

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN DE TOUROS NELORE (*Bos taurus indicus*) DE
ALTA E BAIXA RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA À CRIOPRESERVAÇÃO**

MARIANA FURTADO ZORZETTO

Botucatu – SP
Junho/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN DE TOUROS NELORE (*Bos taurus indicus*) DE
ALTA E BAIXA RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA À CRIOPRESERVAÇÃO**

MARIANA FURTADO ZORZETTO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia Animal para
obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice Oba

Co-orientadores: Dr. Fábio Morato Monteiro

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu – SP

Junho/2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Zorzetto, Mariana Furtado.

Perfil lipídico do sêmen de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) de alta e baixa resistência espermática à criopreservação / Mariana Furtado Zorzetto. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Fábio Morato Monteiro

Coorientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Nelore (Zebu). 3. Espectrometria de massa. 4. Sêmen. 5. Criopreservação. 6. Preservação do sêmen. 7. Lipídios. 8. Reprodução animal.

Palavras-chave: Bovinos; Espectrometria de massa; Lipídios; Sêmen.

Nome do Autor: Mariana Furtado Zorzetto

Título: PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN DE TOUROS NELORE (*Bos taurus indicus*)
DE ALTA E BAIXA RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA À CRIOPRESERVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Eunice Oba
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Drª Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof Dr Gabriel Augusto Monteiro
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
Unicentro Guarapuava - PR

Prof Dr Luís Souza Lima de Souza Reis
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade do Oeste Paulista – Presidente Prudente/SP

Prof Dr João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 01 de Julho de 2016.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais Henrique Donizetti Zorzetto e Antonia Aparecida Furtado Zorzetto, a minha irmã Juliana Furtado Zorzetto. Obrigada pelo apoio, amor incondicional e dedicação para que esse sonho se realizasse.

Dedico aos meus avós Gilda Rodrigues, José Furtado, Anna Aparecida Canciã Zorzetto (in memoriam) e Henrique Zorzetto (in memoriam) que são pessoas muito especiais para mim, sempre me trataram com muito amor e acompanharam meu crescimento.

Dedico a Deus, que sempre me protegendo e iluminando permitiu que eu chegasse até aqui.

Obrigada a todos !!!!

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashiki

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

A Professora Titular Dr^a. Eunice Oba pelos ensinamentos, exemplo, paciência e amizade. Obrigada pela confiança.

Ao Professor Titular Dr. Frederico Ozanam Papa pelo apoio durante o experimento, os ensinamentos, profissionalismo e amizade.

Ao Professor Titular Dr. Alcides Ramos (*in memoriam*) pela ajuda desde o mestrado, por todo aprendizado e experiência passados a mim.

A CAPES pela bolsa de estudos que viabilizou a execução do projeto de pesquisa.

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu/SP, em nome de todos os seus professores e funcionários.

Aos amigos do curso de pós-graduação e companheiros do CERAN da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu - SP, pela convivência, amizade e troca de experiências.

Ao co-orientador Dr. Fábio Morato Monteiro pela paciência, ensinamento, disponibilidade de tempo e pela amizade.

A professora Dra. Claudia Cristina Paro de Paz pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao professor Dr. Edson Lo Turco e sua Orientada Daniela Montani pela grande ajuda com as análises lipídicas.

A Camila Freitas por toda ajuda nas análises realizadas no citômetro de fluxo, paciência e ensinamentos.

Aos funcionários da Fazenda Instituto de Zootecnia por toda ajuda e paciência, sem vocês eu não conseguiria realizar o experimento, meu sincero obrigado.

As colegas de trabalho e amigas Erika e Suzane pelo apoio e ajuda.

Ao meu avô José Furtado por toda ajuda, esforço, paciência e experiência passada, sem o senhor eu não conseguiria chegar aonde cheguei, meu sincero obrigado a você que é meu espelho e pode me acompanhar durante meu experimento no doutorado, tive essa imensa honra, sinto muito de orgulho do senhor.

Aos amigos de pós- graduação Yamê, Gabriel, Carlos Ramies e Guta obrigada pela ajuda durante o experimento, pela amizade, conversas, risadas e todo apoio.

Aos amigos Alexandre, Dayane, Carolina, Juliana, Renata, Débora, Luciane e Renato pelo apoio nas horas de desabafos e dificuldades, e ainda por estarem sempre ao meu lado.

As amigas Aliucha, Karina, Rita, Marina e todos os amigos de Sertãozinho pelo apoio mesmo que de longe, sempre na torcida.

Aos amigos da República Zona Azul pelo seu apoio de forma peculiar e pelo espaço cedido nos momentos de comemorações.

A todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho...

DEDICO, HOMENAGEIO e AGRADEÇO !

MUITO OBRIGADA !!!

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1	Ajuste do htma-ivos-14 para análise espermática em bovinos.....	67
Tabela 2	Médias ajustadas e erro padrão das características: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), espermatozoides rápidos (RAP), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) e integridade da membrana plasmática (IMP) no momento à fresco (T0) e pós-descongelção (T1) entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore.....	73
Tabela 3	Médias ajustadas e erro padrão das características (MPAI), iodeto de propídio negativo e caspase negativa (PI-CASP-) e peroxidação positiva (PER+) no momento pós-descongelção do sêmen entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore.....	73
Tabela 4	Médias ajustadas e erro padrão das características defeitos totais (DEF. TOTAIS), defeitos maiores (DEF. MAI) e defeitos menores (DEF. MEN) entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore.....	74
Tabela 5	Relação massa-carga (m/z), dos íons lipídicos identificados com importância variável na projeção (VIP), subclasses lipídicas e massa erro dos íons analisados pelo teste VIP nos grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore.,.....,....	74
Tabela 6	Relação massa-carga (m/z), dos íons lipídicos identificados com importância variável na projeção (VIP), subclasses lipídicas e massa erro dos íons analisados pelo teste VIP nos grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no plasma seminal de touros Nelore.....	75

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Representação gráfica da diferença do perfil lipídico, analisado por PLS-DA, entre os grupos A (vermelho, baixa resistência) e B (verde, alta resistência) nos espermatozoides de touros Nelore.....	77
Figura 2	Representação gráfica da diferença do perfil lipídico do plasma seminal do sêmen de touros Nelore, analisado por PLS-DA, entre os grupos A (vermelho, baixa resistência) e B (verde, alta resistência).....	78
Figura 3	Pontuação VIP diferenciando a abundância dos íons entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) nos espermatozoides de touros Nelore. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas dos íons em cada grupo estudado.....	79
Figura 4	Pontuação VIP diferenciando a abundância dos íons do plasma seminal entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) do sêmen de touros Nelore. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas dos íons em cada grupo estudad.....	80

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

AO: acridina laranja

CASA: Análise computadorizada do movimento espermático;

CDFA: diacetato de carboxifluoresceína

DIC: microscopia de interferência diferencial

DMAI: defeitos maiores

DMEN: defeitos menores

DNA: ácido desoxirribonucleico

IA: Inseminação artificial;

IMP: Integridade da membrana plasmática;

mL: Mililitro;

mM: miliMol

MP: Motilidade progressiva;

MPAI: Membrana plasmática e acrossomal íntegras;

MT: Motilidade total;

NL₂: Nitrogênio líquido;

pH: concentração de ions de hidrogênio

PI: Iodeto de propídeo;

RAP: Espermatozoides com movimento rápido;

ROS: Espécies reativas de oxigênio;

SAS: Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)

VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média;

VCL: Velocidade curvilinear;

VOL: volume

VSL: velocidade progressiva;

μL: Microlitro;

m/z: relação massa-carga

VIP: importância variável na projeção

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	IX
Lista de Figuras	XI
Lista de Abreviaturas	XIII
Resumo	XVIII
Abstract	XX
1. Introdução	23
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. Revisão de Literatura	28
3.1. Célula espermática	28
3.2. Composição das membranas espermáticas	29
3.3. Lipídios das membranas espermáticas	30
3.4. Plasma seminal	32
3.5. Crioprotetores	35
3.6. Criopreservação do sêmen bovino	37
3.7 Alterações dos parâmetros espermáticos decorrentes da congelação	37
3.8. Análises realizadas pela Citometria de Fluxo	41
3.8.1 Integridade da Membrana Plasmática e Acrossomal.....	41
3.8.2 Peroxidação Lipídica	42
3.8.3 Ativação de caspase	42

3.9. Espectrometria de Massa	43
4. Referências	46

Capítulo 1

5. Análise lipídica do ejaculado de touros da raça Nelore (<i>Bos taurus indicus</i>) de alta e baixa resistência espermática à criopreservação	61
7. Considerações Gerais	97
8. Anexos	99

Resumo

ZORZETTO, M. F. **Perfil lipídico do sêmen de touros nelore (*Bos taurus indicus*) de alta e baixa resistência espermática à criopreservação**. Botucatu, 2016. 101p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A composição dos lipídeos da membrana espermática e do plasma seminal estão entre os fatores que podem influenciar a capacidade fecundante do sêmen. Desta maneira, este estudo objetivou analisar as diferenças do perfil lipídico do ejaculado de bovinos da raça Nelore, resistentes e sensíveis à criopreservação. Foram utilizados 15 touros da raça Nelore para colheitas de sêmen utilizando eletroejaculador. Os ejaculados foram diluídos com meio convencional na concentração de 25×10^6 espermatozoides/palheta. Os animais foram divididos em dois grupos conforme a resistência pós-criopreservação, grupo A (*Bad freezer*, touros sensíveis à criopreservação) e grupo B (*Good freezer*, touros resistentes à criopreservação). O sêmen fresco foi analisado quanto morfologia realizada por microscopia de interferência diferencial (DIC), cinética espermática e integridade da membrana. Na pós-descongelação as amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal, caspase ativa, peroxidação lipídica. A análise do perfil de lipídios foi realizada por espectrometria de massa MALDI-MS. Foi possível observar diferença no perfil lipídico dos espermatozoides e do plasma seminal entre os grupos, com maior abundância relativa dos íons m/z 704,59; m/z 804,59 e m/z 943,77 no grupo A nos espermatozoides. No plasma seminal houve maior abundância relativa de 34 íons lipídicos nos touros do grupo B. Assim sendo, conclui-se que existe diferença no perfil de lipídios dos espermatozoides e no plasma seminal de touros sensíveis ou resistentes à criopreservação.

Palavras-chave: lipídios, sêmen, espectrometria de massa e bovinos.

Abstract

ZORZETTO, M. F. **Lipid profile the bull's semen Nelore (*Bos taurus indicus*) high and low sperm cryopreservation resistance.** Botucatu, 2016. 101p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Lipid compositions of the sperm membrane are among the factors that can influence the semen fertilizing capacity. Likewise, the lipid composition of seminal plasma can interfere in sperm quality. In this sense, this study aimed to analyze differences between lipid profile of the ejaculate and sperm parameters from bulls (Nelore breed) which are resistant and susceptible to cryopreservation. In the study 15 Nelore bulls were used for semen collection by electroejaculation. The samples were diluted with yolk egg-based extender (Botu-Bov®). The animals were divided into two groups according to semen quality after cryopreservation: group A (Bad freezer, bulls sensitive to cryopreservation) and group B (Good freezer, bulls resistant to cryopreservation). Fresh semen was analyzed for sperm morphology by differential interference contrast microscopy (DIC), kinetic parameters by CASA and by plasma membrane integrity by epifluorescence microscopy. In post-freezing the samples were evaluated for kinetic parameters by CASA, sperm viability by flow cytometry (plasma and acrosomal membrane integrity, lipid peroxidation and active caspase) and plasma membrane integrity by epifluorescence microscopy. Analysis of lipid profile were carried out by mass spectrometry MALDI-MS of the sperm membrane lipids (Experiment 1) and from seminal plasma (Experiment 2). In Experiment 1 was observed difference in sperm lipid profile between the groups. The group A showed highest relative abundance of ions m/z 704.59; m/z 804.59 e m/z 943.77 on spermatozoa. In seminal plasma, there was a greater relative abundance of 34 lipid ions in bulls than group B. Therefore, in conclusion there are differences in the sperm lipid profile and seminal plasma lipid profile between sensitive or resistant bulls to semen cryopreservation.

Keywords: lipids, semen, mass spectrometry and cattle.

Introdução

1. Introdução

A eficiência produtiva e reprodutiva na pecuária brasileira pode ser melhorada utilizando biotecnologias da reprodução para o aperfeiçoamento do sistema de produção, aumentando a renda percapita, diminuindo os custos e acelerando a provação de animais geneticamente superiores.

A criopreservação de gametas tornou-se essencial para a aplicação dessas tecnologias, por eliminar as limitações de tempo e distância (PARKS, 1997). Atualmente, muitos proprietários rurais recorrem a congelação de sêmen de seus touros reprodutores, para facilitar o manejo na fazenda, como também conseguem manter um banco genético importante para o rebanho e utilizá-lo em futuras estações de monta.

Dentre as biotecnologias da reprodução, a inseminação artificial (IA) é uma tecnologia que causa maior impacto nos programas de seleção e consequentemente o melhoramento genético de bovinos. A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado ainda é dependente de vários passos não fisiológicos, que envolvem a adição de um agente crioprotetor hipertônico permeável, resfriamento, congelação, aquecimento e a remoção do crioprotetor (WOODS et al., 2004). Todos esses passos possuem relação com a estrutura funcional das membranas espermáticas e metabolismo celular, podendo causar danos aos espermatozoides.

A perda de viabilidade dos espermatozoides após o processo de congelação está relacionada principalmente a ruptura na membrana plasmática (WHITE, 1993). Estudos sugerem que os espermatozoides de cada espécie possuem diferentes propriedades criobiológicas, bem como apresentam variação quanto à sensibilidade e tolerância osmótica à congelação (KATKOV et al., 1999, PHELPS et al., 1999).

A composição lipídica da membrana espermática influencia na capacidade fecundante do sêmen. Sabe-se que os lipídeos desempenham importantes papéis nas membranas espermáticas, participando dos processos de interação entre gametas e influenciando o comportamento físico-químico dos espermatozoides durante os processos de criopreservação (FERREIRA et al., 2010).

Os procedimentos de congelação e descongelação acarretam quedas da fertilidade quando comparada àquela do sêmen a fresco. Existem touros que apresentam baixa resistência espermática à congelação seminal. Muitos fatores podem prejudicar à resistência espermática à criopreservação, como os fatores genéticos (WHITE, 1993, LEITE et al., 2010). Ainda, destacam-se os que estão relacionados à composição da

membrana plasmática espermática (PARKS e LYNCH, 1992, GARCIA et al., 2011) e do plasma seminal (FERRUSOLA et al., 2009, ALVAREZ et al., 2008).

As pesquisas do perfil lipídico em ejaculados de touros Nelore possibilitam uma análise mais minuciosa da qualidade do sêmen em níveis bioquímicos, ultra-estruturais e funcionais na membrana plasmática espermática. Portanto, o estudo teve como objetivo avaliar as diferenças no perfil lipídico do ejaculado e dos parâmetros espermáticos de bovinos da raça Nelore que são resistentes e sensíveis às injúrias decorrentes da criopreservação.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar perfil lipídico de bovinos da raça Nelore resistentes e sensíveis à criopreservação.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar o perfil lipídico do ejaculado de touros com alta e baixa resistência à criopreservação, pela espectrometria de massa MALDI-MS.
- Avaliar a cinética espermática com o emprego do analisador computadorizado dos movimentos espermáticos (CASA), pré e pós-descongelação de animais com alta e baixa resistência à criopreservação;
- Avaliar a integridade da membrana, com a associação das sondas fluorescentes diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP), nos momentos pré e pós-descongelação e entre animais sensíveis e resistentes à criopreservação;
- Avaliar a integridade do acrossoma, integridade da membrana citoplasmática, presença de caspase ativa e peroxidação lipídica com o uso da técnica de citometria de fluxo, após a descongelação das amostras de sêmen entre os animais sensíveis e resistentes à criopreservação;
- Avaliar as alterações morfológicas (defeitos) em microscopia de interferência diferencial (DIC) entre os animais sensíveis e resistentes à criopreservação;

Revisão de Literatura

3. Revisão de literatura

3.1 Célula espermática

Os espermatozoides, constituídos por cabeça e cauda, que por sua vez é subdividida em três peças: intermediária, principal e terminal, são recobertos pela membrana plasmática. A cabeça do espermatozoide é formada pelo acrossomo, lâmina pós-acrosomal, e núcleo. No núcleo os dois terços anteriores são sobrepostos pelo acrossoma, que formam uma vesícula especializada originada do complexo de Golgi, uma membrana de duas camadas que contém enzimas hidrolíticas essenciais para a penetração do espermatozoide no oócito. O núcleo preenche a maior parte da cabeça do espermatozoide e é onde fica armazenado o material genético em formato de DNA altamente condensado e contido por dupla camada nuclear. O espaço entre a cabeça e o pescoço na célula espermática é bem definida por um anel e é o local de fixação da membrana plasmática com o envelope nuclear na base da cabeça (BRITO, 2007).

