

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM  
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA INTEGRADAS À MEDICINA VETERINÁRIA  
PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL

JULIANA CARLA CAVALCANTI MARQUES

**Associação entre a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e a fertilidade de amostras seminais  
descongeladas de touros Angus**

VIÇOSA-AL

2019

JULIANA CARLA CAVALCANTI MARQUES

**Associação entre a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase e a fertilidade de amostras seminais descongeladas de touros Angus**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Inovação e Tecnologia Integradas à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara

Viçosa-AL

2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Polo Viçosa**  
Bibliotecária Responsável: Edvânia C. S. Gonçalves

M357a     Marques, Juliana Carla Cavalcanti

Associação entre a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase e a fertilidade de amostras  
seminais descongeladas de touros Angus/Juliana Carla Cavalcanti  
Marques – 2019.

61 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade  
Federal de Alagoas, CECA, Pólo Viçosa, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara

Inclui bibliografia

1. Fertilização animal 2. Bovinos 3. Reprodução I. Título

CDU:636.082.454

Folha de Aprovação

AUTÓRA: JULIANA CARLA CAVALCANTI MARQUES

(Associação entre a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase e a fertilidade de amostras seminais descongeladas de touros Angus/Dissertação de mestrado em Inovação e Tecnologia Integradas à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional, da Universidade Federal de Alagoas)

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Inovação e Tecnologia Integradas à Medicina Veterinária para o Desenvolvimento Regional da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 26 de julho de 2019.

*Diogo Ribeiro Câmara*

Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara, Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

Banca Examinadora:

*Sildivane Valcácia Silva*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sildivane Valcácia Silva - UFPB

*Gilden Maria Nascimento de Aguiar*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilden Maria Nascimento de Aguiar - UFAL

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar, mostrando que seus planos são muito maiores, e que sim, são possíveis.

A minha família, pela compreensão, tolerância, incentivo e respeito. Agradeço especialmente a meu noivo Edson, que tem suportado todas as inseguranças, compartilhando conselhos, trazendo ânimo e alegria, fundamentais ao longo do caminho.

Aos amigos que se fizeram presentes ao longo desta jornada compartilhando momentos de alegria e dividindo o peso dos momentos de dificuldade, aconselhando, apoiando e estimulando, sempre em prol do meu crescimento.

Agradeço a nossa pequena-grande equipe, especialmente Allan e Agnelo que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa, e mesmo em meio as atribuições diárias não mediram esforços, oferecendo ajuda, deixando tudo muito mais leve.

Aos professores e técnicos da UFAL (unidade Viçosa e LBC) e do ANDROLAB pelas valiosas lições compartilhadas, por todo carinho, paciência e colaboração.

A Alta Genetics pela parceria e confiança no fornecimento das doses seminais, produtos de grande valia e imprescindíveis a nossa pesquisa; e a FAPEAL pelo incentivo financeiro fundamental ao desenvolvimento do projeto.

Agradeço especialmente a meu orientador, Prof. Diogo Ribeiro Câmara, por todo o zelo, disponibilidade e confiança; por não medir palavras quando necessário e pelo reconhecimento quando merecido. Agradeço por cada oportunidade de aprendizado e convivência, por todos os aconselhamentos, por ter novamente a chance de trabalhar com este profissional ímpar.

## RESUMO

Na atualidade, um dos desafios da reprodução bovina é identificar de maneira eficiente touros que apresentam elevada fertilidade, uma vez que a avaliação andrológica tradicional pode não diferenciar de forma precisa o potencial fertilizante de um reprodutor, levando a redução nas taxas de prenhez e prejuízos financeiros. Desta maneira, a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase tem sido um biomarcador potencial da fertilidade, devido as suas atribuições específicas na célula espermática e relatos de correlação com a fertilidade de touros Holandeses. No entanto, devido a peculiaridades de manejo reprodutivo da pecuária brasileira de corte e pela ausência de pesquisas envolvendo a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em bovinos com esta aptidão, o presente estudo foi desenvolvido a fim de determinar a associação entre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em espermatozoides descongelados de touros Angus classificados como de fertilidade superior (FS) e normal (FN) após inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas três diferentes partidas de amostras comerciais de touros de FS (n=4) e FN (n=4). Realizou-se a avaliação da cinemática através do sistema CASA, da viabilidade espermática através da microscopia de fluorescência e da expressão de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase através da citometria de fluxo, imediatamente após a descongelação (0h) e após 2h de incubação (37 °C), enquanto a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase foi determinada mensurando-se a liberação de fosfato inorgânico (iP) nas amostras tratadas ou não com inibidor específico (ouabaína,  $4 \times 10^{-4}$  M), sendo normalizada em função da proteína total de cada amostra. Dentro do mesmo tempo de incubação não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na viabilidade, cinemática e na expressão da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase entre touros FS e FN. Os parâmetros cinemáticos de LIN e VCL não foram influenciados pela incubação nas amostras de FS e FN, respectivamente. Houve uma tendência ( $P = 0,06$ ) de maior atividade enzimática da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em amostras de touros de FS. Em conclusão, diferenças na cinemática e viabilidade espermática não são detectadas entre touros Angus de FS e FN imediatamente após o descongelamento. Diferentes respostas nos parâmetros de velocidade pós-incubação são detectadas em touros de FS e FN que podem estar relacionadas a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, sem influência na sua expressão.

**Palavras-chave:** Bomba de sódio e potássio. Bovino. Espermatozoide.

## ABSTRACT

Currently, one of the challenges on bovine reproduction is to efficiently identify high fertility bulls, since traditional andrological evaluation may not precisely differ the fertilizing potential of a sire, leading to reduced pregnancy rates and economic losses. Therefore, the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase has been considered a potential fertility marker, due to its sperm specific properties and reports of correlation with Holstein bull fertility. However, specificities on reproductive management of Brazilian beef herds associated to the lack of information regarding  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in beef bulls, the present study was performed aiming to determine association between  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in thawed Angus bull sperm scored as being a high fertility (HF) or normal fertility (NF) after fixed time artificial insemination (FTAI). Samples from three different commercial batches of bulls of HF (n=4) or NF (n=4) were used. Sperm kinematics was evaluated with CASA system, sperm viability was assessed by fluorescent microscopy, and expression of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase on the sperm surface by flow cytometry, immediately post-thaw (0h) and after 2h of incubation (37 °C).  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was determined measuring the releasing of inorganic phosphate (iP) in the samples treated or not with a specific inhibitor (ouabain,  $4 \times 10^{-4}$  M), normalized by total protein of each sample. Within the same incubation time, there was no difference ( $P > 0.05$ ) on sperm viability, kinematic parameters, and the expression of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase between HF and NF bulls. Kinematic parameters of LIN and VCL were not influenced ( $P > 0.05$ ) by incubation time in samples from HF and NF, respectively. There was a tendency ( $P = 0.06$ ) of higher  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase enzymatic activity in HF bull samples. In conclusion, differences on kinematic and sperm viability are not detected between HF and NF Angus bulls immediately post-thaw. Different responses on velocity parameters post-incubation were detected in HF and NF bulls that might be related to  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity, without influence of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase expression.

**Keyword:** Sodium-potassium pump. Bovine. Sperm.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	amplitude de deslocamento lateral de cabeça
ATP	adenosina trifosfato
BCF	batimento cruzado flagelar
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
Ca <sup>+</sup>	cálcio
cM	centiMorgan
cm <sup>3</sup>	centímetro cúbico
DNA	ácido desoxirribonucleico
FSH	hormônio folículo-estimulante
GWAS	<i>genome-wide association study</i>
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O	água
K <sup>+</sup>	potássio
kDA	kilodalton
M	molar
mm <sup>3</sup>	milímetro cúbico
mL	mililitro
MP	motilidade progressiva
MT	motilidade total
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	sódio-potássio adenosina trifosfatase
Na <sup>+</sup>	sódio
LIN	linearidade
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
STR	retilinearidade
VAP	velocidade média do trajeto
VCL	velocidade curvilínea
VSL	velocidade em linha reta
WOB	índice de oscilação



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Parâmetros Seminais e Fertilidade em Touros.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Potenciais Marcadores de Fertilidade em Touros.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase na Reprodução do Macho.....</b>	<b>19</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>24</b>
<b>4 ARTIGO SUBMETIDO.....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um importante pilar da produção mundial de carne e o Brasil apresenta-se como principal exportador e detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo (ANUALPEC, 2017; GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017). No entanto, a fim de manter a alta competitividade no mercado, faz-se necessário elevada eficiência produtiva (OLIVEIRA FILHO, 2015).

Nesse sentido, a fertilidade é um aspecto altamente relevante (PEDDINTI et al., 2008), com impacto superior em cerca de cinco vezes, quando comparado ao desempenho de crescimento, e em cerca de dez vezes comparando-se a qualidade de produto (BARBOSA; MACHADO; BERGAMASCHI, 2005). Está diretamente relacionada a qualidade seminal (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001) e além disso, no sistema tradicional de produção de bovinos de corte, a fertilidade do macho recebe destaque em virtude da utilização de um único indivíduo para a monta natural de várias fêmeas, sendo essa importância ainda maior quando da potencialização do uso de um único reprodutor através da inseminação artificial (GADEA; SELLES; MARCO, 2004; KATHIRAVAN et al., 2011).

A inseminação artificial (IA) tem como vantagem a economia (já que é um dos métodos biotecnológicos menos dispendiosos) e a alta aplicabilidade, promovendo celeridade no ganho genético do rebanho (RODRIGUEZ-MARTINEZ; PEÑA VEGA, 2013). Desta forma, é fundamental que se selecione criteriosamente os reprodutores, visto que podem impactar positiva ou negativamente no futuro reprodutivo do rebanho (BALL; PETERS, 2006). Além disso, a utilização de touros de fertilidade questionável promove redução nas taxas de prenhez e aumento dos custos com manutenção dos touros e das fêmeas não prenhes (WALTON, 2012).

Neste sentido, um conjunto de análises é utilizado para designar a capacidade do macho bovino na reprodução (SANTOS; MARQUES; MELO, 2005), pois nenhuma delas é suficiente para determinar a fertilidade de um indivíduo quando utilizada separadamente. Entretanto, ao serem combinadas, proporcionam uma avaliação geral mais fidedigna (OLIVEIRA et al., 2013), recebendo a denominação de exame andrológico ou avaliação tradicional de fertilidade. Esta análise reprodutiva fundamenta-se no exame físico geral, que leva em consideração características como condição corpórea, idade e puberdade; no exame específico do sistema genital, através da averiguação de órgãos internos e externos, além de

aferições importantes como da circunferência escrotal; na avaliação do comportamento sexual dos indivíduos e especialmente da qualidade seminal, avaliando-se seus aspectos físicos, morfológicos e funcionais (MARTINS, 2002; SALVADOR et al., 2008; FONSECA, 2009; CBRA, 2013).

Apesar da boa aplicabilidade à campo, a avaliação tradicional apresenta limitações que culminam em prejuízos financeiros. A dificuldade na identificação de touros de fertilidade levemente reduzida é um dos principais entraves, que propiciam menores taxas de prenhez e conseqüentemente perdas econômicas consideráveis, desta forma estimula-se a busca por melhores métodos para introdução na rotina de diagnóstico andrológico (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004; HOSSAIN et al., 2011; THUNDATHIL; RAJAMANICKAM; KASTELIC, 2018).

