

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

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA ANTES E APÓS A
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE TOUROS GIR
LEITEIRO**

Fernando Henrique Garcia Furtado

CAMPO GRANDE, MS

2017

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

**Caracterização da enzima conversora de angiotensina antes e após
a criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro**

*Characterization of angiotensin-converting enzyme before and after the criopreservation of
Gyr bulls semen*

Fernando Henrique Garcia Furtado

Orientador: Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa

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

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2017

Certificado de aprovação

FERNANDO HENRIQUE GARCIA FURTADO

**Caracterização da enzima conversora de angiotensina antes e após a
criopreservação do sêmen de touros Gir leiteiro**

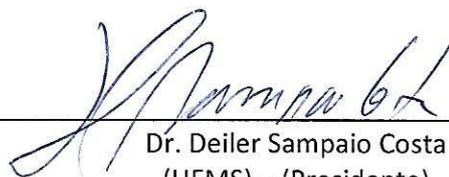
**Characterization of angiotensin-converting enzyme before
and after cryopreservation of Gyr semen**

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

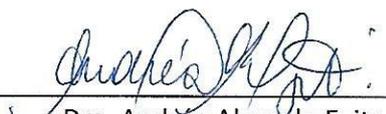
Área de concentração: Produção
Animal.

Aprovado(a) em: 21-02-2017

BANCA EXAMINADORA:



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



Dra. Andréa Alves do Egito
EMBRAPA CNPGC



Dr. Gumercindo Lorian Franco
UFMS

“Com um sorriso no rosto as pessoas terão a melhor das impressões de si, e você estará afirmando a si mesmo que está pronto para ser feliz. Trabalhe, trabalhe muito a seu favor. Pare de esperar a felicidade sem esforços. Pare de exigir das pessoas aquilo que nem você conquistou ainda. Critique menos, trabalhe mais. E não se esqueça, nunca, de agradecer. Agradeça tudo o que faz parte da sua vida nesse momento, inclusive a dor que possa sentir. A nossa compreensão do universo ainda é muito pequena para julgar o que quer que seja nossa vida. A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las...”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meu caminho e me ajudar a fazer as melhores escolhas.

Agradeço aos meus familiares, em especial meu pai Alíbio de Souza Furtado, minha mãe Romilda Garcia de Souza e minha irmã Laís Furtado, que desde o começo estiveram ao meu lado.

Agradeço também ao Prof. Dr Deiler Sampaio Costa, que além de ser um grande orientador, também se tornou um grande amigo.

Obrigado à Tamara da Cruz Loubet Furtado, minha esposa, por sempre me dar forças para que eu concluísse esse projeto.

Lista de ilustrações

- Figura 1. Imunodeteção da enzima conversora de angiotensina (ECA) antes (A) e após (B) a criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro. Técnica de western blot com anticorpo monoclonal anti-ECA. Cada coluna representa um touro. 27
- Figura 2. Quantidade de pixels das bandas de proteínas obtidas através de western blot e avaliadas pelo software Image J®. Quanto maior o número de pixels, mais clara é a banda proteica e menos proteína foi detectada. A média da intensidade da banda diminuiu significativamente após a criopreservação ($p < 0,05$). 28
- Figura 3. Imunodeteção da β -tubulina no sêmen dos touros Gir Leiteiro. Técnica de western blot com anticorpo monoclonal anti- β -tubulina. Cada coluna representa um animal. 28
- Figura 4. Imunolocalização da ECA no espermatozoide antes (A) e após (B) a criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro. A ECA foi localizada na região periacrossomal. 29
- Figura 5. Área média corada do espermatozoide corada pelo anticorpo anti-ECA conjugada ao fluorocromo Cy3 e avaliada através do software Image J®. Os resultados foram obtidos em *pixels*. As áreas antes e após o congelamento são significativamente diferentes ($p < 0,05$). 29
- Figura 6. Atividade enzimática da ECA antes e após a criopreservação do sêmen de cinco touros Gir Leiteiros. A atividade da ECA foi determinada através da hidrólise do FAPGG. Cada unidade equivale a hidrólise de 10^{-6} M de FAPGG. A atividade da ECA foi significativamente reduzida após a criopreservação ($p < 0,05$). 30

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
REVISÃO DE LITERATURA	9
Alterações das membranas espermáticas durante a criopreservação.....	9
Proteínas seminais e criopreservação	11
Enzima conversora de angiotensina I	13
REFERÊNCIAS	16
Artigo: Caracterização da enzima conversora de angiotensina antes e após a criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
MATERIAIS E MÉTODO	24
Animais e coleta de sêmen	24
Western blot.....	25
Imunocitoquímica.....	26
Atividade enzimática	26
Análise estatística	27
RESULTADOS	27
Western blot.....	27
Imunocitoquímica.....	28
Atividade Enzimática	29
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	34

INTRODUÇÃO

As biotécnicas da reprodução, principalmente a inseminação artificial, tem cada vez mais se tornado fundamental para pecuária brasileira. Nesse contexto, a escolha de machos geneticamente superiores e de fertilidade comprovada é a chave para se obter índices de prenhez satisfatórios, visto que o sêmen desse macho será utilizado para inseminar várias fêmeas. Além da fertilidade, outro fator importante na utilização de um touro é o grau de congelabilidade do sêmen desse animal, já que para realização dessas biotécnicas, o sêmen utilizado geralmente é congelado.

A utilização de sêmen congelado, principalmente na pecuária bovina, promove taxas de prenhez satisfatórias, porém, o processo de criopreservação pode levar à perda de aproximadamente 50% na viabilidade espermática (Watson, 2000). Durante esse processo, a membrana plasmática passa por alterações estruturais, principalmente durante a etapa de resfriamento (de 19°C a 5°C), onde ela passa do estado líquido para o estado gel (Graham, 2011), Essas alterações são as principais responsáveis por provocar danos estruturais às membranas e citoesqueleto, alterações das proteínas de membranas e aumento intracelular de íons, o que resulta em diminuição da capacidade fertilizante do espermatozoide (Ardon e Suarez, 2013).

O método mais utilizado hoje em dia para determinar se um touro apresenta as condições mínimas para reprodução e se o seu sêmen tem condições de passar pelo processo de criopreservação é o exame andrológico, que junto com seus testes complementares fornece informações de grande utilidade para a tomada de decisões estratégicas num rebanho ou numa central de inseminação artificial, o que pode, muitas vezes, evitar prejuízos econômicos com o uso de animais de baixo potencial fertilizante. Entretanto, ainda existem diferenças nas taxas de gestações produzidas por touros classificados como aptos para reprodução, existindo variação até mesmo entre touros de centrais de inseminação, classificados como elite (Larson e Miller, 2000). Tais variações, muitas vezes são mascaradas pela baixa relação touro: vaca, por estações de monta prolongadas e, muitas vezes, por uma escrituração zootécnica ineficiente (Kastelic e Thundathil, 2008).

Como a fertilidade após o descongelamento do sêmen de touros é influenciada por uma ampla gama de fatores, um único teste de diagnóstico ainda não pode prever com precisão a fertilidade desse sêmen, abrindo espaço para o surgimento de outras técnicas de avaliação, como o estudo da proteômica seminal (Petrunkina et al., 2007).

34 Muitas proteínas estão envolvidas em processos como: migração dos espermatozoides
35 no trato reprodutivo da fêmea, capacitação espermática, interação dos espermatozoides com
36 as células do *cumulus*, reação acrossômica, ligação com a zona pelúcida (ZP), penetração da
37 ZP, e fusão do espermatozoide com o ovócito (Ikawa, et al., 2010). A composição proteica da
38 membrana espermática é alterada com o processo de criopreservação, sendo que algumas
39 proteínas podem ser perdidas ou ter a expressão diminuída, e outras aumentarem de
40 quantidade ao final do processo (Roncoletta, 1999).

41 Ollero et al. (1998) observaram uma redução de proteínas membranares no sêmen
42 bovino após a criopreservação. Os pesquisadores concluíram que a identificação de proteínas
43 presentes na membrana espermática e envolvidas no processo de fertilização, pode servir
44 como marcador bioquímico para congelabilidade do sêmen. Esses marcadores podem auxiliar
45 no desenvolvimento de testes que avaliem melhor um reprodutor, principalmente os doadores
46 de centrais de inseminação, além de poder ajudar a desenvolver melhores protocolos de
47 criopreservação de sêmen. Isso resultará em comercialização de sêmen com maior potencial
48 fertilizante, aumentando os índices produtivos a campo.

49 A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma ectoenzima ancorada a membrana
50 plasmática celular, com sua maior parte exposta na superfície da célula. Existem duas
51 isoformas dessa enzima. Uma é bem conhecida, chamada de isoforma somática (sECA), a
52 qual é um elemento fundamental no sistema renina angiotensina, responsável por regular a
53 pressão artéria sistêmica. A outra isoforma é a testicular (tECA), encontrada exclusivamente
54 no testículo, a qual está envolvida em diferentes eventos espermáticos, como motilidade e
55 fusão do espermatozoide com o oócito (Corvol et al., 2005). A presença da isoforma testicular
56 é fundamental para a correta fertilização, já que camundongos *knockout* para essa enzima
57 tiveram a fertilidade severamente comprometida, apesar de apresentar parâmetros
58 espermáticos normais (Hagaman et al., 1998).

59 Portanto, os efeitos da criopreservação sobre a proteômica seminal parece ser algo
60 muito complexo, e cada proteína parece responder de forma diferente a esse processo. Sendo
61 assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a enzima conversora de
62 angiotensina antes e após a criopreservação do sêmen de touros da raça Gir, elucidando sua
63 expressão, imunolocalização e atividade enzimática.

64

65

66

REVISÃO DE LITERATURA

67

68

69 *Alterações das membranas espermáticas durante a criopreservação*

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

A célula espermática apresenta na sua estrutura quatro membranas: a plasmática, a nuclear, a acrossomal e a mitocondrial. São estruturas formadas por uma bicamada lipídica, com proteínas integrais e periféricas ancoradas e adsorvidas, organizadas e um mosaico fluido (Parks e Graham, 1992). As proteínas integrais são liberadas apenas por solventes ou detergentes, já as periféricas são solúveis em diluidores seminais e água, e são facilmente removidas da membrana. As integrais atuam como poros ou canais na membrana, além de servirem como receptores de outras moléculas. Tanto as proteínas integrais, quanto as periféricas, possuem na sua superfície, cadeias de carboidratos carregados negativamente, o que faz com que proteínas e glicoproteínas do meio externo sejam atraídas, e juntos, esses elementos formam um glicocálix na superfície espermática, fundamental para a interação do espermatozoide com o oócito (Amann e Pickett, 1987).

81

82

83

84

85

86

87

88

89

Em geral, nos mamíferos, 70% dos lipídios de membrana são fosfolipídios (Flesch e Gadella, 2000), sendo que esses são compostos por uma parte hidrofílica (cabeça) e outra hidrofóbica (cadeia de ácidos graxos) que se estende para o interior da membrana, adquirindo de forma espontânea uma conformação de bicamada em meio aquoso (Parks, 1997). Devido a esse arranjo lamelar apresentado pelas cadeias de ácidos graxos, a membrana se torna hidrofóbica, fazendo com que o transporte de moléculas seja feito através de poros ou canais de proteínas. O resfriamento do espermatozoide leva a um rearranjo de fosfolipídios e proteínas, o que leva a uma passagem mais rápida de moléculas pela membrana (Amann e Pickett, 1987).

90

91

92

93

94

95

96

97

A fluidez da membrana se deve à capacidade dos fosfolipídios se movimentarem lateralmente, devido a sua conformação lamelar. Essa fluidez é determinada pela proporção de colesterol e fosfolipídios com cadeias de ácido graxos poli-insaturados, assim como a natureza do fosfolipídio. Em geral, quanto mais colesterol presente, menos flexível, ou menos fluida é essa membrana ou região da membrana, e se a proporção colesterol: fosfolipídio é elevada, principalmente se o fosfolipídio for poli-insaturado, mais resistente essa membrana será às mudanças de temperaturas. Isso ocorre porque o colesterol ajuda a manter os fosfolipídios arranjados de maneira lamelar (Amann e Pickett, 1987).