A célula espermática é formada em processo único contendo várias divisões meióticas e mitóticas das espermatogônias. A transcrição de proteínas e adição final de protaminas leva a substituição das histonas e organização da cromatina. O DNA espermático é organizado de forma específica mantendo a cromatina no núcleo compacta e estável, e ocupa praticamente todo o núcleo espermático (D'OCCHIO, et al., 2007).

Na bainha mitocondrial localiza-se a peça intermediária que contém as mitocôndrias, responsáveis pela produção de ATP, através de fosforilação oxidativa, sua função é a de suprimento energético para os movimentos flagelares (COSSON, 1996). Desta forma, o ATP é importante, entre outros fatores, no processo de manutenção da bomba de Na^+ e K^+ , responsável pela regulação química e no transporte de gradientes eletrolíticos. Assim, a integridade funcional das mitocôndrias é um fator importante na sobrevivência da célula espermática durante o trajeto pelo trato reprodutivo da fêmea, nas aplicação das biotécnicas reprodutivas (SILVA e GADELLA, 2006).

A reação acrossomal, resultante da liberação e ativação das enzimas acrossomais, é ativada pela ligação do espermatozoide com a zona pelúcida. A penetração do espermatozoide na zona pelúcida é facilitada por esse processo associado com a hiperativação da motilidade (HONDA et al., 2002). Desta maneira, a fertilização só ocorrerá caso o acrossomo permaneça intacto durante todo trajeto espermático pelo trato reprodutor feminino até o momento final da ligação com a zona pelúcida. No caso

da reação acrossômica ocorrer prematuramente é observada queda no índice de fertilidade do sêmen (SILVA e GADELLA, 2006).

3.2 Composição das membranas espermáticas

A membrana plasmática é constituída por bicamada lipídica contendo proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em composição fluída. Esses componentes permanecem agregados á regiões específicas da membrana, sendo essas cabeça, peça intermediária e o flagelo (GADELLA e HARRISON, 2000). Desta maneira, a integridade da membrana torna-se essencial para o metabolismo normal do espermatozoide, capacitação e reação acrossômica. Pode ser utilizada para avaliar a viabilidade espermática (JANUSKAUSKAS et al., 2000; GARNER et al., 1997).

A membrana plasmática exerce função essencial para a sobrevivência espermática no trato reprodutivo feminino e manutenção da capacidade fecundante. Possuindo uma especificidade particular, atuando como barreira seletiva entre os componentes do meio intra e extracelular e quando ocorre alguma mudança na sua estrutura, sua função torna-se comprometida (CUNHA, 2015). A membrana espermática, é de estrutura assimétrica, e sua bicamada lipídica é composta por faces interna e externa. Seus diferentes componentes possuem afinidades específicas com cada região recoberta por sítios de ligação (GWATHMEY et al., 2006). Desta forma, cada região da membrana plasmática é considerada como domínios de funções específicas. Na região da cabeça do espermatozoide ela exerce função de interagir com o ovócito; enquanto que na região que recobre a peça intermediária, estão localizadas as mitocôndrias envolvidas na produção de energia e na região do flagelo, ela esta envolvida na motilidade (FLESCHE e GADELLA, 2000).

As proteínas presentes na membrana plasmática realizam o transporte específico de moléculas, este transporte pode influenciar a fluidez e permeabilidade da membrana. A fluidez da membrana está diretamente relacionada com os lipídios que a compõem (ALBERTS et al., 1994), quantidade de colesterol, níveis de saturação dos ácidos graxos e fosfolipídios presentes na membrana (WOLFE et al., 1998), assim como pela temperatura a qual é exposta (ALBERTS et al., 1994; FLESCHE e GADELLA, 2000; CELEGHINI, 2005;).

As moléculas lipídicas da membrana plasmática, são anfipáticas, possuindo região hidrofílica (polar) voltada para o meio externo e superfície hidrofóbica (apolar),

voltada para o meio interno (CUNHA, 2015). Dos lipídios que compõem a membrana plasmática o que pode ser encontrado em maior abundância são os fosfolipídios: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielina. Esses lipídios na membrana plasmática possuem tamanhos e disposição diferentes, fato importante que influencia no agrupamento das moléculas e afeta a fluidez (ALBERTS et al., 1994).

A membrana plasmática é uma estrutura na qual ocorrem constantes mudanças entre seus componentes e sua disposição aleatória por serem de movimentação livre. Essa movimentação confere fluidez a membrana, quando a mesma encontra-se em temperatura ambiente, essa fase da membrana é conhecida como estado líquido-cristalino. A fluidez da membrana, ainda pode ser influenciada pela proporção colesterol:lipídeos e os tipos de lipídios presentes (AMANN e GRAHAM, 2010). De forma geral, a maior quantidade de colesterol na membrana a torna menos flexível, fluída e permeável (AMANN e GRAHAM, 2010; ALBERTS, 1994; GIRAUD, 2000).

3.3 Lipídios das membranas espermáticas

A bicamada lipídica da membrana espermática é composta por fosfolipídios e colesterol, entremeados por proteínas. As principais classes de fosfolipídios presentes nos espermatozoides do mamíferos são a colina, etanolamina e esfingomielina (AMANN e GRAHAM, 2010).

Os mamíferos em sua maioria contém como principal ácido graxo o ácido docosa-hexanóico na composição da membrana plasmática dos espermatozoides, no entanto na membrana espermática dos equinos, pássaros e ovinos o principal ácido graxo é o ácido docosa-pentanóico (PARKS e LYNCH, 1992; GARCIA et al., 2011b). A membrana espermática de várias espécies de mamíferos, são constituídas em 60% pelos ácidos graxos poli-insaturados, o que resulta em maior fluidez da membrana devido à quantidade de duplas ligações ou ligações insaturadas presentes (VALENÇA e GUERRA, 2007).

A fluidez da membrana plasmática confere maior resistência à célula espermática exposta a criopreservação (GIRAUD et al., 2000). Go e Wolf (1983) relataram, que o colesterol causa o desaparecimento da fase de transição da esfingomielina quando presente nas propriedades dos fosfolipídios, aumento o estado fluido intermediário da membrana e acarretando em um estado líquido-cristalino dos lipídios ao invés do gel. O colesterol ainda pode causar diminuição da permeabilidade da membrana, influenciando na movimentação dos componentes e a atividade das

enzimas ligadas à membrana (YEAGLE, 1985).

As modificações na composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide é fator importante na viabilidade dessas células quando submetidas à criopreservação (PARKS e LINCH, 1992).

A fosfatidilserina entre outros fosfolipídios localizados no folheto interno da membrana plasmática é exposta para o folheto externo quando ocorre danos na membrana como no choque frio ou em graves danos decorrentes da refrigeração (GRAHAM, 2010).

A distribuição do colesterol na membrana espermática não é uniforme, apresentando maiores concentrações na porção extracelular da membrana plasmática em relação à intracelular. Wales e White (1959) relataram que as espécies de mamíferos com espermatozoides contendo menor teor de colesterol apresentam menor resistência ao choque frio. Poulos et al. (1973) observaram que as espécies com menor resistência à criopreservação, apresentam maior quantidade lipídios insaturados na membrana espermática. Além disso, Quinn e White (1967) indicaram relação entre a perda de fosfolipídios durante o trânsito no epidídimo e baixa resistência espermática a criopreservação em espermatozoides de carneiros.

A criopreservação seminal pode causar lesões celulares pela alteração ou ruptura das estruturas da membrana, e ainda por modificar funções espermáticas. O resfriamento rápido dos espermatozoides de 20°C a 5°C induz danos irreversíveis para a membrana celular, caracterizada pela perda de lipídios da membrana para o meio extracelular e conseqüentemente perda de íons e moléculas intracelulares. A maior referência na proteção espermática proporcionada pelos fosfolipídios à criopreservação é utilização da gema de ovo, sendo está um dos principais componentes dos meios diluidores na congelação de sêmen. O componente presente que confere essa proteção à membrana é o fosfolipídio lecitina (MEDEIROS et al. 2002).

Schiller et al., (2003) estudaram fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide bovino e observaram que a fosfatidilcolina (FC) corresponde a maior fração dos fosfolipídios presentes na membrana, em menor proporção está a esfingomielina (SE) e fosfatidiletanolamina (FE). Neste mesmo estudo, relataram uma quantidade significativa de FC e FE formadas por ligações do tipo éter, alquil e alquenil e uma pequena parcela no formato de ligações do tipo diacil.

No estudo realizado com garanhões por Garcia et al. (2011a) observou-se alta quantidade de fosfolipídios presentes na membrana plasmática desses animais, e que

resulta na redução da peroxidação lipídica após a congelação do sêmen. Ainda, Garcia et al. (2011b) em um segundo estudo, relataram que a composição, a proporção de lipídios na membrana espermática de equinos interferem na peroxidação lipídica da mesma, podendo alterar a criotolerância espermática.

Há relatos na literatura que menores quantidades de colesterol presentes na membrana de bactérias diminuem a tolerância da mesma a exposição a baixas temperaturas (WHITE, 1993). Darin-Bennett e White (1977) analisaram espermatozoides de coelhos, humanos, bovinos e ovinos, e relataram que os espermatozoides das espécies mais resistentes ao choque térmico apresentavam maiores taxas de colesterol:fosfolipídios em relação as espécies mais susceptíveis á danos decorrentes da congelação.

Estudos com espermatozoides humanos demonstraram alta presença dos ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, docosa-hexanóico e araquidônico em espermatozoides defeituosos (KHOSROWBEYGI e ZARGHAMI, 2007). Combes et al. (2000) incorporando colesterol à membrana plasmática de espermatozoides equinos, através de complexo de inclusão com ciclodextrina, obtiveram melhora da cinética espermática e integridade de membrana.

3.4 Plasma Seminal

A porção aquosa do sêmen que é adicionada aos espermatozoides durante o transporte epididimário e a ejaculação é denominado de plasma seminal (PS). Esse fluido é produzido pelo epidídimo e glândulas sexuais anexas (BURROUGHS et al., 2013).

O plasma seminal é uma secreção complexa que contribui significativamente para o volume do sêmen (REGO et al., 2015) e é de grande importância fisiológica por carrear os gametas masculinos até o sistema reprodutor feminino, dando condições para a viabilização do processo de fertilização (RONCOLETTA et al., 1999).

Na espécie bovina o plasma contém variadas funções, do transporte ao trato genital feminino (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; BERGERON et al., 2004), a participação no processo de capacitação espermática, reação acrossomal, (THÉRIEN; BLEAU; MANJUNATH, 1995; THÉRIEN; SOUBEYRAND; MANJUNATH, 1997; MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; MOURA et al., 2007) fertilização, (MOURA et al.,

2007; GWATHMEY et al., 2006; SOUZA et al., 2008) na proteção ao estresse oxidativo e peroxidação lipídica (MOURA et al., 2007; RAO et al., 2013).

O plasma seminal tem como principal componente e em abundância a proteína, e tal componente é considerado o modulador dominante da função dos espermatozoides (LEAHY; GRAAF, 2012).

As proteínas do plasma seminal advindas do epidídimo desempenham papéis na maturação final dos espermatozoides, já as proteínas das glândulas sexuais anexas contribuem na capacitação espermática, motilidade, reação acrossomal, proteção dos espermatozoides ao estresse oxidativo e respostas imunes (KELLY et al., 2006; MOURA et al., 2007; MOURA et al., 2010; REGO et al., 2014, REGO et al., 2015). Outro importante papel das proteínas do plasma seminal é a remodelação da membrana dos espermatozoides, no transporte de substâncias lipofílicas e íons e na proteção dos espermatozoides a reações oxidativas e ataque imunológico, também na prevenção a uma reação acrossômica prematura, essas funções são atribuídos as proteínas presentes no fluído da cauda do epidídimo de touros (MOURA et al., 2010).

A proteína ácida do fluido seminal (aSFP), é uma proteína importante encontrada em grande quantidade no plasma seminal de bovinos, secretada pelas vesículas seminais, ampolas e epidídimo. É considerada um bom marcador bioquímico para a alta fertilidade dos touros (RONCOLETTA, 2003), por preservar a integridade da membrana, agindo como um redutor da peroxidação lipídica espermática, além de regular de acordo com a sua concentração, a atividade mitocondrial e a motilidade espermática (SCHÖNECK; BRAUM; EINSPANIER, 1996).

Segundo relatos de Jobim et al. (2003) e Roncoletta et al. (1999) em bovinos existe diferença nas proteínas do plasma seminal entre os animais que tem boa resposta à congelação e aqueles que são mais sensíveis ao processo, sugerindo que o estudo dessas proteínas poderiam ser utilizadas como marcadores da congelabilidade ou funcionar como biomarcadores da fertilidade. Outro estudo mais recente, demonstrou que as proteínas do plasma seminal podem servir como biomarcadores da fertilidade em touros e sugere-se que a avaliação simultânea da expressão dessas proteínas, juntamente com outros ensaios de fertilidade possa ajudar a determinar a fertilidade em bovinos (ASLAM et al., 2014).

O plasma seminal e os espermatozoides possuem função antioxidante composta por diferentes substâncias, como a taurina, glutathiona reduzida (GSH), a glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) na prevenção do

dano oxidativo. Porém, esta capacidade antioxidante é limitada nas células espermáticas, devido ao componente citoplasmático que contém os antioxidantes ser de tamanho reduzido, demonstrando a importante função do plasma seminal na prevenção do estresse oxidativo (SARIÖZKAN et al., 2009). Estudos realizados recentemente na espécie bovina, relataram que o fator touro é responsável por mais de 86% da variação da capacidade antioxidante total no plasma seminal, enquanto o fator ejaculado contribui com apenas 2% dessa variação (GÜRLER; CALISICI; BOLLWEIN, 2015).

No entanto, apesar dos relatos sobre o efeito benéfico do plasma seminal aos espermatozoides, o mesmo também já foi descrito como prejudicial (BERGERON et al., 2004), fato que está relacionado com o tempo de contato entre eles (MANJUNATH et al., 2007).

Na monta natural o espermatozoide passa um intervalo de tempo relativamente curto em contato com o plasma seminal, mas durante o processamento do sêmen para a criopreservação ou sexagem, o espermatozoide pode passar horas, até mesmo um dia, no plasma seminal diluído (BURROUGHS et al., 2013). Alguns autores, relataram que em garanhões a presença do plasma seminal tem efeito muito pequeno para a qualidade e viabilidade espermática quando o sêmen é congelado logo após a colheita, porém, quando o sêmen é exposto por um longo tempo ao plasma seminal antes da congelação, ele torna-se prejudicial para a sobrevivência espermática pós-congelação (MOORE, SQUIRES e GRAHAM, 2005).

As proteínas mais encontradas no plasma seminal bovino (50 a 70%) são as BSPs, decorrentes de uma família de proteínas de ligação a fosfolipídeos (MANJUNATH et al., 2007). Manjunath et al. (2002), descreveram suas funções, principalmente em relação ao efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana do espermatozoide que se relacionam com o processo de capacitação espermática. Este efluxo é concentração e tempo dependente e, por isso, a exposição contínua das células espermáticas ao plasma seminal pode ser nociva à membrana dos espermatozoides (THÉRIEN; MOREAU; MANJUNATH, 1999, BERGERON et al., 2004). Fato que pode tornar o espermatozoide mais sensível ao processo de preservação através da criopreservação (MANJUNATH et al., 2007) ou levar a uma capacitação prematura pós-descongelação, afetando o processo de fertilização (NAUC; MANJUNATH, 2000).

O grande conjunto de dados gerados referentes à reprodução na indústria da IA nos rebanhos geraram mais informações sobre a função das BSPs nos touros (LEAHY; GRAAF, 2012). Foi relatado que a abundância relativa de BSP1 (D'AMOURS et al.,

2010) e BSP3 (RONCOLETTA et al., 2006) é positivamente associada com baixa fertilidade. O mesmo foi relatado em outro estudo com a BSP 30 kDa que em maiores quantidades tornou-se prejudicial para a fertilidade (MOURA et al., 2006) fato que corrobora com estudos que relatam que a exposição do espermatozoide a concentrações crescentes de BSP provoca danos na membrana espermática, resultante de um excesso de efluxo de lipídios (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

Na espécie equina, a remoção do plasma seminal é um processo essencial para refrigeração ou criopreservação do sêmen (LOOMIS, 2006; RAMIRES NETO et al., 2013b). Vários estudos já relataram que o plasma seminal apresenta efeitos deletérios para refrigeração do sêmen equino (KARESKOSKI; KATILA, 2008; RIGBY et al., 2001; BRINSKO et al., 2000). Ramires Neto et al. (2013) relataram que na refrigeração do sêmen de alguns garanhões, a presença do plasma seminal causa menor qualidade e viabilidade espermática. A motilidade espermática e integridade do DNA apresentam-se superiores em amostras com remoção completa do plasma seminal, quando comparadas as amostras com plasma seminal (LOVE et al., 2005).

