

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA NO SÊMEN DE TOUROS NELORE**

**Ricardo Garcia de Almeida**

CAMPO GRANDE, MS

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**Caracterização da enzima conversora de angiotensina no sêmen de touros  
Nelore**

*Characterization of angiotensin-converting enzyme in Nelore bulls semen*

**Ricardo Garcia de Almeida**

**Orientador: Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa**

**Co-orientador: Prof. Dr. Fábio José Carvalho Faria**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2016

Certificado de aprovação

**RICARDO GARCIA DE ALMEIDA**

**Caracterização da Enzima Conversora de Angiotensina no Sêmen de Touros Nelore**

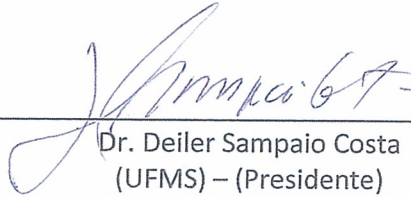
**Characterization of the Angiotensin Converting Enzyme in Nelore Bulls Semen**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de doutor em Ciência Animal.


Área de concentração: Produção Animal.

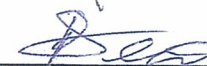
Aprovado(a) em: 20-10-2016

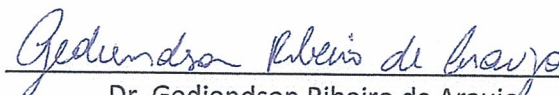
BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Deiler Sampaio Costa  
(UFMS) – (Presidente)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maria Cristina Baracat Pereira  
UFV

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Cristiano Marcelo Espínola  
UCDB

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Thyara de Deco Souza  
UFMS

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gediendson Ribeiro de Araujo  
UFV

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese a Deus que sempre me guiou  
em Seu caminho e me deu força para superar  
cada desafio...*

*À minha esposa e filha por serem tão especiais  
em minha vida e me tornarem uma pessoa melhor  
e mais feliz...*

*Aos meus pais pelo amor incondicional e pela  
dedicação em me educar...*

*Ao meu irmão pela amizade e apoio em todos os  
momentos da minha vida...*

*Aos meus sobrinhos pela alegria que trouxeram  
pra minha vida...*

*Ao meu avô, José Valério de Almeida, por todo  
ensinamento e exemplo de vida...*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me conceder a benção da vida e sempre pôr pessoas maravilhosas em meu caminho.

À minha esposa Larissa pela compreensão nos momentos difíceis, apoio nas decisões importantes, companheirismo incondicional, pelo amor e carinho que a faz uma pessoa tão especial em minha vida, te amo.

À minha filha Maria Alice que é a melhor parte de mim, presente de Deus e que me fez entender o verdadeiro significado da palavra amor.

Aos meus pais Tatão e Elza pela dedicação em me educar com muito amor e carinho.

Ao meu irmão Valério pelo seu apoio em momentos difíceis e por compartilhar momentos alegres.

Aos meus sobrinhos Giovanna e Nathan pela alegria de seus sorrisos e por me entreterem com suas brincadeiras.

Aos meus familiares e amigos que sempre confiaram em mim e me apoiaram em minhas decisões.

Ao Professor Dr. Deiler Sampaio Costa por me mostrar o verdadeiro sentido da palavra orientação. Por me apoiar e me ensinar nessa etapa importante da minha vida.

Ao Professor Dr. Fábio José Carvalho Faria por sua amizade e por seus conhecimentos, que nos passa de uma maneira tão simples que até parecem fáceis.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

A todos os colegas do Nupra que de alguma maneira contribuíram para a realização desta tese e aos professores da pós-graduação que passaram seus conhecimentos de maneira sincera e com muita competência.

## EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a  
Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

## RESUMO

ALMEIDA, R.G. Caracterização da enzima conversora de angiotensina no sêmen de touros Nelore. 2016. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Esse estudo foi realizado com o objetivo de imunolocalizar a enzima conversora de angiotensina (ECA) no sêmen de touros Nelore, sua caracterização antes e depois da criopreservação do sêmen e sua importância na capacitação espermática. Utilizaram-se amostras de sêmen de cinco touros Nelore, sexualmente maduros, para a imunolocalização e padrão de localização. Para a caracterização antes e depois do congelamento/descongelamento, foram utilizadas amostras de 10 touros Nelore, sexualmente maduros. Após a coleta, a metade do ejaculado foi congelado e a outra metade foi processada *in natura*. Imediatamente após a coleta ou descongelamento, o sêmen foi centrifugado duas vezes e o pellet ressuspendido com TALP. As amostras foram padronizadas numa concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides em 100  $\mu$ L e submetidas ao western blot e à imunocitoquímica utilizando-se o anticorpo anti-ECA. O anticorpo monoclonal utilizado foi capaz de reconhecer pelo menos uma banda de proteínas com 100 kDa na suspensão de espermatozoides dos touros Nelore, bem como no plasma seminal destes mesmos animais. A imunodeteção da ECA no espermatozoide foi caracterizada pela coloração intensa observada sobre toda a região periacrosomal, demonstrando a localização desta enzima no espermatozoide dos animais avaliados. Após o descongelamento, percebeu-se que o processo de criopreservação reduziu a intensidade das bandas de proteínas em aproximadamente 70% da quantidade inicial ( $P < 0,05$ ), mostrando que houve perda desta enzima durante o protocolo utilizado. pela técnica de imunocitoquímica também observou-se uma redução na intensidade do corante fluorescente, entretanto, não houve alteração na localização da enzima. Houve redução da capacitação espermática e reação do acrossomo no grupo tratado com inibidor da ECA (captopril - 10 $\mu$ M) ( $P < 0,05$ ), o que indica ação da enzima nesses processos.

Palavras-chave: bovino, espermatozoide, plasma seminal, criopreservação

## ABSTRACT

ALMEIDA, R.G. Characterization of angiotensin-converting enzyme in Nelore bulls semen, 2016. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

This study was conducted to determinate the imunolocalization of the angiotensin converting enzyme (ACE) in the semen of Nelore bulls, its characterization before and after cryopreservation and its importance in sperm capacitation. Were used semen samples from five Nelore sexually mature bulls, for immunolocalization and pattern location, and for characterization before and after freeze / thawing, samples were used from 10 Nelore sexually mature bulls. After collection with artificial vagina, half of the ejaculate was frozen and half was processed *in natura*. Immediately after collection or thawing, the semen was centrifuged twice and resuspended pellet with TALP. Samples were standardized to a concentration of  $100 \times 10^6$  sperm in 100  $\mu$ L and subjected to western blot and immunocytochemistry using anti-ACE antibody. The monoclonal antibody used was able to recognize a band of 100 kDa protein in spermatozoa suspension of Nelore as well as seminal plasma of these same animals. Immunodetection ACE in sperm was characterized by intense staining observed on all periacrosomal region, showing the location of this enzyme in sperm of animals worked. After thawing, it was noticed that the cryopreservation process reduced the intensity of the protein bands in over 70% of the initial quantity ( $P < 0.05$ ), showing that this enzyme was lost during the protocol used. The immunocytochemistry technique also showed a reduction in the intensity of fluorescent dye, however, there was no change in the enzyme's location. There was reduction in sperm capacitation and acrosome reaction in the group treated with ACE inhibitor (captopril - 10 mM) ( $P < 0.05$ ), indicating action of the enzyme in these processes.

Keywords: bovine, sperm, seminal plasma, cryopreservation



## Lista de ilustrações

- FIGURA 1. Imunodeteccção da enzima conversora da angiotensina (ECA) no espermatozoide (a) e no plasma seminal (b) de touro Nelore, western blot com anticorpo monoclonal anti-ECA. Cada uma das cinco colunas representa um touro diferente..... 30
- FIGURA 2. Número de *pixels* das bandas ECA, detectadas pelo western blot, de cinco touros Nelore, no espermatozoide e plasma seminal, calculada pelo Software ImageJ 1,40. Quanto menor o número de *pixels* maior a quantidade de ECA..... 30
- FIGURA 3. Imunodeteccção da  $\beta$ -tubulina no sêmen de bovino. Western blot com anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina. Cada uma das cinco colunas representa um touro Nelore diferente..... 31
- FIGURA 4. Número de *pixels* das bandas de  $\beta$ -tubulina, detectados pelo western blot, no espermatozoide de cinco touros Nelore, calculados pelo Software ImageJ 1,40. Quanto menor o número de *pixels* maior a quantidade de  $\beta$ -tubulina..... 31
- FIGURA 5. Imunolocalização da ECA no espermatozoide de touro Nelore. Imunocitoquímica com anticorpo monoclonal anti-ECA e anticorpo secundário conjugado com IgG marcado com CY3. ECA localizada na região periacrosomal..... 32
- FIGURA 6. Imunodeteccção da ECA no sêmen de touro Nelore pré (a) e pós-criopreservação (b). Imunodeteccção da proteína  $\beta$ -tubulina (c). Western blot com anticorpo monoclonal anti-ECA e anti- $\beta$ -tubulina. Cada uma das 10 colunas representa um touro diferente..... 33
- FIGURA 7. Número de *pixels* das bandas de ECA, detectadas pelo western blot, de 10 touros Nelore, pré e pós-criopreservação, calculada pelo Software ImageJ 1,40. Quanto menor o número de *pixels* maior a quantidade de ECA.

Letras distintas representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).....	34
FIGURA 8. Número de <i>pixels</i> das bandas de $\beta$ -tubulina, detectado pelo western blot, no espermatozoide de 10 touros Nelore, calculado pelo Software ImageJ 1,40. Quanto menor o número de <i>pixels</i> maior a quantidade de $\beta$ -tubulina.....	34
FIGURA 9. Imunolocalização da ECA no espermatozoide de touro Nelore, pré (a) e pós-criopreservação (b). Imunocitoquímica com anticorpo monoclonal anti-ECA e anticorpo secundário conjugado com IgG marcado com CY3. ECA localizada na região periacrossomal.....	35
FIGURA 10. Médias das áreas fluorescentes nos espermatozoides de 10 touros Nelore, detectadas pela imunocitoquímica, pré e pós-criopreservação, calculada pelo Software ImageJ 1,40. Letras distintas representam diferença estatística, pelo teste T ( $P < 0,05$ ).....	35
FIGURA 11. Áreas fluorescentes nos espermatozoides de 10 touros Nelore, detectadas pela imunocitoquímica, indicando a quantidade de proteína pré e pós-criopreservação. A linha tracejada indica a média entre os animais. Calculada pelo Software ImageJ 1,40.....	36
FIGURA 12. Esfregaços corados com FITC PSA em microscópio de epifluorescência para estimação da porcentagem de espermatozoides com reação acrossômica positiva. (a) heparina, (b) e (c) captopril + heparina. Aumento de 400 x. Coloração verde na região acrossomal indica reação acrossômica positiva.....	37