98

99

Existem na membrana, alguns fosfolipídios conhecidos como formadores de micela invertida, ou forma hexagonal II, onde a porção hidrofóbica dos fosfolipídios ficam para fora

100 na camada e a hidrofílica para dentro. Esse arranjo hexagonal não promove uma barreira de
101 permeabilidade, e ocorre transitoriamente em membranas biológicas durante os eventos de
102 fusão de membranas. Em condições fisiológicas, esses fosfolipídios formadores de micela
103 invertida localizam-se ao redor das proteínas integrais, e essa interação evita a ocorrência da
104 forma hexagonal II (Parks e Graham, 1992). Além disso, esses fosfolipídios possuem maior
105 ponto de fusão, portanto, quando o espermatozoide é submetido ao processo de resfriamento,
106 são os primeiros a sofrerem a transição de fase (Parks, 1997). Durante a fase de
107 reaquecimento, esses fosfolipídios podem desestabilizar a membrana e permitir a formação da
108 forma hexagonal II, resultando em perda da integridade da membrana, levando a formação de
109 canais hidrofílicos na membrana que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas,
110 com consequente perda do controle osmótico. Se os fosfolipídios não puderem reestabelecer
111 sua associação original com as proteínas, essas podem ter suas funções alteradas (Parks e
112 Graham, 1992). Holt e North (1985) demonstraram que a cálcio-ATPase tem sua atividade
113 diminuída devido a transição de fase sofrida pelos lipídios que ficam ao redor do sítio dessa
114 enzima.

115 Normalmente, as partículas intramembranas são distribuídas de forma aleatória entre
116 os folhetos da bicamada lipídica (Amann e Pickett, 1987). O resfriamento lento resultou em
117 redistribuição dessas partículas na membrana espermática de ovinos (Holt e North, 1985).
118 Aparentemente, as partículas que estão na região da membrana plasmática sobreposta pela
119 membrana acrossomal parecem não sofrer alteração. Já na região pós-acrossomal, as
120 partículas intramembranas se redistribuem para a região equatorial e próximo ao pescoço,
121 tendo dessa forma áreas desprovidas dessas partículas e outras com um grande aumento. Essa
122 reorientação das partículas intramembranas provavelmente é consequência da
123 movimentação dos fosfolipídios para áreas livres de proteínas, levando a agregação de
124 proteínas integrais, e com o resfriamento rápido e consequente choque térmico pelo frio, o
125 arranjo normal não é reestabelecido após o aquecimento a 37°C (Amann e Pickett, 1987).

126 Outras estruturas presentes na membrana de um espermatozoide são as “bombas”, as
127 quais são responsáveis em manter as concentrações de cálcio, sódio, potássio e magnésio
128 dentro dos intervalos fisiológicos. Uma das bombas mais conhecidas é a de sódio–potássio,
129 responsável por mover sódio para fora e potássio para dentro da célula. Essa função é
130 dependente de ATP, e a produção dessa diminui à medida que a temperatura é reduzida,
131 diminuindo a capacidade da “bomba”. Com isso, menos potássio entra na célula, e a
132 proporção sódio-potássio fisiológica é alterada, o que provavelmente leva a uma
133 despolarização da membrana, levando a um aumento dos canais de cálcio, com influxo desse

134 íon para dentro da célula (Parks e Graham, 1992). Esse acúmulo intracelular de cálcio foi
135 correlacionado com danos à membrana, devido a hidrólise de fosfolipídios resultante da
136 ativação de fosfolipases (Watson, 2000).

137

138 *Proteínas seminais e criopreservação*

139 Existem relatos de resistência espermática ao processo de congelação desde 1776, por
140 Spallanzini, porém foi a partir da descoberta dos efeitos crioprotetores do glicerol, por Polge
141 et al. (1949), que a criopreservação espermática começou a ser difundida. O processo consiste
142 basicamente em diluição, resfriamento, congelação, armazenamento e descongelação, e para
143 que, ao final desse processo, seja possível obter um sêmen com capacidade fertilizante é
144 necessária uma interação entre diluidor, curva de resfriamento e congelação e descongelação
145 (Amann e Pickett, 1987).

146 O choque térmico pelo frio ocorre quando o sêmen é resfriado rapidamente da
147 temperatura ambiente para 0°C, e é caracterizado por movimento circular dos
148 espermatozoides, perda prematura da motilidade, diminuição da produção de energia e
149 aumento da permeabilidade da membrana com consequente perda de íons e moléculas
150 intracelulares. Os danos à membrana espermática são os grandes responsáveis por essas
151 alterações decorrentes do choque pelo frio (Amann e Pickett, 1987). Uma forma de diminuir
152 esses efeitos é promover o resfriamento lento do sêmen diluído, além da adição de proteínas
153 do leite ou da gema do ovo nos diluidores seminais (Amann e Pickett, 1987).

154 Com o advento da proteômica, muitos estudos começaram a ser desenvolvidos com o
155 objetivo de caracterizar as proteínas presentes no sêmen, com isso, identificar alterações na
156 composição proteica após a criopreservação e correlacionar essas alterações com o padrão de
157 fertilidade e congelabilidade do sêmen de cada animal. Ollero e colaboradores, em 1998,
158 observaram, através de *western blot* de extrato espermático, que o sêmen criopreservado
159 apresentava 4 bandas proteicas a menos do que o sêmen fresco, e que portanto o processo de
160 congelação/dcongelação levaria a perda de proteínas.

161 Por muito tempo foi assumido que a criopreservação levava à liberação de proteínas,
162 principalmente enzimas, da superfície espermática para o fluido extracelular. Porém, tem sido
163 demonstrado recentemente que além da perda de algumas proteínas pelo espermatozoide,
164 ocorre também aumento na expressão de outras proteínas, tanto no espermatozoide quanto no
165 plasma seminal. Ardon e Suarez (2013), observaram uma maior expressão da *bind sperm*
166 *protein* (BSP) 1, BSP3 e BSP5 no espermatozoide de touros após o processo de
167 criopreservação quando comparado ao sêmen fresco. Já Wang et al. (2014) demonstraram um

168 aumento na expressão de 22 proteínas do espermatozoide de humanos submetidos à
169 congelação/descongelação.

170 A diferença de resposta das proteínas ao processo de criopreservação ficou claro em
171 um trabalho realizado por Westfalewicz et al. (2015), onde os pesquisadores estudaram,
172 através da eletroforese 2-D, as mudanças na composição proteica do sêmen bovino fresco,
173 durante o período de equilíbrio (4°C por 2,5 horas) e congelado, e observaram que no extrato
174 espermático, 25 *spots* de proteínas (representando 16 proteínas) alteraram a expressão após o
175 processo de criopreservação, sendo que 18 *spots* diminuíram e 5 aumentaram a expressão
176 após a criopreservação. Já no fluido seminal, identificaram 6 *spots* de proteína (representando
177 4 proteínas) que tiveram a expressão alterada, sendo que 2 *spots* aumentaram e 4 diminuíram
178 a expressão. A maioria dessas proteínas espermáticas afetadas pela criopreservação são
179 proteínas ligantes de membrana, e segundo os autores, a perda dessas proteínas podem alterar
180 o revestimento natural do espermatozoide. Esses autores observaram também, que as maiores
181 mudanças ocorrem no período de equilíbrio, onde ocorre a interação com o diluidor.

182 Existem variações na composição proteica no sêmen de indivíduos da mesma espécie,
183 e alguns estudos têm correlacionado a expressão de algumas proteínas com a congelabilidade
184 do sêmen. Roncoletta et al. (1999) observaram através de gel de eletroforese, que animais de
185 alta congelabilidade apresentavam uma banda de proteína de aproximadamente 61,8 KDa, e
186 que os animais de baixa congelabilidade não apresentavam essa banda. Jobim e colaboradores
187 (2003), encontraram uma maior expressão das proteínas de 15-16 KDa, 11-12 KDa, 13-14
188 KDa e 18-20 KDa no plasma seminal de touros classificados como produtores de sêmen de
189 alta congelabilidade, e segundo os autores, essas proteínas seriam a BSP-A1/-A2, proteína
190 ácida do fluido seminal (aSFP), BSP-A1/A2 ou A3, e clusterina cadeia alfa, respectivamente.
191 Em contra partida, associaram a proteína de 25-26 KDa com sêmen de baixa congelabilidade,
192 e que essa proteína provavelmente seria a prostaglandina D sintetase tipo lipocaína.

193 Proteínas transmembranais também são alteradas pelo processo de criopreservação.
194 Danos severos foram observados no acrossoma de 60% dos espermatozoides criopreservados
195 de touros, e mais da metade desses animais apresentaram localização errônea da proteína
196 IZUMO1, uma proteína transmembranar responsável pela fusão do espermatozoide com a
197 membrana do oócito após a reação acrossomal. Além disso, após incubação por 360 minutos,
198 uma porcentagem maior de espermatozoides criopreservados perderam a IZUMO1 em
199 comparação ao sêmen fresco (Fukuda et al., 2016). Mohan et al. (1992), avaliaram a atividade
200 enzimática da ECA no espermatozoide e plasma seminal de touros e búfalos, e demonstraram
201 que a atividade dessa enzima diminuiu no espermatozoide, e aumentou no plasma seminal

202 após a criopreservação do sêmen de ambas as espécies, e atribuíram esses achados às
203 alterações decorrentes do choque pelo frio.

204

205 *Enzima conversora de angiotensina I*

206 O sistema renina-angiotensina tem um papel importante na regulação da pressão
207 arterial e função cardiovascular. Esse sistema é ativado quando há uma queda na pressão
208 arterial, fazendo com que o fígado secrete uma glicoproteína, o angiotensinogênio. Essa
209 glicoproteína é então clivada pela renina (produzida pelos rins), liberando um decapeptídeo
210 inativo, chamado de angiotensina I. Esse decapeptídeo é então convertido em um
211 octapeptídeo vasoativo, a angiotensina II, através da remoção de dois aminoácidos da porção
212 C-terminal pela ação da ECA, resultando em aumento da pressão arterial (Maciel e Muzzi,
213 2013). Essa enzima também inativa a bradicinina, um polipeptídeo vasodilatador,
214 potencializando o efeito citado. Essas ações da ECA são mediadas pela sua atividade
215 metalopeptidase dependente de zinco, sendo inibida pelo captopril e inalapril, substâncias
216 amplamente utilizadas no tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca e insuficiência
217 renal (Corvol et al., 1995, Sabeur et al., 2001).

218 A ECA é uma ectoenzima ancorada à membrana plasmática, com a maior parte de sua
219 massa exposta na superfície da célula. Existem duas isoformas da ECA: uma forma somática
220 de cerca de 150-180 kDa, que tem dois sítios cataliticamente ativos, e uma menor isoforma
221 (90-110 kDa) presente nos testículos, que contém um único sítio ativo (Langford et al., 1993,
222 Kondoh et al., 2005). A isoforma testicular (tECA) é encontrada exclusivamente em células
223 germinativas masculinas após a meiose e é transcrita a partir do mesmo gene que a ECA
224 somática (sECA), por um promotor específico do testículo (Williams et al., 1995, Corvol et
225 al., 2004).

226 Com base no efeito já conhecido dos inibidores de ECA, esperava-se que a inativação
227 do *gene* ECA resultaria em uma diminuição da pressão arterial. De fato, camundongos
228 *knockout* para as duas isoformas da ECA apresentaram uma marcada redução da pressão
229 arterial e uma deterioração da função renal, porém, como efeito adicional, tiveram uma
230 acentuada redução na fertilidade (Krege et al., 1995). Quando foi inibida a síntese apenas da
231 isoforma somática da ECA, os camundongos apresentaram um severo comprometimento
232 renal, porém apresentaram fertilidade normal. Já quando foi inibida apenas a isoforma
233 testicular, mantendo-se a isoforma somática, a deficiência na fertilidade foi acentuada,
234 sugerindo que a isoforma participante da fertilização seja a tECA. Além disso, a ausência da
235 ECA testicular nesses animais não influenciou o número de espermatozoides e tampouco sua

236 morfologia, mas causou uma alteração no transporte dos espermatozoides na tuba uterina e na
237 ligação com a zona pelúcida do oócito (Hagaman et al., 1998). O mecanismo molecular
238 responsável por esse efeito ainda permanece desconhecido.