Uma das sugestões mais recentes é a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, enzima presente em células eucariontes (BLANCO; MERCER, 1998; KAPLAN, 2002; LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; MORTH et al., 2007), que possui uma de suas subunidades ( $\alpha 4$ ) restrita ao trato reprodutor masculino, envolvendo-se em aspectos funcionais espermáticos e influenciando em características importantes para a fertilização (WOO; JAMES; LINGREL, 1999, 2000; JIMENEZ et al., 2010; JIMENEZ et al., 2011a; KONRAD et al., 2011; MCDERMOTT et al., 2012). Assim, a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, vem sendo considerada potencialmente preditiva para a fertilidade de touros, através de estudos com animais de aptidão leiteira (RAJAMANICKAM et al., 2017), entretanto ainda há a necessidade de avaliações em outras raças bovinas e diferentes condições de manejo reprodutivo. Por isso, objetivou-se através deste estudo determinar a associação entre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em espermatozoides descongelados de touros Angus, utilizados em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), e a sua fertilidade, contribuindo com dados científicos que auxiliem na determinação de marcadores capazes de prever com maior fidedignidade a fertilidade de touros de corte.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Parâmetros Seminais e Fertilidade em Touros

A partir de uma análise inicial no ejaculado, é possível identificar alterações seminais por meio de elementos físicos, macroscópicos e sensoriais, tais como volume, aspecto, coloração e odor. A aferição do volume é realizada em tubo graduado em mililitros (mL) e essa característica pode variar de acordo com o regime de serviço e o método de coleta, onde a maior aproximação aos valores fisiológicos é obtida através da vagina artificial, perfazendo normalmente de 5 a 8 mL (CBRA, 2013). No entanto, este parâmetro ainda pode sofrer uma variação fisiológica em função da idade do animal, uma vez que estudos evidenciam que o volume seminal tende a aumentar até aproximadamente sete anos de idade, mantendo-se estável até os dez anos, quando a partir de então passa a diminuir (TAYLOR et al., 1985; MATHEVON; BUHR; DEKKERS, 1998; ISMAYA, 2014; ARGIRIS et al., 2018).

No que diz respeito ao aspecto seminal, a classificação varia entre aquoso, opaco, leitoso e cremoso, possuindo relação direta com a concentração espermática. A coloração também pode fornecer informações relacionadas à presença de sangue (hemospermia), sujidades, urina (urospermia) ou ainda secreção purulenta (piospermia), sendo o ejaculado bovino considerado dentro da normalidade para esta característica ao apresentar-se esbranquiçado ou em tom amarelo-marfim. O odor é classificado como *suis generis* (CBRA, 2013).

Os demais parâmetros seminais podem ser visibilizados através da microscopia (BLOM, 1973; CBRA, 2013). A motilidade, característica imprescindível no deslocamento espermático ao longo do trato reprodutor da fêmea, é frequentemente empregada para evidenciar o potencial fértil dos touros através de uma análise subjetiva, com o sêmen entre lâmina e lamínula sob o aumento de 100 a 400× em microscopia óptica, podendo apresentar variações entre avaliadores de 30 a 60%, mesmo em casos de andrologistas com vasta experiência, o que evidencia que apesar de útil, a motilidade por si só não representa um parâmetro confiável na determinação da fertilidade de um animal (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; FOOTE, 2003; SUNDARARAMAN; KALATHARAN; THILAK PON JAWAHAR, 2012; SILVA; NOGUEIRA; SILVA, 2017). Na tentativa de suprir os prejuízos do caráter subjetivo da avaliação humana, tem-se

feito uso do sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), uma análise computadorizada que fornece dados com objetividade e reprodutibilidade superior (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; SUNDARARAMAN; KALATHARAN; THILAK PON JAWAHAR, 2012), aumentando a produtividade, facilitando a comercialização de doses e o descarte de sêmen fora dos padrões (AMANN; WABERSKI, 2014).

Em geral, o CASA é composto por uma câmera de vídeo interligada a microscópio e computador, contendo software específico. Este conjunto permite a captura e digitalização de imagens sequenciadas das células espermáticas (AMANN; KATZ, 2004), com posterior análise de diversas propriedades cinemáticas, além da concentração e morfologia (DAVIS; KATZ, 1993; CONTRI et al., 2010; AMANN; WABERSKI, 2014). No que diz respeito aos padrões móveis, pode-se avaliar desde parâmetros mais básicos como motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), até características mais detalhadas tais como velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do trajeto (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), índice de oscilação (WOB), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) e batimento cruzado flagelar (BCF) (KATHIRAVAN et al., 2011). Apesar deste método ser mais eficaz na avaliação dos parâmetros móveis das células espermáticas, não modifica o fato da característica “motilidade” possuir grande variabilidade biológica e apresentar baixa correlação com a fertilidade em alguns estudos (SÁNCHEZ-PARTIDA et al., 1999; BROEKHUIJSE et al., 2012), enquanto em outros demonstra-se claramente correlacionada (ALLOUCHE et al., 2017).

A morfologia espermática possui uma relação mais estreita com a fertilidade (KASTELIC; THUNDATHIL, 2008; MENON et al., 2011), mesmo sendo comumente analisada em esfregaços corados ou câmara úmida, demandando alta capacidade técnica do analista (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2011). Menon et al. (2011), visando confirmar anormalidades morfológicas avaliadas por veterinários a campo, realizaram análises comparativas com os resultados previamente obtidos, evidenciando concordância média de 92%. Na grande maioria dos casos em que os resultados não corroboraram, os autores sugeriram que houve interferência de fatores como a inferior qualidade de equipamentos utilizados a campo, além da divergência de conhecimento e experiência. No quesito equipamento, o microscópio de contraste de fase torna-se importante, visto que muitos dos veterinários não

conseguiram identificar alterações como vacúolos nucleares, defeitos acrossomais e condensação anormal de DNA. Ainda assim foi possível determinar que os dados obtidos a campo possuem confiabilidade, servindo para embasar análises com fins clínicos e de pesquisa, além de auxiliar na determinação da precocidade sexual dos animais. De modo geral, são estabelecidos como padrões mínimos  $\geq 70\%$  de espermatozoides morfolologicamente normais e  $\leq 20\%$  de espermatozoides com alterações na região da cabeça (BARTH; OKO, 1989; FRENEAU, 2011).

A concentração espermática é um outro parâmetro inserido na avaliação tradicional, configurando o número de espermatozoides por milímetro cúbico ( $\text{mm}^3$ ), centímetro cúbico ( $\text{cm}^3$ ) ou mL. É uma medida passível de modificação em função de muitas variáveis tais como: método e frequência de coleta seminal, idade e higidez do animal, além do aspecto testicular (CBRA, 2013). Sua determinação pode ser obtida utilizando-se câmara de Neubauer, configurando-se uma análise com caráter de subjetividade, ou pode ser adquirida ainda em análises computadorizadas e espectrofotometria (ARRUDA et al., 2011; CBRA, 2013).

Durante a análise do sêmen fresco, pode-se também verificar o turbilhonamento ou movimento de massa, que é a força de movimentação das células decorrente de um conjunto de características (concentração, motilidade e vigor espermático). É observado sob lâmina e lamínula em microscopia óptica em aumento de  $100\times$ , com sua classificação variando entre zero (ausência de turbilhonamento) e cinco (intensidade máxima do movimento), sendo considerado fisiológico na espécie bovina valores  $\geq 3$  (CBRA, 2013; SILVA, NOGUEIRA; SILVA, 2017).

A homeostase celular depende da integridade da membrana plasmática, que delimita os meios intra e extracelulares (AMANN; PICKET, 1987). Desta forma, a avaliação tradicional engloba também tal característica, que apresenta-se como um importante parâmetro complementar na predição da fertilidade bovina. O teste detecta membranas plasmáticas intactas baseando-se na resposta das células à inserção em meio hiposmótico, que permite o influxo de água com consequente alteração estrutural e curvatura flagelar (REVELL; MRODE, 1994; BACINOGLU et al., 2008). É fundamental que seja utilizado especialmente em amostras criopreservadas, uma vez que este processo torna a membrana passível de maiores alterações na permeabilidade seletiva e, conseqüentemente, à ocorrência de áreas lesionadas (AMANN; GRAHAM, 1993). Sondas fluorescentes também podem ser

utilizadas para avaliação da integridade de membrana, neste caso diferenciando plasmática, acrossomal e mitocondrial (ARRUDA; CELEGHINI, 2003; CELEGHINI, 2005). A relação da integridade de membrana com a fertilidade é comprovada e supostamente está também interligada à capacidade de ligação à zona pelúcida (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; PUGLISI et al., 2010).

Apesar de todas estas aplicabilidades demonstradas por meio da avaliação tradicional da fertilidade, existem limitações que estimulam a busca por melhores métodos para introdução na rotina de diagnóstico andrológico. Uma delas é a capacidade limitada em avaliar apenas pequena quantidade de células espermáticas (em geral centenas), e neste sentido a citometria de fluxo tem ganhado espaço, aumentando gradualmente sua utilização (HOSSAIN et al., 2011; PEÑA, 2015). Isto se deve a superioridade na representação numérica das amostras, visto que torna-se possível a análise de milhares de espermatozoides em segundos (PEÑA, 2015). Além disso, promove a potencialização no uso dos fluorocromos, obtendo uma análise em ampla escala e mais completa a nível bioquímico, estrutural e funcional, determinando a existência de populações heterogêneas, por sua capacidade de distinguí-las, fornecendo assim dados individualizados (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005).

Vale ressaltar que as análises clássicas permitem identificar alterações espermáticas mais acentuadas, excluindo com facilidade os touros inférteis, enquanto os animais que apresentam o potencial fértil levemente reduzido são frequentemente classificados com padrões seminais normais e aprovados como detentores de fertilidade satisfatória (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004). Em testes *in vivo*, estima-se que ocorra uma variação de aproximadamente 20% na fertilidade de touros selecionados através da avaliação tradicional o que configura perdas econômicas consideráveis para produção nacional (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004; THUNDATHIL; RAJAMANICKAM; KASTELIC, 2018). Assim sugere-se que estas diferenças podem estar envolvidas com outros fatores, ainda não bem definidos, o que torna necessária a busca de novos marcadores, a fim de complementar as análises tradicionais e inferir com maior precisão a fertilidade destes animais (BYRNE et al., 2012; KAYA; MEMILLI, 2016; MORRELL et al., 2017).

## 2.2 Potenciais Marcadores de Fertilidade em Touros

Com a acurácia dos testes usuais de fertilidade sendo alvo de frequentes questionamentos, a busca por melhores fatores preditivos na avaliação reprodutiva de machos torna-se imprescindível, e é com este objetivo que diversas pesquisas têm sido realizadas, evidenciando possíveis marcadores para seleção mais efetiva de touros (JOBIM; GREGORY; MATTOS, 2009; CHACUR, 2012; GANGULY et al., 2013; KUMAR et al., 2014; KUMAR et al., 2015a,b). Dentre esses estudos, as análises bioquímicas tem demonstrando sua potencialidade (JOBIM; GREGORY; MATTOS, 2009), destacando elementos como as proteínas, que mostram-se relacionadas positiva ou negativamente com o estado reprodutivo masculino (RONCOLETTA et al., 2006; MOURA et al., 2006; MUHAMMAD et al., 2014).

De modo geral, funções essenciais aos espermatozoides, como nutrição e proteção são viabilizadas por constituintes orgânicos e inorgânicos presentes no plasma seminal (KUTTY et al., 2014). As proteínas plasmáticas são os elementos que apresentam-se em maior concentração neste meio, envolvendo-se nos processos de capacitação e fertilização (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1998; JELÍNKOVÁ et al., 2003), despertando assim o interesse e questionamentos quanto ao seu papel potencial na determinação da fertilidade, e estimulando pesquisas com resultados positivos para bovinos de leite (KILLIAN; CHAPMAN.; ROGOWSKI, 1993; CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1997) e de corte (BELLIN; HAWKINS; AX, 1994; BELLIN et al., 1996; PARENT et al., 1999).

Abordagens iniciais realizadas por Killian; Chapman; Rogowski (1993) permitiram a determinação de quatro proteínas com possibilidade de associação à fertilidade no plasma seminal de touros da raça Holandesa. Os polipeptídeos detectados de acordo com o peso molecular foram observados com 26 kDa e 55 kDa localizando-se em maiores quantidades nas amostras de touros de maior fertilidade, enquanto os dois tipos proteicos com 16 kDa, apresentavam-se proeminentes em touros considerados menos férteis. Um destes polipeptídeos foi posteriormente determinado como osteopontina (CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1997). Por sua vez, Moura et al. (2006) utilizando abordagem proteômica no fluido seminal de touros com fertilidade pré-determinada e pertencentes a mesma raça, fizeram o reconhecimento de cerca de 52 caracteres proteicos, nenhum deles com seletividade para qualquer categoria de fertilidade, no entanto com a existência de



correlação entre a intensidade de expressão de quatro das proteínas identificadas e os grupos animais, sendo elas a osteopontina, fosfolipase A<sub>2</sub> e duas isoformas de espermedesina.

