



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**INFLUÊNCIA DO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO
CÉREBRO (BDNF) NA QUALIDADE DO SÊMEN DE
CARNEIROS**

MATHEUS BATISTA DE OLIVEIRA

2024



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

MATHEUS BATISTA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)
NA QUALIDADE DO SÊMEN DE CARNEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador
Prof. Dr. Hymerson Costa Azevedo

Co-orientador:
Prof. Dr. Gladston Rafael de Arruda Santos

**SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2024**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48i Oliveira, Matheus Batista de
 Influência do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na
 qualidade do sêmen de carneiros / Matheus Batista de Oliveira;
 orientador Hymerson Costa Azevedo – São Cristóvão, SE, 2024.
 40 f. : il.

 Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) –
 Universidade Federal de Sergipe, 2024.

 1. Agricultura. 2. Biodiversidade. 3. Ovinos. 4. Antioxidantes. 5.
 Células - Membranas. 6. Carneiros - Espermatozóides. I. Azevedo,
 Hymerson Costa, orient. II. Título.

CDU 636.082:636.3

MATHEUS BATISTA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)
NA QUALIDADE DO SÊMEN DE CARNEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA em 05 de fevereiro de 2024.

Prof. Dr. Antônio Matos Fraga Júnior
(Faculdade Pio Décimo – FPD)

Prof. Dr. Anselmo Domingos Ferreira Santos
(Universidade Federal de Sergipe – UFS)

Prof. Dr. Hymerson Costa Azevedo
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

DEDICATÓRIA

*Ao criador – meu Deus – e aos seres de luz
que me guiaram com cuidado e zelo; à minha
família, especialmente à minha mãe Maria
José de Oliveira Santos; ao meu pai, Moisés
Batista Santos; à minha irmã Moisanne Batista
de Oliveira; ao meu irmão Marcos Nathan
Batista de Oliveira; aos meus sobrinhos
Carlos, Nicole e Sofia e cunhado (a).*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre ter sido amparo e refúgio em todas as vezes que precisei. À minha família, pelo inesgotável apoio, incentivo e motivação.

À minha mãe, Maria José, eterna companheira a quem destino o meu amor e toda minha admiração. Ao meu pai, Moisés Batista, por sempre vibrar com cada conquista. Aos meus irmãos, Moisanne Oliveira e Marcos Nathan, Vocês são sinônimos de resiliência, dedicação, esforço e de coragem, cuja recompensa é a vida e suas famílias que construíram e constroem. Aos meus sobrinhos, Carlos Alberto, Linda Nicole e Linda Sofia: seres que iluminam e trazem tranquilidade nos dias de desânimo. Ao meu cunhado Alisson, pelo apoio e parceria ao longo desses anos.

Ao meu eterno orientador e mentor acadêmico, Hymerson Azevedo, cujo papel na minha formação pessoal e profissional foi determinante em cada passo que decidi trilhar. Serei eternamente grato pelas inúmeras oportunidades, lições e pelo aprendizado que obtive sob sua supervisão. Ao meu co-orientador Gladston Rafael, pelo apoio, pela parceria e resolutividade durante essa jornada.

Ao meu amigo/irmão Júlio Constantino, que foi um instrumento de perseverança, conhecimento e de resiliência nessa jornada acadêmica. Ao José Eduardo, pela contribuição no experimento. Aos meus amigos, Islan Dantas e Paulo Henrique, que estiveram nessa jornada.

Aos meus amigos/irmãos veterinários Renato Fontes, Igor Jhonata, Rodrigo Dalvo, Paloma Santana e Bruno Cunha pela amizade, pelo companheirismo e pelos conselhos ao longo desses anos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Embrapa Tabuleiros Costeiros pela disponibilidade de infraestrutura e de recursos financeiros e humanos desde pesquisadores, técnicos de laboratório e de campo e operários rurais.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS) e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI/UFS) pela oportunidade e pela incrível experiência de aprender com ótimas referências. Aos meus professores Leandro Bacci, Arie Blank e Renata Mann e à secretária Jéssika Fontes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro durante a pós-graduação e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE) pelo auxílio financeiro do projeto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DE SÍMBOLOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1. O BDNF e o seu papel no sistema nervoso	1
2.2. O BDNF e seu papel na reprodução	3
3. REFERÊNCIAS	5
4. ARTIGO 1: EFEITO DE CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) NA QUALIDADE DO SÊMEN DE CARNEIROS	12
Resumo.....	12
4.1. Introdução.....	13
4.2. Material e Métodos.....	13
4.2.1 Animais experimentais e manejo	14
4.2.2 Colheita e processamento de sêmen	14
4.2.3 Análises espermáticas	14
a) Cinética espermática	14
b) Funcionalidade da membrana plasmática	15
c) Integridade de membrana plasmática	15
d) Estresse oxidativo	15
e) Potencial de membrana mitocondrial	16
4.2.4 Delineamento experimental e análise estatística	16
4.3. Resultados	16
4.4. Discussão.....	17
4.5. Conclusão	18
4.6. Referências	18
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
ANEXOS	23

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Visão geral da sinalização do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) através dos receptores TrkB. TrkB – tirosina quinase B; PLCy – fosolipase C; IP3 – Inositol 3 fosfato; DAG – diacilglicerol; MAPK/ERK – Proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular; PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase; CamK – calmodulina quinase; CaM – calmodulina; CREB - elemento de resposta ao AMPc/fator de transcrição.	2
2	Proposição de mecanismo de sinalização do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) BDNF no espermatozoide através do receptor TrkB. TrkB – tirosina quinase B PLCy – fosolipase C; IP3 – Inositol 3 fosfato; DAG – diacilglicerol; MAPK/ERK – proteína quisane ativada por mitógeno; PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase; CamK – calmodulina quinase; CaM – calmodulina; CREB – elemento de resposta ao AMPc/fator de transcrição.	4
3	Efeito da interação entre diferentes concentrações e tempos de exposição ao BDNF sobre a funcionalidade da membrana - HOST+. Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças entre as interações. T0 e T30 – tempos de exposição ao BNDN de aproximadamente 5 minutos e de 30 minutos respectivamente.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Médias $\pm$ desvio padrão dos parâmetros espermáticos no sêmen fresco de carneiros submetido à diferentes concentrações do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).	22
2	Médias $\pm$ desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco de carneiros submetido à diferentes tempos de exposição ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM17	Metalopectidase 17
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento flagelar cruzado
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)
Ca ⁺²	Cálcio
CaM	Calmodulina;
CamK	Calmodulina quinase
CASA	<i>Computer assisted sperm class analyzer</i> (Análise de Cinética Espermática Computadorizada)
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPE	Carboxipeptidase
CREB	Elemento de resposta ao AMPc/fator de transcrição
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAP1	Proteína dedo de zinco heme-responsiva
HOST	Teste hiposmótico
HYPER	Percentual de espermatozoides com hiperatividade
IMP	Integridade de membrana plasmática
IP3	Trifosfato de inositol
JC-1	5,50,6,60-tetracloro-1,10,3,30-iodeto de tetraetil-benzimidazolil-carbocianina
LIN	Linearidade
LPO	Lipoperoxidação
MMP3	Matriz metalopeptidase 3
MAPK/ERK	Proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular
MAP2K5	Proteína quinase 5 ativada por mitógeno
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
NGF	Fator de crescimento nervoso
PBS	Solução salina tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K/mTOR	Fosfatidilinositol 3 quinase/alvo mecanístico da rapamicina

PI3K-Akt),	Fosfatidil-inositol 3 kinase – proteína quinase B
PLC- γ	Fosfolipase C- γ
PMM	Potencial de membrana mitochondrial
RAP	Percentual de espermatozoides rápidos
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SOD	Superóxido dismutase
SPTZ	Espermatozoides
STR	Retilinearidade
TrkB	Receptor da tropomiosina quinase B
VAP	Velocidade de percurso médio
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade em linha reta
WOB	Índice de oscilação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Maior que
>	Menor que
±	Mais ou menos
≥	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
µg/L	Micrograma por litro
µm	Micrômetro
µm/s	Micrômetro por segundos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
sptz/mL	Espermatozoides por mlilitro
µL	Microlitro

RESUMO

OLIVEIRA, Matheus Batista de. Influência do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na qualidade do sêmen de carneiros. São Cristóvão: UFS, 2024. 38 p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

O grupo de proteínas pertencentes às neurotrofinas tem apresentado papel importante no desenvolvimento dos tecidos reprodutivos e uma ação antioxidante em espermatozoides. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações e tempos de exposição ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na qualidade do sêmen de carneiros. Um ejaculado de cada carneiro da raça Santa Inês (n=5) foi colhido usando-se vagina artificial, sendo utilizados apenas aqueles com valores de motilidade total $\geq 70\%$ (0 a 100%) e vigor ≥ 3 (0 a 5). Amostras de sêmen de cada ejaculado foram submetidas à diferentes concentrações (0; 10; 20; 40 e 80 $\mu\text{g/L}$) e tempos de exposição (T0 e T30 minutos) ao BDNF. Em seguida foram analisadas quanto aos parâmetros espermáticos de cinética computadorizada (CASA) e o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional pelo teste hiposmótico (HOST+) e íntegra (IMP+; SYBR-Green/Iodeto de propídio), sem estresse oxidativo (EO-; CellROX®) e com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM+; JC-1). A normalidade dos dados foi avaliada usando-se o teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Hartley. Foram estudados os efeitos da interação entre as cinco concentrações (Fator 1) e os dois tempos de exposição (Fator 2) ao BDNF. Utilizou-se um modelo misto (PROC MIXED) seguindo um delineamento fatorial 5x2, e os efeitos dos fatores e suas interações foram avaliados pelo Teste F. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste de Tukey. Dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos a transformação pelo arco seno da raiz quadrada. Aqueles que mesmo após a transformação não foram normalizados foram submetidos a análises não-paramétricas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn. Todas as avaliações foram feitas considerando-se 95% de confiança (SAS®). A concentração de BDNF influenciou a qualidade do sêmen sendo que 10 $\mu\text{g/L}$ apresentou os maiores percentuais de espermatozoides com HOST+, IMP+, PMM+ e EO-. O tempo de exposição também teve influência sobre a qualidade do sêmen sendo que o T30 reduziu os valores médios da maioria dos parâmetros cinéticos, mas não influenciou os parâmetros HOST+, IMP+, PMM+ e EO-. A interação entre a concentração de 10 $\mu\text{g/L}$ de BDNF e o T30 aumentou o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional em relação às outras interações. Concluiu-se que a adição do BDNF na concentração de 10 $\mu\text{g/L}$ durante 30 minutos melhora a qualidade do sêmen de carneiros.