## Lista de abreviaturas e siglas

AT1	Receptor 1 da angiotensina
BSP	Bind sperm protein
CY3	Cyanine dye 3
DTT	DL-Dithiothreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
sECA	Enzima conversora de angiotensina I somática
tECA	Enzima conversora de angiotensina I testicular
FITC PSA	Isotiocianato de fluoresceína <i>Pisum sativum</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GPI	Glicophosphatidylinositol
LH	Hormônio luteinizante
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldeído
PH25	Protein hyaluronidase 25
PI-PLC	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – polyacrylamide gel eletroforese
SP-TALP	Sperm - Tyrode's albumin lactate pyruvate
TALP	Tyrode's albumin lactate pyruvate
TBS	Tris-buffered saline
TESP5	Testicular serine protease 5
TTBS	Tris-buffered saline + tween20

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Enzima conversora de angiotensina I.....	13
2.2 Criopreservação e proteômica seminal.....	16
2.3 Capacitação espermática.....	17
2.4 Considerações finais.....	18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO 2.....	24
Caracterização da enzima conversora de angiotensina no sêmen de touros Nelore.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 Animais e coleta de sêmen.....	26
2.2 Western blot.....	27
2.3 Imunocitoquímica.....	28
2.4 Ensaio de capacitação espermática.....	28
2.5 Indução da reação acrossômica nos espermatozoides capacitados.....	29
2.6 Análise estatística.....	29
3 RESULTADOS.....	29
3.1 Imunolocalização da ECA no espermatozoide de touros Nelore.....	29
3.1.1 Western blot.....	29
3.1.2 Imunocitoquímica.....	31

3.2 Caracterização da ECA antes e após a criopreservação do sêmen de touros Nelore.....	32
3.2.1 Western blot.....	32
3.2.2 Imunocitoquímica.....	34
3.3 Avaliação da ECA na capacitação espermática e reação acrossômica <i>in vitro</i> .....	36
3.3.1 Indução da reação acrossômica nos espermatozoides capacitados....	36
4 DISCUSSÃO.....	37
5 CONCLUSÃO.....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

O exame andrológico e seus testes complementares são ferramentas úteis para avaliação de um reprodutor, entretanto, ainda existem variações nas taxas de gestações entre touros classificados como aptos à reprodução. Tais variações, muitas vezes, são mascaradas pela alta relação touro/vaca, por estações de monta prolongadas ou por ineficiente coleta de dados a campo (Kastelic & Thundathil, 2008).

Essas diferenças na fertilidade são encontradas inclusive em sêmen congelado de touros provenientes de centrais de congelação, que apesar de atenderem aos padrões mínimos de qualidade seminal para comercialização, ainda podem apresentar grandes variações na taxa de gestação em programas de inseminação artificial (Larson & Miller 2000). Os exames, usualmente realizados para se avaliar um touro, conseguem identificar animais com alterações graves, mas falham em identificar touros subfêrteis, com sêmen aparentemente normal (Gadea et al., 2004).

Existem proteínas envolvidas na migração dos espermatozoides pelo trato reprodutivo da fêmea, na capacitação espermática, na reação acrossômica, na interação dos espermatozoides com as células do cumulus, na ligação com a zona pelúcida (ZP), na penetração da ZP, e na fusão do espermatozoide com o ovócito (Ikawa et al., 2010). Embora essas proteínas estejam associadas a funções específicas do espermatozoide, a caracterização de mudanças no seu padrão, em touros que produzem diferentes índices de gestação, tem grande potencial de revelar marcadores moleculares de fertilidade.

Alguns pesquisadores já têm caracterizado diferenças na expressão de proteínas em animais com diferentes potenciais de fertilização. Por exemplo, proteínas de ligação com heparina (heparin-binding proteins 24-31 kDa) foram propostas como um marcador genético de fertilidade em bovinos (Bellin et al., 1998; McCauley et al., 1999). Além disso, já foram relatadas associações entre algumas

proteínas específicas do plasma seminal e fertilidade de touros (Killian et al., 1993; Moura et al., 2006).

Ejaculados de touros Nelore de baixa e alta fertilidade apresentaram diferenças na expressão proteômica, identificadas através da eletroforese bidimensional (Roncoletta et al., 2006). Da mesma forma, fluidos das glândulas acessórias de touros da raça Holandesa de alta fertilidade tiveram mais proteínas do plasma seminal bovino (BSP) e fosfolipase A2, que animais de baixa fertilidade (Moura et al., 2007). Outra proteína presente no espermatozoide e plasma seminal é a enzima conversora de angiotensina (ECA), a ECA está envolvida no processo de fecundação do óvulo (Hagaman et al., 1998) e na capacitação espermática (Kohn et al., 1995). Diversos motivos que levam a diferenças na fertilidade entre reprodutores bovinos ainda estão sem explicação e um melhor entendimento do papel dessa enzima na reprodução pode sanar algumas dessas dúvidas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Enzima conversora de angiotensina I*

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) tem um papel importante na regulação da pressão arterial e função cardiovascular. Quando há queda na pressão arterial, o angiotensinogênio, uma glicoproteína secretada pelo fígado, é clivado pela renina, glicoproteína secretada pelos rins, liberando um decapeptídeo inativo denominado angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu). Então, a enzima conversora de angiotensina I (ECA) converte a angiotensina I, pela liberação de dois aminoácidos da porção C-terminal, em um octapeptídeo vasoativo, a angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) que atua no aumento da pressão arterial (Maciel & Muzzi, 2013). Além disso, a ECA potencializa esse resultado inativando a bradicinina, que é um vasodilatador (Somlev & Subev, 1998).

A angiotensina II possui efeito vasoconstritor, estimula a liberação da aldosterona (hormônio que atua nos rins aumentando a retenção de sódio, a reabsorção de água e a excreção de potássio). A ECA é uma dipeptidil carboxipeptidase metalopeptidase zinco-dependente, contém 1.278 resíduos de aminoácidos e seus inibidores, captopril e inalapril, são amplamente utilizados no

tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca e insuficiência renal (Corvol et al., 1995, Sabeur et al., 2001).

A ECA é uma ectoenzima ancorada à membrana plasmática, com a maior parte de sua massa exposta na superfície da célula. Existem duas isoformas da ECA: uma forma somática de cerca de 150-180 kDa, que tem dois sítios cataliticamente ativos e está presente em todo o organismo; e uma isoforma menor (90-110 kDa) presente nos testículos, que contém um único sítio ativo (Langford et al., 1993, Kondoh et al., 2005). A isoforma testicular (tECA) é encontrada exclusivamente em células germinativas masculinas após a meiose e é transcrita a partir do mesmo gene que a ECA somática (sECA), por um potente promotor específico do testículo (Williams et al., 1995, Corvol et al., 2004).

Com base no efeito já conhecido dos inibidores de ECA, esperava-se que a inativação do gene ECA resultasse em uma diminuição da pressão arterial. De fato, camundongos ECA-knockout apresentaram uma marcada redução da pressão arterial e uma deterioração da função renal (Krege et al., 1995). O completamente inesperado, no entanto, foi a observação de que os camundongos machos tiveram sua fertilidade severamente comprometida (Esther et al., 1996, Fuchs et al., 2005). A ausência de ECA testicular nesses animais não influenciou o número de espermatozoides e tampouco sua morfologia, mas causou uma alteração no transporte dos espermatozoides na tuba uterina e na ligação destas células à zona pelúcida do óvulo (Hagaman et al., 1998). O mecanismo molecular responsável por esse efeito ainda permanece desconhecido. Aparentemente não existia um substrato envolvido na fecundação para a ação peptidase de ECA, e a inativação de outros genes do sistema renina-angiotensina (angiotensinogênio e receptores da angiotensina) não induziu a infertilidade masculina (Corvol, 2005).

Kondoh et al. (2005) relataram em sua pesquisa que a tECA é capaz de liberar a porção extracelular de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) nos espermatozoides; esta nova função da tECA estaria diretamente relacionada com a fecundação do óvulo, independente da atividade proteolítica, previamente conhecida da ECA. As células germinativas do testículo são ricas em proteínas GPI-ancoradas e foi durante uma busca sistemática de novos fatores capazes de liberar tais proteínas que Kondoh e colaboradores identificaram um fator de 110 kDa, que



após purificado e feito análise proteômica, concluiu-se que era a tECA. A partir desta informação, novos campos de investigação foram abertos.

As proteínas GPI-ancoradas liberadas pela ação da tECA apresentam o mesmo tamanho daquelas liberadas pela fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC), *in vitro*, uma GPI-ase bem caracterizada e rotineiramente utilizada em pesquisas (Corvol, 2005). Kondoh et al. (2005) relataram que as proteínas liberadas da membrana do espermatozoide pela ação da tECA são a TSP5 e a PH-20. Camundongos que não possuem o gene de tECA são inférteis, já que a liberação dessas proteínas permite que o espermatozoide se ligue à ZP e realize a fecundação.

A ECA foi localizada no acrossoma dos espermatozoides de cães por Sabeur et al. (2001). Nesta mesma pesquisa, esses autores relatam a presença de ECA principalmente na região adluminal dos túbulos seminíferos correspondente às espermatídes. Localização semelhante foi relatada em coelhos (Berg et al., 1986), ratos e camundongos (Langford et al., 1993; Sibony et al., 1994). Outros estudos têm mostrado a presença de ECA em toda a área periacrossomal de espermatozoides eqüinos (Dobrinski et al., 1997), suínos e ovinos (Boettger et al., 1993), e em espermatozoides humanos (Kohn et al., 1998). Alguns autores também relataram a presença de ECA em gotas citoplasmáticas de espermatozoides de suínos e humanos (Brentjens et al., 1986; Foresta et al., 1987). Sibony et al. (1994) mostraram que, em camundongos e ratos, a tECA está presente apenas após a conclusão da meiose e com expressão máxima na fase de acrossoma. E em bovinos, a tECA está presente em toda região periacrossomal (Costa & Thundanthil, 2012).

A atividade enzimática de tECA foi relatada no ejaculado do homem (Shibahara et al., 2001), do cão (Sabeur et al., 2001), em camundongos (Vanha-Perttula et al., 1985) e suínos (Heder et al., 1990). A atividade da tECA está presente nos testículos, nos espermatozoides e no plasma seminal de garanhões pós-púberes, com pouca atividade detectada no testículo ou epidídimo de equinos antes da puberdade (Ball et al., 2003). Em suínos, elevada atividade de tECA foi correlacionada com ejaculados de menor fertilidade (Heder et al., 1990). Nesse caso os autores sugerem que tais achados podem ter sido devido à alta concentração da

ECA ter causado a degradação de bradicinina, que sabidamente promove um aumento da motilidade espermática (Mizutani e Schill, 1985; Sato e Schill, 1987).

Finalmente, o efeito da ECA sobre a capacitação espermática também tem sido avaliado em homens e coelhos (Foresta et al., 1987, Singh & Srivastava, 1988). Há uma perda gradativa da ECA no espermatozoide durante a capacitação (Kohn et al., 1995), ao longo do trato reprodutivo feminino e na fertilização (Kamata et al., 2001), remanescendo alguma quantidade ao final do processo. Apesar de sua liberação na capacitação, seu papel ainda não foi completamente elucidado e vários questionamentos ainda encontram-se sem resposta.

