

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Toxicologia reprodutiva: padrão de ligação
e efeitos de lectinas do gênero *Canavalia* em
espermatozoides bovinos**

Cristian Kaefer

Pelotas, 2012

CRISTIAN KAEFER

**TOXICOLOGIA REPRODUTIVA: PADRÃO DE LIGAÇÃO E EFEITOS DE
LECTINAS DO GÊNERO *CANAVALLIA* EM ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Deschamps

Co-Orientador (es): Prof. Dr. Tiago Collares
Prof. Dr. Vinicius Farias Campos

Pelotas, 2012.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

K11t

Kaefer, Cristian

Toxicologia reprodutiva: padrão de ligação e efeitos de lectinas do gênero *Canavalia* em espermatozóides bovinos / Cristian Kaefer. – 61f. : fig. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2012. – Orientador João Carlos Deschamps ; co-orientador Tiago Collares, Vinicius Farias Campos.

1.Biotecnologia. 2.Estresse oxidativo. 3.Peroxidação lipídica. 4.Sêmen. 5.Lectinas. 6.ConA. 7.ConBol. 8.ConBr. I.Deschamps, João Carlos. II.Collares, Tiago. III.Campos, Vinicius Farias. IV.Título.

CDD: 636.208243

Banca examinadora:

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Tiago Collares, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. João Carlos Deschamps, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Marta Gonçalves do Amaral, Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelos dons que me concedeu e por estar finalizando este mestrado em uma Universidade de excelência, como a Universidade Federal de Pelotas.

Um agradecimento especial a minha mãe e minha tia por estarem sempre ao meu lado, acreditando e confiando. Obrigado pelo apoio, incentivo e amor em todos os momentos. Dedico esta conquista a vocês.

Ao meu orientador João Carlos Deschamps, pelo exemplo de pesquisador, pelas oportunidades que me foram apresentadas e pelo paternalismo com que zela por seus alunos.

Ao meu co-orientador Tiago Collares, pelo voto de confiança, pela oportunidade de participar de seu grupo, pelo incentivo e pelos ensinamentos científicos que foram de grande valia durante minha formação.

À caríssima amiga e colega Eliza Rossi, sempre com uma alegria contagiante esteve presente em todas as etapas deste trabalho de forma responsável e competente. Obrigado por me estimular e guiar no aprendizado de diversos aspectos da reprodução animal. Agradeço, ainda, pela amizade além dos limites do laboratório e pelo bom humor frequente, mesmo em situações difíceis.

Ao amigo e Prof. Vinicius Farias Campos (Cazuza) que colaborou e me orientou em todas as etapas deste trabalho, servindo como modelo de profissionalismo e dedicação à ciência.

Às amigas Karine Begnini, Virgínia Yurgel e Duda Schultze pelo companheirismo, amizade, alegria e reflexões com que me tem presenteado ao longo desse tempo. Vocês foram fundamentais durante os altos e baixos que se alternaram nesse período.

Ao meu grande companheiro de jornada, Marcos, por aguentar minhas agonias e desesperos e também por compartilhar as felicidades. Um imenso obrigado por estar sempre ao meu lado ajudando em tudo possível.

À todos os amigos do grupo GPO pela ajuda e pelos momentos divertidos que passamos juntos no dia a dia, tornando a rotina mais prazerosa: Samuel, Ludmila, Helena, Priscila, Stéphanie, Fernanda, Marrí, Tati, Carol, Gabriel, Cris, Ruan, Emily, Lucas, Otávio e Lisiane.

Ao professor Benildo Sousa Cavada e sua equipe por ter colaborado em grande parte com este trabalho por ceder-nos gentilmente as lectinas.

A CAPES pela bolsa de estudos.

Obrigado a todos!

RESUMO

KAEFER, Cristian. **Toxicologia reprodutiva: padrão de ligação e efeitos de lectinas do gênero *Canavalia* em espermatozoides bovinos**. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A membrana externa dos espermatozoides de mamíferos é coberta pelo glicocálice, uma camada rica em carboidratos que é crucial para as funções e interações dos gametas masculinos com o ambiente extracelular. Vários fatores afetam a motilidade e a integridade funcional dos espermatozoides, sendo o dano causado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) um importante fator. Lectinas são proteínas que se ligam de forma específica a resíduos de carboidratos. Essas proteínas são ferramentas úteis para a investigação da distribuição e alteração de glicoconjugados de membrana. Estudos investigaram o estresse oxidativo em células espermáticas, porém, até o momento, não foram realizados trabalhos para avaliar o efeito de lectinas vegetais no estresse oxidativo em espermatozoides. O presente estudo teve por objetivo investigar o padrão de ligação e os efeitos das lectinas ConA, extraída de *Canavalia ensiformis*, ConBol, extraída de *C. boliviana*, e ConBr, extraída de *C. brasiliensis*, na motilidade, viabilidade, peroxidação lipídica, e geração de ROS em espermatozoides bovinos. Foi observado que as três lectinas se ligaram aos espermatozoides, mas com algumas diferenças. A lectina ConA não se ligou ao segmento equatorial, localizado entre a capa acrossomal e a região pós-acrossomal. Em 18% dos espermatozoides marcados com ConBol não houve ligação da lectina na região do acrossoma. Já em 45% das células marcadas com ConBr houve uma ligação de aspecto fragmentado a cabeça do espermatozoide. A incubação com as lectinas do gênero *Canavalia* produziu um decréscimo na motilidade. ConA e ConBr demonstraram um grande efeito na diminuição da motilidade espermática logo após a incubação ($13.3 \pm 3.3\%$ em ambas as lectinas vs. $60 \pm 5.7\%$) ($P < 0.05$). A motilidade mais baixa ocorreu com a concentração de $15 \mu\text{g/ml}$ de ConBr após 2h de incubação ($1.6 \pm 1.7\%$). A viabilidade celular e a peroxidação lipídica não foram afetadas por nenhuma das lectinas testadas ($P > 0.05$). No entanto, as lectinas ConA, ConBol e ConBr apresentaram comportamento similar causando um aumento na produção de ROS ao longo do tempo comparado com o controle ($P < 0.05$). Em conclusão, este estudo demonstra que as lectinas ConA, ConBol e ConBr ligam-se aos carboidratos de membrana de espermatozoides bovinos e induzem uma diminuição da motilidade e aumento na geração de ROS, que pode levar a perda da função celular.

Palavras-chave: ConA, ConBol, ConBr, lectinas, sêmen, estresse oxidativo, peroxidação lipídica.

ABSTRACT

KAEFER, Cristian. **Toxicologia reprodutiva: padrão de ligação e efeitos de lectinas do gênero *Canavalia* em espermatozoides bovinos.** 2012. 61f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The outer membrane of mammalian sperm is covered by the glycocalyx, a layer rich in carbohydrates which is crucial for the functions and interactions of male gametes with the extracellular environment. Several factors affect the motility and functional integrity of sperm, being the damage caused by excessive production of reactive oxygen species (ROS), an important factor. Lectins are proteins that bind specifically to carbohydrate residues. These proteins are useful tools for investigating the distribution and changes of membrane glycoconjugates. Studies have investigated the oxidative stress in sperm cells, however, to date, no studies have been conducted to evaluate the effect of plant lectins on oxidative stress in spermatozoa. The present study aimed to investigate the pattern of binding and the effects of lectins ConA, extracted from *Canavalia ensiformis*, ConBol, extracted from *C. boliviana*, and ConBr, extracted from *C. brasiliensis*, on motility, viability, lipid peroxidation, and ROS generation in bovine sperm. The three lectins bound to sperm, but with some differences. It was observed that the lectin ConA did not bind to the equatorial segment located between the acrosomal cap and post-acrosomal region. In 18% of sperm cells labeled with ConBol there was not binding in the acrosome region and 45% of ConBr labeled cells showed a fragmented binding to the sperm head. Sperm incubation with *Canavalia* lectins produced a decrease in motility. ConA and ConBr demonstrated a strong effect to decline motility soon after incubation ($13.3 \pm 3.3\%$ in both lectins vs. $60 \pm 5.7\%$) ($P < 0.05$). The lowest motility values found was at the $15 \mu\text{g/ml}$ concentration after 2h incubation for ConBr ($1.6 \pm 1.7\%$). The cell viability and lipid peroxidation were not affected by any lectin tested ($P > 0.05$). However, ConA, ConBol and ConBr lectins showed similar behavior causing a increase of ROS production over time compared with control ($P < 0.05$). In conclusion, this study demonstrates that sperm incubation with ConA, ConBol and ConBr lectins induce a decrease in motility and an increase generation of ROS that can led to a spermatozoon dysfunction.

Keywords: ConA, ConBol, ConBr, lectins, sperm, oxidative stress, lipid peroxidation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-hidroxinonenal – 4-HNE

ATP – Adenosina trifosfato

ConA – Lectina Concanavalina A

ConBol – Lectina de *Canavalia brasiliensis*

ConBr – Lectina de *Canavalia brasiliensis*

DCF – 2',7'-dichlorofluorescein diacetate

DCHF – A 2',7'-dichlorodihydrofluorescein

DCHFDA – 2',7' '-dichlorodihydrofluorescein diacetate

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

LPO – Lipoperoxidação

MDA – Malondialdeído

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NO – Óxido nítrico

O₂ – Oxigênio

O₂^{•-} – Ânion superóxido

OH – Radical hidroxila

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

RNOO⁻ – Radical peroxil

ROS – espécies reativas de oxigênio

SDS – Sódio dodecil sulfato

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Espécies reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Lectinas	10
2.1.1 Classificação	12
2.1.2 Lectinas Vegetais	12
2.1.2.1 ConA	13
2.1.2.2 ConBr	14
2.1.2.3 ConBol	15
2.2 Estresse Oxidativo	15
2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres	15
2.2.2 Principais antioxidantes	18
2.2.3 Substratos celulares para ROS	19
2.2.3.1 Lipídeos	19
2.2.3.2 Proteínas	20
2.2.4 Impacto do estresse oxidativo em espermatozoides	21
2.2.4.1 Motilidade espermática e peroxidação lipídica	22
2.2.5 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	23
3 ARTIGO	24
5 CONCLUSÕES	48
6 REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que a membrana externa dos espermatozoides ejaculados de mamíferos possua pelo menos 300 diferentes proteínas (NAABY-HANSEN et al., 1997) e que muitas destas sejam glicosiladas, formando o que é geralmente referido como o glicocálice espermático. Essa camada possui de 20 a 60 nm de espessura e representa a interface entre o gameta masculino e o seu meio extracelular. Aparentemente, todas as interações entre o espermatozoide e o seu ambiente devem, inevitavelmente, envolver uma interação com esta estrutura, sendo assim um componente vital do processo de fertilização (KIRCHHOFF; SCHROTER, 2001). Os carboidratos da membrana espermática são cruciais para as funções e interações dos gametas masculinos, como a capacitação, reação acrossômica, ligação do espermatozoide com o oócito e penetração da zona pelúcida.

Lectinas são uma classe de proteínas que são capazes de se ligar de forma específica a resíduos de carboidratos. Acredita-se que essas proteínas contribuem dinamicamente para o reconhecimento de células tumorais, adesão e localização celular, transdução de sinais através de membranas, estimulação mitogênica, potencialização da defesa imunológica do hospedeiro, citotoxicidade e apoptose (WANG et al., 2000).

A lectina Concanavalina A (ConA), extraída das sementes de *Canavalia ensiformis* (Família Leguminosae, Tribo Phaseoleae, Subtribo Diocleinae) foi a primeira a ser isolada (SUMNER; HOWELL, 1936) e é extensivamente caracterizada e estudada com respeito aos seus efeitos biológicos. Outras lectinas com similaridade estrutural com a ConA tem sido isoladas de sementes de outras espécies do gênero *Canavalia*, entre elas estão a lectina ConBr, extraída de sementes de *C. brasiliensis* (MOREIRA; CAVADA, 1984), e a lectina ConBol, extraída das sementes de *C. boliviana* (MOURA et al., 2009). Apesar de essas três

lectinas possuem alta afinidade por resíduos de D-manose e do alto grau de identidade observado entre as lectinas isoladas da Subtribo Diocleinae, elas podem apresentar efeitos biológicos diferenciados (CAVADA et al., 2001).

Mudanças na membrana plasmática de espermatozoides têm sido estudadas através de lectinas, sendo empregadas como marcadores de superfície para determinar os componentes de sacarídeos de membrana dessas células. A sequência de oligossacarídeos presentes na superfície de espermatozoides ejaculados tem sido caracterizada com o uso de lectinas em várias espécies de mamíferos, como bovinos (TAITZOGLU et al., 2007), equinos (DESANTIS et al., 2010) e humanos (DE CEREZO et al., 1996). O conhecimento do padrão de ligação de lectinas em oligossacarídeos de membrana em espermatozoides pode fornecer informações úteis sobre a biologia reprodutiva. Além disso, a ligação de lectinas pode ser uma ferramenta útil para examinar a capacidade dos espermatozoides de sofrer capacitação e reação acrossômica (DESANTIS et al., 2010).