Palavras-chave: Antioxidantes, Cinética espermática, Membrana plasmática, Neurotrofinas, Ovinos.

* Comitê Orientador: Hymerson Costa Azevedo – UFS (Orientador), Gladston Rafael de Arruda Santos – UFS (Co-orientador).

ABSTRACT

OLIVEIRA, Matheus Batista de. **Influence of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) on ram sperm quality**. São Cristóvão: UFS, 2024. 38 p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

The group of proteins belonging to neurotrophins has been found to play a significant role in the development of reproductive tissues and exert an antioxidant action on spermatozoa. The present study aimed to assess the effect of the addition of different concentrations and exposure times to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the semen quality of rams. One ejaculate from each Santa Inês ram (n=5) was collected using an artificial vagina, and only those with total motility values $\geq 70\%$ (0 to 100%) and vigor ≥ 3 (0 to 5) were included. Semen samples from each ejaculate were subjected to different concentrations (0; 10; 20; 40; and 80 $\mu\text{g/L}$) and exposure times (T0 and T30 minutes) to BDNF. They were then analyzed for computer-assisted sperm analysis (CASA) and the percentage of spermatozoa with functional plasma membrane using the hypo-osmotic swelling test (HOST+), intact membrane (PMI+; SYBR-Green/Propidium Iodide), without oxidative stress (OS-; CellROX®), and with high mitochondrial membrane potential (MMP+; JC-1). Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, and homoscedasticity was assessed using the Hartley test. The interaction effects between the five concentrations (Factor 1) and the two exposure times (Factor 2) to BDNF were studied. A mixed model (PROC MIXED) following a 5x2 factorial design was used, and the effects of the factors and their interactions were evaluated by the F-test. Differences between experimental groups were determined by the Tukey test. Data that did not show normal distribution were subjected to transformation by the arcsine square root. Even after transformation, those not normalized underwent non-parametric analyses using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-hoc test. All evaluations were conducted considering a 95% confidence level (SAS®). BDNF concentration influenced semen quality, with 10 $\mu\text{g/L}$ showing the highest percentages of spermatozoa with HOST+, PMI+, MMP+, and OE-. The exposure time also influenced semen quality, with T30 reducing the mean values of most kinetic parameters but not affecting HOST+, PMI+, MMP+, and OS-. The interaction between the concentration of 10 $\mu\text{g/L}$ of BDNF and T30 increased the percentage of spermatozoa with functional plasma membrane compared to other interactions. It was concluded that the addition of BDNF at a concentration of 10 $\mu\text{g/L}$ for 30 minutes improves the quality of ram semen.

Keywords: Antioxidants, Sperm kinetics, Plasma membrane, Neurotrophins, Sheep.

* Supervisor Committee: Hymerson Costa Azevedo (Advisor), Gladston Rafael de Arruda Santos (Adjunct advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma proteína essencial para o desenvolvimento, função e sobrevivência das células neuronais e pode contribuir para manutenção da qualidade de células reprodutivas e proteção contra danos oxidativos (Skaper, 2012). A proteção contra esses danos oxidativos ocorre pela capacidade do BDNF de proteger as células contra os radicais livres (Li *et al.*, 2016). Assim, a presença dessa proteína no sêmen está associada à redução dos níveis de óxido nítrico e ao aumento da motilidade, assim como redução da peroxidação lipídica, contribuindo para a manutenção da fluidez da membrana plasmática e viabilidade espermática (Safari *et al.*, 2017). Além disso, o BDNF também estimula a produção de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase, importante para a defesa contra o estresse oxidativo em espermatozoides (Sapolsky, 2000; Mattson, 2004; Xiu *et al.*, 2020).

Os espermatozoides de ovinos são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo devido à presença elevada de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática (Bucak *et al.*, 2007). A elevada concentração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no sêmen pode desencadear estresse oxidativo, impactando negativamente o metabolismo energético, a motilidade, a viabilidade e a integridade do DNA dos espermatozoides (Kryzosiak *et al.*, 2000; Baumber *et al.*, 2002; Bilodeau *et al.*, 2002).

O estresse oxidativo é um processo que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante do organismo (Barbosa *et al.*, 2010). Este desequilíbrio provoca danos às células de um modo geral e os espermatozoides também são vulneráveis pela limitada capacidade intrínseca de mitigar parcial ou totalmente a produção de EROs e de prevenir a peroxidação excessiva dos substratos (Silva, 2006) justificando a necessidade de proteção exógena (Taylor, 2001). Neste sentido, substâncias com ação antioxidantes têm um papel crucial na prevenção do estresse oxidativo, mantendo a integridade, funcionalidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides (Ashrafzadeh *et al.*, 2013; Najafi *et al.*, 2017).

A incorporação de antioxidantes ao sêmen, a exemplo do BDNF, pode desempenhar um papel crucial na preservação da qualidade espermática, promovendo a proteção contra o estresse oxidativo e, consequentemente, melhorando a motilidade espermática, integridade e funcionalidade da membrana plasmática. A melhora nesses parâmetros espermáticos pode representar um aumento no desempenho reprodutivo de carneiros por meio do impacto positivo gerado à qualidade do sêmen e das tecnologias associadas de conservação como a refrigeração e criopreservação, assim como de uso a exemplo da inseminação artificial (IA) e da fertilização *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O BDNF e o seu papel no sistema nervoso

Foi identificado um fator neurotrófico que desempenhava um papel fundamental na sobrevivência e no crescimento dos gânglios da raiz dorsal em embriões de galinha, sendo posteriormente denominado fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) após sua purificação (Barde *et al.*, 1982).

O BDNF é o segundo membro da família de neurotrofinas, juntamente com outros membros como neurotrofina 3, neurotrofina 4 e fator de crescimento nervoso e tem sido objeto de extensa pesquisa desde sua descoberta (Figura 1; Cohen e Levi-Montalcini, 1956; Maisonpierre *et al.*, 1990; Carroll *et al.*, 1998; Kernie *et al.*, 2000; Ferraguti *et al.*, 2022; Malekan *et al.*, 2023).

Ao longo dos anos, numerosos estudos têm explorado diversos aspectos da sinalização do BDNF no sistema nervoso central, bem como seu papel crucial no desenvolvimento neuronal e na plasticidade sináptica (Leal *et al.*, 2014; Lu; Nagappan, 2014; Kojima; Mizui, 2017; Leal *et al.*, 2017; Kowianski *et al.*, 2018; Trombetta *et al.*, 2020; Keifer, 2022). A plasticidade sináptica é um mecanismo pelo qual se produz mudanças no número e na intensidade de conexões sinápticas em consequência do seu uso (Castrén; Antila, 2017) e é um aspecto importante por exemplo na compreensão e tratamento de distúrbios psiquiátricos (Lu, 2003; Autry; Monteggia, 2012; Park *et al.*, 2014; Kowiański *et al.*, 2018).

No sistema nervoso o BDNF é sintetizado nos corpos celulares de neurônios e células gliais, sendo distribuído e produzido predominante por todo o cérebro, com expressão mais proeminente no hipocampo e no córtex (Merriotti *et al.*, 2020). Nos neurônios o transcrito do BDNF passa por tradução, resultando no pré-pró-BDNF, que é posteriormente clivado para formar o precursor pró-BDNF (Wang *et al.*, 2022). O pré-BDNF estimula ou induz a apoptose neural e depressão sináptica pela ativação de pró-BDNF e do receptor de neurotrofinas p75 (Numakawa; Odaka, 2021; Yaneva-Sirakova *et al.*, 2023). O BDNF maduro estimula a sobrevivência neural, auxiliando seu crescimento e neuroplasticidade através da ativação do complexo BDNF e do receptor de tirosina quinase B (TrkB; Alam *et al.*, 2016).

Quando clivado intracelularmente, o BDNF pode ser encapsulado em vesículas de densidade central, que são transportadas para terminais axônicos e compartimentos dendríticos (Gao *et al.*, 2022). O BDNF assim como outras neurotrofinas, possui uma carga positiva em pH fisiológico, o que facilita sua ligação à membrana celular e à matriz extracelular, ampliando sua capacidade de difusão após a secreção (Park *et al.*, 2013). Ele tem alta afinidade pelo receptor TrkB, desencadeando vias de sinalização que modulam diversos processos sinápticos. O TrkB é encontrado em células gliais, corpos celulares neuronais, terminais pré-sinápticos e em locais específicos nos dendritos pós-sinápticos (Andreska *et al.*, 2020; Niu *et al.*, 2023).

A ativação do TrkB pelo BDNF desencadeia importantes vias a jusante na função e na sobrevivência de neurônios (Bilanges *et al.*, 2019). Essa ativação ocorre por meio da fosforilação dos resíduos de tirosina do TrkB, resultando na ativação do domínio homólogo 2 de Src (SH2) e na fosforilação da fosfolipase C- γ (PLC- γ), da fosfatidilinositol-3 quinase/alvo mecanístico da rapamicina (PI3K/mTOR; Zhang *et al.*, 2019) e das vias de proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK; De Vicenti *et al.*, 2019). A ativação da via PI3K/mTOR promove a sobrevivência neuronal, enquanto a sinalização MAPK/ERK apoia a plasticidade sináptica e a função neuronal. A ativação da via PLC- γ resulta na geração de trifosfato de inositol (IP3) e na subsequente liberação dos estoques internos de cálcio, influenciando processos como a plasticidade sináptica (Figura 1; Johnstone; Mobley, 2020).

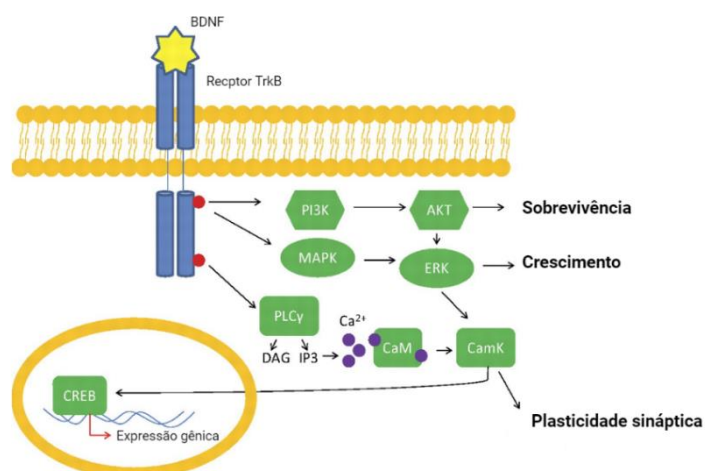


Figura 1. Visão geral da sinalização do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) através dos receptores TrkB. TrkB – tirosina quinase B; PLC γ – fosfolipase C; IP3 – Inositol 3 fosfato; DAG – diacilglicerol; MAPK/ERK – Proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular; PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase; CamK – calmodulina quinase; CaM – calmodulina; CREB - elemento de resposta ao AMPc/fator de transcrição.

