RENATO REZENDE BERGQVIST

Biomarcadores lipídicos de congelabilidade no sêmen equino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

VERSÃO CORRIGIDA

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2711
FMVZ

Bergqvist, Renato Rezende
Biomarcadores lipídicos de congelabilidade no sêmen equino / Renato Rezende Bergqvist. -- 2012.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Andrade Silva.

1. Garanhão. 2. Congelabilidade. 3. Lipídeos. I. Título.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – ÁREA: ANIMAL

Processo USP nº: 2012.1.1030.74.8

Data de entrada: 23/08/2012

Pesquisadores: Prof (a) Dr (a): Luciano Andrade Silva

Currículo(s) do(s) pesquisador(es): Prof. Dr. Luciano Andrade Silva – LT/FZEA/USP (orientador); Prof. Dr. Felipe Perecin – LMMD/FZEA/USP (co-orientador); M.V. Renato Rezende Bergqvist – Mestrando LT/FMVZ/USP (Pesquisador responsável); Msc. Reno Roldi de Araújo – Doutorando LT/FMVZ/USP; Alessandra Tata – ThoMSon Lab/UNICAMP; Giovana Bataglion – ThoMSon Lab/UNICAMP.

PARECER

Título do Projeto: Biomarcadores lipídicos de congelabilidade no sêmen de garanhões.

Apreciação Geral: O projeto é pertinente, apresenta adequações éticas sobre a experimentação animal. Empregarão técnicas sofisticadas para caracterizar o sêmen eqüino, no caso, análises proteômicas. Considero o projeto apto.

Introdução: O projeto possui hipótese adequada. Seu embasamento bibliográfico está adequado a projeto de mestrado.

Metodologia: A metodologia envolve colheita de sêmen via métodos tradicionais e conhecidos. As analises do sêmen serão feitas por espectrometria junto ao Laboratório ThoMson da Unicamp.

Aspectos Éticos: A proposta segue as normativas legais de experimentação animal.

Outros Comentários: Nada digno de nota.

Esclarecimentos Necessários: Não há necessidade de correções da proposta.

Pelo Comitê de Ética:

☒ **Referendado.**

☐ **Não referendado.**

☐ **Retirado de pauta.**

Pirassununga, 13 de setembro de 2012.

Notifique-se o interessado.

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade - Presidente do CEP/FZEA

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BERGQVIST, Renato Rezende
Título: Biomarcadores lipídicos de congelabilidade no sêmen equino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luciano Andrade Silva pela oportunidade de realização deste mestrado e orientação durante as etapas necessárias para obtenção deste título.

Ao Prof. Dr. Felipe Perecin pela colaboração no delineamento dos experimentos e na conexão com os parceiros deste trabalho.

A todos alunos de pós-graduação e graduação integrantes do Laboratório de Teriogenologia pelo auxílio na realização dos experimentos e demais atividades associadas ao mestrado. Em especial, gostaria de agradecer ao Msc. M.V. Reno Roldi Araújo não só pela colaboração na realização dos experimentos, mas principalmente pela amizade cultivada neste período.

Ao Prof. Dr. Flavio Meirelles e Prof. Dr. Rubens Paes Arruda por abrirem as portas de seus laboratórios, tornando possível a realização dos experimentos. A colaboração de seus alunos de pós-graduação também foi de grande importância e a eles extendo meus agradecimentos.

A toda equipe do Laboratório Thomson IQ/UNICAMP que tornou a realização deste trabalho possível, em especial à Dra. Alessandra Tata e Giovana Bataglion pela colaboração na realização das análises dos lipídeos. Este título não seria possível sem sua ajuda e principalmente paciência.

A todos funcionários e estagiários do Centro Avançado de Reprodução Equina Embrio-Equi e Haras Bandeirantes, em especial ao Msc. M.v. Carlos Guilherme Schutzer, pela disponibilidade dos garanhões e colaboração nas coletas de sêmen.

A Botupharma Ltda, em especial ao Dr. José Dell'Aqua, por gentilmente cederem os diluentes e meios de congelação para sêmen de garanhões utilizados neste experimento.

RESUMO

BERGQVIST, R. R. **Biomarcadores lipídicos de congelabilidade no sêmen equino**. (Lipid biomarkers fo freezeability on stallion semen) 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A inseminação artificial utlizando sêmen criopreservado de garanhões apresenta uma baixa utilização, principalmente pela variabilidade dos resultados e aumento dos custos relacionados à inseminação. Os lipídeos presentes nas membranas plasmáticas dos espermatozóides participam de diversos eventos associados à fertilização e por sofrerem alterações químicas e estruturais durantes os processos necessários à congelação podem estar relacionados a congelabilidade dos ejaculados. Este trabalho foi composto por dois experimentos. O experimento I utilizou amostras de espermatozóides de seis garanhões e seis touros e objetivou avaliar a possibilidade de análise direta das amostras de espermatozóides e o efeito do armazenamento em metanol por um período de 45 dias a -80°C. As amostras foram coletadas, "lavadas" por centrifugações sucessivas e armazenadas nos seguintes meios: PBS Ca^{++} Mg^{++} Free, Metanol padrão-HPLC e solução 1:1 PBS Ca^{++} Mg^{++} Free e Metanol padrão-HPLC. As amostras em PBS foram analisadas após extração lipídica ou adição de metanol padrão-HPLC previamente à análise. Foi confirmada a possibilidade de análise direta da composição lipídica em MALDI-TOF, sem necessidade de extração. O armazenamento em metanol ou solução contendo o mesmo não resultou em degradação no período observado, no entanto o armazenamento de amostras previamente extraídas por longos períodos resultaram em resultados alterados. O experimento II utilizou amostras de 16 garanhões, armazenadas em solução 1:1 PBS Ca^{++} Mg^{++} Free e Metanol padrão-HPLC. Os ejaculados de origem destas amostras foram submetidos à congelação e os resultados de análise *in vitro* de motilidade e morfologia espermática foram relacionados com os dados de composição lipídica através da análise dos componentes principais (PCA). Não foi observada nenhuma relação entre os resultados de análise seminal *in vitro* e a composição lipídica, apesar de alguns autores encontrarem tal relação, principalmente quanto à relação de determinados ácidos graxos e conteúdo

total de fosfolipídeos. Estes autores utilizaram técnicas complexas, impossibilitando a aplicação na rotina veterinária a campo. A facilidade de preparo das amostras para MALDI-TOF torna esta técnica viável para análise de composição lipídica, no entanto novos testes devem ser realizados incluindo um maior número de amostas e dados de fertilidade a campo.

Palavras-chave: Garanhão. Congelabilidade. Lipídeos.

ABSTRACT

BERGQVIST, R. R. **Lipid biomarkers of frezzeability on stallion semen. (**Biomarcadores lipídicos de congelabilidade no sêmen equino). 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Artificial insemination with stallions' frozen semen have not been widely used, mainly due to the high variability of field results and the increased cost associated with it. Sperm cell membrane lipids play an important role on several events associated with fertilization. These cells go through structural and chemicals changes during freezing and might participate in the freezeability of ejaculates. This work was composed by two experiments. In Experiment I sperm samples from six bulls and six stallions were collected, "washed" through centrifugation and stored at -80° in the following mediums: PBS Ca^{++} Mg^{++} Free, Methanol HPLC-standard and a solution 1:1 PBS Ca^{++} Mg^{++} Free and Methanol HPLC-standard. The samples on PBS were analyzed immediately after lipid extraction or after the addition of methanol. These samples were evaluated on the day after collection and 45 days later for evaluation of the possibility of a direct analyses with methanol and the effect of long periods of storage with methanol on lipid degradation. The possibility of an extraction-free direct MALDI-TOF analysis was confirmed. The storage with methanol did not resulted in lipid degradation for the period studied, however the storage of previously extract samples resulted on irregular spectrums. In Experiment II 16 sperm samples from stallions were collected and frozen. An aliquot of 500µl from each sample was washed through centrifugation and stored with a 1:1 PBS Ca^{++} Mg^{++} Free and Methanol HPLC-standard solution. *In vitro* sperm analysis of motility and morphology were studied for relations with the lipid profile through a principal components analysis (PCA). It was not observed relation between lipid profile and sperm motility and morphology, as previously reported by others authors. However, these authors methodology were highly complex , making it difficult for field application. MALDI-TOF sample preparation its easy and fast and new test with a larger number of samples and field fertility

results may prove this is a viable tool for improving field results with frozen semen artificial insemination.

Keywords: Stallion. Freezeability. Lipids.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa de prenhez de éguas inseminadas com sêmen criopreservado utilizando diferentes técnicas de inseminação, dose e volume inseminante.....21

Tabela 2 – Evolução da taxa de ejaculados criopreservados aceitos pelo National Stud frânces para inseminação artificial no período de 1985-2004.....22

Tabela 3 – Evolução da taxa de prenhez/ciclo em inseminaçãos artificiais com sêmen criopreservado no período de 1985-2004, National Stud frânces.....22

Tabela 4 - Dados referentes aos testes de análises *in vitro* das amostras de sêmen de garanhões.....45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espectros lipídicos por análise direta de amostras de espermatozóides bovinos armazenadas em metanol padrão-HPLC por apenas um dia.....36

Figura 2 – Espectros lipídicos por análise direta de amostras de espermatozóides bovinos armazenada em uma solução 1:1 de PBS Ca^{++} Mg^{++} Free e metanol padrão-HPLC. Os espectros correspondem aos respectivos períodos de armazenagem na presença de metanol: 30 dias, 45 dias, 15 dias e 1 dia.....37

Figura 3 – Espectros lipídicos após extração lipídica e armazenamento a -80°C de amostras de espermatozóides bovinos. Os espectros correspondem aos seguinte períodos de armazenamento após a extração: 15 dias, 30 dias, 45 dias e 1 dia.....38

Figura 4 – PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e a idade dos mesmos. As identificações em amarelo correspondem ao grupo de animais mais jovens (n=8) e os animais em vermelho ao grupo de animais mais velhos (n=8).....46

Figura 5 – PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e a motilidade progressiva pós-descongelação das amostras. As identificações em amarelo correspondem aos animais de resultados superiores (n=8) e as identificações em vermelho correspondem aos animais de resultados inferiores (n=8).....47

Figura 6 – PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e a perda de motilidade progressiva após o processo de congelação/descongelação das amostras. As identificações em amarelo correspondem aos animais de resultados superiores

(n=8) e as identificações em vermelho correspondem aos animais de resultados inferiores (n=8).....47

Figura 7 – PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e o percentual de células com defeitos morfológicos. As identificações em amarelo correspondem aos animais de resultados superiores (n=8) e as identificações em vermelho correspondem aos animais de resultados inferiores (n=8).....48

Figura 8 – PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e o percentual de células com defeitos morfológicos maiores. As identificações em amarelo correspondem aos animais de resultados superiores (n=8) e as identificações em vermelho correspondem aos animais de resultados inferiores (n=8).....48

Figura 9 – Loadings dos íons utilizados para realização do PCA para os diferentes parâmetros testados.....49

Figura 10 - Espectros lipídicos representatiovos dos agrupamentos de amostras encontrados através do PCA.....49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....18
2.1 Criopreservação de sêmen.....18
2.2 Viabilidade e fertilidade do sêmen criopreservado de garanhões.....20
2.3 Membrana plasmática.....23
2.4 Composição lipídica da membrana plasmática.....24
2.5 Técnicas de determinação da composição lipídica.....26
3. HIPÓTESES.....28
4. OBJETIVOS.....29
4.1 Objetivos Gerais.....29
4.2 Objetivos Específicos.....29

Capítulo I: Análise direta da composição lipídica de amostras de espermatozóides e efeito do armazenamento em metanol padrão-HPLC A -80°C sobre a degradação lipídica.