239 Kondoh et al. (2005) relataram em sua pesquisa que tECA era capaz de liberar a
240 porção extracelular de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI); esta nova
241 função da ECA estaria diretamente relacionada a fecundação do oócito pelo espermatozoide,
242 independente da atividade proteolítica, previamente conhecida da ECA. As células
243 germinativas do testículo são ricas em proteínas GPI-ancoradas, e foi durante uma busca
244 sistemática de novos fatores capazes de liberar tais proteínas que os pesquisadores
245 identificaram um fator de 110 kDa, que após purificado e feita a análise proteômica,
246 identificaram como sendo a tECA. A partir desta informação, novos campos de investigação
247 foram abertos.

248 *In vitro*, as proteínas GPI-ancoradas liberadas por ação de ECA tinham o mesmo
249 tamanho daquelas liberadas pela proteína bacteriana fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC),
250 uma GPIase bem caracterizada e rotineiramente utilizada em pesquisas (Corvol, 2005). Além
251 disso, Kondoh et al. (2005) também relataram que as proteínas GPI-ancoradas TSP5 e PH-20
252 são liberadas da membrana do espermatozoide pela ação da ECA. Tais proteínas já eram
253 conhecidas por seu papel na fertilização do oócito. Camundongos que não possuíam o *gene* de
254 tECA ativo não tiveram essas proteínas liberadas e conseqüentemente seus espermatozoides
255 não conseguiram se ligar à zona pelúcida.

256 A ECA foi localizada no acrossoma dos espermatozoides de cães por Sabeur et al.
257 (2001) por imunocitoquímica. Nesta mesma pesquisa, usando imunohistoquímica, esses
258 autores relatam a presença de ECA principalmente na região adluminal dos túbulos
259 seminíferos correspondente às espermátides. Localização semelhante foi relatada em coelhos
260 (Berg et al, 1986), ratos e camundongos (Langford et al, 1993; Sibony et al, 1994). Outros
261 estudos têm mostrado a presença de ECA em toda a área periacrosomal de espermatozoides
262 equinos (Dobrinski et al., 1997), suínos e ovinos (Boettger et al., 1993), e em espermatozoides
263 humanos (Kohn et al., 1998). Alguns autores também relataram a presença de ECA em gotas
264 citoplasmáticas de espermatozoides de suínos e humanos (Brentjens et al, 1986; Foresta et al,
265 1987). Sibony et al. (1994) mostraram que em camundongos e ratos, tECA estava presente
266 apenas após a conclusão da meiose, com expressão máxima na fase de acrossoma. Já no
267 espermatozoide bovino a tECA foi encontrada no acrossoma dessas células (Costa e
268 Thundathil, 2012).

269 A atividade enzimática da ECA tem sido relatada no ejaculado do homem (Shibahara
270 et al., 2001), no cão (Sabeur et al., 2001), em camundongos (Vanha-Perttula et al., 1985) e
271 suínos (Heder et al., 1990). Costa e Thundathil (2012) relataram atividade enzimática da
272 ECA, através da hidrólise do furanilacrilóil-L-fenilalanilglicilglicina (FAPGG), no
273 espermatozoide e no plasma seminal de touros Holandês, sendo essa atividade inibida por
274 10 μ M de captopril. Outros trabalhos já haviam relatado atividade enzimática da ECA no
275 sêmen de touros, utilizando como substrato o hip-his-leu (Singh et al., 1985; Heder et al.,
276 1989)

277 A expressão da ECA parece ser dependente de testosterona. Velletri et al. (1985),
278 investigando esta hipótese, observaram que ratos pré-púberes submetidos a hipofisectomia
279 perdiam a capacidade de sintetizar a isoforma testicular da ECA quando púberes. Neste caso,
280 reposições hormonais com testosterona, hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante
281 (LH), se feitas logo após a hipofisectomia, eram capazes de manter a atividade da ECA,
282 indicando a necessidade da manutenção da glândula pituitária íntegra e conseqüentemente a
283 estimulação da esteroidogênese nos testículos, para o processo de síntese da enzima. No
284 cavalo, a atividade da ECA está presente nos testículos, nos espermatozoides e plasma
285 seminal de garanhões pós-púberes, com insignificante atividade detectada no testículo ou
286 epidídimo de equinos antes da puberdade (Ball et al., 2003)

287 O efeito da ECA sobre a capacitação espermática também tem sido avaliado em
288 algumas espécies. Uma parte do conteúdo da ECA é liberada durante a capacitação (Kohn et
289 al., 1995), enquanto outras partes parecem ser liberadas durante a passagem dos
290 espermatozoides pelo trato reprodutivo feminino e durante a fertilização (Kamata et al.,
291 2001). Em humanos, a ECA é liberada do espermatozoide durante a capacitação *in vitro*,
292 independente da morte celular ou da reação acrossomal (Foresta et al., 1987). Sua liberação
293 do espermatozoide durante a capacitação espermática já foi demonstrada também em bovinos
294 (Singh et al., 1985) e coelhos (Singh e Srivastava, 1988). Segundo Ball et al. (2003) a inibição
295 da ECA durante a incubação *in vitro* de espermatozoides equinos com progesterona,
296 aparentemente potencializou a capacitação, determinada pela maior habilidade do
297 espermatozoide promover exocitose acrossomal. Porém, quando Foresta et al. (1991) inibiram
298 a ECA com captopril, a reação acrossomal foi diminuída, assim como a penetração de oócitos
299 de camundongos pelos espermatozoides humanos. Costa e Thundathil (2012) tiveram
300 resultados semelhantes aos obtidos por Foresta et al. (1991), onde a utilização de 10 μ M de
301 captopril diminuiu a porcentagem de espermatozoides com acrossoma reagido, e os autores
302 sugeriram que essa diminuição foi devido à redução na produção de angiotensina II, um

303 importante estimulador de reação acrossomal em espermatozoides capacitados de bovinos e
304 equinos. Apesar de sua liberação durante a capacitação, seu papel durante esse processo ainda
305 não foi completamente elucidado e vários questionamentos ainda encontram-se sem resposta.

306 Assim como outras proteínas da membrana espermática, a tECA foi correlacionada
307 com parâmetros espermáticos, e parece estar expressa em diferentes quantidades em sêmen de
308 diferentes graus de fertilidade. Foi demonstrado por Nikolaeva et al., (2006) que a expressão
309 da tECA é alterada em espermatozoides com baixa motilidade e/ou alterações morfológicas.
310 Esses autores encontraram uma expressão de tECA 2,5 vezes maior na superfície de
311 espermatozoides humanos anormais, corroborando os resultados de Siems et al. (1991) e
312 Kohn et al. (1998). Shibahara et al. (2001), também encontraram uma maior atividade da
313 tECA no espermatozoide de pacientes humanos inférteis, que apresentavam motilidade
314 reduzida, e sugeriram que, em espermatozoides normais, a tECA é liberada, e isso faz com
315 que o espermatozoide adquira sua capacidade fertilizante, já em células defeituosas, essa
316 enzima não consegue se desprender da membrana. Em suínos, elevada atividade de ECA foi
317 correlacionada com ejaculados de menor fertilidade (Heder et al., 1990). Nesse caso os
318 autores sugeriram que tais achados podem ter sido devido à alta concentração de ECA ter
319 causado a degradação de bradicinina, que sabidamente promove um aumento da motilidade
320 espermática (Sato e Schill, 1987; Mizutani e Schill, 1985).

321 Desta feita, alguns pontos devem ser considerados. O primeiro é que a tECA tem um
322 papel fundamental na fertilização do oócito e sua ausência ocasiona uma falha grave nesse
323 processo. O segundo, é que por ser uma proteína ancorada à membrana plasmática, está
324 sujeita a modificações durante o processo de criopreservação; e o terceiro é que há pouca
325 informação sobre a caracterização de ECA antes e após a criopreservação espermática.

326

327

REFERÊNCIAS

328 AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of
329 cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3,
330 p. 145-174, 1987.

331

332 ARDON, F., SUAREZ, S. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal
333 plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. **Reproduction**, v. 146, p. 111-117,
334 2013.

335

336 BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; WESSEL, M.T.; SABEUR, K. Activity of
337 angiotensin converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of
338 angiotensin II on sperm motility. **Theriogenology**. v.59, p.901-914, 2003.

- 339 BERG T, SULNER J, LAI CY, SOFFER RL. Immunohistochemical localization of two
340 angiotensin 1 converting isoenzymes in the reproductive tract of the male rabbit. **Journal of**
341 **Histochemistry & Cytochemistry**, v. 34, p.753–760, 1986.
- 342
- 343 BOETTGER, A., KERTSCHER, U., STEINMANN, C., BAEGER, U., SIEMS, W-E.,
344 HEDER, G. Degradation of bradykinin in semen of ram and boar. **Biochemical**
345 **Pharmacology**, v.45, p.1983–1988, 1993.
- 346
- 347 BRENTJENS, J.R., MATSUO, S., ANDRES, G.A., CALWELL, P.R.B., ZOMBONI, L.
348 Gametes contain angiotensin-converting enzyme (kininase II). **Experientia**, v.42, p.399–402,
349 1986.
- 350
- 351 CORVOL, P. ACE sets up fertilization. **Nature Medicine**, v.11, p.118-119, 2005.
- 352
- 353 CORVOL, P., EYRIES, M., SOUBRIER, F. In: Barret, A.J., Rawlings, N., Woessner, J.
354 (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, p.332–
355 349, 2004.
- 356
- 357 CORVOL, P., WILLIAMS, T.A., SOUBRIER, F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin
358 Iconverting enzyme. **Methods in Enzymology**, v.248, p.283–305, 1995.
- 359
- 360 COSTA, D.S., THUNDATHIL, J.C. Characterization and activity of angiotensinconverting
361 enzyme in Holstein semen. **Animal Reproduction Science**, v.133, p.35- 42, 2012.
- 362
- 363 DOBRINSKI, I., IGNOTZ, G.G., FAGNAN, M.S., ASHLEY, I.Y., BALL, B. Isolation and
364 characterization of a protein with homology to angiotensin converting enzyme from the
365 periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. **Molecular Reproduction and**
366 **Development**, v.48, p.251–260, 1997.
- 367
- 368 FLESCHE, F.M., GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the
369 process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, n. 3, p. 197-235, 2000.
- 370
- 371 FORESTA, C., MIONI, R., ROSSATO, M., VAROTTO, A., ZORZI, M. Evidence for the
372 involvement of sperm angiotensin converting enzyme in fertilization. **International Journal**
373 **of Andrology**, v.14, p.333–339, 1991.
- 374
- 375 FORESTA, C., INDINO, M., MANONI, F., SCANDELLARI, C. Angiotensinconverting
376 enzyme content of human spermatozoa and its release during capacitation. **Fertility and**
377 **Sterility**, v.47, p.1000–1003, 1987.
- 378
- 379 FUKUDA, M., SAKASE, M., FUKUSHIMA, M., HARAYAMA, H. Changes of IZUMO1 in
380 bull spermatozoa during the maturation, acrosome reaction, and cryopreservation.
381 **Theriogenology**, v.86, p. 2179-2188, 2016.
- 382
- 383 GRAHAM, J.K. Principles of cooled semen. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.;
384 VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex:
385 WileyBlackwell, cap.127, v.1, p.1308-1315, 2011.
- 386
- 387 HAGAMAN, J.R., MOYER, J.S., BACHMAN, E.S., SIBONY, M., MAGYAR, P.L.,
388 WELCH, J.E., SMITHIES, O., KREGE, J.H., O'BRIEN, D.A. Angiotensin-converting