2.2 O BDNF e o seu papel na reprodução

O BDNF já foi identificado em vários tipos de células animais, a exemplo de células femininas no sistema mamário (Colliti *et al.*, 2015), folículo ovariano (Qin *et al.*, 2022), granulosa (Silva *et al.*, 2006), cummulus (Li *et al.*, 2015; Cacialli *et al.*, 2018), e em células masculinas como de Sertoli (Tan *et al.*, 2022), Leydig (Koeva; Davidoff, 2002), próstata (Krygier; Djakiew, 2002) e em espermatozoides (Li *et al.*, 2012).

Em fêmeas, o incremento da concentração do BDNF gerou uma maior proporção de oócitos maduros, sendo esse efeito decorrente da expressão de genes ligados a ovulação, estereidogênese, luteólise e à maturação oocitária possibilitando o desenvolvimento de embriões com melhor qualidade (Chen *et al.*, 2019). Já em galinhas, o BDNF e seu receptor TrkB foram expressos, atuando de forma parácrina em células do folículo ovariano, cuja função fisiológica está ligada a modulação da esteroidogênese (Jensen; Johnson, 2001). Nos machos o BDNF e seus receptores agem de forma parácrina e, por serem encontrados em células germinativas, foi identificada sua função na espermatogênese (Li; Zhou, 2013) cumprindo um papel na maturação dessas células e produção de esteroides (Mruk; Cheng, 2004; Svehnikov *et al.*, 2010).

Esse efeito está diretamente relacionado à capacidade de fertilidade dos espermatozoides que é dependente de uma série de reações biológicas complexas (Bansal; Bilaspuri, 2011). Dentre elas, as bioquímicas que são controladas pela ação de diferentes proteínas (Ashrafzadeh *et al.*, 2013), as quais tem funções sobre as características estruturais e funcionais dos espermatozoides como a cinética, capacitação e a interação com o oócito (Ashrafzadeh *et al.*, 2013; Sáez-Esinosa *et al.*, 2020).

A adição do BDNF no sêmen de bovinos aumentou motilidade, porém não foi observado um efeito positivo sobre a atividade mitocondrial e a viabilidade espermática (Li *et al.*, 2012). A diminuição na viabilidade espermática pode ter sido devida à regulação negativa da sinalização BDNF/TrkB e da via de sinalização PI3K/Akt. Embora a presença dessas substâncias no ejaculado permita a ativação da via de sinalização intracelular fosfatidinositol-3 quinase e proteína quinase B (PI3K/Akt) que está relacionada à sobrevivência celular e sinais antiapoptóticos (Tan *et al.*, 2022), até então não foram realizadas pesquisas para investigar a concentração ideal que promova os melhores benefícios ao sêmen de carneiros.

No sêmen fresco de humanos, a adição de BDNF reduziu os níveis de óxido nítrico e incrementou a atividade mitocondrial, motilidade e reduziu o conteúdo de peroxidação lipídica pela redução das EROs ajudando a manter a fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides e a viabilidade (Safari *et al.*, 2017). Estes benefícios podem ser atribuídos aos mecanismos moleculares como a ativação de enzimas antioxidantes e das vias de sinalização intracelular da PI3K-Akt, cujo efeito está relacionado com a manutenção da motilidade, viabilidade e o potencial de membrana mitocondrial (Gallardo Bolanos *et al.*, 2014), assim como na inibição de caspases (Najafi *et al.*, 2017) que estão envolvidas no processo de inflamação, apoptoses e morte celular (Van Opdenbosh; Lamkanfi, 2019). No sêmen congelado de humanos, foi demonstrado que a adição do BDNF nos meios de congelamento e descongelamento proporcionou aumento na motilidade espermática, viabilidade e capacidade de fertilização (Najafi *et al.*, 2017).

Os mecanismos envolvidos nos efeitos da adição do BDNF podem ser compreendidos a partir do conhecimento das vias de sinalização que podem ser ativadas (Figura 2). A partir da ligação do BDNF com o receptor TrkB, ocorre uma fosforilação em vários locais que leva à ativação de vias a jusante, a exemplo da via PI3K que ativa a Akt, levando à sobrevivência celular. A via MAPK/ERK leva ao crescimento e diferenciação celular e a via PLCy ativa o receptor de inositol trifosfato (IP3) para liberar reservas intracelulares de cálcio, levando ao aumento da atividade da calmodulina quinase (CamK) e aumento da motilidade espermática.

Todas as três vias convergem para o fator de transcrição CREB, que pode regular positivamente a expressão gênica (Autry; Monteggia, 2012).

Embora tenham sido relatados inúmeros benefícios associados à identificação e adição do BDNF em vários tipos de células humanas e de animais como em ovinos (Coliti, 2016), caprinos (Peng *et al.*, 2016), bovinos (Li *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2023), búfalos (Zhao *et al.*, 2019), ainda não foram realizados estudos para investigar o efeito da adição dessa proteína sobre a qualidade dos espermatozoides de carneiros

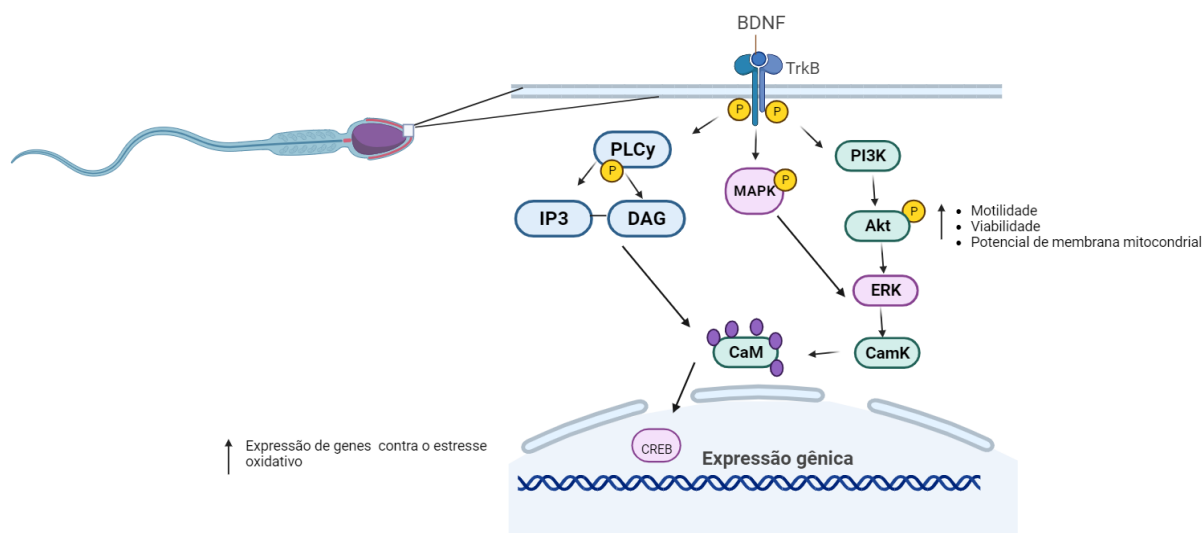


Figura 2. Proposição de mecanismo de sinalização do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) BDNF no espermatozoide através do receptor TrkB. TrkB – tirosina quinase B PLCγ – fosfolipase C; IP3 – Inositol 3 fosfato; DAG – diacilglicerol; MAPK/ERK – proteína quissase ativada por mitógeno; PI3K – fosfatidilinositol-3-cinase; CamK – calmodulina quinase; CaM – calmodulina; CREB – elemento de resposta ao AMPc/fator de transcrição. Fonte: Autoria própria.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAI, L.; BENMOULA, A.; SILVA, M.M.; NASSER, B.; EL-AMIRI, B. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 6-17, 2018.
- ALAM, M. A.; RALLABANDI, V. P. S.; ROY, P. K. Systems biology of immunomodulation for post-stroke neuroplasticity: multimodal implications of pharmacotherapy and neurorehabilitation. **Frontiers in Neurology**, v. 7, p. 94, 2016.
- ANDRESKA, T.; LÜNINGSCHRÖR, P.; SENDTNER, M. Regulation of TrkB cell surface expression—a mechanism for modulation of neuronal responsiveness to brain-derived neurotrophic factor. **Cell and Tissue Research**, v. 382, p. 5-14, 2020.
- ARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R. DE; PAULA, S. O. DE; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- ASHRAFZADEH, A.; KARSANI, S. A.; NATHAN, S. Mammalian sperm fertility related proteins. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 12, p. 1649–1657, 2013.

- AUTRY, A.; MONTEGGIA, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 238-258, 2012.
- BANSAL, K. B.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.
- BARDE, Y. A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO journal**, v. 1, n. 5, p. 549-553, 1982.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. DE; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1025-1033, 2002.
- BILANGES, B.; POSOR, Y.; VANHAESEBROECK, Bart. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 9, p. 515-534, 2019.
- BILODEAU JF.; BLANCHETTE S.; CORMIER., N; SIRARD, M.A. 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**, v. 3, p. 1105-1122, 2002.
- BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHIN, A.; VARIŞLI, Ö.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1060-1067, 2007.
- CACIALLI, P.; PALLADINO, A.; LUCINI, C. Role of brain-derived neurotrophic factor during the regenerative response after traumatic brain injury in adult zebrafish. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 6, p. 941, 2018.
- CARROLL, P.; LEWIN, G. R.; KOLTZENBURG, M.; TOYKA, K. V.; THOENEN, H. A role for BDNF in mechanosensation. *Nature Neuroscience*, v. 1, n. 1, p. 42-46, 1998.
- CASTRÉN, E.; ANTILA, H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 8, p. 1085-1095, 2017.
- CHEN, S.; WANG, F.; LIU, Z.; ZHAO, Y.; JIANG, Y.; CHEN, L.; LI, C.; ZHOU, X. Brain-derived neurotrophic factor promotes proliferation and progesterone synthesis in bovine granulosa cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8776-8787, 2019.
- COHEN, STANLEY.; LEVI-MONTALCINI, R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. **Science**, v. 42, n. 9, p. 571-574, 1956.
- COLITTI, M. Expression of NGF, BDNF and their high-affinity receptors in ovine mammary glands during development and lactation. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 144, n. 6, p. 559-570, 2015.