3.5 Crioprotetores

A primeira etapa envolvida na criopreservação é a diluição do sêmen com meios específicos, na tentativa de evitar os efeitos deletérios da técnica (FOOTE, 1982).

A diluição do sêmen é importante por permitir uma proteção efetiva do sêmen com antibióticos, minimizando a possibilidade de transmissão de patógenos ou de organismos potencialmente patogênicos, prolongar a sobrevivência dos espermatozoides e protegê-los de condições ambientais desfavoráveis, aumentar o volume ejaculado, reduzir os efeitos tóxicos dos subprodutos do metabolismo espermático e possibilitar a avaliação apropriada da motilidade espermática individual, evitando, ao mesmo tempo, a aglutinação dos espermatozoides (BITTENCOURT, 2009).

Porém, os diluidores e crioprotetores podem causar danos irreversíveis aos espermatozoides se a estrutura físico-química da célula for afetada, diminuindo assim a motilidade e a capacidade fecundante (PICKETT et al., 1987).

Os agentes crioprotetores mais utilizados são: gema de ovo, glicerol e açúcares, sendo empregados em diferentes porcentagens de acordo com a composição dos diluidores (CHACUR, 1996).

A gema de ovo e o leite de vaca são as principais fontes de lipídeos e lipoproteínas utilizadas na preparação de diluentes de congelção de sêmen bovino, porém a maioria dos extensores disponíveis comercialmente são produzidos à base de gema de ovo (DEJARNETTE et al., 2000). Existe outros meios sendo utilizados na criopreservação seminal utilizando como base o leite integral homogeneizado, leite desnatado e água de coco, porém a gema de ovo é o elemento mais utilizado na criopreservação de espermatozoides bovinos (AMIRAT et al., 2005).

A gema de ovo é amplamente empregada como crioprotetor não permeável, operando na proteção espermática contra o choque frio (MOUSSA, et al., 2002). A proteção desempenhada pela gema de ovo e seus mecanismos de ação, ainda não foi bem esclarecida (MEDEIROS et al., 2002). No entanto várias pesquisas indicam a presença de lipoproteínas de baixa densidade (LPLs) na composição de pequenas frações da gema de ovo. Essas lipoproteínas são as responsáveis pela resistência ao choque frio (HOLT, 2000; MOUSSA et al., 2002; VISHWANATH e SHANNON, 2000).

O mecanismo de ação e a associação das LPLs presentes na membrana dos espermatozoides, conferindo crioproteção dessa célula são especulados em diversos trabalhos científicos. Assim sendo, foi sugerido por Holt (2000) que a ação das LPLs, deriva das alterações ocorridas na permeabilidade celular, ou seja, da interação entre as LPLs, água e íons presentes nas estruturas da membrana espermática, esses eventos culminam com a ativação de bombas iônicas e afetam o comportamento osmótico celular e a permeabilidade a crioprotetores como o glicerol.

Contradizendo esses relatos, Manjunath et al., (2002), observaram que as LPLs interagem com proteínas de baixo peso molecular que compõem o plasma seminal (família das BSPs) e essas mesmas atuam na potencialização de moléculas capacitantes como as lipoproteínas de alto peso molecular e glicosaminoglicanos. Segundo esse mesmo estudo as BSPs têm atuação direta na desestabilização da membrana plasmática utilizando a retirada de colesterol e fosfolipídeos, função essa extinguida ou suprimida pela interação protéica com as LPLs, indicando, o possível e mais provável, mecanismo de ação da gema de ovo na proteção espermática.

Vishwanth e Shannon (2000) observaram que devido à variedade de diferentes meios diluidores utilizados, a quantidade de gema adicionada aos mesmo é muito variável, em média utiliza-se concentrações de 15% a 30% do volume total dos meios de criopreservação.

Crespilho (2010) relatou que os diluidores TRIS e Botu-Bov® (que possuem a gema de ovo em suas composições) foram mais efetivos para a congelação do sêmen de touros, mostrando-se mais vantajosos em relação ao meio Botu-Bov® a base de lecitina de soja (BB-L) pela produção de maior número de amostras seminais adequadas para a utilização em programas de IA.

3.6 Criopreservação do sêmen bovino

Os princípios básicos da criopreservação do sêmen são a suspensão do metabolismo e a manutenção das características espermáticas por um período prolongado de tempo (AMANN e PICKETT, 1987). A qualidade do sêmen criopreservado é um dos fatores que afeta a probabilidade de concepção (SAACKE, 1984).

O processo de criopreservação requer que os espermatozoides sejam submetidos à refrigeração moderada e controlada, visando preservar a função principal dessas células, que é a fecundação do ovócito (HOLT, 2000). O controle da taxa de redução da temperatura diminui a possibilidade de perda da viabilidade celular, por diminuir a formação de cristais de gelo no interior da célula espermática (KUMAR et al., 2003).

Os protocolos utilizados na criopreservação do sêmen bovino geralmente incluem o resfriamento do sêmen à 4 a 5°C, seguido pela manutenção da temperatura por um intervalo variável de equilíbrio (de 30 minutos a 24 horas) e posteriormente a congelação (LEITE et al., 2010).

Estudando a utilização de 4 ou 18 horas de tempo de equilíbrio em sêmen de touros holandeses, Foote et al. (2001) chegaram à conclusão de que quatro horas foram suficientes para o sêmen tornar-se apto à uma boa congelação/descongelação e com boa porcentagem de sobrevivência dos espermatozoides.

O período de equilíbrio varia de acordo com a espécie animal, com o protocolo de congelação/descongelação e também segundo o meio diluente utilizado (CHACUR, 1996).

3.7 Alterações da estrutura espermática pós-criopreservação

As principais injúrias celulares relacionadas ao choque frio ocorrem entre 15° a 5°C (STORNELLI et al., 2005; WATSON, 2000), levando a queda significativa na motilidade espermática e atividade metabólica (BLACKSHAW e SALISBURY, 1957).

O termo choque térmico define um conjunto de alterações ocorridas na célula espermática de mamíferos submetidas à refrigeração rápida, da temperatura corpórea ($\pm 38^{\circ}\text{C}$) à temperaturas próximas a 5°C , resultando no decréscimo da motilidade espermática, assim como em mudanças na bioquímica e no funcionamento destes gametas (WATSON, 2000).

Outro ponto crítico da criopreservação é o “efeito solução”, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, elevada concentração de solutos, modificação do pH e consequente alteração na função do espermatozoide (FAHY, 1980). Segundo Watson (1995), quando a célula espermática é submetida a congelação lenta, há tempo suficiente para que grande quantidade de água intracelular migre para o ambiente extracelular, estabelecendo o equilíbrio entre solvente e soluto. Desta forma, torna-se estritamente necessária a descongelação na mesma intensidade, ou seja, de forma lenta, para que a célula, ao ser reidratada, não sofra rompimentos das membranas biológicas pela rápida reconstituição do volume intracelular.

O processo de congelação rápida, aliado à descongelação lenta, implicará danos causados pela formação de pequenos cristais de gelo, os quais podem se agrupar formando cristais grandes, que rompem a membrana (WATSON, 2000). Importante salientar que a curva de congelação ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem, e rápida o bastante para evitar que as células espermáticas fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações de soluto (SNOECK, 2003).

As diferentes espécies apresentam variações de fragilidade espermática ao processo de refrigeração, essas podem ser conferidas pelas modificações na composição da membrana plasmática. A sensibilidade da membrana espermática em ser submetida às mudanças que ocorrem durante a refrigeração é contrariamente relacionada com a proporção de colesterol presente na membrana. Ainda está relacionada com o grau de instauração e quantidade de ácidos graxos que compõem a mesma, sendo que, altos índices de ácidos graxos saturados causam maior susceptibilidade a danos na membrana (DROBNIS et al., 1993).

Existem fatores bioquímicos específicos que podem afetar a capacidade espermática de evitar os danos provocados pelos procedimentos criogênicos (RAIZADA et al., 1990, ANDRABI et al., 2008). As diferenças na quantidade de lipídeos

nos

espermatozoides entre espécies diferentes é uma das causas de menor congelabilidade do sêmen (JAIN e ANAND, 1976; TATHAM, 2000).

Na espécie bovina a fosfatidilcona está presente em torno de 50% na composição lipídica da membrana espermática. Da mesma maneira, a fosfatidiletanolamina corresponde a apenas 10% da membrana em bovinos (PARKS et al., 1997).

A membrana plasmática espermática sofre alterações em sua estrutura tentando se adequar às mudanças de temperatura que ocorrem durante os processos de criopreservação. A translocação de fosfolipídeos é uma delas, com a externalização da fosfatidilserina. Modificações ocorridas nas membranas espermáticas durante o procedimento de congelamento e descongelamento são semelhantes às alterações fisiológicas da capacitação (SILVA et al., 2009a).

Alterações diferem os processos fisiológicos observados durante a capacitação dos mecanismos envolvidos na troca dos lipídeos entre o meio interno e externo da membrana plasmática, como a fosforilação da tirosina e efluxo de colesterol, que podem ser observados nos espermatozoides criopreservados (SILVA e GADELLA, 2006). Análoga à capacitação, a criopreservação provoca maior fluidez e exposição de sítios de ligação à moléculas externas na membrana plasmática, requerendo rapidez na capacitação da célula (THOMAS et al., 2006).

No plasma seminal geralmente são encontradas moléculas pró-oxidantes denominadas de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS), que estão associadas ao metabolismo aeróbico. As ROS podem desempenhar funções fisiológicas ou deletérias nos espermatozoides, seu papel varia de acordo com as concentrações em que são encontradas no plasma. As mesmas quando em concentrações fisiológicas, podem fazer parte de processos vitais das células espermáticas como maturação, capacitação, hiperativação, reação do acrossoma e fusão espermatozoide-oócito. No entanto, em níveis deletérios induzem ao processo de peroxidação lipídica, causando danos ao DNA e até a apoptose da célula espermática (KOTHARI et al., 2010).

O oxigênio apresenta efeitos tóxicos a célula, resultantes da oxidação de componentes como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, mediados por ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS; GILLE e SINGLER, 1995). Essas espécies reagem em contato com os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, e

consequentemente, desencadeia o processo de lipoperoxidação (WILLIAMS e FORD, 2005).

A vulnerabilidade da célula espermática à ação das ROS está ligada a presença das duplas ligações nas moléculas da membrana plasmática, sendo o fator iniciante da cascata da peroxidação lipídica, objetivando estabilizar os elétrons desemparelhados destes radicais (IRVINE, 1996).

Na célula espermática equina foi observado que durante a congelação e descongelação, a mesma apresenta maior ação da peroxidação lipídica do que no espermatozoide refrigerado ou não exposto à esses processos (NEID et al., 2002). Resultados semelhantes, também foram encontrados no sêmen de búfalos (KADIRVEL et al., 2009).

A apoptose é marcada por diversas mudanças estruturais e bioquímicas que podem ocorrer nas células, como a agregação da cromatina, condensação citoplasmática e mudanças nas membranas nucleares e citoplasmáticas (WILLIAMS e SMITH, 1993). Quando o núcleo é fragmentado e seus debris celulares são denominados corpos apoptóticos, é a fase do seu processo com a dispersão desses corpos para o espaço intercelular e extrusão dos tecidos. Esse evento vem ocorrendo em vários tipos celulares (WYLLIE et al., 1980; WYLLIE, 1997).

Na fase inicial da apoptose, geralmente ocorre a translocação da fosfatidilserina, do interior da membrana celular íntegra, para o exterior, evento que leva à lesão da membrana (MARTIN et al., 1995). A translocação da fosfatidilserina foi identificada como um marcador de degradação precoce na membrana de espermatozoides criopreservados em humanos e bovinos (DURU et al., 2001; ANZAR et al., 2002).

No ejaculado de homens, alguns autores identificaram a existência da caspase-dependente no andamento do processo apoptótico (SAID et al., 2004; MARCHETTI e MARCHETTI, 2005). As caspases são enzimas consideradas as maiores transdutoras e efetoras dentro dos diversos percursos de sinalização de apoptose em células somáticas. Essas enzimas são da família das proteases altamente específicas, contendo o aminoácido cisteína em seus sítios ativos (PAASH et al., 2004). As caspases envolvidas no processo da apoptose são as conhecidas como iniciadoras (caspases 8, 9, e 10) ou efetoras (caspases 3, 6 e 7; BRANTTON et al., 2000).

3.8 Análises realizadas pela Citometria de Fluxo

Os espermatozoides são células que necessitam possuir determinadas características a fim de alcançarem a fertilização, por exemplo: entrar em estado de hiperatividade (hiperativação), possuir acrossoma intacto, realizar a capacitação, possuir o DNA íntegro e ter a capacidade de se ligar a zona pelúcida, entre outras. Dentre os métodos que podem ser utilizados para essas avaliações destaca-se a citometria de fluxo, sendo uma técnica capaz de fazer medições em células isoladas (ZORZETTO, 2013)

O citômetro de fluxo tem resultado rápido em todas as subpopulações dentro de uma amostra, tornando-o ideal para a avaliação de populações heterogêneas, tais como espermatozoides. Essa metodologia, além de ser utilizada para as análises espermáticas, também permite a sexagem do sêmen, ou seja, a separação dos espermatozoides que carregam cromossomos X ou Y (GILLAN et al., 2005).

3.8.1 Integridade da Membrana Plasmática e Acrossomal

Na avaliação da integridade de membrana as sondas mais utilizadas são as de iodeto de propídio (PI) e etídio homodímero (EH). Esses corantes ao entrarem nas células com o plasmalema danificado emitem fluorescência vermelha quando há ligação de ácidos nucleicos (PI: 636 nm; EH: 617 nm) (GILLAN et al., 2005). Segundo Garner et al. (1986) outras sondas podem ser usadas para avaliar a viabilidade, emitindo fluorescência verde ao entrar em células metabolicamente ativas (por exemplo, diacetato de carboxifluoresceína).

O uso das lecitinas, que se ligam a resíduos glucosídicos em diferentes partes da membrana acrossomal, tem sido empregada com a mesma finalidade em uma ampla gama de espécies. *Pisum sativum* (ervilha) aglutinina (PSA) (TAO et al., 1993) e *Arachis hypogaea* (amendoim) aglutinina (PNA) (TAO et al., 1993; THOMAS et al., 1997; NAGY et al., 2003; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2005) têm sido as lecitinas mais utilizadas para as análises do acrossoma, devido à sua especificidade.

Sondas acrossomais são geralmente conjugadas com um fluorocromo que emite fluorescência verde, como a fluoresceína de isotiocianato (FITC), e combinado com a viabilidade ou corantes PI e EH. Atualmente, eles estão disponíveis conjugados com fluorocromos emitindo comprimentos de onda diferentes. Por exemplo, Nagy et al. (2003) propuseram o uso conjugado de PNA com o fluorocromo ficoeritrina laranja (PE-PNA), que provido entre o verde SYBR-14 e o vermelho PI, tem sido utilizado com

sucesso conjugado com o fluorocromo laranja tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC), em uma coloração tripla com YO-PRO® -1 e MitoTracker® Deep Red FM (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010).

3.8.2 Peroxidação Lipídica

A presença das espécies reativas de oxigênio (ROS) associada aos ácidos graxos poli-insaturados e a presença das duplas ligações, desencadeiam o processo de peroxidação lipídica, causando danos ao DNA e ativando a cascata da apoptose na célula espermática (KOTHARI et al., 2010).

A avaliação da peroxidação lipídica pode ser utilizada como indicador do estresse oxidativo celular. O método mais utilizado para mensuração da peroxidação lipídica é pela detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (LIMA e ABDALLA, 2001; MAIA e BICUDO, 2009).

Outra técnica alternativa na avaliação da lipoperoxidação em espermatozoides de mamíferos, são a utilização de sondas fluorescentes lipofílicas. O BODIPY581/591C11 é um análogo de ácidos graxos com propriedade fluorescente vermelha e verde. Quando identificada à oxidação induzida por radicais livres, sua fluorescência muda do vermelho para o verde.