Embora o oxigênio seja um elemento essencial para todos os organismos aeróbios, ele é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em concentrações baixas ou fisiológicas, a geração de ROS é benéfica, atuando na capacitação espermática, reação acrossômica e dando suporte a fertilização do oócito (BAUMBER et al., 2000). No entanto, quando são produzidas acima das concentrações consideradas ótimas elas acarretam vários efeitos deletérios sobre a função e viabilidade das células espermáticas (SALEH; AGARWAL, 2002) devido a alterações na fluidez e integridade das membranas como uma consequência da peroxidação lipídica (LPO) (PARTYKA et al., 2012; DA SILVA et al., 2011).

Vários estudos tem investigado o estresse oxidativo em espermatozoides (KADIRVEL et al., 2009; CHATTERJEE; GAGNON, 2001), entretanto até o presente momento não há estudos sobre os efeitos de lectinas vegetais no estresse oxidativo em espermatozoides bovinos.

O presente estudo teve por objetivo analisar o padrão de ligação e os efeitos das lectinas ConA, ConBoI e ConBr na motilidade, viabilidade, peroxidação lipídica e produção de ROS em espermatozoides bovinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lectinas

Lectinas formam uma classe heterogênea de proteínas que se ligam especificamente e reversivelmente a carboidratos (SHARON; LIS, 1989) e que estão envolvidas em diversos fenômenos naturais. Dentre esses, destacam-se os processos de fertilização, embriogênese, migração celular, formação de órgãos e defesa imunológica (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas são referidas como hemaglutininas, ou fitoaglutininas, porque foram originalmente encontradas em plantas e podem causar aglutinação celular (SHARON; LIS, 2004; LIS; SHARON, 1998). O termo lectina (do latim *legere*, que significa selecionar ou escolher) foi introduzido por Boyd para designar uma gama maior de atividades que envolvem seletividade para carboidratos específicos (BOYD, 1963).

Atualmente a definição mais aceita sugere que lectinas são proteínas de origem não imune que contêm pelo menos um domínio não catalítico que se liga de maneira reversível a mono ou oligossacarídeos específicos, podendo ou não apresentar em sua estrutura domínios catalíticos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Lectinas podem reconhecer mono-, oligo- ou polissacarídeos, bem como glicoconjugados e, assim, reconhecer glicoproteínas ou glicolipídeos, por exemplo, na superfície das células (SHARON; LIS, 1995). Cada molécula de lectina contém geralmente dois ou mais sítios de ligação a carboidratos. Assim, suas interações na superfície de membranas que expressam múltiplos carboidratos (como eritrócitos) resultam na ligação cruzada das células e sua subsequente precipitação (REEKE; BECKER, 1988). Este fenômeno conhecido como aglutinação celular, é um atributo essencial da atividade das lectinas e é usado rotineiramente para a sua detecção e

caracterização. Ambos os processos de aglutinação e precipitação são inibidos pelos açúcares ligantes para os quais as lectinas são específicas.

Para ser considerada como uma lectina, uma determinada proteína ou glicoproteína deve preencher três requisitos: (i) se ligar a carboidratos; (ii) ser distinta de imunoglobulinas e (iii) não modificar bioquimicamente o carboidrato ao qual se liga (GOLDSTEIN; HAYES, 1980; GABIUS, 1997; RÜDIGER; GABIUS, 2001). Lectinas podem ser obtidas a partir de quase todos os organismos vivos: microorganismos (vírus e bactérias), plantas e animais (SHARON; LIS, 2004; AMBROSI et al., 2005; PEUMANS et al., 2001; KILPATRICK, 2002; MISLOVICOVA et al., 2009).

A primeira lectina purificada, Concanavalina A (Con A, obtida a partir de um tipo de feijão-de-porco da espécie *Canavalia ensiformes*) foi isolada por Sumner em 1919. Mais tarde, Watkins e Morgan descobriram que essas proteínas desempenham um papel crucial na elucidação da base molecular para a especificidade do grupo sanguíneo (ZATTA; CUMMINGS, 1992). Atualmente, as investigações das interações entre lectinas e carboidratos focalizam seus papéis no reconhecimento celular, bem como a aplicação destas proteínas para o estudo de carboidratos em solução e na superfície das células.

Tabela 1 – Aplicações de lectinas vegetais como ferramentas em ciências médicas e básicas (Adaptado de RÜDIGER; GABIUS, 2001).

Áreas	Aplicações
Biologia Celular	- Investigação da superfície celular durante sua divisão e diferenciação, auxiliando o estudo de alguns tumores. - Análise de mecanismos envolvidos na glicosilação das proteínas. - Fracionamento de populações celulares. - Modulação do status de ativação celular.
Bioquímica	- Purificação de glicoconjugados por cromatografia de afinidade. - Quantificação e análise de glicoconjugados.
Medicina	- Identificação de grupos sanguíneos (ABO humano). - Marcador celular para diagnóstico de agentes infecciosos. - Indutores de regeneração celular (agentes mitogênicos).

2.1.1 Classificação

Baseado na estrutura e nas propriedades de aglutinação e precipitação, PEUMANS e VAN DAMME (1998) classificaram as lectinas vegetais em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

a) Merolectinas: são proteínas monovalentes, de cadeia única que apresentam um único sítio responsável pela ligação com carboidratos. São proteínas pequenas e por serem monovalentes, são incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como exemplo, podemos citar as proteínas monoméricas das orquídeas.

b) Hololectinas: contém pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos, idênticos ou muito similares. Devido a sua natureza di ou multivalente, aglutinam células e também podem precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence ao grupo das hololectinas. Essa classe de lectinas está representada pelas hemaglutininas ou fitoaglutininas.

c) Quimerolectinas: são proteínas que possuem um ou mais sítios de ligação para carboidratos e outro sítio com atividade catalítica (ou outra atividade biológica) que funciona independentemente daquele de ligação para carboidratos. Dependendo do numero de sítios para carboidratos, quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas.

d) Superlectinas: possuem pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos diferentes; um exemplo de superlectina é a lectina do bulbo de tulipa, a qual possui dois sítios de ligação a carboidratos, sendo um específico para manose e outro para N-acetilgalactosamina.

2.1.2 Lectinas Vegetais

As lectinas são ubíquas na natureza, mas a grande maioria das lectinas isoladas e caracterizadas são de origem vegetal. Nas plantas, as lectinas são encontrados principalmente em órgãos de armazenamento, como sementes, mas pequenas quantidades também estão presentes nas folhas, caule, raízes ou flores (RÜDIGER; GABIUS, 2001). A principal localização intracelular das lectinas vegetais

1 está dentro dos corpos proteicos, mas as lectinas também ocorrem no citoplasma e
2 no espaço intercelular (PEUMANS et al., 2000).

3 Em recentes estudos, foi observado que quando as plantas sofrem estímulos
4 específicos bióticos ou abióticos, essas respondem com a expressão de lectinas
5 citoplasmáticas ou nucleares. A localização e expressão dessas proteínas indicam
6 que estão envolvidas em interações endógenas com carboidratos. Esses achados
7 conduzem a idéia de que lectinas podem estar envolvidas na regulação e
8 sinalização celular (VAN DAMME et al., 2004) e também na defesa vegetal contra
9 patógenos e predadores (MURDOCK; Shade, 2002).

10 As lectinas extraídas de plantas têm sido amplamente utilizadas no estudo
11 de eventos moleculares relacionado à fisiologia celular animal (CAVADA et al., 2001;
12 FAY; BOWIE, 2006) como produção de óxido nítrico e mecanismos de apoptose e
13 proliferação celular (ANDRADE et al., 1999; CAVADA et al., 2001).

14 Entre as lectinas vegetais mais estudadas estão as da família Leguminosae,
15 principalmente aquelas isoladas de sementes da subtribo Diocleinae incluindo os
16 gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*. Observa-se que as lectinas dessa família
17 representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes
18 especificidades a carboidratos (CAVADA et al., 2001).

20 **2.1.2.1 ConA**

21
22 A lectina ConA é a lectina vegetal mais bem estudada. Tem sido
23 caracterizada quanto a sua estrutura e efeitos biológicos sobre células de
24 mamíferos. A ConA é uma lectina D-glicose/D-manose específica e seu monômero
25 contém 237 resíduos de aminoácidos e tem a capacidade de precipitar
26 polissacarídeos complexos (CAVADA et al., 2001). Visto que a glicose e manose são
27 frequentemente encontradas em glicoconjugados de membrana de um grande
28 número de células, a ConA pode se ligar a muitos tipos diferentes de células de uma
29 ampla gama de organismos (ZHAO et al., 2002).

30 A fácil preparação da ConA e o grande número de sacarídeos com os quais
31 ela pode interagir, levaram a numerosos estudos com esta lectina (AMBROSI et al.,
32 2005). As aplicações da ConA incluem a marcação de estruturas de membrana de
33 células normais e tumorais, o estudo de glicosilação em células transformadas, e o

1 fracionamento de preparações de polissacarídeos, glicoproteínas e glicopeptídeos
2 em colunas de afinidade a ConA (CHATTERJEE; MANDAL, 2005). Essa lectina
3 também é um mitógeno de linfócitos, induzindo a proliferação de linfócitos T (JAIN et
4 al., 2000). Além disso, a ConA é utilizada na detecção da reação acrossômica em
5 espermatozóides de mamíferos (KOHN et al., 1997; NISHIKIMI et al., 1997).

6 A partir da purificação da ConA, várias outras lectinas com propriedades
7 físicas semelhantes têm sido isoladas de outras espécies da subtribo Diocleinae,
8 incluindo as lectinas ConBr (MOREIRA; CAVADA, 1984) e ConBol (MOURA et al.,
9 2009), dentre outras. Lectinas que fazem parte dessa subtribo partilham muitas
10 características, todas são específicas a glicose/manose e possuem estruturas
11 quaternárias semelhantes. Embora tenham similaridade estrutural e de afinidade por
12 determinados carboidratos, as lectinas desta subtribo podem apresentar efeitos
13 biológicos distintos (CAVADA et al., 2001).

15 **2.1.2.2 ConBr**

16
17 A lectina ConBr compartilha muitas semelhanças com a lectina ConA,
18 ambas pertencentes a subtribo Diocleinae. Esta lectina apresenta 99% da sequência
19 de aminoácidos idêntica a de ConA e a mesma especificidade por glicose/manose e
20 seus derivados (SANZ-APARICIO et al., 1997). Os efeitos biológicos da ConBr
21 incluem estimulação da produção de óxido nítrico por macrófagos, tanto *in vitro*
22 como *in vivo* (ANDRADE, 1999; BEZERRA et al., 2011), ativação ou geração de
23 apoptose em linfócitos (BARBOSA et al., 2001), a estimulação da liberação de
24 histamina em mastócitos (LOPES et al., 2005) e indução de apoptose e dano ao
25 DNA em células MCF-7 (FAHEINA-MARTINS et al., 2011). De acordo com SANZ-
26 APARÍCIO et al. (1997) a substituição de dois aminoácidos fora do sítio de união de
27 carboidratos pode ser responsável pela diferença na afinidade de ligação aos
28 açúcares e das atividades biológicas das lectinas Diocleinae.

2.1.2.3 ConBol

A lectina ConBol foi recentemente purificada e cristalizada por MOURA, et al. (2009). Comparada com outras lectinas da subtribo Diocleinae, esta lectina apresenta alta atividade anti-inflamatória (FIGUEIREDO et al., 2009) e também atua inibindo o crescimento de biofilmes de *Streptococcus mutans*, considerado o agente etiológico primário da cárie dental (CAVALCANTE et al., 2011).

2.2 Estresse Oxidativo

O termo "estresse oxidativo" se refere a um desequilíbrio entre o excesso na produção ou acúmulo de ROS e um mecanismo antioxidante defeituoso (SIKKA, 2001; AGARWAL et al., 2003). Células armazenadas em condições aeróbias, como durante o resfriamento, congelamento e descongelamento, necessitam de oxigênio (O_2) para sustentar o seu metabolismo normal (AGARWAL et al., 2003). Metabólitos excessivos de O_2 , como ROS, podem, no entanto, causar danos às células ou apoptose (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995). Exemplos de ROS são os radicais superóxido, radicais hidroxila e também o peróxido de hidrogênio, que é o produto final de reatividade de ROS e é considerado o oxidante mais tóxico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; AITKEN; KOPPERS, 2011).

Estudos indicam que as ROS possuem um importante papel na função espermática e que sua produção desequilibrada, ou sua degradação, podem causar efeitos adversos nos espermatozoides (TVRDA et al., 2011). Portanto, estes possuem tanto efeitos benéficos a baixas concentrações quanto efeitos deletérios a altas concentrações, dependendo do equilíbrio relativo entre sua produção e sua degradação.

