

INCUBAÇÃO DE LECTINAS VEGETAIS COM ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

**KAEFER, Cristian¹; KOMNINOU, Eliza Rossi¹; CAMPOS, Vinicius Farias¹;
CAVADA, Benildo Sousa²; COLLARES, Tiago¹**

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas - cristiankaefer@gmail.com; collares.t@gmail.com

²Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará - bscavada@ufc.br

1. INTRODUÇÃO

Os espermatozoides de mamíferos possuem um glicocálice que representa a interface entre o gameta masculino e o ambiente extracelular (SCHRÖTER et al. 1999). O glicocálice atua como um componente funcional essencial do espermatozoide, e está envolvido nos passos fundamentais da biologia reprodutiva, como o transporte do espermatozoide pelo oviduto, capacitação, reação acrossômica e adesão à zona pelúcida (DIEKMAN, 2003). A superfície dessas células é composta por diferentes domínios funcionais, refletindo uma distribuição espacial distinta e regulável dos glicoconjugados (GADELLA, 2001). Devido à extrema complexidade, pouco é conhecido sobre a estrutura e função do glicocálice em espermatozoides (DIEKMAN, 2003).

As lectinas são proteínas que se ligam de forma específica a resíduos de carboidratos e são, então, ferramentas úteis para a análise da expressão, distribuição e alteração de glicoconjugados de membrana (SHARON, 2003). Estudos de microscopia de fluorescência utilizando lectinas têm sido realizados em espermatozoides de diversas espécies animais, demonstrando que a distribuição dos sítios ligantes de lectinas é restrita a certas regiões do espermatozoide (JIMÉNEZ, 2003).

Entre as lectinas de plantas mais estudadas estão as da família Leguminosae, principalmente aquelas isoladas de sementes de *Canavalia* sp. Observa-se que as lectinas dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos (CAVADA et al., 2001). A Concanavalina A (ConA), lectina proveniente das sementes de *Canavalia ensiformis* (subtribo Diocleinae), tem sido muito estudada e caracterizada quanto a sua estrutura e efeitos biológicos sobre células de mamíferos. Entretanto, outras lectinas, com similaridade estrutural em relação à ConA, têm sido isoladas das sementes de outras espécies da subtribo Diocleinae e carecem de maiores estudos. Entre estas se destacam a ConBr, extraída da semente de *C. brasiliensis* (MOREIRA, CAVADA, 1984); e a ConBol, extraída da semente de *C. boliviana* (MOURA et. al, 2009).

O presente estudo tem por objetivo investigar o padrão de ligação das lectinas Con A, Con Br e Con Bol à espermatozoides de bovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No estudo, foram utilizadas as lectinas ConA (extraída de *Canavalia ensiformis*), ConBr (extraída de *C. brasiliensis*) e ConBol (extraída de *C. boliviana*)

marcadas com o corante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC). Estas lectinas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas da Universidade Federal do Ceará, de acordo com suas respectivas referências de purificação (MOREIRA, CAVADA, 1984; MOURA, et al., 2009).

Sêmen de 3 diferentes touros foi descongelado a 36°C por 60 segundos. As amostras foram centrifugadas em 2mL de PBS por a 60g por 5min, o sobrenadante foi desprezado e o processo foi repetido. A concentração espermática de cada amostra foi ajustada para 2×10^6 céls/mL. Cada amostra de sêmen foi dividida em 4 alíquotas de mesmo volume. Os espermatozóides foram então incubados com 10 µg/ml de lectina diluída em PBS a 36°C por 3 minutos. Além dos grupos com as lectinas, foi incluído um grupo controle contendo apenas os espermatozóides e o marcador FITC, sem lectina. A fim de remover as lectinas não ligadas às células, duas centrifugações com PBS foram realizadas por 5min a 60g.

O padrão de ligação das lectinas aos espermatozóides bovinos foram analisadas em microscopia de fluorescência (Olympus IX 51 - Japão; excitação 460 a 570 nm e emissão 460-610 nm).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espermatozóides reagiram com todas as lectinas, porém a intensidade e a distribuição das reações foram diferentes. As amostras do grupo controle não apresentaram fluorescência, demonstrando que o corante FITC não possui afinidade específica aos espermatozóides.

A lectina ConA ligou-se à maior parte do espermatozóide, com exceção à porção do segmento equatorial (Figura 1). Em muitos espermatozóides esta lectina demonstrou uma maior intensidade de fluorescência na região do acrossoma espermático. Segundo trabalho realizado por KURODA et al. (1998), a lectina ConA somente liga-se à região acrossomal de espermatozóides que sofreram uma perda completa da membrana plasmática que recobre o acrossoma.

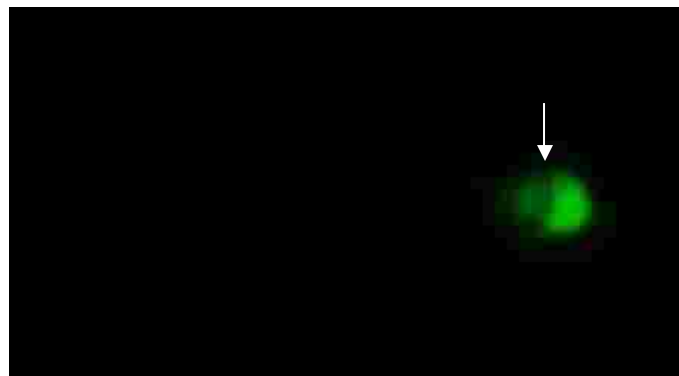


Figura 1 – Microscopia de fluorescência de espermatozóide bovino marcado com ConA. Maior intensidade de fluorescência na região acrossômica do espermatozóide, demonstrando forte ligação da ConA nesta região. Seta evidenciando o segmento equatorial.