4 INTRODUÇÃO.....31
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....32
6.1 Animais e coleta de sêmen.....32
6.2 Preparo das amostras.....32
6.3 Análise MALDI-TOF.....33
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....35

Capítulo II: Biomarcadores lipídicos de congelabilidade no sêmen equino

8 INTRODUÇÃO.....41
9 MATERIAIS E MÉTODOS.....42
9.1 Animais e coleta de sêmen.....42
9.2 Análise *in vitro* e preparo das amostras.....42
9.3 Congelação das amostras de sêmen.....43
9.4 CASMA e morfologia espermática.....43
9.5 Análise MALDI-TOF e PCA.....44
10 RESULTADOS.....45
11 DISCUSSÃO.....50
12 DISCUSSÃO GERAL.....53
13 CONCLUSÕES GERAIS.....54
REFERÊNCIAS.....55

1 INTRODUÇÃO

As biotécnicas reprodutivas apresentam importante papel na preservação de espécies ameaçadas, melhoramento genético de animais de produção ou performance atlética, e superação de problemas de fertilidade em humanos e animais. Estas técnicas estão em constante desenvolvimento pela comunidade científica, sendo muitas destas empregadas na rotina da reprodução de animais domésticos a campo, como inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), fertilização *in vitro* (FIV) e criopreservação de sêmen.

Esta última técnica se tornou possível a partir do trabalho de Polge et al (1949), atingido larga utilização no manejo reprodutivo de animais de produção, inclusive equinos. Apesar dos estudos constantes, a IA com sêmen criopreservado de garanhões ainda apresenta fertilidade significantemente inferior a IA com sêmen fresco (LOOMIS; GRAHAM, 2008). A baixa fertilidade é consequência de perda da viabilidade de espermatozóides e diminuição da funcionalidade dos sobreviventes (WATSON, 2000), resultantes principalmente do intenso estresse osmótico e choque térmico durante o processo de congelação.

Historicamente, considera-se que menos da metade dos garanhões apresentam resultados satisfatórios em testes laboratoriais pós-descongelação (LOOMIS; GRAHAM, 2008). Entre os testes laboratoriais de análise de sêmen *in vitro*, os parâmetros de motilidade espermática pós-descongelação são os mais utilizados como critério de avaliação, no entanto diversos autores falharam em demonstrar correlação com fertilidade (SAMPER; HELLANDER; CRABO, 1991; DIGRASSIE et al, 2000). Outro parâmetro de análise seminal *in vitro*, a integridade de membrana demonstra correlação com fertilidade de sêmen criopreservado de garanhões (WILHELM, GRAHAM; SQUIRES, 1996; CHRISTENSEN et al, 2000), porém sem correlação com valores de motilidade e velocidade (BLACH ET al, 1989).

A correlação entre fertilidade e integridade da membrana plasmática é facilmente entendida quando nos atentamos às observações de participação desta estrutura em processos como capacitação espermática e reação acrossomal (GADELLA et al, 2001). Esta importante participação nos processos fisiológicos celulares corroboram as teorias de que a fluidez da membrana é um pré-requisito para a função celular normal (LENZI et al, 1996). Sendo assim, a composição desta membrana e suas ações fisiológicas constituem importantes tópicos dos estudos na área de fertilização em mamíferos.

A fluidez e flexibilidade das membranas celulares dependem principalmente de suas contituições lipídicas (LENZi et al, 1996). A composição lipídica da membrana plasmática de espermatozóides de garanhões já foi descrita por diversos autores (MANN; LEONE; PARKES 1956; KOMAREK e al, 1965; PARKS; LYNCH, 1992), utilizando diferentes métodos de cromatografia e mais recentemente espectrometria de massas devido a sua alta sensibilidade e resolução de massa. A utilização deste intrumento permite um conhecimento mais preciso da constituição das membranas celulares e consequentemente de sua atuação nos eventos da fertilização.

Acreditamos que o importante papel dos lipídeos de membrana nas funções espermáticas, assim como a possibilidade de aprofundamento do conhecimento dos componentes celulares pela técnica de espectrometria de massas, constituem uma via promissora para a optimização da fertilidade de garanhões. Portanto, este trabalho objetiva estudar a relação entre congelabilidade de espermatozóides de garanhões e a composição lipídica de suas membranas plasmáticas, assim como o entendimento do efeito dos meios de conservação das amostras sobre os resultados da espectrometria de massas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação de sêmen

A preservação de gametas e embriões por longos períodos é uma biotécnica essencial para programas de melhoramento genético, preservação de espécies ameaçadas, controle de doenças sexualmente transmissíveis e tratamentos de infertilidade. O desenvolvimento destas técnicas iniciou-se ainda no século XVIII com o padre italiano Spallanzani (1729-1799), avançou com a formulação das primeiras teorias de criopreservação por outro padre, B.J. Luyet, e tornou-se possível após a descorberta da capacidade crioprotetora do glicerol por Polge et al (1949). No entanto, apesar dos mais de 60 anos deste marco histórico e dos demais avanços relacionados à criopreservação de gametas e embriões, a inseminação artificial utilizando sêmen criopreservado ainda apresenta resultados significativamente inferiores ao uso do sêmen fresco em diversas espécies (WATSON, 2000).

Os resultados insatisfatórios do sêmen criopreservado são associados principalmente a lesões celulares ocorridas devido a uma intensa pressão osmótica e formação de cristais de gelos intracelulares (SIEME; HARRISON; PETRUNKINA, 2008). Estas lesões, ao contrário do que se pensava inicialmente, não ocorrem durante o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), e sim em temperaturas intermediárias durante a congelação e aquecimento das células (MAZUR, 1984). Durante a congelação, a formação de cristais de gelo no meio extracelular eleva a osmolaridade do meio, promovendo saída de água da célula, e o mesmo ocorrendo de forma inversa durante a descongelação (MAZUR, 1984). A entrada e saída de água da célula devem ocorrer de forma limitada, evitando-se que as alterações do volume celular consequentes deste processo não causem perda da integridade da membrana plasmática e função celular (SIEME; HARRISON; PETRUKINA, 2008).

Na tentativa de evitar ou reduzir a ocorrência destas lesões, chamadas de crioinjúrias, novos protocolos de congelação são desenvolvidos constantemente, principalmente quanto a utilização de diferentes substâncias crioprotetoras (SQUIRES; KEITH, GRAHAM, 2004; ALVARENGA et al, 2005; PAPA et al, 2011; RODRÍGUEZ et al, 2011; PILLET et al, 2012), redução ou eliminação dos efeitos deletérios da centrifugação (ALVARENGA et al, 2012; KNOP et al, 2005; BLISS et al, 2012) e taxa de refrigeração (BRUEMMER et al, 2008; SALAZAR et al, 2011).

Paralelamente a estes estudos, outras técnicas alternativas aos protocolos de congelação habituais estão sendo estudadas, na tentativa de preservação do potencial fertilizante de espermatozóides por longos períodos. Recentemente, Choi et al (2011) produziram potros a partir de amostras de sêmen liofilizado associadas a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Uma outra técnica alternativa, a vitrificação surgiu como uma tentativa de evitar a formação de cristais de gelo intracelulares (Isachenko et al, 2004), porém estudos recentes demonstraram que estas estruturas não se formam em espermatozóides durante o processo de congelação (MORRIS, 2006; MORRIS et al, 2007).

Na espécie equina, a inseminação artificial a partir de amostras de sêmen criopreservado foi aprovada por quase todas as associações de raças, porém seu uso ainda é limitado. A expansão da técnica esbarra principalmente nos baixos índices de fertilidade, aumento dos custos com veterinário e alojamento dos animais e a falta de padronização da técnica (LOOMIS; GRAHAM, 2008). Os garanhões apresentam como característica uma grande variabilidade dos resultados, resultantes de uma seleção genética baseada em pedigree, performance atlética, ou outra característica fenotípica, ignorando a capacidade reprodutiva como fator de seleção (BRITO, 2007; SIEME; HARRISON; PETRUKINA, 2008).

Os padrões de seleção citados acima resultaram em uma população de garanhões onde menos da metade dos indivíduos apresentam resultados satisfatórios pós-descongelação quando um único protocolo de criopreservação é utilizado (revisado por LOOMIS; GRAHAM, 2008). Alguns autores relatam

resultados de até 90% de ejaculados satisfatórios, porém estes resultados somente foram alcançados após uma intensa seleção de garanhões e ejaculados (VIDAMENT, 2005). No entanto, vale ressaltar que estes dados são referentes à motilidade pós-descongelação e este parâmetro não apresenta uma correspondência consistente com à fertilidade a campo destas amostras (KUISMA ET al, 2006).

2.2 Viabilidade e Fertilidade do Sêmen Criopreservado de Garanhões

A determinação do potencial de fertilidade de um garanhão ou ejaculado ainda não pode ser determinada por um único teste laboratorial (KUISMA et al, 2006), apesar deste ser um tópico recorrente de pesquisa nas últimas décadas. Os principais fatores limitantes para o desenvolvimento de um teste confiável para determinação do potencial de uma amostra, assim como a otimização dos resultados comerciais com sêmen congelado, são o custo e tempo necessários para a realização de testes de fertilidade a campo (KIRK; SQUIRES; GRAHAM, 2005), e a falta de padronização da técnica de congelação e avaliação do sêmen (VIDAMENT, 2005, LOOMIS; GRAHAM, 2008). Estas condições determinam menores índices de fertilidade e uma baixa aceitação entre os criadores, ocasionando uma utilização em maior escala do sêmen refrigerado (LOOMIS, 2001). A variabilidade dos resultados com sêmen criopreservado pode ser observada na tabela 1. Estes dados demonstram também a variabilidade nas técnicas de inseminação e dose inseminante utilizadas na rotina a campo.

As publicações de dados de fertilidade a campo são poucas e por muitas vezes incompletas, resultantes da organização do mercado equestre em diversos países, como Brasil e Estados Unidos. Estes países compartilham algumas das barreiras ao desenvolvimento do uso de sêmen congelado, como

a ausência de um centro nacional de reprodução ou ausência de uma rede de centrais privadas (LOOMIS, 2001). Alguns países da europa, como a França, apresentam centros nacionais de reprodução, permitindo uma maior padronização dos protocolos de congelação e facilitação da comercialização das doses.

Tabela 1 – Taxa de prenhez de éguas inseminadas com sêmen criopreservado utilizando diferentes técnicas de inseminação, dose e volume inseminante.

FONTE	TÉCNICA DE IA	DOSE INSEMINANTE (10^6)	VOLUME INSEMINANTE (mL)	TAXA DE PRENHEZ (%)
FÉO et al.	CU	250-350	4	8/25 (32%)
	IP			32/48 (66%)
ALVARENGA et al.	IPGH	100-150	1	34/62 (54%)
SQUIRES et al.	CU	800	2 (1IA)	12/20 (60%)
	CU	400	1 (2IA)	11/20 (55%)
	CU	200	0.5 (2IA)	10/20 (50%)
	IP	200	0.5 (2IA)	4/20 (20%)
SIEME et al.	CU	100	0.5	16/37 (43%)
	IP	100	0.5	17/38 (44%)
	IPGH	100	0.5	22/48 (45%)
	CU	800	12	9/21 (42%)

Adaptado de SIEME, 2011. CU = corpo uterino; IP = inseminação profunda guiada por palpação transretal; IPGH = Inseminação profunda guiada por histeroscópio.

Essa característica do mercado francês permite uma avaliação dos resultados do sêmen criopreservado a campo, assim como uma análise da evolução da técnica e identificação de pontos marcantes deste processo. Em uma retrospectiva do uso de sêmen criopreservado na França no período entre 1985 e 2005, Vidament (2005) consegue descrever a evolução do uso do sêmen congelado em seu país e principalmente, estabelecer algumas relações entre os testes laboratoriais e dados de fertilidade a campo. Após a análise dos dados referentes a este período, percebeu-se uma correlação entre motilidade rápida ($p<0.01$) e velocidade média progressiva (VAP) ($p<00,1$) pós-descongelação e fertilidade. No entanto, como pode ser observado nas tabelas

2 e 3, o aumento em 42% no número de ejaculados que apresentavam motilidade rápida superior ao limite mínimo estabelecido (35%) entre 1995 e 2004 resultaram em apenas 3% de aumento da taxa de prenhez por ciclo.