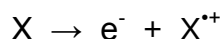
2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres

O oxigênio é essencial para a vida por ser necessário na produção de energia. No nível molecular, a energia celular é produzida pela fosforilação oxidativa mitocondrial, a partir do transporte de elétrons de doadores para receptores, como o

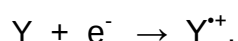
O₂. Durante essas etapas, o hidrogênio é fornecido na forma de equivalentes redutores (NADH) e a energia é produzida sob a forma de fosfatos de alta energia (ATP), enquanto que a redução de quatro elétrons do oxigênio molecular à água produz radicais livres e espécies reativas derivadas do oxigênio. Portanto, a geração de ROS é um subproduto essencial metabolismo básico em todos os indivíduos.

A expressão espécies reativas de oxigênio inclui não apenas os radicais livres de oxigênio, mas também os não radicais derivados de oxigênio como os agentes oxidantes e radicais de oxigênio baseados em carbono.

O termo radicais livres se refere a “qualquer espécie capaz da existência independente, que contém um ou mais elétrons desemparelhados” (HALLIWELL, 2006). Estas moléculas de curta duração, mas altamente reativas podem ser formadas pela perda de um único elétron de um não radical,



ou pelo ganho de um único elétron por um não radical,



Assim, os radicais livres atacam sempre a molécula estável mais próxima, capturando elétrons para estabilizar seus elétrons desemparelhados. A molécula que foi atacada se torna um radical livre em si e inicia uma cascata de reações em cadeia. Rapidamente, eles podem oxidar biomoléculas que se encontram nas suas proximidades exercendo uma influência positiva ou negativa sobre a função celular normal (WARREN et al., 1987; COCUZZA et al., 2007).

As ROS mais comuns e com potenciais implicações em biologia reprodutiva incluem o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxil e os muito reativos radicais hidroxila (FORD, 2004; MANEESH; JAYALEKSHMI, 2006). Os radicais livres derivados de nitrogênio, o óxido nítrico e o ânion peroxinitrato, também parecem desempenhar um papel importante na reprodução e fertilização (MANEESH; JAYALEKSHMI, 2006). O efeito do óxido nítrico depende principalmente da sua concentração e interações com o peróxido de hidrogênio. *In vivo*, o peroxinitrato pode ser formado a partir de superóxido e óxido nítrico, podendo reagir ativamente com a glutathione, cisteína, desoxirribose e outros tióis e tioéteres (KOPPENOL et al., 1992). ROS estão envolvidas no crescimento celular, diferenciação, progressão e morte celular (MATES et al., 1999). Baixos níveis de ROS podem ser benéficos em termos de sinalização intracelular e defesa contra micro-organismos (MATES et al., 1999).

1 a) Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

2 É um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um
3 elétron. É o primeiro intermediário na redução do oxigênio molecular para água na
4 cadeia respiratória. É formado em quase todas as células aeróbicas e é produzido
5 durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (FERREIRA;
6 MATSUBARA, 1997). É um radical pouco reativo e impermeável a membranas
7 lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido
8 (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Possui um tempo de vida médio de 1×10^{-6} s.

9
10 b) Radical hidroxila ($OH^{\cdot}$)

11 Possui meia vida curta (1×10^{-9} s). Altamente reativo, é considerado como a
12 ROS mais tóxica, atacando todos os componentes celulares. É formado a partir do
13 peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+),
14 denominada reação de Fenton (NORDBERG; ARNÉR, 2001; FERREIRA;
15 MATSUBARA, 1997). Responsável pelo início da oxidação dos ácidos graxos
16 poliinsaturados de membranas celulares (lipoperoxidação).

17
18 c) Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

19 O H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente
20 deletério porque participa como intermediário na reação que produz o $OH^{\cdot}$. É uma
21 molécula não carregada capaz de atravessar membranas biológicas. Possui meia
22 vida longa (NORDBERG; ARNÉR, 2001; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Uma vez
23 produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes:
24 catalase, glutational peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

25
26 d) Radical peroxil ($RNOO^{\cdot}$)

27 Agente oxidante. Extrai íons de hidrogênio de outras moléculas, o que é
28 importante na peroxidação lipídica. Possui meia vida de 1×10^{-2} s.

29
30 e) Óxido nítrico (NO)

31 Substância transmissora que reage com ânion superóxido para fazer
32 peroxinitrato, que reage ativamente com a glutational, cisteína, desoxirribose e tióis
33 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A atividade da óxido nítrico sintase é Ca^{2+}

dependente, envolvida em várias vias de sinalização (VIGGIANO et al., 1996; LEWIS et al., 1996; ZINI et al., 1996).

2.2.2 Principais antioxidantes

ROS são subprodutos comuns do metabolismo celular e como resultado, a maioria das células contém abundantes antioxidantes, a fim de prevenir ou minimizar a oxidação dos constituintes celulares por ROS. Antioxidantes celulares são uma combinação de sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. No entanto, se os níveis de ROS exceder os níveis de antioxidantes no interior da célula o estresse oxidativo ocorre podendo resultar em um dano oxidativo significativo.

O sistema enzimático é composto pelas enzimas: Superóxido dismutase (SOD); catalase, peroxiredoxinas, glutathione, glutathione redutase e glutathione peroxidase. Fazem parte do sistema não enzimático um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo as vitaminas C e E, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Esses sistemas podem atuar através de duas estratégias: como removedor do agente antes que ele cause lesão (glutathione reduzida, SOD, catalase, glutathione peroxidase e vitamina E) ou como reparador da lesão (ácido ascórbico) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A maior parte dos agentes antioxidantes encontram-se no meio intracelular, com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana.

Existem duas formas de SOD, a citosólica Cu/ZnSOD e a mitocondrial Mn/FeSOD. O ânion superóxido é o substrato para a SOD que prontamente converte os radicais livres em outro ROS, o peróxido de hidrogênio. Enquanto a SOD remove o ânion superóxido, o subsequente superóxido tem que ser removido por outros antioxidantes, particularmente por glutathione peroxidase e catalase. Considerando a importância da SOD como um antioxidante, os testículos também contêm uma única SOD extracelular que é secretada pelas células germinativas e pelas células de Sertoli (MRUK et al., 2002).

A Glutathione é um tripeptídeo, consistindo de um único glutamato, cisteína e glicina. Sua capacidade antioxidante vem do resíduo de cisteína, que contém um grupo sulfidril livre que elimina os radicais livres (WU et al., 2004). Apesar de não

1 ser propriamente um antioxidante, a glutathione redutase é fundamental, devido ao
2 seu papel na regeneração da glutathione oxidada, reduzindo-a com elétrons
3 pertencentes à nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (CHABORY et
4 al., 2010). A catalase é igualmente importante na remoção de peróxido de
5 hidrogênio, e está presente dentro do fluido seminal (WU et al., 2004).

6 A vitamina E é o termo coletivo para todas as 8 moléculas de tocoferol, dos
7 quais o α -tocoferol é o composto principal. A peroxidação lipídica é um ciclo de auto-
8 propagação que causa grandes danos à ácidos graxos insaturados. O α -tocoferol é
9 um potente removedor de radicais peroxil e provavelmente, o mais importante
10 inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação em animais (HALLIWELL;
11 GUTTERIDGE, 2007).

12 Ao contrário das células somáticas, os espermatozoides são os únicos que
13 não são mais capazes de realizar transcrição gênica (DADOUNE, 1995). Isso, e a
14 falta de espaço citoplasmático para armazenar enzimas antioxidantes, deixa o
15 espermatozoide em uma posição precária. No entanto, o trato reprodutivo masculino
16 compensa a falta de capacidade antioxidante interna banhando essas células em
17 uma complexa mistura de enzimas que realizam a limpeza de ROS enquanto estas
18 células estão atravessando o epidídimo, um processo que pode demorar 12 dias
19 (AMANN et al., 1976), e também quando essas células são ejaculadas no plasma
20 seminal. Um aumento significativo na geração de ROS como consequência de, por
21 exemplo, infecção, ao longo do tempo pode exceder os níveis de proteção
22 antioxidante fornecidos nesses fluidos e causar um estado de estresse oxidativo.

24 **2.2.3 Substratos celulares para ROS**

26 **2.2.3.1 Lipídeos**

28 A membrana plasmática de espermatozoides mamíferos, a qual é rica em
29 ácidos graxos poliinsaturados (ALVAREZ; STOREY, 1995), pode ser facilmente
30 danificada pela reação de ROS, como $\text{OH}^\cdot$, e os ácidos graxos poliinsaturados. Este
31 mecanismo é conhecido como reação de peroxidação lipídica (AGARWAL et al.,
32 2003). A peroxidação lipídica é composta de três etapas principais, iniciação,
33 propagação e terminação (YU, 1994).

A etapa inicial é o processo de produção de radicais lipídicos por ROS. Na etapa de propagação, o radical lipídico da etapa de iniciação ataca outras moléculas de ácidos graxos insaturados na membrana celular ou rouba o elétron do O₂ para formar radicais peroxil lipídicos (RPLs). O RPL abstrai o átomo de hidrogênio a partir de outras moléculas lipídicas resultando em hidroperóxidos lipídicos, que são estáveis até serem atacados por um metal de transição, gerando alcóxil e RPL que pode continuar a atacar outros ácidos graxos insaturados na membrana celular. Este passo se auto perpetua, razão pela qual a reação de peroxidação lipídica também é conhecido como uma reação em cadeia (AGARWAL et al., 2003; HERRERA; BARBAS, 2001). Na etapa de terminação os radicais livres se combinam para formar pares de elétrons estáveis. Esta etapa pode ser interrompida antes por antioxidantes que podem aprisionar os radicais livres (AITKEN; KOPPERS, 2011). A reação de peroxidação lipídica resulta em alterações na fluidez da membrana de espermatozoides e perda da integridade da membrana, bem como a perda irreversível da motilidade espermática (STOREY, 1997). A peroxidação lipídica reduz a capacidade dos espermatozoides humanos de penetrar oócitos (AITKEN; Krausz, 2001) e também está relacionada à quebra da fita de DNA (BAUMBER et al., 2000).

2.2.3.2 Proteínas

Os aminoácidos são organizados em uma cadeia linear de polipeptídeos em proteínas. Peptídeos individuais têm diferentes susceptibilidades à oxidação mediada por radicais (DU; GEBICKI, 2004; DEAN et al., 1997). Recentemente, foi mostrado que as proteínas podem ser os alvos iniciais de radicais, em vez de lipídios ou de DNA. Espécies reativas de hidroxil têm a capacidade de modificar covalentemente proteínas por ligações cruzadas causando agregação proteica. Posteriormente, as proteínas modificadas tornam-se sensibilizadas para proteólise ou pelo proteassoma (proteínas ubiquitiniladas) ou pelo lisossomo (YU, 1994). Se uma proteína de transporte ou um canal de proteínas é atacado por um radical, sua função comprometida pode alterar o gradiente transmembrana de íons e, consequentemente, prejudicar a função celular (HAUSSINGER, 1996). Resíduos de tirosina oxidados induzem ligações cruzadas entre proteínas, que por sua vez

1 mudam a conformação proteica, resultando na perda da função fisiológica de
2 determinadas proteínas efetoras (HOLLEY et al., 1993).

3 A oxidação de cadeias laterais de resíduos de lisina, prolina, arginina e
4 treonina pode diretamente formar grupos carbonila em proteínas (BEAL, 2002).
5 Indiretamente, proteínas carboniladas podem se originar de peróxidos lipídicos
6 reativos que iniciam a oxidação de proteínas por reações de adição de
7 malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE). MDA e 4HNE são produtos finais
8 da lipoperoxidação (BEAL, 2002; SZWEDA et al., 2002) e a indução da formação de
9 proteína carbonilada pode afetar indiretamente a atividade enzimática e,
10 consequente, vias metabólicas (SALVAYRE et al., 2002). A célula pode mudar de
11 proteólise à apoptose após um certo limite de acumulação em proteínas
12 carboniladas. Estudos indicam que a 4-HNE atua como uma molécula sinalizadora
13 para iniciar ou inibir uma determinada via metabólica (SZWEDA et al.,
14 2002;PETERSEN; DOORN, 2004).

16 **2.2.4 Impacto do estresse oxidativo em espermatozoides**

17
18 Desde a primeira observação feita por MacLeod (1943) de que
19 espermatozoides em meios ricos em oxigênio perdem a motilidade em um ritmo
20 acelerado, mas que poderiam ser resgatados pela enzima antioxidante catalase, o
21 estresse oxidativo tem se tornado uma área de pesquisa importante para a biologia
22 reprodutiva. TOSIC e WALTON (1950) seguiram com a descoberta de que
23 espermatozoides bovinos produzem peróxido de hidrogênio, resultando no
24 decréscimo em seu metabolismo. Estudos subsequentes constataram a geração de
25 ROS em espermatozoides em várias espécies, incluindo coelhos (HOLLAND;
26 STOREY, 1981; ALVAREZ; STOREY, 1984) camundongos, ratos (LEWIS; AITKEN
27 2001) e cavalos (BALL et al, 2001). Estimar os efeitos do estresse oxidativo nos
28 gametas masculinos não é um processo simples devido ao grande número de
29 moléculas que são substratos para o ataque dos radicais livres (principalmente
30 lipídios, proteínas e DNA).