- 389 enzyme and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**
390 **the United States of America**, v.95, p.2552–2557, 1998.
- 391
- 392 HEDER, G., SIEMS, W.E., NEHRING, H., MÜLLER, K., HILSE, H., JENTZSCH, K.D.
393 Occurrence and potential importance of selected peptidases in bull ejaculates. **Andrologia**,
394 v.21, p. 247–255, 1989.
- 395
- 396 HEDER, G.; SIEMS, W.; MUDRA, K.; NEHRING, H.; SEIFFERT, I.; JENTZSCH, K.D.
397 Occurrence and potential importance of angiotensin-converting enzyme in semen of boars.
398 **Andrology**, v.22, p.437-443, 1990.
- 399
- 400 HOLT, W.V., NORTH, R.D. Determination of lipid components and thermal phase transition
401 temperature in an enriched plasma membrane fraction from spermatozoa. **Journal of**
402 **Reproduction and Fertility**, v. 73, n. 1, p. 285-294, 1985.
- 403
- 404 IKAWA, M., INOUE, N., BENHAM, A.M., OKABE, M. Fertilization: a sperm's journey to
405 and interaction with the oocyte. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, p.984- 994, 2010.
- 406
- 407 JOBIM, M. I. M., OBERST, E. R., SALBEGO, C. G., SOUZA, D. O., WALD, V. B.,
408 MATTOS, R. C. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas
409 com a congelabilidade do sêmen através da eletroforese bidimensional em gel de
410 poliacrilamida. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 21-30, 2003.
- 411
- 412 KAMATA, M., HU, J., SHIBAHARA, H., NAKAGAWA, H. Assay of testicular angiotensin-
413 converting enzyme activity in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**,
414 v.24, p.225-231, 2001.
- 415
- 416 KASTELIC, J.P., THUNDATHIL, J.C. Breeding soundness evaluation and semen analysis
417 for predicting bull fertility. **Reproduction Domestic Animals**, v.43, p.368–373, 2008.
- 418
- 419 KOHN, F.M., MISKA, W., SCHILL, W.B. Release of angiotensin-converting enzyme (ACE)
420 from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. **Journal of Andrology**,
421 v.6, p259–265, 1995.
- 422
- 423 KOHN, F.M., DAMMSHAUSER, I., NEUKAMM, C., RENNEBERG, H., SIEMS, W.E.,
424 SCHILL, W.B., AUMULLER, G. Ultrastructural localisation of angiotensin-converting
425 enzyme in ejaculated spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, p.604–610, 1998.
- 426
- 427 KONDOH, G., TOJO, H., NAKATANI, Y., KOMAZAWA, N., MURATA, C.,
428 YAMAGATA, K., MAEDA, Y., KINOSHITA, T., OKABE, M., TAGUCHI, R., TAKEDA,
429 J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for
430 fertilization. **Nature Medicine**, v.11, p.160-166, 2005.
- 431
- 432 KREGE, J.H., JOHN, S.W.M., LANGENBACH, L.L., HODGIN, J.B., HAGAMAN, J.R.,
433 BACHMAN, E.S., JENNETTE, J.C., O'BRIEN, D.A., SMITHIES, O. Male–female
434 differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. **Nature**, v.375, p.146–148,
435 1995.
- 436

- 437 LANGFORD, K.G., ZHOU, Y., RUSSELL, L.D., WILCOX, J.N., BERNSTEIN, K.
438 Regulated expression of testis angiotensin converting enzyme during spermatogenesis in
439 mice. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1210–1218, 1993.
440
- 441 LARSON, J.L., MILLER, D.J. Can relative spermatozoal galactosyltransferase activity be
442 predictive of dairy bull fertility? **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2473-2479, 2000.
443
- 444 MACIEL, R.P., MUZZI, R.A.L. A presença do Sistema renina angiotensina em vários órgãos.
445 **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.20, p.1-22, 2013.
446
- 447 MIZUTANI, T., SCHILL, W.B. Motility of seminal plasma-free spermatozoa in the presence
448 of several physiological compounds. **Andrology**, v.17, p.150-156, 1985.
449
- 450 MOHAN, J., MOUDGAL, R.P., PANDALAND, J.N., MOHAN, G. Effects of cold shock
451 treatment on angiotensin-converting Enzyme activity and on semen characteristics in Roosters
452 and bulls. **Theriogenology**, v.37, p.1147-1154, 1992.
453
- 454 NIKOLAEVA, M.A., BALYASNIKOVA, I.V., ALEXINSKAYA, M.A., METZGER, R.,
455 FRANKE, F.E., ALBRECHT, R.F., KULAKOV, V.I., SUKHIKH, G.T., DANILOV, S.M.
456 Testicular isoform of angiotensin I-converting enzyme (ACE, CD143) on the surface of
457 human spermatozoa: revelation and quantification using monoclonal antibodies. **American
458 Journal of Reproduction and Immunology**, v.55, p.54–68, 2006.
459
- 460 OLLERO, M., BESCÓS, O., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., MUIÑO-BLANCO, T. Loss of plasma
461 membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing
462 process. **Theriogenology**, v.49, p.547-55, 1998.
463
- 464 PARKS, J.E. Hypothermia and Mammalian gametes, In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K.
465 (Eds.) **Reproduction Tissue Banking: scientific principles**. San Diego: Academic Press,. p.
466 229-261, 1997.
467
- 468 PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.
469 **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
470
- 471 PETRUNKINA, A.M., WABERSKI, D., GÜNZEL-APEL, A.R., TÖPFER-PETERSEN, E.
472 Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. **Reproduction**, v.134, p.3–17,
473 2007.
474
- 475 POLGE, C., SMITH, A.U., PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and
476 dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.
477
- 478 RONCOLETTA, M. Perfil em SdS-Page das proteínas de plasma seminal e membrana de
479 espermatozoides e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores de sêmen.
480 1999. [956 f]. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) Faculdade de Ciências Agrárias
481 e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1999.
482
- 483 SABEUR, K., VO, A.T., BALL, B.A. Characterization of angiotensin-converting enzyme in
484 canine testis. **Reproduction**, v.122, p.139-46, 2001.
485

- 486 SATO, H., SCHILL, W.B. Temperature-dependent effects of the components of kallikrein
487 kinin system on sperm motility in vitro. **Fertility and Sterility**, v.47, p.684- 688, 1987.
488
- 489 SHIBAHARA, H., KAMATA, M., HU, J., NAKAGAWA, H., OBARA, H., KONDOH, N.,
490 SHIMA, H., SATO, I. Activity of testis angiotensin converting enzyme (ACE) in ejaculated
491 human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.24, p.295- 299. 2001.
492
- 493 SIBONY, M., SEGRETAİN, D., GASC, J.M. Angiotensin-converting enzyme in murine
494 testis: step-specific expression of the germinal isoform during spermiogenesis. **Biology of**
495 **Reproduction**, v.50, p.1015–1026, 1994.
496
- 497 SIEMS, W.-E., HEDER, G., HILSE, H., BAEGER, I., ENGEL, S., JENTZSCH, E.K.D.
498 Angiotensin-converting enzyme and other peptidolytic enzymes in human semen and
499 relations to its spermatologic parameters. **Andrologia**, v. 23, p. 185-189, 1991.
500
- 501
- 502 SINGH, U.S., KUMAR, M.V., PANDA, I.N. Angiotensin converting enzyme in semen and
503 its possible role in capacitation. **Andrologia**, v. 17, p. 472–475, 1985.
504
- 505 SINGH, U.S., SRIVASTAVA, A.K. Angiotensin converting enzyme from capacitated rabbit
506 spermatozoa: two distinct forms. **Andrology**, v.20, p.322-325, 1988.
507
- 508 SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W., GRAHAM, J.K., VANDERWAL, D.K., MCCUE, P.M.,
509 BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: **Animal Reproduction**
510 **and Biotechnology**, p. 89, 1999.
511
- 512 VANHA-PERTTULA, T., MATHER, J.P., BARDIN, C.W., MOSS, S.B., BELLVE, A.R.
513 Localization of the angiotensin-converting enzyme activity in testis and epididymis. **Biology**
514 **of Reproduction**, v.33, p.870-877, 1985.
515
- 516 VELLETRI, P.A., AQUILANO, D.R., BRUCKNICK, E., TSAI-MORRIS, C.H., DUFAU, M.L.,
517 LOVEMBERG, W. Endocrinological control and cellular localization of rat testicular
518 angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1). **Endocrinology**, v.116, p.2516-2522, 1985.
519
- 520 WANG S., WANG W., XU Y., TANG M., FANG J., SUN H., SUN Y., GU M., LIU Z.,
521 ZHANG Z. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. **Proteomics**, v. 14, p.
522 298-310, 2014.
523
- 524 WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
525 **Reproduction Science**. v. 60, p 481-492, 2000.
526
- 527 WESTFALEWICZ, B., DIETRICH, M.A., CIERESZKO, A. Impact of cryopreservation on
528 bull (*Bos taurus*) semen proteome. **Journal Animal Science**, p. 5240-5253, 2015.
529
- 530 WILLIAMS, T.A., VILLARD, E., PRIGENT, Y., DADOUNE, J.-P., SOUBRIER, F. A
531 genetic study of angiotensin I-converting enzyme levels in human semen. **Molecular and**
532 **Cellular Endocrinology**, v.107, p.215–219, 1995.
533

534 **Artigo: Caracterização da enzima conversora de angiotensina antes e após a**
535 **criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro**

536
537 **RESUMO**

538
539 FURTADO, F.H.G. Caracterização da enzima conversora de angiotensina antes e após a
540 criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro. 2017. Dissertação - Faculdade de Medicina
541 Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS,
542 2017.

543
544 O presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar a enzima conversora de
545 angiotensina (ECA) antes e após a criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro. Foram
546 utilizados ejaculados de cinco touros sexualmente maduros. Após a coleta, uma alíquota de
547 1ml foi retirada para análise com o sêmen fresco, e o restante foi submetido ao processo de
548 criopreservação, sendo mantido em nitrogênio líquido até o momento da análise do sêmen
549 descongelado a 37°C por 30 segundos. O sêmen fresco, após a coleta, e o criopreservado após
550 a descongelação, foram centrifugados duas vezes com TALP para retirada do plasma e do
551 diluidor, respectivamente. As amostras foram então submetidas às técnicas de *western blot*,
552 imunocitoquímica e atividade enzimática. Através do *western blot* com anticorpo monoclonal
553 anti-ECA, foi possível observar uma banda de 100 kDa em todos os cinco touros analisados,
554 sendo que a intensidade dessas bandas diminuiu 70% ($p<0,05$) após a criopreservação. A
555 imunocitoquímica revelou uma localização periacrossomal da ECA, sendo que a área corada
556 pelo anticorpo fluorescente diminuiu significativamente ($p<0,05$) após a criopreservação. A
557 atividade enzimática foi avaliada através da hidrólise do substrato FAPGG, a qual foi
558 significativamente menor ($p<0,05$) no sêmen criopreservado quando comparado ao sêmen
559 fresco. Portanto, o processo de criopreservação leva a diminuição da intensidade das bandas
560 de ECA, da área corada na imunocitoquímica e na atividade enzimática da ECA no sêmen de
561 touros Gir Leiteiro.

562
563 Palavras-chave: bovino, espermatozoide, proteômica seminal, sêmen

564
565
566

ABSTRACT

567

568

569 FURTADO, F.H.G. Characterization of angiotensin-converting enzyme before and after the
570 cryopreservation of Gyr bulls semen. 2017. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária
571 e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

572

573 The objective of this study was to characterize the angiotensin-converting enzyme (ACE)
574 before and after cryopreservation of semen from bulls Gyr. The ejaculates of five sexually
575 mature bulls were used. After collection, a 1ml aliquot was removed for analysis with fresh
576 semen, and the rest was submitted to the cryopreservation process, being kept in liquid
577 nitrogen until the analysis of the thawed semen at 37°C for 30 seconds. Fresh semen after
578 collection and cryopreserved after thawing were centrifuged twice with TALP for plasma and
579 diluent withdrawal, respectively. The samples were submitted to western blot,
580 immunocytochemistry and enzymatic activity. Through the western blot with anti-ACE
581 monoclonal antibody, it was possible to observe a band of 100 KDa in all five bulls analyzed,
582 and the intensity of these bands decreased 70% ($p < 0.05$) after cryopreservation.
583 Immunocytochemistry revoked a periacrossomal localization of ACE, and the area stained by
584 fluorescent antibody decreased significantly ($p < 0.05$) after cryopreservation. The enzymatic
585 activity was evaluated by the hydrolysis of the FAPGG substrate, which was significantly
586 lower ($p < 0.05$) in cryopreserved semen when compared to fresh semen. Therefore, the
587 cryopreservation process leads to a decrease in the intensity of the ECA bands, the stained
588 area in immunocytochemistry and in the enzymatic activity of ACE in Gyr bull semen.