Tabela 2 – Evolução da taxa de ejaculados criopreservados aceitos pelo National Stud frânces para inseminação artificial no período de 1985-2004.

ANO	N° de GARANHÕES	TAXA DE EJACULADOS ACEITOS (%)
1985	06	58
1990	41	35
1995	64	46
2000	141	78
2004	114	88

Adaptado de VIDAMENT, 2005.

Tabela 3 – Evolução da taxa de prenhez/ciclo em inseminaçãos artificiais com sêmen criopreservado no período de 1985-2004, National Stud frânces.

ANO	N° de ÉGUAS INSEMINADAS	TAXA DE PRENHEZ/CICLO (%)
1985	93	29
1990	248	28
1995	307	43
2000	1326	49
2004	1990	46

Adaptado de VIDAMENT, 2005.

Em um programa comercial de reprodução equina no Brasil (dados pessoais não publicados), em um total de 57 inseminações com sêmen criopreservado de 12 garanhões diferentes, ocorreu prenhez ao primeiro ciclo ou recuperação embrionária 32 vezes (56,1%). No entanto, ao analisarmos os resultados apenas dos dois garanhões mais utilizados (42 inseminações), estes apresentam 64,2% de prenhez ao primeiro ciclo ou embrião recuperado, contra 33,3% dos demais. Estes resultados demonstram que o sêmen criopreservado pode apresentar resultados satisfatórios, porém apenas para aqueles animais que apresentam ejaculados de maior resistência ao processo de congelação. Sendo assim, o estudo das características seminais e sua associação com a sobrevivência e manutenção da funcionalidade, após o processo de

congelação, possibilita a identificação destes animais de congelabilidade superior e das alternativas para melhor aproveitamento daqueles que não apresentam resultados satisfatórios.

2.3 Membrana Plasmática

Espermatozóides são células altamente diferenciadas, polarizadas e compartimentalizadas, com uma alta relação membrana:citoplasma (PAZ et al, 2003). A membrana plasmática do espermatozóide, conhecida como plasmalema, é uma estrutura dinâmica que circunda a célula por completo, desempenhando importante papel na fisiologia espermática e interação espermatozóide-oócito. Alterações estruturais da membrana plasmática são necessárias para que o espermatozóide adquira a habilidade de realizar a reação acrossomal e demais eventos da fertilização. Este processo é chamado de capacitação espermática e envolve alterações da composição externa de proteínas, localização de antígenos, carga e potencial de membrana, composição lipídica, assimetria dos fosfolipídeos da membrana, pH intracelular, entre outras (FLORMAN; DUBICELA, 2006).

O plasmalema é uma estrutura inerte metabolicamente, pois a célula espermática não é capaz de sintetizar novos componentes, como proteínas e lipídeos, devido a perda de organelas e fatores de transcrição de DNA durante a espermatogênese (FLESCH; GADELLA, 2000). No entanto, durante alguns eventos fisiológicos e em consequência a manipulação *in vitro*, a membrana sofre alterações estruturais (revisado por LEAHY; GADELLA, 2011) que podem ser visualizadas por microscopia de luz, microscopia eletrônica (TOSHIMORI, 2011) e imunofluorescência (NEILD et al, 2003). A composição da membrana também sofre alterações, por absorção de novos componentes como proteínas e lipídeos (NIKOLOPOULO; SOUCEK; VARY, 1985; HINKOVSKA-GALCHEVA; PETKOVA; KOUMANOV, 1989; LEAHY; GADELLA, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que esta membrane seguia o modelo do mosaico fluido proposto por Singer e Nicholson (1972) para as membranas biológicas, compondo-se de uma bicamada lipídica, associada principalmente a proteínas. No entanto, a membrana plasmática espermática apresenta uma estrutura complexa com assimetria lateral e transmembrana (CARDULLO; WOLF, 1990). Esta também é uma estrutura dinâmica, onde os componentes lipídicos apresentam uma grande mobilidade associada com importantes processos fisiológicos e biotécnicas como capacitação espermática (GESTEL et al, 2005), maturação epididimária (SCOTT; VOLGMAYR; SETCHELL, 1967; NIKOLOPOULO; SOUCEK; VARY,, 1985), morte celular (LADHA et al, 1997) e criopresevação (CHAKRABARTY et al, 2007) demonstrando o importante papel dos lipídeos da membrana plasmática na viabilidade celular.

2.4 Composição lipídica da membrana plasmática

A composição lipídica do plasmalema já foi descrita para diversas espécies (JOHNSON; PURSEL; GERRITS, 1972; PARKS; LYNCH, 1992; SURAI et al, 2000; FUCHS et al, 2009; TEUBER et al, 2011). Os fosfolipídeos representam a fração lipídica mais abundante (MANN, 1964[1]; MANN[2]; LUTWAK-MANN, 1981 apud LENZI et al, 1996, p. 251), correspondendo a 57% dos lipídeos presentes na membrana (GADELLA et al, 2001). Em garanhões, estes fosfolipídeos são representados aproximadamente em 48% por fosfocolineglicerídeos, 16% por fosfoetanolamineglicerídeos, 15% por fosfatidilserina e cardiolipina, 13% por esfingomielinas, 5% por fosfatidilglicerol e 3% por fosfatidilinositol (GADELLA et al, 2001).

A relação entre os componentes da membrana parecem determinar a funcionalidade da mesma em diferentes aspectos da fisiologia da célula, influenciando a fertilidade e os parâmetros de avaliação seminal in vitro em diversas espécies. Em suínos, o conteúdo total de lipídeos e o percentual de

[1]MANN, T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. METHUEN, UK: London, 1964. 439 p.
[2]MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. SPRINGER-VERLAG, Germany: Berlin, 1981. 495 p.

colesterol, fosfolipídeos, ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), ácido docohesanóico e n-3 PUFA correlacionam positivamente com motilidade, viabilidade, morfologia e integridade de membrana (AM-IN et al, 2011).

Em garanhões a relação entre lipídeos de membrana e fertilidade também pode ser observada, como na relação colesterol:fosfolipídeo. Esta representa um aspecto determinante na capacitação espermática (DAVIS, 1981), devido ao efluxo de colesterol da membrana durante este processo (EHRENWALD; PARKS; FOOTE, 1988). Brinsko et al (2007) demonstraram a importância desta relação na fertilidade de garanhões. Os autores encontraram uma razão molar colesterol:fosfolipídeos maior em 2.5 vezes no plasma seminal ($p<0.09$) e 1.9 no sêmen total ($p<0.009$) para garanhões subférteis e férteis, respectivamente. A relação entre os componentes lipídicos também apresentam influencia na sobreviência ao processo de criopreservação. Garciá et al (2011) identificaram diferenças significativas na relação do plasmalogênio C16 (75% de sensibilidade e 79.9% de especificidade) e do ácido graxo C18 (70% de sensibilidade e 62,5% de especificidade) com o conteúdo total de fosfolipídeos em garanhão “bons” e “maus”congeladores.

Uma particularidade na composição lipídica da membrana plasmática de espermatozóides é o grande conteúdo de acídos graxos altamente poliinsaturados (WHATES et al, 2007). Estes componentes garantem a fluidez necessária a membrana em eventos associados à fertilização (FLESCH; GADELLA, 2000), no entanto tornam a célula altamente sensível a stress oxidativo (JONES; MANN; SHERINS, 1979). As injúrias ocorridas devido à peroxidação afetam o estado fusogênico da membrana e sua habilidade de suportar importantes enzimas, como as ATPases (WHATES et al ,2007). A composição de ácidos graxos ainda apresenta forte correlação sobre características espermáticas como motilidade ($r= 0.50$, $p< 0.0001$), morfologia ($r=0.28$, $p<0.01$) e concentração espermática ($r=0.35$, $p<0.002$), principalmente quanto a quantidade de ácido docohexaóico (AKSOY et al, 2006).

Estes resultados demonstram a participação dos lipídeos de membrana em processos essenciais à fertilização, no entanto a realização de pesquisas a

respeito do tema ainda esbarram na complexibilidade e variabilidade das técnicas de determinação do perfil lipídico.

2.5 Técnicas de determinação da composição lipídica

Lipidômica pode ser definida como uma caracterização completa das espécies moleculares de lipídeos e de seus papéis biológicos (SPENER et al, 2003). Estudos nesta área ganharam grande importância nas últimas décadas devido a descoberta de que cada classe lipídica apresenta uma função biológica altamente específica, independente de seu papel como fonte energética ou estrutural em membranas (CHRISTIE, 2009). Os avanços nesta área permitiram a compreensão da participação dos lipídeos presentes na membrana plasmática de espermatozóides nos processos fisiológicos citados anteriormente, permitindo uma nova visão sobre a participação do gameta masculino nos eventos da fertilização.

Inicialmente as pesquisas em lipidômica na reprodução animal, mais especificamente associadas aos espermatozóides, utilizaram diferentes técnicas de cromatografia, como a cromatografia de camada fina e cromatografia gasosa (KOMAREK et al, 1965; PARKS; LYNCH, 1992), no entanto estas técnicas se mostraram insuficientes para responder os questionamentos a respeito dos papéis fisiológicos e origem das classes lipídicas (IVANOVA et al, 2009). Esta limitação ocasionou na utilização de técnicas mais complexas como a espectrometria de massas.

Esta técnica destaca-se diante das demais devido à sua sensibilidade, limite de detecção, velocidade e diversidade de aplicações (HOFFMANN; STROOBRANT, 2007). A espectrometria de massas necessita que os íons estejam na fase gasosa para que possam ser detectados de acordo com seus valores de m/z individuais (WATSON; SPARKMAN, 2007). Inicialmente, a

ionização gasosa dos componentes tinha origem em diferentes métodos como ionização por campo elétrico, electrospray, bombardeamento por átomos e diversas outras técnicas. Após o desenvolvimento das técnicas de desorpção e ionizaçã, tornou-se possível a obtenção de íons diretamentes de amostras na fase condensada (WATSON; SPARKMAN, 2007) A desorpção/ionização a laser assistida por matriz, conhecida como MALDI, surgiu em 1988 e desde então vem crescendo na análise de proteínas e lipídeos.

O método MALDI é caracterizado pela facilidade de preparação das amostras e grande tolerância a contaminação com sais, tampões e detergentes (HOFFMANN; STROOBRANT, 2007). Esta técnica é baseada na utilização de uma matriz que absorve a energia do laser e media a geração de íons (FUCHS; SÜß.; SCHILLER, 2010). Estes íons podem ser separados e identificados através da utilização de um equipamento MALDI-TOF (Time-of-Flight) onde os íons são submetidos a uma mesma força cinética e podem ser identificados pelo tempo de “viagem” entre a fonte de íons e o equipamento detector (WATSON; SPARKMAN, 2007). Recentemente, foi demonstrada a possibilidade de análise dos lipídeos presentes em embriões e oócitos de diferentes espécies através de análise direta em MALDI, sem necessidade de extração lipídica, tornando a técnica mais simples e rápida (FERREIRA et al, 2010). Este tipo de análise apresenta boa sensibilidade, sendo capaz de diferenciar embriões bovinos de acordo com sub-espécie e método *(in vivo X in vitro*) (SUDANO et al, 2012). Estas características permitiram a utilização desta tecnologia no estudo da composição lipídica de espermatozóides e demais estruturas de importância na reprodução humana e animal.

3 Hipóteses

- ✓ Amostras de sêmen de garanhões podem ser analisadas quanto à composição lipídica em MALDI-TOF, sem a necessidade de serem submetidas à extração lipídica, desde que sejam mantidas em uma solução contendo Metanol padrão-HPLC ou o mesmo seja adicionado anteriormente ao momento da análise;

- ✓ A composição lipídica dos espermatozóides de garanhões influenciam diretamente sua capacidade de sobrevivência e manutenção da função após a congelação, tornando possível a identificação de biomarcadores lipídicos de congelabilidade.