As análises podem ser realizadas pela microscopia de epifluorescência, microscopia confocal de varredura a laser, fluorimetria e citometria de fluxo (NEILD et al., 2005; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010).

Um estudo comparando o método do TBARS e as sondas fluorescentes BODIPY581/591 C11 (B581) e BODIPY665/676 C11 (B665) na mensuração dos danos peroxidativos induzidos no sêmen do epidídimo pós-congelação de veados ibéricos foi realizado por Domínguez-Rebolledo et al. (2010). Esses autores utilizaram a fluorimetria e a citometria de fluxo para a avaliação das sondas fluorescentes. Observaram que os níveis de peroxidação dos lipídios encontrados foram semelhantes entre as duas sondas, porém diferindo do método do TBARS. Concluíram, com os resultados deste experimento que as sondas fluorescentes apresentam maior precisão na mensuração da lipoperoxidação.

3.8.3 Ativação de caspase

As células em apoptose apresentam diversas alterações morfológicas, geramente causadas pelas proteases específicas denominadas caspases (SIMÕES, 2008). O

processo desencadeador da apoptose é de extrema complexidade, uma vez que patricamente todas as proteínas envolvidas neste evento localizam-se no citosol, aguardando o momento para serem ativadas (BUSTAMANTE FILHO et al., 2005).

A supressão da apoptose é realizada pelo proto-oncogene Bcl-2, aumentando a sobrevivência da célula. No entanto, alguns elementos da família Bcl-2 causam o efeito oposto e funcionam como promotores da apoptose. A Bcl-2 é uma proteína da membrana espermática, localizada na bainha mitocondrial interna. Quando ocorre a associação entre a membrana mitocondrial e Bcl-2, a mesma exerce a sua função, mantendo a polarização da membrana. A sobrevivência celular depende do crítico equilíbrios entre os elementos pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 (ADAMS e CORY, 1998; PAASCH et al., 2004).

No ejaculado de homens, alguns autores identificaram a existência da caspase-dependente no andamento do processo apoptótico (SAID et al., 2004; MARCHETTI e MARCHETTI, 2005). Essas caspases ativadas foram relatadas nos espermatozoides vivos utilizando a carboxifluoresceína (PAASCH et al., 2003).

Marchetti, et al. (2004) relataram a associação de FITC-Val-Ala-Asp-FMK (FITC-VAD-FMK) e observaram que a ativação da capasse pode ocorrer pela indução de agonistas específicos da apoptose, tais como o ácido betulimico, promovendo a apoptose espermática (PAASCH et al., 2004; GRUNEWALD et al., 2005ab).

3.9 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é a técnica que permite quantificar e determinar a massa molecular das biomoléculas, como proteínas, carboidratos, lipídios e oligonucleotídeos (FERREIRA et al., 2010).

A análise de material pela espectrometria de massa, ocorre através da geração de íons com base em elementos orgânicos ou inorgânicos, pelo método de ionização adequado. O próximo passo, é a separação dos íons pela sua relação massa-carga (m/z) identificados por um analisador de massas e mensurados qualitativamente e ou quantitativamente utilizando um detector, que quantifica esses íons. O processador de dados converte a magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z , gerando o espectro de massas correspondente aqueles íons (GROSS, 2004).

A “matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry” (MALDI-TOF) é a técnica de espectrometria de massa desenvolvida para análise de proteínas, porém demonstrou-se eficiente, rápida e prática para qualificar

lipídios (SCHILLER et al., 2007).

A análise lipídica, geralmente é realizada utilizando a cromatografia líquida, porém esta técnica exige grande experiência para ser efetivada e possui baixa resolução (PETERSON et al., 2006). Foi demonstrado, que a técnica de espectrometria MALDI-TOF é extremamente competente na avaliação do perfil lipídico da membrana plasmática dos espermatozoides e do plasma seminal (SCHILLER et al., 2000).

Trabalho realizado por Ferreira et al. (2010) analisaram o perfil lipídico por MALDI-TOF de oócitos de diferentes espécies e observaram que existe uma alteração lipídica na composição do oócito em cada espécie e a interferência do meio ambiente a que essa espécie é exposta. Ainda, concluíram que o conhecimento do perfil lipídico de oócitos pode auxiliar no processo de criopreservação destas estruturas.

A espectrometria de massa MALDI-TOF, ainda foi testada por Schiller et al. (2000) que verificaram a eficiência da técnica em caracterizar os lipídios da membrana plasmática espermática de humanos e a relação deste perfil com a capacidade fecundante dos espermatozoides. Lebig et al. (2004) analisaram o perfil lipídico dos espermatozoides de humanos e ovinos através da técnica e observaram diferenças lipídicas entre as espécies estudadas. A mesma observação foi relatada por Fuchs et al. (2008) ao comparar espermatozoides de ruminantes e felinos.

Portanto, Fonseca et al. (2012) concluíram que a técnica de espectrometria de massa utilizada para gerar a composição do perfil lipídico espermático é um método simples, rápido e eficiente quanto a extração lipídica.

Referências

4. Referências

ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, Washington, v.281, p.1322-1326, 1998.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane Structure. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3 ed.: Garland Publishing, New York. 1994. Cap. 10, p. 478-506.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **J Androl**; 13:232–41, 2008.

AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, 1987.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal Function. In: **Equine reproduction**, p. 1053, 2010.

AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I.; COURTENS, J.L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v.129, p.535-543, 2005.

ANDRABI, S.M.H., ANSARI, M.S., ULLAH, N., ANWAR, M., MEHMOOD, A., AKHTER, S., 2008: Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Anim Reprod Sci** 104, 427–433.

ANZAR, M., HE, L., BUHR, M.M., KROETSCH, T.G, PAULS, K.P., 2002: Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biol Reprod** 66, 354–360.

BITTENCOURT, R.F. **Viabilidade e fertilidade de sêmen ovino criopreservado com glicerol e dimetilacetamina acrescido de trealose e edta**. Botucatu, 2009. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

BLACKSHAW, A.W.; SALISBURY, G.W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-Shock and its prevention. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.9, p.1099-1106, 1957.

BRATTON, S.B; MACFARLANE, M., CAIN, K., COHEN, G.M. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. **Exp Cell Res**, v.256, p.27-33, 2000.

BRITO LFC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **C Tech Equi Pract**, v.6, p.249-264, 2007.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.

CHACUR, M.G.M. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino (*Buballus bubalis*) com diferentes diluidores Glicina-gema, Triladyl e TES em diferentes tempos de equilíbrio**. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, 1996, Dissertação de Mestrado. 116p.

CHACHUR, M.G.M., OBA, E., GONZALES, C.I.M., 1997: Equilibrium time influence on motility, vigour and membrane integrity of thawed buffalo semen using triladyl, glycine-egg yolk and tes extenders. In: **Borghese A, Failla S, Barile VL (eds) Proceedings of 5th World Buffalo Cong., Caserta, Italy. International Buffalo Federation**, Roma, Italy, pp. 846–849.

CHACUR, M.G.M., et al. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Vet. e Zootec.** 2012 mar.; 19(1): 346-355.

CHESHMEDJIEVA, S.B.; DIMOV, V.N., 1994: Effect of freezing on phospholipid distribution of buffalo spermatozoa plasma membranes. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, **Proceedings of 4th World Buffalo Cong., Sao Paulo, Brazil. International Buffalo Federation**, Roma, Italy, pp. 519–521.

CRESPILHO, A.M. **Estudo comparativo de diferentes metodologias de preservação do sêmen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial em**

tempo fixo (IATF). Botucatu, 2010. 114p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

COMBES, G.B; VARNER, D.D; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R.C.; BLANCHARD, T.L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **J Reprod Fert Suppl**, v. 56, p. 127-32, 2000.

BUSTAMANTE FILHO IC, SILVA JFS, JOBIM MIM. Apoptose em espermatozoides: uma nova abordagem na avaliação da viabilidade espermática. **Sem Ciên Agr**, v.26, n.3, p.395-404, 2005.

COSSON, J.A. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biol Int**, v.20, p.83-94, 1996.

CUNHA, A. T. M. **Características estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos recuperados do epidídimo**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 55p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, 2015.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiol**, v.14, p.466-70, 1977.

DEJARNETTE, J.M.; BARNES, D.A.; MARSHALL, C.E. Effects of pre-and postthaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Theriogenology**, v.53, p.1225–1238, 2000.

D’OCCHIO MJ, HENGSTBERGER KJ, JOHNSTON SD. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Anim Reprod Sci** v.101, p.1–17, 2007.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZSANTOS, M.R.; OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARDE, J.J. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.360-368, 2010.

DROBNIS, E.Z. et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, n.4, p.432-437, 1993.

DURU, N.K; MORSHEDI, M; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. **Fertil Steril**, v.75, p.263-268, 2001.

FAHY, G.M. Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. **Biophys J**, v.32, p.837-850, 1980.

FERREIRA, C.R.; SARAIVA, S.A.; CATHARINO, R.R.; GARCIA, J.S.; GOZZO, F.C.; SANVIDO, G.B.; SANTOS, L.F.A.; LO TURCO, E.G.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; BERTOLLA, R.P.; SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F.V.; SANGALLI, J.R.; EBERLIN, M.N. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, Volume 51, p.1218-1227, 2010.

FERRUSOLA, C.O.; FERNÁNDEZ, L.G.; GARCÍA, B.M.; SALAZAR, C.S.; MORELL, J.M.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11 increases after cryopreservation of stallion spermatozoa is stallion dependent and relates to “apoptosis like” changes. **Reproduction** 2009; 138:55–63, 2009.

FLESCHE, F.M. e GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p.197–235, 2000.

FONSECA, M.A. **Análise do perfil lipídico do sêmen bovino**. [Analysis of the lipid profile of bovine sêmen]. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FOOTE, R.H. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present, and future. **Journal of Andrology**, v.3, p.85-100, 1982.

FOOTE, R.H.; KAPROTH, M.T. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.453-456, 2001.

FUCHS, B.; JAKOP, U.; GÖRITZ, F.; HERMES, R.; HILDEBRANDT, T.; SCHILLER, J.; MÜLLER, K. MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 568-575, 2008.

GADELLA BM, HARRISON RAP. The capacitating agente bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. **Develop**, v. 127, p. 2407-20, 2000.

GARCIA, B.M.; FERNANDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; BOLANOS, J.M.G.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; MORCUENDE, D.; PENA, F.J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post- thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.811–818, 2011a.

GARCIA, B.M.; FERNANDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; RODRIGUEZ, A.M.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; MORCUENDE, D.; PENA, F.J. Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. **Reprod Dom Anim**, v. 46, p.141–148, 2011b.

GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A., PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol Reprod** 34, 127–138, 1986.

GARNER DL, THOMAS CA, JOERG HW, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod** v.57, p.1401–1406, 1997.

GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiol**, v.40, p.131-152, 1995.

GILMORE, J.A; LIU, J.; WOODS, E.J; PETER, A.T; CRITSER, J.K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human**

Reproduction. [Internet] 2000;15(2):335-43. Disponível em: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/15/2/335.full.pdf>

GILLAN, L., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology** 63, 445–457, 2005.

GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Hum Reprod**, v.15, p.2160-2164, 2000.

GO, K.J.; WOLF, D.P. The role of sterols in sperm capacitation. **Adv Lipid Res**, v.20, p.317-30, 1983.

GRAHAM, J.K. Principles of Cooled Semen. In: **Equine reproduction**, p. 1308, 2010.

GROSS, J. H. Mass spectrometry: a textbook. Heidelberg, Germany: **Springer Verlag** p.518, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Textbook of Medical Physiology, **9th edn. Philadelphia:** W.B. Saunders, 2000.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 75, p.501–507, 2006.

GRUNEWALD S, PAASCH U, SAID TM, SHARMA RK, GLANDER HJ AND AGARWAL A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. **Fertil Steril** v.83(Suppl 1),1106–1112, 2005a.

GRUNEWALD S, PAASCH U, WUENDRICH K, GLANDER HJ. Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during Cryopreservation. **Arch of Androl**, v.51, p.449–460, 2005b.

HONDA, A, SIRUNTAWINETI, J, BABA, T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. **H Reprod Upd** v. 8, p. 405-12, 2002.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**. v.62, n.1-3, p.2-22, 2000a.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.43, p.47-58, 2000b.

IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Rev Reprod**, v.1, p.6-12, 1996.

JAIN, Y. C., ANAND, S.R. The lipids of buffalo spermatozoa and seminal plasma. **J. Reprod. Fert**, (1976) 47, p.255-260.

JANUSKAUSKAS, A, JOHANNISSON, A, SODERQUIST, L, RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. **Therio**, v.53, p.859–75, 2000.

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Anim Reprod Sci**, v.114, p.125-134, 2009.

KATKOV, I.I; MAZUR, P. Factors affecting yield and survival of cells when suspensions are subjected to centrifugation. Influence of centrifugal acceleration, time of centrifugation, and length of the suspension column in quasi-homogeneous centrifugal fields. **Cell Biochemistry and Biophysics**. 1999;31:231-45.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. Prostaglandins **Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, p.117–121, 2007.

KOTHARI, S., THOMPSON, A., AGARWAL, A., DU PLESSIS, S.S. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian J Exp Biol**, v.48, p.425-435, 2010.

KUMAR S, MILLAR JD, WATSON PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **J Membr Biol**, v.165, p.1-10, 1998.

LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C., EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.31–38, 2010.

LEBIG, J.; GEY, C.; SÜß, R.; SCHILLER, J.; GLANDER H.J.; ARNHOLD, J. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. **Comp Biochem Physiol B**, v.137, p.265-277, 2004.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MADRID-BURY N, PÉREZ-GUTIÉRREZ JP, PÉREZ-GARNELO S, MOREIRA P, SANJUANBENITO BP, GUTIÉRREZ-ADÁN A, MARTÍNEZ JF. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Therio**, v.64, p.232-241, 2005.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A., MÉNARD, M., 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen`s egg yolk. *Biol. Reprod.* v. 67, p.1250-1258.

MARCHETTI, C; MARCHETTI, P. Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. **Gynecol Obstet Fertil**, v.33, p. 669-677, 2005.

MARTIN, S.J; REUTELINGSPERGER, C.P; MCGAHON, A.J; RADER, J.A; VAN SCHIE, R.C; LAFACE, D.M; GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v.182, p.1545-1556, 1995.

MARTÍNEZ-PASTOR, F., GARCÍA-MACÍAS, V., ÁLVAREZ, M., HERRAEZ, P., ANEL, L., DE PAZ, P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. **Biol Reprod** 72, 316–327, 2005.

MEDEIROS, C.M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. **Theriogenology**, v.57, p.327–344, 2002.

MORREL JM, JOHANNISSON A, DALIN AM, HAMMAR L, SANDEBERT T, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Vet Scand**, v.50, p.2, 2008.

MOUSSA, M.; MARTINET, V. TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins: extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v57, p. 1695-1706, 2002.

NAGY, S., JANSEN, J., TOPPER, E.K., GADELLA, B.M. A triplestain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome- membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biol Reprod** 68, 1828–1835, 2003.

NEID, D.M.; GADELLA, B.M.; COLLENBRANDER, B.; AGÜERO, A.; BROUWERS, J.F.H.M. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.295-298, 2002.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh

and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.230-238, 2005.

OBA, E., FUCK, E.J., BICUDO, S.D., PAP, F.O., OHASHI, O.M., 1994: Preliminary study on different mediums for deep-freezing of buffalo semen. In: **Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, Proceedings of 4th World Buffalo Cong., Sao Paulo, Brazil. International Buffalo Federation**, Roma, Italy, pp. 579–581.

OBA, E.; FUCK, E.J.; BICUDO, S.D.; PAPA, F.O.; OHASHI, O.M. Estudo preliminar de diferentes meios para congelação de sêmen de búfalos. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 10, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993, v.2, p.337

PAASCH U, GRUNEWALD S, FITZL G AND GLANDER HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. **J Androl**, v.24, p.246–252, 2003.

PAASCH, U; GRUNEWALD, S; AGARWAL, A; GLANDER, H. Activation pattern of caspase in human spermatozoa. **Fertil Steril**, v.81, p.802-809, 2004

PARKS, J. E.; EHRENWALD, E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In 'Fertilization in Mammals'. (Eds B. D. Bavister, J. Cummins and E. R. S. Roldan.) p. 155-67. (**Serono Symposium: Norwell.**), 1990.

PARKS, J.E.; ARION, J.A.; FOOTE, R.H., 1997: Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. **Biol Reprod** 37, 1249–1258.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p.209-222, 1992.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-66, 1992.

PETERSON, B.L.; CUMMINGS, B.S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. **Biomed Chromatogr**, v.20, p.227-43, 2006.