DE VINCENTI, A. P.; RÍOS, A. S.; PARATCHA, G.; LEDDA, F. Mechanisms that modulate and diversify BDNF functions: implications for hippocampal synaptic plasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 135, 2019.

FERRAGUTI, G.; TERRACINA, S.; MICANGELI, G.; LUCARELLI, M.; ARANI, L.; CECCANTI, M.; SPAZIANI, M.; D'ORAZI, V.; PETRELLA, C.; FIORE, M. NGF and BDNF in pediatrics syndromes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 145, p. 105015, 2023.

GALLARDO BOLANOS, J. M.; BALAO, S. C. M.; MARTIN, P. M.; ANTOLIN, M. R. Phosphorylated AKT preserves stallion sperm viability and motility by inhibiting caspases 3 and 7. **Reproduction**, v. 148, n. 2, p. 221-235, 2014.

GAO, S.; LI, Q.; ZHANG, S.; SUN, X.; ZHENG, X.; QIAN, H.; WU, J. One-step high-throughput detection of low-abundance biomarker BDNF using a biolayer interferometry-based 3D aptasensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 215, p. 114566, 2022.

JENSEN, T.; JOHNSON, A. L. Expression and function of brain-derived neurotrophin factor and its receptor, TrkB, in ovarian follicles from the domestic hen (*Gallus gallus domesticus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 12, p. 2087-2095, 2001.

JOHNSTONE, A.; MOBLEY, W. Local TrkB signaling: themes in development and neural plasticity. **Cell and Tissue Research**, v. 382, p. 101-111, 2020.

KHALIL, W.; SHARAF, A. E.; KHALIFA, M. A.; EL-HARAIRY, M. A.; SWELUM, A. A.; ABDELNOUR, S. A. Recent approaches in the use of antioxidants and proteomic modifications in ram semen preservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 58, n. 12, p. 1639-1653, 2023.

KAYDOS, E. H.; SUAREZ, J. D.; ROBERTS, N. L.; BOBSEINE, K.; ZUCKER, R.; LASKEY, J.; KLINEFELTER, G. R. Haloacid induced alterations in fertility and the sperm biomarker SP22 in the rat are additive: validation of an ELISA. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 2, p. 430-442, 2004.

KEIFER, J. Regulation of AMPAR trafficking in synaptic plasticity by BDNF and the impact of neurodegenerative disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 100, n. 4, p. 979-991, 2022.

KERNIE, S. G.; LIEBL, D. J.; PARADA, L. F. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. **The EMBO journal**, v. 19, n. 6, p. 1290-1300, 2000.

KOEVA, Y.; DAVIDOFF, M. S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor trkB in rat Leydig cells during the postnatal development. **Acta Morphologica et Anthropologica**, v. 7, p. 23-27, 2002.

KOJIMA, M.; MIZUI, T. BDNF propeptide: a novel modulator of synaptic plasticity. **Vitamins and Hormones**, v. 104, p. 19-28, 2017.

KOWIAŃSKI, P.; GRAŻYNA, L.; CZUBA, E.; WAŚKOW, M.; STELIGA, A.; MORYŚ, J. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, p. 579-593, 2018.

KRYGIER, S.; DJAKIEW, D. Neurotrophin receptor p75NTR suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 98, n. 1, p. 1-7, 2002.

KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and, Development**, v.12, p. 251-261, 2000.

LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. BDNF and hippocampal synaptic plasticity. **Vitamins and hormones**, v. 104, p. 153-195, 2017.

LEAL, G.; COMPRIDO, D.; DUARTE, C.B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v.76, p.639-656, 2014.

LI, C.; ZHOU, X. The potential roles of neurotrophins in male reproduction. **Reproduction**, v. 145, n. 4, p. R89-R95, 2012.

LI, M.; CHANG, H.; XIAO, X. BDNF Val66Met polymorphism and bipolar disorder in European populations: A risk association in case-control, family-based and GWAS studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 218–233, 2016.

LI, X.; XUAN, L.; RUBIO, J. F.; ZERIC, T.; BOSSERT, J. M.; KAMBHAMPATI, S.; CATES, H. M.; KENNEDY, J. P.; LIU, Q. R.; CIMBRO, R.; HOPE, B. T.; NESTLER, E. J.; SHAHAM, Y. Incubation of methamphetamine craving is associated with selective increases in expression of Bdnf and trkb, glutamate receptors, and epigenetic enzymes in cue-activated fos-expressing dorsal striatal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 21, p. 8232-8244, 2015.

LIU, B.; YAN, J.; LI, J.; XIA, W. The Role of BDNF, YBX1, CENPF, ZSCAN4, TEAD4, GLIS1 and USF1 in the Activation of the Embryonic Genome in Bovine Embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 22, p. 16019, 2023.

LU, B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. **Learning & memory**, v. 10, n. 2, p. 86-98, 2003.

LU, B.; NAGAPPAN, G. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. **Neurotrophic factors**, p. 223-250, 2014.

MAISONPIERRE, PC.; BELLUSCIO, L.; SQUINTO, S.; IP, NY.; FURTH, M. E.; LINDSAY, R. M.; YANCOPOULOS, G. D. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. **Science**, v.247, n. 4949, p. 1446-1441, 1990.

MALEKAN, M.; NEZAMABADI, S. S.; SAMAMI, E.; MOHEBALIZADEH, M.; SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N. BDNF and its signaling in cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 149, n. 6, p. 2621–2636, 2023.

MASOUDI, R.; DADASHPOUR-DAVACHI, N.; ASADZADEH, N.; HATEFI, A.; ALIPOUR-JENAGHARD, P. MitoQ preserves the quality and fertility of liquid-preserved ram sperm. **Theriogenology**, 2023.

MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: A dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 10, p. 589–594, 2004.

MERRITT, V.; CLARK, A. L.; EVANGELISTA, N. D.; SORG, S. F.; SCHIEHSER, D. M.; WOOD-DELANO, L. Dissociation of BDNF Val66Met polymorphism on neurocognitive functioning in military veterans with and without a history of remote mild traumatic brain injury. **The Clinical Neuropsychologist**, v. 34, n. 6, p. 1226-1247, 2020.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

MUTTER, D.; MIDDENDORFF, R.; DAVIDOFF, M. S. Neurotrophic factors in the testis. **Biomedical Reviews**, v. 10, p. 25-30, 1999.

NAJAFI, A.; ASADI, E.; MOAWAD, A. R.; MIKAEILI, S.; AMIDI, F.; ADUTWUM, E.; SAFA, M.; SOBHANI, A. G. Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 7, p. 1658- 1665.e4, 2017.

NIU, C.; YUE, X.; AN, J. J.; XU, H.; XU, B. Genetic dissection of BDNF and TrkB expression in glial cells. **bioRxiv**, p. 2023.07. 14.549007, 2023.

NUMAKAWA, T.; ODAKA, H. Brain-derived neurotrophic factor and neurogenesis. In: Factors Affecting Neurodevelopment. **Academic Press**, p. 121-131, 2021

PARK, H.; POPESCU, A.; POO, M. Essential role of presynaptic NMDA receptors in activity-dependent BDNF secretion and corticostriatal LTP. **Neuron**, v. 84, n. 5, p. 1009-1022, 2014.

PENG, J. Y.; AN, X. P.; FANG, F.; GAO, K. X.; HAN, P.; BAO, L. J.; MA, H. D.; CAO, B. Y. MicroRNA-10b suppresses goat granulosa cell proliferation by targeting brain-derived neurotrophic factor. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 54, p. 60-67, 2016.

PISANI, A.; PACIELLO, F.; VECCHIO, V. DEL; MALESCI, R.; CORSO, E. DE; CANTONE, E.; FETONI, A. R. The Role of BDNF as a Biomarker in Cognitive and Sensory Neurodegeneration. **Journal of Personalized Medicine**, v. 13, n. 4, 2023.

QIN, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, T.; YIN, C.; QIAO, J.; GUO, W.; LU, B. TrkB agonist antibody ameliorates fertility deficits in aged and cyclophosphamide-induced premature ovarian failure model mice. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 914, 2022.

SÁEZ-ESPINOSA, P.; HUERTA-RETAMAL, N.; ROBLES-GÓMEZ, L.; AVILÉS, M.; AIZPURUA, J.; VELASCO, I.; ROMERO, A.; GÓMEZ-TORRES, M. J. Influence of in vitro capacitation time on structural and functional human sperm parameters. **Asian Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 447, 2020.

SAFARI, H.; KHANLARKHANI, N.; SOBHANI, A.; NAJAFI, A.; AMIDI, F. Effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on sperm quality of normozoospermic men. **Human Fertility**, v. 21, n. 4, p. 248–254, 2017.

SAPOLSKY, R. M. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: A primer on neuron death. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 755–765, 2000.

SILVA, P.F.N. **Physiology of peroxidation process in mammalian sperm**. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculty of Veterinary Science, Utrecht University, Utrecht, 2006.

SKAPER, S. D. **Neurotrophins: An overview**. Springer, 2012. p. 1-12

SVECHNIKOV, K.; IZZO, G.; LANDREH, L.; WEISSER, J.; SODER, O. Endocrine disruptors and Leydig cell function. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

TAN, X.; ZHAO, L.; TANG, Yuxin. The function of BDNF and its receptor in the Male genitourinary system and its potential clinical application. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 1, p. 110-121, 2022.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 189–198, 2001.

TROMBETTA, I.; DE MOURA, J. R.; ALVES, C. R.; CARBONARI-BRITO, R.; CEPEDA, F. X.; LEMOS Jr, J. R.; Serum levels of BDNF in cardiovascular protection and in response to exercise. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 263-269, 2020.

VAN OPDENBOSCH, N.; LAMKANFI, M. Caspases in cell death, inflammation, and disease. **Immunity**, v. 50, n. 6, p. 1352-1364, 2019.

WANG, C. S.; KAVALALI, E. T.; MONTEGGIA, L. M. BDNF signaling in context: From synaptic regulation to psychiatric disorders. **Cell**, v. 185, n. 1, p. 62–76, 2022.

WOŹNIAK, W. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF): role in neuronal development and survival. **Folia Morphologica (Warsz)**, v. 52, n. 4, p. 173-181, 1993.