A osteopontina é uma glicoproteína de caráter ácido, primeiramente identificada na matriz óssea mineralizada da espécie bovina (FRANZEN; HEINEGARD, 1985). É abundante em ácido aspártico, ácido glutâmico e serina (SORENSEN; PETERSEN, 1994) e está presente em diversas espécies, relacionando-se a processos essenciais tais como adesão, estimulação e sobrevivência celular, remodelação tecidual, quimiotaxia, organização do citoesqueleto e sinalização (CRIVELLO; DELVIN, 1992; DENHARDT et al., 1995; HOYER; OTVOS; URGE, 1995; LIAW et al., 1998; DENHARDT; GIACHELLI; RITTLING, 2001; LESSEY, 2002; MAZZALI et al., 2002).

No trato reprodutivo de touros, além da sua localização no plasma seminal, é principalmente detectada nas glândulas vesiculares e ampulares, onde sua expressão gênica também ocorre no tecido epitelial, concomitante à expressão em células germinativas do túbulo seminífero (CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1999; RODRIGUEZ; DAY; KILLIAN, 2000). Acredita-se que a osteopontina estabelece interação com as células espermáticas no momento da ejaculação (MANJUNATH et al., 1994), no entanto Erikson et al. (2007) através de análises em Western Blot conseguiram reconhecer uma variação da osteopontina com peso molecular de 35 kDa em espermatozoides da cauda do epidídimo. No mesmo estudo foi possível verificar por meio da imunofluorescência que esta proteína pode situar-se na região pós-acrossomal da cabeça espermática, bem como na peça intermediária. De modo geral, a osteopontina de 55 kDa é encontrada com cerca de 2,5 vezes maior concentração no plasma seminal de touros Holandeses de fertilidade superior, em comparação a touros de baixa fertilidade (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993; CANCEL; CHAPMAN; KILLIAN, 1997). Contudo, existem relatos de concentrações mais elevadas, em torno de quatro vezes para os touros de maiores escores, evidenciando que esta correlação com a fertilidade pode ser ainda mais forte (MOURA et al., 2006).

A fosfolipase A<sub>2</sub> é uma família de proteínas que também promove atuação em diversos aspectos biológicos, como em processos inflamatórios, defesa celular e remodelação lipídica, sendo capaz de remover de forma específica o ácido graxo na posição sn-2 da molécula de fosfolípidos (CHAMINADE et al., 1999; SCHALOSKE;

DENNIS, 2006; LAMBEAU; GELB, 2008). Apesar de apresentar como principal característica sua atividade enzimática, as fosfolipases A2 subdividem-se em dois agrupamentos de acordo com a massa molecular (DENNIS, 1994; SCOTT; SIGLER, 1994). Englobando proteínas que variam entre 14 e 20 kDa, o grupo de baixa massa molecular é encontrado em secreções e no citoplasma de várias células (DENNIS, 1994; SCOTT; SIGLER, 1994; CHEN et al., 1994), dentre elas o espermatozoide e o plasma seminal de mamíferos (RONKKO, 1992), bem como células epididimárias, das vesículas seminais, do ducto deferente e próstata de camundongos (MASUDA et al., 2004).

Há indicações de que sua atuação é relacionada à fertilização e a modificações no sistema reprodutivo da espécie bovina (ao longo do seu amadurecimento), e esta identificação de fosfolipase A2 em grandes quantidades no trato genital masculino sugere sua grande importância no aspecto da fertilidade, onde se evidencia que a expressão deste tipo proteico ocorre em níveis mais elevados em touros considerados mais férteis (RONKKO, 1992; MASUDA et al., 2004; MOURA et al., 2006; ROLDAN; SHI, 2007).

Por sua vez, as espermadesinas compõem um grupo de glicoproteínas com peso molecular entre 12 e 16 KDa (CABALLERO et al., 2008), que participam do processo de ligação a zona pelúcida, atuando na interação entre oócito e espermatozoide (MELO; TEIXEIRA; HAVT, 2008); além disso recobrem as células espermáticas, comportando-se como fatores decapacitantes (JANSEN; EKHLASI-HUNDRIESER; TÖPFER-PETERSEN, 2001; DACHEUX et al., 2005).

No fluido seminal de touros da raça Brahman, é o segundo maior grupo de proteínas (RÊGO et al., 2014). Apesar disso, Moura et al. (2006) comparando diferentes status de fertilidade em touros Holandeses, constataram que a espermadesina (isoforma z13, 14 kDa) apresenta correlação negativa com este parâmetro. Assim os touros mais férteis, apresentam menor expressão do grupo proteico no plasma seminal, o que é coerente com os relatos de Killian; Chapman; Rogowski (1993) a respeito do caráter antifertilidade com baixo peso molecular localizado no mesmo meio biológico.

Outras proteínas presentes no plasma seminal e na própria célula espermática são relatadas com associação a fertilidade de touros, como por exemplo protamina 1 (DOGAN et al., 2015), enolase 1, alfa-2-Glicoproteína-HS e glutatona peroxidase (PARK et al., 2012) que apresentam correlação positiva,

enquanto as proteínas do plasma seminal bovino (*bovine seminal plasma proteins*, BSPs) e ropporina 1 (RONCOLETTA et al., 2006; PARK et al., 2012) associam-se negativamente com este parâmetro.

Um outro viés que vem mostrando-se de grande valia na predição do status reprodutivo bovino é a utilização de marcadores genéticos, que possibilitam a seleção precoce de touros, evitando custos na criação de machos futuramente não aprovados pela avaliação andrológica. No entanto, para o bom funcionamento deste método é necessário a identificação de marcadores moleculares que possuam associação efetiva com a qualidade seminal (GANGULY et al., 2013; KUMAR et al., 2014; KUMAR et al., 2015a,b), em geral genes relacionados a codificação de hormônios reprodutivos ou cuja funcionalidade esteja atrelada diretamente a fertilidade (FORTES et al., 2013).

Diversos polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) têm sido associados com traços de fertilidade, bem como ao desenvolvimento de blastocistos *in vitro* (WANG et al., 2009; KHATIB et al., 2009a; KHATIB et al., 2009b; COCHRAN et al., 2013). Além disso, quando comparada a testes convencionais, a seleção genômica de touros pode promover outros benefícios, como a redução de intervalo entre gerações (GILBERT et al., 2007). Porém, considera-se pequena a quantidade de pesquisas para genes candidatos a demarcação da fertilidade masculina, mesmo com a tamanha contribuição do macho no sistema produtivo (FORDYCE et al., 2002; HOLROYD et al., 2002; MCGOWAN et al., 2002; FORDYCE et al., 2006; FORTES et al., 2013).

Ainda assim, regiões específicas de cromossomos já foram identificadas com associação a caracteres reprodutivos em touros, como a idade estimada da puberdade, peso e volume testicular, relacionando-se ao cromossomo 29, e os níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) ao cromossomo 5, na posição 70cM (CASAS; LUNSTRA; STONE, 2004). SNPs também foram correlacionados a puberdade e fertilidade em animais da raça Brahman, nos cromossomos X e 14 (FORTES et al., 2012a, b), enquanto taxas de concepção de touros holandeses associaram-se a regiões nos cromossomos 2, 5, 18, 25 e 29 através de análises em associação genômica ampla (*genome-wide association study*, GWAS) (PENAGARICANO; WEIGEL; KHATIB, 2012).

Um outro elemento que vem sendo estudado em função da fertilidade bovina é a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e uma análise mais aprofundada da sua relação com características espermáticas é apresentada abaixo.

### **2.3 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase na Reprodução do Macho**

A  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, também conhecida como bomba de sódio e potássio, é uma enzima presente na membrana plasmática da maior parte das células eucariontes, capaz de regular o gradiente iônico intracelular através do transporte ativo, com permuta de três  $\text{Na}^+$  citoplasmáticos por dois  $\text{K}^+$  extracelulares, após fosforilação (BLANCO; MERCER, 1998; KAPLAN, 2002). Como proteína integral de membrana, possui ação sobre o equilíbrio osmótico e demais processos essenciais para a homeostase celular, como a manutenção da estabilidade de membrana, regulação do pH e volume intracelular, além do transporte secundário de outros componentes, como  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , glicose, aminoácidos e neurotransmissores (SKOU, 1990; SKOU; ESMANN, 1992; LINGREL et al., 2003; BLANCO, 2005; BARTOLAMI et al., 2011). Recebe também a classificação de heterodímera, por possuir sua constituição principal baseada em dois polipeptídeos denominados de subunidades  $\alpha$  (de caráter catalítico) e  $\beta$  (glicosilada) (LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; BLANCO; MERCER, 1998; MORTH et al., 2007).

A subunidade  $\alpha$  mostra-se essencial no processo de troca iônica e no papel hidrolítico desempenhado pela enzima (JORGENSEN; HAKANSSON; KARLISH, 2003). Seu peso molecular aproximado é de 112 kDa, com distribuição em dez segmentos de membrana e apresentação em quatro variações já identificadas em mamíferos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ ). Além disso, é a subunidade que detém receptores para cátions, ATP e glicosídeos cardíacos, como a ouabaína e a digoxina (ROSE; VALDES, 1994; BLANCO; MERCER, 1998; JORGENSEN; HAKANSSON; KARLISH, 2003; LINGREL et al., 2003; HAVIV; KARLISH, 2013). Com uma função inibitória altamente específica sobre a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, a ouabaína se liga aos sítios na subunidade  $\alpha$ , incitando vias sinalizatórias capazes de promover correções funcionais em diversas células (BLANCO; MERCER, 1998).

Por sua vez, a subunidade  $\beta$  é a responsável por realizar a estabilização proteica na membrana plasmática, sendo assim imprescindível para o bom desempenho da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Seu peso molecular é estimado em 35 kDa e

apresenta-se como único segmento de membrana (GEERING, 2001; HAVIV; KARLISH, 2013), possuindo três variações já identificadas ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$ ) (BLANCO; MERCER, 1998).

Existe ainda o polipeptídeo  $\gamma$ , pertencente à família FXYD, uma classe de proteínas caracterizadas como acessórias, que estabelece interações com a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (BEGUIN et al., 1997; PAVLOVIC; FULLER; SHATTOCK, 2013). Este polipeptídeo participa da regulação funcional da bomba e pode ainda interferir com a sua afinidade por cátions em determinados tecidos (BEGUIN et al., 1997; ARYSTARKHOVA et al., 1999; DIETZE et al., 2013). É uma proteína pequena, de apenas 7 kDa e de caráter hidrofóbico (FORBUSH; KAPLAN; HOFFMAN, 1978).

Ao se tratar da expressão das diferentes subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , encontram-se variações relacionadas a tipos celulares. Por exemplo,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  podem ser encontradas em células somáticas (BLANCO; MERCER, 1998; MOBASHERI et al., 2000), com  $\alpha 1$  considerada onipresente, enquanto  $\alpha 2$  é sobretudo expressa em tecido cerebral, cardíaco e musculo-esquelético, e  $\alpha 3$  em tecido cerebral e ovariano (BLANCO; MERCER, 1998; WOO; JAMES; LINGREL, 2000). Já a  $\alpha 4$  possui uma expressão bem mais restrita, sendo identificada apenas em células de Sertoli e espermatozoides (WOO; JAMES; LINGREL, 1999, 2000; KONRAD et al., 2011; MCDERMOTT et al., 2012). Remetendo-se aos polipeptídios  $\beta$ ,  $\beta 1$  é o que possui apresentação ubíqua (HICKEY; BUHR, 2012), em contrapartida  $\beta 2$  tem forte expressão em músculo esquelético, tecido nervoso e na glândula pineal, e  $\beta 3$  em tecido pulmonar, hepático e testicular (MOBASHERI et al., 2000; BLANCO, 2005). Os polipeptídeos  $\alpha$  e  $\beta$  estabelecem combinações entre si, promovendo a criação de isoformas com padrões mais específicos de expressão (BLANCO; MERCER, 1998; BLANCO, 2005), estando tais particularidades intrínsecas a nível tecidual ou celular (JEWELL; SHAMRAJ; LINGREL, 1992).