589

590 Keywords: bovine, semen, seminal proteomics, spermatozoa

591

INTRODUÇÃO

592

593 A pecuária está cada vez mais dependente da utilização de biotécnicas reprodutivas,
594 em especial a inseminação artificial, sendo que o sêmen congelado é utilizado quase que na
595 totalidade das inseminações realizadas. Segundo a Associação Brasileira de Inseminação
596 Artificial (ASBIA, 2013), foram comercializadas 14,3 milhões de doses de sêmen no Brasil
597 em 2013, sendo que 41,2% dessas doses foram oriundas de touros de raças leiteiras, e os
598 touros Gir Leiteiro representam a terceira raça leiteira que mais comercializou doses no
599 âmbito nacional, e a que mais exportou doses dentre as raças leiteiras. O sêmen dos touros Gir
600 é muito utilizado, principalmente nos climas tropicais, devido a sua rusticidade e docilidade
601 dos animais, sem perder a eficiência produtiva (Carvalho et al., 2003)

602

Dessa forma, o processo de criopreservação do sêmen se torna fundamental, já que a
603 aquisição de um touro de alto valor genético é algo muito dispendioso. A inseminação
604 artificial com sêmen congelado promove taxas de prenhez satisfatórias, porém, o processo de
605 criopreservação ainda leva à perda de aproximadamente 50% na viabilidade espermática
606 (Watson, 2000). Durante esse processo, a membrana plasmática passa por alterações
607 estruturais, principalmente durante a etapa de resfriamento (de 19°C a 8°C), onde passa do
608 estado líquido para o estado gel (Graham, 2011), e são essas alterações as principais
609 responsáveis por provocar formação de cristais de gelo intracelular, influxo excessivo de íons
610 de cálcio e desidratação celular, resultando em diminuição da capacidade fertilizante do
611 espermatozoide (Jobim et al., 2009).

612

As alterações espermáticas decorrentes da criopreservação englobam também
613 mudanças na composição proteica, tanto do fluido seminal quanto da membrana espermática
614 (Westfalewicz et al., 2015). Nauc e Manjunath (2000) relataram uma diminuição de 70-80%
615 na concentração das proteínas BSP-A1-A2, BSP 0A3 e BSP-30KDa, no plasma seminal de
616 touros, após a criopreservação, quando comparado ao sêmen fresco dos mesmos animais,
617 sendo essas proteínas mais tarde correlacionadas positivamente com a congelabilidade do
618 sêmen bovino (Jobim et al., 2009). Já Westfalewics et al. (2015), estudando as alterações
619 proteicas, decorrentes da criopreservação, na membrana espermática, observaram mudança na
620 expressão de 16 proteínas, sendo que a maioria delas diminuíram sua expressão após o
621 processo de congelação/descongelação.

622

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma das proteínas pertencentes a
623 membrana espermática. É uma metaloprotease dependente de zinco que está ancorada a
624 membrana plasmática celular, com a maior parte da sua massa exposta na superfície da célula
625 (Corvol et al., 2004). Essa enzima possui duas isoformas, uma somática e outra testicular. A

626 isoforma somática (sECA) apresenta peso molecular de 150-180 KDa, é encontrada em
627 diversos órgãos, e desempenha papel fundamental no controle da pressão arterial, convertendo
628 angiotensina I (peptídeo inativo) em angiotensina II (peptídeo vasoativo) dentro do sistema
629 renina-angiotensina-aldosterona, além de inibir a bradicinina (peptídeo vasodilatador),
630 resultando em aumento da pressão arterial. Sua ação é inibida por algumas substâncias, como
631 o captopril e inalapril, amplamente utilizados no tratamento de pressão alta (Corvol et al.,
632 2004; Deguchi et al., 2007).

633 A isoforma testicular (tECA) apresenta um menor peso molecular (90-110 KDa). É
634 transcrita pelo mesmo gene que a sECA, porém utiliza um promotor testicular específico,
635 sendo encontrada apenas em células testiculares germinativas após a meiose (Corvol et al.,
636 2004). Sua expressão foi 2,5 vezes maior na superfície espermática de espermatozoides
637 humanos anormais (Nikolaeva et al., 2006) e sua atividade enzimática estava aumentada nos
638 espermatozoides de homens inférteis (Shibahara et al., 2001). Essa maior quantidade de ECA
639 nos espermatozoides anormais se deve a uma falha na sua liberação durante a fecundação
640 (Nikolaeva et al., 2006). A sua presença é fundamental para a correta fertilização, já que
641 camundongos *knockout* para a tECA tiveram a fertilidade comprometida (Hagaman et al.,
642 1998). A atividade enzimática da ECA no sêmen de touros e búfalos foi alterada pelo
643 processo de criopreservação, diminuindo 36,28 e 30,70%, respectivamente, porém não foi
644 alterada no sêmen de galos (Mohan et al., 1992).

645 Portanto, na literatura existem poucos dados sobre como o processo de
646 criopreservação modifica as características da ECA. Dessa forma o objetivo do presente
647 trabalho foi avaliar a intensidade, imunolocalização e atividade enzimática dessa proteína,
648 antes e após a criopreservação do sêmen de touros da raça Gir.

649

650

MATERIAIS E MÉTODO

651 Exceto onde mencionado o fabricante, todos os reagentes químicos foram adquiridos
652 da Sigma-Aldrich® (Oakville, ON, Canada).

653

Animais e coleta de sêmen

654 Foram utilizadas amostras de sêmen de cinco touros Gir Leiteiro sexualmente
655 maduros. As coletas foram realizadas pelo método de eletroejaculação. Imediatamente após a
656 coleta, o tubo coletor foi colocado em banho Maria a 37°C e mantido nessa temperatura
657 durante todo o período de manipulação e avaliação do aspecto físico do sêmen. Em seguida,
658 uma alíquota de 1mL foi retirada para as análises de western blot, imunocitoquímica e
659

660 atividade enzimática do sêmen fresco. Após a avaliação da concentração o sêmen foi diluído
661 em meio tris-gema até uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/ml e resfriado até 4°C ,
662 obedecendo-se uma curva de resfriamento de $-0,55^\circ\text{C}/\text{minuto}$, permanecendo na câmara fria
663 por cinco horas (tempo necessário ao resfriamento e equilíbrio). Ao final deste período, foi
664 envasado em palhetas de 0,5mL, colocadas em vapor de nitrogênio líquido por 14 minutos e,
665 em seguida, submersas em nitrogênio líquido (-196°C), onde permaneceram até o momento de
666 sua utilização (Graham, 1996).

667

668 *Western blot*

669 Para detecção da ECA nos espermatozoides dos cinco touros, tanto o sêmen fresco
670 quanto o descongelado (37°C por 30 segundos) foram centrifugados 2 vezes com TALP
671 (tyrode's albumin lactate pyruvate) para completa remoção do plasma e do diluidor,
672 respectivamente. A concentração do pellet foi aferida e alíquotas de $100\mu\text{L}$ contendo 10×10^6
673 espermatozoides foram submetidos à extração de proteínas com $25\mu\text{L}$ de "sample buffer"
674 (10% DL-Dithiothreitol, 0,004% azul de bromofenol, 20% glicerol, 4% de sodium dodecyl
675 sulfate) e aquecidas a 100°C por 5 min em termobloco. Em seguida as amostras foram
676 centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos (Thundathil et al., 2006).

677 O sobrenadante foi submetido à eletroforese (SDS-PAGE) e transferido para
678 membranas de nitrocelulose em tampão de transferência (25 mM Tris, 0,2 M de glicina, e
679 álcool metílico a 20%, pH 8,5) a uma tensão constante de 100 V (Costa e Thundathil, 2012).
680 As membranas de nitrocelulose resultantes foram coradas com ponceau 0,2% em ácido
681 acético para determinar a eficácia do *electrotransfer*. Posteriormente, os sítios inespecíficos
682 de ligação foram bloqueados com 3% de leite desnatado em tris-buffered saline + tween20
683 (TTBS) (Tris 20 mM, pH 7,8 contendo Tween-20 a 0,1%); por 60 minutos. Em seguida as
684 membranas foram incubadas (overnight a 4°C) com o anticorpo primário anti-ACE (anti-
685 ACE, clone E2, Millipore[®], 1:5000 em TTBS). Na manhã seguinte as membranas foram
686 lavadas três vezes com TTBS, e incubadas com anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG,
687 HRP conjugate, Millipore[®], 1:500 em TTBS) por 1 hora em temperatura ambiente. Depois de
688 lavadas três vezes com TTBS, as bandas de proteínas foram identificadas por
689 quimioluminescência (Newton et al., 2009, Heytens et al., 2009).

690 Para confirmar que todas as amostras possuíam a mesma quantidade de proteína, outro
691 gel foi preparado com as mesmas amostras e o western blot foi realizado utilizando anticorpo
692 anti- β -tubulina (1:10000) (Peknicova et al., 2007). A β -tubulina é utilizada como controle da

693 quantidade total de proteína na amostra pois, em espermatozoides normais, existe a mesma
694 quantidade de β -tubulina.

695 A intensidade de *pixels* cinzas das bandas de proteínas foi comparada com auxílio do
696 software ImageJ 1,40[®]. A escala de cinza vai de zero a 250, onde o zero representa uma
697 imagem totalmente preta, conseqüentemente, quanto mais próximo de zero for a intensidade
698 de cinza da banda, mais proteína está presente na amostra.

699 *Imunocitoquímica*

700 Para localização da ECA no espermatozoide, após a centrifugação com TALP do
701 sêmen fresco e descongelado, 10 μ L do pellet foi diluído em 1,0 mL de *phosphate-buffered*
702 *saline* (PBS). Os espermatozoides foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS. Em
703 seguida foram permeabilizadas com 0,5% (v / v) de Triton X-100 em PBS. Alíquotas de 50 μ L
704 (10×10^6 espermatozoides) foram depositadas sobre lâminas previamente tratadas com poly-
705 L-lysine e incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, o excesso de
706 espermatozoides foi lavado com PBS e os sítios inespecíficos bloqueados com *bovine serum*
707 *albumine* (BSA) a 3% em PBS por 60 minutos. Posteriormente as lâminas foram incubadas
708 com o anticorpo primário anti-ACE (anti-ACE, clone E2, Millipore[®], 1:250) diluído em
709 0,05% BSA-PBS a 4°C overnight. Após três lavagens com PBS, as amostras foram incubadas
710 com anti-corpo secundário IgG anti-mouse (goat anti-mouse IgG, HRP conjugate, Millipore[®],
711 1:400). Após outras três lavagens com PBS para retirar o excesso de anticorpo, as lâminas
712 foram coradas com 5 μ g/mL de Hoechst 33258 e 5 μ g/mL de isocianato de fluoresceína *pisum*
713 *sativum* (FITC-PSA) e em seguida montadas com 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)
714 (Heytens et al., 2009). As lâminas foram avaliadas em microscopia de fluorescência (pico de
715 excitação 550 nm e emissão 570 nm), sendo avaliadas 200 células.

716

717 *Atividade enzimática*

718 A atividade de ECA foi determinada com base na hidrólise de furanilacrilil-L-
719 phenilalanilglicilglicina (FAPGG) para furanacryloil-L-phenilalanina e glycil-glicina em um
720 ensaio de espectrofotometria contínuo conforme descrito previamente por Holmquist et al.
721 (1979) e Ball et al. (2003). O pellet de espermatozoides do ejaculado fresco e do
722 descongelado, que já haviam sido centrifugados para retirada do plasma e do diluidor, foi
723 ressuspendido em uma concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL e incubado em TALP
724 com 1% Triton-X a 4 °C por 60 minutos. Após a extração por detergente, as amostras foram
725 centrifugadas a 10000xg por 30min, e em seguida, 100 μ L do sobrenadante foi adicionado a
726 900 μ L de FAPGG (45mM em DMSO) diluído 1:30 em 0.05M Tris, pH 7.5, contendo 0.3M

727 de NaCl. A degradação de FAPGG foi mensurada a cada minuto pela diminuição da leitura da
728 absorvância em espectrofotômetro, durante oito minutos e esses valores convertidos em
729 atividade enzimática expressa em (mU/mL^{-1}). Uma unidade é equivalente a hidrólise de 10^{-6}
730 M de FAPGG. As amostras foram avaliadas em triplicata e a especificidade da reação foi
731 determinada pela adição do inibidor de ECA, captopril ($10\mu\text{M}$).