PHELPS, M.J; LIU, J.; BENSON, J.D; WILLOUGHBY, C.E; GILMORE, J.A; CRITSER, J.K. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**. 1999;61:1031-41.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. **Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory**, 1987.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT; A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol.* v.46, p.541-549, 1973.

QUINN, P. J.; WHITE, I. G. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **J. Biol. Sci.** v.20, p.1205-1215, 1967.

RAIZADA, B.C., SATTAR, A., PANDEY, M.D., 1990: A comparative study of freezing buffalo semen in two dilutors. In: Acharya RM, Lokeshwar RR, Kumar AT (eds), **Proceedings of 2nd World Buffalo Cong**, New Delhi, India. International Buffalo Federation, Roma, Italy, pp. 66–74.

RAMALHO-SANTOS, J, SCHATTEN, G, MORENO, RD. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. **Biol Reprod**, v. 67, p. 1043-51, 2002.

RAMIRES NETO, C. **Perfil lipídico da membrana plasmática e alterações morfofuncionais de espermatozoides de garanhões resistentes e sensíveis à criopreservação** / Carlos Ramires Neto. - Botucatu, 2015. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

SAACKE, R.G; 1984: Semen quality: importance of and influencing factors. In: **Proceedings of 10th NAAB Tech. Conf. A. I. Reprod Milwaukee**, WI, USA. National Association of Animal Breeders, Columbia, USA, p. 30–36.

SAID, T.M; PAASCH, U.; GLANDER, H.J; AGARWAL, A. Role of caspases in male infertility. **Hum Reprod Update**, v.10, p.39-51, 2004.

SCHILLER J.; ARNOLD, K. Mass spectrometry in structural biology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Ed: Meyers R A, John Wiley & Sons Ltd., **Chichester**, 2000.

SCHILLER, J., MÜLLER, K., SÜß, R., ARNHOLD, J., GEY, C., HERRMANN, A., LESSIG, J., ARNOLD, K., MÜLLER, P. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDITOF mass spectrometry—a cautionary note. **Chem Phys Lip** 2003; 126:85–94.

SCHILLER, J.; SUSS, R.; FUCHS, B.; MULLER, M.; ZSCHORNIG, O.; ARNOLD, K. MALDITOF MS in lipidomics. **Fro Biosci**, v.12, p.2568-79, 2007.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHINIRÉA, V.H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciênc Anim Bras**, v.10, p.595-601, 2009a.

SILVA, P.F.N. & GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958–978, 2006.

SIMÕES, R. **Influência da fragmentação de DNA espermático na produção in vitro de embriões bovinos**. 2010. 105f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade**. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

TAO, J., CRITSER, E., CRITSER, J. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. **Mol Reprod Dev** 36, 183–194, 1993.

TATHAM, B., 2000: Increasing Buffalo Production; Using Reproduction Technology. Report Rur. Indust. Res Corp. Dev., Kingston, ACT, Australia. Jain YC, Anand SR, 1976: The lipids of buffalo spermatozoa and seminal plasma. **J Reprod Fert** 47, 255–60.

THOMAS, C., GARNER, D., DEJARNETTE, J., MARSHALL, C. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod** 56, 991–998, 1997.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550, 2006.

QUINN, P. J.; WHITE, I. G. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **J Biol Sci**, v.20, p.1205-15, 1967.

VALENÇA, R.M.B., GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.47-53, 2007.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000.

ZORZETTO, M. F. **Avaliação do sêmen de búfalos em três meios de criopreservação**. Botucatu, 2013. 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

WALES, R. G.; WHITE, I. G. The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. **J. Endo- crinol.** v.19, p.211-220, 1959.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p. 871-91, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60, p.481-492, 2000.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold-shock and

preservation: a review. **Reprod Fertil Dev**, v.5, p.639-58, 1993.

WILLIAMS, A.C; FORD, W.C.L. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. **Fertil Steril**, v.83, p.929-936, 2005.

WILLIAMS, G.T; SMITH, C.A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. **Cell**, v.74, p.777- 779, 1993.

WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mammalian Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1506–1514, 1998.

WOODS EJ, BENSON JD, AGCA Y, CRITSER JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**. [Internet] 2004;48(2):146-56. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>

WYLLIE, A.H. Apoptosis and carcinogenesis. **Eur J Cell Biol**, v.73, p.189-97, 1997.

WYLLIE, A.H; KERR, J.F; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v.68, p.251-306, 1980.

YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochim Biophys Acta**, v.822, p.267-87, 1985.

YADAV, P.S.; SINGH, B.; SINGH, I.; SETHI, R.K. Reproductive biotechnology in buffalo. 1 ed. **Satish serial publishing house**, 2010. 78-79 p.

CAPÍTULO 1

Artigo que será submetido para a revista *Biology of Reproduction*

Análise lipídica do ejaculado de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) de alta e baixa resistência espermática à criopreservação

Mariana Furtado Zorzetto¹, Erika Aline Ribeiro Dias², Fabio Morato Monteiro², Camila de Paula Freitas Dell'Aqua¹, Claudia Cristina Paro de Paz², Edson Guimarães Lo Turco³, Thaís Regiani Cataldi⁴, Fabiana Ferreira de Souza¹, Frederico Ozanam Papa¹, Eunice Oba¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil, Cep 18618-970.

²Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, São Paulo, Cep 14174-000.

³Departamento de Cirurgia, Divisão de Urologia, Seção Reprodução Humana, Universidade Federal de São Paulo, Rua Embau, 231, São Paulo Cep 04039-060, SP, Brasil

⁴Especialista em espectrometria de massas do Laboratório Max Feffer Genética de plantas, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil

e-mail: euniceoba@fmvz.unesp.br

RESUMO

A composição lipídica das membranas plasmáticas dos espermatozoides é um dos fatores que pode interferir na criotolerância espermática em várias espécies. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar o perfil lipídico do ejaculado de touros Nelore sensíveis e resistentes à danos decorrentes da criopreservação. Para isso, foram utilizados ejaculados de 15 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com boa qualidade e alta fertilidade. Os animais foram divididos de acordo com as suas porcentagens de motilidade total e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides em dois grupos: resistentes e sensíveis à congelção. Foram realizadas análise computadorizada de cinética espermática e avaliação da integridade de membrana no sêmen fresco e pós-descongelção. O perfil lipídico do ejaculado foi

realizado pós-descongelamento pela análise MALDI-MS. Os dados de cinética espermática e microscopia de epifluorescência foram comparados pelo teste Tukey e os dados do perfil lipídico dos espermatozoides foram analisados utilizando o Software MetaboAnalyst 2.0. Na análise MALDI-MS foi possível observar diferenças no perfil lipídico do sêmen e do plasma seminal entre os grupos. Os íons lipídicos m/z 704,59; m/z 804,59 e m/z 943,77 apresentaram maior abundância relativa no sêmen dos touros do grupo A. Os resultados encontrados, permitem concluir que existe diferenças no perfil lipídico do sêmen e do plasma seminal entre touros com alta e baixa resistência espermática à criopreservação.

Palavras-chave: Sêmen, crioresistência, MALDI-MS, citometria de fluxo, bovinos.

1 INTRODUÇÃO

2 Na reprodução bovina as técnicas de congelação de sêmen, associadas à
3 inseminação artificial, possibilitam maior aproveitamento genético de touros
4 reprodutores, facilitando a reprodução de animais distantes geograficamente. E apesar
5 da alta seleção na espécie bovina, existem touros que apresentam baixa resistência
6 espermática à congelação seminal.

7 Os fatores que podem interferir na resistência espermática à criopreservação, são
8 de origem genética [1, 2]. Dentre esses fatores a criotolerância espermática pode ser
9 alterada pela composição de lipídios da membrana plasmática espermática e do plasma
10 seminal [3,4].

11 A composição dos ácidos graxos e a proporção dos lipídios das membranas
12 espermáticas possuem relação direta com a sensibilidade ao processo de criopreservação
13 [5,6]. Quando os espermatozoides são expostos a temperaturas não fisiológicas,
14 ocorrem mudanças na organização bidimensional dos lipídios que compõem a
15 membrana plasmática espermática, levando a alterações na fluidez e perda lipídica [6,7].
16 Após a criopreservação, os espermatozoides que apresentam melhor qualidade são os
17 que possuem maiores quantidades de triglicérides, lipídios e fosfolipídios na membrana
18 espermática [8]. Estudos demonstraram que um dos fatores principais responsáveis pela
19 alteração da motilidade espermática pós congelação é a peroxidação dos lipídios [9,10]
20 e que os fosfolipídios em maiores quantidades na membrana plasmática podem reduzir a
21 perioxidação lipídica pós-descongelação [11].

22 Os lipídios do plasma seminal tem como função gerar energia para os
23 espermatozoides, funcionam como anti ou pró-oxidante potencial no sêmen [12]. Ainda,
24 o plasma seminal, é essencial em diversos processos após a ejaculação até o momento
25 da fertilização. Possíveis alterações que ocorrem na composição do plasma seminal

podem afetar potencialmente a fertilidade [13]. Em vista disso, estudar tais lipídios que compõem o plasma seminal pode revelar as causas da infertilidade de reprodutores.

A composição lipídica das membranas espermáticas é de extrema importância para o conhecimento da qualidade do sêmen e sua resistência à criopreservação, uma vez que existe variações individuais na proporção de lipídios na membrana plasmática dos espermatozoides [11].

A possibilidade em compreender a composição lipídica do plasma seminal e a sua relação com a criotolerância do sêmen em reprodutores resistentes ou sensíveis à congelação possibilita o aprimoramento das técnicas de criopreservação do sêmen bovino, contribuindo na elevação da taxa de fertilidade do sêmen descongelado na espécie. Porém, as informações sobre os padrão lipídico do plasma seminal e dos espermatozoides de bovinos ainda são escassas na literatura. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi comparar o perfil lipídico, por espectrometria de massas MALDI-MS, do ejaculado de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) sensíveis e resistentes aos processos de criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

A aprovação para o uso de animais no estudo foi obtida a partir da Comissão de Ética da FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Botucatu (número 105/2015).

1. Locais do experimento

Os animais utilizados pertenciam ao Centro APTA Bovinos de Corte, Unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, localizada ao norte do Estado de São Paulo. Esta região apresenta clima tropical úmido, com temperatura e precipitação médias anuais de 24°C e 1312 mm, respectivamente. As colheitas de sêmen e análises

pré-congelação foram realizadas no mesmo local. A citometria de fluxo foi realizada no CERAN (Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal), pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu/SP. Já as análises do perfil lipídico dos espermatozoides por espectrometria de massa foi realizada no Laboratório de Andrologia da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP.

2. Animais e Colheita de Sêmen

Os animais, provenientes de rebanho Nelore registrado na Associação Brasileira dos Criadores de Zebu. Foram utilizados 15 touros da raça Nelore, com idade entre 3 e 6 anos. Os animais passaram por colheitas de sêmen, na semana anterior ao início do experimento, para processo esgotamento. Os touros foram mantidos em sistema de pasto em piquetes constituído de capim braquiária (*Brachiaria brizantha*), sal e água *ad libitum*.

A colheita do sêmen foi realizada com eletroejaculador (Autojac®, Neovet®, Uberaba, Brasil). Os animais utilizados no experimento foram submetidos a uma colheita de sêmen (um ejaculado por animal).

Após a colheita, uma amostra foi retirada para avaliação dos lipídios, e o restante foi diluído em diluente convencional (BotuBov, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) para concentração final de 25×10^6 spz/dose (50×10^6 spz/mL).

3. Congelação e descongelação do sêmen

O ejaculado foi diluído em meio convencional (Botu-Bov®, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) a concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. O envase

foi realizado manualmente em palhetas francesas de 0,5 mL, que posteriormente foram distribuídas em um grade telada e mantidas a 5°C em refrigerador digital (Minitub®, Alemanha) durante 4 horas. Posteriormente, as palhetas foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros (dimensões internas de 36 cm de altura X 40 cm de comprimento X 31 cm de largura), preenchida com nitrogênio líquido até a marca de 3,0 cm de altura. Desta forma, as palhetas ficaram dispostas horizontalmente a 3,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e, após este período, foram imersas no mesmo [14]. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em container criogênico a -196°C.

O sêmen foi descongelado à 37°C por 30 segundos em banho maria e analisado quanto a cinética espermática (CASA), integridade da membrana plasmática (microscópio de epifluorescência), índice de caspase ativado, peroxidação lipídica e integridade da membrana plasmática e acrossomal (citometria de fluxo).

4. Análise do sêmen

Análise computadorizada da cinética espermática (CASA)

Tanto o sêmen fresco quanto o descongelado foram avaliados pelo sistema computadorizado de cinética espermática (CASA, IVOS, Versão 14, Hamilton-Throne Bioscience®, Beverly, USA). Para esta análise uma alíquota de 10 µL da amostra foi depositada em câmara de Makler (Makler Counting ChamberR, Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) pré-aquecida a 38°C. A análise foi realizada pelo programa Animal Motility, com escolha automática e padronizada de cinco campos de leitura e sendo avaliando-se no mínimo 1000 células/amostra. Foram consideradas as variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s) velocidade curvilínea (VCL, µm/s) e percentagem de espermatozoides rápidos (RAP,

%). O setup do HTMA-IVOS 14 utilizado para as análises realizadas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Ajuste do htma-ivos-14 para análise espermática em bovinos.

CARACTERÍSTICAS	AJUSTE
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	6 pixels
Contraste para células imóveis	60 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	70 %
Referência para velocidade média (VAP)	<40 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VAP)	<30 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 $\mu\text{m/s}$
Limite inferior de tamanho	0,41 pixels
Limite superior de tamanho	1,99 pixels
Limite inferior de intensidade	0,30
Limite superior de intensidade	7,89
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	96%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

Integridade da membrana plasmática dos espermatozoides

A avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (IMP%, espermatozoides viáveis) foi realizada antes e após a congelação do sêmen de acordo com Harrison e Vickers [15]. As amostras foram observadas entre lâmina e lamínula no aumento de 100x por microscopia de epifluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Ernst-Leitz-Strabe, Weslar Germany) e foram contadas 200 células, sendo consideradas íntegras as coradas totalmente em verde, e lesadas as coradas em vermelho ou em verde e vermelho.

Microscopia de interferência diferencial (DIC)

Amostras de sêmen fresco foram conservadas em formol salino (1:100) à 4°C para avaliação da morfologia espermática (cauda, cabeça, acrossomo e peça intermediária) avaliados na microscopia de interferência diferencial (DIC). A análise das amostras foi realizada pela deposição de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, observada em aumento de 1000X e 200 células foram contadas.

Citometria de Fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas apenas nas amostras descongeladas. O equipamento utilizado foi BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW; vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm. Os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1.

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (1,5µM, PI; P4170, Sigma) e FITC-PSA (1ng, L-0770, Sigma), associadas ao Hoechst33342 (7µM, H33342, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. [16]. Assim, em uma amostra de 200µL de sêmen diluído em meio TALP-PVA, segundo Parrish et al. [17] modificado (100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina), na concentração de 5x10⁶ espermatozoides/mL foram adicionados PI, H3342 e FITC-PSA e então homogeneizados e incubados por 15 minutos a 37°C.

Quanto ao índice de caspase ativada utilizou-se a associação de FITC-VAD-

FMK (5mM, G7462, Promega, Madison WI, EUA) com PI (2,5 μ M) e H33342 (7 μ M). Assim, em 1 mL de uma solução de TALP-PVA com 1x10⁶ espermatozoides foram adicionadas todas as sondas, e o conteúdo então homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação, os espermatozoides foram lavados (200g/5min) e ressuspensos em TALP-PVA na mesma concentração inicial.

A peroxidação lipídica foi avaliada utilizando a sonda C11-BODYPY (1 μ M, D-3861; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) associada ao H3342 (7 μ M) de acordo com Guasti et al. [18], uma amostra de 489,5 μ L de sêmen diluído em meio TALP-PVA, numa concentração de 2x10⁶ espermatozoides/mL, adicionou-se ambas as probes e a mistura foi incubada por 30 minutos à 37°C. Após a incubação as amostras foram centrifugadas em 2 vezes a 300g/5min e o pellet ressuspensado com 500 μ L e analisados.

Classificação do Sêmen

Após as avaliações pós-descongelação, os animais foram divididos em dois grupos conforme a qualidade espermática e utilizando o intervalo de confiança feito pelo SAS INST., INC, Cary, NC: grupo Bad freezer, touros com baixa resistência ao processo de congelamento do sêmen (n=6), os quais apresentam motilidade total e integridade de membrana plasmática < 30% após a descongelação. Grupo Good freezer, touros com alta resistência ao processo de congelamento do sêmen (n=9), apresentando motilidade total e integridade de membrana plasmática > 50% após a descongelação.