A singular expressão da subunidade  $\alpha 4$  (ATP1A4, nomenclatura do gene) tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas em busca de informações mais aprofundadas sobre o funcionamento e suas implicações na fertilidade do macho. Já é comprovada que esta subunidade pode ser identificada no meio intratesticular, tanto em células germinativas diploides quanto em haploides, e sua expressão ocorre conjuntamente à maturidade sexual e à medida que há o processo de diferenciação celular, podendo equivaler a dois terços de toda atividade energética consumida pela célula espermática (BLANCO; MERCER, 1998; BLANCO et al.,

1999; WOO; JAMES; LINGREL, 2000; BLANCO, 2003; BLANCO, 2005; WAGONER et al., 2005).

A relevância da  $\alpha 4$  faz-se presente em funções gerais, como a regulação de pH, do potencial de membrana e dos próprios íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  no espermatozoide, sendo essencial no suporte à motilidade, fertilidade e capacitação de forma espécie-específica (WOO; JAMES; LINGREL, 2000; JIMENEZ et al., 2010; JIMENEZ et al., 2011a). Através de estudos onde foram utilizados espermatozoides oriundos de camundongos *knockout*, com deleção desta subunidade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, foi possível confirmar sua grande importância frente a capacidade fertilizante, uma vez que os espermatozoides mostraram-se totalmente incompetentes para executar a fertilização e os camundongos apresentavam-se estéreis. Além disso, a ausência da  $\alpha 4$  prejudicou severamente diversos parâmetros cinemáticos (JIMENEZ et al., 2011a; MCDERMOTT et al., 2012). Sua elevada sensibilidade à ouabaína, que é capaz de inibir seletivamente este polipeptídeo, torna evidente que o seu bloqueio também resulta no comprometimento da motilidade espermática (BLANCO et al., 1999; WOO; JAMES; LINGREL, 2000; WOO; JAMES; LINGREL, 2002). Em contrapartida Jimenez et al. (2011b), a fim de confirmar esta premissa, utilizaram camundongos transgênicos para promover a superexpressão de  $\alpha 4$  nos espermatozoides, resultando em motilidade espermática hiperativada mesmo submetendo-os a condições não-capacitantes.

Esta funcionalidade sobre os parâmetros móveis da célula pode ser associada à localização de  $\alpha 4$  na região flagelar dos espermatozoides de algumas espécies (WAGONER et al., 2005; SANCHEZ et al., 2006), que se encontra predominantemente na peça intermediária em espermatozoides de ratos (WOO; JAMES; LINGREL, 2000) e na peça principal em camundongos e humanos (HLIVKO et al., 2006; SANCHEZ et al., 2006; KUMAR; KUMAR; JAMES, 2016). No entanto, ao se tratar de espermatozoides bovinos, a sua localização ocorre especialmente na região da cabeça e sua atuação se relaciona de forma mais intensa à capacitação espermática (GUR; BREITBART, 2006; NEWTON et al., 2010). A menor influência de  $\alpha 4$  sobre os padrões móveis de células espermáticas bovinas pôde ser demonstrada em estudo realizado por Thundathil; Anzar; Buhr (2006), que ao efetuar o bloqueio desta subunidade não evidenciaram qualquer redução ou comprometimento significativo na motilidade total.

Um outro ponto importante foi comprovado por Newton et al. (2010), que demonstraram a ocorrência de redistribuição da subunidade  $\alpha 4$  de toda a região da cabeça espermática para uma restrição na região pós-acrossomal após o processo de capacitação. Para tanto foi necessário confirmar a manutenção da integridade do acrossoma nas células, o que permitiu constatar que não houve correlação entre a perda da subunidade  $\alpha 4$  na região acrossomal e a exocitose de grânulos, mas sim uma correlação positiva, mesmo que parcial, entre a reorganização desta proteína e a capacitação espermática (NEWTON et al., 2010).

Remetendo-se a particular relação entre  $\alpha 4$  e ouabaína, sua sensibilidade apresenta-se cerca de 10000 vezes maior quando comparada a  $\alpha 1$  em células espermáticas de ratos (WAGONER et al., 2005). Este potente inibidor é naturalmente secretado a partir da glândula adrenal bovina e também faz-se presente no fluido vaginal da mesma espécie (LAREDO; HAMILTON; HAMLIN, 1994; DANIEL et al., 2010). Assim, para utilização *in vitro*, definiu-se de modo geral que a concentração necessária para inibição da subunidade  $\alpha 4$  por ouabaína dar-se-á em nanomolar, enquanto para  $\alpha 1$ , em micromolar (BLANCO; MERCER, 1998). Jimenez; Sanchez; Blanco (2012) por meio da utilização do glicosídeo na concentração de  $10^{-6}$  M, obtiveram o bloqueio total da  $\alpha 4$ , ao mesmo tempo que não promoveram qualquer interferência sobre a ação da subunidade  $\alpha 1$ . Neste estudo, um outro aspecto importante foi a associação do fluorocromo *bodipy* associado à molécula de ouabaína, sendo utilizado como uma ferramenta pertinente à quantificação de  $\alpha 4$  na superfície celular. Jimenez et al. (2010) realizaram tratamentos em espermatozoides de ratos, com ouabaína nas concentrações de  $10^{-6}$  M e  $10^{-3}$  M. O primeiro tratamento permitiu a inibição exclusiva da subunidade  $\alpha 4$ , adquirindo efeitos prejudiciais à motilidade total e demais parâmetros móveis das células, como velocidade curvilínea, amplitude lateral de cabeça e linearidade. Por sua vez, a utilização da maior concentração de ouabaína ( $10^{-3}$  M) foi capaz de bloquear tanto a  $\alpha 4$  quanto a  $\alpha 1$ , não promovendo alterações adicionais aos padrões móveis dos espermatozoides. Com estes resultados, além de indicar as concentrações usuais do inibidor para as respectivas subunidades, os autores reafirmam a importante atuação de  $\alpha 4$  sobre tais características espermáticas, da mesma forma que excluem o envolvimento de  $\alpha 1$ .

Uma outra resposta induzida pela interação da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase com a ouabaína é o desencadeamento de eventos em sequência relacionados à

capacitação, tais como elevação dos níveis de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^+$  no meio intracelular (YANAGIMACHI, 1994), fosforilação de tirosina (THUNDATHIL; ANZAR; BUHR, 2006), polimerização de actina (BERNABO et al., 2011; RAJAMANICKAM et al., 2017) e produção de espécies reativas de oxigênio (de LAMIRANDE; LECLERC; GAGNON, 1997), indicando que o estabelecimento desta relação também induz a capacitação espermática (NEWTON et al., 2009). Em ensaio realizado por Newton et al. (2010), utilizou-se a incubação de amostras bovinas com ouabaína e com imunossoro anti- $\alpha 4$ , posteriormente observando-se maior proporção de células espermáticas capacitadas. Em adição, foi realizada a fertilização *in vitro* utilizando estes espermatozoides, identificando-se a superioridade na concentração de células em região limítrofe da zona pelúcida, quando comparada aos grupos controle. Além disso, detectou-se maior porcentagem de oócitos fertilizados pelos espermatozoides incubados com ouabaína ou com imunossoro. Estes resultados puderam determinar a habilidade das células espermáticas pré-incubadas com os meios supracitados e sua correlação com a capacitação destes espermatozoides.

A ação inibitória da ouabaína como atributo de especificidade frente à  $\alpha 4$  permite destacar a divergência nesta classe de subunidades presente nas células espermáticas, evidenciando que não se trata de dualidade, mas sim de características e funcionalidades distintas inerentes a cada uma delas (WOO; JAMES; LINGREL, 2000, 2002; SANCHEZ et al., 2006; JIMENEZ et al., 2010). Todavia, a  $\alpha 4$  pode se associar a outras subunidades, como a  $\beta 1$  e assim realizarem co-expressão, o que permite a manutenção das características clássicas, como a catálise, fosforilação e transporte de íons, mas também a apresentação de propriedades diferenciadas (ARYSTARKHOVA; SWEADNER, 1997; BLANCO et al., 1999). No caso da isoforma  $\alpha 4\beta 1$ , além de apresentar-se mais sensível à ouabaína, possui afinidade superior ao  $\text{Na}^+$ , e inferior ao  $\text{K}^+$  (BLANCO, 2005).

Em função da interferência direta sobre o gameta masculino, a subunidade  $\alpha 4$  vem ganhando notoriedade com o seu potencial preditivo da capacidade fertilizante espermática. Rajamanickam et al. (2017), utilizando sêmen bovino descongelado oriundo de touros de leite com níveis distintos de fertilidade, investigaram a associação entre o conteúdo de ATP1A4 e a fertilidade destes animais. Observaram que a quantidade deste polipeptídeo possui correlação positiva com a fertilidade, uma vez que os touros pré-classificados como mais férteis, possuíam também maior concentração de ATP1A4, quando comparados aos touros de fertilidade reduzida.



Além deste parâmetro, a pesquisa envolveu atividade e níveis de espécies reativas de oxigênio, F-actina e cálcio intracelular, com os quais foi possível estabelecer que a maior atividade enzimática e o maior conteúdo de ATP1A4, também estavam interligados ao aumento da fosforilação de tirosina, do conteúdo de espécies reativas de oxigênio intracelular e de F-actina, assim como estavam atrelados aos menores níveis de cálcio. Através desta pesquisa demonstrou-se o potencial preditivo do conteúdo de ATP1A4 na fertilidade de touros, lançando mão de métodos precisos, objetivos e que proporcionam boa repetibilidade (RAJAMANICKAM et al., 2017). Da mesma forma, Thundathil; Rajamanickam; Kastelic (2018) demonstraram relevância fisiológica da ATP1A4 na regulação da função espermática, evidenciando sua aptidão na marcação deste parâmetro tão importante na produção animal.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O exame andrológico é um método eficaz na determinação de muitos aspectos da qualidade espermática, no entanto sua falha na identificação dos fatores promotores de variação em testes *in vivo* quando da utilização de sêmen de touros aprovados, estimula a busca por novos elementos preditivos da fertilidade. Assim, caracteres proteicos e genéticos têm sido indicados como potenciais marcadores, e dentre eles, a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase cuja associação à fertilidade é comprovada em touros de raça leiteira. Apesar disso, ainda há a necessidade de consolidar o conhecimento já adquirido em torno desta proteína e ir em busca de caracteres moleculares relacionados à  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e a fertilidade com maior padronização e repetibilidade, visando sua utilização comercial como marcador da fertilidade bovina.

#### 4 ARTIGO SUBMETIDO

### **Evaluation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in thawed sperm and its relationship with Angus bull fertility**

#### *Sperm sodium pump and fertility of Angus bulls*

J. C. C. Marques<sup>A</sup>, A. R. R. Cezar<sup>A</sup>, A. D. Nascimento Júnior<sup>A</sup>, J. P. da Silva<sup>B</sup>, A. S.