4 Objetivos

4.1 Gerais

- ✓ Identificar a relação entre os resultados de congelabilidade de ejaculados de garanhões e a composição lipídica destes ejaculados;

4.2 Específicos

- ✓ Determinação do meio de conservação de amostras de sêmen em freezer - 80° C que apresente maior facilidade de preparação das amostras e melhor conservação dos lipídeos da amostra;
- ✓ Identificação da correlação entre a composição lipídica de amostras de espermatozóides de equinos e as características seminas in vitro de motilidade e morfologia.

CAPÍTULO I : Análise direta da composição lipídica de amostras de espermatozóides e efeito do armazenamento em metanol padrão HPLC a -80°C sobre a degradação lipídica.

5 INTRODUÇÃO

A utilização das técnicas de espectrometria de massas no estudo dos processos químicos envolvidos na fisiologia reprodutiva de humanos e animais tornou-se um assunto recorrente nos últimos anos (WATES et al, 2007). No entanto, a utilização destas técnicas como ferramentas de diagnóstico ainda esbarra na variabilidade dos resultados e dificuldade do preparo das amostras. Os equipamentos de MALDI-TOF permitem a identificação dos compostos químicos de uma amostra, associada à maior facilidade de preparo das amostras em relação às demais modalidades de espectrometria de massas (HOFFMANN; STROOBRANT, 2007). A aplicação desta técnica em experimentos a campo tornou-se mais viável após a descoberta da possibilidade de análise direta de embriões e oócitos de diferentes espécies (FERREIRA et al, 2010). No entanto, a utilização desta técnica associada a experimentos a campo necessita de conservação das amostras, de forma que não ocorra alteração do perfil químico. Este estudo tem como objetivo identificar o meio de conservação ideal para armazenamento de amostras de sêmen a - 80°C para análise do perfil lipídico em MALDI-TOF.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Animais e coleta de sêmen

Foram coletadas amostras de sêmen de 06 (seis) touros da raça nelore e 06 (seis) garanhões de raças variadas, alojados no campus de Pirassununga, da Universidade de São Paulo (USP). Os touros eram mantidos a pasto com aguá e sal mineral ad libitum e foram submetidos a coleta de sêmen através de estimulação por eletroejaculador. Os garanhões eram mantidos em cocheiras com acesso livre à água, sal mineral e capim, sendo ainda suplementados com ração comercial. A coleta de sêmen destes animais foi realizada através de vagina artificial com auxílio de um manequim.

6.2 Preparo das amostras

Após a coleta de sêmen, uma amostra de 100µL de sêmen in natura (após filtragem do gel para garanhões) para cada meio de conservação a ser testado foi transferida para um microtubo e adicionadas de 1 mL de PBS Ca^{++} Mg^{++} Free. Estas amostras foram submetidas à “lavagem” através de três centrifugações consecutivas a 3.000rpm/5 minutos. Após a última centrifugação as amostras foram ressuspendidas em uma dos seguintes meios: PBS Ca^{++} Mg^{++} Free, Metanol padrão-HPLC, solução na proporção de 1:1 de PBS Ca^{++} Mg^{++} Free e Metanol padrão-HPLC, ou ainda submetidas a extração lipídica, e armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise. Para cada um dos meios de conservação mencionados, foram preparadas amostras para avaliação em do efeito da conservação em metanol em quatro momentos

diferentes: no dia seguinte a coleta (D0), 15 dias após a coleta (D15), 30 dias após a coleta (D30) e 45 dias após a coleta (D45).

As amostras D0 foram analisadas no dia seguinte à coleta e as demais 45 dias após o D0. Visando analisar o efeito do metanol e da extração lipídica em amostras armazenadas por longos períodos, a cada 15 dias um grupo de amostras foi submetido à lavagem do metanol por centrifugação e ressuspendidas apenas em PBS Ca^{++} Mg^{++} Free. Da mesma forma, um grupo de amostras mantidas previamente em PBS Ca^{++} Mg^{++} Free foi submetida a extração lipídica por um método de Bligh-Dyer modificado em que as amostras foram ressuspendidas em 150 µl de água ultrapura, adicionadas de 190 µL de clorofórmio HPLC, 375 µL de metanol HPLC e misturadas em vórtex por 2 minutos. Novamente foram adicionados 187,5 µL de clorofórmio HPLC e 150 µL de água ultrapura. Após esse passo, as amostras foram centrifugadas novamente e duas fases foram formadas, onde a inferior com os lipídeos em solvente foram cuidadosamente aspiradas e transferidas para um novo microtubo. A fase lipídica foi secada por centrifugação a vácuo e os tubos armazenados em freezer - 80°C.

6.3 Análise MALDI-TOF

As amostras foram distribuídas em espaços individuais da placa de MALDI, secadas à temperatura ambiente e suas respectivas localização devidamente registradas. Anteriormente à análise, 1 µL de 1.0 M de 2,5- ácido dihidroxibenzóico diluído em metanol puro foi depositado em cada espaço da placa, de forma a cobrir por completo as amostras e permitidas secarem à temperatura ambiente.

Os dados de MALDI-MS foram adquiridos nos módulos íons positivos e reflecton , utilizando um espectrômetro de massas Autoflex III MALDI time-of-

flight (Brukers Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com tecnologia smart beam laser. Os dados foram adquiridos utilizando uma variação de m/z de 700 a 1000, por uma média de 1500 tiros consecutivos de laser com uma frequência de 200, até que os sinais da área de interesse fossem observados e sumissem pelo consumo da amostra. O gás de colisão utilizado foi o argônio. Os espectro foram avaliados utilizando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). Os íons mais intensos que distinguiram-se claramente após a exclusão dos picos isotópicos foram considerados para cada espectro e utilizados como ponto de partida para correspondência entre lipídeos e valores de m/z.

7 Resultados e Discussão

Os espectros resultantes da análise das amostras de sêmen dos garanhões utilizados no experimento apresentaram grande semelhança visual, indicando não haver necessidade de realização de análise estatística da variação dos componentes principais. A figura 1 apresenta o espectro de amostras de espermatozóides de touros mantidas em metanol. Como podemos observar, foi possível a identificação do perfil lipídico, sem necessidade de processamento para extração dos lipídeos, tornando a técnica mais simples e possibilitando a utilização desta técnica em experimentos aplicados a campo.

Ao analisarmos visualmente estes espectros, podemos observar que não houve diferença entre os íons e suas respectivas intensidades quanto ao período de armazenamento, ou mesmo o meio utilizado para conservação das amostras a - 80°, como demonstrado na figura 2. Nas amostras submetidas a extração lipídica e posterior armazenamento foram observados picos iônicos irregulares, provavelmente devido a corrosão dos recipientes plásticos pelo clorofórmio utilizado no processo, como observado na figura 3. Estes picos elevados suprimiram a expressão dos restantes, impossibilitando a avaliação da composição lipídica das amostras.

Figura 1 – Espectros lipídicos por análise direta de amostras de espermatozóides bovinos armazenadas em metanol por apenas um dia.

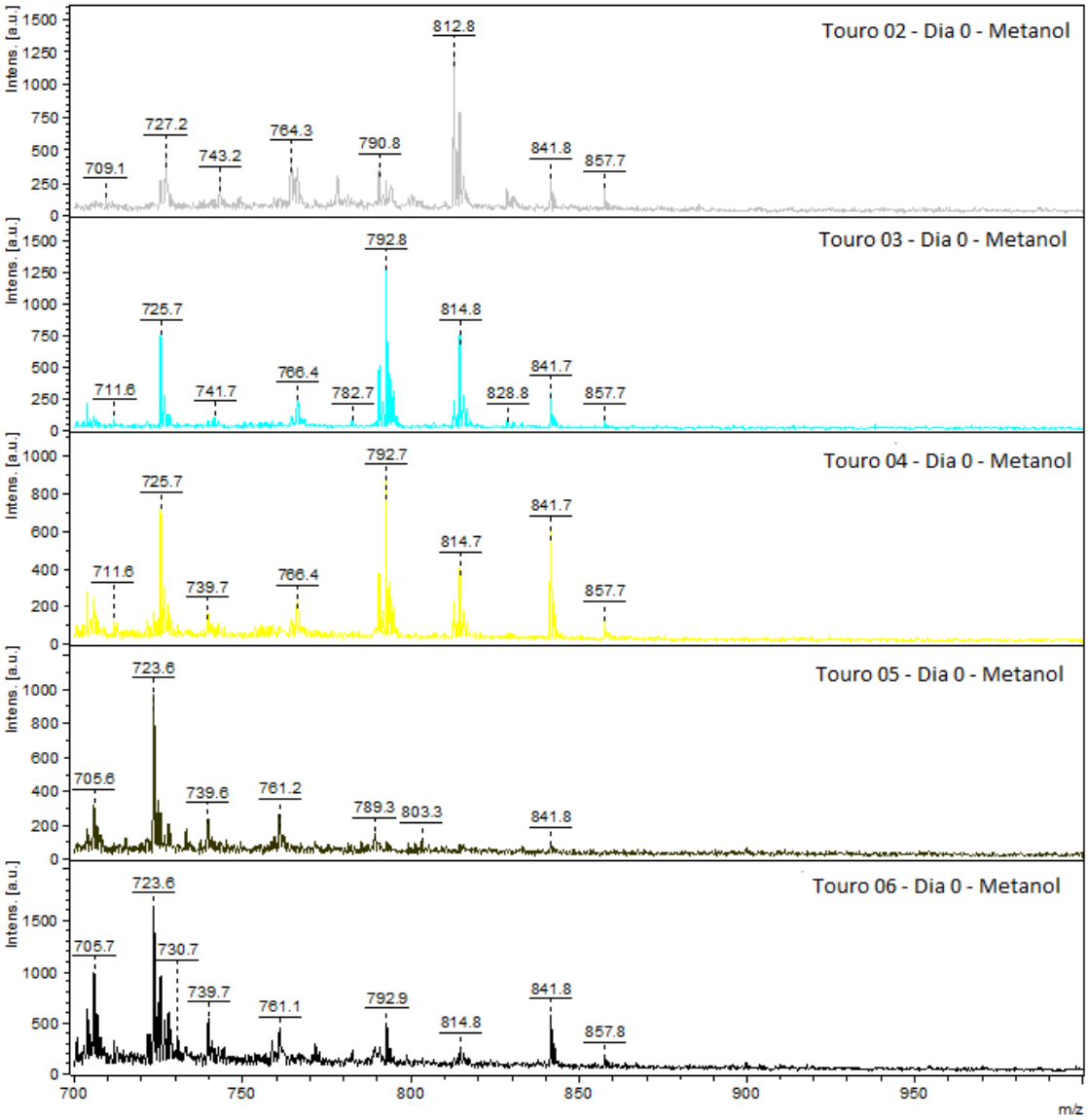


Figura 2 – Espectros lipídicos por análise direta de amostras de espermatozóides bovinos armazenada em uma solução 1:1 de PBS e metanol. Os espectros correspondem aos respectivos períodos de armazenagem na presença de metanol: 30 dias, 45 dias, 15 dias e 1 dia.