## *2.2 Criopreservação e proteômica seminal*

A membrana plasmática (MP) delimita a célula espermática, é uma estrutura fluida, composta por uma bicamada lipídica (principalmente fosfolipídios - FFL, glicolipídios e colesterol) e proteínas, que podem ser integrais ou formar canais ou receptores para outras moléculas (Amann e Graham, 2011). A MP, durante o resfriamento, passa por modificações em sua estrutura, principalmente na faixa de temperatura entre 19 e 8°C, onde há uma diminuição da movimentação lateral dos lipídeos, aproximação dos ácidos graxos e transição do estado líquido cristalino para gel (Graham, 2011).

Nos protocolos de criopreservação, o sêmen normalmente passa por um período lento de resfriamento até alcançar temperaturas entre 4 e 5°C, depois passa por um intervalo de equilíbrio, que é variável, seguido pela fase de congelação, até -40°C e por fim a criopreservação, que se torna possível a temperaturas inferiores a -40°C (Wolfe & Bryant, 2001; Leite et al., 2010).

O processo de congelamento/descongelamento pode levar à perda de aproximadamente 50% da viabilidade das células espermáticas (Watson, 2000). Mudanças na membrana dos espermatozoides são as grandes responsáveis por essa queda de fertilidade, formação de cristais, influxo excessivo de íons de cálcio e desidratação celular são alguns dos danos mais comuns encontrados no processo de criopreservação (Jobim et al., 2009).

Autores citam também perdas de proteínas ligadas à membrana espermática devido ao processo de congelamento, fato relevante na diferença de fertilidade encontrada entre sêmen fresco e criopreservado (Lasso et al., 1994; Ollero et al., 1998; Nauc & Manjunath, 2000). Uma importante classe de proteínas presente no plasma bovino são as BSPs (*Bind Sperm Protein*), que tem a capacidade de se ligar a fosfolípidios e à heparina (Thérien et al., 1999). No momento da ejaculação ela se liga às fosfatidilcolinas da membrana do espermatozoide causando sua estabilização, funcionando assim como fator decapacitante. Depois, no trato reprodutivo feminino, as BSPs se ligam a fatores semelhantes à heparina e induzem a capacitação espermática (Bergeron et al., 2005), ou favorecem a ligação do espermatozoide às células do epitélio do oviduto formando um reservatório espermático (Gwathmey et al., 2006). Desse modo, as BSPs são importantes na fertilidade do sêmen. Nauc & Manjunath (2000) observaram acentuada redução, de 70 a 80%, na quantidade de BSPs na membrana de espermatozoides que passaram pelo processo de congelamento/descongelamento. Maior concentração dessa proteína foi encontrada por Jobim (2009) no plasma seminal de touros com alta congelabilidade. Isso mostra a importância do estudo da proteômica seminal e o maior conhecimento acerca das proteínas que podem servir como marcadores de fertilidade.

A ECA é também uma proteína que está ligada à MP e participa dos processos de capacitação espermática e de fusão dos gametas (Konh et al., 1995). Esse fato levanta a hipótese de que as mudanças que ocorrem na MP durante a criopreservação também possam reduzir a quantidade de ECA nos espermatozoides congelados. Mohan et al. (1992) encontraram, em bovinos e bubalinos, redução da ECA na MP e aumento no plasma seminal após a criopreservação, os autores atribuíram esse resultado ao choque térmico pelo frio que o espermatozoide sofre durante o congelamento.

### 2.3 Capacitação espermática

Após a ejaculação, a membrana plasmática do espermatozoide precisa passar por alterações fisiológicas para que o gameta masculino possa realizar a reação acrossômica e se tornar apto a fecundar o ovócito, esse processo é

denominado capacitação espermática (Gadella et al., 2008). Durante a capacitação há efluxo de colesterol, aumento da concentração de fosfatidilcolina e desestabilização da membrana, levando ao aumento da fluidez da MP (Borges et al., 2011). Com a perda de colesterol da MP há influxo de bicarbonato e íons cálcio elevando o pH intracelular e ativando a adenilatociclase, que faz a conversão do ATP em AMP cíclico, estimula a proteína cinase A, a fosforilação da tirosina e promove a capacitação do espermatozoide (Gadella et al., 2008).

A indução da capacitação *in vitro* se faz principalmente com cálcio ou heparina. A heparina se liga ao gameta, causa uma alteração nas proteínas e modifica a estrutura da MP, formando canais de cálcio, o que leva a capacitação da célula (Parrish et al., 1988). Após a capacitação espermática o espermatozoide está apto a sofrer a reação acrossômica, que é a fusão da membrana acrossomal externa à membrana, plasmática. Com essa fusão entre as membranas há formação de vesículas e liberação de proteases que ajudarão o espermatozoide a penetrar a zona pelúcida do ovócito (Yanagimachi, 1994).

#### 2.4 Considerações finais

Três fatores motivaram a realização desta pesquisa, visto que a ECA pode ser um potencial marcador de fertilidade em touros. O primeiro é confirmar a localização da ECA no espermatozoide de touros Nelore. O segundo é a ausência de informação sobre a caracterização da ECA antes e após a criopreservação espermática. E o terceiro, é que a isoforma testicular da ECA parece desempenhar um papel importante na capacitação espermática e na fertilização do óvulo, já que na sua ausência ocasionam falhas nesses processos.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.98, v.1, p.1053-1084, 2011.

- BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; WESSEL, M.T.; SABEUR, K. Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. **Theriogenology**, v.59, p.901-914, 2003.
- BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E.; ZHANG, H.; SMITH, R.G.; FORREST, D.W.; SPROTT, L.R.; AX, R.L. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal Animal Science**, v.76, p.2032–2039, 1998.
- BERG, T.; SULNER, J.; LAI, C.Y.; SOFFER, R.L. Immunohistochemical localization of two angiotensin I-converting enzymes in the reproductive tract of the male rabbit. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.34, p.753–760, 1986.
- BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v.71, p.461–470, 2005.
- BOETTGER, A.; KERTSCHER, U.; STEINMANN, C.; BAEGER, U.; SIEMS, W-E.; HEDER, G. Degradation of bradykinin in semen of ram and boar. **Biochemical Pharmacology**, v.45, p.1983–1988, 1993.
- BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos de oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, p.303-314, 2011.
- BRENTJENS, J.R.; MATSUO, S.; ANDRES, G.A.; CALWELL, P.R.B.; ZOMBONI, L. Gametes contain angiotensin-converting enzyme (kininase II). **Experientia**, v.42, p.399–402, 1986.
- CORVOL, P.; WILLIAMS, T.A.; SOUBRIER, F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. **Methods in Enzymology**, v.248, p.283–305, 1995.
- CORVOL, P.; EYRIES, M.; SOUBRIER, F. In: Barret, A.J., Rawlings, N., Woessner, J. (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.332–349, 2004.
- CORVOL, P. ACE sets up fertilization. **Nature Medicine**, v.11, p.118-119, 2005.
- COSTA, D.S.; THUNDATHIL, J.C. Characterization and activity of angiotensin-converting enzyme in Holstein semen. **Animal Reproduction Science**, v.133, p.35-42, 2012.
- DOBROINSKI, I.; IGNOTZ, G.G.; FAGNAN, M.S.; ASHLEY, I.Y.; BALL, B. Isolation and characterization of a protein with homology to angiotensin converting enzyme from the periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.48, p.251–260, 1997.
- ELLERMAN, D.A.; PEI, J.; GUPTA, S.; SNELL, W.J.; MYLES, D.; PRIMAKOFF, P. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.76, p.1188–1199, 2009.
- ESTHER, C.R.; HOWARD, T.E.; MARINO, E.M.; GODDARD, J.M.; CAPECCHI, M.R.; BERNSTEIN, K.E. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. **Laboratory Investigation**, v.74, p.953–965, 1996.

- FORESTA, C.; INDINO, M.; MANONI, F.; SCANDELLARI, C.; Angiotensin-converting enzyme content of human spermatozoa and its release during capacitation. **Fertility and Sterility**, v.47, p.1000–1003, 1987.
- FUCHS, S.; FRENZEL, L.; HUBERT, C.; LYNG, R.; MULLER, L.; MICHAUD, A.; XIAO, H.D.; ADAMS, J.W.; CAPECCHI, M.R.; CORVOL, P.; SHUR, B.D.; BERNSTEIN, K.E. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. **Nature Medicine**, v.11, p.1140–1142, 2005.
- GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction of Domestic Animals**, v.39, p.303–308, 2004.
- GADELLA, B.M.; TSAI, P.S.; BOURKE, A.; BREWIS, I.A. Sperm head membrane reorganization during capacitation. **International Journal of Developmental Biology**, v.52, p.473, 2008.
- GARCIA, J.M.; PINHEIRO, L.E.L.; OKUDA, H.T. Body development and semen physical characteristics of young Guzerá bulls. **Ars Veterinary**, v.3, n.1, p.47-53, 1987.
- GRAHAM, J.K. Principles of cooled semen. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.127, v.1, p.1308-1315, 2011.
- 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.
- HAGAMAN, J.R.; MOYER, J.S.; BACHMAN, E.S.; SIBONY, M.; MAGYAR, P.L.; WELCH, J.E.; SMITHIES, O.; KREGGE, J.H.; O'BRIEN, D.A. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.2552–2557, 1998.
- HEDER, G.; SIEMS, W.; MUDRA, K.; NEHRING, H.; SEIFFERT, I.; JENTZSCH, K.D. Occurrence and potential importance of angiotensin-converting enzyme in semen of boars. **Andrology**, v.22, p.437-443. 1990.
- HEYTENS, E.; PARRINGTON, J.; COWARD, K.; YOUNG, C.; LAMBRECHT, S.; YOON, S.Y.; FISSORE, R.A.; HAMER, R.; DEANE, C.M.; RUAS, M.; GRASA, P.; SOLEIMANI, R.; CUVELIER, C.A.; GERRIS, J.; DHONT, M.; DEFORCE, D.; LEYBAERT, L.; DE SUTTER, P. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. **Human Reproduction**, v.24, p.2417–2428, 2009.
- IKAWA, M.; INOUE, N.; BENHAM, A.M.; OKABE, M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, p.984-994, 2010.
- INOUE, N.; IKAWA, M.; ISOTANI, A.; OKABE, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. **Nature**, v.434, p.234–238, 2005.
- JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p.25-31, 2009.