XIU, M. H.; LI, Z.; CHEN, D. C.; CHEN, S.; CURBO, M. E.; WU, H. E.; TONG, Y. S.; TAN, S. P.; ZHANG, X. Y. Interrelationships between BDNF, Superoxide Dismutase, and Cognitive Impairment in Drug-Naive First-Episode Patients with Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 46, n. 6, p. 1498–1510, 2020.

YANEVA-SIRAKOVA, T.; TRAYKOV, L.; KARAMFILOFF, K.; PETROV, I.; HISTROVA, J.; VASSILEV, D. Neurotrophins in carotid atherosclerosis and stenting. **Annals of Medicine**, v. 55, n. 1, p. 335-341, 2023.

ZHANG, H.; QIN, F.; LIU, A.; SUN, Q.; WANG, Q.; QIAN, L.; LU, S.; ZHANG, D.; LU, Z. Retracted: Kuntai capsule attenuates premature ovarian failure through the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, n. 111885, 2019.

ZHAO, X.; DU, F.; LIU, X.; RUAN, Q.; WU, Z.; LEI, C.; DENG, Y.; LUO, C.; JIANG, J.; SHI, D.; LU, F. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is expressed in buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian follicles and promotes oocyte maturation and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 130, p. 79-88, 2019.

ZHENG, L.; LI, C.; SUN, Y.; LIU, Z.; ZHOU, X. Expression of brain-derived neurotrophic factor in mature spermatozoa from fertile and infertile men. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 1-2, p. 44-47, 2011.

4. ARTIGO

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) NA QUALIDADE DO SÊMEN DE CARNEIROS

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico *Animal Reproduction Science*

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações e tempos de exposição ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na qualidade do sêmen de carneiros. Amostras de sêmen de carneiros (n=5) foram submetidas à diferentes concentrações (0; 10; 20; 40 e 80 µg/L) e dois tempos de exposição (T0 e T30 minutos) ao BDNF. Foram avaliados a cinética computadorizada (CASA) e o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional pelo teste hiposmótico (HOST+) e íntegra (IMP+; SYBR-Green/Iodeto de propídio), sem estresse oxidativo (EO-; CellROX®) e com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM+; JC-1). Foi observado um efeito significativo das concentrações de BDNF sobre HOST+, IMP+, EO- e PMM+. O tempo de exposição influenciou os parâmetros CASA: motilidade total e progressiva; velocidades curvilínea (VCL), em linha reta (VSL) e do percurso médio (VAP), linearidade (LIN) e o índice de oscilação (WOB). A concentração de 10 µg/L apresentou maior HOST+, IMP+, EO- e PMM+. O tempo de exposição de 30 minutos reduziu os valores médios da maioria dos parâmetros cinéticos, mas manteve estável os demais parâmetros. A interação entre a concentração de 10 µg/L de BDNF e o T30 aumentou o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional em relação às outras interações. Conclui-se que a adição do BDNF na concentração de 10 µg/L durante 30 minutos melhora a qualidade do sêmen de carneiros.

Palavras-chave: Antioxidantes, Cinética espermática, Membrana plasmática, Neurotrofinas, Ovinos.

4.1 Introdução

A peroxidação lipídica no sêmen é desencadeada pelo desequilíbrio entre substâncias antioxidantes e oxidantes presentes e que resulta no aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio - EROs (Guerra et al., 2004) que podem provocar alterações metabólicas e funcionais aos espermatozoides (Agarwal et al., 2005). Os espermatozoides de carneiros são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo devido à presença elevada de ácidos graxos polinsaturados na membrana plasmática (Bucak et al., 2007) fazendo com que eles sofram maiores danos devido à peroxidação lipídica (Nascimento et al., 2018). Elevadas concentrações de EROs no sêmen produzidas a partir da peroxidação lipídica podem desencadear o estresse oxidativo, impactando negativamente o metabolismo energético, a motilidade, a integridade acrossomal, do DNA e a viabilidade dos espermatozoides (Baumber et al., 2002; Bilodeau et al., 2002; Ball, 2008).

Durante o processo de coleta e manipulação do sêmen, os espermatozoides são expostos à diferentes condições ambientais que podem acentuar o estresse oxidativo (Peña et al., 2009; Cocchia et al., 2011) com formação de EROs que comprometem a qualidade espermática e, consequentemente, a sua fertilidade (Lahnsteiner et al., 2011; Hagedorn et al., 2012; Aramli et al., 2016).

Os sistemas de defesa antioxidante podem atuar na prevenção, inibindo a produção de EROs, na interceptação, interrompendo as reações em cadeia e na reparação, um mecanismo pouco usado e limitado pelos espermatozoides (Silva e Guerra, 2012). Estratégias que visem auxiliar os sistemas de defesa antioxidante podem melhorar a qualidade espermática no sêmen de carneiros à medida que atenua os efeitos negativos do estresse oxidativo.

Para compensar a limitada capacidade intrínseca dos espermatozoides em mitigar os efeitos deletérios da presença de EROs e prevenir a peroxidação lipídica (Silva, 2006) tem sido preconizada medidas de proteção exógena (Taylor, 2001) com a adição de substâncias antioxidantes ao sêmen (Masoudi et al., 2023) a exemplo do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Li et al., 2012). O BDNF é uma proteína essencial para o desenvolvimento, função e sobrevivência das células neuronais e pode contribuir para manutenção da qualidade de células reprodutivas por meio da proteção contra danos oxidativos (Skaper, 2012). Em humanos, a adição do BDNF no sêmen foi inversamente relacionada aos níveis de estresse oxidativo (Zhang et al., 2019).

A manipulação do sêmen *in natura* e o tempo que isso leva pode comprometer a sua qualidade por predispor a formação de EROs que prejudicam os espermatozoides. Além dos potenciais prejuízos ao sêmen *in natura* que pode ser utilizado como material genético nesta condição sem ser processado, estes fatores também podem prejudicar a qualidade do sêmen refrigerado e congelado destinados a uso em biotécnicas da reprodução a exemplo da inseminação artificial (IA) que são submetidos a um número maior de etapas de manipulação.

A análise da efetividade e a definição da melhor concentração de BDNF a ser adicionada ao sêmen de carneiros pode representar um avanço significativo na preservação da sua qualidade. Além disso, compreender como se dá o efeito sobre os espermatozoides nas diferentes concentrações de BDNF ao longo do tempo de exposição poderá abrir perspectivas de desenvolvimento de metodologias adequadas para sua adição ao sêmen de carneiros. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações e tempos de exposição do BDNF na qualidade do sêmen de carneiros.

4.2. Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) com o número de protocolo 0035/2020.

4.2.1. Animais experimentais e manejo

Foram utilizados cinco ($n=5$) carneiros sexualmente maduros do Núcleo de Conservação de ovinos da raça Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros com peso médio de 60 kg, com idade entre 3 e 5 anos, bom estado nutricional e libido. Todos os animais foram manejados em regime semi-intensivo, permanecendo sob pastejo à campo entre 07h00 e 16h00, onde consumiam forragem nativa e cultivada, composta pelos capins-pangola (*Digitaria decumbens L*), estrela (*Cynodon nlemfuensis*), buffel (*Cenchrus ciliaries*) e *Panicum maximum* das cultivares aruana e green-panic. Após esse período, os animais permaneciam em estábulo coberto para pernoitar das 16h00 às 07h00, onde recebiam suplementação alimentar com volumoso (50%) de silagem de milho e concentrado (50%) à base de farelo de soja e farelo de milho, com disponibilidade de sal mineral e água *ad libitum* durante todo dia.

4.2.2. Colheita e processamento de sêmen

A colheita do sêmen foi feita pelo método da vagina artificial modelo LABRA-2020 (Molina et al., 2022) com água aquecida ($\sim 52^{\circ}\text{C}$), utilizando-se como manequim uma ovelha em estro natural. Os ejaculados foram coletados em tubos (50 mL) pré-aquecidos (37°C) e depois transferidos para tubos graduados (15 mL) e mantidos em banho-maria (37°C). Os ejaculados foram submetidos às seguintes avaliações seguindo-se recomendações do CBRA (CBRA, 2013): volume (mL), vigor espermático (0 a 5), motilidade espermática total (0 a 100%), concentração espermática ($\times 10^6 \text{ sptz/mL}$) e número total de espermatozoides ($\times 10^9 \text{ sptz}$). O vigor e a motilidade espermática foram avaliados por meio da microscopia óptica, com uma amostra de sêmen (10 μL) colocada entre lâmina e lamínula e levada ao microscópio óptico (Olympus Optica Co. Tokyo, Japão) em uma magnitude de 400 vezes. A concentração espermática foi mensurada adicionando-se uma alíquota de sêmen (10 μL) em água destilada na proporção 1:400 realizando-se a contagem dos espermatozoides em câmara de Neubauer, em microscópio óptico (Olympus Optica Co. Tokyo, Japão) com magnitude de 400 vezes. O número total de espermatozoides foi determinado por meio da multiplicação da concentração espermática pelo volume total ejaculado. Apenas aqueles ejaculados com valores de vigor ≥ 3 , e de motilidade $\geq 70\%$ foram selecionados para o experimento.

Amostras de sêmen foram removidas de cada ejaculado e diluídas em solução contendo BDNF (Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) e salina fosfatada (PBS) mantendo-se uma concentração espermática final de 200 espermatozoides/mL. Foram formados os seguintes grupos que variaram quanto à concentração final do BDNF: 0 $\mu\text{g/L}$ (controle); 10 $\mu\text{g/L}$; 20 $\mu\text{g/L}$; 40 $\mu\text{g/L}$ e 80 $\mu\text{g/L}$. Os grupos experimentais foram submetidos a análises espermáticas após serem expostos por ± 5 minutos que foi considerado o tempo inicial (T_0) e após 30 minutos (T_{30}) de exposição sob incubação em banho-maria a 37°C .

4.2.3. Análises espermáticas

a) Cinética espermática

Amostras de sêmen (5 μL) dos grupos experimentais foram diluídas a uma concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL em solução avaliadora pré-aquecida a 37°C (Azevedo, 2006) para avaliação da cinética espermática pela Análise Espermática Assistida por Computador (CASA). Depois de homogeneizadas e mantidas a 37°C por 5 minutos, foram pipetadas alíquotas de 2 μL das amostras diluídas para uma câmara de Makler® (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) pré-aquecida a 37°C , para captura e análise de imagens por meio de uma câmera de vídeo (Basler ace acA1300-200um, Ahrensburg, Alemanha) conectada a um microscópio com contraste de fase (Nikon® 50i, Japão), sob aumento de 100 vezes. A captura foi feita a uma velocidade de 203 frames/segundo, com seleção manual de cinco campos

equidistantes de um mesmo ponto central, capturando-se no mínimo 600 células por amostra e uma média de 120 células por campo. As imagens capturadas foram analisadas pelo *Sperm Class Analyzer* (SCA®, Microoptics, S.L. Versão 6.5, Barcelona, Espanha).