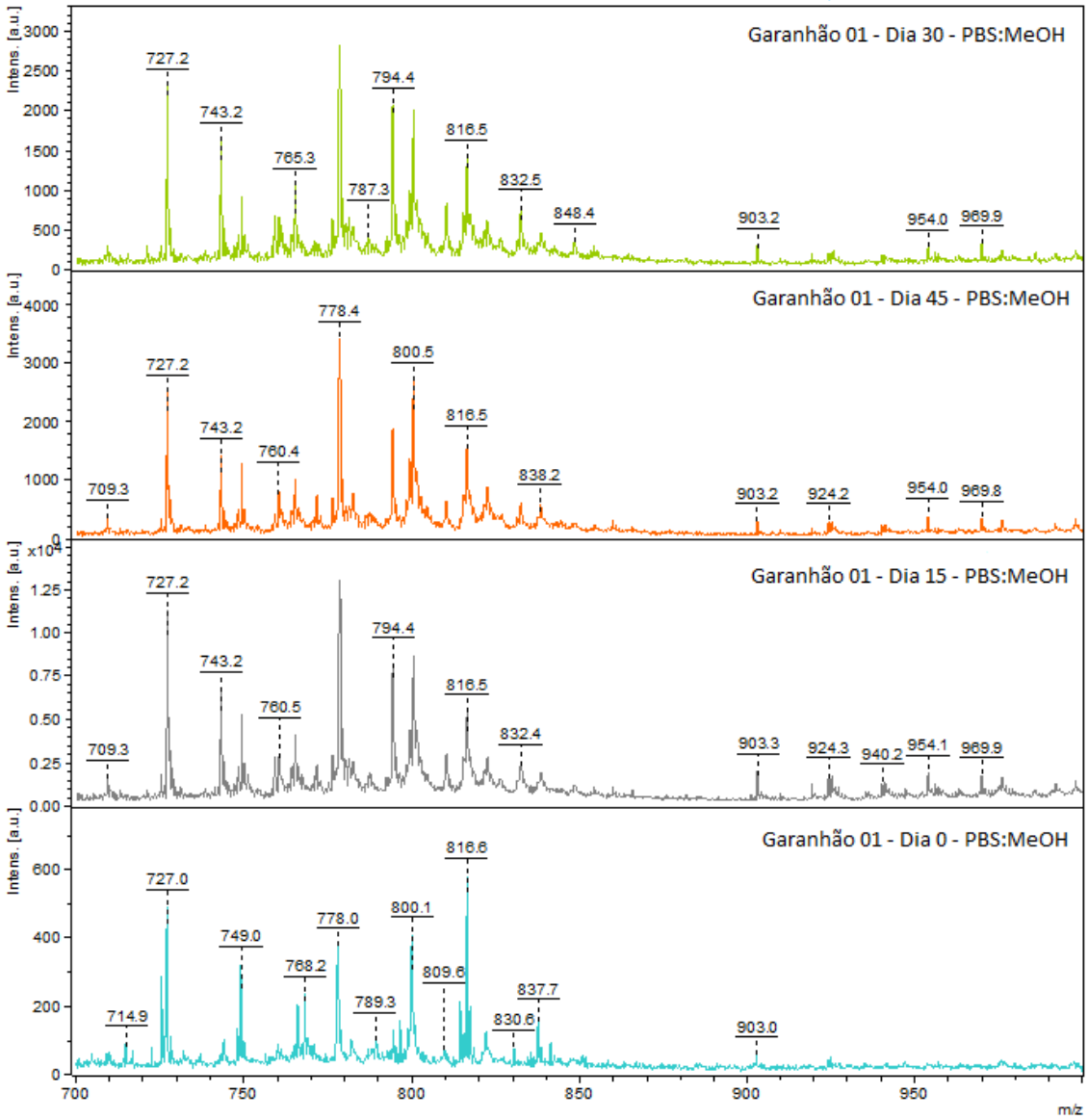
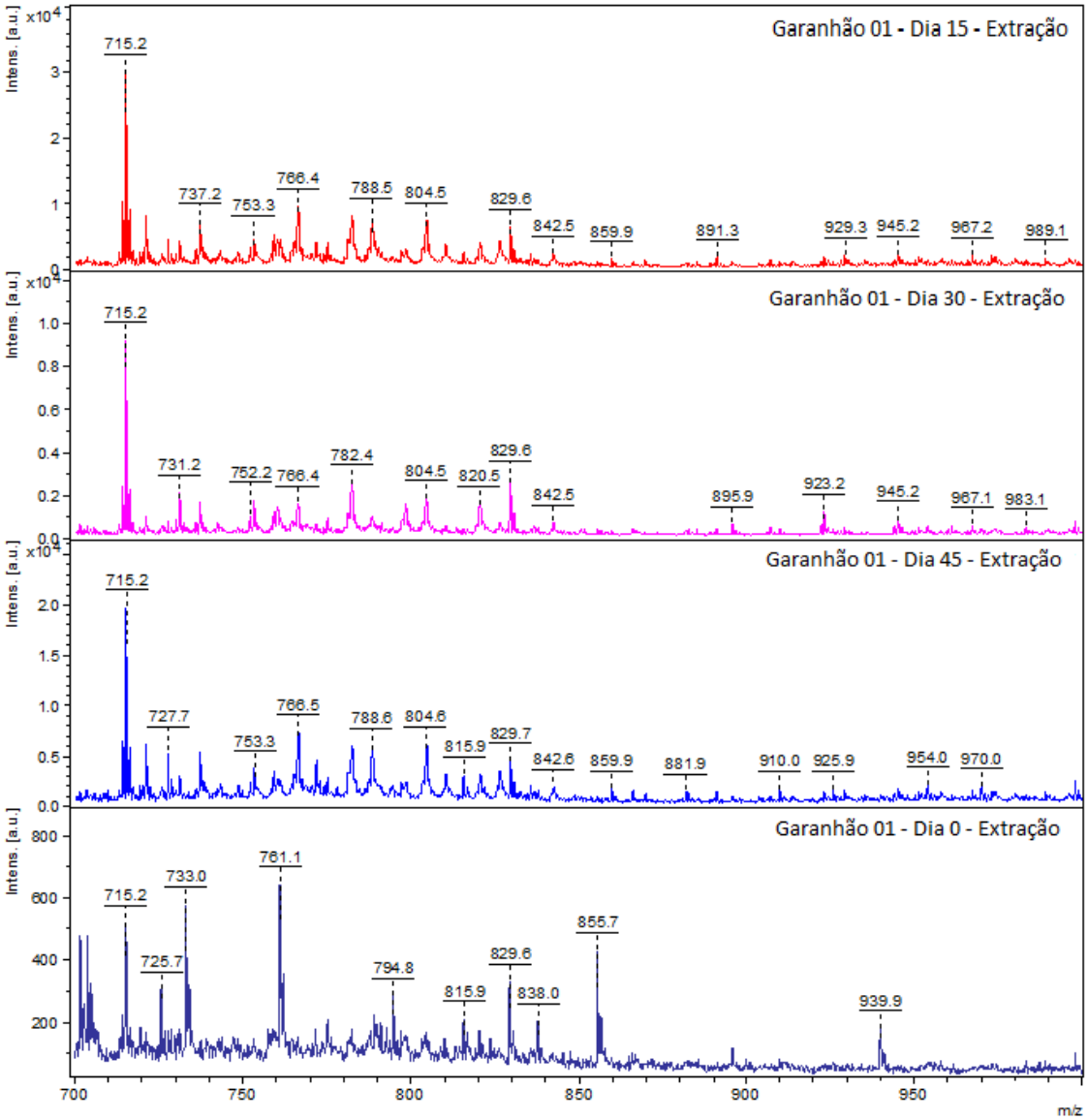


Figura 3 – Espectros lipídicos após extração lipídica e armazenamento a -80°C de amostras de espermatozóides bovinos. Os espectros correspondem aos seguinte períodos de armazenamento após a extração: 15 dias, 30 dias, 45 dias e 1 dia.



Estes resultados demonstram que é possível manter amostras de espermatozóides de garanhões e touros por até 45 dias em freezer -80°, sem comprometer a confiabilidade do resultado da análise da composição lipídica pela técnica de MALDI-TOF, desde que não seja realizada extração lipídica. Estas amostras podem ser mantidas em PBS, Metanol, ou mesmo uma solução de ambos na razão de 1:1 e avaliadas de forma direta, somente necessitando da adição de metanol no momento da análise para aquelas

amostras armazenadas somente em PBS. Devido a facilidade de preparação das amostras e possibilidade de armazenamento por semanas, a utilização dos meios contendo metanol, ou mesmo a adição do mesmo no momento da análise, apresentam grande vantagem em relação a técnica de extração lipídica, sendo o meio PBS:Metanol na razão 1:1 selecionado para armazenamento das amostras no experimento II.

CAPÍTULO II - Biomarcadores lipídicos de congelabilidade no sêmen de garanhões

8 Introdução

A inseminação artificial em equinos utiliza principalmente sêmen fresco ou refrigerado. Embora o sêmen criopreservado apresente facilidades de manejo, devido à possibilidade de armazenamento por longos períodos, os resultados insatisfatórios a campo impedem sua utilização em larga escala. Os constantes estudos nesta área ainda falham em apontar um método confiável de avaliação da fertilidade de amostras de sêmen congelado (KUISMA et al, 2006), indicando uma falta de conhecimento em relação ao pré-requisitos espermáticos necessários à fertilização.

A membrana plasmática foi identificada como um importante componente dos processos fisiológicos que ocorrem ao espermatozóide durante o processo de capacitação do mesmo (FLESCH; GADELLA, 2000), sendo composta por uma distribuição heterogênea de lipídeos (CARDULLO; WOLF, 1990). Estes lipídeos participam ativamente de diversos processos celulares e apresentam variação quanto a condição corporal e qualidade espermática (PYTTEL et al, 2012), e congelabilidade espermática (GARCIÁ et al, 2011). A relação entre a composição lipídica dos espermatozóides, em especial da membrana plasmática, e capacidade de sobrevivência ao processo de congelação resulta principalmente de um rearranjo dos lipídeos durante o processo de congelação (CHAKRABARTY et al, 2007), causando perda de fluidez e estabilidade da membrana (DAVIS, 1981) . Sendo assim, este trabalho tem como objetivo identificar a relação entre a variabilidade da composição lipídica do ejaculado de garanhões com a variabilidade de congelabilidade dos mesmos.

9. Materiais e Métodos

9.1 Animais e coleta de sêmen

Foram utilizados 16 garanhões de raças e idades variadas, alojados em propriedades localizadas no estado de São Paulo. Todos os animais foram mantidos em cocheiras, com acesso semanal a um piquete, alimentados com ração comercial e feno e acesso livre à agua e sal mineral. Os animais foram submetidos à coleta de sêmen por vagina artificial com auxílio de um manequim ou uma fêmea em estro. Os animais coletados em manequim foram estimulados previamente através de contato visual com uma fêmea em estro.

9.2 Análise in vitro e preparo das amostras

Após a coleta, uma amostra de 100µL de sêmen in natura (gel-free) foi processada de acordo com o experimento I e armazenada em PBS:Metanol a -80°C.

Os ejaculados foram imediatamente submetidos a avaliação subjetiva de motilidade em microscopia de luz sob aumento de 100X.. Estes ejaculados foram analisadas novamente após congelação/descongelação sob microscopia de luz, e adicionalmente por um sistema computadorizado de análise da motilidade espermática (CASMA) e morfologia espermática em um microscópio de contraste interfase diferencial.

9.3 Congelação das amostras de sêmen

Após avaliação, as amostras foram diluidas em meio Botu-sêmen® (Botupharma, Botucatu-SP) na proporção 1:1 e concentradas por centrifugação (600g/10 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet formado re-suspendido em meio de congelação Botu-crio® (Botupharma, Botucatu-SP) até atingir a concentração de 200 X 10^6 espermatozóides/ml. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e congeladas em equipamento comercial de congelação de sêmen (TK 3000, TK equipamentos, Uberaba-MG) a – 0,5°C/min até 5°C, - 10°C/min até -80°C e - 20°C/min até -120°C.

9.4 CASMA e Morfologia Espermática

As amostras de sêmen congelado foram descongeladas a 37° C por 30 segundos e mantidas em banho maria a 37° C durante a realização dos testes de avaliação. As amostras foram diluídas em meio Botucrio (Botucatu, São Paulo) sem substâncias crioprotetores, até que fosse atingida uma concentração espermática entre 25 e 50 x 10^6 espermatozóides por mL. Uma alíquota da amostra de sêmen foi mantida em formolsalina até o momento da análise de morfologia espermática.