- KAMATA, M.; HU, J.; SHIBAHARA, H.; NAKAGAWA, H. Assay of testicular angiotensin-converting enzyme activity in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.24, p.225-231, 2001.
- KASTELIC, J.P.; THUNDATHIL, J.C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction Domestic Animals**, v.43 (Suppl. 2), p.368–373, 2008.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202–1207, 1993.
- KOHN, F.M.; DAMMSHAUSER, I.; NEUKAMM, C.; RENNEBERG, H.; SIEMS, W.E.; SCHILL, W.B.; AUMULLER, G. Ultrastructural localisation of angiotensin converting enzyme in ejaculated spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, p.604–610, 1998.
- KONDOH, G.; TOJO, H.; NAKATANI, Y.; KOMAZAWA, N.; MURATA, C.; YAMAGATA, K.; MAEDA, Y.; KINOSHITA, T.; OKABE, M.; TAGUCHI, R.; TAKEDA, J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. **Nature Medicine**, v.11, p.160-166, 2005.
- KREGE, J.H.; JOHN, S.W.M.; LANGENBACH, L.L.; HODGIN, J.B.; HAGAMAN, J.R.; BACHMAN, E.S.; JENNETTE, J.C.; O'BRIEN, D.A.; SMITHIES, O. Male–female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. **Nature**, v.375, p.146–148, 1995.
- LANGFORD, K.G.; ZHOU, Y.; RUSSELL, L.D.; WILCOX, J.N.; BERNSTEIN, K. Regulated expression of testis angiotensin converting enzyme during spermatogenesis in mice. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1210–1218, 1993.
- LARSON, J.L.; MILLER, D.J. Can relative spermatozoa galactosyltransferase activity be predictive of dairy bull fertility? **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2473–2479, 2000.
- LASSO, J.L.; NOILES, E.E.; ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.15, p.255-65, 1994.
- 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.
- MACIEL, R.P.; MUZZI, R.A.L. A presença do Sistema renina angiotensina em vários órgãos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.20, p.1-22, 2013.
- McCAULEY, T.C.; ZHANG, H.; BELLIN M.E.; AX, R.L. Purification and characterization of fertility-associated antigen (FAA) in bovine seminal fluid. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, p.145-153, 1999.
- MIZUTANI, T.; SCHILL, W.B. Motility of seminal plasma-free spermatozoa in the presence of several physiological compounds. **Andrology**, v.17, p.150-156, 1985.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAMPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v.27, p.201–211, 2006.

- MOURA, A.A.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.214–222, 2007.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1058-1066, 2000.
- NEWTON, L.D.; KASTELIC, J.; WONG, B.; VAN DER HOORN, F.; THANDANTHIL, J. Elevated testicular temperature modulates expression patterns of sperm proteins in Holstein bulls. **Molecular Reproduction and Development**, v.76, p.109-118, 2009.
- OLLERO, M.; BESCÓS, O.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. **Theriogenology**, v.49, p.547-55, 1998.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, p.1171-1188, 1988.
- PEKNICOVA, J.; PEXIDROVA, M.; KUBATOVA, A.; KOUBEK, P.; TEPLA, O.; SULIMENKO, T.; DRABER, P. Expression of beta-tubulin epitope in human sperm with pathological spermogram. **Fertility and Sterility**, v.88, p.1120-1128, 2007.
- PETRUNKINA, A.M.; WABERSKI, D.; GÜNZEL-APEL, A.R.; TÖPFER-PETERSEN, E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. **Reproduction**, v.134, p.3–17, 2007.
- RONCOLETTA, M.; MORANI EDA, S.; ESPER, C.R.; BARNABE, V.H.; FRANCESCHINI, P.H. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.77–87, 2006.
- SABEUR, K.; VO, A.T.; BALL, B.A. Characterization of angiotensin-converting enzyme in canine testis. **Reproduction**, v.122, p.139-46, 2001.
- SATO, H.; SCHILL, W.B. Temperature-dependent effects of the components of kallikrein kinin system on sperm motility in vitro. **Fertility and Sterility**, v.47, p.684-688, 1987.
- SHIBAHARA, H.; KAMATA, M.; HU, J.; NAKAGAWA, H.; OBARA, H.; KONDOH, N.; SHIMA, H.; SATO, I. Activity of testis angiotensin converting enzyme (ACE) in ejaculated human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.24, p.295-299, 2001.
- SIBONY, M.; SEGRETAIN, D.; GASC, J.M. Angiotensin-converting enzyme in murine testis: step-specific expression of the germinal isoform during spermiogenesis. **Biology of Reproduction**, v.50, p.1015–1026, 1994.
- SINGH, U.S.; SRIVASTAVA, A.K. Angiotensin converting enzyme from capacitated rabbit spermatozoa: two distinct forms. **Andrology**, v.20, p.322-325, 1988.
- SOMLEV, B.; SUBEV, M. Effect of kininase II inhibitors on bradykinin-stimulated bovine sperm motility. **Theriogenology**, v.50, p.661-657, 1998.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Savoy: IETS, p.83-88, 1998.



THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1080-1088, 1998.

THUNDATHIL, J.C.; ANZAR, M.; BUHR, M.M. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.75, p.308–317, 2006.

VANHA-PERTTULA, T.; MATHER, J.P.; BARDIN, C.W.; MOSS, S.B.; BELLVE, A.R. Localization of the antigotensin-converting enzyme activity in testis and epididymis. **Biology of Reproduction**, v.33, p.870-877, 1985.

WANG, M. LV, Z.; SHI, J.; HU, Y.; XU, C. Immunocontraceptive potential of the Ig-Like domain of Izumo. **Molecular Reproduction and Development**, v.76, p.794–801, 2009.

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

WILLIAMS, T.A.; VILLARD, E.; PRIGENT, Y.; DADOUNE, J.-P.; SOUBRIER, F. A genetic study of angiotensin I-converting enzyme levels in human semen. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.107, p.215–219, 1995.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular Cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p.438-450, 2001.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD (Ed.). **The Physiology of reproduction**, 2.ed. New York: Raven Press, p.198-317, 1994.

## CAPÍTULO 2

### Caracterização da enzima conversora de angiotensina no sêmen de touros Nelore

**Resumo:** Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a imunolocalização da ECA no sêmen de touros Nelore, sua caracterização pré e pós-criopreservação e sua avaliação na capacitação espermática e reação acrossômica *in vitro*. Para a imunolocalização e padronização da enzima foram utilizadas amostras seminais de cinco touros e para caracterização pré e pós-criopreservação foram utilizadas amostras de 10 touros, todas as amostras são de Nelore sexualmente maduros. Metade das amostras foi congelada e metade foi trabalhada *in natura*. Depois da coleta, o ejaculado foi centrifugado e o pellet ressuspendido com TALP, padronizado em alíquotas de 100 µL com  $100 \times 10^6$  espermatozoides. O sêmen foi submetido ao teste de western blot com anticorpo monoclonal anti-ECA, onde uma banda de proteínas com 100 kDa foi identificada no plasma e no espermatozoide dos touros Nelore, o que corresponde à ECA. Na imunocitoquímica, observou-se intensa coloração na região periacrossomal, indicando a imunolocalização da enzima no espermatozoide dos animais avaliados. O processo de criopreservação utilizado reduziu a intensidade da banda de proteínas, no teste de western blot, para menos da metade da intensidade encontrada no sêmen *in natura* ( $P < 0,05$ ), entretanto, sem alteração na localização, confirmado pela imunocitoquímica. A inibição da ECA pelo captopril, na dose de 10 µM, foi capaz de diminuir a porcentagem de espermatozoides capacitados e com reação acrossomal positiva ( $P < 0,05$ ), indicando ação da ECA nesses processos.

Palavras-chave: andrologia, bovino, capacitação espermática, proteômica

## 1 INTRODUÇÃO

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma metaloprotease dependente do zinco, ligada à membrana plasmática e que possui duas isoformas. Uma somática (sECA 150-180 kDa) encontrada em diversos órgãos e com

importante papel no controle da pressão arterial através do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Essa isoforma atua na conversão da angiotensina I, forma inativa, em angiotensina II, que é um potente vasoconstrictor e, também, estimula a liberação do hormônio aldosterona, que retém sódio e aumenta a pressão arterial. Além disso, potencializa seu efeito inibindo a ação da bradicinina, que é um vasodilatador (Corvol et al., 1995; Sabeur et al., 2001; Henriques et al., 2003; Corvol et al., 2004; Deguchi et al., 2007).

A segunda isoforma, de menor peso molecular (90-110 kDa), apesar de ser transcrita pelo mesmo gene da sECA, é encontrada exclusivamente nas células germinativas masculinas, por isso foi designada como isoforma testicular (tECA). Essa isoforma não é expressada em animais antes da puberdade, o que sugere a necessidade de estímulo hormonal na sua síntese (Henriques et al., 2003). Ratos hipofisectomizados antes da puberdade não expressaram a tECA, porém os animais que receberam testosterona, FSH e LH logo após a retirada da hipófise sintetizaram a enzima, indicando a necessidade de hormônios reprodutivos na expressão da tECA (Velletri et al., 1985).

A tECA tem importante função na fecundação do óvulo pelo espermatozoide. Em experimento com camundongos ECA-knockout não se observou alterações no número e na morfologia de espermatozoides produzidos, porém eles apresentaram problemas na ligação à zona pelúcida (Hagaman et al., 1998). Para que ocorra a fecundação é necessário que proteínas como a TESP5 e a PH-20, que são ancoradas ao espermatozoide por glicosilfosfatidilinositol (GPI), sejam liberadas e esse é um dos papéis realizados pela ECA, motivo pelo qual camundongos ECA-knockout apresentaram a fertilidade comprometida (Kondoh et al., 2005).

Parte das ECAs é liberada durante capacitação espermática (Konh et al., 1995), o que indica seu efeito também nesse processo, no entanto seu papel ainda não está muito claro. Gur et al. (1998) mostraram que a angiotensina II atua na capacitação espermática e reação acrossômica através do receptor AT1, evidenciando a ação indireta da ECA nesses processos, já que a enzima é responsável pela conversão de angiotensina I em angiotensina II.

Estudos têm demonstrado atividade da ECA no sêmen humano (Shibahara et al., 2001), canino (Sabeur et al., 2001), suíno (Heder et al., 1990), equino (Ball et al., 2003) e de roedores (Vanha-Perttula et al., 1985). Em recente estudo Costa &

Thundanthil (2012) demonstraram atividade da enzima no ejaculado de touros Holandeses, fato que torna a ECA uma proteína candidata a marcador de fertilidade para bovinos. Por esse motivo, o trabalho foi conduzido com a finalidade de verificar a imunolocalização da ECA no espermatozoide de touros da raça Nelore, comparar seu padrão pré e pós-criopreservação e sua importância na capacitação espermática.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais e coleta de sêmen

Foram utilizadas amostras de sêmen de 15 touros Nelore (*Bos taurus indicus*) sexualmente maduros. Amostras de cinco animais foram usadas para a imunolocalização da ECA no espermatozoide e na avaliação da ECA na capacitação espermática. As amostras dos outros 10 animais foram utilizadas na caracterização da ECA pré e pós-criopreservação.

O sêmen foi coletado pela técnica de vagina artificial em Central de congelamento. Apenas ejaculados com motilidade maior que 70% e vigor maior que três foram utilizados. Após a coleta, uma alíquota de 1,0 mL foi retirada antes da criopreservação para as análises do sêmen fresco. Em seguida os ejaculados de 10 animais foram congelados segundo procedimentos de rotina da Central de congelamento (diluidor a base de gema de ovo). Cinco palhetas destes mesmos ejaculados de cada touro foram destinadas para análises do sêmen congelado/descongelado.

Após a coleta, o sêmen foi diluído 1:1 em meio *tyrode's albumin lactate pyruvate* (TALP) e transportado até o laboratório a 35°C em garrafa térmica. No laboratório o sêmen foi centrifugado a 700 x g por 30 minutos a 25°C em gradiente de percol (90/45%). Em seguida, o sobrenadante (plasma seminal) foi diluído 1:50 em TALP e o pellet ressuscitado com TALP e centrifugado novamente para retirar o percol, a 500 x g por 10 minutos a 25°C.