Oliveira<sup>C</sup>, A. M. Batista<sup>C</sup>, M. M. P. Guerra<sup>C</sup>, D. R. Câmara<sup>A\*</sup>

<sup>A</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Federal University of Alagoas, Viçosa, AL, Brazil,

<sup>B</sup>Laboratory of Cellular Biology, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil,

<sup>C</sup>Laboratory of Andrology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

\*Corresponding author. Fazenda São Luis, s/n, Zona Rural do Município de Viçosa-AL, Brazil. CEP: 57.700-000. Email: diogo@vicoso.ufal.br

### Summary text for the online table of contents

1. The prediction of bull fertility remains challenging
2. We evaluated if sodium pump of thawed sperm can be associated with fertility of Angus bulls. There is a tendency of higher enzymatic activity in high fertility bulls and the expression of this enzyme on sperm surface decreases after post-thaw incubation
3. The results can contribute with a new piece on comprehension and prediction of bull fertility

**Abstract.** The present study aimed to evaluate the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in thawed sperm of Angus bulls of high (HF, n = 4) and normal fertility (NF, n = 4), after fixed time artificial insemination. Samples from three different batches/bull were used. The following sperm features were evaluated immediately post-thaw and after 2 h of incubation: sperm kinematic, viability, and expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the sperm surface. The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was determined immediately after thawing by measurement of phosphate releasing. Within the same incubation time, there was no difference (P > 0.05) on sperm viability, kinematic parameters, and the expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the sperm surface between HF and NF bulls. Kinematic parameters of LIN and VCL were not influenced (P > 0.05) by incubation time in samples from HF and NF, respectively. There was a tendency (P = 0.06) of higher Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase enzymatic activity in HF bull samples. In conclusion, thawed sperm from high fertility Angus bulls tend to higher Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, associated with kinematic parameters post-incubation, which demonstrated lower hyperactivation compared to normal fertility bulls. Additionally, expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the sperm surface of Angus bulls is not related to bull fertility and reduces throughout incubation time.

*Keywords:* ion channel, spermatozoa, transmembrane protein.

## Introduction

In order to evaluate the reproductive potential of a sire, traditional andrological evaluation is usually performed and can identify infertile animals, but this strategy is normally inefficient to distinguish between fertile and subfertile bulls, allowing variations between 20% on pregnancy rate of bulls classified as satisfactory, during traditional andrological evaluation (Thundathil et al., 2018). Considering that in beef herds, the bull fertility contributes more significantly to fertility failure than in dairy herds (Flowers, 2013), new markers able to predict bull fertility have been studied.

Seminal plasma proteins and metabolomics markers (Muhammad et al., 2014; Velho et al., 2018), genetic analysis (Taylor et al. 2018), and sperm cells characteristics (Erickson et al., 2015; Kumaresan et al., 2017) are some of the research targets in order to better predict bull fertility. Among these potential markers, the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and its relevance for sperm fertility in different species has been studied in the last decades (Blanco and Mercer, 1998; Kaplan, 2002). The  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase is a transmembrane protein, which participates on sperm-related features, such as motility, fertility, and capacitation (Woo et al., 2000; Newton et al., 2010; Jimenez et al., 2011), and one of the subunits of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase ( $\alpha 4$ ) is restricted to male reproductive tract (Woo et al., 2000; Konrad et al., 2011).

In Holstein bulls, it was reported a relationship between  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase concentration/activity and fertility (Rajamanickam et al., 2017), as well as its physiological relevance on the regulation of some sperm features (Thundathil et al., 2018). Nonetheless, to our knowledge, studies investigating the influence of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase on beef bull fertility was not reported. Consequently, the goal of the present study was to determine the association

between  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase content and activity in thawed sperm from bulls previously classified as higher- (HF) and normal-average fertility (NF) after FTAI.

## **Materials and methods**

Semen samples from three different batches of eight Angus bulls were provided by an AI center. Four bulls were previously classified as HF and four as NF, based on pregnancy rate of thousands of AI in FTAI programs (Concept Plus program, Alta Genetics LTDA, Brazil). All sample were maintained in liquid nitrogen (-196 °C) until further processing, when they were thawed (37 °C, 30 s). Sperm were evaluated regarding kinematic, viability,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity and expression on the sperm surface, as follows.

### *Sperm kinematic and viability*

One straw from each batch/bull was thawed, the content transferred to a microtube and homogenized. Sperm kinematic and viability were assessed immediately after thawing (0h) and following 120 min of incubation in water-bath (37°C).

The CASA system consisted of an optical phase-contrast microscopy system (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japan) with stroboscopic illumination, a warming stage (37 °C), video camera (Basler Vision Technologie™ A312FC, Ahrensburg, Germany), and a PC with Sperm Class Analyzer (SCA™) software (Microoptics, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Spain). At least five nonconsecutive, randomly selected microscopic fields per sample were scanned, recording at least 500 sperm. Events not related to sperm were removed, and image sequences were saved and later analyzed. The following end points were analyzed: total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), linearity (LIN, %), straightness (STR, %), wobble (WOB,

%), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), progressive velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ), and beat frequency of the tail (BCF, Hz). Motility end points were measured with the following settings: temperature 37 °C; frames acquired, 25; frame rate, 25 s; minimal contrast, 75; frame number, 25 per field; sperm velocity that can be analyzed, 0 to 180  $\mu\text{m/s}$ ; and threshold STR, 75%.

Sperm viability was assessed using a commercial kit (LIVE/DEAD™ Sperm viability kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA; code L7011), according to manufacture's guidelines. Aliquots (25  $\mu\text{L}$ ) of thawed semen samples from each batch/bull were diluted in modified TALP (1:10, v:v), followed by addition of 1.25  $\mu\text{L}$  of SYBR-14 (20  $\mu\text{M}$ ) and 1.25  $\mu\text{L}$  of propidium iodide (2.4 mM), homogenized in microtubes and incubated in the dark (10 min) at room temperature. After, an aliquot (6  $\mu\text{L}$ ) was placed on glass slides, fixed (glutaraldehyde 5%) covered with a coverslip and evaluated by fluorescence microscopy (400 $\times$ ; 450-490 nm excitation/emission filter; FWL- 3500 T FL, Feldmann Wild Leitz, Manaus, AM, Brazil). Two hundred cells of each sample were evaluated, being considered viable sperm labeled in green and non-viable sperm labeled in red.

#### *Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity*

Two straws from each batch/bull were thawed, the content transferred to a microtube, 500  $\mu\text{l}$  of modified TALP (NaCl 100 mM, KCl 3.1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 mM, MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O 0.4 mM, Hepes 40 mM, Lactate 21.6 mM, PVA 0.1 mM; 37 °C) was added followed by centrifugation (500 g, 10 min, 8°C). After the supernatant was discarded, the sperm pellet was resuspended with 1000  $\mu\text{l}$  of extraction buffer (Imidazole 30 mM, sucrose 250 Mm, NaEDTA 1 Mm) and homogenized. The content was split into two treatments: control (extraction buffer only) and ouabain-treated (extraction buffer + ouabain  $4 \times 10^{-4}$  M), to inhibit Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

activity. The samples were kept under refrigeration (5 °C) during 60 min and vortexing (10 s) every 15 min. Following, the samples were centrifuged (15,000 g, 15 min, 22°C), the supernatant was recovered and diluted in Milli-Q water (1:20, v:v), before Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity determination.

The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was determined in triplicate, using a commercial kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; code MAK307) according to manufacture's guidelines. Briefly, the kit detects the released phosphate (rP) based on the green complex formed by the interaction among Malachite Green, molybdate and free orthophosphate, allowing the quantification of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by calculating the difference between rP in the control and ouabain-treated samples. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was normalized based on the total protein of each sample, assessed using a commercial kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; code TP0300), according to manufacture's guidelines. Both rP and total protein were measured using an ELISA reader at 630 nm filter (Polaris®, Celer Biotechnology, Belo Horizonte-MG, Brazil). The activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase is expressed as μM of rP/μg of protein/hour.

#### *Expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the sperm surface*

One straw from each batch/bull was thawed and the total content was split into two microtubes. The samples of the first microtubes were immediately processed; whereas the samples in the second microtube were maintained in water-bath during 120 min (37°C), before evaluating the expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the sperm surface.

To assess the expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on sperm surface, the semen samples in each microtube were homogenized with 750 μl of modified TALP, followed by centrifugation (500 g, 5 min, room temperature) to remove the extender. After the supernatant was

discarded, the sperm pellet was resuspended in 750  $\mu$ l of modified TALP and homogenized. Following, 2  $\mu$ l of fluorochrome Bodipy<sup>®</sup> FL Ouabain solution in PBS (FLOU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to 198  $\mu$ l of sperm samples and incubated (15 min, room temperature), to obtain  $10^{-7}$  M of FLOU as final concentration.

After incubation with FLOU, the samples were analyzed by flow cytometry on a FACSCanto<sup>™</sup> II device (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with the FACS Diva software (Becton Dickinson). A gate excluding cell debris was determined using forward vs. side scatter parameters. Analyses were performed after recording 10,000 events for each sample and fluorescence was determined in the FITC channel at 488 nm excitation and 525 nm emission. The flow cytometry results for expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the sperm surface of total cells were analyzed using the Flowing Software 2.5.1 and the results are expressed as the median of fluorescence intensity.

### *Statistical analysis*

The normal distribution of the data was assessed by a Shapiro-Wilk test. Each batch from each bull was considered an experimental unit. The variables used for comparison were bull fertility (HF and NF) and incubation time (0 and 120 min), when applicable. All analyses were performed using Past software (Version 3.18) and no data was transformed before the analyses. Differences between variable means in sperm kinematic, viability and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase expression on the sperm surface were assessed using one-way ANOVA followed by a Tukey's pairwise test. The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase enzymatic activity between HF and NF bulls were assessed using Mann-Whitney. For all analyses,  $P < 0.05$  was considered significant and the values of each parameter are expressed as mean  $\pm$  SEM.



## Results

Within the same evaluation time (0 and 2 h post-thaw), there was no difference on sperm kinematic between HF and NF bulls ( $P > 0,05$ , Table 1). The incubation time caused a significant reduction in most of the kinematic parameters, in spite of bull fertility, excepting for STR, BCF, and ALH that were not influenced by incubation time. It is of note that in the samples from HF bulls, there was no reduction on LIN after incubation time, and a similar pattern was observed for VCL in NF bulls.

There was also no difference between samples from HF and NF bulls for sperm viability within the same evaluation time, although incubation reduced ( $P < 0.05$ ) sperm viability in sperm samples from both HF and NF bulls ( $63.6 \pm 2.2$  and  $69.3 \pm 2.4$  at 0h;  $54.2 \pm 2.4$  and  $52.5 \pm 1.8$  at 2 h for HF and NF bulls, respectively).

Regarding  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity, there was a similarity between HF and NF bulls. However, a tendency ( $P = 0.06$ ) to higher enzymatic activity was observed in samples from HF bulls compared to NF (Figure 1). Moreover, there was no influence of bull fertility in the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase expression on the sperm surface immediately after thawing, nor after 2 h of incubation. However, the incubation time reduced ( $P < 0.001$ ) the median fluorescence intensity in samples from both HF and NF bulls (Figures 2 and 3).

## Discussion

The similar kinematic parameters within the same incubation time between HF and NF bulls are in agreement with a previous report (Santos, 2016). Nevertheless, a similar study performed with Holstein bulls (Rajamanickam et al., 2017) reported that high fertility bulls presented higher PM compared to low fertility bulls. It is noteworthy that Rajamanickam et al.

(2017) separated the thawed sperm by percoll density gradient before analysis, which probably selected sperm subpopulations with superior motility and viability (Henkel and Schill, 2003), excluding sperm subpopulations that suffered more extensive cryoinjuries (Morrell, 2006; Maree and Van Der Horst, 2013). As in the present study the thawed samples were not pre-selected, sperm subpopulations more susceptible to cryoinjuries were also evaluated, which could explain the similar kinematics between HF and NF bulls within the same incubation time.

In parallel to kinematic parameters, sperm viability did not differ between HF and NF bulls with the same, in agreement with Al Naib et al. (2011), who also reported no difference in sperm viability between bulls with different fertility. Although sperm viability has been considered an important characteristic of seminal quality (Christensen et al., 2011), the present results reinforce its ineffectiveness to predict bull fertility when evaluated isolated.