2.2.4.1 Motilidade espermática e peroxidação lipídica

Peroxidação lipídica envolve a oxidação de ácidos graxos insaturados, e como examinado anteriormente, resulta em uma cadeia extremamente nociva de danos oxidativos. Ácidos graxos insaturados são mais suscetíveis ao ataque devido a um enfraquecimento das ligações do hidrogênio entre as suas duplas ligações adjacentes a grupos metileno. Membranas plasmáticas de espermatozoides são extremamente vulneráveis a peroxidação devido ao seu significativamente maior conteúdo de ácidos graxos insaturados em comparação com outros tipos de células (JONES, 1979; OLLERO et al., 2001). Por outro lado, acredita-se que a presença de ácidos graxos insaturados é essencial para os eventos de fusão de membrana envolvidos na fertilização, em particular a reação acrossômica e a fusão do espermatozoide/oócito.

Na sequência do estudo realizado por MACLEOD (1943), o próximo grande avanço foi alcançado por JONES (1979), que usou um promotor de ferro ferroso para induzir estresse oxidativo *in vitro* e, como resultado houve um significativo aumento na peroxidação lipídica e diminuição da motilidade dos espermatozoides. Esta relação entre a perda da motilidade e estresse oxidativo tem sido repetidamente demonstrado em estudos independentes (AITKEN et al., 1989; TWIGG et al., 1998; DURU et al., 2000). Assim, a exposição de espermatozoides humanos a ROS gerados extracelularmente induz a uma perda de mobilidade que está diretamente correlacionado com o nível de peroxidação lipídica experimentada pelos espermatozoides (GOMEZ et al., 1998).

A habilidade de antioxidantes, tais como α -tocoferol, para resgatar a motilidade dos espermatozoides *in vivo* e *in vitro* é mais uma evidência de que a peroxidação lipídica é uma das principais causas de perda da motilidade (AITKEN et al., 1989; SULEIMAN et al., 1996). De fato, a proporção da peroxidação lipídica em sêmen humano têm sido usadas para selecionar pacientes para tratamentos antioxidantes incorporando α -tocoferol (SULEIMAN et al., 1996).

Os mecanismos pelos quais a peroxidação lipídica leva à perda de motilidade provavelmente envolve mudanças na fluidez e integridade da membrana plasmática e uma consequente incapacidade para manter as funções críticas da membrana ao movimento flagelar. Além disso, a peroxidação lipídica irá interromper outras funções espermáticas que dependem da atividade da membrana, incluindo

1 fusão dos gametas e a capacidade de sofrer reação acrossômica (AITKEN et al.,
2 1993).

4 **2.2.5 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

5
6 A ocorrência de peroxidação lipídica em espermatozóides resulta em um
7 acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática que,
8 posteriormente, se decompõem para formas de malondialdeído (MDA). A
9 peroxidação lipídica é avaliada rotineiramente através da análise de substâncias
10 reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Este ensaio é baseado na reação entre o
11 MDA, um produto final da peroxidação lipídica, e moléculas de TBA em uma
12 proporção de 1:2. O produto possui uma cor rosada e pode ser medido em
13 espectrofotômetro usando comprimento de onda de 532 - 535 nm (JANERO, 1990).
14 Este teste tem sido extensamente utilizado para quantificar a peroxidação lipídica
15 sendo utilizado por muitos pesquisadores (IZQUIERDO-VEGA et al., 2010;
16 GAVELLA; LIPOVAC, 1998; CEROLINI et al., 2000; MORTE et al., 2008;
17 OGUZTURK et al., 2012).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

3 ARTIGO

**Reproductive toxicology: binding pattern and effects of lectins from genus
Canavalia on bovine sperm**

(Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Reproductive Toxicology*)

Reproductive toxicology: binding pattern and effects of lectins from genus *Canavalia* on bovine sperm

Cristian Kaefer^{1#}, Eliza R. Komninou^{1#}, Vinicius F. Campos^{1#}, Priscila M. de Leon¹, Benildo S. Cavada², Kyria S. Nascimento², Francielli M. Stefanello³, Alethéa G. Barschak³, João Carlos Deschamps¹, Fabiana K. Seixas¹, Tiago Collares^{1*}

¹*Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil*

²*Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil*

³*Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil*

*Corresponding author: BioMol-Lab. Universidade Federal do Ceará. CEP 60.451-970, Fortaleza-Ce, Brasil; Tel: +55-85-288.9818; Fax: +55-85-288.9818; E-mail: bscavada@ufc.br

These authors contributed equally for this study.

Abstract

The aim of this study was determine if the lectins from *Canavalia ensiformes* (ConA), *Canavalia boliviana* (ConBol) and *Canavalia brasiliensis* (ConBr) are able to bind to bovine sperm and if different concentrations of these lectins affect sperm motility, viability, lipid peroxidation and ROS production. The three lectins bound to sperm with differences. ConA lectin did not bind to the equatorial segment. In 18% of sperm cells labeled with ConBol there was no binding in the acrosome region and 45% of ConBr labeled cells showed a fragmented binding to the sperm head. Sperm incubation with *Canavalia* lectins decreased the motility. ConA and ConBr demonstrated a strong effect to decline motility soon after incubation ($13.3 \pm 3.3\%$ in both lectins vs. $60 \pm 5.7\%$). Cell viability and lipid peroxidation were not affected by any lectin ($P>0.05$). However, the lectins showed a increase of ROS compared with control ($P<0.05$). This study demonstrates that ConA, ConBol and ConBr lectins induce a decrease in motility and an increase generation of ROS that can led to a spermatozoon dysfunction.

Keywords: ConA, ConBol, ConBr, Sperm, Oxidative stress, Lipid peroxidation.

1. Introduction

Mammalian sperm surface is covered by a layer rich in carbohydrates that interacts with plasma membrane lipids (glycolipids) and proteins (glycoproteins) called glycocalyx. These glycocalyx on the sperm membrane is crucial for the functions and interactions of male gametes, *e.g.*, capacitation, acrosome reaction, sperm-oocyte binding and zona pelucida penetration (1-3). The functional domains distribution of the glycocalyx components is part of the key to understanding the complex biological functions of the spermatozoon during its post-testicular existence (2;4;5). Due to its extreme complexity, little is known about the structure and function of sperm glycocalyx (2).

Lectins are a class of proteins which are able to bind specifically to sugar residues of glycoconjugates. Diocleinae subtribe lectins form a large group of structurally similar proteins with distinct carbohydrate specificities (6). The concanavalin A lectin (ConA), purified from *Canavalia ensiformis* seeds (Leguminosae Family, Phaseoleae tribe, Diocleinae subtribe) was the first to be isolated and has been extensively studied and characterized with respect to its structure and biological effects. However, other lectins with structural similarity with ConA, have been isolated from seeds of other species of the subtribe Diocleinae. Among these are ConBr lectin, extracted from seeds of *C. brasiliensis* (7); and ConBol, extracted from seeds of *C. boliviiana* (8). Despite the affinity for D-mannose residues and high degree of identity observed between the lectins isolated from Diocleinae subtribe, they exhibit different biological activities (6) such as proinflammatory and antiinflammatory effects (9;10).

Lectin histochemistry is an useful tool for investigating glycoconjugate distribution and alteration as well as cell differentiation and functional maturation (11). Changes in plasma membrane accompanying *in vitro* capacitation and acrosome reaction, such as removal of specific glycoproteins, has been studied using these approach (12).

Oligosaccharide sequences of glycoproteins coating the surface of ejaculated sperm has been characterized using lectins in several mammalian species, as human (13), rabbit (14), ram (15), equine (11), boar (16) and bovine (17). In spermatology, ConA lectin is commonly used conjugated with a fluorescent dye to detect specific carbohydrates from the inner side of the acrosome, indicating acrosome reaction (18;19).

The lectin carbohydrate reaction can also change the physiology and influence the metabolism of the living cell (20). Thus, the knowledge of the lectin binding pattern on sperm oligosaccharides may provide useful information on the reproductive biology (11). Several studies have investigated the oxidative stress in sperm cells (21-23), however, to our knowledge, there is no other studies about the effects of plant lectins on sperm oxidative stress. The present study was performed to analyze the binding pattern and effects of ConA, ConBol and ConBr lectins on viability, motility, lipid peroxidation and ROS production in bovine semen.

2. Materials and methods

2.1. Lectins Acquisition

Lectins from seeds of the genus *Canavalia* were isolated by affinity chromatography on Sephadex G-50 matrix: *C. brasiliensis* (24), *C. brasiliensis* (7), and *C. boliviana* (8). After purification, lectins were dialyzed against distilled water and freeze-dried. For the experiments, lectins were dissolved in Opti-MEM I medium (Invitrogen®, USA). The protocol used for purification was similar to that described for crystallization of each lectin (8;24;25).

2.2. Sperm source

Sperm from three Nelore bulls was purchased from CRV Lagoa Ltd. (São Paulo, SP, Brazil). According to the supplier, there were 15×10^6 sperm per straw.

2.3. *Fluorescence microscopy / Labelling of sperm surface*

One frozen semen straw from each of the three bulls was thawed in a water bath (35 °C for 30 s) and all semen pooled was washed two times by centrifugation for 5 min at 250 x g in Opti-MEM I medium (Invitrogen® 97, USA). Concentration was adjusted to 1×10^6 sperm per labelling procedure. The spermatozoa were then incubated with 10 µg/ml of FITC-lectin diluted in PBS at 36°C for 3 minutes in the dark. After, the samples were washed two times again to remove excess fluorescent lectins, in order to avoid background, being finally placed on a glass slide and covered with a cover slip for fluorescence microscopy with fluorescein isothiocyanate filters (Olympus IX 51 – Japan; excitation range of 395–470 nm and emission spectrum of 509 nm).

2.4. *Sperm motility and sperm viability analyses*

Sperm motility and sperm viability were determined as described (26;27). Briefly, sperm motility was assessed in four to six fields of approximately 100 sperm each under a phase contrast microscope. Sperm viability was evaluated using the LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Invitrogen®, USA), according to the manufacturer's protocol. Sperm motility and viability were evaluated before and immediately after lectin incubation with sperm, and also 0.5, 1 and 2 hours after incubation. All evaluations were done independently by three persons, and data were averaged.

2.5. Lipid peroxidation

The level of substances reacting with 2-thiobarbituric acid (TBARS), reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation. The TBARS was measured as described by Esterbauer & Cheeseman (28), using a spectrophotometer. In test tubes was added 75 μ L of sample (concentration of 2×10^6 cells), 7.5 μ L of SDS, 150 μ L of 10% trichloroacetic acid and 230 μ L of thiobarbituric acid. The samples were incubated in boiling water bath for 25 minutes. After, the tubes were cooled in water for 5 minutes and centrifugated at 300g for 10 minutes. The absorbance was then measured on a spectrophotometer ($\lambda = 535$ nm). The lipid peroxidation levels were expressed as nmol TBARS/mg protein.

2.6. Measurement of ROS production

The 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHFDA) is membrane permeant and, therefore, is able to diffuse readily into cells. Within the cell, acetate groups are hydrolyzed by intracellular esterase, forming 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCHF). DCHF then fluoresces when it is oxidized by H_2O_2 to 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF). The level of DCF produced within the cells is related to the concentration of peroxide present; thus, its fluorescent emission enables measurement of the cellular peroxide level [33]. Sperm labelling with DCHFDA (Sigma #4091-99-0) was performed using 2×10^6 sperm per labelling procedure. The ROS staining was conducted as previously described by Owusu-Ansah et al. [34] with some modifications. Briefly, sperm cells were incubated with the DCHFDA dye in PBS for 20 minutes in a dark chamber at 38.5°C. Later, the samples were washed to avoid the

background. All washings were done with PBS by centrifugation at 250 x g for 5 min. Concentration was adjusted to 2×10^6 sperm per labelling procedure. After, the sperm samples were finally placed on a glass slide and covered with a cover slip for microscopic evaluation. The fluorescence emissions were recorded as TIFF files using a digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) attached to a fluorescence microscope (DP 12; BX 51; Olympus, Tokyo, Japan) after excitation at 480 nm and emission at 510 nm. The recorded images was analyzed using Cell[^]F software (Cell-F, New York, USA). The experiment was replicated three times with 100 cells in each replicate.

2.7. Experimental design

Three different lectins, *Canavalia ensiformis* agglutinin (ConA), *Canavalia brasiliensis* agglutinin (ConBr) and *Canavalia boliviana* agglutinin (ConBol), had their effect investigated in frozen-thawed semen.

One frozen semen straw from each of the three bulls was thawed in a water bath (35 °C for 30 s) and all semen pooled was washed two times by centrifugation for 5 min at 250 x g in Opti-MEM I medium (Invitrogen®, USA). Concentration was adjusted to 1×10^6 cells sperm samples were incubated with different lectin concentrations (1, 5, 10 or 15 µg/ml) at 37°C. The analysis were made immediately after incubation and after 0.5, 1 and 2 hours.

Controls included: (1) Opti-MEM I medium lacking lectin; (2) incubation with each lectin in the presence of mannose (0.1 M in Opti-MEM I) (29). All the experiments were repeated at least three times using separate pools of frozen-thawed semen.