## 2.2 Western blot

Para detecção da enzima conversora de angiotensina nos espermatozoides de touros Nelore, após a centrifugação com TALP, a concentração do pellet foi aferida e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$ , contendo  $100 \times 10^6$  espermatozoides, foram submetidas à extração de proteínas com 25  $\mu\text{L}$  de tampão Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% DTT, 0,004% azul de bromofenol e 0,125 M Tris HCl, pH 6,8) e aquecida a 100°C por cinco minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 11.200 x g, por cinco minutos.

O sobrenadante (extrato de proteínas) foi submetido à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), para separação das proteínas segundo seus pesos moleculares. Após uma hora, a uma corrente elétrica constante de 100 V, verificou-se que as proteínas percorreram toda a extensão do gel. Em seguida, o gel foi retirado cuidadosamente do cassete e submerso em etanol 20% por 10 minutos, para aumentar a eficiência de transferência. As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese, em sistema de sanduíche, com solução tampão de transferência (25 mM Tris, 0,2 M de glicina, e álcool metílico a 20%, pH 8,5), a uma tensão constante de 350 mA. As membranas de nitrocelulose resultantes foram coradas com ponceau 0,2% em ácido acético para determinar a eficácia do electrotransfer. Posteriormente, os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com 3% de leite em pó desnatado, diluído em meio *tris-buffered saline + tween20* (TTBS), por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas (overnight a 4°C) com o anticorpo primário (anti-ACE, clone 2E2, Millipore<sup>®</sup>, 1:5.000 em TTBS). Na manhã seguinte as membranas foram lavadas três vezes em TTBS, e incubadas com anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG, HRP conjugate, Millipore<sup>®</sup>, 1:10.000 em TTBS) por uma hora em temperatura ambiente. Depois de lavadas três vezes com TTBS, as bandas de proteínas foram identificadas por quimioluminescência (Newton et al., 2009).

Para confirmar que todas as amostras possuem a mesma quantidade de proteína, outro gel foi preparado com as mesmas amostras e o western blot foi realizado utilizando anticorpo anti- $\beta$ -tubulina (Peknicova et al., 2007). Os *pixels* das bandas de proteínas foram comparadas com auxílio do software ImageJ 1,40 (variando entre 0 = anecóico e 255 = hiperecóico), quanto mais proteína presente na amostra, mais hipocóica a imagem e menor a quantidade de *pixels*.

Para detecção da ECA no plasma seminal, foram adicionados 25 µL de tampão Laemmli em alíquotas de 100 µL de plasma diluído em TALP (1:50) e aquecidas a 100°C por cinco minutos para extração de proteínas. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 11.200 x g, por cinco minutos e o sobrenadante foi submetido ao western blot, pela mesma metodologia usada com os espermatozoides.

### 2.3 Imunocitoquímica

O sêmen foi diluído com TALP (1:1) e centrifugado a 700 x g por 30 minutos a 25°C em gradiente de percol (90/45%), para separar o plasma. O sobrenadante foi desprezado e 100 µL do pellet foram diluídos em 1,0 mL de meio *phosphate-buffered saline* (PBS). Alíquotas de 50 µL desta solução foram depositadas sobre lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina e incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, o excesso de espermatozoides foi lavado com PBS, foi realizada a fixação com paraformaldeído (PFA) a 4% (40 mg de PFA em 10 mL de PBS, pH = 7,5) e os sítios inespecíficos bloqueados com *goat serum* a 5% em PBS por 60 minutos. Posteriormente as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (anti-ACE, clone 2E2, Millipore®, 1:5.000) em estufa de CO<sub>2</sub> a 39°C por uma hora. Após três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com IgG marcado com CY3 (Millipore®, 1:100 em PBS) que emite fluorescência de cor laranja. Após outras três lavagens com PBS para retirar o excesso de anticorpo, as lâminas foram incubadas por cinco minutos com Hoechst 33258 e em seguida montadas com fluoromount (Sabeur et al., 2001). As lâminas foram avaliadas em microscopia de fluorescência (pico de excitação 550 nm e emissão 570 nm) e contadas 400 células.

### 2.4 Ensaio de capacitação espermática

Alíquotas de 50 µL contendo 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides foram utilizadas para constituir os seguintes tratamentos para cada touro: grupo controle (50 µL de sêmen + 50 µL de SP-TALP), grupo heparina (50 µL de sêmen + 49 µL de SP-TALP + 1,0 µL de heparina 100 µg/µL), grupo captopril + heparina (50 µL de sêmen + 49 µL de SP-TALP + 1,0 µL de heparina 100 µg/µL + 10 µM captopril). Os tratamentos foram

incubados em estufa de CO<sub>2</sub> a 39°C por 4 horas. A motilidade e vigor espermáticos foram avaliados a cada hora em cada grupo experimental, para avaliar se a capacitação ocorreu em tempo similar para cada animal avaliado.

## **2.5 Indução da reação acrossômica nos espermatozoides capacitados**

Após as quatro horas de incubação, uma alíquota de cada tratamento foi submetida a mais 30 minutos de incubação com L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholine (LPC), para induzir a reação acrossômica nos espermatozoides capacitados (Parrish et al., 1988). Após esse período, foram preparados esfregaços corados com FITC PSA e analisados em microscópio de epifluorescência. Foram contadas 200 células e estimado o percentual de espermatozoides com a região acrossomal corada de verde, considerados como reação acrossômica positiva.

## **2.6 Análise estatística**

O número de *pixels* e as áreas das bandas de proteínas foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste T, considerando-se o nível de significância de  $P < 0,05$ .

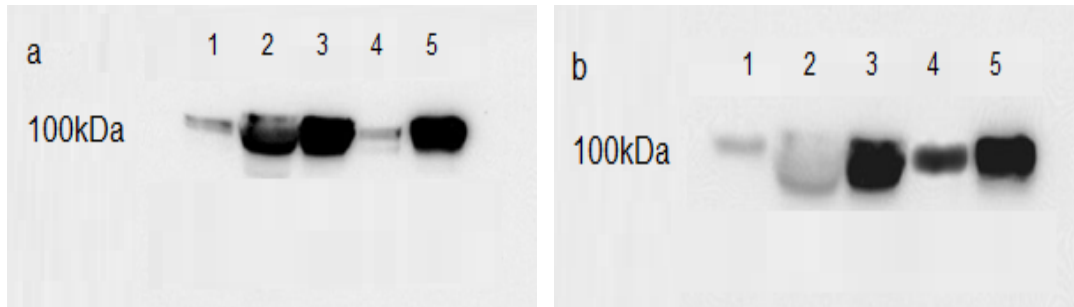
O percentual de células com reação acrossômica positiva entre os tratamentos foi comparado pelo teste qui-quadrado. O nível de significância considerando foi de  $P < 0,05$ .

# **3 RESULTADOS**

## **3.1 Imunolocalização da ECA no espermatozoide de touros Nelore**

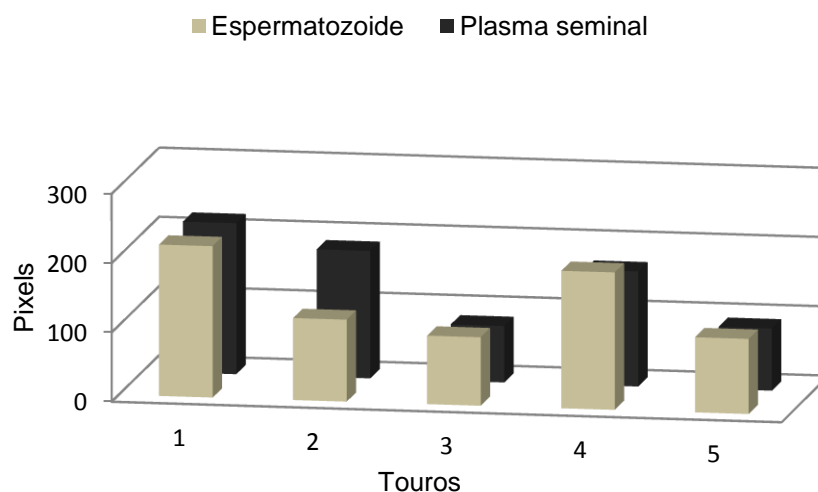
### *3.1.1 Western blot*

O anticorpo monoclonal anti-ECA foi capaz de reconhecer pelo menos uma banda de proteína, com 100 kDa, na suspensão de espermatozoides de cinco touros Nelore (Figura 1a), bem como no plasma seminal destes mesmos animais (Figura 1b).



**Figura 1.** Imunodeteção da enzima conversora da angiotensina (ECA) no espermatozoide (a) e no plasma seminal (b) de touro Nelore, western blot com anticorpo monoclonal anti-ECA. Cada uma das cinco colunas representa um touro diferente.

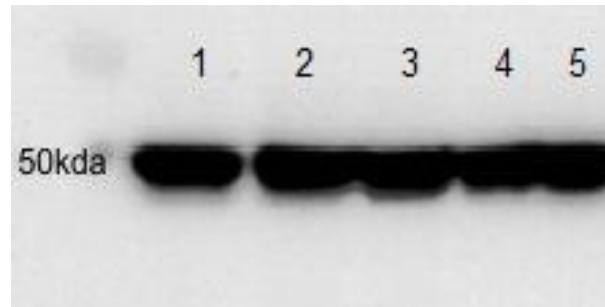
O número de *pixels* das bandas de proteínas encontrado entre os cinco touros Nelore está demonstrado na Figura 2. Não houve diferença entre os *pixels* dos espermatozoides e dos plasmas seminais dos touros Nelore utilizados ( $P>0,05$ ).



**Figura 2.** Número de *pixels* das bandas ECA, detectadas pelo western blot, de cinco touros Nelore, no espermatozoide e plasma seminal, calculada pelo Software ImageJ 1,40. Quanto menor o número de *pixels* maior a quantidade de ECA.

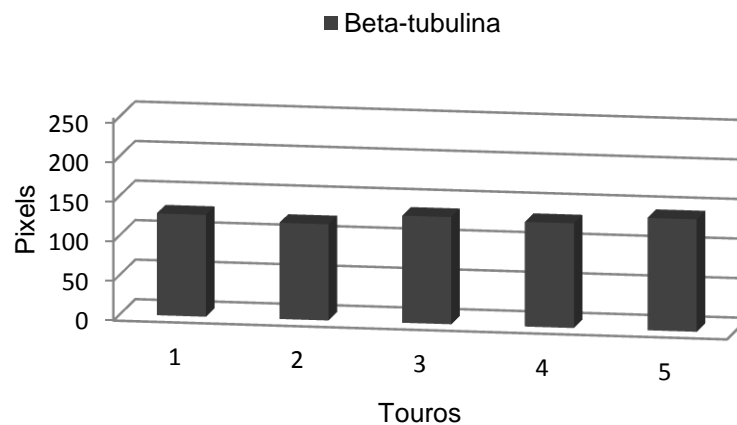
Foi realizado western blot com anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina para avaliar se existia a mesma quantidade de proteína nas amostras avaliadas pelo anticorpo anti-ECA. Foi encontrada pelo menos uma banda de proteína, com 50 kDa, no sêmen dos cinco animais avaliados (Figura 3).