The 2 h incubation time allows identifying a different kinematic pattern on VCL and LIN for HF and NF bulls, respectively, which remained similar values compared to immediately post-thaw (0 h). It is well known that cryopreservation causes sublethal sperm freezing damage (Holt, 2000) and might culminate on sperm cryocapacitation and hyperactivation (Töpfer-Petersen et al., 2005), which can be characterized by high VCL and ALH values associated to low LIN and STR (Muiño et al., 2008). Since STR, ALH, and BCF values were similar throughout incubation time, regardless bull fertility (HF or NF); the kinematic pattern observed in NF bulls throughout incubation time (maintaining VCL and reducing LIN values) might reflect the hyperactivation in sperm subpopulations. Conversely, the high LIN and reduction on VCL of the HF bulls sperm after incubation indicates a lower percentage of hyperactivated sperm subpopulations, in agreement with previous studies reporting that individual sperm velocities can be associated to fertilizing potential of thawed sperm (Byrd et al., 1990; Krause, 1995).

It was observed a tendency of HF bulls presents higher  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase enzymatic activity, but no difference on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase expression on sperm surface was detected. Rajamanickam et al. (2017) demonstrated that high fertility Holstein bulls have higher activity and content of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, compared to low fertility bulls. It is noteworthy that Rajamanickam et al. (2017) detected the expression of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase on the sperm surface by flow cytometry only in membrane intact sperm and used an anti-  $\alpha 4$  antibody. In the present study, the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase on sperm surface was detected using a fluorochrome conjugated to ouabain, a specific inhibitor of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (Schoner and Scheiner-Bobis, 2007) in the total sperm population. Moreover, it was reported that ouabain at  $10^{-6}$  M can inhibit only the activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase comprised by  $\alpha 4$  subunit, due to its higher sensitivity compared to  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase comprised by  $\alpha 1$  subunit (Jimenez et al., 2012). However, we cannot be certain that the concentration of Bodipy<sup>®</sup> FL Ouabain used in the present study ( $10^{-7}$  M) did not bind to different isoforms of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. These explanations could explain the differences between the report of Rajamanickam et al. (2017) and the present data.

In both HF and NF bull's sperm, the incubation time decreased the surface expression of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. The cholesterol is the binding site of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase to the cell membrane (Shinoda et al., 2009) and cholesterol stability influences the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase expression and activity (Chen et al., 2011). Moreover, the cryopreservation alters lipid configuration of the sperm membrane (Giraud et al. 2000) and was able to reduce the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase expression in the surface of ram sperm (Oliveira et al., 2019). Therefore, we inferred that samples from NF bulls are more susceptible to cryodamage, which compromised the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase functionality with no influence o sperm surface expression, triggering capacitation-like changes, as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase inhibition induces bull sperm capacitation (Newton et al., 2010).

In conclusion, thawed sperm from high fertility Angus bulls tend to higher Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, associated with kinematic parameters post-incubation, which demonstrated lower hyperactivation compared to normal fertility bulls. Additionally, expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on the sperm surface of Angus bulls is not related to bull fertility and reduces throughout incubation time.

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

The author's work described herein were supported by grant from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL, Edital 14/2016). The author's thank the Alta Genetics do Brazil LTDA for providing semen samples.

### **References**

Al Naib, A., Hanrahan, J. P., Lonergan, P. and Fair, S. (2011). In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology* **76**, 161–167.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.038>

Blanco, G. and Mercer, R. W. (1998). Isozymes of the Na, K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **275**, 633–650.

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633>

Byrd, W., Bradshaw, K., Carr, B., Edman, C., Odom, J. and Ackerman, G. (1990). A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor sperm. *Fertil. Steril.* **53**, 521–527.

[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)53351-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)53351-2)

Chen, Y., Li, X., Ye, Q., Tian, J., Jing, R. and Xie, Z. (2011). Regulation of  $\alpha 1$  Na/K-ATPase Expression by Cholesterol. *J. Biol. Chem.* **286**, 15517-15524.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204396>

Christensen, P., Labouriau, R., Birck, A., Boe-Hansen, G. B., Pedersen, J. and Borchersen, S. (2011). Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. *J. Dairy Sci.* **94**, 1744-1754. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3087>

Erickson, L., Kroetsch, T. and Anzar, M. (2015). Relationship between sperm apoptosis and bull fertility: *in vivo* and *in vitro* studies. *Reprod. Fertil. Dev.* **28**, 1369-1375.

<https://doi.org/10.1071/RD14417>

Flowers, W. L. (2013). Sperm characteristics that limit success of fertilization. *J. Anim. Sci.* **91**, 3022–3029. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5945>

Giraud, M. N., Motta, C., Boucher, D. and Grizard, G. (2000). Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* **15**, 10, 2160–2164.

[doi.org/10.1093/humrep/15.10.2160](https://doi.org/10.1093/humrep/15.10.2160)

Henkel, R. R. and Schill, W. B. (2003). Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 108. [https://doi.org/ 10.1186/1477-7827-1-108](https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-108)

Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of Sperm cryobiology: The importance species and individual differences. *Theriogenology* **53**, 47-58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)

Jimenez, T., McDermott, J. P., Sánchez, G. and Blanco, G. (2011). Na, K-ATPase alpha4 isoform is essential for sperm fertility. *PNAS* **108**, 2, 644-649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016902108>

Jimenez, T., Sánchez, G. and Blanco, G. (2012). Activity of the Na, K-ATPase  $\alpha$ 4 isoform is regulated during sperm capacitation to support sperm motility. *J. Androl.* **33**, n. 5, p. 1047-1057. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.015545>

Kaplan, J. H. Biochemistry of Na, K-ATPase. (2002). *Ann. Rev. Biochem.* **71**, 511-535. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218>

Konrad, L., Dietze, R., Kirch, U., Kirch, H., Eva, A. and Scheiner-Bobis, G. (2011). Cardiotonic steroids trigger non-classical testosterone signaling in Sertoli cells via the alpha4 isoform of the sodium pump. *Biochim. Biophys. Acta.* **1813**, 2118-2124. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.012>

Krause, W. (1995). Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Hum. Reprod.* **10**, 60-66. [https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl\\_1.60](https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl_1.60)

Kumaresan, A., Johannisson, A., Al-Essawe, E. M. and Morrell, J. M. (2017). Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. *J. Dairy Sci.* **100**, 5824-5836. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12484>

Maree, L. and Van Der Horst, G. (2013). Quantification and identification of sperm subpopulations using computer-aided sperm analysis and species-specific cut-off values for swimming speed. *Biotech. & Histochem.* **88**, 181-193. <https://doi.org/10.3109/10520295.2012.757366>

Morrell, J. M. (2006). Update on Semen Technologies for Animal Breeding. *Reprod. Domest. Anim.* **41**, 63-67. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x>

Muhammad, A. M. K., Kumaresan, A., Sharma, V. K., Tajmul, M., Chhillar, S., Chakravarty, A. K., Manimaran, A., Mohanty, T. K., Srinivasan, A. and Yadav, S. (2014). Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology* **82**, 1254-1262. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.007>

Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C. O. and Peña, A. I. (2008). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of

cryopreservation and between bull variation. *Anim. Reprod. Sci.* **109**, 27-39.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.007>

Newton, L. D., Krishnakumar, S., Menon, A. G., Kastelic, J. P., Van der Hoorn, F. A. and Thundathil, J. C. (2010). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase regulates sperm capacitation through a mechanism involving kinases and redistribution of its testis-specific isoform. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 136–148. <https://doi.org/10.1002/mrd.21114>

Oliveira, A. S., Câmara, D. R., Batista, A. M., Silva, R. A. J. A., Arruda, L. C. P., Monteiro, M. M., Costa, J. A. S., Guerra, M. M. P. (2019). Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in ram sperm – Its importance for kinematics, localisation and expression on the sperm surface. *Small Ruminant Res.* **176**, 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.05.012>

Rajamanickam, G. D., Kroetsch, T., Kastelic, J. P. and Thundathil, J. C. (2017). Testis-specific isoform of Na/K-ATPase (ATP1A4) regulates Sperm function and fertility in dairy bulls through potential mechanisms involving reactive oxygen species, calcium and actin polymerization. *Andrology* **5**, 814-823. <https://doi.org/10.1111/andr.12377>

Santos, F. B. *Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte*. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F. and Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4Å resolution. *Nature* **459**, 446–450.

<https://doi.org/10.1038/nature07939>



Schoner, W. and Scheiner-Bobis, G. (2007). Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **293**, C509–C536. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00098.2007>.

Taylor, J., Schnabel, R. and Sutovsky, P. (2018). Review: genomics of bull fertility. *Animal* **12**, S172-S183. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000599>

Thundathil, J. C., Rajamanickam, G. D. and Kastelic, J. P. (2018). Na/K-ATPase and Regulation of Sperm Function. *Anim. Reprod.* **15**, 1, 711-720. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0024>

Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., Kirchhoff, C., Leeb, T. and Sieme, H. (2005). The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* **89**, 159-170. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.018>

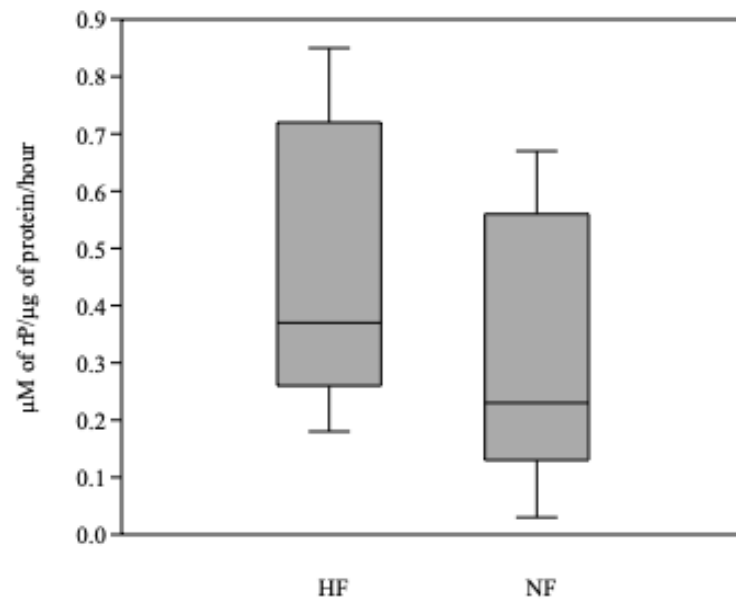
Velho, A. L. C., Menezes, E., Dinh, T., Kaya, A., Topper, E., Moura, A. A. and Memili, E. (2018). Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *PloS ONE*, **13**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195279>

Woo, A. L., James, P. F. and Lingrel, J. B. (2000). Sperm motility is dependent on a unique isoform of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 20693-20699. <http://doi.org/10.1074/jbc.M002323200>

**Table 1.** Kinematic of thawed sperm from Angus bulls scored as high fertility (HF) and normal fertility (NF), immediately after thawing (0 h) and after 2 h of incubation at 37°C.