732 *Análise estatística*

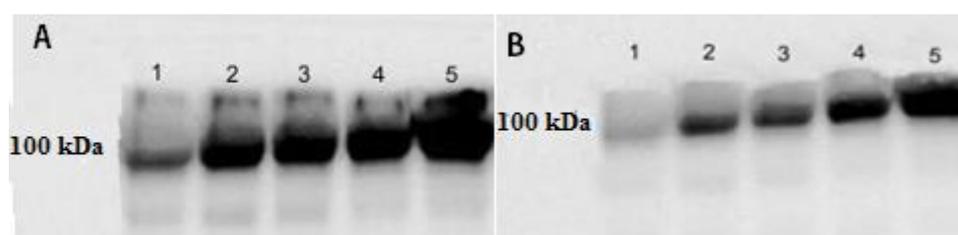
733 As médias das áreas coradas na imunocitoquímica, os números médios de pixels das
734 bandas de proteína e a atividade enzimática foram submetidos a análise de variância (teste F)
735 e as diferenças entre os grupos foram comparadas por meio do teste de Student, considerando-
736 se o nível de significância de 0,05.

737 **RESULTADOS**

738 *Western blot*

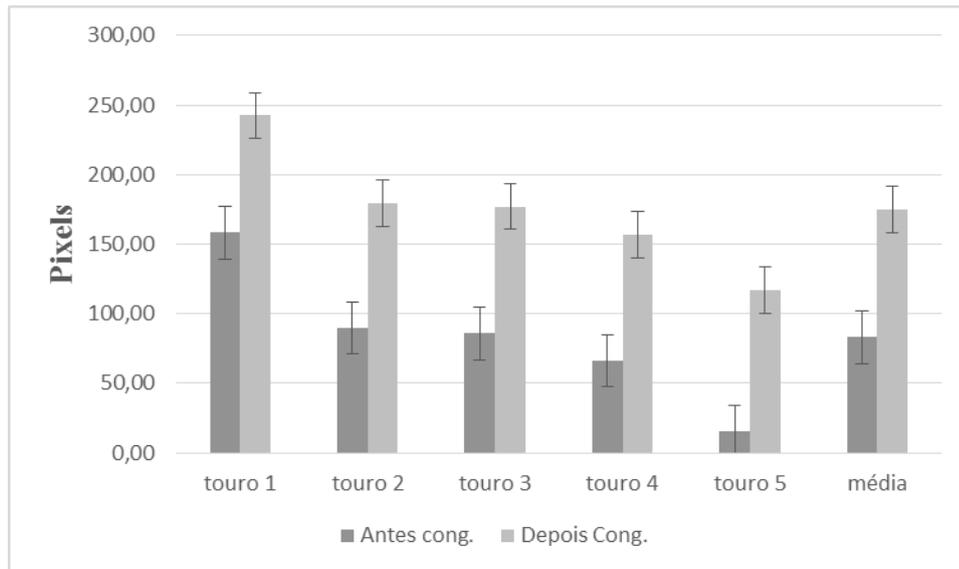
739 O anticorpo monoclonal anti-ECA foi capaz de reconhecer pelo menos uma banda de
740 proteína, com aproximadamente 100 kDa, na suspensão de espermatozoides, antes (Figura 1a)
741 e após (Figura 1b) a criopreservação do sêmen de cada um dos cinco touros Gir Leiteiro
742 sexualmente maduros analisados. O processo de criopreservação resultou em um aumento do
743 número de pixels das bandas de proteínas, sendo que na escala de cinza a intensidade média
744 foi de 82,973 pixels antes da congelação para 174,64 pixels após a congelação (Figura 2)
745 (quanto mais perto de zero mais escura a banda), representando uma redução de 47,5% na
746 quantidade média de proteínas ($p < 0,05$).

747



748

749 **Figura 1.** Imunodeteccção da enzima conversora de angiotensina (ECA) antes (A) e após (B) a
750 criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro. Técnica de western blot com anticorpo
751 monoclonal anti-ECA. Cada coluna representa um touro.



752

753 **Figura 2.** Quantidade de pixels das bandas de proteínas obtidas através de western blot e
 754 avaliadas pelo software Image J®. Quanto maior o número de pixels, mais claro é a banda
 755 proteica e menos proteína foi detectada. A média da intensidade da banda diminuiu
 756 significativamente após a criopreservação ($p < 0,05$).

757

758

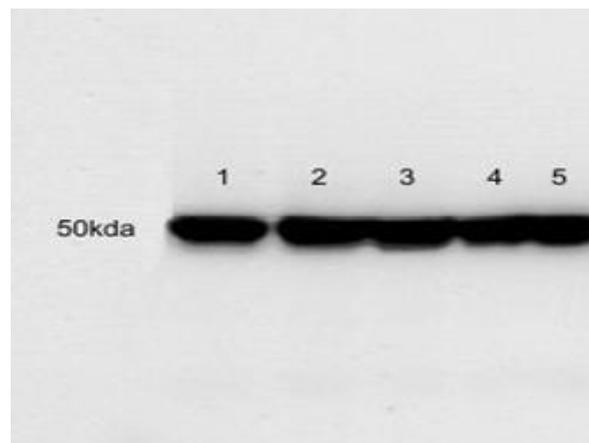
759

760

761

762

Para verificar se a quantidade de proteína adicionada nas amostras foi a mesma, foi
 realizado western blot com anticorpo anti- β tubulina. As intensidades das bandas foram iguais
 para os 5 touros (Figura 3), não havendo diferença na quantidade de pixels entre as amostras
 ($p > 0,05$) demonstrando que a mesma quantidade de proteína foi adicionada para cada
 amostra.



763

764

765

766

Figura 3. Imunodeteccção da β -tubulina no sêmen dos touros Gir Leiteiro. Técnica de western
 blot com anticorpo monoclonal anti- β -tubulina. Cada coluna representa um animal.

767

Imunocitoquímica

768

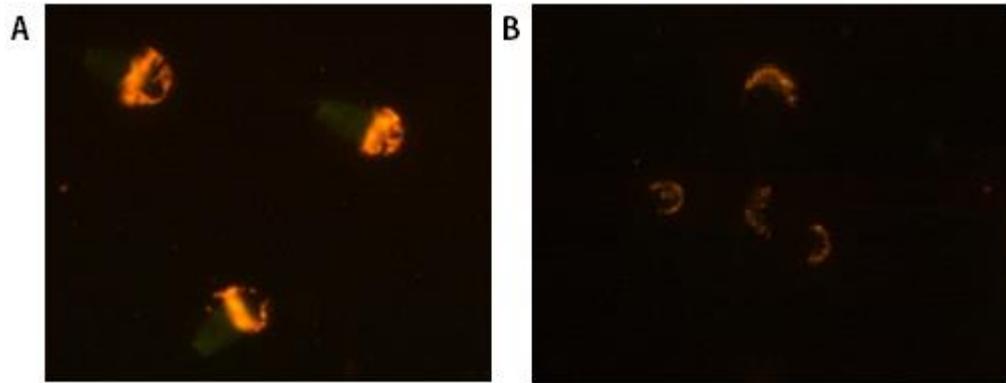
769

770

A imunodeteccção da ECA no espermatozoide dos cinco touros Gir Leiteiro
 demonstrou uma localização periacrossomal dessa enzima, e o processo de criopreservação
 não levou a alteração da localização da ECA (Figura 4a e 4b). A área corada no sêmen fresco

771 foi de 519,6 pixels, já no sêmen criopreservado foi de 238,33 pixels, o que representa uma
 772 redução de 55% (Figura 5; $p < 0,05$).

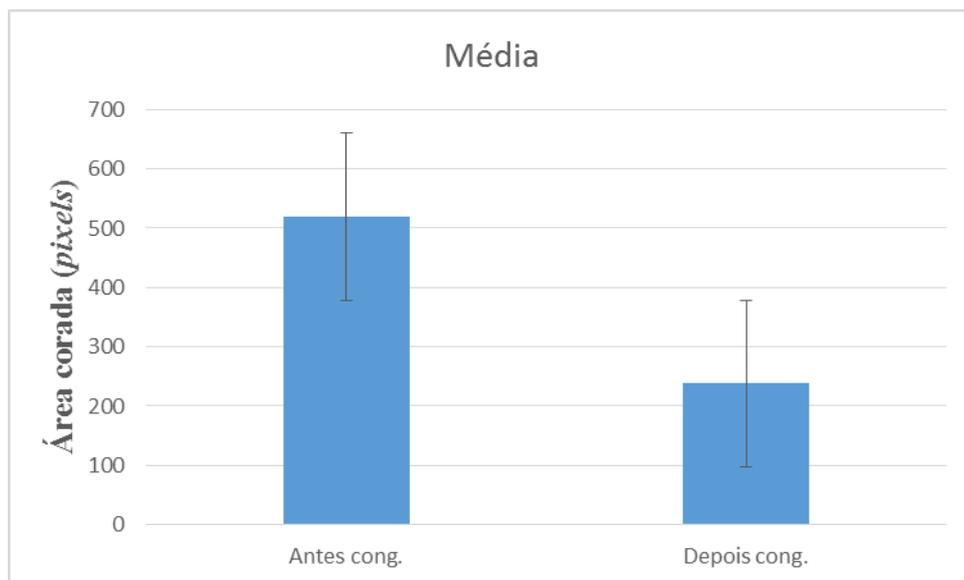
773



774

775 **Figura 4.** Imunolocalização da ECA no espermatozoide antes (A) e após (B) a
 776 criopreservação do sêmen de touros Gir Leiteiro. A ECA foi localizada na região
 777 periacrossomal.

778



779

780 **Figura 5.** Área média corada do espermatozoide corada pelo anticorpo anti-ECA conjugada
 781 ao fluorocromo Cy3 e avaliada através do software Image J®. Os resultados foram obtidos em
 782 pixels. As áreas antes e após o congelamento são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

783

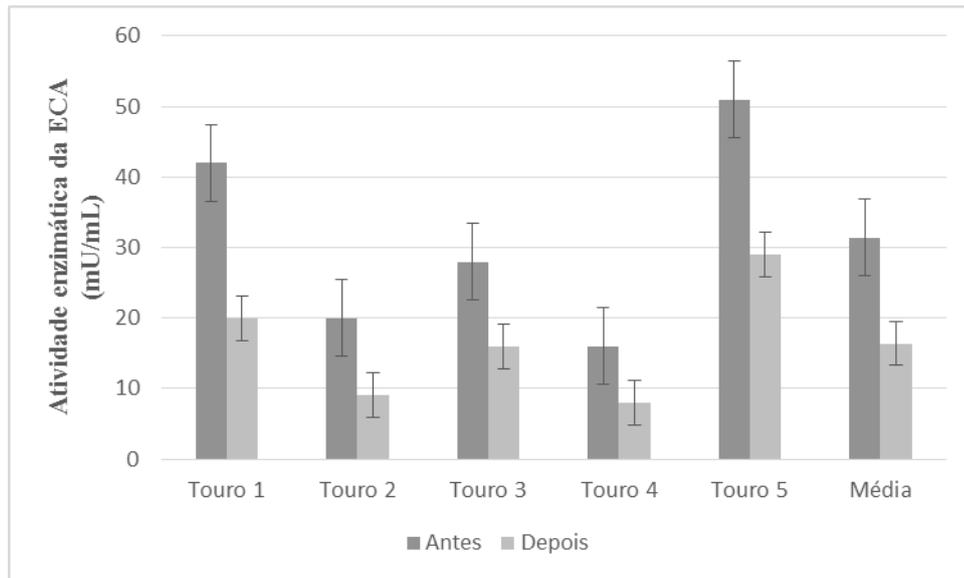
784 *Atividade Enzimática*

785

786

787

A atividade enzimática da ECA antes e após a criopreservação está demonstrada na figura 6. O processo de criopreservação levou a uma redução de 47% na atividade enzimática dessa proteína ($p < 0,05$).



788

789 **Figura 6.** Atividade enzimática da ECA antes e após a criopreservação do sêmen de cinco
 790 touros Gir Leiteiros. A atividade da ECA foi determinada através da hidrólise do FAPGG.
 791 Cada unidade equivale a hidrólise de 10^{-6} M de FAPGG. A atividade da ECA foi
 792 significativamente reduzida após a criopreservação ($p < 0,05$).