**Figura 3.** Imunodeteção da  $\beta$ -tubulina no sêmen de bovino. Western blot com anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina. Cada uma das cinco colunas representa um touro Nelore diferente.

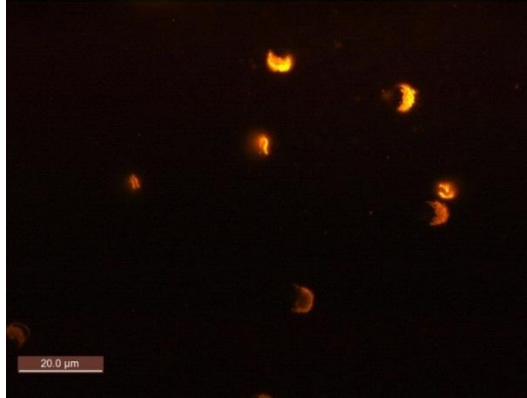
A contagem do número de *pixels* das bandas de  $\beta$ -tubulina não demonstrou diferenças entre os animais avaliados ( $P>0,05$ ; Figura 4).



**Figura 4.** Número de *pixels* das bandas de  $\beta$ -tubulina, detectados pelo western blot, no espermatozoide de cinco touros Nelore, calculados pelo Software ImageJ 1,40. Quanto menor o número de *pixels* maior a quantidade de  $\beta$ -tubulina.

### 3.1.2 Imunocitoquímica

A imunodeteção da ECA no espermatozoide dos cinco touros foi caracterizada pela coloração intensa observada sobre toda a região periacrosomal (Figura 5).



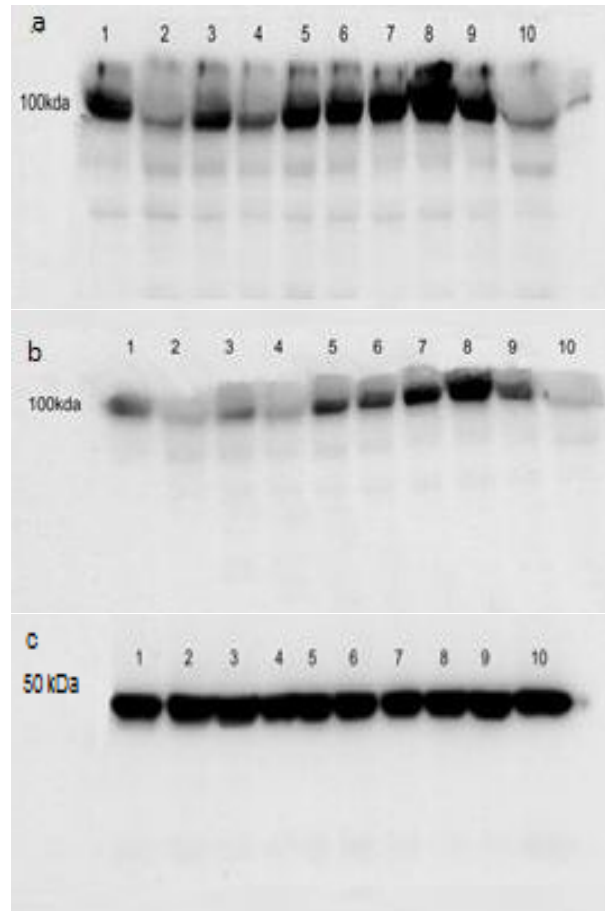
**Figura 5.** Imunolocalização da ECA no espermatozoide de touro Nelore. Imunocitoquímica com anticorpo monoclonal anti-ECA e anticorpo secundário conjugado com IgG marcado com CY3. ECA localizada na região periacrosomal (400 x).

### **3.2 Caracterização da ECA pré e pós-criopreservação do sêmen de touros Nelore**

#### *3.2.1 Western blot*

O padrão das bandas de proteínas pré (Figura 6a) e pós-criopreservação (Figura 6b) do sêmen com anticorpo anti-ECA, mostra que houve redução na quantidade de proteína no processo de criopreservação utilizado.

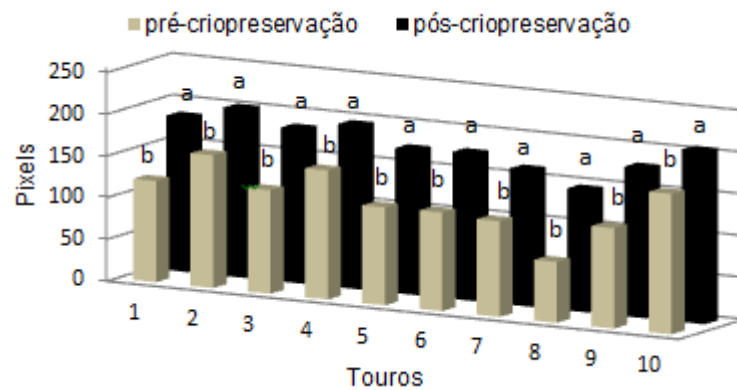
O resultado do western blot, com anticorpo anti- $\beta$ -tubulina (Figura 6c), demonstra que a mesma quantidade de proteína foi utilizada nas amostras avaliadas.



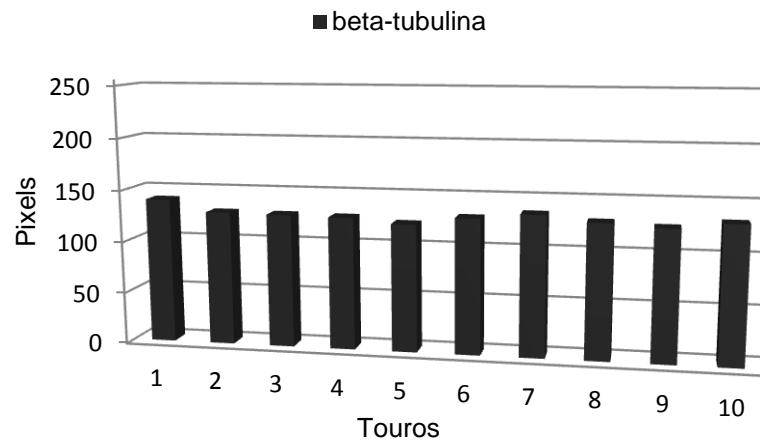
**Figura 6.** Imunodeteção da ECA no sêmen de touro Nelore pré (a) e pós-criopreservação (b). Imunodeteção da proteína  $\beta$ -tubulina (c). Western blot com anticorpo monoclonal anti-ECA e anti- $\beta$ -tubulina. Cada uma das 10 colunas representa um touro diferente.

As três ilustrações acima são cortes de uma única foto de uma película de raio-x, as três membranas de nitrocelulose foram colocadas juntas com objetivo de não haver alterações de intensidade, das bandas de proteínas, advindas de diferentes tempos de exposição ao luminol.

O processo de congelamento aumentou o número de *pixels* das bandas de ECA dos 10 touros Nelore, após a criopreservação ( $P < 0,05$ ), demonstrando que há perda desta enzima durante o protocolo utilizado (Figura 7). A quantidade de proteína nas amostras de cada animal foi semelhante, comprovado pela quantidade de *pixels* das bandas de  $\beta$ -tubulina dos 10 touros (Figura 8).



**Figura 7.** Número de *pixels* das bandas de ECA, detectadas pelo western blot, de 10 touros Nelore, pré e pós-criopreservação, calculada pelo Software ImageJ 1,40. Quanto menor o número de *pixels* maior a quantidade de ECA. Letras distintas representam diferença estatística, pelo teste T ( $P < 0,05$ ).

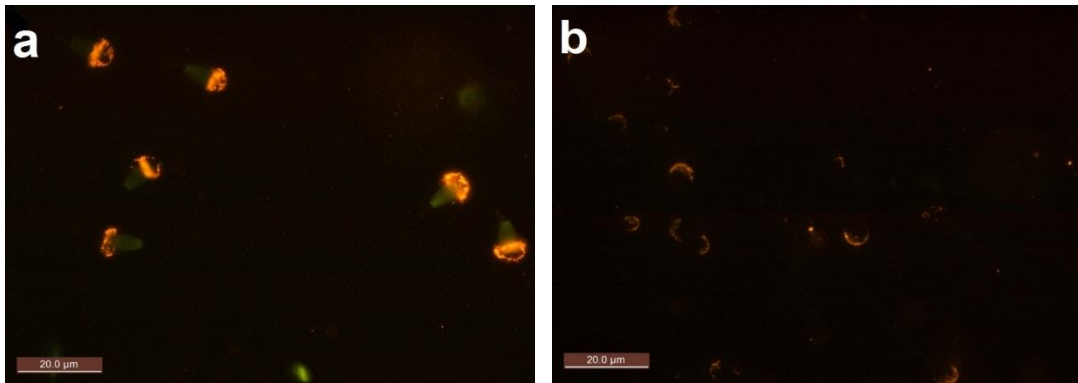


**Figura 8.** Número de *pixels* das bandas de  $\beta$ -tubulina, detectado pelo western blot, no espermatozoide de 10 touros Nelore, calculado pelo Software ImageJ 1,40. Quanto menor o número de *pixels* maior a quantidade de  $\beta$ -tubulina.

### 3.2.2 Imunocitoquímica

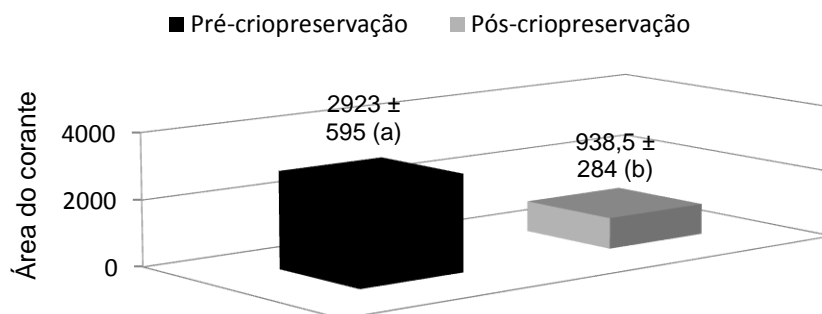
O padrão de localização da ECA pré (Figura 9a) e pós-criopreservação (Figura 9b) do sêmen, foi realizada pela técnica de imunocitoquímica.

Corroborando com os dados do western blot, percebe-se também que o processo de criopreservação reduz a intensidade do corante fluorescente ( $P < 0,05$ ), demonstrando que há perda da ECA durante o protocolo utilizado (Figura 9). Não houve alteração na localização da enzima com o protocolo de congelamento utilizado.