Análise dos lipídios

A análise do perfil lipídico foi realizada por espectrometria de massas MALDI-MS.

As amostras de sêmen foram descongeladas em banho maria à 37°C por 2 minutos para a realização da extração de lipídios e centrifugadas para ser separada em duas porções: porção 1 (P1) contendo a maior parte de espermatozoides e a porção 2 (P2) contém a maior quantidade do plasma seminal. Essa separação foi realizada utilizando o seguinte protocolo: as amostras foram centrifugadas pela primeira vez à 1500xg por 10min, o sobrenadante plasma seminal foi separado da fração de célula, alíquota armazenada em tubos separados, a amostra contendo a fração de espermatozoides foi novamente centrifugada por 10 min à 15000xg para completar a separação em duas porções, distinguindo ao máximo espermatozoides e plasma seminal.

Os lipídios foram extraídos com base no protocolo de Bligh e Dyer [19] com algumas modificações. Foram adicionados 50 uL de água destilada em microtubo com os CCs, e foram misturados com uma pipeta para quebrar as células por lise osmótica. O passo seguinte consistiu em adicionar 125 uL de clorofórmio e 250 uL de metanol. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos durante 1 min. As fases apolares e polares foram separadas por adição de 100 uL de água e 125 uL de clorofórmio. A mistura foi novamente homogeneizada em agitador de tubos durante 1 min e centrifugada a 3000g durante 1 min. A fase inferior contendo lipídios foi recuperada e transferida para um microtubo limpo, que então foi deixado aberto, à temperatura ambiente, até a evaporação completa do solvente.

O volume de 1µL do extrato lipídico foi adicionado sobre a placa MALDI e após a cristalização foi adicionado 1 µL da solução de DHB (30 mg em 1 mL de metanol). Os espectros foram adquiridos em modo positivo utilizando MALDI-MS Autoflex III por tempo de voo, equipado com tecnologia laser smartbeam™ (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os dados de MS foram adquiridos na faixa de m/z entre 700 e 1000 em média 1.500 disparos consecutivos de laser com uma frequência de 200 Hz.

FlexAnalysis Software 3.0 foi utilizado para visualizar e processar os espectros de massas.

As estruturas dos lipídios foram atribuídas baseada na busca da literatura e base de dados (<http://lipidsearch.jp> ou www.lipidmaps.org).

5. Análise Estatística

Os dados obtidos de cinética espermática, citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência foram submetidos à análise estatística pelo PROC MIXED (SAS INST., INC, Cary, NC) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Os dados de defeitos espermáticos realizados em microscopia diferencial de fase foram analisados pelo PROC GENMOD (SAS INST., INC, Cary, NC). O nível de significância considerado foi de 5%.

As análises estatísticas dos dados para o perfil lipídico, foram realizadas no programa on-line MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>). Os dados foram normalizados pela mediana, em seguida foi realizada transformação logarítmica (log 2) e escalonamento por Pareto, que utiliza a raiz quadrada do desvio padrão para fazer o escalonar cada variável encontrada PCA [20]. Para análise dos dados foi utilizado a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA – Partial-least squares discriminant analysis). A PLS-DA é um dos principais métodos multivariados utilizados na análise estatística e interpretação dos dados gerados nos experimentos de metabolômica. A PLS-DA é um método de regressão linear supervisionado, que permite a classificação ou agrupamento (clustering) das amostras, é utilizada para determinar quais são as variáveis responsáveis por predizerem as classes (grupos formados), explicando assim a variabilidade entre os dados [21]. Na PLS-DA

foram observados os valores de R², que indica a variação descrita pelo modelo e Q², que indica a acurácia, a habilidade preditiva do modelo [22].

Os metabólitos diferencialmente abundantes foram determinados por meio do Índice de Importância da Variável (variable importance in projection – VIP), o qual utiliza a soma ponderada dos quadrados dos loadings da PLS para estabelecer quais variáveis mais contribuíram para a formação dos grupos. Os pesos são baseados na “quantidade” da variância de Y que é explicada em cada dimensão.

Paralelamente as análises descritas acima foi realizado teste-t, para cada uma das comparações, também no MetaboAnalyst [23]. Embora o critério de seleção dos metabólitos diferencialmente abundantes tenha sido baseado nos VIPS, foi adicionado o p-valor e FDR (False Discovery Rate) para os metabólitos que também foram significativos pelos critérios do teste-t.

Foi realizada uma busca no banco de dados do HMDB (Human Metabolome Database – [24]) dos metabólitos diferencialmente abundantes com base no valor do íon precursor. Nesta etapa foi utilizado tolerância de massa de até 100 ppm.

RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta os dados de cinética espermática e integridade da membrana plasmática (IMP) do sêmen fresco (T0) e pós-congelação (T1) entre o grupo A e B. As análises realizadas pela citometria de fluxo do sêmen pós-congelação estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2. Médias ajustadas e erro padrão das características: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), espermatozoides rápidos (RAP), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) e integridade da membrana plasmática (IMP) no momento à fresco (T0) e pós-descongelamento (T1) entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore.

Variáveis	Grupos				
	N	Grupo A (T0)	Grupo B (T0)	Grupo A (T1)	Grupo B (T1)
MT (%)	15	85,55±2,40 ^{Aa}	92,72±1,91 ^{Aa}	24,89±2,40 ^{Ba}	68,17±1,91 ^{Bb}
MP (%)	15	65,00±3,14 ^{Aa}	61,78±2,56 ^{Aa}	22,83±3,14 ^{Ba}	57,00±2,56 ^{Bb}
RAP (%)	15	87,00±2,82 ^{Aa}	90,11±2,30 ^{Aa}	24,67±2,82 ^{Ba}	63,67±2,30 ^{Bb}
VAP (%)	15	128,13±6,76 ^{Aa}	118,67±5,52 ^{Aa}	79,95±6,76 ^{Ba}	79,77±5,52 ^{Ba}
VSL (%)	15	100,93±4,28 ^{Aa}	89,42±3,49 ^{Aa}	72,37±4,28 ^{Ba}	69,94±3,49 ^{Ba}
VCL (%)	15	216,48±14,52 ^{Aa}	200,79±11,85 ^{Aa}	119,27±14,52 ^{Ba}	121,77±11,85 ^{Ba}
IMP (%)	15	53,18±13,77 ^{Aa}	59,22±13,19 ^{Aa}	28,51±13,77 ^{Ba}	39,22±13,19 ^{Ba}

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (p < 0,05)

Tabela 3. Médias ajustadas e erro padrão das características membrana plasmática e acrossomal íntegras (MPAI), iodeto de propídio negativo e caspase negativa (PI-CASP) e peroxidação positiva (PER+) no momento pós-descongelamento entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore.

Variáveis	Grupos		
	N	Grupo A	Grupo B
MPAI (%)	15	26,57±4,50 ^a	33,22±3,68 ^a
PI-CASP- (%)	15	26,45±2,98 ^a	25,58±2,43 ^a
PER+ (%)	15	29,70±5,90 ^a	23,84±4,82 ^a

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (p < 0,05)

Quanto aos defeitos maiores, menores e totais, a porcentagem de defeitos totais e defeitos menores apresentaram diferença entre os grupos (Tabela 4). Os defeitos espermáticos maiores mais encontrados foram: cauda fortemente dobrada ou enrolada (21% no grupo A e 28% grupo B) e gota citoplasmática proximal (35% no grupo A e 15% grupo B). Os defeitos menores mais frequentes foram cauda dobrada ou enrolada (35% no grupo A e 33% grupo B) e gota citoplasmática distal (29% no grupo A e 14% grupo B).

Tabela 4. Médias ajustadas e erro padrão das características defeitos totais (DEF. TOTAIS), defeitos maiores (DEF. MAI) e defeitos menores (DEF. MEN) entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore.

Grupos	Variáveis			
	N	DEF. TOTAIS (%)	DEF. MAI (%)	DEF. MEN (%)
Grupo A	6	12,67±0,11 ^a	5,20±0,20 ^a	10,00±0,14 ^a
Grupo B	9	7,89±0,12 ^b	4,50±0,17 ^a	3,89±0,17 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

A relação dos principais íons encontrados nos espectros de massas entre os grupos A (baixa resistência) e grupo B (alta resistência) no sêmen estão descritos na Tabela 5. Foram identificados, pela análise de importância variável na projeção (VIP), três íons lipídicos diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos, sendo que os lipídios de m/z 704,59; m/z 804,59 e m/z 943,77 foram encontrados em maior abundância relativa no grupo A (Tabela 5). A diferença encontrada no perfil lipídico espermático entre os grupos está representada nas Figuras 1 e 3. A Figura 1 apresenta a diferença do perfil lipídico espermático, analisado por PLS-DA, entre os grupos A e B e a Figura 3 apresenta a pontuação VIP diferenciando a abundância relativa dos íons entre os grupos.

Tabela 5. Relação massa-carga (m/z), dos íons lipídicos identificados com importância variável na projeção (VIP), subclasses lipídicas e massa erro dos íons analisados pelo teste VIP nos grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no sêmen de touros Nelore.

m/z	Grupo	Subclasses	Aduto	Erro	Banco
704,59	A	SM	[M+H] ⁺	50	HMDB
804,59	A	PE	[M+Na] ⁺	50	HMDB
943,77	A	TG	[M+H] ⁺	50	HMDB

Identificação baseada na literatura e base de dados (<http://lipidsearch.jp> ou www.lipidmaps.org). SM: esfingomielina; TG: triglicerídeos; PE: fosfatidiletanolamina; refere-se às espécies e subespecies lipídicas identificadas.

Na Tabela 6 está apresentada a relação dos principais íons encontrados nos espectros de massas entre os grupos A (baixa resistência) e grupo B (alta resistência) no

plasma seminal. Foram identificados, pela análise de importância variável na projeção (VIP), trinta e quatro íons lipídicos diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos, sendo que os trinta e quatro lipídios descritos na Tabela 6, foram encontrados em maior abundância relativa no grupo B. A Figura 2 apresenta a diferença do perfil lipídico do plasma seminal, analisado por PLS-DA, entre os grupos A e B e a Figura 4 apresenta a pontuação VIP diferenciando a abundância relativa dos íons entre os grupos no plasma seminal.

Tabela 6. Relação massa-carga (m/z), dos íons lipídicos identificados com importância variável na projeção (VIP), subclasses lipídicas e massa erro dos íons analisados pelo teste VIP nos grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) no plasma seminal de touros Nelore.

m/z	Grupo	Subclasses	Aduto	Erro	Banco
805,59	B	TG	$[M+Na]^+$	100	HMDB
816,60	B	PC	$[M+H]^+$	50	HMDB
804,59	B	PC	$[M+H]^+$	50	HMDB
705,59	B	CE	$[M+H]^+$	50	HMDB
811,62	B	TG	$[M+H]^+$	100	HMDB
893,74	B	TG	$[M+H]^+$	50	HMDB
782,58	B	PC	$[M+H]^+$	50	HMDB
659,29	B	Glúten exorphin B5	$[M+H]^+$	50	HMDB
828,54	B	PC	$[M+H]^+$	50	HMDB
704,59	B	SM	$[M+H]^+$	50	HMDB
750,55	B	PE	$[M+H]^+$	50	HMDB
903,59	B	PGP	$[M+H]^+$	100	HMDB
770,57	B	PE	$[M+H]^+$	50	HMDB
731,60	B	SM	$[M+H]^+$	50	HMDB
793,60	B	TG	$[M+H]^+$	50	HMDB
680,63	B	NI	-	-	-
746,59	B	PC	$[M+H]^+$	50	HMDB
861,68	B	TG	$[M+H]^+$	50	HMDB
675,55	B	SM	$[M+H]^+$	50	HMDB
680,49	B	OS	$[M+H]^+$	100	HMDB
723,46	B	PA	$[M+Na]^+$	50	HMDB
740,53	B	PE	$[M+H]^+$	50	HMDB

745,57	B	TG	$[M+H]^+$	100	HMDB
699,65	B	CE	$[M+H]^+$	100	HMDB
688,52	B	OS	$[M+H]^+$	50	HMDB
947,79	B	TG	$[M+H]^+$	50	HMDB
754,55	B	PC	$[M+H]^+$	50	HMDB
824,58	B	PE	$[M+H]^+$	50	HMDB
891,74	B	TG	$[M+H]^+$	50	HMDB
751,55	B	SM	$[M+Na]^+$	50	HMDB
722,64	B	NI	-	-	-
706,55	B	PC	$[M+H]^+$	50	HMDB
747,59	B	TG	$[M+H]^+$	100	HMDB
795,61	B	TG	$[M+H]^+$	50	HMDB

PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; SM: esfingomielina; TG: triglicerídeos; CE: éster ácido graxo de colesterol; PGP: fosfato de fosfatidilglicerol; PS: fosfatidilserina; PA: ácido fosfatídico; NI: não identificado; refere-se às espécies e subespecies lipídicas identificadas no HMDB (banco de dados molecular humano).

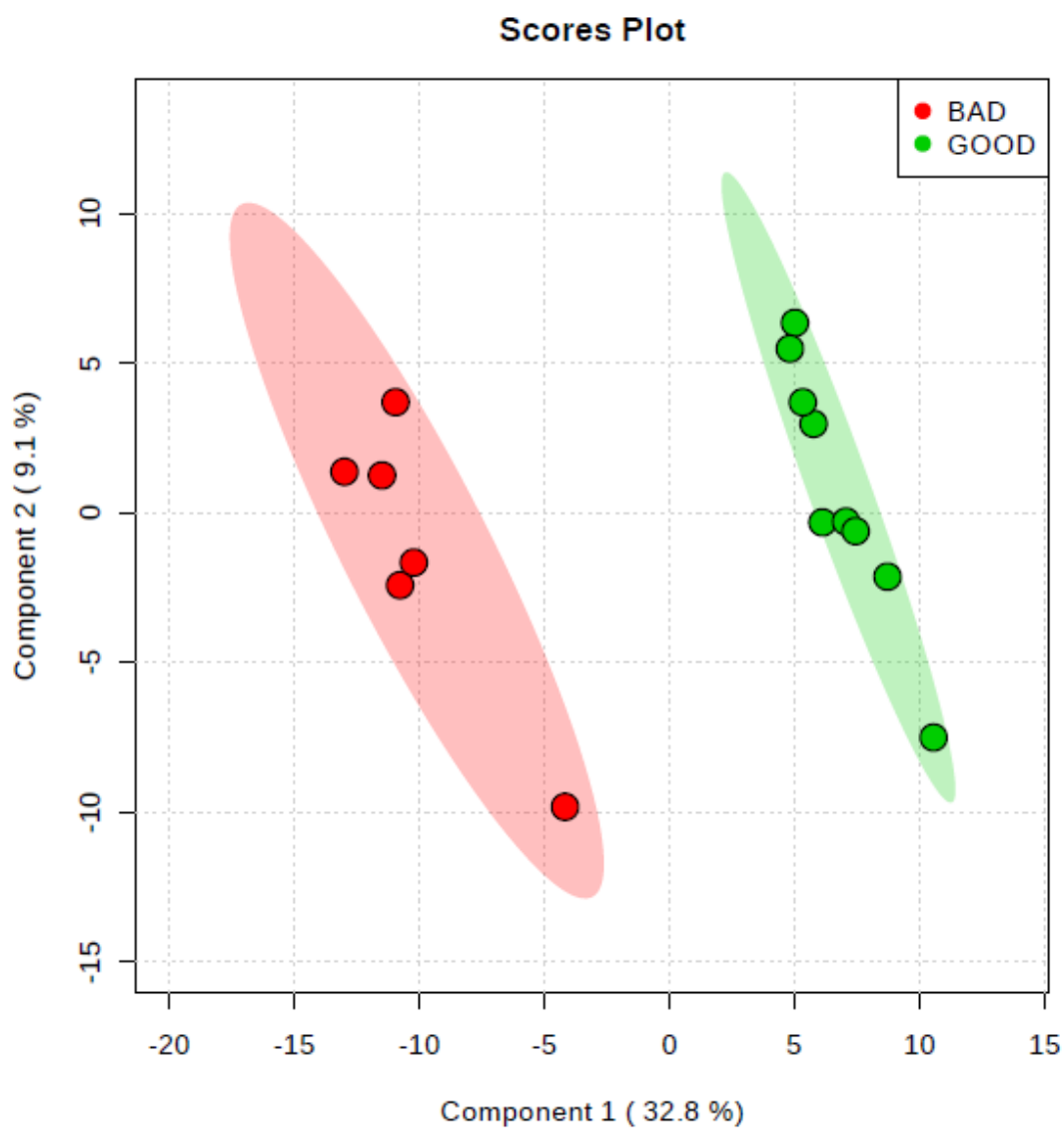


Figura 1: Representação gráfica da diferença do perfil lipídico, analisado por PLS-DA, entre os grupos A (vermelho, baixa resistência) e B (verde, alta resistência) nos espermatozoides de touros Nelore.