2.8. Data analyses

Sperm motility, viability, TBARS and ROS production were compared using two-way ANOVA, followed by a Tukey test for multiple comparisons. Two factors were considered: lectin concentration (five levels) and time for lectin action (four levels). Significance was considered at $P < 0.05$ in all analyses. All data were expressed as mean $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. Labelling of sperm surface by FITC-lectins

All lectins bound to the majority of sperm surface, but the strength and the distribution of the responses were not equal. The ConA lectin, specific for terminal/internal D-mannose and D-glucose residues, bound to the majority of the sperm, except the portion of the equatorial segment. ConA generally showed a higher fluorescence intensity in the region of sperm acrosome, only the equatorial segment was not bound (Fig. 1A). The ConBol lectin tagged all sperm, having fluorescence intensity higher in the sperm head. Otherwise, 18% of ConBol-labeled sperm did not show fluorescence in the acrosome portion (Fig. 1B). The ConBr lectin also showed a higher affinity for sperm head. However, unlike of other lectins, in 40% of cells the ConBr showed a fragmented fluorescence at sperm head (Fig. 1C). Samples from the control group did not showed fluorescence, demonstrating that the FITC-labelling stand alone had no affinity to sperm. Inhibited lectins by preincubation with mannose also did not bind to sperm cells.

3.2. Effects of lectins on sperm motility and viability

The effect of increasing lectins concentrations on the sperm motility were shown in Fig. 1. Compared to control, all lectins induced a reduction of sperm motility during the incubation period ($P < 0.05$) (Fig. 2). The motility in control sample differed from all concentrations in ConA treated groups at time 0h, however, at time 1h and 2h the control group did not differed from 1 μ g. At time 0h, incubation with ConA lectin was associated with a significant decline in 45% of motility compared with the control (Fig. 2 A). ConBol treated samples showed a significant lower motility compared to control group at time 0h and 1h (Fig. 2 B). For ConBr lectin, control sample did not show difference to the group treated with 1 μ g of lectin at any time. It just had difference at 5 μ g, 10 μ g and 15 μ g concentrations (Fig. 2 C). The cell viability were not affected by lectin incubation, since no differences were found between treatments and control groups ($P > 0.05$) ramining between 31% to 72% of live cells during the observed time (Fig. 3). No difference in motility and viability was observed in the lectin inhibited groups.

3.2. Lipid peroxidation

We evaluated lipid oxidative damage (TBARS) in sperm cells incubated with ConA, ConBol and ConBr lectins (Fig. 4). Similarly to results achieved for viability, TBARS analysis showed no significant differences between the concentrations for the three lectins studied or over time ($P > 0.005$) with values ranging from 4 ± 0.9 to 6.3 ± 1.4 .

3.3. ROS

The effect of increasing lectins concentrations on the ROS generation in sperm were shown in Fig. 5. Following the results for sperm motility, ConA, ConBol and CONBr lectins

showed similar behavior causing a increase of ROS production over time compared with control ($P < 0.05$). The effect of the different lectin concentration only was observed in ConA treated groups, in wich the ROS production at concentrations of 5 μ g, 10 μ g and 15 μ g were higher than the 1 μ g concentration (Fig. 5 A). There were no differences for the distint ConBol and ConBr concentrations tested (Fig. 5 B, C). The highest ROS production exhibited by ConA occurred after 0.5h incubation (175 ± 8.7) while ConBol and ConBr demonstrated their highest generation of ROS at 2h incubation with values of pixel intensity of 185 ± 6.7 and 198.4 ± 9.4 , respectively. The lectins inhibited with mannose did not affect the ROS production.

4. Discussion

In this experiment, all lectins bound to sperm but the strength and the distribution of the responses were not equal. Recently, Desantis et al. (11) evaluate lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods, concluding that different distribution of glycoconjugates occurs on the sperm surface. They reported that ConA shows a moderate reaction for the acrosomal cap, weak staining with the post-acrosomal surface and a faintly visible reaction with the tail of sperm collected during the breeding and non-breeding periods. In the present study, ConA lectin bound to the majority of the sperm, except the portion of the equatorial segments, showing a high fluorescence intensity in acrosome portion. At the same time, 18% of ConBol-labeled sperm did not show fluorescence in the acrosome. According to Kuroda et al. (30), ConA lectin only binds to the acrosomal region of sperm that underwent a complete loss of plasma membrane covering the acrosome. In another study performed in fresh boar spermatozoa, in which changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction were assessed, FITC-labeled ConA weakly bound

to head and midpiece before capacitation, and after it was concentrated on acrosomal region (31). In our study, commercially frozen sperm was used to evaluate the effects of *Canavalia* lectins. It is well known that thawing process can induce the sperm capacitation and acrosome reaction. In this sense, we hypothesized that the high fluorescence intensity in acrosome region generated by FITC-labeled ConA could be associated to capacitated cells after thawing process and the lack of fluorescence in few FITC-labeled ConBol spermatozoa could be associated to uncapacitated cells.

ConBr and ConA lectins had a 99% identity in sequence of amino acids and also showed affinity for glucose/mannose residues (24). Here, ConBr showed less fluorescence intensity than the lectins ConA and ConBol, characterized by a weak labeling pattern. The lectin ConBr also showed a higher affinity for the portion of the head sperm, but compared to the other lectins studied, the labeling was weaker. The ConBr was also able to reveal a fragmented binding pattern in the sperm head. In spite of the several similarities between *Canavalia* lectins, it is possible that differences in the quaternary conformation of ConBr, as compared with ConA, may be the basis for these divergent phenotypes (24). Despite the common aspects among ConA, ConBr and ConBol they demonstrated several differences in their biological activities (32-34).

The entire surface of bovine sperm ConA reactivity indicates that the glycocalyx of this cell contains N-linked oligosaccharides, since this lectin binds to a range of N-linked high-mannose type glycans (35;36). The presence of N-linked glycans on the entire sperm surface contributes greatly to the properties of glycocalyx due their extraordinary flexibility (high degree of rotation and movement possible about each glycosidic bond) and microheterogeneity (3).

The sperm motility is closely related to functional status of spermatozoa mitochondria (37) and plasma membrane (38). ROS cause several damage in lipidic layers and are

1 responsible for the loss of motility (39). Motility is ATP-dependent (40) and ROS causes a
2 rapid decrease in intracellular ATP concentration (41). During incubation of the spermatozoa
3 with pFLAG-hLY, extracellular depletion of ATP in the presence of ROS has a detrimental
4 effect on motility. Intracellular ATP could not neutralize the toxic effect of high ROS
5 formation due to absent of iron and other transition metal, wich led to further decline of
6 spermatozoa motility.

7 The results presented in this paper showed an increase in ROS production by sperm
8 cells after incubation with *Canavalia* lectins tested. In a study realized by Oliveira et al. (42)
9 with murine splenocytes cultured with ConBr and ConA, nitric oxide (NO) production was
10 significant higher in the ConBr lectin-stimulated cultures than ConA. It is well established
11 that ROS like NO are beneficial to sperm physiology at low concentrations and promote
12 capacitation (43;44). During procedures where there is high ROS production, NO may be one
13 of the major free radicals causing damage. Despite the fact that both NO and ROS are
14 important signalling molecules, the increases detected in ROS levels present could be one
15 reason for the decreased motility observed.

16 A decline on motility was observed following incubation with *Canavalia* lectins.
17 Specifically, ROS have detrimental effects to sperm motility parameters (45). Lipid
18 peroxidation of the mammalian sperm membranes destroys the structure of the lipid matrix
19 due to the attacks of ROS. The damage eventually leads to loss of membrane integrity,
20 membrane deterioration, decreased sperm motility, loss in fertility, and sperm DNA damage,
21 through the oxidative stress and the production of cytotoxic aldehydes (46-48). The axoneme
22 and associated dense fibers of the mid-pieces in sperm, which are responsible for the sperm
23 motility, are covered by mitochondria that generate energy by oxidative phosphorylation.
24 Large amounts of ROS can impair the sperm motility, producing axonemal damage as a result
25 of ATP depletion (41;49).

1 However, in our study the decline in sperm motility that occurred in the presence of
2 the lectins was not accompanied by a detectable increase in lipid peroxidation. These might
3 indicate that sperm motility may be inhibited before any measurable increase in lipid
4 peroxidation due to be a more delicate indicator of oxidative stress (50). Therefore, sperm
5 motility may be affected by ROS through a mechanism of action separate to that of lipid
6 peroxidation. It has been suggested that, in somatic cell systems, H₂O₂ causes perturbations in
7 important biochemical functions, including rapid decrease in ATP levels and a consequent
8 depression of glycolytic flux (51). In a study realized by De Lamirande and Gagnon (52) they
9 showed that the inhibition of sperm motility after incubation with ROS was caused by a
10 depletion of ATP.

11 Although increased generation of ROS resulted in a marked decline in sperm motility,
12 there was no detectable decrease in sperm viability in our study. Our results demonstrated a
13 low level of cell damage, which was similar between ConA, ConBol and ConBr lectins. In
14 murine splenocytes the ConA and ConBr lectins also induced minimal damage to cell survival
15 (42). But analysis with other lectins have shown their activity on induction of cell death.
16 Mistletoe lectin was shown to stimulate increased apoptosis in neutrophils (53), *Abrus*
17 *agglutinin* stimulated apoptosis in thymocytes (54) and Con A induced cell death in cultivated
18 hepatocytes (55).

19 In summary, this study demonstrates that ConA, ConBol and ConBr lectins exhibited
20 different binding patterns on the sperm surface. Furthermore, they induce a decrease on sperm
21 motility accompanied of an increase in sperm ROS production. There was no loss of sperm
22 viability and the lipid peroxidation was no affect by lectin incubation.

24 **Acknowledgements**

This work was supported by Brazilian CNPq and FAPERGS. Both C. Kaefer and E.R. Komninou are students of the Graduate Program in Biotechnology at Universidade Federal de Pelotas and are supported by Brazilian CAPES, whereas B. S. Cavada, K. S. Nascimento and J.C. Deschamps are research fellows of CNPq.

Reference List

- (1) Topfer-Petersen E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum Reprod Update* 1999 Jul;5(4):314-29.
- (2) Diekman AB. Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cell Mol Life Sci* 2003 Feb;60(2):298-308.
- (3) Schroter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R. The glycocalyx of the sperm surface. *Hum Reprod Update* 1999 Jul;5(4):302-13.
- (4) Gadella BM, Rathi R, Brouwers JF, Stout TA, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci* 2001 Dec 3;68(3-4):249-65.
- (5) Bearer EL, Friend DS. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microsc Tech* 1990 Dec;16(4):281-97.
- (6) Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro TB, Barral-Netto M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Protein Pept Sci* 2001 Jun;2(2):123-35.

- (7) Moreira RA, Cavada BS. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol Plant Praga* 1984;26(113):120.
- (8) Moura TR, Bezerra GA, Bezerra MJ, Teixeira CS, Bezerra EH, Benevides RG, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia boliviana* Piper seeds. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2009 Mar 1;65(Pt 3):213-5.
- (9) Bezerra EH, Rocha BA, Nagano CS, Bezerra GA, Moura TR, Bezerra MJ, et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 May 20;408(4):566-70.
- (10) Figueiredo JG, da Silveira BF, Beserra IG, Teixeira CS, Luz PB, Bezerra EH, et al. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009 Nov;380(5):407-14.
- (11) Desantis S, Ventriglia G, Zizza S, Nicassio M, Valentini L, Di SA, et al. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. *Theriogenology* 2010 May;73(8):1146-53.
- (12) Taitzoglou IA, Kokoli AN, Killian GJ. Modifications of surface carbohydrates on bovine spermatozoa mediated by oviductal fluid: a flow cytometric study using lectins. *Int J Androl* 2007 Apr;30(2):108-14.
- (13) de Cerezo JM, Marquinez AC, Sarchi MI, Cerezo AS. Fucosylated glycoconjugates of the human spermatozoon. Comparison of the domains of these glycoconjugates with the alpha-fucosyl binding sites, and with lactosaminic glycoconjugates and beta-D-galactosyl binding site domains. *Biocell* 1996 Apr;20(1):11-20.

- 1 (14) Nicolson GL, Usui N, Yanagimachi R, Yanagimachi H, Smith JR. Lectin-binding sites
2 on the plasma membranes of rabbit spermatozoa. Changes in surface receptors during
3 epididymal Maturation and after ejaculation. *J Cell Biol* 1977 Sep;74(3):950-62.
- 4 (15) Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH. Changes in lectin-binding features of ram
5 sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biol Reprod*
6 1988 Apr;38(3):667-85.
- 7 (16) Vazquez JM, Martinez E, Pastor LM, Roca J, Matas C, Calvo A. Lectin
8 histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar
9 spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta*
10 *Histochem* 1996 Jan;98(1):93-100.
- 11 (17) Medeiros CM, Parrish JJ. Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-
12 induced capacitation. *Mol Reprod Dev* 1996 Aug;44(4):525-32.
- 13 (18) Nishikimi A, Yamada M, Minami N, Utsumi K. Evaluation of acrosomal status of
14 bovine spermatozoa using concanavalin a lectin. *Theriogenology* 1997 Oct
15 15;48(6):1007-16.
- 16 (19) Kohn FM, Mack SR, Schill WB, Zaneveld LJ. Detection of human sperm acrosome
17 reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum*
18 agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Hum Reprod* 1997
19 Apr;12(4):714-21.
- 20 (20) Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 1989 Oct
21 13;246(4927):227-34.