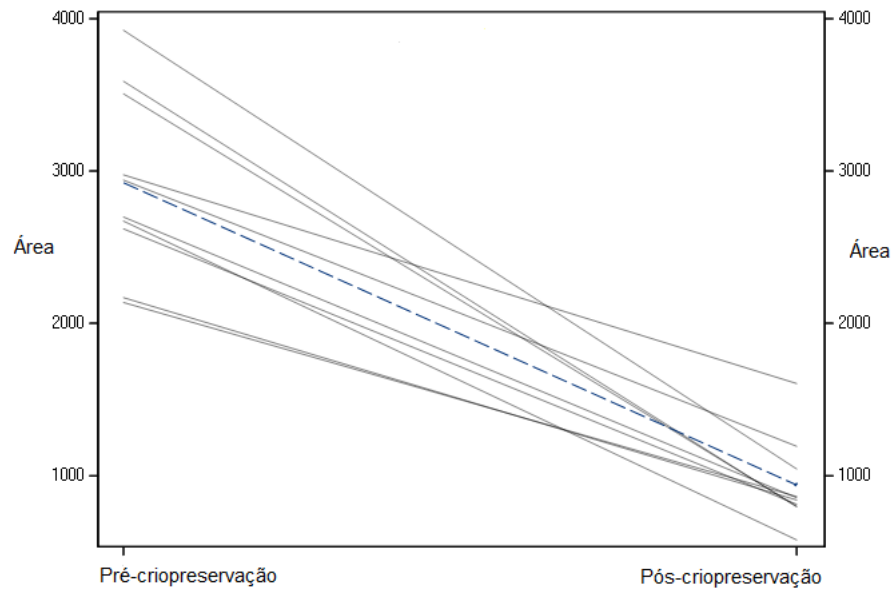
**Figura 9.** Imunolocalização da ECA no espermatozoide de touro Nelore, pré (a) e pós-criopreservação (b). Imunocitoquímica com anticorpo monoclonal anti-ECA e anticorpo secundário conjugado com IgG marcado com CY3. ECA localizada na região periacrossomal.

A média da área corada nos espermatozoides dos 10 touros Nelore avaliados, pré e pós-criopreservação, pela imunocitoquímica, identificando a quantidade de ECA, está demonstrada na Figura 10. Observa-se que a área marcada pelo corante reduziu após o processo de criopreservação.



**Figura 10.** Médias das áreas fluorescentes nos espermatozoides de 10 touros Nelore  $\pm$  desvio padrão, detectadas pela imunocitoquímica, pré e pós-criopreservação, calculada pelo Software ImageJ 1,40. Letras distintas representam diferença estatística, pelo teste T ( $P < 0,05$ ).

Na Figura 11 estão representadas as áreas coradas, detectadas pela imunocitoquímica pré e pós-criopreservação. Cada linha representa um animal diferente, observa-se que todos os animais apresentaram redução da área após a criopreservação, relacionado com redução da quantidade de ECA nos espermatozoides.

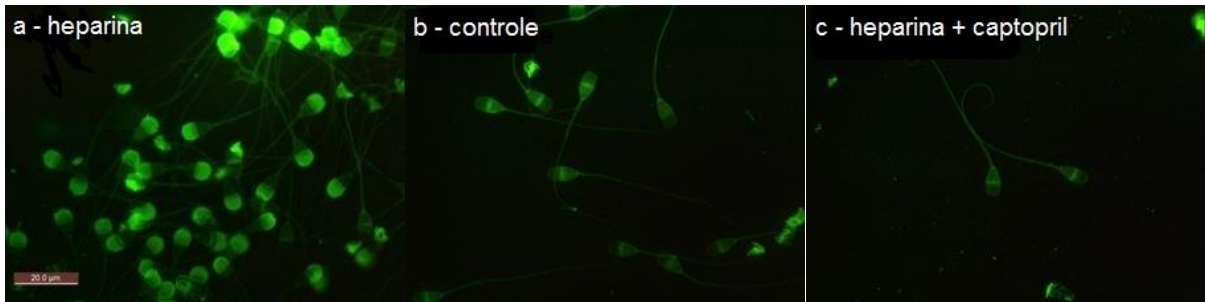


**Figura 11.** Áreas fluorescentes nos espermatozoides de 10 touros Nelore, detectadas pela imunocitoquímica, indicando a quantidade de proteína pré e pós-criopreservação. A linha tracejada indica a média entre os animais. Calculada pelo Software ImageJ 1,40.

### 3.3 Avaliação da ECA na capacitação espermática e reação acrossômica *in vitro*

#### 3.3.1 Indução da reação acrossômica nos espermatozoides capacitados

Após a indução da reação do acrossomo os esfregaços foram analisados em microscópio de epifluorescência e os resultados encontrados foram os seguintes: Percentual estimado de espermatozoides com reação acrossômica positiva de 83% no grupo Heparina (Figura 12a), 11% no grupo controle (Figura 12b) e 13% no grupo captopril + heparina (Figura 12c). Houve diferença estatística entre o grupo Heparina e os outros dois grupos ( $P < 0,05$ ), porém não houve diferença entre os grupos Controle e Heparina + Captopril ( $P > 0,05$ ).



**Figura 12.** Esfregaços corados com FITC PSA em microscópio de epifluorescência para estimação da porcentagem de espermatozoides com reação acrossômica positiva. (a) heparina, (b) controle e (c) captopril + heparina. Aumento de 400 x. Coloração verde na região acrossomal indica reação acrossômica positiva.

## 4 DISCUSSÃO

A técnica de western blot com anticorpo monoclonal anti-ECA detectou uma banda simples de proteína com massa molecular de aproximadamente 100 kDa em extrato preparado de sêmen provenientes dos cinco touros Nelore sexualmente maduros. A massa molecular da banda simples de proteína encontrada está de acordo com a tECA citada na literatura, entre 90 e 110 kDa (Corvol et al., 2004). Esse resultado foi compatível com os encontrados por outros autores que trabalharam com diferentes espécies: coelho (El-Dorry et al., 1982), porco (Yotsumoto et al., 1984), homem (Ehlers et al., 1986), rato (Langford et al., 1993), carneiro (Gatti et al., 1999) e touro Holandês (Costa & Thundathil, 2012).

Observou-se que a mesma quantidade de proteína foi colocada para avaliação de cada animal, confirmado pela imunodeteção da  $\beta$ -tubulina nos cinco touros Nelore (Figura 2). Isso sugere que as diferenças na intensidade das bandas de proteínas encontradas, visualmente, entre os animais (Figura 1a e 1b), sejam intrínsecas de cada indivíduo. Outras proteínas, presentes na membrana plasmática do espermatozoide ou no plasma seminal, estão correlacionadas com a fertilidade em touros, seja de forma proporcional como osteopontina (OPN), BSP 30 kDa, fosfolipase A2, proteínas de ligação à heparina, P25b (Parent et al., 1999; Moura et al., 2006), ou inversamente proporcional como espermadesina Z13 e clusterina (Ibrahim et al., 2000; Moura et al., 2006). Dessa forma, se a diferença, visual, encontrada na quantidade de ECA entre os animais avaliados também se mostrar na

fertilidade e/ou congelabilidade seminal, a ECA poderia servir como marcador de fertilidade.

A localização da tECA no espermatozoide é muito variável nas diferentes espécies e, inclusive, há controversa entre autores para a mesma espécie. Nikolaeva et al. (2006), em estudo com espermatozoide humano, a encontraram na região pós-acrossomal e na peça intermediária, já Köhn et al. (1998) a descreveram, nessa mesma espécie, em toda a cabeça (acrossomal, segmento equatorial e região pós-acrossomal), peça intermediária e cauda, e Foresta et al. (1987) em gota citoplasmática.

Em suínos tECA foi detectada em espermátides e em gotas citoplasmáticas de espermatozoides epididimários (Yotsumoto et al., 1984). Assim como em suínos, em experimento com coelhos, Brentjens et al. (1986) encontraram a tECA em espermátides e gotas citoplasmáticas. A localização dessa enzima em espermatozoide de roedores foi descrita por Metayer et al. (2002) e, tanto em ratos quanto em camundongos, ela foi localizada na peça intermediária e na parte inicial do flagelo.

No presente estudo, a presença da ECA foi detectada na região periacrossomal do espermatozoide, assim como em outros experimentos realizados com equinos (Dobrinski et al., 1997), caninos (Sauber et al., 2001), suínos e ovinos (Boettger et al., 1993). Foram utilizados em nosso estudo touros *Bos indicus* da raça Nelore e os resultados corroboram com os encontrados por Costa & Thundathil (2012), que trabalharam com bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*), onde a ECA também foi detectada em toda a região periacrossomal, pela técnica de imunocitoquímica.

No processo de congelamento/descongelamento do sêmen há modificações na estrutura da membrana plasmática (MP), o que pode levar ao choque térmico pelo frio, perda de proteínas da superfície do espermatozoide e injúrias na célula espermática, como a ruptura da MP e, conseqüentemente, a morte do espermatozoide (Lasso et al., 1994; Jobim et al., 2009). Diversas proteínas seminais estão relacionadas com a congelabilidade do sêmen, como a proteína ácida do fluido seminal bovino (aSFP), a albumina, a OPN, as proteínas de ligação ao esperma (BSP) A1 e A2, e a P25b (Parent et al., 1999; Jobim, 2001; Jobim et al., 2004). No presente estudo, houve redução na expressão da tECA após a



criopreservação do sêmen de aproximadamente 70% (de 2923 para 938,5) ( $P < 0,05$ ), semelhantes aos resultados encontrados por Nauc e Manjunath (2000), onde eles observaram redução de 70 a 80% na concentração das proteínas BSP ligadas à MP depois da criopreservação do sêmen bovino.

Assim como a tECA, as BSP A1/A2 estão relacionadas com a capacitação espermática e a proteína P25b está envolvida na fusão dos gametas (Berube & Sullivan, 1994; Therien et al., 1998) e apesar de não se conhecer o mecanismo exato da tECA nesses processos (Konh et al., 1995), o fato dessa enzima também estar ancorada na MP (Corvol et al., 1995), assim como as BSP e a P25b, a reorganização dos componentes da MP durante o congelamento é, possivelmente, a razão da redução na quantidade de tECA detectada nos espermatozoides. Como as proteínas citadas acima, que são importantes para a fertilidade do touro, a quantidade de tECA no ejaculado bovino, provavelmente, poderia ser considerado um fator importante na escolha de um reprodutor para congelamento do sêmen, uma vez que após o processo de criopreservação há redução da tECA, assim como ocorre para as demais proteínas (Jobim et al., 2009) e sua presença é indispensável na fecundação do óvulo (Corvol, 2005; Kondoh et al., 2005).

Mohan et al. (1992) em experimento realizado comparando a atividade de ECA no sêmen de galinha, búfalo e touro, por espectrofotometria (hippuril-L-histidil-L-leucina, como substrato), relatam que a atividade da enzima, na ave, não foi alterada pelo choque pelo frio. Todavia, tanto nos bubalinos, quanto nos bovinos houve decréscimo na quantidade de ECA no espermatozoide e aumento no plasma seminal, os autores atribuíram esse resultado a uma perda da enzima que estava na MP da célula espermática e acúmulo dela no plasma, devido ao choque térmico pelo frio que o espermatozoide sofre durante o congelamento. Provavelmente o mesmo aconteceu em nosso estudo, já que houve redução na quantidade de ECA nos espermatozoides dos touros Nelores após a criopreservação, entretanto a quantidade de ECA no plasma, pós-criopreservação, não foi mensurada.

Os resultados obtidos pela técnica de imunocitoquímica mostraram diminuição na intensidade de fluorescência emitida pelo corante no espermatozoide ( $P < 0,05$ ), que pode ser explicada pela redução da enzima na MP após o processo de congelamento/descongelamento utilizado, onde o corante estava conjugado, porém não houve alteração em sua localização na célula.