793

794

DISCUSSÃO

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

No presente trabalho, foi comparado a intensidade das bandas da enzima conversora de angiotensina (ECA) antes e após a criopreservação do sêmen de touros Gir leiteiro. A massa molecular encontrada no extrato espermático dos 5 touros, através da técnica de western blot, foi de aproximadamente 100kDa (Figura 1a), estando dentro do intervalo descrito pela literatura para a isoforma testicular da ECA, e compatível com outras espécies, como: 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 e Thundathil, 2012). Porém, Sabeur et al., (2001), trabalhando com cães, e Dobrinski et al., (1997) com equinos, encontraram massa molecular para a tECA de 65-70 e 68-70 KDa, respectivamente. Segundo os autores, essa diferença se deve a níveis diferentes de glicosilação entre as espécies, já que 20% da massa molecular dessa enzima é carboidrato (El-Dorry et al., 1982). Já Nikolaeva et al., (2006) sugere que essa diferença seria devido a utilização de anticorpo policlonal nesses estudos, o qual poderia ter detectado uma enzima diferente da tECA. No presente estudo, o anticorpo utilizado foi monoclonal, e a massa molecular encontrada é compatível apenas com a tECA.

810

811

812

Após a criopreservação, as bandas da tECA observadas nas amostras (Figura 1b) apresentaram a mesma massa molecular daquelas observadas com o sêmen fresco. Porém, foi possível observar uma redução de aproximadamente 47% na intensidade dessas bandas nas

813 amostras após a criopreservação (Figura 2). Nauc e Manjunath (2000), estudando outras
814 proteínas, observaram uma redução de 84%, 79% e 74% na quantidade de BSP-A1/-A2, BSP-
815 A3 e BSP-30-KDa, respectivamente, no espermatozoide bovino submetidos ao processo de
816 criopreservação enquanto Yoon e colaboradores (2016) observou que a criopreservação de
817 espermatozoides do epidídimo de touros levou à alteração na quantidade de nove proteínas,
818 sendo que sete delas tiveram sua expressão aumentada (AKAP, F1-ATPase, TPI, NDPK7,
819 NDUFV2, CAPZB e SOD2) e duas (ODF2 e uma proteína não identificada), assim como a
820 tECA no presente trabalho, tiveram a quantidade diminuída.

821 Uma porção da ECA é liberada do espermatozoide durante a capacitação, enquanto
822 outra parte é liberada durante a passagem do espermatozoide pelo trato reprodutivo feminino
823 (Kamata et al., 2001). Essa liberação da ECA foi demonstrada em bovinos por Singh e
824 colaboradores (1985), e a redução da intensidade das bandas de ECA observada do presente
825 trabalho vai de encontro a esses resultados, pois, segundo Medeiros e colaboradores (2002),
826 as alterações de membranas decorrentes da criopreservação são semelhantes às observadas na
827 capacitação espermática, dessa forma a ECA seria liberada da membrana espermática, assim
828 como ocorre na capacitação.

829 Essas alterações na composição proteica da membrana espermática e plasma seminal é
830 uma das principais causas de diminuição da fertilidade do espermatozoide após a
831 criopreservação, já que essas proteínas estão envolvidas em processos fundamentais para a
832 fertilização, como motilidade, reação acrossoma, transporte no trato reprodutivo feminino,
833 ligação a zona pelúcida e fusão com oócito (Moura et al., 2007). Kondoh et al. (2005)
834 relataram em sua pesquisa que tECA era capaz de liberar a porção extracelular de proteínas
835 ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI); esta nova função da ECA estaria diretamente
836 relacionada a fecundação do oócito pelo espermatozoide, independente da atividade
837 proteolítica, previamente conhecida da ECA. As células germinativas do testículo são ricas
838 em proteínas GPI ancoradas, e foi durante uma busca sistemática de novos fatores capazes de
839 liberar tais proteínas que os autores identificaram um fator de 110 kDa, que após purificado e
840 feita a análise proteômica, identificaram como sendo a tECA.

841 Muitos estudos têm correlacionado parâmetros espermáticos e fertilidade de touros
842 com algumas proteínas espermáticas. Por exemplo, a osteopontina (OPN), BSP 30 KDa,
843 fosfolipae A2, proteínas de ligação a heparina (HBP) e P25b tiveram correlação positiva com
844 a fertilidade (Parent et al., 1999; Moura et al., 2006), já a espermadesina z13 e clusterina
845 apresentaram correlação negativa (Ibrahim et al., 2000; Moura et al., 2006). Foi demonstrado
846 por Nikolaeva et al., (2006) que a expressão da tECA é alterada em espermatozoides com

847 baixa motilidade e/ou alterações morfológicas. Esses autores encontraram uma expressão de
848 tECA 2,5 vezes maior na superfície de espermatozoides humanos anormais, corroborando os
849 resultados de Siems et al. (1991) e Kohn et al. (1998). Shibahara et al. (2001), também
850 encontrou uma maior atividade da tECA no espermatozoide de pacientes humanos inférteis,
851 que apresentavam motilidade reduzida, e sugeriram que, em espermatozoides normais, a
852 tECA é liberada e isso faz com que o espermatozoide adquira sua capacidade fertilizante,
853 porém em células defeituosas, essa enzima não consegue se desprender da membrana, sendo
854 encontrada uma maior quantidade da ECA nessas células. Por outro lado, camundongos
855 *knockout* para a tECA apresentam fertilidade reduzida, sugerindo que a expressão dessa
856 enzima no espermatozoide é necessária para uma correta fertilização (Hagaman et al., 1998).

857 A localização da tECA parece variar entre as espécies, sendo que alguns trabalhos
858 relataram diferentes localizações dentro da mesma espécie. Essa proteína já foi detectada na
859 peça intermediária e começo do flagelo em espermatozoides testicular de ratos e
860 camundongos (Metayer et al., 2002), em espermátides e gota citoplasmática de
861 espermatozoides epididimários de suínos (Yotsumoto et al., 1984), em volta da cabeça
862 de espermátides, espermatozoides e em gota citoplasmática do fluído seminal de coelhos
863 (Brentjens et al., 1986) e no acrossoma ou em toda cabeça, região pós acrossomal, peça
864 intermediária, flagelo e região equatorial do espermatozoide de humanos (Kohn et al., 1998).
865 Já Nikolaeva et al. (2006), utilizando anticorpo monoclonal anti-ECA, detectou a tECA na
866 cabeça e do acrossoma de espermátides e espermatozoides móveis de humanos, e segundo
867 esses autores, essas diferenças encontradas na localização da tECA, assim como sugerido
868 também no western blot, se deve a uma baixa especificidade do anticorpo policlonal anti-
869 ECA.

870 No presente trabalho, foi utilizado um anticorpo monoclonal de camundongo anti-
871 ECA, o qual foi capaz de detectar a presença da ECA apenas na região periacrossomal de
872 espermatozoides de touros Gir (Figura 4a). Costa e Thundathil (2012), encontraram a mesma
873 localização trabalhando com touros Holandês. Essa localização periacrossomal também foi
874 descrita em outras espécies, como em equinos (Dobrinski et al., 1997), e caninos (Sabeur et
875 al., 2001).

876 Assim como no western blot, foi possível observar através da imunocitoquímica uma
877 diminuição da quantidade de tECA após a criopreservação, revelada através de uma
878 diminuição de 55% na área media corada (Figura 5), porém a localização da enzima no
879 espermatozoide não foi alterada (Figura 4a e 4b), sugerindo que o processo de
880 criopreservação libera a ECA da membrana plasmática, corroborando os resultados obtidos

881 por Mohan et al. (1992), onde a quantidade de ECA diminuiu no espermatozoide e aumentou
882 no plasma seminal após a criopreservação.

883 Sabe-se que a ECA tem papel fundamental na fertilização. Camundongos *knockout*
884 para isoforma somática e testicular dessa enzima, apesar de apresentarem parâmetros
885 espermáticos e cópula normais, geraram poucos filhos em comparação aos camundongos
886 selvagens. Essa redução na fertilização foi devido a falha no transporte espermático pelo
887 oviduto feminino e na ligação do espermatozoide à zona pelúcida (Krege et al., 1995). Porém,
888 camundongos *knockout* apenas para a isoforma somática da ECA, apesar de apresentarem
889 problemas renais graves, não tiveram sua fertilidade alterada, sugerindo que a presença da
890 isoforma forma testicular é necessária e suficiente para um correto funcionamento
891 espermático (Hagaman et al., 1998). Além disso, camundongos *knockout* para substratos
892 participantes do sistema renina-angiotensina, como angiotensinogênio e bradicinina, não
893 tiveram sua fertilidade reduzida, levando a pensar que outros substratos estariam envolvidos
894 na função espermática da ECA (Bergaya et al., 2001; Doan et al., 2001).

895 A atividade enzimática da ECA *in vitro*, pode ser avaliada, principalmente, através de
896 duas metodologias, as quais usam dois substratos distintos. A metodologia descrita por
897 Kasahara e Ashihara (1981) utiliza como substrato o composto sintético hippuril-histidil-
898 leucina (hip-his-leu), já a descrita por Homquist et al. (1979) utiliza o furanilacrilil-L-
899 fenilalanilglicilglicina (FAPGG). Jaiswal et al. (1984) encontrou atividade enzimática da ECA
900 em homogenados de epidídimo e testículos de ratos albinos, camundongos, suínos, cobaias,
901 cabras, coelhos e búfalo, todos utilizando como substrato o hip-his-leu. Utilizando como
902 substrato o FAPGG, já foi encontrado atividade enzimática da ECA no espermatozoide
903 humano (Kohn et al., 1998), testículo canino (Sabeur et al., 2001), e testículo equino (Ball et
904 al., 2003), e no espermatozoide e no plasma seminal de touros Holandês (Costa e Thundathil
905 et al., 2012).

906 No presente trabalho, através do substrato FAPGG, foi encontrado atividade
907 enzimática da ECA no sêmen dos cinco touros Gir analisados, corroborando os resultados
908 obtidos por Costa e Thudathil (2012), que encontraram atividade enzimática da ECA tanto no
909 espermatozoide quanto no plasma seminal de touros Holandês utilizando também como
910 substrato o FAPGG, e Singh et al. (1985) e Heder et al. (1989), que encontraram atividade
911 enzimática da ECA no sêmen bovino com o substrato hip-his-leu. Além disso é possível
912 observar pela figura 6 que a atividade enzimática da ECA diminuiu em todas as amostras
913 criopreservadas em comparação com as amostras frescas, estando, mais uma vez, de acordo

914 com os resultados de western blot e imunocitoquímica, que também mostraram diminuição da
915 ECA no espermatozoide após a criopreservação.

916 No sêmen de aves, a ECA parece se comportar de maneira diferente do que é
917 observado no sêmen de mamíferos. Mohan et al. (1992), comparando a atividade enzimática
918 da ECA no sêmen de galo, búfalo e touro, utilizando como substrato o hip-his-leu,
919 observaram que a atividade dessa enzima nas aves é maior no plasma seminal do que no
920 espermatozoide, ao contrário do que foi observado em búfalo e touros, que apresentaram atividade
921 enzimática 6,5 vezes maior no espermatozoide do que no plasma. Além disso, após passar
922 pelo choque térmico pelo frio (0°C por 10 minutos), a atividade enzimática no espermatozoide
923 e no plasma de aves não sofreu alteração, permanecendo a mesma. Já no sêmen de búfalo e
924 touro, a atividade da ECA caiu no espermatozoide e aumentou no plasma.

925 Esses resultados reforçam ainda mais a hipótese de que a ECA é perdida pelo
926 espermatozoide durante o processo de criopreservação, porém o que não fica muito claro é se
927 a enzima simplesmente se solta da membrana espermática devido a alterações estruturais que
928 essa sofre durante a congelação/descongelação, ou se ocorre um consumo da ECA devido ao
929 ataque à algum substrato durante a criopreservação.

930

931

932 CONCLUSÃO

933 O processo de criopreservação levou a uma diminuição da: atividade enzimática da
934 ECA, da intensidade das bandas da proteína sem alterar a massa molecular e da
935 imunofluorescência sem alterar localização da enzima no espermatozoide de touros Gir
936 Leiteiro. Todos esses resultados indicam perda da ECA pelo espermatozoide durante o
937 processo de criopreservação.

938

939 REFERÊNCIAS

940

941 ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial). Disponível em:
942 <<http://www.asbia.org.br/>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

943

944 BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; WESSEL, M.T.; SABEUR, K. Activity of
945 angiotensin converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of
946 angiotensin II on sperm motility. **Theriogenology**. v.59, p.901-914, 2003.