- (21) Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci* 2009 Aug;114(1-3):125-34.
- (22) Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 2001 Aug;59(4):451-8.
- (23) Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009 May;112(1-2):119-35.
- (24) Sanz-Aparicio J, Hermoso J, Grangeiro TB, Calvete JJ, Cavada BS. The crystal structure of Canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Lett* 1997 Mar 17;405(1):114-8.
- (25) Sumner JB, Howell SF. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol* 1936 Aug;32(2):227-37.
- (26) Campos VF, Komninou ER, Urtiaga G, de Leon PM, Seixas FK, Dellagostin OA, et al. NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology* 2011 May;75(8):1476-81.
- (27) Campos VF, de Leon PM, Komninou ER, Dellagostin OA, Deschamps JC, Seixas FK, et al. NanoSMGT: transgene transmission into bovine embryos using halloysite clay nanotubes or nanopolymer to improve transfection efficiency. *Theriogenology* 2011 Nov;76(8):1552-60.

- 1 (28) Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation
2 products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
- 3 (29) Gualandris L, Rouge P, Duprat AM. Membrane changes in neural target cells studied
4 with fluorescent lectin probes. *J Embryol Exp Morphol* 1983 Oct;77:183-200.
- 5 (30) Kuroda Y, Kaneko S, Oda T, Yoshimura Y, Nozawa S. Quantitative assessment of
6 human sperm acrosome reaction by using fluorescein isothiocyanate conjugated
7 concanavalin A--comparison between highly purified acrosome reacted with non-
8 acrosome reacted sperm. *Arch Androl* 1998 May;40(3):215-24.
- 9 (31) Jimenez I, Gonzalez-Marquez H, Ortiz R, Herrera JA, Garcii A, Betancourt M, et al.
10 Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome
11 reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 2003 Mar;59(5-6):1171-80.
- 12 (32) Rodriguez D, Cavada BS, Abreu-de-Oliveira JT, de-Azevedo-Moreira R, Russo M.
13 Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to
14 intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. *Braz J Med*
15 *Biol Res* 1992;25(8):823-6.
- 16 (33) Assreuy AM, Shibuya MD, Martins GJ, De Souza ML, Cavada BS, Moreira RA, et al.
17 Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian
18 beans. *Mediators Inflamm* 1997;6(3):201-10.
- 19 (34) Russi MA, Vandresen-Filho S, Rieger DK, Costa AP, Lopes MW, Cunha RM, et al.
20 ConBr, a Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds, Protects Against Quinolinic Acid-
21 Induced Seizures in Mice. *Neurochem Res* 2012 Feb;37(2):288-97.

- (35) Goldstein IJ, Hayes CE. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1978;35:127-340.
- (36) Debray H, Decout D, Stecker G, Montreuil J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur J Biochem* 1981;117:41-55.
- (37) Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003;8:115-28.
- (38) Ponzio MF, Busso JM, Ruiz RD, De Cuneo MF. Time-related changes in functional activity and capacitation of chinchilla (*Chinchilla lanigera*) spermatozoa during in vitro incubation. *Anim Reprod Sci* 2007;102:343-9.
- (39) Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 2002;57:1105-22.
- (40) Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, Chandsawangbhuwana C, Durrant B, Botvinick EL, et al. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *J Cell Physiol* 2008;217:745-51.
- (41) Delamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. 1. Effects on the motility in intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992;13:368-78.

- 1 (42) de Oliveira SF, das Neves SP, de Melo CM, Teixeira EH, de Sousa CB, Pereira VA, et
2 al. Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and
3 proliferative cytokine secretion. *Cell Tissue Res* 2011 Nov;346(2):237-44.
- 4 (43) Herrero MB, de LE, Gagnon C. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and
5 protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol Reprod* 1999 Sep;61(3):575-81.
- 6 (44) Zini A, de LE, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm
7 capacitation in vitro. *J Androl* 1995 Sep;16(5):424-31.
- 8 (45) Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the
9 pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003 Apr;79(4):829-43.
- 10 (46) Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid
11 peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989 Jul;41(1):183-97.
- 12 (47) Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship between iron-catalysed lipid
13 peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* 1993
14 May;98(1):257-65.
- 15 (48) Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian
16 spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete*
17 *Res* 1989;23:77-90.
- 18 (49) Garner DL, Hafez ESE. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez ESE, editor.
19 *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea&Febier; 1993. p. 167-82.
- 20 (50) Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of
21 reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity,

1 mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J Androl 2000
2 Nov;21(6):895-902.

3 (51) Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA, Jr., Schraufstatter IU, Sauerheber RD, Spragg
4 RG, et al. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and
5 mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets
6 inactivated by hydrogen peroxide. J Biol Chem 1988 Feb 5;263(4):1665-75.

7 (52) de LE, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the
8 motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. J Androl 1992 Sep;13(5):368-
9 78.

10 (53) Lavastre V, Cavalli H, Rathe C, Girard D. Anti-inflammatory effect of Viscum album
11 agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of
12 lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo. Clin Exp Immunol
13 2004 Aug;137(2):272-8.

14 (54) Hegde R, Maiti TK, Podder SK. Purification and characterization of three toxins and
15 two agglutinins from Abrus precatorius seed by using lactamyl-Sepharose affinity
16 chromatography. Anal Biochem 1991 Apr;194(1):101-9.

17 (55) Leist M, Wendel A. A novel mechanism of murine hepatocyte death inducible by
18 concanavalin A. J Hepatol 1996 Dec;25(6):948-59.

19
20
21
22
23

Figure Captions

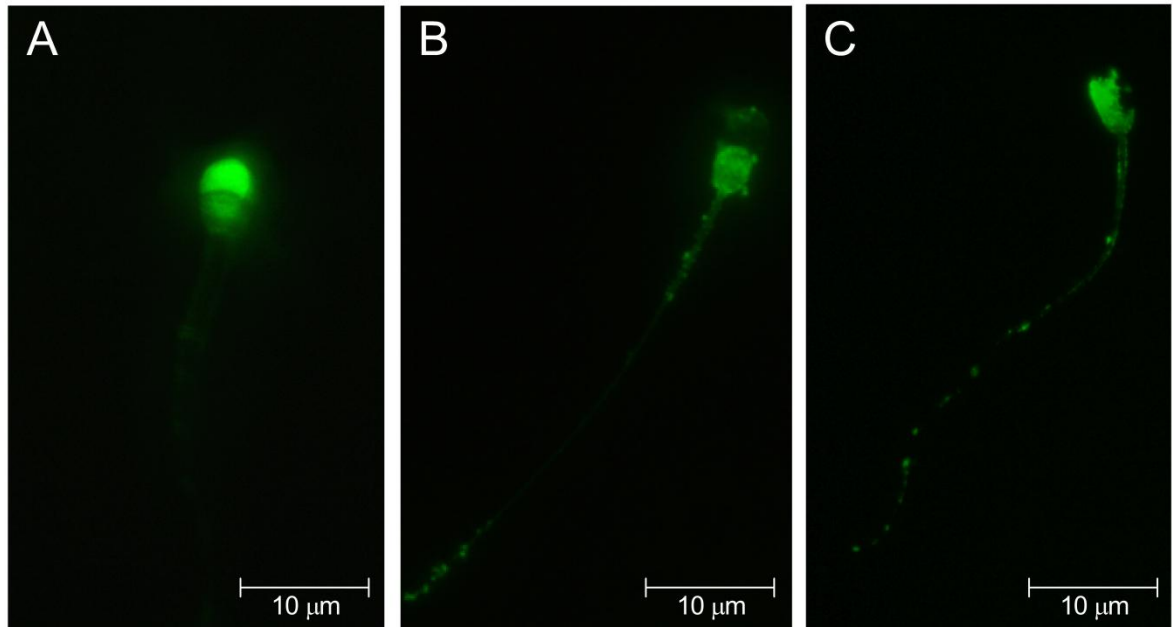


Fig. 1. Fluorescence microscopy photographs, magnification 400x. Bovine sperm stained with FITC-ConA, -ConBol and -ConBr lectins. ConA: spermatozoa showing that ConA lectin did not have bind only to the equatorial segment. ConBol: spermatozoa not showing lectin binding on acrosome region. ConBr: spermatozoa showing a fragmented lectin binding aspect to sperm head.

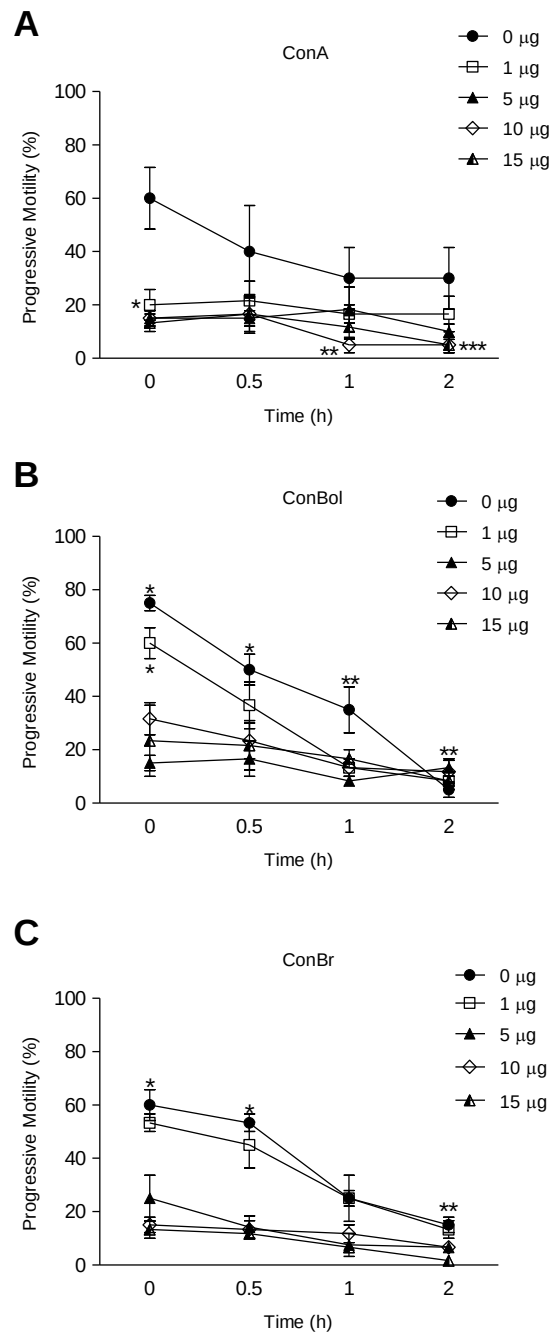


Fig. 2. Effects of lectins on progressive motility of bovine sperm.

A) ConA: * indicates that control differs from treated groups at time 0 h. ** Indicates that groups treated with 5, 10 and 15µg differ from control group at time 1 h. *** indicates that groups treated with 5, 10 and 15µg differ from control group at time 2 h; B) ConBol: * indicates that control differs from treated groups; C) ConBr: * indicates that control and 1µg differ from other groups. ** indicates that do not have difference between groups.