A avaliação dos parâmetros de motilidade foram realizadas por deposição de uma alíquota do ejaculado na câmara de leitura (Leja® standart count, SC20.01.FA, 20 micron) e esta inserida no equipamento modelo Ivos-Ultimate (Hamilton Thorne Bioscience, Beverly, MA, Estados Unidos). O equipamento foi ajustado de acordo com um setup específico para garanhões, conforme descrito por Nascimento (2006) e um mínimo de 5 campos foram selecionados para a leitura e análise.

A avaliação de morfologia espermática foi realizada através de um microscópio de contraste de interferência diferencial (Nikon® 80i, Tokio, Japão) sob imersão em aumento de 1000X. Foram avaliadas 200 células por amostra e somente a alteração morfológica de maior relevância foi registrada para cada célula.

9.5 Análise MALDI-TOF e PCA

A análise das amostras em espectrometria de massas, modalidade MALDI-TOF foi realizada de acordo com a descrição do experimento I.

A análise estatística dos componentes principais de variação (PCA) foi realizada utilizando o software Pirouette 3.11 (InfoMetrix, Bothell, Wa, Estados Unidos). Os dados foram centrados na média e dois componentes principais foram utilizados para avaliação dos espectros quanto aos parâmetros de análise seminal. Os grupos de comparação foram determinados pela divisão entre a metade de resultado superior e a metade de resultado inferior para os parâmetros de idade dos animais, percentual de variação da motilidade antes e depois da congelação, motilidade progressiva pós-descongelação, percentual de espermatozóides com defeito morfológico e percentual de espermatozóides com defeitos maiores de morfologia. A utilização de três ou mais componentes não determinou separação aparente dos grupos testados.

10. RESULTADOS

Os resultados dos parâmetros analisados para determinação da congelabilidade das amostras de sêmen podem ser visualisados na tabela 4.

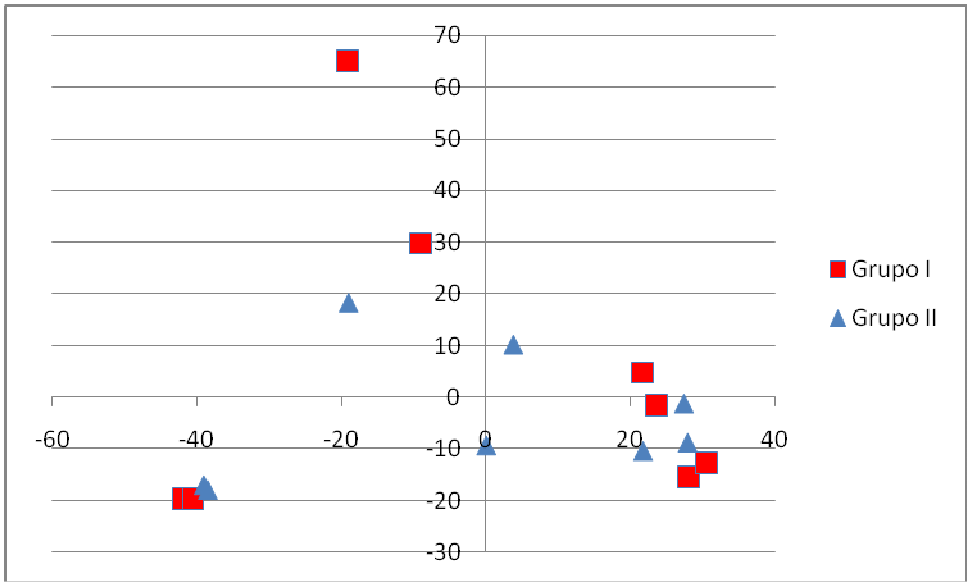
Tabela 4 – Dados referentes aos testes de análises in vitro das amostras de sêmen de garanhões.

ANIMAL	MOT. PROG.	MOT. PROG. RAP.	PERDA DE MOTILIDADE (%)	DEFEITOS MORFOLÓGICOS (%)	DEFEITOS MORFOLÓGICOS MAIORES (%)
02	43	56	16,66	24,0	18,5
03	26	28	50,0	24,5	17,5
04	11	13	83,33	69,0	67,0
05	19	21	75,0	42,5	20,5
06	52	61	16,66	52,5	42,5
07	71	85	21,43	20,5	18,0
08	22	23	25,0	51,5	47,0
10	20	25	40,0	31,5	25,0
11	19	20	83,33	70,5	59,5
12	25	30	12,5	34,0	32,5
14	47	51	22,22	23,5	19,5
15	04	04	75,0	52,0	28,0
18	62	72	9,09	23,0	18,0
23	62	69	30,77	32,5	20,5
25	42	48	20,0	37,0	25,0
26	72	82	21,43	38,0	20,5

Após a determinação dos valores de análise espermática e separação dos grupos, estes foram submetidos a análise dos componentes principais. O resultado do PCA para cada parâmetro avaliado pode observado nas figuras 4,

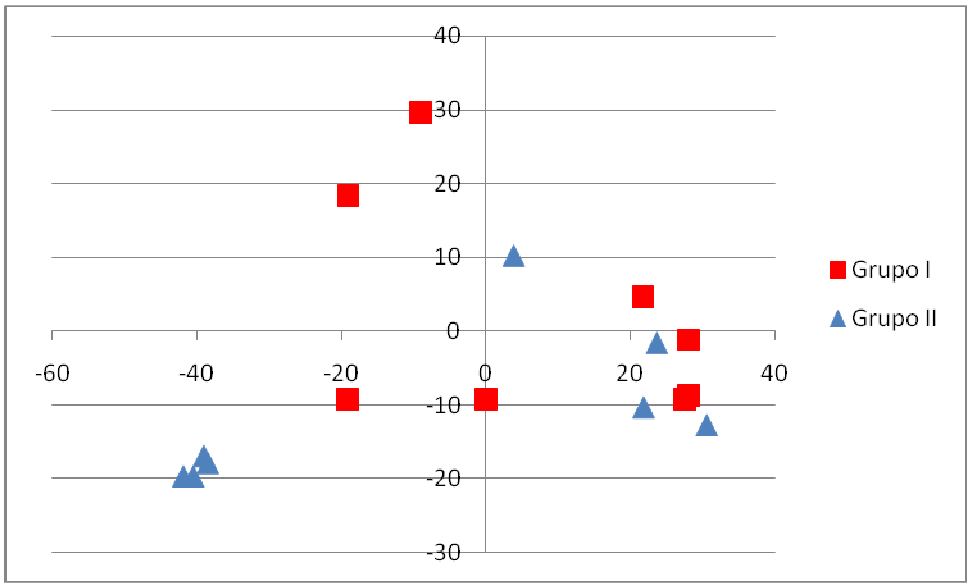
5, 6, 7 e 8. A figura 9 apresenta o agrupamento dos espectros de íons utilizados para realização do PCA. A figura 10 apresenta três espectro selecionados para representar os agrupamentos de amostras observados após o PCA.

Figura 4 – PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e a idade dos mesmos.



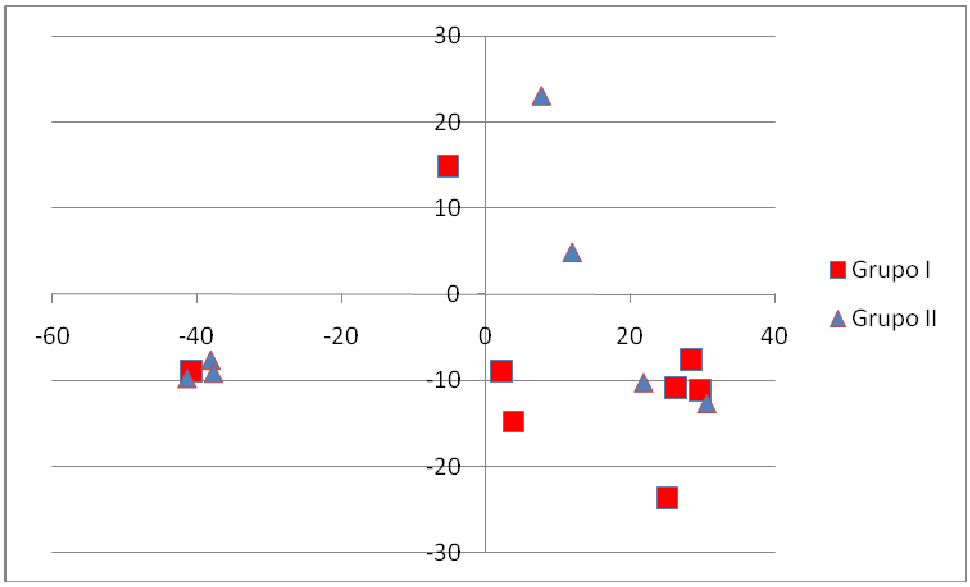
Legenda: As identificações em vermelho (Grupo I) correspondem ao grupo de animais mais jovens (n=8) e as identificações em azul (Grupo II) ao grupo de animais mais velhos (n=8).

Figura 5 – PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e a motilidade progressiva pós-descongelação das amostras.



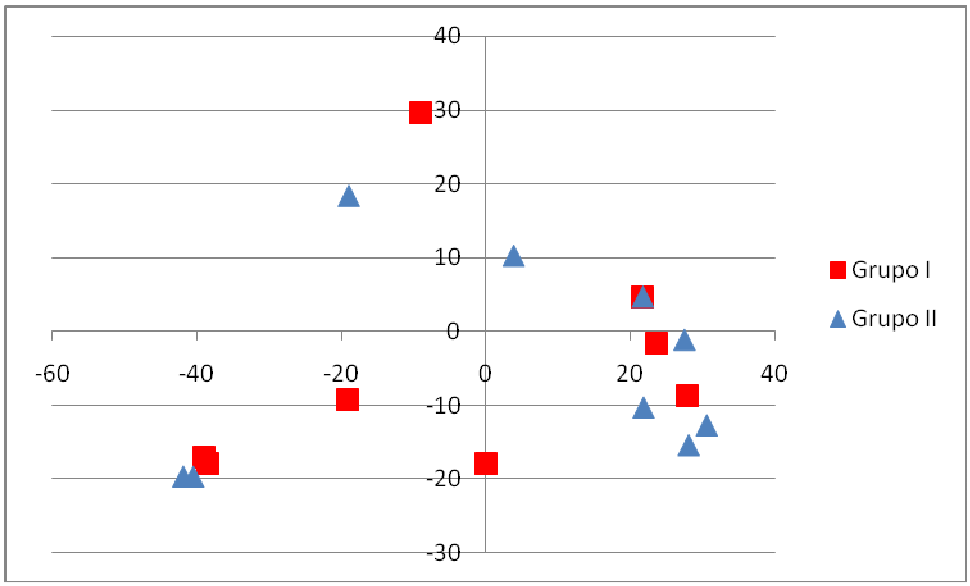
Legenda: As identificações em vermelho (Grupo I) correspondem aos animais de resultados superiores (n=8) e as identificações em azul (Grupo II) correspondem aos animais de resultados inferiores (n=8).

Figura 6 - PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e a perda de motilidade progressiva após o processo de congelação/descongelação das amostras.