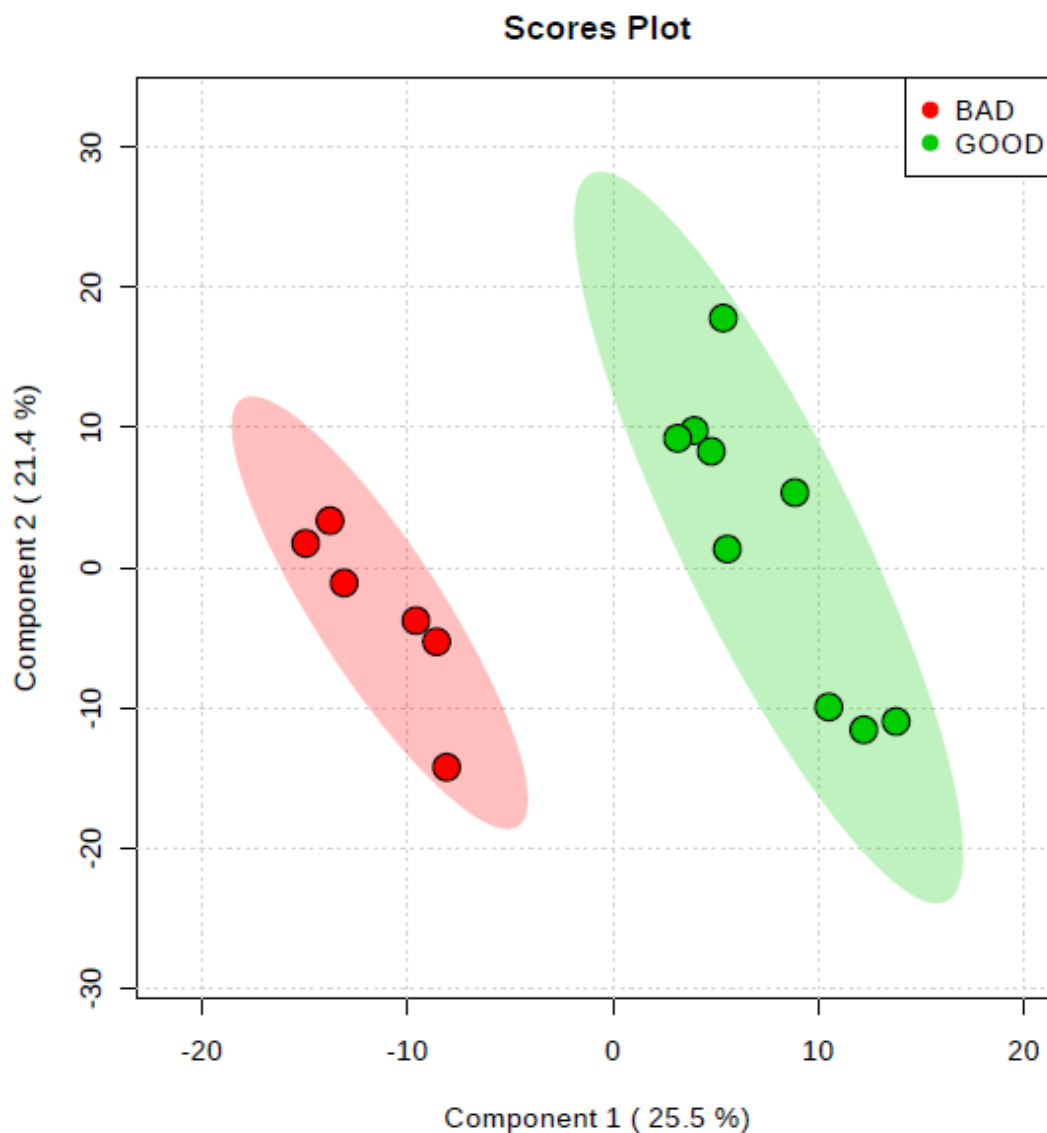


Figura 2: Representação gráfica da diferença do perfil lipídico do plasma seminal do sêmen de touros Nelore, analisado por PLS-DA, entre os grupos A (vermelho, baixa resistência) e B (verde, alta resistência).

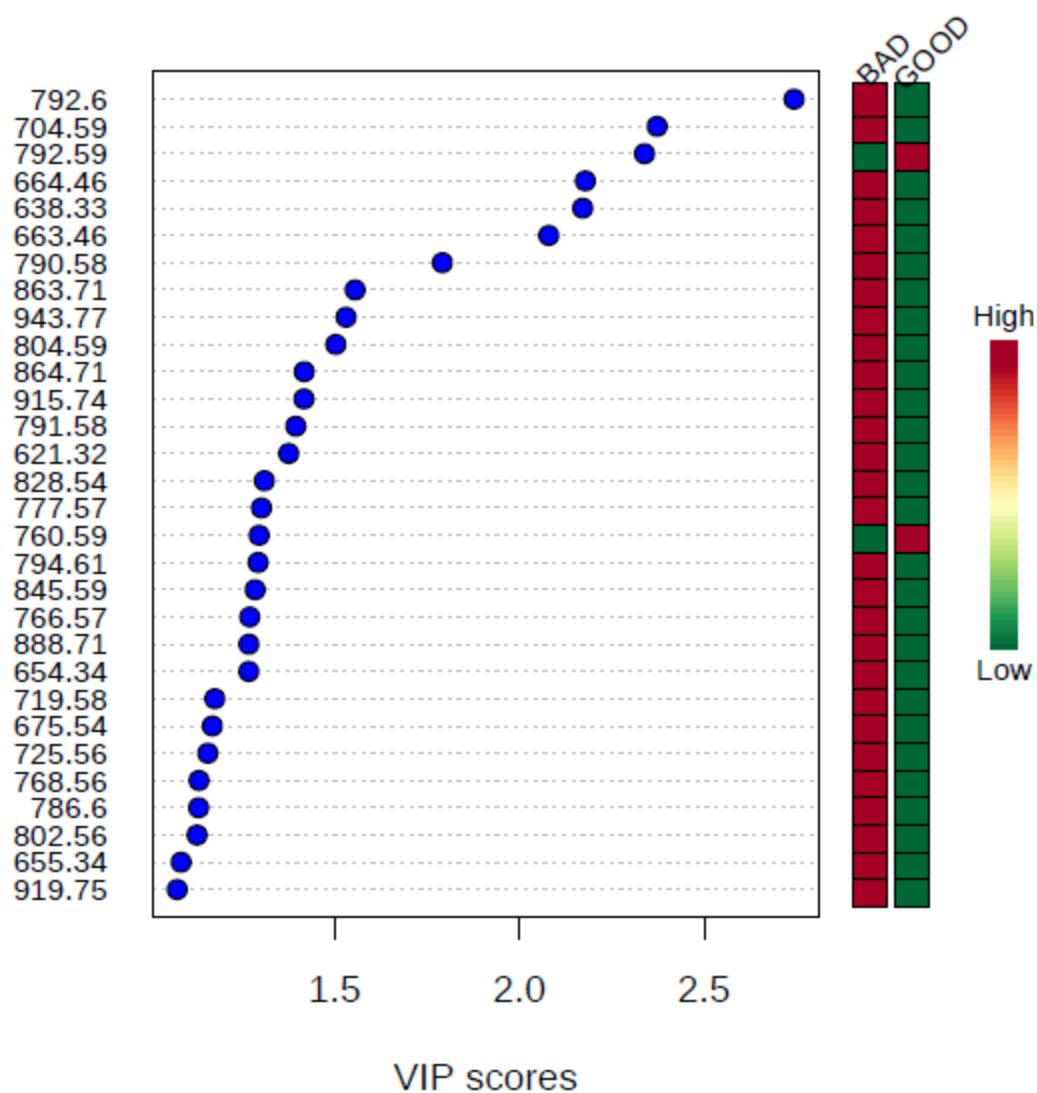


Figura 3: Pontuação VIP diferenciando a abundância dos íons entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) nos espermatozoides de touros Nelore. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas dos íons em cada grupo estudado.

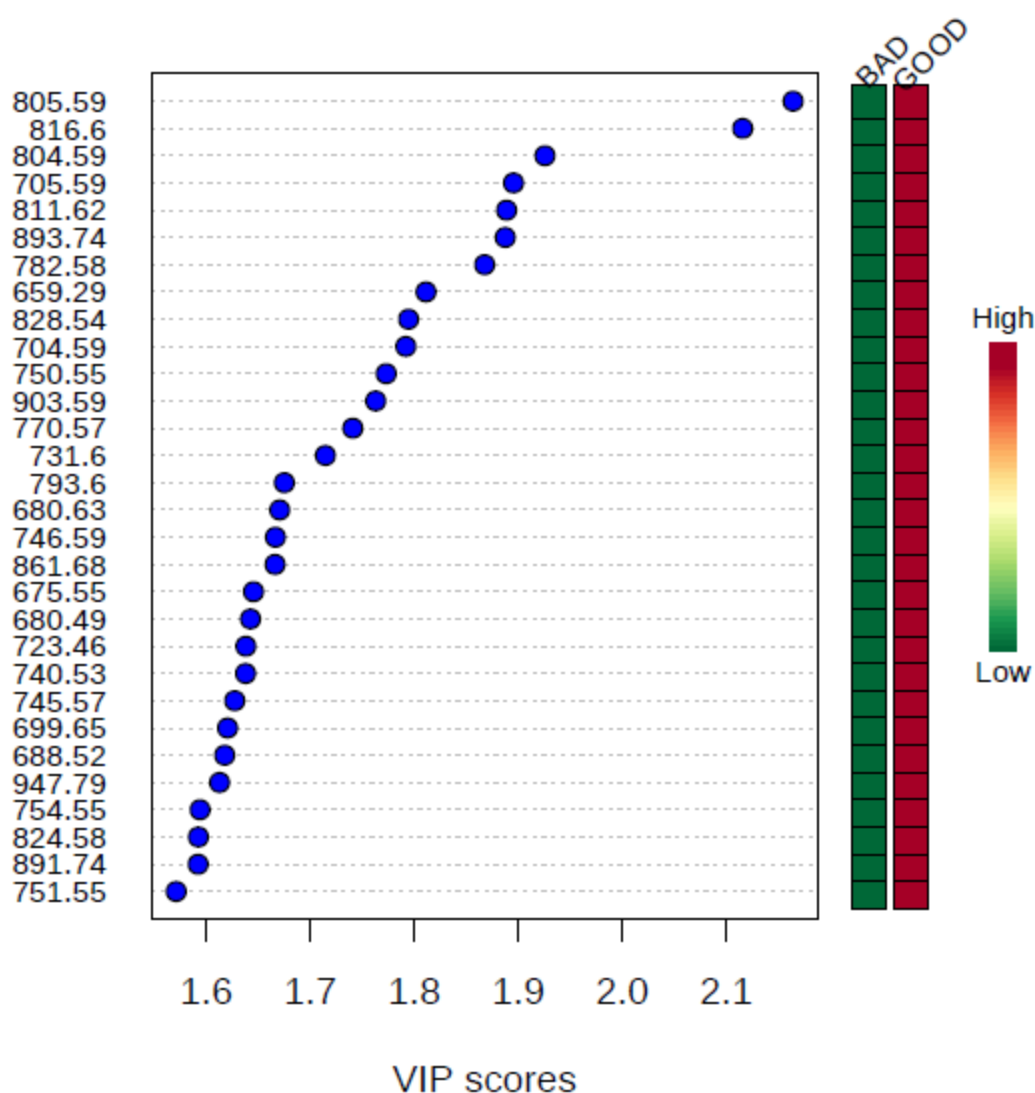


Figura 4: Pontuação VIP diferenciando a abundância dos íons do plasma seminal entre os grupos A (baixa resistência) e B (alta resistência) do sêmen de touros Nelore. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas dos íons em cada grupo estudado.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado após a descongelação que nos parâmetros cinéticos MT, MP e RAP os animais do grupo com alta resistência a congelação (B) apresentaram melhor qualidade seminal em relação aos do grupo com baixa resistência (A), resultado esse esperado já que foi realizada a seleção dos grupos em relação a qualidade e resistência espermática durante a criopreservação.

Os grupos também apresentaram diferença estatística nos parâmetros morfológicos, o grupo A apresentaram maior porcentagem de defeitos totais e menores, fato que pode influenciar na baixa resistência a congelação dos animais pertencentes a esse grupo.

A análise dos gráficos de PLS-DA demonstram as diferenças existentes entre a composição lipídica da membrana espermática e no plasma seminal entre os touros do grupo A em relação aos do grupo B. Essa diferença entre a quantidade e/ou tipo de lipídios é um dos fatores que explica a diferença na resistência à criopreservação do sêmen entre os dois grupos, pois a composição lipídica do espermatozoide é essencial nos processos de criopreservação [25].

Quando os espermatozoides são expostos à temperatura não fisiológica, como acontece na congelação seminal, ocorrem mudanças na organização bidimensional dos lipídios que compõem a membrana plasmática espermática, alterando por sua vez a fluidez e levando a perda dos lipídios da membrana [26, 27]. Mudanças na fluidez da membrana pode ocorrer à temperatura corpórea, sendo a proporção entre fosfolipídios e colesterol que irão determinar esse estado de fluidez, além da natureza desses fosfolipídios [25] e consequentemente afetando a resistência à criopreservação da membrana espermática [28]. Esse fato pode ter ocorrido com os touros do grupo A, e explicar a menor resistência a congelação seminal desses animais.

A pontuação VIP demonstra que os touros do grupo A apresentam três íons lipídicos, presentes na membrana espermática, em maior abundância relativa em relação aos dos animais do grupo B. Dentre esses três lipídios, estão presentes a esfingomielina (SM, m/z 704,59) e a fosfatidiletanolamina (PE, m/z 804,59), assim como Johnson et al., [29], relataram em suínos, uma maior quantidade de fosfatidiletanolamina e esfingomielina na monocamada interna da membrana espermática, e ainda diferenças na

composição dos ácidos graxos desses fosfolipídios, pois possuem poucas duplas ligações. Estas diferenças estruturais na membrana do espermatozoide ajudam a explicar sua alta sensibilidade a criopreservação.

A maior abundância de esfingomielina presente na membrana desses animais pode ser a causa da baixa motilidade espermática dos mesmos após o descongelamento, sendo justificada pela ausência de ácidos graxos de dupla ligação na sua estrutura molecular. A relação desse lipídio com menor integridade da membrana é possivelmente devido à presença de ácidos graxos saturados, que estão associados com maior rigidez da membrana [30, 31]. As esfingomielinas, também já foi citada por outros autores, por sua possível associação na indução da apoptose e geração de ceramidas [32,33].

Outro lipídio em maior abundância na membrana dos animais com menor resistência a criopreservação foram as fosfatidiletanolaminas, que apresentam intolerância ao processo de congelamento provavelmente devido ao grau de saturação dos ácidos graxos desse lipídio. Essa classe lipídica é formada pela reação enzimática da etanolamina com fosfatidilserina, está envolvida com diversas funções, algumas delas são a modulação da atividade de receptores, enzimas moleculares sinalizadoras, canais iônicos e na regulação da fluidez da membrana. As etanolaminas, assim como colinas, são normalmente combinadas com ácidos graxos poli-insaturados associados à fluidez da membrana e que tornam os espermatozoides mais susceptíveis ao processo oxidativo, pois quando oxidam as cadeias produzem novos metabólitos oxidantes aumentando a lesão celular [34].

As fosfatidiletanolaminas, no processo de desestabilização da membrana, são redistribuídas e expostas ao ambiente celular e assim sinalizam a apoptose [35].

Portanto, é plausível que haja maior abundância deste lipídio no grupo A e esteja associada a um possível processo de apoptose dos espermatozoides pós-descongelamento.

O plasma seminal apresentou trinta e quatro íons lipídicos em maior abundância relativa nos animais do grupo B em relação aos do grupo A, portanto, os animais que apresentam maior resistência a criopreservação contêm trinta e quatro lipídios em maior abundância relativa no plasma seminal. Esses lipídios no plasma seminal no grupo B são os responsáveis e podem explicar a diferença e maior resistência do grupo à congelamento espermática, em relação ao outro grupo, sendo conhecida a relação da composição lipídica do plasma seminal com criotolerância na espécie [36].