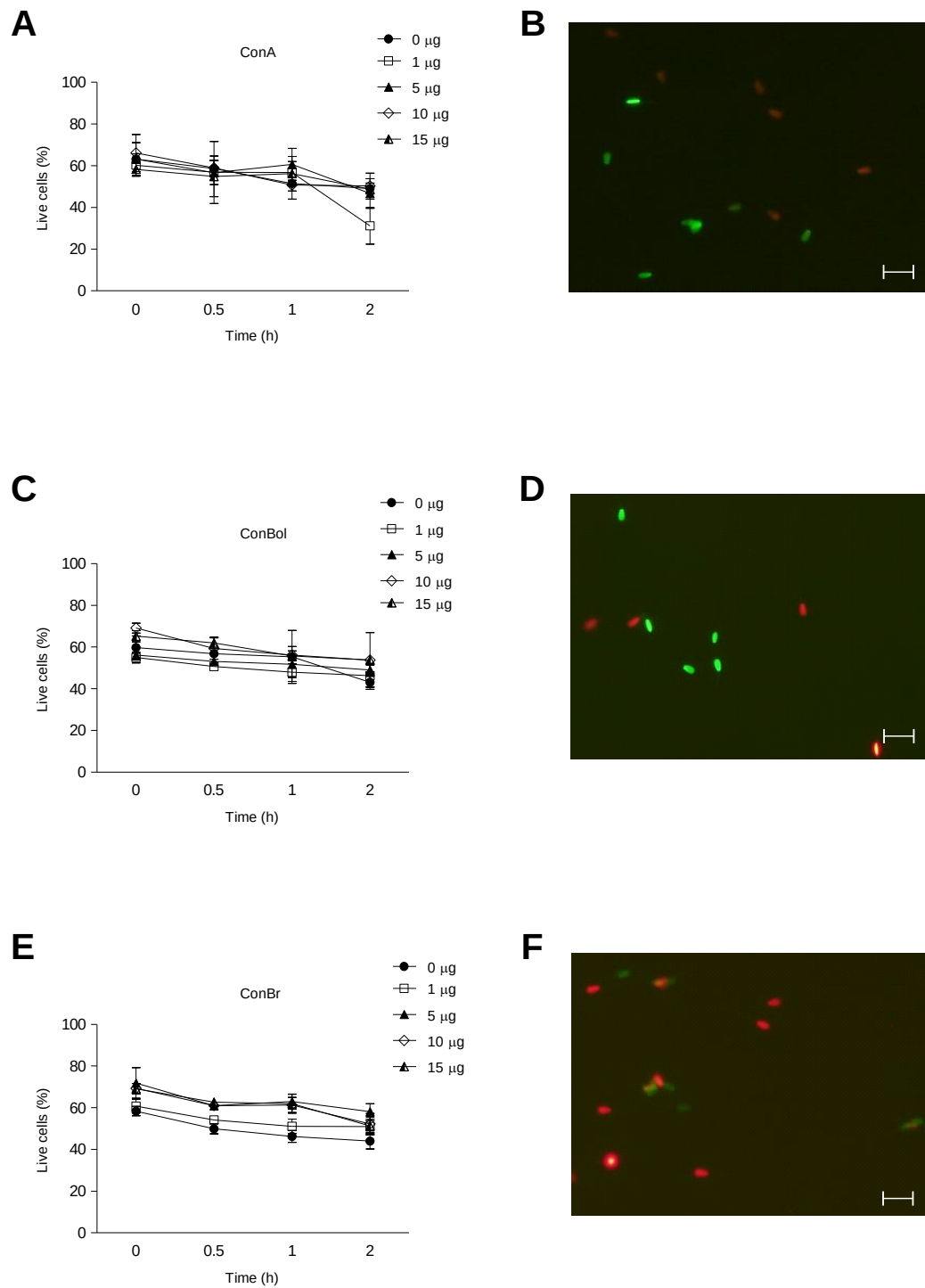


Fig. 3. Viability of bovine spermatozoa incubated with different lectins concentrations. A) ConA; B) Sperms incubated with ConA and stained with Live/Dead[®] Sperm Viability Kit; C) ConBol; D) Sperms incubated with ConBol and stained with Live/Dead[®] Sperm Viability Kit. E) ConBr; B) Sperms incubated with ConBr and stained with Live/Dead[®] Sperm Viability Kit. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Scale bar is 20 μm .

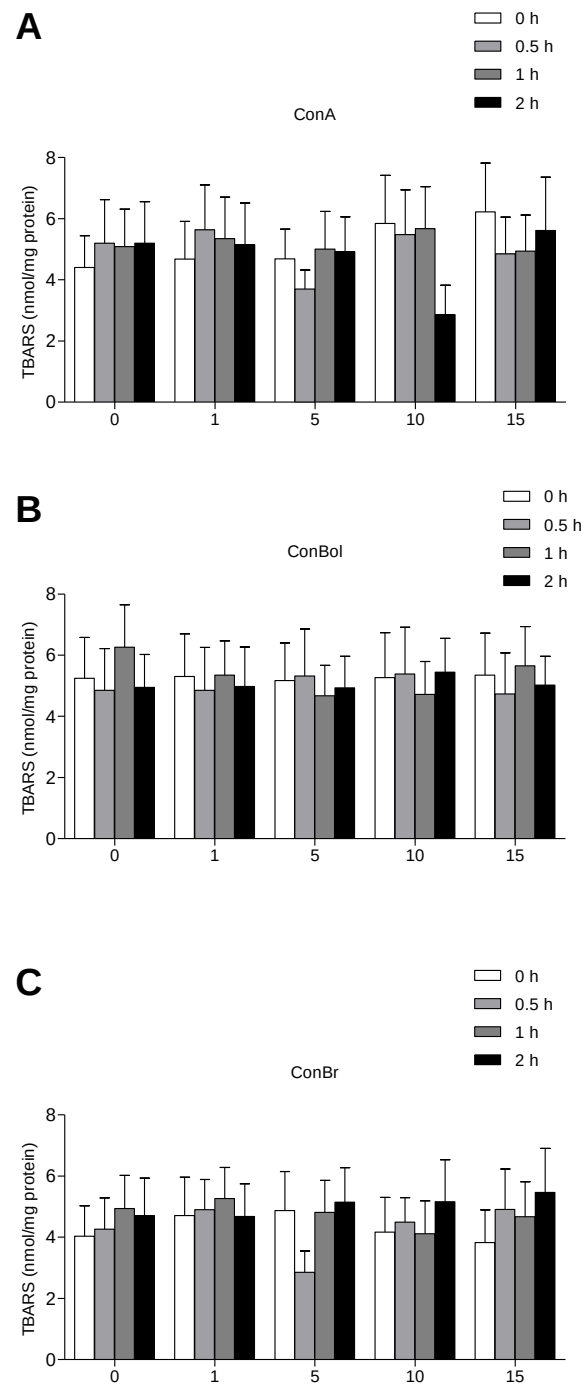


Fig. 4. Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) in bovine spermatozoa treated with different concentrations of lectins ConA, ConBol and ConBr (A, B, C, respectively). Data are expressed as means $\pm$ SEM.

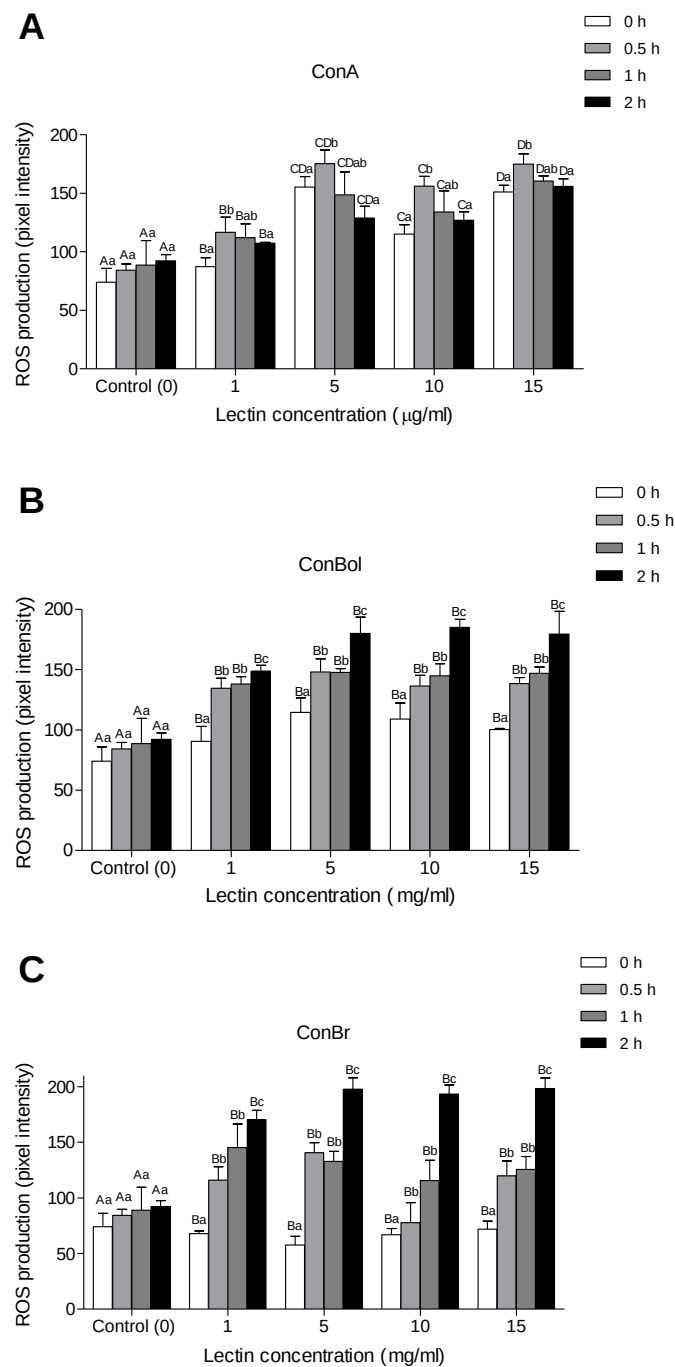


Fig. 5. ROS production (pixel intensity) in bovine spermatozoa treated with different concentrations of lectins ConA, ConBol and ConBr. Data showewd in A, B, C, demonstrate an increase of fluoreshnce intensity exhibited by the DCHFDA in spermatozoa incubated with Diocleinae lectins. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Treatments without a common uppercase superscript differ ($P < 0.05$). Within incubation time, numbers without a common lowercase superscript differ ($P < 0.05$).

5 CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível concluir que:

- ConA, ConBol e ConBr exibem diferentes padrões de ligação à superfície do espermatozoide.
- Estas lectinas causam uma diminuição da motilidade espermática.
- A viabilidade celular e a peroxidação lipídica não são afetadas pela incubação com estas lectinas.
- ConA, ConBr e ConBol causam um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides bovinos.

6 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A., SALEH, R.A., BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p.829-843, 2003.
- AITKEN, R.J., CLARKSON, J.S., FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p.183-197, 1989.
- AITKEN, R.J., HARKISS, D., BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.257-265, 1993.
- AITKEN, R.J., KOPPERS, A.J. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.36-42, 2011.
- AITKEN, R.J., KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p.497-506, 2001.
- ALTMAN, S.A., ZASTAWNY, T.H., RANDERS-EICHHORN, L., CACCIUTTOLO, M.A., AKMAN, S.A., DIZDAROGLU, M., RAO, G. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v.19, p.897-902, 1995.
- ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.30, p.833-841, 1984.
- ALVAREZ, J.G., STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p.334-346, 1995.
- AMANN, R.P., JOHNSON, L., THOMPSON, D.L., JR., PICKETT, B.W. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v.15, p.586-592, 1976.

- 1 AMBROSI, M., CAMERON, N.R., DAVIS, B.G. Lectins: tools for the molecular
2 understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.3,
3 p.1593-1608, 2005.
- 4
- 5 ANDRADE, J.L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M.V.,
6 CAVADA, B.S., BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production.
7 **Cellular Immunology**, v.194, p.98-102, 1999.
- 8
- 9 BALL, B.A., VO, A.T., BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by
10 equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, 508-515,
11 2001.
- 12
- 13 BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANJEIRO, T.B., DE FREITAS, L.A.,
14 BARRAL NETO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the
15 diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.673-678, 2001.
- 16
- 17 BAUMBER, J., BALL, B.A., GRAVANCE, C.G., MEDINA, V., DAVIES-MOREL,
18 M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability,
19 acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid
20 peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895-902, 2000.
- 21
- 22 BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical**
23 **Biology and Medicine**, v.32, p.797-803, 2002.
- 24
- 25 BEZERRA, E.H., ROCHA, B.A., NAGANO, C.S., BEZERRA, G.A., MOURA, T.R.,
26 BEZERRA, M.J., BENEVIDES, R.G., SAMPAIO, A.H., ASSREUY, A.M.,
27 DELATORRE, P., CAVADA, B.S. Structural analysis of ConBr reveals molecular
28 correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO
29 synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,
30 v.408, p.566-570, 2011.
- 31
- 32 BOYD, W.C. The Lectins: their present status. **Vox Sanguinis**, v.8, p.1-32, 1963.
- 33 CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T.B., BARRAL-NETTO,
34 M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological
35 activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe
36 lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v.2, p.123-135, 2001.
- 37
- 38 CAVALCANTE, T.T., ANDERSON MATIAS DA, R.B., ALVES, C., V, VASSILIEPE
39 SOUSA, A.F., FERNANDES DO NASCIMENTO, A.S., CARDOSO, S.N., DO
40 NASCIMENTO, K.S., SOUSA, C.B., HOLANDA, T.E. Effect of lectins from Diocleinae
41 subtribe against oral Streptococci. **Molecules**, v.16, p.3530-3543, 2011.
- 42
- 43 CEROLINI, S., MALDJIAN, A., SURAI, P., NOBLE, R. Viability, susceptibility to
44 peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal**
45 **Reproduction Science**, v.58, p.99-111, 2000.
- 46
- 47 CHABORY, E., DAMON, C., LENOIR, A., HENRY-BERGER, J., VERNET, P.,
48 CADET, R., SAEZ, F., DREVET, J.R. Mammalian glutathione peroxidases control

- acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. **Journal of Animal Science**, v.88, p.1321-1331, 2010.
- CHATTERJEE, A., MANDAL, D.K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.35, p.103-109, 2005.
- COCUZZA, M., SIKKA, S.C., ATHAYDE, K.S., AGARWAL, A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, 603-621, 2007.
- DADOUNE, J.P. The nuclear status of human sperm cells. **Micron**, v.26, p.323-345, 1995.
- DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v.10, p.15-21, 1995.
- DE ZWART, L.L., MEERMAN, J.H., COMMANDEUR, J.N., VERMEULEN, N.P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p.202-226, 1999.
- DEAN, R.T., FU, S., STOCKER, R., DAVIES, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochemical Journal**, v.324, p.1-18, 1997.
- DRAPER, H.H., SQUIRES, E.J., MAHMOODI, H., WU, J., AGARWAL, S., HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15, p.353-363, 1993.
- DU, J., GEBICKI, J.M. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.2334-2343, 2004.
- DURU, N.K., OEHNINGER, S., MORSHEDI, M. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.74, p.1200-1207, 2000.
- FAHEINA-MARTINS, G.V., DA SILVEIRA, A.L., RAMOS, M.V., MARQUES-SANTOS, L.F., ARAUJO, D.A. Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 25, p.290-296, 2011.
- FAY, A.M., BOWIE, D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. **Journal of Physiology**, v.572, p.201-213, 2006.
- FERREIRA, A.A., MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 1-16, 1997.