947

948 BERGAYA, S.; MENETON, P.; BLOCH-FAURE, M.; MATHIEU, E.; ALHENC-GELAS,
949 F.; LEVY, B.I.; BOULANGER, M. Decreased flow-dependent dilation in carotid arteries of
950 tissue kallikrein-knockout mice. **Circ. Res.** v. 88, p.593-599, 2001.

- 951 BRENTJENS, J.R.; MATSUO, S.; ANDRES, G.A.; CALWELL, P.R.B.; ZOMBONI, L.
952 Gametes contain angiotensin-converting enzyme (kininase II). **Experientia**, v.42, p.399–402,
953 1986.
- 954
955 CARVALHO, L.A.; NOVAES, L.P.; GOMES, A.T. et al. Sistema de produção de leite (Zona
956 da Mata Atlântica). Embrapa Gado de Leite, 2003. Disponível em: <http://www.embrapa.br/>.
957 Acessado em: 20 out. 2016.
- 958
959 CORVOL, P.; EYRIES, M.; SOUBRIER, F. In: Barret, A.J., Rawlings, N., Woessner, J.
960 (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, p.332–
961 349, 2004.
- 962
963 COSTA, D.S.; THUNDATHIL, J.C. Characterization and activity of angiotensin converting
964 enzyme in Holstein semen. **Animal Reproduction Science**, v.133, p.35- 42, 2012.
- 965
966 DEGUCHI, E.; TANI, T., WATANABE, H., YAMADA, S., KONDOH, G.
967 Dipeptidase inactivated tACE action in vivo: selective inhibition of sperm-zona pellucida
968 binding in the mouse. **Biology of Reproduction**, v.77, p.794–802, 2007.
- 969
970 DOAN, T.N., GLETSU, N., COLE, J., BERNSTEIN, K.E. Genetic manipulation of the
971 rennin–angiotensin system. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** v. 10, p. 483–491, 2001.
- 972
973 DOBRINSKI, I., IGNOTZ, G.G., FAGNAN, M.S., ASHLEY, I.Y., BALL, B. Isolation and
974 characterization of a protein with homology to angiotensin converting enzyme from the
975 periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. **Molecular Reproduction and**
976 **Development**, v.48, p.251–260, 1997.
- 977
978 EHLERS, M.R.W., MAEDER, D.L., KIRSCH, R.E. Rapid affinity chromatographic
979 purification of human lung and kidney angiotensin converting enzyme with the novel 42 N-
980 carboxyalkyl dipeptide inhibitor N-[1 (S)-carboxy-5-aminopentyl] glycylglycine. **Biochimica**
981 **et Biophysica Acta**, v.883, p.361–372, 1986.
- 982
983 EL-DORRY, H.A., BULL, H.G., IWATA, K., THORNBERRY, E.H., SOFFER, R.L.
984 Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. **Journal of**
985 **Biological Chemistry**, v.257, p.14128–14133, 1982.
- 986
987 GATTI, J.L., DRUART, X., GUERIN, Y., DACHEUX, F., DACHEUX, J.L. A 105 to 94
988 kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin converting
989 enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of ACE. **Biology of Reproduction**, v.60,
990 p.937–945, 1999.
- 991
992 GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Reproduction and Technology**.
993 v. 12, n. 1, p. 131-145, 1996.
- 994
995 GRAHAM, J.K. Principles of cooled semen. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.;
996 VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex:
997 WileyBlackwell, cap.127, v.1, p.1308-1315, 2011.
- 998
999 HAGAMAN, J.R., MOYER, J.S., BACHMAN, E.S., SIBONY, M., MAGYAR, P.L.,
1000 WELCH, J.E., SMITHIES, O., KREGG, J.H., O'BRIEN, D.A. Angiotensin-converting

- 1001 enzyme and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**
1002 **the United States of America**, v.95, p.2552–2557, 1998.
1003
- 1004 HEDER, G., SIEMS, W.E., NEHRING, H., MÜLLER, K., HILSE, H., JENTZSCH, K.D.
1005 Occurrence and potential importance of selected peptidases in bull ejaculates. **Andrologia**, v.
1006 21, p. 247–255, 1989.
1007
- 1008 HEYTENS, E., PARRINGTON, J., COWARD, K., YOUNG, C., LAMBRECHT, S., YOON,
1009 S.Y., FISSORE, R.A., HAMER, R., DEANE, C.M., RUAS, M., GRASA, P., SOLEIMANI,
1010 R., CUVELIER, C.A., GERRIS, J., DHONT, M., DEFORCE, D., LEYBAERT, L., DE
1011 SUTTER, P. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in
1012 spermatozoa from infertile men. **Human Reproduction**, v.24, p.2417–2428, 2009.
1013
- 1014 HOLMQUIST, B., BUNNING, P., RIORDAN, J.F. A continuous spectrophotometric assay
1015 for angiotensin converting enzyme. **Anal. Biochem**, v. 95, p. 540–548, 1979.
1016
- 1017 IBRAHIM, N.M., GILBERT, G.R., LOSETH, K.J., CRABO, B.G. Correlation between
1018 clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility.
1019 **Journal of Andrology**, v.21, p.887-894, 2000.
1020
- 1021 JAISWAL, A.K., JOSHI, P., KUMAR, M.V., PANDA, L.N., SINGH, J.N. Angiotensin
1022 converting enzyme in the testes and epididymis of mammals. **Andrologia**, v. 16, p. 410–416,
1023 1984.
1024
- 1025 JOBIM, M.I.M., GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. Proteínas do plasma seminal
1026 relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Revista Brasileira de Reprodução**
1027 **Animal**, n.6, p.25-31, 2009.
1028
- 1029 KAMATA, M., HU, J., SHIBAHARA, H., NAKAGAWA, H. Assay of testicular angiotensin-
1030 converting enzyme activity in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**,
1031 v.24, p.225-231, 2001.
1032
- 1033 KASAHARA, Y., ASHIHARA, Y. Colorimetry of angiotensin-I converting enzyme activity
1034 in sérum. *Clinical Chemistry*, v. 27, p. 1922-1925, 1981.
1035
- 1036 KOHN, F.M., DAMMSHAUSER, I., NEUKAMM, C., RENNEBERG, H., SIEMS, W.E.,
1037 SCHILL, W.B., AUMULLER, G. Ultrastructural localisation of angiotensinconverting
1038 enzyme in ejaculated spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, p.604–610, 1998.
1039
- 1040 KONDOH, G., TOJO, H., NAKATANI, Y., KOMAZAWA, N., MURATA, C.,
1041 YAMAGATA, K., MAEDA, Y., KINOSHITA, T., OKABE, M., TAGUCHI, R., TAKEDA,
1042 J. Angiotensin-coverting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for
1043 fertilization. **Nature Medicine**, v.11, p.160-166, 2005.
1044
- 1045 KREGE, J.H., JOHN, S.W.M., LANGENBACH, L.L., HODGIN, J.B., HAGAMAN, J.R.,
1046 BACHMAN, E.S., JENNETTE, J.C., O'BRIEN, D.A., SMITHIES, O. Male–female
1047 differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. **Nature**, v.375, p.146–148,
1048 1995.

- 1049 LANGFORD, K.G., ZHOU, Y., RUSSELL, L.D., WILCOX, J.N., BERNSTEIN, K.
1050 Regulated expression of testis angiotensin converting enzyme during spermatogenesis in
1051 mice. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1210–1218, 1993.
1052
- 1053 MEDEIROS, C.M.O., FORREL, F., OLIVEIRA, A.T.D., RODRIGUES, J.L. Current status
1054 of sperm cryopreservation: why isn't better?. **Theriogenology**, v.57, p. 327-344, 2002.
1055
- 1056 METAYER, S., DACHEUX, F., DACHEUX, J.L., GATTI, J.L. Germinal angiotensin
1057 converting enzyme is totally shed from the rodent sperm membrane during epididymal
1058 maturation. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1763–1767, 2002.
1059
- 1060 MOHAN, J., MOUDGAL, R.P., PANDALAND, J.N., MOHAN, G. Effects of cold shock
1061 treatment on angiotensin-converting Enzyme activity and on semen characteristics in Roosters
1062 and bulls. **Theriogenology**, v.37, p.1147-1154, 1992.
1063
- 1064 MOURA, A.A., CHAPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Proteins of the accessory sex glands
1065 associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein
1066 bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.214–222,
1067 2007.
1068
- 1069 MOURA, A.A., KOC, H., CHAMPMAN, D.A., KILLIAN, G.J. Identification of proteins in
1070 the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic
1071 approach. **Journal of Andrology**, v.27, p.201–211, 2006.
1072
- 1073 NAUC, V., MANJUNATH, P. Radioimmunoassay for bull seminal plasma proteins (BSP-
1074 A1/A2, BSP-A3, and BSP-30 kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and
1075 sperm. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1058-1066, 2000.
1076
- 1077 NEWTON, L.D., KASTELIC, J., WONG, B., VAN DER HOORN, F., THANDANTHIL, J.
1078 Elevated testicular temperature modulates expression patterns of sperm proteins in Holstein
1079 bulls. **Molecular and Reproduction Development**, v.76, p.109-118, 2009.
1080
- 1081 NIKOLAEVA, M.A., BALYASNIKOVA, I.V., ALEXINSKAYA, M.A., METZGER, R.;
1082 FRANKE, F.E., ALBRECHT, R.F., KULAKOV, V.I., SUKHIKH, G.T., DANILOV, S.M.
1083 Testicular isoform of angiotensin I-converting enzyme (ACE, CD143) on the surface of
1084 human spermatozoa: revelation and quantification using monoclonal antibodies. **American
1085 Journal of Reproduction and Immunology**, v.55, p.54–68, 2006.
1086
- 1087 PARENT, S., LEFIÈVRE, L., BRINDLE, Y., SULLIVAN, R. Bull subfertility is associated
1088 with low levels of a sperm membrane antigen. **Molecular Reproduction and Development**,
1089 v.52, p.57-65, 1999.
1090
- 1091 PEKNICOVA, J., PEXIDROVA, M., KUBATOVA, A., KOUBEK, P., TEPLA, O.,
1092 SULIMENKO, T., DRABER, P. Expression of beta-tubulin epitope in human sperm with
1093 pathological spermogram. **Fertility and Sterility**, v.88, p.1120-1128, 2007.
1094
- 1095 SABEUR, K., VO, A.T., BALL, B.A. Characterization of angiotensin-converting enzyme in
1096 canine testis. **Reproduction**, v.122, p.139-46, 2001.

- 1097 SHIBAHARA, H., KAMATA, M., HU, J., NAKAGAWA, H., OBARA, H., KONDOH, N.,
1098 SHIMA, H. SATO, I. Activity of testis angiotensin converting enzyme (ACE) in ejaculated
1099 human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.24, p.295- 299. 2001.
1100
- 1101 SIEMS, W.-E., HEDER, G., HILSE, H., BAEGER, I., ENGEL, S., JENTZSCH, K.D.
1102 Angiotensin-converting enzyme and other peptidolytic enzymes in human semen and
1103 relations to its spermatologic parameters. **Andrologia**, v. 23, p. 185-189, 1991.
1104
- 1105 SINGH, U.S., KUMAR, M.V., PANDA, I.N. Angiotensin converting enzyme in semen and
1106 its possible role in capacitation. **Andrologia**, v. 17, p. 472–475, 1985.
1107
- 1108 THUNDATHIL, J.C., ANZAR, M., BUHR, M.M. Na⁺/K⁺ATPase as a signaling molecule
1109 during bovine sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.75, p.308– 317, 2006.
1110
- 1111 WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
1112 **Reproduction Science**. v. 60, p 481-492, 2000.
1113
- 1114 WESTFALEWICZ, B., DIETRICH, M.A., CIERESZKO, A. Impact of cryopreservation on
1115 bull (*Bos taurus*) semen proteome. **J. Anim. Sci.**, p. 5240-5253, 2015.
1116
- 1117 YOON, S.J., RAHMAN, M.S., KWON, W.S., RYU, D.Y., PARK, Y.J, PANG, M.G.
1118 Proteomic identification of cryostress in epididymal spermatozoa. **Journal of Animal**
1119 **Science and Biotechnology**, v. 7, p. 12, 2016.
1120
- 1121 YOTSUMOTO, H., SATO, S., SHIBUYA, M. Localization of angiotensin converting
1122 enzyme (dipeptidyl carboxypeptidase) in swine sperm by immunofluorescence. **Life Science**,
1123 v.35, p.1257–1261, 1984.