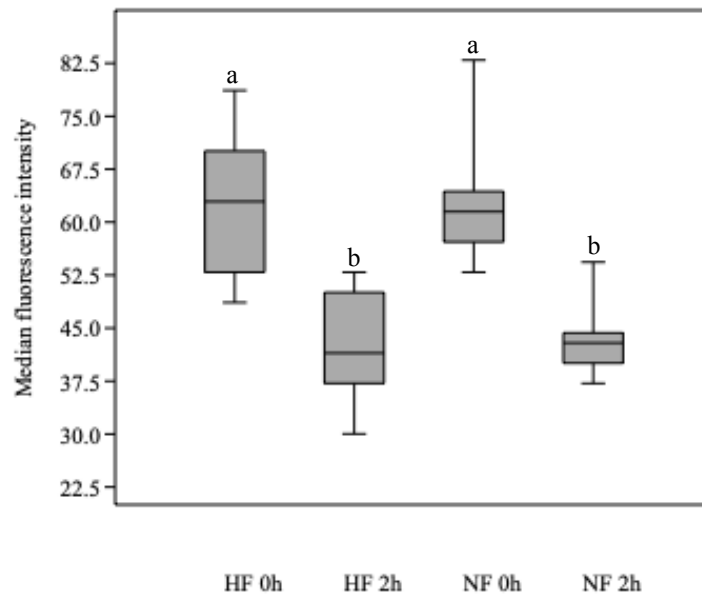
Parameter	Bull fertility and incubation time			
	HF	NF	HF	NF
	0 h	0 h	2 h	2 h
TM (%)	77.9 ± 3.1 <sup>a</sup>	78.8 ± 3.0 <sup>a</sup>	48.1 ± 5.6 <sup>b</sup>	57.2 ± 4.0 <sup>b</sup>
PM (%)	46.6 ± 3.0 <sup>a</sup>	44.7 ± 2.7 <sup>a</sup>	29.0 ± 5.2 <sup>b</sup>	31.1 ± 3.9 <sup>b</sup>
VCL (µm/s)	67.9 ± 3.5 <sup>a</sup>	59.3 ± 3.2 <sup>ab</sup>	47.2 ± 3.2 <sup>c</sup>	48.1 ± 2.6 <sup>bc</sup>
VSL (µm/s)	36.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	32.6 ± 2.0 <sup>a</sup>	22.1 ± 2.7 <sup>b</sup>	21.6 ± 1.9 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	46.4 ± 2.2 <sup>a</sup>	41.8 ± 2.4 <sup>a</sup>	29.2 ± 3.0 <sup>b</sup>	29.0 ± 2.1 <sup>b</sup>
LIN (%)	53.4 ± 1.5 <sup>ab</sup>	55.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	45.3 ± 2.9 <sup>bc</sup>	44.4 ± 2.4 <sup>c</sup>
STR (%)	77.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	77.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	74.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	73.9 ± 2.0 <sup>a</sup>
WOB (%)	68.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	70.6 ± 1.4 <sup>a</sup>	60.5 ± 2.5 <sup>b</sup>	59.7 ± 1.8 <sup>b</sup>
ALH (µm)	2.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	10.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	9.7 ± 0.6 <sup>a</sup>

Within a row, means without a common superscript differed ( $P < 0.05$ ).



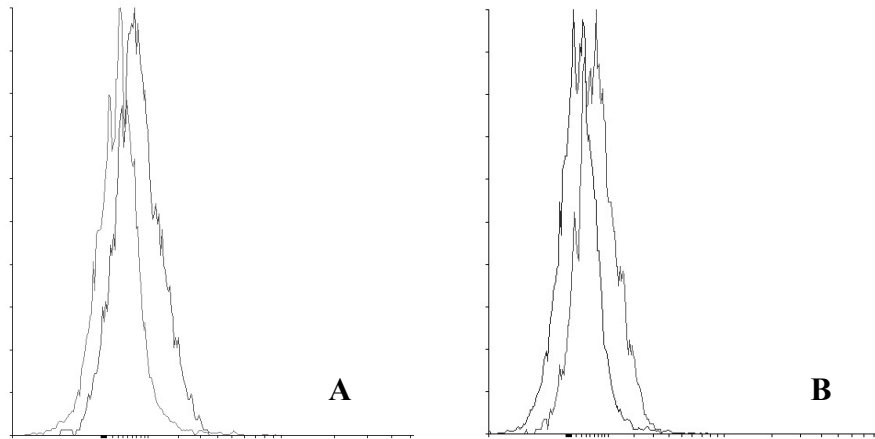
**Fig. 1.** Box plot of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of thawed sperm from Angus bulls scored as high fertility (HF) and normal fertility (NF).

P = 0.06



**Fig. 2.** Box plot of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase expression on surface of thawed sperm from Angus bulls scored as high fertility (HF) and normal fertility (NF), immediately after thawing (0 h) and after 2 h of incubation at 37°C.

Means without a common superscript differed ( $P < 0.01$ )



**Fig. 3.** Overlay of a representative fluorescence intensity histogram of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase expression on the surface of thawed sperm from Angus bulls scored as high fertility (A) and normal fertility (B), immediately after thawing (right peak) and after 2 h of incubation (left peak) at  $37^\circ\text{C}$ .

## REFERÊNCIAS

ALLOUCHE, L. et al. Bull Fertility and Its Relation with Density Gradient Selected Sperm. **International Journal of Fertility and Sterility**, v.11, n.1, p.55-62, 2017.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febinger 1993. 1. ed., Cap. 80, p.715-746.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 143-173, 1987.

AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, p. 5-17, 2014.

Anuário estatístico da pecuária de corte (ANUALPEC). 22. ed. Instituto FNP, São Paulo, SP, Brasil, 2017.

ARGIRIS, A. et al. Effect of age and Bulls on fresh semen quality and frozen semen production of holstein bulls in Indonesia. IOP. Conf. Series: Earth and Environmental Science 119, 12033, 2018.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 230-231, 2003.

ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n. 2, p. 145-151, 2011.

ARYSTARKHOVA, E.; SWEADNER, K. J. Tissue-specific expression. Of the Na,K-ATPase beta3 subunit. The presence of beta3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 22405-22408, 1997.

ARYSTARKHOVA, E. et al. The gamma subunit modulates Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> affinity of the renal Na-K-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 33183–33185, 1999.

BACINOGLU, S. et al. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 1, p. 38-46, 2008.

BALL, P. J. H; PETERS, A. R. **Reprodução em bovinos**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2006, 232p.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. A importância do exame andrológico em bovinos. **EMBRAPA Pecuária Sudeste**, n. 41, 2005.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames, Iowa: Iowa State Univ Pr; 1989. p. 130–279.

BARTOLAMI, S. et al. Critical roles of transitional cells and Na/K-ATPase in the formation of vestibular endolymph. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 46, p.16541–16549, 2011.

BEGUIN, P. et al. The Y subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. **EMBO Journal**, v. 16, p. 4250–4260, 1997.

BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 9, p. 2441-2448, 1994.

BELLIN, M. E. et al. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 173-182, 1996.

BERNABO, N. et al. The role of actin in capacitation-related signaling: an in silico and in vitro study. **BMC Systems Biology**, v. 5, n. 47, 2011.

BLANCO, G. Functional expression of the 4 isoform of the Na,KATPase in both diploid and haploid germ cells of male rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p. 536-538, 2003.

BLANCO, G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. **Seminars in Nephrology**, v. 25, p. 292- 303, 2005.

BLANCO, G.; MERCER, R. W. Isozymes of the Na,K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v. 275, p. 633–650, 1998.

BLANCO, G. et al. Functional Characterization of a Testes-Specific  $\alpha$ -Subunit Isoform of the Sodium/Potassium Adenosinetriphosphatase. **Biochemistry**, v. 38, n. 41, p. 13661–13669, 1999.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic Sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BROEKHUIJSE, M. L. et al. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology**, v. 77, p. 1466–1479, 2012.

BYRNE, K. et al. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. **Proteomics**, v. 12, p. 3559-3579, 2012.

CABALLERO, I. et al. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1352–1355, 2008.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Journal of Biology of Reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1293-1301, 1997.



CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. **Journal of Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 454-60, 1999.

CASAS, E.; LUNSTRA, D. D.; STONE, R. T. Quantitative trait loci for male reproductive traits in beef cattle. **Animal Genetics**, v. 35, n. 6, p.451–453, 2004.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHACUR, M. G. M. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in zebu bulls (*Bos taurus indicus*). In: GHOWSI, K. **Electrophoresis**. 1.ed. London: Intech Open Limited, 2012. v. 1, p. 173-192.

CHAMINADE, B. et al. New developments in phospholipase A2. **Lipids**, v. 34, p. 39–55, 1999.

CHEN, J. et al. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipase A<sup>2</sup>. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 2365–2368, 1994.

COCHRAN, S. D. et al. Single Nucleotide Polymorphisms in Candidate Genes Associated with Fertilizing Ability of Sperm and Subsequent Embryonic Development in Cattle. **Journal of Biology of Reproduction**, v. 89, n. 3, p. 1–7, 2013.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. CBRA: Belo Horizonte, 104p.

CONTRI, A. et al. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p. 424-435, 2010.

CRIVELLO, J. F.; DELVIN, E. Isolation and characterization of a Cdna for osteopontin-k, a kidney cell adhesion molecule with high homology to osteopontins. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 6, p. 693-699, 1992.

DACHEUX, J. L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 319-341, 2005.

DANIEL, L. et al. Regulation of the sperm EGF receptor by ouabain leads to initiation of the acrosome reaction. **Developmental Biology**, v. 344, p. 650–657, 2010.

DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Operational standards for CASA instruments. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 385-394, 1993.

de LAMIRANDE, E. LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**. v. 3, p.175-194, 1997.

DENHARDT, D. T. et al. Osteopontin-induced modifications of cellular functions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 760, p. 127-42, 1995.

DENHARDT, D. T.; GIACHELLI, C. M.; RITTLING, S. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 723-749, 2001.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 18, 13057–13060, 1994.

DIETZE, R. et al. Cardiac glycoside ouabain induces activation of ATF-1 and StAR expression by interacting with the  $\alpha 4$  isoform of the sodium pump in Sertoli cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, p. 511–519, 2013.

DOGAN, S. et al. Sperm chromatin structure reflects fertility phenotypes in breeding bulls. **Journal of Biology of Reproduction**, v. 92, p. 92-106, 2015.

ERIKSON, D. W. et al. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, v. 133, n.5, p. 909–917, 2007.

FONSECA, V. O. Avaliação reprodutiva de touros para a monta a campo: análise crítica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 36-41, 2009.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v. 75, p. 119-139, 2003.

FORBUSH, B. III; KAPLAN, J. H.; HOFFMAN, J. F. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: Labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na, K-ATPase. **Biochemistry**, v. 17, p. 3667-3676, 1978.

FORDYCE, G. et al. Bull selection and use in northern Australia, 5. Social behaviour and management. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 81–99, 2002.

FORDYCE, G. et al. Standardising bull breeding soundness evaluations and reporting in Australia. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1140–1148, 2006.

FORTES, M. R. et al. Candidate genes associated with testicular development, Sperm quality, and hormone levels of inhibin, luteinizing hormone, and insulin-like growth factor 1 in brahman bulls. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 3, 2012a.

FORTES, M. R. S. et al. Finding genes for economically important traits: Brahman cattle puberty. **Animal Production Science**, v. 52, p.143–150, 2012b.

FORTES, M. R. S. et al. Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: Advances from microsatellites to high-density chips and beyond. **Animal Reproduction Science**, v. 141, p. 1–19, 2013.

FRANZEN, A.; HEINEGARD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochemical Journal**, v. 232, n. 3, p. 715-24, 1985.

FRENEAU, G. E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p.160-170, 2011.

GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M, A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 303-308, 2004.

GANGULY, I. et al. Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature sperm of normal and motility impaired sêmen producing crossbred Frieswal (HF × Sahiwal) bulls. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 2, p. 256–262, 2013.

GEERING, K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 33, p. 425-38, 2001.

GILBERT, I. et al. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1073-1086, 2007.

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

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. Embrapa gado de corte, nota técnica, Campo Grande, mar. 2017.

GUR, Y.; BREITBART, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. **Genes & Development**, v. 20, p. 411-416, 2006.

HAVIV, H.; KARLISH, S. J. D. P-Type Pumps: Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Bioenergetics**, p. 681-687, 2013.

HICKEY, K. D.; BUHR, M. M. Characterization of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in bovine sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1369–1380, 2012.

HLIVKO, J. et al. The human Na,K-ATPase alpha4 isoform is a ouabain-sensitive alpha isoform that is expressed in sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 1, p. 101–115, 2006.

HOLROYD, R. G. et al. Bull selection and use in northern Australia. 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 67–79, 2002.

HOSSAIN, M. S. et al. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.3, p. 406-419, 2011.

HOYER, J. R.; OTVOS, L.; URGE, L. Osteopontin in urinary stone formation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 760, p. 257-265, 1995.

ISMAYA, I. Artificial insemination Biotechnology in Cattle and Buffaloes. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 2014.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, B. Falha Reprodutiva em Machos. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004.

JANSEN, S.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Sperm adhesion molecules: structure and function. **Cells Tissues Organs**, v. 168 p. 82-92, 2001.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, p. 947-981, 2001.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JELÍNKOVÁ, P. et al. Proteinase Inhibitors in aggregated forms of Boar Seminal Plasma Proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, p. 99-107, 2003.