Um dos possíveis motivos dessa diferença lipídica no plasma seminal ocorrer é a própria quantidade e tipo de lipídios, que podem favorecer ou prejudicar a resistência à congelamento em cada grupo, pois sabe-se que a composição de lipídios do plasma seminal está diretamente relacionada a resistência espermática durante o processo de criopreservação [4].

O perfil lipídico do plasma seminal, apresentou resultados diferentes em relação a composição lipídica da membrana espermática entre os grupos. Enquanto, na membrana foi observado no grupo A lipídios em maior abundância que estão relacionados à apoptose e prejudicam a resistência à criopreservação, no plasma seminal os animais do grupo B devem apresentar lipídios em maior abundância relacionados a maior resistência à congelamento, demonstrando que é necessária maior quantidade de fatores para desestabilizar as membranas espermáticas desse grupo. Porém, para o grupo A que apresenta menor resistência espermática à congelamento, são necessários menores quantidades de fatores para desestabilizar as membranas espermáticas durante os processos de criopreservação.

Nos touros resistentes a congelação (grupo B) a maioria dos lipídios encontrados em maior abundância no plasma seminal foram triglicerídeos (m/z 805,59; m/z 811,62; m/z 893,74; m/z 793,60; m/z 861,68; m/z 745,57; m/z 947,79; m/z 891,74; m/z 747,59 e m/z 795,61) e fosfatidilcolina (m/z 816,60; m/z 804,59; m/z 782,58; m/z 828,54; m/z 746,59; m/z 754,55 e m/z 706,55).

Os lipídios em diferentes graus de saturação podem afetar a temperatura da membrana plasmática e deste modo alterar sua tolerância ao choque frio [37, 38]. Durante o choque frio, ocorrem modificações na distribuição dos fosfolipídios pela camada dupla da membrana [39], como a translocação da fosfatidilserina, para o folheto externo [40]. Essa translocação causa perda de motilidade espermática e consequentemente queda da fertilidade do sêmen [41].

A fosfatidilcolina é um fosfolipídio que se diferencia nos touros do grupo B e possui na maioria das suas fórmulas alto grau de insaturação, que podem alterar a fluidez da membrana espermática. A fluidez da membrana plasmática é essencial para o sucesso da criopreservação espermática. Estudos já demonstraram que quanto maior a fluidez da membrana espermática em humanos, maior a resistência à congelação [42]. Além disso, alto grau de insaturação dos fosfolipídios presentes no plasma seminal nos animais do grupo B pode estar favorecendo a resistência espermática desse grupo à congelação. Em garanhões, já foi demonstrada a relação entre os ácidos graxos insaturados e a qualidade da membrana plasmática dos espermatozoides após a congelação, esses lipídios em maiores quantidades na membrana melhoram sua resistência ao processo de criopreservação [9]. Estudo similar foi realizado por Sudano et al. [32] aonde observaram que um maior grau de insaturação dos fosfolipídios nos embriões das vacas Simentais apresentaram melhor resistência à criopreservação. Fato

que pode ajudar explicar a resistência á criopreservação e melhor qualidade cinética dos espermatozoides nos touros do grupo B.

O outro lipídio mais encontrado em maior abundância no plasma seminal dos touros do grupo B, foram os triglicerídeos, formado pela união de três ácidos graxos em uma molécula de glicerol e apresentando alto grau de insaturação.

A composição específica de ácidos graxos no sêmen pode fornecer pistas para a compreensão dos mecanismos por trás das diferenças na congelabilidade. Neste contexto, os ácidos graxos saturados têm sido associados com a regulação in vitro do metabolismo energético e motilidade espermática [40, 42]. Contudo, a elevada proporção de ácidos graxos saturado (30%) foi relacionada com espermatozoides danificados. Pelo contrário, porcentagens altas de ácidos graxos insaturados (50%) foi positivamente correlacionada com membranas intactas pós-descongelação [43]. Adicionalmente, variações na composição da membrana contendo ácido docosa-hexanóico tem sido associadas com diferenças na criotolerância seminal. A diminuição dos ácidos graxos poli-insaturados e docosa-hexanóico nos espermatozoides e plasma seminal, tem sido observada em touros maduros, sugerindo oxidação com o envelhecimento [44].

Ainda, a composição de ácidos graxos no sêmen é um fator que pode explicar a qualidade seminal em geral e a capacidade de congelação em particular. Por exemplo, a composição de ácidos graxos pode alterar o plasma seminal humano e seu estado antioxidante. A maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados pode aumentar a capacidade antioxidante no sêmen, enquanto que uma proporção mais elevada de ácidos graxos saturados (62,6%) e monoinsaturados (19,7%) reduz essa capacidade [45]. Assim, uma elevada proporção de ácidos graxos saturados no sêmen (49,9% em espermatozoides e 66,6% no plasma seminal) pode ser considerado um fator de

instabilidade da membrana espermática, e alterar o estado antioxidante do plasma seminal, reduzindo a porcentagem dos espermatozoides com membrana plasmática intactas após a descongelação [46].

O específico perfil dos lipídios identificados no plasma seminal desses reprodutores pertencentes ao grupo B, provavelmente são devidos a características genéticas e contribuíram com a resistência espermática à congelação dos mesmos. Adicionalmente, o fato dos touros com maior resistência a congelação seminal (grupo B) apresentarem maior abundância relativa de lipídios específicos no plasma seminal, abre a possibilidade de estudos relacionados à incorporação de lipídios ao diluente.

No plasma seminal a diferença entre os perfis lipídicos entre os touros sensíveis e resistentes à criopreservação de sêmen, e ainda o fato do grupo A apresentar maior abundância de lipídios específicos nos espermatozoides, abre a possibilidade para pesquisas relacionadas à estes lipídios e sua relação com a sensibilidade espermática à criopreservação. Talvez ainda tornarem-se possíveis marcadores biológicos da criotolerância espermática em bovinos da raça Nelore, como em humanos onde concentrações maiores dos ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, docosa-hexanóico e araquidônico indicam espermatozoides de pior qualidade [47].

A diferença lipídica encontrada no presente estudo é responsável e pode explicar a maior susceptibilidade do grupo à danos espermáticos após a congelação, assim como a menor congelabilidade do grupo A em relação ao B e indicar a predisposição a criotolerância do animal, corroborando com esses achados Thurson et al. [36], observaram em suínos que as características da membrana plasmática espermática e a congelabilidade são geneticamente determinadas e transmitidas, provavelmente por alterações que ocorrem durante a espermatogênese. Fato que poderia justificar os achados do presente estudo, explicando a diferença da composição lipídica tanto nos

espermatozoides, como no plasma seminal entre os grupos com maior e menor resistência a criopreservação.

Esses resultados, ainda possibilitam estudos que possam correlacionar uma possível perda de lipídios da membrana plasmática para o plasma seminal, e a suplementação dietética como ferramenta para alterar a composição lipídica espermática e acarretar benefícios a fertilidade dos reprodutores na espécie bovina.

CONCLUSÃO

Pela análise foi observada diferenças nos padrões lipídicos dos espermatozoides e no plasma seminal de touros sensíveis e resistentes à criopreservação. Portanto, os touros com baixa resistência a congelamento apresentaram maior abundância de lipídios específicos no sêmen e os touros com alta resistência a congelamento apresentaram maior abundância de lipídios específicos no plasma seminal.

Novos estudos com adição de lipídios específicos nos meios podem colaborar para criopreservação do sêmen bovino. Ainda, abre a possibilidade, para estudos sobre a utilização de lipídios como marcadores biológicos para prever a resistência espermática à congelamento de touros da raça Nelore. Porém, futuros estudos devem ser realizados avaliando a interação do plasma seminal com os lipídios das membranas espermáticas e a sua relação com a resistência espermática à criopreservação.

REFERÊNCIAS

[1] White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold-shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5:639-58.

[2] Leite, T.G.; Vale Filho, V.R.; Arruda, R.P.; Andrade, A.F.C., Emerick, L.L.; Zaffalon, F.G.; Martins, J.A.M.; Andrade, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, v.120, p.31–38, 2010.

[3] Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992; 29:255- 66.

[4] Alvarez JG, Storey B. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 2008; 13:232–41.

[5] Lebig J, Gey C, Süss R, Schiller J, Glander HJ, Arnhold J. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B* 2004; 137:265-77.

[6] García BM, Fernandez LG, Ferrusola CO, Bolanos JMG, Martinez HR, Tapia JA, Morcuende D, Pena FJ. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the postthaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2011; 75:811–18.

[7] Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53:47-58.

[8] Cerolini S, Kelso KA, Noble RC, Speake BK, Pizzi F, Cavalchini LG. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol Reprod* 1997; 57:976–90.

[9] Ferrusola CO, Fernández LG, García BM, Salazar CS, Morell JM, Martinez HR, Tapia JA, Peña FJ. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11 increases after cryopreservation of stallion spermatozoa is stallion dependent and relates to “apoptosis like” changes. *Reproduction* 2009; 138:55–63.

[10] Andrade AFC, Zaffalona FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Bressan FF, Martins SMMK, Arruda RP. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology* 2012; 77:1866–72.

[11] Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992; 29:255- 66.

[12] Fuchs B, Jakop U, Göritz F, Hermes R, Hildebrandt T, Schiller J, Müller K (2009) MALDI-TOF “fingerprint” phospholipid mass spectra allow the differentiation between Ruminantia and Felidae spermatozoa. *Theriogenology* 71(4):568–575

[13] Arienti G, Saccardi Carla, Carlini Enrico, Verdacchi Rosaria, Carlo A (1999) Distribution of lipid and protein in human semen fractions. *Clin Chim Acta* 289(1):111–120

523

524 [14] Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'aqua, J.A., Zahn, F.S., Alvarenga,
525 M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 2008;
526 107(Suppl 3-4): 293-301.

527

528 [15] Harrison, R.A.P.; Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane
529 integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990;
530 88:343-352

531

532 [16] Freitas-Dell'Aqua, C.P.; Guasti, P.N.; Monteiro, G.A.; Maziero, R.R.D.;
533 Dell'Aqua Jr, J.A.; Papa, F.O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen
534 stallion spermatozoa. *Anim Reprod*, v.9, p.941, 2012.

535

536 [17] Parrish J.J, Susko-Parrish I.L. Winer M.A, First N.L. Capacitation of bovine sperm
537 by heparin. *Biol Reprod* 38:1171-80, 1988.

538

539 [18] Guasti P.N, Freitas-Dell'aqua C.P, Maziero R.R.D, Hartwig F.P, Monteiro G.A,
540 Lisboa F.P, et al. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid
541 peroxidation of equine spermatozoa. *Anim Reprod* 2012; 9:929.

542

543 [19] Bligh, E.G., Dyer, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification,
544 *Biochem. Can J Physiol* 1959; 37:911–917.

545

546 [20] Van Den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, de Vito M, Farland W, Feeley M,
547 Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama

C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006; 93:223–241.

[21] Rubingh, C. M., Bijlsma, S., Derks, E. P. P. A., et al. Assessing the performance of statistical validation tools for megavariable metabolomics data. *Metabolomics*, 2(2), 2006; 53–61.

[22] Salek R, Colebrooke R, Macintosh R, Lynch P, Sweatman B, Emson P, Griffin J. A metabolomic study of brain tissues from aged mice with low expression of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) gene. *Neurochem Res*. 2008; 15(2):292–300. doi: 10.1007/s11064-007-9542-3.

[23] Xi, S.Y., Hong, R.J., Huang, J.R., Lu, D.W., Qian, L.C., Li, P.C., Wen, L., Wang, Y.H. Effects of Ciji Hua'ai Baosheng Granule Formula (CHBGF) on life time, pathology, peripheral blood cells of tumor chemotherapy model mouse with H22 hepatoma carcinoma cells. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med* 11, 2014; 94–100.

[24] Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P. and Woolsey, J. DrugBank: A comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids. Res*. 2006; 34(Database issue):D668-672.

[25] Amann, R.P.; Graham, J.K. Spermatozoal Function. In: *Equine reproduction*, p. 1053, 2010.

[26] Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. *Animal Reproduction Science* 2000a; 62 (n.1-3): 2-22.

[27] Holt, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000b; 43:47-58.

[28] Giraud, M.N.; Motta, C.; Boucher, D.; Grizard, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15:2160-2164.

[29] Johnson LA, Gerrits RJ and Young EP (1969) Quantitative analysis of porcine spermatozoa and seminal plasma phospholipids as affected by frequency of ejaculation *Journal of Reproduction and Fertility* 19 95–102.

[30] Flesch FM, Gazella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrana in the proccess of fertilization *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469:197-35.

[31] Lenci A, Picardo M, Gandini L, Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 1996; 2:246-56.

[32] Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro and in vivo-produced blastocysts. *Biol Reprod* 2012; 87:30.

[33] Kalo D, Roth Z. Involvement of the sphingolipid ceramide in heat-shock-induced apoptosis of bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:876-88.

[34] Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2010;2011:1-7, [http: doi:10.4061/2011/686137](http://doi:10.4061/2011/686137). [accessed 13.01.17].

[35] Post JA, Bijvelt JJ, Aj V. Phosphatidylethanolamine and sarcolemal damage during ischemia or metabolic inhibition of heart myocytes. *Am J Physiol* 1995;268:H773-80.

[36] Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism marker linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod* 2002; 66:545-54.

[37] Watson PF (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:481–492.

[38] Kelso KA, Redpath A, Noble RC, Speake BK (1997) Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *Reproduction* 109:1–6.

[39] Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992; 37:1241-52.

[40] Kiernan M, Fahey AG, Fair S (2012) The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reprod Fert* 25:947–954.

[41] Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7:871-91.

[42] Neill A, Masters C (1972) Metabolism of fatty acids by bovine spermatozoa. *Biochem J* 127:375–385.

[43] Macías García B, Gonzalez L, Ortega C, Morillo A, Gallardo JM, Rodriguez H (2011) Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 75:811–818.

[44] Argov-Argaman N, Mahgrefthe K, Zeron Y, Roth Z (2013b) Variation in lipid profiles within semen compartments-the bovine model of aging. *Theriogenology* 80:712–721.

[45] Martínez-Soto J, Landeras J, Gadea J (2013) Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology* 1:365–375.

[46] Díaz R, Inostroza K, Risopatrón J, Sánchez R, Sepúlveda N (2014) Identification of fatty acids in canine seminal plasma. *Andrologia* 46:194–197.

647 [47] Khosrowbeygi A, Zarghami N. Fatty acid composition of human spermatozoa and
648 seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. Prost Leu E
649 Fat A 2007; 77:117–21.

Considerações Gerais

7. Considerações Gerais

Existe vários estudos a respeito de sêmen fresco, congelado, cinética espermática e principalmente sobre o processo de criopreservação em bovinos, entretanto a respeito de lipídios ainda são escassos e este estudo permitiu elucidar o perfil lipídico do sêmen bovino na raça Nelore.

Os resultados do presente estudo permitem concluir que existe diferença no perfil lipídico das membranas dos espermatozoides e na resistência espermática à criopreservação em touros da raça Nelore.

Existem diferenças no perfil lipídico do plasma seminal entre os touros sensíveis e resistentes à congelação de sêmen.

Assim sendo, esses resultados abrem campo para futuras pesquisas sobre lipídios serem utilizados como marcadores biológicos e poder predizer a resistência espermática de um touro à congelação.

Novos estudos devem ser realizados para avaliar a interação do plasma seminal com os lipídios da membrana espermática e a sua relação com a resistência espermática à criopreservação.

Anexos

ANEXO I

Setup CASA

Ajuste do htma-ivos-14 para análise espermática em bovinos.

CARACTERÍSTICAS	AJUSTE
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	6 pixels
Contraste para células imóveis	60 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	70 %
Referência para velocidade média (VAP)	<40 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VAP)	<30 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 $\mu\text{m/s}$
Limite inferior de tamanho	0,41 pixels
Limite superior de tamanho	1,99 pixels
Limite inferior de intensidade	0,30
Limite superior de intensidade	7,89
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	96%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

ANEXO II

Preparo das sondas fluorescentes.

Soluções	Constituintes	Quantidades
Estoque IP	Iodeto de Propídeo ¹	10 mg
	Solução Fisiológica	20 mL
Estoque CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína ²	9.2 mg
	DMSO	20 mL
Estoque de Formaldeído	Formalina a 40%	1 mL
	Solução Fisiológica	79 mL
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio	3 g
	Solução Fisiológica	100 mL

¹ P4170 – Sigma

² C541 – Sigma

ANEXO III

Solução de Trabalho

Soluções	Quantidade
Solução de Citrato de Sódio	1 mL
Solução de Formaldeído	10 µL
Solução de iodeto de propídio	10 µL
Solução de Carboxifluoresceína	20 µL