Foram analisados os parâmetros cinéticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), linearidade ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$), retilinearidade ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e índice de oscilação ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL} \times 100$). Foram considerados como móveis apenas aqueles espermatozoides que apresentaram valores de $\text{VCL} \geq 20 \mu\text{m}/\text{segundo}$. Os espermatozoides móveis foram ainda classificados como rápidos (RAP) quando apresentavam $\text{VCL} \geq 200$. Espermatozoides que apresentaram $\text{STR} > 80 \%$ foram considerados progressivos e com $\text{LIN} \geq 40 \%$ caracterizados com movimento linear. Foram utilizados os dados dos parâmetros de cada espermatozoide das amostras para análise.

b) Funcionalidade da membrana plasmática

Foi avaliada a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides por meio do teste hiposmótico (HOST; Jeyendran et al., 1984), que se baseia na observação das caudas enroladas ou inchadas dos espermatozoides após exposição a uma solução hiposmótica de 100 mOsm (9 g de frutose e 4,9 g de citrato de sódio por litro de água Mili Q). O procedimento consistiu em incubar 10 μL de sêmen com 100 μL da solução hiposmótica a 37°C por 60 minutos. Após a incubação, 20 μL da mistura foram adicionados em lâmina-lamínula para posterior visualização em microscópio óptico equipado com contraste de fase (Nikon 50i, Japão) sob ampliação de 1000x em óleo de imersão. Foi realizada uma subtração dos valores obtidos com o percentual de espermatozoides com cauda dobrada ou enrolada na análise de morfologia espermática. Foram contados 200 espermatozoides por amostra, considerando aqueles com cauda enrolada ou inchada como possuidores de membrana plasmática funcional (HOST+).

c) Integridade de membrana plasmática

Para a análise da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides (IMP) uma alíquota de sêmen (5 μL) foi submetida à associação dos fluorocromos SYBR-14 e iodeto de propídio (20 mM), contidos no kit de ensaio disponível comercialmente Live/Dead Sperm Viability (Molecular Probes Inc., OR, USA). Foi realizada a leitura de 200 espermatozoides sob imersão em óleo, com magnitude de 1000 vezes, em microscópio de epifluorescência (Nikon® 50i, Japão), usando o filtro com comprimento de onda de excitação de 450–490 e de emissão de 515 nanômetros. As membranas plasmáticas dos espermatozoides foram classificadas como: íntegras (cabeça corada de verde) e lesadas (cabeça corada de vermelho) sendo os resultados expressos em percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (IMP+).

d) Estresse oxidativo

O estresse oxidativo (EO) foi avaliado utilizando a sonda fluorescente CellROX Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) em uma concentração final de 5 μM (Castro et al., 2016). Esta sonda penetra na célula e, quando oxidada por radicais livres intracelulares, se liga ao DNA, emitindo uma fluorescência verde intensa (Castro et al., 2016). Foi realizada a leitura de 200 espermatozoides sob imersão em óleo, com magnitude de 1000 vezes, em microscópio de epifluorescência (Nikon® 50i, Japão), usando o filtro com comprimento de onda de excitação de 450–490 e de emissão de 515 nanômetros. Os espermatozoides foram classificados de acordo com a intensidade da coloração verde observada na cabeça como possuindo (verde

intenso) ou não (verde fraco) sinais de estresse oxidativo sendo os resultados expressos em percentual de espermatozoides sem sinais de estresse oxidativo (EO-).

e) **Potencial de membrana mitocondrial**

O potencial da membrana mitocondrial dos espermatozoides (PMM) foi avaliado através da coloração com JC-1 (5,50,6,60-tetracloro-1,10,3,30-iodeto de tetraetil-benzimidazolil-carbocianina, T3168, Invitrogen), seguindo protocolo descrito por Oztürk et al. (2020). Foi preparada uma solução estoque de JC-1 (1,53 mM) em solução de dimetilsulfóxido que após a filtração foi armazenada a -20 °C. Em seguida, foram misturados 300 µL da amostra de sêmen com 2,5 µL de JC-1 sendo esta mistura foi incubada a 37°C, no escuro, por 15 minutos

Uma gota da amostra (2,5 µL) foi colocada entre lâmina e lamínula para serem examinados 200 espermatozoides com uma ampliação de 400 vezes, utilizando um microscópio de fluorescência (Nikon® 50i, Japão), equipado com filtro com comprimento de onda de excitação de 450–490 e de emissão de 515 nanômetros. A fluorescência amarela ou laranja emitida pela peça intermediária indicava alto potencial de membrana mitocondrial. Por outro lado, a coloração verde da peça intermediária indicou baixo potencial de membrana mitocondrial. Os resultados foram expressos em percentual de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM+).

4.2.4. **Delineamento experimental e análise estatística**

Para estudar os efeitos da concentração de BDNF (fator 1), tempos de exposição (fator 2) e da interação entre eles, os dados foram submetidos à estatística paramétrica e não paramétrica. Para determinar o cumprimento dos pressupostos necessários para aplicação de estatística paramétrica os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Hartley). Os dados que não apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foram transformados pelo arco seno da raiz quadrada. Aqueles que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade antes (MT, VCL, VSL, VAP, LIN, ALH e WOB) e após terem sido transformados (MP, BCF, HYPER, RAP, IMP+, PMM+) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo Teste F e, posteriormente, foi aplicado o teste post-hoc de Tukey para comparar as médias entre si.

Para as análises foi utilizado um modelo misto (PROC MIXED) usando-se o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Onde: Y_{ij} é a variável dependente ou parâmetro espermático, μ é a média de todas as observações, T_i representa o efeito das concentrações de BDNF (0, 10, 20, 40 and 80µg/L), β_j é o efeito dos tempos de exposição ao BDNF (T0 e T30), $(T\beta)_{ij}$ representa o efeito da interação entre as concentrações e os tempos de exposição ao BDNF, e ϵ_{ij} representa o erro experimental

Para os parâmetros que mesmo após a transformação permaneceram sem distribuição normal (STR, EO- e HOST+) foi aplicada estatística não paramétrica, utilizando-se uma análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis com o teste post-hoc de Dunn. Todas as avaliações foram feitas considerando-se 95% de confiança e usando-se o SAS® (Versão 9.1).

4.3 **Resultados**

Os resultados relativos aos parâmetros de cinética espermática, funcionalidade e integridade de membrana plasmática, estresse oxidativo e potencial de membrana mitocondrial de acordo com as concentrações e com tempo de exposição ao BDNF e a interação entre estes dois fatores estão expostos respectivamente nas Tabelas 1 e 2, e na Figura 3.

Foi observado um efeito significativo ($P < 0,05$) das concentrações de BDNF (Fator 1) sobre o HOST+, IMP+, EO- e PMM+. O tempo de exposição (Fator 2) influenciou significativamente ($P < 0,05$) os parâmetros do CASA MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, WOB e HYPER, mas não influenciou ($P > 0,05$) o STR, ALH, BCF, RAP, HOST+, IMP+, EO- e PMM+. A interação entre as concentrações e os tempos de exposição ao BDNF influenciou ($P < 0,05$) apenas o HOST.

A concentração de 10 µg/L apresentou os maiores percentuais de espermatozoides com membrana plasmática funcional (HOST+) e íntegra (IMP+), sem estresse oxidativo (EO-) e com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM+) em relação às outras concentrações de BDNF. O tempo de exposição de 30 minutos (T30) diminuiu significativamente ($P < 0,05$) os valores de todos os parâmetros cinéticos que sofreram influência deste fator (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, WOB e HYPER). A análise dos efeitos das interações entre os fatores, entretanto, mostrou que a interação entre de 10 µg/L de BDNF e o T30 aumentou ($P < 0,05$) o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional (HOST+) em relação às outras interações.

4.4. Discussão

Esse foi o primeiro trabalho a investigar o efeito da adição de diferentes concentrações de BDNF e tempos de exposição sobre a qualidade do sêmen fresco de carneiros. Nesse trabalho foi observado que a adição da proteína BDNF conferiu efeitos positivos à qualidade espermática na concentração de 10 µg/L. Similarmente, a adição do BDNF no sêmen fresco de humanos em uma concentração semelhante a utilizada nesse trabalho (0,133 nM; aproximadamente 9,5 µg/L) foi benéfica à qualidade espermática conforme foi observado nesse trabalho, a qual aumentou a atividade mitocondrial e motilidade além de reduzir a peroxidação lipídica, demonstrando assim seu efeito contra danos oxidativos (Safari et al., 2018).

Foi observado no presente estudo que níveis acima de 10 µg/L de BDNF (20, 40 e 80 µg/L) não melhoraram a funcionalidade e integridade de membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial nem diminuíram o estresse oxidativo dos espermatozoides. O BDNF pode ter ampliado a atividade da catalase e regulado enzimas antioxidantes, a exemplo da glutathione e diminuído a ativação da SOD, estabilizando a concentração de EROs em níveis aceitáveis, prevenindo o estresse oxidativo nos espermatozoides (Najafi et al., 2017a; Najafi et al., 2017b).

A adição simultânea do BDNF e seu antagonista no sêmen de bovinos levou a uma redução na atividade mitocondrial supostamente por sua atuação em regular o metabolismo espermático e o potencial de membrana mitocondrial, cujo efeito pode ser atribuído ao estímulo da ativação da via PI3K/Akt no espermatozoide (Li et al., 2012). A ativação dessa via pode manter a motilidade, viabilidade e a integridade do DNA e o potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides, inibindo a ativação das caspases e eventos ligados à apoptose (Almeida et al., 2005; Koppers et al., 2011; Bolanos et al., 2014), porém nesse estudo não foi observado efeito sobre a motilidade e nos outros parâmetros cinéticos.