JEWELL, E. A.; SHAMRAJ, O. I.; LINGREL, J. B. Isoforms of the alpha subunit of Na, K-ATPase and their significance. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 607, p. 161-169, 1992.

JIMENEZ, T. et al. Activity of the Na, K-ATPase  $\alpha 4$  isoform is important for membrane potential, intracellular  $Ca^{2+}$ , and pH to maintain motility in rat spermatozoa. **Reproduction**, v. 139, n. 5, p. 835–45, 2010.

JIMENEZ, T. et al. Na, K-ATPase  $\alpha 4$  isoform is essential for sperm fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, n. 2, p. 644–649, 2011a.

JIMENEZ, T. et al. Increased expression of the Na, K-ATPase  $\alpha 4$  isoform enhances sperm motility in transgenic mice. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 153-161, 2011b.

JIMENEZ, T.; SÁNCHEZ, G.; BLANCO, G. Activity of the Na, K-ATPase  $\alpha 4$  isoform is regulated during sperm capacitation to support sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 1047-1057, 2012.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p.11-19, 2009.

JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. Structure and mechanism of Na, K ATPase: functional sites and their interactions. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p. 817–849, 2003.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na, K-ATPase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 511–535, 2002.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 368-373, 2008.

KATHIRAVAN, P. et al. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 165-172, 2011.

KAYA, A.; MEMILI, E. Sperm macromolecules associated with bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 88-94, 2016.

KHATIB, H. et al. Effects of signal transducer and activator of transcription (STAT) genes STAT1 and STAT3 genotypic combinations on fertilization and embryonic survival rates in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 12, p. 6186–6191, 2009a.

KHATIB, H. et al. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 2238–2247, 2009b.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p.1202-1207, 1993.

KONRAD, L. et al. Cardiotonic steroids trigger non-classical testosterone signaling in Sertoli cells via the alpha4 isoform of the sodium pump. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 2118-2124, 2011.

KUMAR, S. et al. Protamin 3 expression in crossbred bull spermatozoa may not be a prognostic marker for differentiating good and poor quality semen. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n. 20, p. 1999–2003, 2014.

KUMAR, S. et al. A SNP (g.358A > T) at the intronic region of CD9 molecule of crossbred bulls may associate with spermatozoal motility. **Meta Gene**, v. 5, p. 140–143, 2015a.

KUMAR, S. et al. Bovine circadian locomotor output cyclic kaput (CLOCK) and clusterin (CLU) mRNA quantitation in ejaculated crossbred bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 3, p. 505–509, 2015b.

KUMAR, D. L.; KUMAR, P. L.; JAMES, P. F. Methylation-dependent and independent regulatory regions in the Na, K-ATPase alpha4 (Atp1a4) gene may impact its testis-specific expression. **Gene**, v. 575, p. 339-352, 2016.

KUTTY, M. V. H. et al. An overview on binder of Sperm proteins of cattle. **International Journal of Livestock Research**, v. 4, p. 1-11, 2014.

LAMBEAU, G.; GELB, M. H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 495–520, 2008.

LAREDO, J.; HAMILTON, B. P.; HAMLIN, J. M. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 135, p. 794–797, 1994.

LESSEY, B. A. Adhesion molecules and implantation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 55, p.101-102, 2002.

LIAN, L. et al. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 1468-1478, 1998.

LINGREL, J.; KUNTZWEILER, T. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 31, p. 19659–19662, 1994.

LINGREL, J. et al. Functional roles of the alpha isoforms of the Na, K-ATPase. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p. 354–359, 2003.

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 27–37, 1994.

MARTINS, C. F. Avaliação do reprodutor – exame físico geral e específico. Curso de andrologia. Embrapa, 2002.

MASUDA, S. et al. Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. **Biochimica et Biophys Acta**, v. 1686, p. 61–76, 2004.

MATHEVON, M.; BUHR, M. M.; DEKKERS, J. C. Environmental, management and genetic factors affecting semen production Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, 3321, 1998.

MAZZALI, M. et al. Osteopontin: a molecule for all seasons. **Quarterly journal of medicine**, v. 95, p. 3-13, 2002.

MCDERMOTT, J. P. et al. Green fluorescence protein driven by the Na, K-ATPase  $\alpha 4$  isoform promoter is expressed only in male germ cells of the mouse testis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p.1313–1325, 2012.

MCGOWAN, M. R. et al. Bull selection and use in northern Australia. 1. Physical traits. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 25–37, 2002.

MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A.; HAVT, A. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 1, p. 8-16, 2008.

MENON, A. G. et al. Validating the assessment of bull sperm morphology by veterinary practitioners. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, p. 407-408, 2011.

MOBASHERI, A. et al.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  –ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience Reports**, v. 20, p. 51-91, 2000.



MORRELL, J. M. et al. Sperm quality variables as indicators of bull fertility may be breed dependent. **Animal Reproduction Science**, v. 185, p. 42-52, 2017.

MORTH, J. P. et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump. **Nature**, v. 450, p.1043–1049, 2007.

MOURA, A. A. et al. Identification of Proteins in the Accessory Sex Gland Fluid Associated With Fertility Indexes of Dairy Bulls: A Proteomic Approach. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006.

MUHAMMAD, A. M. K. et al. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. **Theriogenology**, v. 82, n. 9, 1254-1262, 2014.

NEWTON, L. et al. Elevated testicular temperature modulates expression patterns of Sperm proteins in holstein bulls. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, p. 109-118, 2009.

NEWTON, L. D. et al. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase regulates sperm capacitation through a mechanism involving kinases and redistribution of its testis-specific isoform. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, p. 136–148, 2010.

OLIVEIRA FILHO, A. Produção e Manejo de Bovinos de Corte. Cuiabá-MT: KCM Editora, 2015. 155p.

OLIVEIRA, L. Z. et al. The importance of semen quality in AI programs and advances in laboratory analyses for sêmen characteristics. In: LEMMA, A. **Assessment, success in artificial insemination - quality of semen and diagnostics employed**. Croatia: InTech, 2013. p. 1-16.

PARENT, S. et al. Bull subfertility is associated with low levels of a Sperm membrane antigen. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, p. 57-65, 1999.

PARK, Y. J. et al. Fertility related proteomic profiling bull spermatozoa separated by percoll. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 8, p. 4162-4168, 2012.

PAVLOVIC, D.; FULLER, W.; SHATTOCK, M. J. Novel regulation of cardiac Na pump via phospholemman. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 61, p. 83–93, 2013.

PEDDINTI, D. et al. Comprehensive proteomic Analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Systems Biology**, v. 2, n. 19, 2008.

PEÑA, F. J. Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 351-355, 2015.

PENAGARICANO, F.; WEIGEL, K. A.; KHATIB, H. Genome-wide association study identifies candidate markers for bull fertility in Holstein dairy cattle. **Animal Genetics**, v. 43, p. 65–71, 2012.

PUGLISI, R. et al. In vitro competitive binding index using fluorochrome-labelled spermatozoa for predicting bull fertility. **Zygote**, v. 18, p. 281-291, 2010.

RAJAMANICKAM, G. D. et al. Testis-specific isoform of Na/KATPase (ATP1A4) regulates Sperm function and fertility in dairy bulls through potential mechanisms involving reactive oxygen species, calcium and actin polymerization. **Andrology**, p. 1-10, 2017.

RÊGO, J. P. A. et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated Bos indicus bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 148, p. 1–17, 2014.

REVELL, S. G.; MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

RODRIGUEZ, C. M.; DAY, J. R.; KILLIAN, G. J. Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 414-20, 2000.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. et al. Immunoelectroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa in vitro to the zona pellucid. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, p. 491-497, 1998.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PEÑA VEGA, F. Semen Technologies in domestic animal species. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 4, p. 26-33, 2013.

ROLDAN, E. R.; SHI, Q. X. Sperm phospholipases and acrossomal exocytosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 89–104, 2007.

- RONCOLETTA, M. et al. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 77-87, 2006.
- RONKKO, S. Immunohistochemical localization of phospholipase A2 in the bovine seminal vesicle and on the surface of the ejaculated spermatozoa. **International Journal of Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 869–876, 1992.
- ROSE, A. M.; VALDES, R. J. Understanding the sodium pump and its relevance to disease. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1674-1685, 1994.
- SALVADOR, D. F. et al. Associação entre o perfil andrológico e a congelação de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 587-593, 2008.
- SANCHEZ, G. et al. The Na,K-ATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, p. 565–576, 2006.
- SÁNCHEZ-PARTIDA, L. G. et al. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. **Journal of Andrology**, v. 20, p. 280-288, 1999.
- SANTOS, K. J. G.; MARQUES, E. G.; MELO, C. S. Avaliação reprodutiva de touros. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 2, p. 148-161, 2005.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246–1259, 2006.
- SCOTT, D. L.; SIGLER, P. B. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A<sub>2</sub>. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 53–88, 1994.
- SILVA, J. C. B.; NOGUEIRA, E. N.; SILVA, M. R. Processamento de Sêmen Bovino Refrigerado. Embrapa, n. 108, Corumbá-MS, dez. 2017.

SKOU, J. The energy coupled exchange of Na<sup>+</sup> for K<sup>+</sup> across the cell membrane — the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump. **FEBS Lett.**, v. 268, n. 2, p. 314–324, 1990.

SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na, K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 24, p. 249–261, 1992.

SORENSEN, E. S.; PETERSEN, T. E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 198, p. 200-205, 1994.

SUNDARARAMAN, M. N.; KALATHARAN, J.; THILAK PON JAWAHAR, K. Computer assisted semen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle. **Veterinary World**, v. 5, p. 723-726, 2012.

TAYLOR, J. F. et al. Genetic and environmental components of sêmen production traits of artificial insemination Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 2703, 1985.

THUNDATHIL, J. C.; ANZAR, M.; BUHR, M. M. Sodium potassium ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. **Biology Reproduction**, v. 75, p. 308-317, 2006.

THUNDATHIL, J. C.; RAJAMANICKAM, G. D.; KASTELIC, J. P. Na/K-ATPase and Regulation of Sperm Function. **Animal Reproduction**, v.15, p. 711-720, 2018.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

WAGONER, K. et al. Different expression and activity of the alpha1 and alpha4 isoforms of the Na, K-ATPase during rat male germ cell ontogeny. **Reproduction**, v. 130, p. 627–641, 2005.

WALTON, R. Important milestones in the AI industry. In: 24th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. **Proceedings...** Milwaukee, WI, USA: NAAB; 2012.

- WANG, X. et al. Analysis of segregation distortion and association of the bovine FGF2 with fertilization rate and early embryonic survival. **Animal Genetics**, v. 40, p. 722–728, 2009.
- WOO, A. L.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B. Characterization of the fourth  $\alpha$  isoform of the Na, K-ATPase. **Journal of Membrane Biology**, v. 169, p. 39–44, 1999.
- WOO, A. L.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of Na, K-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 27, p. 20693–20699, 2000.
- WOO, A. L.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B. Roles of the Na, K-ATPase  $\alpha$ 4 isoform and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in Sperm motility. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 348-356, 2002.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 189–317.

## APÊNDICE

**Reproduction, Fertility and Development** <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

ter, 23 de jul 18:46 (há 13 días)



para juliana.marques, allan.vet, agnelo\_dn, juliane.silva, alinesaraivamv, marianopq, mmpguerra, eu, diogocamara1979

inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês

24-Jul-2019

Dear Dr Câmara

Your manuscript entitled 'Evaluation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in thawed sperm and its relationship with Angus bull fertility' has been successfully submitted online and will be given full consideration for publication in *Reproduction, Fertility and Development*.

Your manuscript ID is RD19296. Please mention this manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions.

If there are any changes in your street address or email address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/csiro-rd> and edit your user information as appropriate. You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in.

Thank you for submitting your manuscript to *Reproduction, Fertility and Development*.

Sincerely,

Editorial Office, *Reproduction, Fertility and Development*