Os espermatozoides dos mamíferos passam por mudanças fisiológicas durante seu trajeto no aparelho reprodutivo da fêmea, que são chamadas de capacitação espermática e reação acrossômica, esse eventos são necessários para a fecundação do óvulo (Gur et al., 1998). Ball et al. (2003) sugeriram que a ECA desempenha importante função nos processos de capacitação e reação do acrossomo nos espermatozoides, apesar de esse mecanismo não estar completamente elucidado. No presente experimento, o grupo heparina teve uma maior percentagem de espermatozoides capacitados e com reação acrossomal positiva, quando comparado aos grupos controle e heparina + captopril (83%, 11% e 13%, respectivamente) ( $P < 0,05$ ), mostrando que a inibição da ECA pelo captopril (10  $\mu\text{M}$ ) afetou a capacitação e conseqüentemente a reação do acrossomo. A percentagem de espermatozoides que tiveram reação acrossomal positiva no grupo com captopril foi similar ao grupo com reação espontânea, controle ( $P > 0,05$ ). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados em touros Holandês (Costa & Thundathil, 2012).

Costa e Thundathil (2012) mostraram que espermatozoides e plasma seminal de touros Holandês possuem a tECA e comprovaram sua atividade pela hidrólise do furanilacrilóil-L-fenilalanilglicilglicina (FAPCG) em furanilacrilóil-L-fenilalanila e glicilglicina. O captopril (10  $\mu\text{M}$ ) foi eficiente em inibir a atividade da tECA e, conseqüentemente, a capacitação espermática, por isso houve uma menor percentagem de células com reação acrossômica positiva, assim como no presente trabalho.

Gur et al. (1998) encontraram receptores da angiotensina II (AT1) apenas na cauda de espermatozoides não capacitados, porém em células capacitadas, AT1 foi encontrado na cauda e região periacrosomal. Esses autores tiveram sucesso ao induzir a reação acrossomal *in vitro*, utilizando angiotensina II na presença de cálcio. Provavelmente, a quantidade de inibidor de ECA utilizada em nosso experimento foi capaz de reduzir a conversão de angiotensina I em angiotensina II, que parece desempenhar importante papel na ativação da reação acrossômica, via receptor AT1, fato que explicaria a menor percentagem de espermatozoides capacitados no grupo heparina+captopril.

## 5 CONCLUSÃO

A tECA está localizada na região periacrosomal do espermatozoide de touros Nelore e a criopreservação promove sua redução, porém não altera sua localização. A inativação da tECA reduz a capacidade do espermatozoide de sofrer a reação acrossômica.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; WESSEL, M.T.; SABEUR, K. Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. **Theriogenology**, v. 59, p. 901–914, 2003.
- BERUBE, B.; SULLIVAN, R. Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. **Biology of Reproduction**, v.51, p.1255-1263, 1994.
- BOETTGER, A.; KERTSCHER, U.; STEINMANN, C.; BAEGER, U.; SIEMS, W-E.; HEDER, G. Degradation of bradykinin in semen of ram and boar. **Biochemical Pharmacology**, v.45, p.1983–1988, 1993.
- BRENTJENS, J.R.; MATSUO, S.; ANDRES, G.A.; CALWELL, P.R.B.; ZOMBONI, L. Gametes contain angiotensin-converting enzyme (kininase II). **Experientia**, v.42, p.399–402, 1986.
- CORVOL, P.; WILLIAMS, T.A.; SOUBRIER, F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. **Methods Enzymol**, v.248, p.283-305, 1995.
- CORVOL, P.; EYRIES, M.; SOUBRIER, F. In: Barret, A.J., Rawlings, N., Woessner, J. (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, p.332–349, 2004.
- CORVOL, P. ACE sets up fertilization. **Nature Medicine**, v.11, p.118–119, 2005.
- COSTA, D.S.; THUNDATHIL, J.C. Characterization and activity of angiotensin-converting enzyme in Holstein semen. **Animal Reproduction Science**, v.133, p.35-43, 2012.
- DEGUCHI, E.; TANI, T.; WATANABE, H.; YAMADA, S.; KONDOH, G. Dipeptidase-inactivated tACE action in vivo: selective inhibition of sperm-zona pellucida binding in the mouse. **Biology of Reproduction**, v.77, p.794–802, 2007.
- DOBRINSKI, I.; IGNOTZ, G.G.; FAGNAN, M.S.; ASHLEY, I.Y.; BALL, B. Isolation and characterization of a protein with homology to angiotensin con-verting enzyme from the periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.48, p.251–260, 1997.
- EHLERS, M.R.W.; MAEDER, D.L.; KIRSCH, R.E. Rapid affinity chromatographic purification of human lung and kidney angiotensin-converting enzyme with the novel

N-carboxyalkyl dipeptide inhibitor N-[1 (S)-carboxy-5-aminopentyl] glycylglycine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.883, p.361–372, 1986.

EL-DORRY, H.A.; BULL, H.G.; IWATA, K.; THORNBERRY, E.H.; SOFFER, R.L. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.14128–14133, 1982.

FORESTA, C.; INDINO, M.; MANONI, F.; SCANDELLARI, C. Angiotensin-converting enzyme content of human spermatozoa and its release during capacitation. **Fertility and Sterility**, v.47, p.1000–1003, 1987.

GATTI, J.L.; DRUART, X.; GUERIN, Y.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. A 105 to 94 kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of ACE. **Biology of Reproduction**, v.60, p.937–945, 1999.

GUR, Y.; BREITBART, H.; LAX, Y.; RUBINSTEIN, S.; ZAMIR, N. Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. **American Journal of Physiology**, v.275, p.87–93, 1998.

HAGAMAN, J.R.; MOYER, J.S.; BACHMAN, E.S.; SIBONY, M.; MAGYAR P.L.; WELCH, J.E.; SMITHIES, O.; KREGE, J.H.; O'BRIEN, D.A. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.95(5), p.2552-2557, 1998.

HEDER, G.; SIEMS, W.; MUDRA, K.; NEHRING, H.; SEIFFERT, I.; JENTZSCH, K.D. Occurrence and potential importance of angiotensin-converting enzyme in semen of boars. **Andrologia**, v.22, p.437–443, 1990.

HENRIQUES, G.S.; HIRATA, M.H.; COZZOLINO, S.M.F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da Enzima Conversora de Angiotensina. **Revista de Nutrição**, v.16(3), p.333-345, jul/set, 2003.

IBRAHIM, N.M.; GILBERT, G.R.; LOSETH, K.J.; CRABO, B.G. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. **Journal of Andrology**, v.21, p.887-894, 2000.

JOBIM, M.I.M. Perfil eletroforético das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen bovino. 2001. 156f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2001.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.61, p.255-266, 2004.

JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p.25-31, 2009.

KÖHN, F.M.; MISKA, W.; SCHILL, W.B. Release of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. **Journal of Andrology**, v.6, p.259–265, 1995.

- KÖHN, F.M.; DAMMSHAUSER, I.; NEUKAMM, C.; RENNEBERG, H.; SIEMS, W.E.; SCHILL, W.B.; AUMULLER, G. Ultrastructural localisation of angiotensin-converting enzyme in ejaculated spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, p.604–610, 1998.
- KONDOH, G.; TOJO, H.; NAKATANI, Y.; KOMAZAWA, N.; MURATA, C.; YAMAGATA, K.; MAEDA, Y.; KINOSHITA, T.; OKABE, M.; TAGUCHI, R.; TAKEDA, J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. **Nature Medicine**, v.11, p.160–166, 2005.
- LANGFORD, K.G.; ZHOU, Y.; RUSSELL, L.D.; WILCOX, J.N.; BERNSTEIN, K. Regulated expression of testis angiotensin converting enzyme during spermatogenesis in mice. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1210–1218, 1993.
- LASSO, J.L.; NOILES, E.E.; ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.15, p.255-65, 1994.
- METAYER, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L. Germinal angiotensin I-converting enzyme is totally shed from the rodent sperm membrane during epididymal maturation. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1763–1767, 2002.
- MOHAN, J.; MOUDGAL, R.P.; PANDALAND, J.N.; MOHAN, G. Effects of cold shock treatment on angiotensin-converting Enzyme activity and on semen characteristics in Roosters and bulls. **Theriogenology**, v.37, p.1147-1154, 1992.
- MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology**, v.27, p.201-211, 2006.
- NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1058-1066, 2000.
- NEWTON, L.D.; KASTELIC, J.; WONG, B.; VAN DER HOORN, F.; THANDANTHIL, J. Elevated testicular temperature modulates expression patterns of sperm proteins in Holstein bulls. **Molecular and Reproduction Development**, v.76, p.109-118, 2009.
- NIKOLAEVA, M.A.; BALYASNIKOVA, I.V.; ALEXINSKAYA, M.A.; METZGER, R.; FRANKE, F.E.; ALBRECHT, R.F.; KULAKOV, V.I.; SUKHIKH, G.T.; DANILOV, S.M. Testicular isoform of angiotensin I-converting enzyme (ACE, CD143) on the surface of human spermatozoa: revelation and quantification using monoclonal antibodies. **America Journal of Reproduction and Immunology**, v.55, p.54–68, 2006.
- PARENT, S.; LEFIÈVRE, L.; BRINDLE, Y.; SULLIVAN, R. Bull subfertility is associated with low levels of a sperm membrane antigen. **Molecular Reproduction and Development**, v.52, p.57-65, 1999.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, p.1171-1188, 1988.
- PEKNICOVA, J.; PEXIDROVA, M.; KUBATOVA, A.; KOUBEK, P.; TEPLA, O.; SULIMENKO, T.; DRABER, P. Expression of beta-tubulin epitope in human sperm with pathological spermogram. **Fertility and Sterility**, v.88, p.1120-1128, 2007.
- SABEUR, K.; VO, A.T.; BALL, B.A. Characterization of angiotensin converting enzyme in canine testis. **Reproduction**, v. 122, p. 139–146, 2001.

SHIBAHARA, H.; KAMATA, M.; HU, J.; NAKAGAWA, H.; OBARA, H.; KONDOH, N.; SHIMA,, H.; SATO, I. Activity of testis angiotensin converting enzyme (ACE) in ejaculated human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.24, p.295-299. 2001.

THÉRIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1080-1088, 1998.

VANHA-PERTTULA, T.; MATHER, J.P.; BARDIN, C.W.; MOSS, S.B.; BELLVE, A.R. Localization of the antigotensin-converting enzyme activity in testis and epididymis.' **Biology of Reproduction**, v.33, p.870-877, 1985.

VELLETRI, P.A.; AQUILANO, D.R.; BRUCKNICK, E.; TSAI-MORRIS, C.H.; DUFAU, M.L.; LOVEMBERG, W. Endocrinological control and cellular localization of rat testicular angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1). **Endocrinology**, v.116(6), p.2516-2522, 1985.

YOTSUMOTO, H.; SATO, S.; SHIBUYA, M. Localization of angiotensin converting enzyme (dipeptidyl carboxypeptidase) in swine sperm by immunofluorescence. **Life Science**, v.35, p.1257–1261, 1984.