A lectina ConBol ligou-se em todo espermatozóide, possuindo uma intensidade de fluorescência maior na região da cabeça do espermatozóide.

Alguns espermatozoides não apresentaram fluorescência na porção acrossômica da cabeça do espermatozóide (Figura 2).

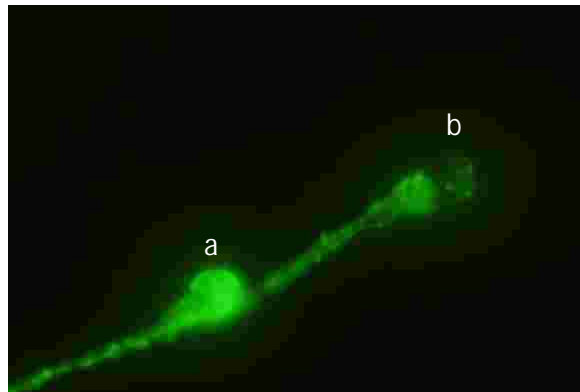


Figura 2 – Microscopia de fluorescência de espermatozóide bovino marcado com a lectina ConBol. (a) espermatozóide apresentando forte fluorescência na região acrossomal; (b) espermatozóide não apresentando fluorescência na região do acrossoma.

A lectina ConBr também apresentou maior afinidade pela porção da cabeça do espermatozóide. Entretanto, diferentemente das outras lectinas a ConBr ligou-se de maneira mais fragmentada à porção da cabeça dos espermatozoides. Esta lectina também apresentou uma fraca fluorescência na peça intermediária e cauda espermática (Figura 3).

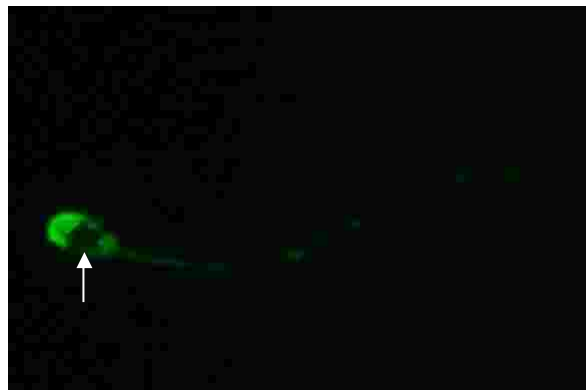


Figura 3 – Microscopia de fluorescência de espermatozóide bovino marcado com a lectina ConBr. Seta evidenciando ligação fragmentada da lectina à cabeça do espermatozóide.

4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou os perfis de ligação das lectinas ConA, ConBol e ConBr à espermatozoides bovinos. As lectinas ConA e ConBol mostraram desempenhos semelhantes, ligando-se principalmente à região acrossomal, enquanto que a Con Br demonstrou uma ligação fragmentada à cabeça dos espermatozoides. Novos experimentos serão realizados para elucidar a diferença no perfil de ligação das lectinas e se essas possuem capacidade de provocar reação acrossômica e capacitação espermática.

Visto que o glicocálice espermático possui um papel chave na fertilização, o conhecimento do padrão de ligação de lectinas à oligossacarídeos de espermatozoides de bovinos pode fornecer informações úteis sobre a biologia reprodutiva dessa espécie. A ligação de lectinas pode ser uma ferramenta útil para examinar a habilidade dos espermatozoides de sofrer capacitação e a reação acrossômica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DIEKMAN, A.B. Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, p.298–308, 2003.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARAL-NETO, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v.2, p.1–13, 2001.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.1–17, 2001.

JIMÉNEZ, I.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H.; ORTIZ, R.; HERRERA, J.A.; GARCÍA, A.; BETANCOURT, M.; FIERRO, R. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.59, p.1171-1180, 2003.

KURODA, Y.; KANEKO, S.; ODA, T.; YOSHIMURA, Y.; NOZAWA, S. Quantitative assessment of human sperm acrosome reaction by using fluorescein isothiocyanate conjugated concanavalin A – comparison between highly purified acrosome reacted with non-acrosome reacted sperm. **Archives of Andrology**, v.40, p.215-224, 1998.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behaviour during germination. **Biol. Plant.**, 26, 113-120. 1984

MOURA, T.R.; BEZERRA, G.A.; BEZERRA, M.J.; TEIXERA, C.S.; BEZERRA, E.H.; BENEVIDES, R.G.; DA ROCHA, B.A.; DE SOUZA, L.A.; DELATORRE, P.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia boliviana* Piper seeds. **Acta Crystallographica**, v.65, n.3, p. 213-215, 2009.

SCHRÖTER, S.; OSTERHOFF, C.; MCARDLE, W.; IVELL, R. The glycocalyx of sperm surface. **Human Reproduction Update**, v.5, p.302-313, 1999.

SHARON, L.N. Applications. In: SHARON, L.N. **Lectins**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. Cap. 6, p. 261–311.