O fato da concentração de 10 µg/L de BDNF ter apresentado os melhores efeitos sobre a qualidade dos espermatozoides pode ser atribuído a regulação da expressão gênica que frequentemente segue uma resposta de dose-resposta, onde concentrações mais baixas podem resultar em modulações específicas e desejadas. Em concentrações superiores, embora o BDNF ainda possa ativar os receptores, a saturação ou ativação excessiva de outras vias de sinalização interligadas por retroatividade podem comprometer a expressão gênica (Kochen et al., 2022). Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade de efeitos bifásicos, no qual concentrações elevadas de BDNF na primeira fase causem inicialmente uma resposta biológica benéfica, porém a segunda fase é caracterizada por um efeito adverso na mesma resposta biológica. Nesse sentido, concentrações mais altas podem induzir respostas celulares opostas às observadas em concentrações mais baixa (Jodynis-Liebert e Kujawska, 2020).

O fato de o tempo de exposição não ter alterado o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional e íntegra, o estresse oxidativo e o potencial de membrana mitocondrial, pode ser explicado pela necessidade do BDNF requerer um período para interagir com os espermatozoides e modular suas funções. Processos de sinalização, reparo celular e adaptação fisiológica podem ser mais efetivamente desencadeados e sustentados durante um período prolongado de exposição, permitindo que o BDNF exerça seus efeitos positivos de maneira mais eficaz. Entretanto, a alteração na cinética espermática observada pode ser explicada pela redução no funcionamento dos espermatozoides que foi se esgotando ao longo do tempo que resultou na diminuição da motilidade e não de outras características relevantes da estrutura e função dos espermatozoides e, devido (Barranco et al., 2021; Petrone et al., 2023).

A melhoria observada no percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional na interação entre a concentração de 10 μ L e o tempo de exposição de 30 minutos em relação às outras interações pode ser explicada pela fisiologia dos espermatozoides que é influenciada pelo equilíbrio entre a regulação da homeostase iônica e a manutenção da funcionalidade da membrana celular (Bernardino et al., 2019). Concentrações menores e um tempo de exposição mais prolongado ao BDNF possivelmente garantiram um equilíbrio iônico e um período necessário para a fixação do BDNF nos receptores TrkB e desencadeamento de respostas intracelulares que auxiliaram na manutenção e proteção dos espermatozoides contra efeitos deletérios das EROs. Essa interação pode representar um aumento na disponibilidade de espermatozoides com membrana plasmática funcional capazes de suportar as condições adversas do ambiente uterino e, consequentemente, melhorar as taxas de fertilidade.

O sêmen fresco de carneiros pode ser mantido de 28 a 30 °C puro ou diluído por um período não superior a 30 e 60 minutos, respectivamente (Gibbons et al., 2019). Por outro lado, taxas de prenhez de ovelhas foram inferiores quando o sêmen fresco foi utilizado a partir de 60 minutos em inseminação artificial por laparoscopia (Korkmaz et al., 2017). Nesse sentido, a determinação da melhor concentração e tempo exposição do sêmen ao BDNF poderia preservar a qualidade do sêmen ao longo do tempo da manipulação, especialmente por haver uma mitigação dos efeitos deletérios oriundos da manipulação e pelo auxílio no metabolismo dos espermatozoides, mantendo a qualidade do sêmen e aumentando as taxas de prenhez após do seu uso nas biotecnologias da reprodução.

4.5. Conclusão

Conclui-se que a adição do BDNF na concentração de 10 μ g/L durante 30 minutos melhora a qualidade do sêmen de carneiros.

4.6. Referências Bibliográficas

- Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K., 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Alahmar, A., 2019. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. *J. Hum. Reprod. Sci.* 12, 4–18. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_150_18
- Almeida, R.D., Manadas, B.J., Melo, C. V., Gomes, J.R., Mendes, C.S., Grãos, M.M., Carvalho, R.F., Carvalho, A.P., Duarte, C.B., 2005. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ.* 12, 1329–1343. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401662>
- Aramli, M.S., Golshahi, K., Nazari, R.M., Golpour, A., Aramli, S., 2016. Influence of Glutamine Supplementation on Motility and Fertilization Success of Frozen-Thawed Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 51, 474–477. <https://doi.org/10.1111/rda.12704>

- Azevedo, H.C., 2006. Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos a criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e alfa-lactoalbumina (Tese). UNESP, São Paulo.
- Azúa, G.D.J., Saucedo, L., Giordana, S., Magri, M.L., Buffone, M.G., Neuspiller, F., Vazquez-Levin, M.H., Marín-Briggiler, C.I., 2017. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) is present in human spermatozoa and is related with sperm motility. The use of recombinant FGF2 to improve motile sperm recovery. *Andrology* 5, 990–998. <https://doi.org/10.1111/andr.12398>
- Ball, B.A., 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- Barranco, I., Rubio, C.P., Tvarijonaviciute, A., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J., 2021. Measurement of oxidative stress index in seminal plasma can predict in vivo fertility of liquid-stored porcine artificial insemination semen doses. *Antioxidants* 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10081203>
- Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K., Ball, B.A., 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1025–1033. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00710-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00710-5)
- Bernardino, R.L., Carrageta, D.F., Sousa, M., Alves, M.G., Oliveira, P.F., 2019. pH and male fertility: making sense on pH homeodynamics throughout the male reproductive tract. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 3783–3800. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03170-w>
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Cormier, N., Sirárd, M-C., 2002. 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* 3, 1105–1122.
- Bucak, M.N., Ateşşahin, A., Varışli, Ö., Yüce, A., Tekin, N., Akçay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67, 1060–1067. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.004>
- Cocchia, N., Pasolini, M.P., Mancini, R., Petrazzuolo, O., Cristofaro, I., Rosapane, I., Sica, A., Tortora, G., Lorzio, R., Paraggio, G., Mancini, A., 2011. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 75, 1201–1210. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.031>
- De Castro, L.S., De Assis, P.M., Siqueira, A.F.P., Hamilton, T.R.S., Mendes, C.M., Losano, J.D.A., Nichi, M., Visintin, J.A., Assumpção, M.E.O.A., 2016. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8213071>
- Gallardo Bolaños, J.M., Balao Da Silva, C.M., Martín Muñoz, P., Morillo Rodríguez, A., Plaza Dávila, M., Rodríguez-Martínez, H., Aparicio, I.M., Tapia, J.A., Ortega Ferrusola, C., Peña, F.J., 2014. Phosphorylated AKT preserves stallion sperm viability and motility by inhibiting caspases 3 and 7. *Reproduction* 148, 221–235. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0191>
- Gibbons, A.E., Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M.M., Spinelli, M.V., Cueto, M.I., 2019. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Anim. Reprod.* 16, 803–809. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>
- Guerra, M.M.P., Evans, G., Maxwell, W.H.C., 2004. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 28, 187–195.
- Hagedorn, M., McCarthy, M., Carter, V.L., Meyers, S.A., 2012. Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *PLoS One* 7, 2–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039397>

- Jean-François Bilodeau, Sophie Blanchette, Nathaly Cormier, M.-A.S., 2002. 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* 3, 1105–1122.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction* 70, 219–228 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>.
- Jodynis-liebert, J., Kujawska, M., 2020. Biphasic dose-response induced by phytochemicals: Experimental evidence. *J. Clin. Med.* 9. <https://doi.org/10.3390/jcm9030718>
- Kochen, M.A., Andrews, S.S., Wiley, H.S., Feng, S., Sauro, H.M., 2022. Dynamics and Sensitivity of Signaling Pathways. *Curr. Pathobiol. Rep.* 10, 11–22. <https://doi.org/10.1007/s40139-022-00230-y>
- Koppers, A.J., Mitchell, L.A., Wang, P., Lin, M., Aitken, R.J., 2011. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem. J.* 436, 687–698. <https://doi.org/10.1042/BJ20110114>
- Korkmaz, M.K., Emsen, E., Köker, A., Kocamüftüoğlu, M., 2017. Duration effect of fresh semen kept in vitro on sheep conception rate. *Anim. Reprod.* 14, 1147–1150. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR855>
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., Kunz, F.A., 2011. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology* 76, 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.019>
- Li, C., Li, C., Zhu, X., Wang, C., Liu, Z., Li, W., Lu, C., Zhou, X., 2012. The expression and putative role of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in bovine sperm. *Theriogenology* 77, 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.003>
- Li, C., Li, C., Zhu, X., Wang, C., Liu, Z., Li, W., Lu, C., Zhou, X., 2012. The expression and putative role of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in bovine sperm. *Theriogenology* 77, 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.003>
- Marti, E., Marti, J.I., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2008. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J. Androl.* 29, 459–467. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003459>
- Masoudi, Reza., Dadashpour-Davachi, N., Asadzadeh, N., Hatefi, A., Alipour-Jenaghard, P., 2023. MitoQ preserves the quality and fertility of liquid-preserved ram sperm. *Theriogenology*, 216, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.023>
- Molina, Constantino, J, J., Oliveira, M.B. De, Azevedo, H.C., 2020. LABRA-2020 para colheita de Modelo de vagina artificial LABRA-2020 para colheita. *Embrapa* 236, 1–13.
- Najafi, A., Amidi, F., Sedighi Gilani, M.A., Moawad, A.R., Asadi, E., Khanlarkhni, N., Fallah, P., Rezaiian, Z., Sobhani, A., 2017a. Effect of brain-derived neurotrophic factor on sperm function, oxidative stress and membrane integrity in human. *Andrologia* 49, 1–10. <https://doi.org/10.1111/and.12601>
- Najafi, A., Asadi, E., Moawad, A.R., Mikaeili, S., Amidi, F., Adutwum, E., Safa, M., Sobhani, A.G., 2017b. Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. *Fertil. Steril.* 106, 1658–1665.e4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.004>
- Nascimento, A.L.C., Santos, A.D.F., Azevedo, H.C., Velarde, J.M.D.S., Lima, C.A., Pereira, M.A., Pinheiro, G.O., Gomes, L.C., 2018. Use of aqueous extract of noni in extender for sheep semen freezing. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 70, 1547–1556. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9944>
- Peña, F.J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J.A., Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Macías García, B., 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology:

- A review. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 345–349. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01211.x>
- Petrone, O., Serafini, S., Yu, B.Y.K., Filonenko, V., Gout, I., O’Flaherty, C., 2023. Changes of the Protein CoAlation Pattern in Response to Oxidative Stress and Capacitation in Human Spermatozoa. *Int. J. Mol. Sci.* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms241512526>
- Safari, H., Khanlarkhani, N., Sobhani, A., Najafi, A., Amidi, F., 2018. Effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on sperm quality of normozoospermic men. *Hum. Fertil.* 21, 248–254. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1346301>
- Silva P.F.N. 2006. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. Doctoral Thesis, Utrecht University, Faculty of Veterinary Science, Utrecht University, Utrecht. 177p
- Silva, E. C. B., Guerra, M. M. P. (2012). Aspectos fundamentais da morfofisiologia e criopreservação espermática em pequenos ruminantes. *Rev. Bras. Repro. Anim* 36, 181-187.
- Skaper, S. D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Neurotrophic factors: Methods and protocols*, 1-12.
- Tan, X., Zhao, L., Tang, Y., 2023. The Function of BDNF and Its Receptor in the Male Genitourinary System and Its Potential Clinical Application. *Curr. Issues Mol. Biol.* 45, 110–121. <https://doi.org/10.3390/cimb45010008>
- Taylor, C.T., 2001. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 189–198. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(01\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(01)00099-0)
- Zhang, H., Qin, F., Liu, A., Sun, Q., Wang, Q., Li, Q., Lu, S., Zhang, D., Lu, Z., 2019. Kuntai capsule attenuates premature ovarian failure through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *J. Ethnopharmacol.* 239, 111885. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111885>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estratégias para mitigar os efeitos do estresse oxidativo ao sêmen de carneiros são importantes para a eficiência dos programas de reprodução assistida associados a este germoplasma já que, quando em excesso, pode comprometer a qualidade espermática e, consequentemente, afetar a fertilidade.