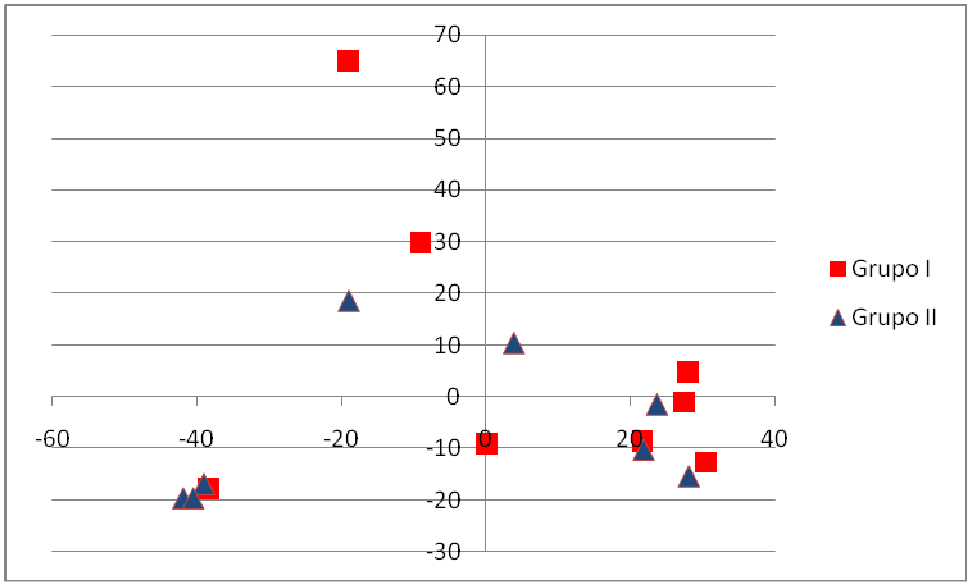
Legenda: As identificações em vermelho (Grupo I) correspondem aos animais de resultados superiores (n=8) e as identificações em azul (Grupo ii) correspondem aos animais de resultados inferiores (n=8).

Figura 7 - PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e o percentual de células com defeitos morfológicos.



Legenda: As identificações em vermelho (Grupo I) correspondem aos animais de resultados superiores (n=8) e as identificações em azul (Grupo II) correspondem aos animais de resultados inferiores (n=8).

Figura 8 - PCA para avaliação da relação entre a composição lipídica das amostras de espermatozóides de garanhões e o percentual de células com defeitos morfológicos maiores.



Legenda: As identificações em vermelho (Grupo I) correspondem aos animais de resultados superiores (n=8) e as identificações em azul (Grupo II) correspondem aos animais de resultados inferiores (n=8).

Figura 9 – Loadings dos íons utilizados para realização do PCA para os diferentes parâmetros testados.

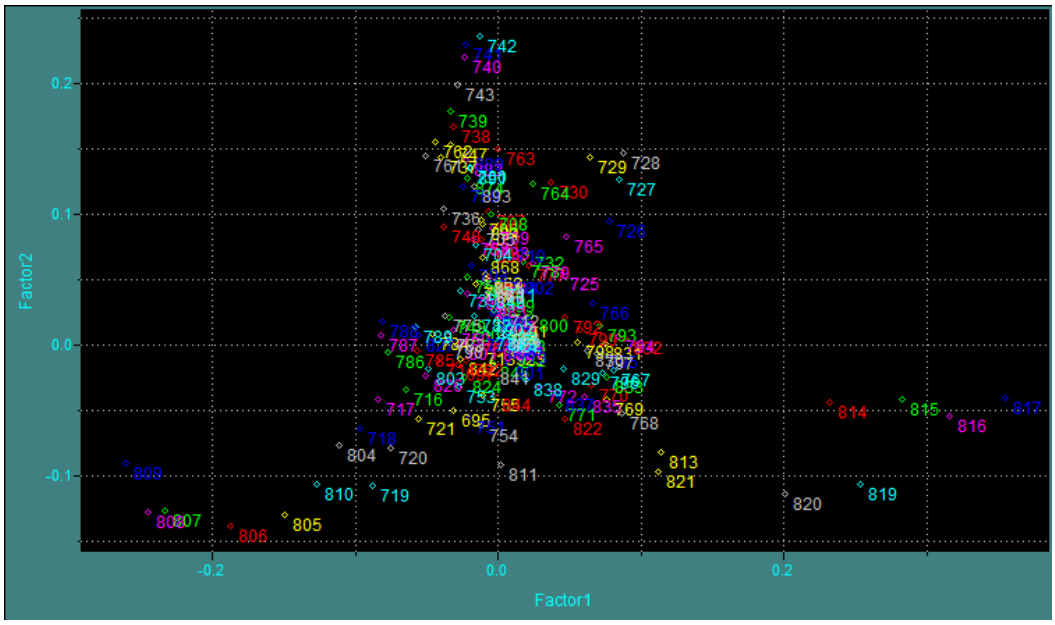
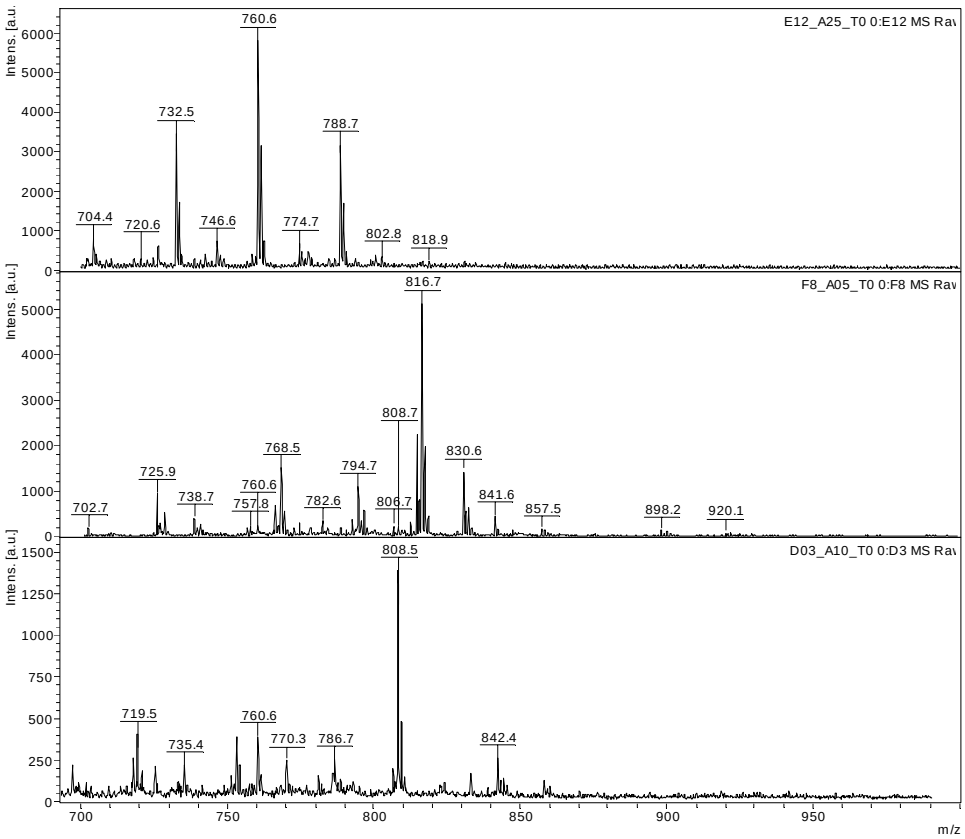


Figura 10 – Espectros lipídicos representatiovos dos agrupamentos de amostras encontrados através do PCA.



11. DISCUSSÃO

Os resultados da análise in vitro das amostras de sêmen criopreservado demonstram não haver grande variação quanto a localização dos animais na metade superior ou inferior, para cada parâmetro avaliado, resultando em resultados bastante similares da análise seminal in vitro e do avalição dos componentes principais de variação lipídica.

Os dados de motilidade progressiva, parâmetro este utilizado em maior escala para avaliação e classificação de amostras seminais de garanhão, demonstram que metade dos animais (n=8) apresentou resultado superior ao limite utilizado na maior parte dos trabalhos de 35% de espermatozóides com motilidade progressiva rápida. Este percentual de ejaculados aceitos está bem abaixo dos percentuais apresentados por Vidament (2006), em que desde o ano de 1998, mais de 78% dos ejaculados apresentam motilidade progressiva rápida pós-descongelação superior a 35%. Esta discordância deve ter ocorrido devido a grande diferença no número de ejaculados avaliados e principalmente, pois este resultado do autor frânces ter ocorrido após seleção dos animais, enquanto em nosso experimento não houve quaquer tipo de pré-seleção dos animais quanto a congelabilidade. Loomis e Graham (2008) utilizaram motilidade progressiva superior ou igual a 30% como parâmetro de seleção dos ejaculados e encontraram que 84,6% dos animais apresentavam ejaculados superiores a este valor em pelo menos 25% dos ejaculados. Este valor, também bastante superior ao encontrado em nosso experimento, foi resultado de avaliação de um grande número de animais e de repetidas coletas dos mesmos, enquanto além do número limitado de animais, em nosso experimento foi realizado apenas uma coleta de cada animal.

Loomis e Graham (2008) citam comunicações pessoais de Müller (1986) em que o autor inclui os dados de morfologia espermática associados aos dados de motilidade pré e pós descongelação. Este autor utilizou como parâmetros de seleção dos ejaculado motilidade inicial <60%, percentual de espermatozóides normais > 70% e motilidade pós-descongelação ≥ 30%. Ao aplicarmos estes

parâmetros em nossos resultados, encontramos apenas 12,50% (2/16) dos ejaculados com resultado superior em todos os parâmetros utilizados, contra 25% apresentado pelo autor citado. No entanto nossos dados de morfologia correspondem a morfologia pós-descongelação, enquanto o autor utiliza morfologia de amostras in natura.

Ao avaliarmos a variação dos componentes principais dos íons apresentados na análise da composição lipídica das amostras com os dados de avaliação in vitro das amostras de sêmen, não observamos a separação dos grupos para os parâmetros testados, e sim a tendência a formação de um grupo a esquerda do gráfico com os animais 03, 08, 10 e 15, um grupo a direita do gráfico com os animais 04, 05, 06, 12, 18, 23 e 26. Os demais animais aparecem de forma mais dispersa ao centro dos gráficos. A possibilidade deste resultado ter ocorrido devido a grande variação na idade dos animais utilizados também foi testada, demonstrando não haver influencia significativa deste parâmetro na composição lipídica dos espermatozóides. A distribuição dos valores médios dos iôns presentes nos espectros lipídicos de cada animal demonstra uma aparente formação de três grupos de animais, porém estes não correspondem aos grupos de animais superiores ou inferiores para cada um dos parâmetros avaliados. A variação destes grupos, como podemos observar na figura 09, ocorre principalmente quanto a faixa de m/z de 805 a 820. Esta faixa corresponde às glicerofosfocolinas. Estes lipídeos apresentam diversas funções em diferentes tecidos corpóreos e nos espermatozóides estão associadas a capacitação espermática e reação acrossomal (ZANETTI et al, 2010).

A ausência de correlação entre a congelabilidade das amostras de sêmen e sua composição lipídica discorda dos resultados apresentados por García et al (2011). Estes autores identificaram diferenças entre garanhões “bons” e “maus” congeladores quanto a composição de ácidos graxos e plasmalogênios. No entanto, estes lipídeos encontram-se fora da faixa de m/z utilizada em nosso experimento, impossibilitanto a detecção de resultados similares. Estes autores utilizaram uma metodologia diferenciada na determinação de “bons” e “maus” congeladores e na técnica de avaliação da composição lipídica. Os modelos e técnicas utilizados permitiram uma avaliação da proporção dos componentes

lipídicos, encontrando diferenças principalmente quando utilizaram a relação de determinados lipídeos com o conteúdo total de fosfolipídeos. A relação entres determinados componentes lipídicos também apresentou correlação com dados de motilidade total e progressiva pré e pós congelação/descongelação para Robalo Europeu (*Dicentrarchus labrax*) (MARTÍNEZ-PÁRAMO et al, 2012). Os métodos destes autores apresentaram êxito na identificação de animais “bons” e “maus” congeladores, mas no entanto apresentam grande complexibilidade, limitando sua aplicação na rotina veterinária a campo.

12. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo demonstrou a possibilidade de uma análise direta da composição lipídica de amostras de sêmen de garanhões sem a necessidade de extração lipídica prévia. Esta possibilidade fortalece ainda mais a utilização da técnica de espectrometria de massas na análise da composição lipídica de estruturas biológicas, adicionando ainda mais velocidade e facilidade na preparação das amostras para a técnica de MALDI-TOF. Ainda observamos não haver alteração da composição lipídicas das amostras na presença do metanol padrão-HPLC durante um período de armazenamento a - 80°C máximo de 45 dias.

Nosso objetivo principal de identificar correlação entre a composição lipídica de amostras de espermatozóides equinos e a congelabilidade das mesmas não foi alcançada. No entanto vale ressaltar que as técnicas de avaliação seminal *in vitro* ainda não são capazes de predizer fertilidade a campo, portanto acreditamos que estudos futuros com um maior número de amostras e algumas adaptações nas técnicas utilizadas possam alcançar tal objetivo, principalmente se dados de fertilidade a campo destas amostras possam ser incluídas.

13. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A hipótese de que amostras de sêmen de garanhões podem ser analisadas de forma direta, sem a necessidade de extração lipídica, desde que armazenadas em metanol padrão-HPLC ou acrescidas do mesmo anteriormente à análise foi suportada;

- ✓ A degradação dos lipídeos das amostras devido ao longo período de armazenamento em metanol não foi observada;

- ✓ A hipótese de que a metodologia utilizada permitiria a identificação de biomarcadores lipídicos de congelabilidade em espermatozóides de garanhões não foi sustentada.

REFERÊNCIAS

AKSOY, Y.; AKSOY, H.; ALTINKAYNAK, K.; AYDIN, H. R.; ÖZKAN. A. Sperm fatty acid composition in subfertile men. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids,** v. 75, p.75–79, 2006.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F.O; CARMO, M.T.; KIEVITSBOSCH, T.; CHAVES, M. M. B. C.; NETO, C. R. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 32, n. p.424-429, 2012.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 105–113, 2005.

AM-IN, N.; KIRKWOOD, R. N.; TECHAKUMPHU, M.; TANTASUPARUK, W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 897–903, 2011.

BLACH, E. L.; AMANN, R. P; BOWEN, R.A.; FRANTZ, D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. **Theriogenology**, v. 31, n. 2, p. 283-298, 1989.

BLISS, S. B.; VOGE, J. L.; HAYDEN, S. S.; TEAGUE, S.R.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. **Theriogenology,** v. 77, n. 6, p. 1232–1239, 2012.

BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E.; MACPHERSON, M. L.; VARNER, D. D. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1-2, p. 65–71, 2007.

BRITO, L. F. C. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice,** v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.

BRUEMMER, J. E.; HARDY, Q. P.; DENNISTON, D. D.; SCHUMACHER, J. K.; SQUIRES, E. L. Effect of cooling prior to cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 310, 2008

CARDULLO, R. A.; WOLF, D. E. The sperm plasma membrane: A little more than mosaic, a little less than fluid. In: R.A. BLOODGOOD, R. A (editor) **Ciliary and Flagellar Membranes**.New York: Plenum Press. 1990. p. 305–336

CHAKRABARTY, J.; BANERJEER, D.; PAL, D.; DE, J.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology,** v. 54, n. 1, p. 27–35, 2007.

CHOI, Y. H.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; HARTMAN, D. L.; HINRICHS, K. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. **Reproduction**, v. 142, n. 4, p. 529–538, 2011

CHRISTENSEN, P.; STENVANG, J.P.; KORSGAARD, I.R.; PEDERSEN, K.M.; JENSEN, J.; LEHN-JENSEN, H. Objective parameters for estimation of the fertility of bull sperm. In: International Congress on Animal Reproduction, 14. 2000- Sweden: Stockolm Animal Reproduction: Research and Practice II, 2000.

CHRISTIE, W.W. Lipidomics – a personal view. **Lipid Technology**, v, 21, n. 3, p. 58-60, 2009.

DAVIS, B.K. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipids ratio as a determinant of the capacitation interval. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 78, n. 12, p. 7560–7564, 1981

DIGRASSIE, W.A.; LEY, W.B.; BAILEY, T.L.; BOWEN, J.M.; ENG, L.A.; SAACKE, R.G. Evaluation of frozen-thawed stallion sperm using conventional and flow cytometric assays. In: EQUINE SYMPOSIUM AND SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 2000, Estados Unidos, 2000, p. 177.

EHRENWALD, E.; PARKS, J.E.; FOOTE, R.H. Cholesterol efflux from bovine sperm. Part I: induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. **Gamete Research**. v. 20, n.2, p. 145–157, 1988.

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; CATHARINO, R. R.; GARCIA, J. G.; 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 fingerprintingby mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 5, p. 29-33, 2010

FLESCH, F. M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1469, n. 2, p. 197-235, 2000.

FLORMAN, H. M.; DUBICELLA, T. Fertilization in mammals. In: NEILD, J. D. (Ed), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction - 3 ed, Saint Louis, Elsevier, 2006, p 55-112.

FUCHS, B,; SÜß, R.; SCHILLER, J. An updated of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n.4, p. 450-475, 2010.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosomere reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science,** v. 68, n. 3-4, p. 249–265, 2001.

GARCÍA, B. M.; FERNÁNDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; RODRÍGUEZ, A. M.; BOLAÑOS, J. M. G.; MARTINEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; MORCUENDE, D.; PEÑA, 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, n. 5, p. 811–818, 2011.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology,** v. 26, n. 1, p. 70–75, 1989.

HOFFMANN, E.; STROOBRANT, V. Mass spectrometry : principles and applications. – 3° ed, WILEY, UK: West Sussex, 2007. 489 p.

ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; KATKOV, I.; MONTAG, M.; DESSOLE, S.; NAWROTH, F.; VAN DER VEN, H. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1167–1173, 2004

IVANOVA, P. T.; MILNE, S. B.; MYERS, D. S.; BROWN, H. A. Lipidomics: a mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids. **Current Opinion in Chemical Biology** v. 13, n. 5-6, p. 526–531, 2009.

KIRK, E. S.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Comparison of *in vitro* laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1422–1439, 2005.

KOMAREK, R. J.; PICKETT, B. W.; GIBSON, E. W.; LANZ, R. N. Composition of lipids in stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 10, n. 3, p. 337-342, 1965.

KUISMA, P.; ANDERSSON, M.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by currently used laboratory methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, n. 14, 2006.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 31, n. 5, p. 531–537, 1979.

JOHNSON, L. A.; PURSEL, V. G.; GERRITS, R. J. Total phospholipids and phospholipid fatty acids of ejaculated and epididymal semen and seminal vesicle fluids of boars. **Journal of Animal Science**, v. 35, n. 2, p.398–403, 1972.

LADHA, S.; JAMES, P. S.; CLARK, D. C.; HOWES, E. A.; JONES, R. Lateral mobility of plasma membrane lipids in bull spermatozoa: heterogeneity between surface domains and rigidification following cell death. **Journal of Cell Science**, v. 110, n. 9, p. 1041-1050, 1997.

LEAHY, M.; GADELLA, B.M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 759–778, 2011

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of sperm plasma membrane: from polyunsaturated fattys acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update,** v. 2, n. 3, p. 246-256, 1996

LOOMIS, P. R.; The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 103-109.

LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v.105, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

MANN, T.; LEONE, E; POLGE, C. The composition of the stallion's semen. **Endocrinology**, v. 13, n. 3, p. 279-290, 1956.

MARTINEZ-PARAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T.; HERRAEZ, M. P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation. **Animal Reproduction Science**, v. 131, n. 3-4, p. 211– 218, 2012.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, p.125–142, 1984

MORRIS, G.J. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. **Human Reproduction**, v.21 n. 8, p. 2075-2083, 2006.

MORRIS, G. J.; FASZER, K.; GREEN, J. E.; DRAPER, D. E.; GROUT, B. W. E.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v. 68, n. 5 p. 804–812, 2007.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia de epifluorescência) de espermatozóides equinos criopreservados**. 2006. 107 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Zootecnia e Enhgenharia de Alimento, Universidade de São Paulo, Pirassununga - 2006.

NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; CHAVES, M. G.; MIRAGAYA, M. H.; COLENBRANDER, B. AGÜERO, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 59, n. 8, p. 1693-1705, 2003.

NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D. A.; VARY, J. C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranesduring epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 815, n. 13, p. 486–498, 1985.

PAPA, F. O.; FELÍCIO, G. B. MELO-OÑA, C. M.; ALVARENGA, M. A.; DE VITA, B.; TRINQUE, C.; PUOLI-FILHO, J. N. P.; DELL'AQUA JR, J. A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 1-2, p. 73– 77, 2011.

PILLET, E.; LABBE, C.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology,** v. 77, n. 2, p. 268–279, 2012.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

PYTTEL, S.; ZSCHÖRNIG, K.; NIMPTSCH, A.; PAASCH, U.; SCHILLER, J. Enhanced lysophosphatidylcholine and shygomielin contens are characteristic of spermatozoa from obese men – A MALDI mass spectrometry study. **Chemistry and Physics of Lipids.** V.165, n. 8, p. 861-865, 2012.

RODRÍGUEZ, A. M.; FERRUSOLA, C. O.; GARCÍA, B. M.; MORRELL, J. M.; MARTÍNEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Freezing stallion semen with the new Cáceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 1-2, p. 78– 83, 2011.

SALAZAR JR, J. L.; TEAGUE, S. R.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 409–418, 2011.

SAMPER, J. C.; HELLANDER, J. C.; CRABO, B. G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion sperm and sperm quality. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**, v. 44, p. 107–114, 1991.

SCOTT, T. W; VOGLMAYR, J. K.; SETCHELL, B.P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 102, n. 2, p. 456-462, 1967.

SIEME, H. Freezing semen. In: McKINON, A**. Equine Reproduction**. West Sussex, Reino Unido: Blackwell Publishing LTDA, 2011, p. 2972-2982.

SIEME, H.; HARRISON, R. A. P.; PETRUNKINA, A. M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science,** v. 107, v. 3-4, p. 276–292, 2008.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, n. 175, p. 720–731, 1972.

SPENER, F.; LAGARDE, M.; GELOEN, A.; RECORD, M. What is lipidomics? **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 105, p. 481–482, 2003.

SQUIRES, E. L; KEITH, S. L.; GRAHAM. J, K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1056–1065, 2004.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos Taurus indicus* and *Bos Taurus Taurus In vitro*- and *In vivo*- produced blastocyst. **Biology of Reproduction.** V. 87, n. 6, p. 12-33, 2012

SURAI, P. F.; BRILLARD, J. P.; SPEAKE, B. K.; BLESBOIS, E.; SEIGNEURIN, F.; SPARKS, N. H. Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1025–1039, 2000.

TEUBER, K.; SCHILLER, J.; JAKOP, U.; LÜPOLD, S.; ORLEDGE, J. M.; BLOUNT, J. D.; ROYLE, N. J.; HOODLESS, A.; MÜLLER, K. MALDI-TOF mass spectrometry as a simple tool to determine the phospholipid/glycolipid composition of sperm: Pheasant spermatozoa as one selected example. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 270–278, 2011

TOSHIMORI, K. Dynamics of the mammalian sperm membrane modification leading to fertilization: a cytological study. **Journal of Electron Microscopy**, v. 60, p. 31–42, 2011. Supplement 1.

VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 115–136, 2005.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation .4° ed, WILEY, UK: West Sussex, 2007, 819 p.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WATHES, D. C.; ROBERT, D.; ABAYASEKARA, E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. **Biology of Reproduction,** v. 77, n. 2, p. 190–201, 2007.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion sperm with sperm motion analyses, flow cytometric

evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**; v. 46, n. 6, p. 559–578, 1996.

ZANETT, S. R.; MONCLUS, M. A. M; RENSETTI, D. E.; FORNÉS, M. W.; AVELDAÑO, M. I. Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. **Biochimie,** v. 92, n. 12, p. 1886-1894, 2010.