- 1 FIGUEIREDO, J.G., DA SILVEIRA, B.F., BESERRA, I.G., TEIXEIRA, C.S., LUZ,
2 P.B., BEZERRA, E.H., MOTA, M.R., ASSREUY, A.M., DE QUEIROZ, C.F.,
3 CAVADA, B.S., DE ALENCAR, N.M. Antinociceptive activity and toxicology of the
4 lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives**
5 **of Pharmacology**, v.380, 407-414, 2009.
- 6
- 7 FORD, W.C. Regulation of sperm function by reactive oxygen species.
8 **Human Reproduction Update**, v.10, p.387-399, 2004.
- 9
- 10 FU, S., DAVIES, M.J., STOCKER, R., DEAN, R.T. Evidence for roles of radicals in
11 protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. **Biochemical Journal**,
12 v.333, p.519-525, 1998.
- 13
- 14 GABIUS, H.J. Animal lectins. **European Journal of Biochemistry**, v.243, p.543-576,
15 1997.
- 16
- 17 GAVELLA, M., LIPOVAC, V. In vitro effect of zinc on oxidative changes in human
18 semen. **Andrologia**, v.30, p.317-323, 1998.
- 19
- 20 GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. What
21 should be called a lectin? **Nature**, v.285, p.66, 1980.
- 22
- 23 GOMEZ, E., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay
24 for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human
25 spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International**
26 **Journal of Andrology**, v.21, p.81-94, 1998.
- 27
- 28 HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental
29 theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, p.312-322, 2006.
- 30
- 31 HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford
32 University Press, 2007.
- 33
- 34 HAUSSINGER, D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function.
35 **Biochemical Journal**, v.313, p.697-710, 1996.
- 36
- 37 HERRERA, E., BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives.
38 **The Journal of Physiology and Biochemistry**, v.57, p.43-56, 2001.
- 39
- 40 HOLLAND, M.K., STOREY, B.T. Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa.
41 Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa. **Biochemical**
42 **Journal**, v.198, p.273-280, 1981.
- 43
- 44 HOLLEY, A.E., WALKER, M.K., CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F. Measurement of
45 n-alkanals and hydroxyalkenals in biological samples. **Free Radical**
46 **Biology and Medicine**, v.15, p.281-289, 1993.
- 47
- 48 IZQUIERDO-VEGA, J.A., SANCHEZ-GUTIERREZ, M., DEL RAZO, L.M. NADPH
49 oxidase participates in the oxidative damage caused by fluoride in rat spermatozoa.
50 Protective role of alpha-tocopherol. **Journal of Applied Toxicology**, 2010.

JAIN, D., KAUR, K.J., GOEL, M., SALUNKE, D.M. Structural basis of functional mimicry between carbohydrate and peptide ligands of con A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.272, p.843-849, 2000.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v.9, p.515-540, 1990.

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

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, p.187-197, 2002.

KOHN, F.M., MACK, S.R., SCHILL, W.B., ZANEVELD, L.J. Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, Pisum sativum agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. **Human Reproduction**, v.12, p.714-721, 1997.

KOPPENOL, W.H., MORENO, J.J., PRYOR, W.A., ISCHIROPOULOS, H., BECKMAN, J.S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. **Chemical Research in Toxicology**, v.5, p.834-842, 1992.

LEWIS, B., AITKEN, R.J. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.22, p.611-622, 2001.

LEWIS, S.E., DONNELLY, E.T., STERLING, E.S., KENNEDY, M.S., THOMPSON, W., CHAKRAVARTHY, U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. **Molecular Human Reproduction**, v.2, p.873-878, 1996.

LIS, H., SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Review**, v.98, p.637-674, 1998.

LOPES, F.C., CAVADA, B.S., PINTO, V.P., SAMPAIO, A.H., GOMES, J.C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins on the histamine release induced by plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.38, p.935-941, 2005.

MACLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal of Physiology**, v.138, p.512-518, 1943.

MANEESH, M., Jayalekshmi, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.21, p. 80-89, 2006.

MATES, J.M., PEREZ-GOMEZ, C., NUNEZ, D.C. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v.32, p.595-603, 1999.

- MISLOVICOVA, D., GEMEINER, P., KOZAROVA, A., KOZAR, T. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v.64, p.1-19, 2009.
- MOLDOVAN, L., MOLDOVAN, N.I., 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. **Histochemistry and Cell Biology**, v.122, 395-412, 2004.
- MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S. Lectin from Canavalia brasiliensis: Isolation, characterization and behavior during germination . **Biologia Plantarum**, v.26, p.113-120, 1984.
- MORTE, M.I., RODRIGUES, A.M., SOARES, D., RODRIGUES, A.S., GAMBOA, S., RAMALHO-SANTOS, J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.36-47, 2008.
- MOURA, T.R., BEZERRA, G.A., BEZERRA, M.J., TEIXERA, C.S., BEZERRA, E.H., BENEVIDES, R.G., DA ROCHA, B.A., DE SOUZA, L.A., DELATORRE, P., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from Canavalia boliviana Piper seeds. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 65, p.213-215, 2009.
- MRUK, D.D., SILVESTRINI, B., MO, M.Y., CHENG, C.Y. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. **Contraception**, v.65, p.305-311, 2002.
- MURDOCK, L.L., SHADE, R.E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6605-6611, 2002.
- NAKANO, M., KAWANISHI, Y., KAMOHARA, S., UCHIDA, Y., SHIOTA, M., INATOMI, Y., KOMORI, T., MIYAZAWA, K., GONDO, K., YAMASAWA, I. Oxidative DNA damage (8-hydroxydeoxyguanosine) and body iron status: a study on 2507 healthy people. **Free Radical Biology and Medicine**, v.35, p.826-832, 2003.
- NISHIKIMI, A., YAMADA, M., MINAMI, N., UTSUMI, K. Evaluation of acrosomal status of bovine spermatozoa using concanavalin a lectin. **Theriogenology**, v.48, p.1007-1016, 1997.
- NORDBERG, J., ARNÉ, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p.1287-1312, 2001.
- OGUZTURK, H., CIFTCI, O., AYDIN, M., TIMURKAAN, N., BEYTUR, A., YILMAZ, F. Ameliorative effects of curcumin against acute cadmium toxicity on male reproductive system in rats. **Andrologia**, 2012.

- 1 OLLERO, M., GIL-GUZMAN, E., LOPEZ, M.C., SHARMA, R.K., AGARWAL, A.,
2 LARSON, K., EVENSON, D., THOMAS, A.J., JR., ALVAREZ, J.G. Characterization
3 of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in
4 the diagnosis and treatment of male infertility. **Human Reproduction**, v.16, 1912-
5 1921, 2001
- 6
7 PETERSEN, D.R., DOORN, J.A. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and
8 cellular targets. **Free Radical Biology and Medicine**, v.37, p.937-945, 2004.
- 9
10 PEUMANS, W.J., HAUSE, B., VAN DAMME, E.J. The galactose-binding and
11 mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular
12 compartments. **FEBS Letters**, v.477, p.186-192, 2000.
- 13
14 PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J. Plant lectins: specific tools for the identification,
15 isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews**
16 **in Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, p.209-258, 1998.
- 17
18 PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J., BARRE, A., ROUGE, P. Classification of plant
19 lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in**
20 **Experimental Medicine and Biology**, v.491, p.27-54, 2001.
- 21
22 PEUMANS, W.J., VAN DAMME, W.J.M. Proposal For a novel sistem of
23 nomenclature of plant lectins . **Lectins**, v.10, p.105-117, 1995.
- 24
25 REEKE, G.N., JR., BECKER, J.W. Carbohydrate-binding sites of plant lectins.
26 **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.139, p.35-58, 1988.
- 27
28 RICH, T., ALLEN, R.L., WYLLIE, A.H. Defying death after DNA damage. **Nature**,
29 v.407, p.777-783, 2000.
- 30
31 RÜDIGER, H., GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and
32 applications. **Glycoconjugate Journal**, v.18, p.589-613, 2001.
- 33
34 SALVAYRE, R., AUGÉ, N., BENOIST, H., NEGRE-SALVAYRE, A. Oxidized low-
35 density lipoprotein-induced apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1585,
36 p.213-221, 2002.
- 37
38 SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., GRANGEIRO, T.B., CALVETE, J.J., CAVADA,
39 B.S. The crystal structure of Canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation
40 between its quaternary conformation and its distinct biological properties from
41 Concanavalin A. **FEBS Letters**, v.405, p.114-118, 1997.
- 42
43 SHARON, N., LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v.246, p.227-
44 234, 1989.
- 45
46 SHARON, N., LIS, H. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell
47 recognition. **Essays in Biochemistry**, v.30, p.59-75, 1995.
- 48
49 SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition
50 molecules. **Glycobiology**, v.14, p.53-62, 2004.

- 1 SIKKA, S.C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function.
2 **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p.851-862, 2001.
- 3
- 4 STOREY, B.T., Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative
5 damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.203-213,
6 1997.
- 7
- 8 SULEIMAN, S.A., ALI, M.E., ZAKI, Z.M., EL-MALIK, E.M., NASR, M.A. Lipid
9 peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of**
10 **Andrology**, v.17, p.530-537, 1996.
- 11
- 12 SZWEDA, P.A., FRIGUET, B., SZWEDA, L.I. Proteolysis, free radicals, and aging.
13 **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, p.29-36, 2002.
- 14
- 15 TOSIC, J., WALTON, A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its
16 inhibitory effect on respiration. **Nature**, v.158, p.485, 1950.
- 17
- 18 TVRDA, E., KNAZICKA, Z., BARDOS, L., MASSANYI, P., LUKAC, N. Impact of
19 oxidative stress on male fertility - a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.59,p. 465-
20 484, 2011.
- 21
- 22 TWIGG, J., FULTON, N., GOMEZ, E., IRVINE, D.S., AITKEN, R.J. Analysis of the
23 impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and
24 functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and
25 effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v.13, 1429-1436, 1998.
- 26
- 27 VAN DAMME, E.J., BARRE, A., ROUGE, P., PEUMANS, W.J. Cytoplasmic/nuclear
28 plant lectins: a new story. **Trends in Plant Science**, v.9, p.484-489, 2004.
- 29
- 30 VAN GENT, D.C., HOEIJMAKERS, J.H., KANAAR, R. Chromosomal stability and the
31 DNA double-stranded break connection. **Nature Reviews Genetics**, v.2, p.196-206,
32 2001.
- 33
- 34 VIGGIANO, J.M., HERRERO, M.B., MARTINEZ, S.P., DE GIMENO, M.F. Analysis of
35 the effect of nitric oxide synthase inhibition on mouse sperm employing a modified
36 staining method for assessment of the acrosome reaction. **Journal of Andrology**,
37 v.17, 692-698, 1996.
- 38
- 39 WARREN, J.S., JOHNSON, K.J., WARD, P.A. Oxygen radicals in cell injury and cell
40 death. **Pathology and Immunopathology Research**, v.6, p.301-315, 1987.
- 41
- 42 WU, G., FANG, Y.Z., YANG, S., LUPTON, J.R., TURNER, N.D. Glutathione
43 metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, v.134, p.489-492,
44 2004.
- 45
- 46 YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.
47 **Physiological Reviews**, v.74, p.139-162, 1994.
- 48
- 49 ZATTA, P.F., CUMMINGS, R.D. Lectins and their uses as biotechnological tools.
50 **Biochemical Education**, v.20, p.2-9, 1992.

- 1 ZHAO, R., GUERRAH, A., TANG, H., ZHAO, Z.J. Cell surface glycoprotein PZR is a
2 major mediator of concanavalin A-induced cell signaling. **Journal of**
3 **Biological Chemistry**, v.277, p.7882-7888, 2002.
4
- 5 ZINI, A., O'BRYAN, M.K., MAGID, M.S., SCHLEGEL, P.N. Immunohistochemical
6 localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas
7 deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm
8 maturation, and programmed cell death. **Biology of Reproduction**, v.55, p.935-941,
9 1996.