Este foi o primeiro trabalho a investigar os efeitos da adição e de tentar definir a concentração e tempo de exposição ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) ideais para manter ou melhorar a qualidade do sêmen de carneiros. Os benefícios da adição do BDNF que foram verificados neste trabalho podem impactar positivamente a fertilidade de carneiros mitigando os efeitos deletérios oriundos das etapas de colheita, manipulação e processamento do sêmen. Essa adição pode fortalecer os espermatozoides para melhor enfrentar os processos de refrigeração e congelamento, garantindo uma qualidade superior das amostras de sêmen refrigerado e congelado para uso em técnicas de reprodução assistida, a exemplo da inseminação artificial e fertilização *in vitro*.

ANEXOS

Tabela 1. Médias $\pm$ desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco de carneiros submetido à diferentes concentrações do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

Parâmetros	Concentrações de BDNF ($\mu\text{g/L}$)				
	0	10	20	40	80
MT (%)	71,82 $\pm$ 13,77	66,38 $\pm$ 20,60	61,47 $\pm$ 18,77	56,92 $\pm$ 22,27	50,21 $\pm$ 28,79
MP (%)	24,88 $\pm$ 19,20	27,45 $\pm$ 27,03	19,76 $\pm$ 24,62	17,95 $\pm$ 23,94	20,23 $\pm$ 25,86
VCL ($\mu\text{m/s}$)	146,03 $\pm$ 25,52	156,03 $\pm$ 14,23	146,07 $\pm$ 19,52	144,73 $\pm$ 21,58	133,87 $\pm$ 42,28
VSL ($\mu\text{m/s}$)	79,83 $\pm$ 23,60	95,32 $\pm$ 17,56	81,61 $\pm$ 21,95	79,09 $\pm$ 21,16	74,16 $\pm$ 29,99
VAP ($\mu\text{m/s}$)	92,02 $\pm$ 28,03	105,01 $\pm$ 19,54	91,14 $\pm$ 23,70	89,59 $\pm$ 25,41	83,27 $\pm$ 29,32
LIN (%)	54,67 $\pm$ 7,69	61,42 $\pm$ 7,95	55,88 $\pm$ 9,24	54,72 $\pm$ 7,41	52,92 $\pm$ 13,03
STR (%)	82,73 $\pm$ 12,60	90,64 $\pm$ 3,43	89,22 $\pm$ 2,99	88,23 $\pm$ 2,83	84,60 $\pm$ 17,10
WOB (%)	62,23 $\pm$ 8,21	67,31 $\pm$ 7,48	62,14 $\pm$ 8,75	61,48 $\pm$ 8,00	61,61 $\pm$ 5,52
ALH (μm)	2,96 $\pm$ 0,35	2,90 $\pm$ 0,42	2,92 $\pm$ 0,58	2,94 $\pm$ 0,48	2,46 $\pm$ 1,08
BCF (Hz)	21,12 $\pm$ 2,95	27,78 $\pm$ 4,54	21,40 $\pm$ 8,79	24,95 $\pm$ 3,58	23,11 $\pm$ 10,14
HYPER (%)	5,86 $\pm$ 5,63	3,86 $\pm$ 4,68	2,97 $\pm$ 3,77	3,07 $\pm$ 4,13	2,17 $\pm$ 6,15
RAP (%)	8,89 $\pm$ 13,56	11,04 $\pm$ 16,11	8,25 $\pm$ 16,42	6,81 $\pm$ 13,12	7,34 $\pm$ 14,12
HOST+ (%)	56,60 $\pm$ 10,00 ^b	74,80 $\pm$ 27,80 ^a	61,20 $\pm$ 7,94 ^b	53,60 $\pm$ 5,05 ^b	60,90 $\pm$ 4,34 ^b
IMP+ (%)	48,80 $\pm$ 4,70 ^b	76,80 $\pm$ 2,82 ^a	41,80 $\pm$ 4,02 ^b	43,90 $\pm$ 12,26 ^{bc}	33,80 $\pm$ 9,12 ^c
EO – (%)	38,20 $\pm$ 14,92 ^b	68,40 $\pm$ 6,05 ^a	35,10 $\pm$ 3,72 ^b	37,60 $\pm$ 6,85 ^b	34,80 $\pm$ 18,77 ^b
PMM+ (%)	48,0 $\pm$ 10,81 ^b	75,80 $\pm$ 5,94 ^a	42,30 $\pm$ 7,54 ^b	41,50 $\pm$ 5,52 ^b	29,30 $\pm$ 5,05 ^c

MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; VCL – velocidade curvilinear; VSL – velocidade em linha reta; VAP – velocidade do percurso médio; LIN – linearidade; STR – retilinearidade; WOB – índice de oscilação dos espermatozoides; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência de batimento flagelar cruzado; HYPER – hiperatividade; RAP – rápidos; HOST+ – membrana plasmática funcional; IMP+ membrana plasmática íntegra; EO- – sem estresse oxidativo; PMM+ – alto potencial de membrana mitocondrial. Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

Tabela 2. Médias $\pm$ desvio padrão dos parâmetros espermáticos do sêmen fresco de carneiros submetido à diferentes tempos de exposição ao fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

Parâmetros	Tempo de exposição (min)	
	T0	T30
MT (%)	72,31 $\pm$ 18,56 ^a	50,40 $\pm$ 19,08 ^b
MP (%)	36,17 $\pm$ 25,17 ^a	7,94 $\pm$ 7,67 ^b
VCL (μ m/s)	158,92 $\pm$ 20,21 ^a	131,77 $\pm$ 24,35 ^b
VSL (μ m/s)	94,11 $\pm$ 20,75 ^a	69,89 $\pm$ 18,96 ^b
VAP (μ m/s)	105,99 $\pm$ 24,20 ^a	78,42 $\pm$ 17,66 ^b
LIN (%)	59,66 $\pm$ 7,49 ^a	52,18 $\pm$ 9,57 ^b
STR (%)	87,30 $\pm$ 8,82	86,87 $\pm$ 10,82
WOB (%)	66,39 $\pm$ 7,87 ^a	59,52 $\pm$ 5,65 ^b
ALH (μ m)	2,83 $\pm$ 0,36	2,85 $\pm$ 0,83
BCF (Hz)	24,32 $\pm$ 7,94	23,02 $\pm$ 7,29
HYPER (%)	5,73 $\pm$ 5,24 ^a	2,27 $\pm$ 3,71 ^b
RAP (%)	15,75 $\pm$ 16,99	1,18 $\pm$ 1,95
HOST+ (%)	60,18 $\pm$ 17,41	62,62 $\pm$ 22,17
IMP+ (%)	50,40 $\pm$ 16,31	47,64 $\pm$ 16,89
EO- (%)	45,20 $\pm$ 18,23	40,44 $\pm$ 18,23
PMM+ (%)	48,60 $\pm$ 15,49	46,24 $\pm$ 18,83

T0 e T30 – tempos de exposição ao BDNF de aproximadamente 5 minutos e de 30 minutos respectivamente; MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; VCL – velocidade curvilínea; VSL – velocidade em linha reta; VAP – velocidade do percurso médio; LIN – linearidade; STR – retilinearidade; WOB – índice de oscilação dos espermatozoides; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência de batimento flagelar cruzado; HYPER – hiperatividade; RAP – rápidos; HOST – membrana plasmática funcional; IMP+ – membrana plasmática íntegra; EO- – sem estresse oxidativo; PMM+ – alto potencial de membrana mitocondrial. Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

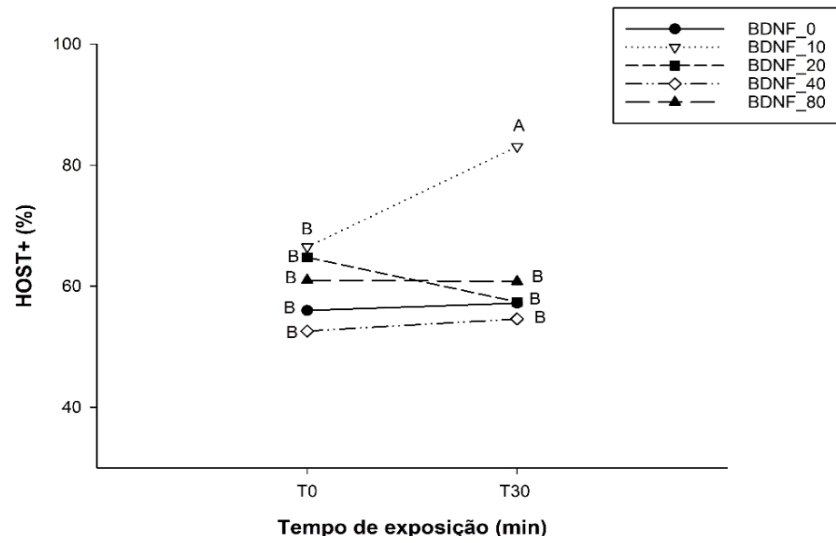


Figura 3. Efeito da interação entre diferentes concentrações e tempos de exposição ao BDNF sobre a funcionalidade da membrana - HOST+. Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças entre as interações. T0 e T30 – tempos de exposição ao BDNF de aproximadamente 5 minutos e de 30 minutos respectivamente.