

## SPERM STIMULATION WITH PEPTIDES

CARLOS T. DA ROS, MARIANO BARCELOS, RUN WANG, HUNTER C. CHAMPION,  
ALINA BARATTA, WAYNE J.G. HELLSTROM, SURESH C. SIKKA, CLÁUDIO TELÖKEN

Department of Urology, Section of Andrology, Tulane University Medical Center, New Orleans,  
Louisiana, USA

### ABSTRACT

**Objective:** Sperm motility has an important role in the normal fertilization process. The motility of post-thaw sperm is so poor and represents a problem, even in some assisted reproduction techniques. Until now, we get few improvements in this field using pentoxifilin and platelet-activating factor. Pituitary adeny-late cyclase-activating polypeptide (PACAP27) is a peptide, which has the capacity to stimulate guanilatocyclase. It is present in sperm tails and could have a relationship with sperm motility. The aim of this study is to establish if the PACAP27 and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) have any action in the motility of the post-thaw sperm.

**Material and Methods:** We mixed 12 post-thaw sperm samples with peptides (PACAP27 and VIP) to improve the sperm motility. The percent motility, viability and motion parameters were evaluated by using a computerized analyzer system.

**Results:** Viability in the initial moment was 33.5% in the 3 groups. After 60 minutes was 27.9%, 29.2% and 30% in the control, VIP and PACAP27 groups, respectively. After 180 minutes was 26.8%, 29.6% and 27,6% in the same groups. The motility after 60 minutes in the PACAP27 and VIP groups was similar to the controls (22.5%, 22.4% and 21.1%, respectively;  $p > 0.05$ ), and after 180 minutes was 22.5%, 21.4% and 21.5% in control, VIP and PACAP27 groups, respectively. Also, there were no differences in the motion parameters among the groups, when evaluated by the computerized analyzer system.

**Conclusion:** We concluded that PACAP27 and VIP had no effects upon motility and viability of post-thaw semen.

**Key words:** sperm, motility, PACAP27, polypeptide, VIP, spermatozoa

**Braz J Urol, 26: 43-47, 2000**

### INTRODUÇÃO

Os peptídeos são agentes de comunicação intercelular que participam do programa de sobrevivência celular, modulam o sinal neuronal e a diferenciação celular. Podem agir no meio intercelular e determinar o desenvolvimento e a sobrevivência da célula. O sinal destes peptídeos geralmente é mediado por alterações intracelulares que envolvem a enzima adenilatociclase (1). Myiata et al. (2,3) descobriram 2 peptídeos amidados com 38 e 27 resíduos de aminoácidos provindos do hipotálamo de ovinos. Os autores perceberam que estes peptídeos tinham uma potente capacidade de estimular a atividade da

adenilatociclase, sendo então denominados polipeptídeos pituitários ativadores da adenilatociclase (PACAP38 e PACAP27), baseados no número de resíduos de aminoácidos que cada um possuía. O PACAP27 corresponde aos 27 resíduos N-terminais do PACAP38. A análise estrutural demonstrou que a formação destes peptídeos é a mesma em humanos, ovinos e ratos, e apresentam uma seqüência 68% homóloga ao polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) (1). Então, pode-se dizer que tanto PACAP27 como o 38 pertencem à mesma família de peptídeos do VIP, secretina, glucagon e hormônio liberador de gonadotrofinas (1,4). Os sítios de ligação (receptores) do PACAP foram localizados, por meio de auto-

radiografia, nos testículos, epidídimos, adrenais, pulmões, fígado, próstata e vesículas seminais. Também foram identificados no hipotálamo, pituitária anterior, cultura de esplenócitos e de astrócitos (1). O PACAP está presente nos testículos e poderia regular a função das células germinativas, através de um mecanismo parácrino, e, devido a isto, possuir um importante papel na espermatogênese (5,6). Leung et al. (7) demonstraram a presença de PACAP, através de imunofluorescência indireta, no epidídimo, principalmente ao nível da cabeça e corpo. É bem conhecido o fato de que também existem receptores do PACAP na cauda dos espermatozóides, envolvendo a adenilatociclase e a motilidade (1). El-Gehani et al. (8) perceberam que alguns fatores parácrinos (PACAP27 e VIP) provavelmente iniciam e mantêm a esteroidogênese testicular precoce fetal em ratos, antes do início da secreção do hormônio luteinizante.

A motilidade espermática é importante no processo normal de fertilização. Devido à preocupação com a SIDA e outras doenças sexualmente transmissíveis, tem sido utilizado somente sêmen criopreservado para a fertilização artificial. Porém, ocorre uma importante perda de motilidade espermática após o descongelamento, o que representa um grande problema a ser resolvido nos processos de fertilização assistida. O processo congelamento/descongelamento causa dano à membrana do espermatozóide, reduzindo a motilidade e, automaticamente, a fertilidade. O dano é determinado pela peroxidação lipídica de ácidos graxos insaturados e pela geração e liberação de radicais livres. Também ocorre alteração no balanço de íons, diminuição da produção de ATP pela mitocôndria e diminuição da produção de energia levando a uma menor motilidade. É claro que a motilidade diminuída torna-se irrelevante quando falamos em injeção intra-citoplasmática de espermatozóides. Até agora, em poucos casos foram obtidos bons resultados na melhora da motilidade após o processo congelamento/descongelamento de sêmen, através do emprego de pentoxifilina e fator de ativação de plaquetas (9-11).

Com o intuito de recuperar a motilidade dos espermatozóides após o descongelamento do sêmen, realizamos este estudo *in vitro*, na tentativa de me-

lhorar a motilidade através da associação com os peptídeos PACAP27 e VIP.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os peptídeos (PACAP27 e VIP) foram desenvolvidos pelo Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade de Tulane e o sêmen foi oriundo do Banco de Sêmen do Departamento de Urologia da mesma universidade.

Foram utilizadas 12 amostras de sêmen humano, congelado de forma habitual em meios de cultura Ham F10 (GIBCO, Long Island, New York) e YOLK (GIBCO, Long Island, New York). As amostras que apresentavam motilidade normal no período pré-congelamento foram selecionadas ao acaso e descongeladas através da incubação à 37°C, durante 5 minutos. O sêmen foi lavado e colocado em meio de cultura Ham F10, com uma concentração média de  $80 \times 10^6$  espermatozóides/ml. Cada amostra foi dividida em 3 grupos contendo 500  $\mu$ L, sendo adicionado 7  $\mu$ L de PACAP27, VIP ou Ham F10 (controle). Então foram avaliados a porcentagem de motilidade, a viabilidade espermática e os parâmetros de motilidade, com o sistema de análise computadorizado. A motilidade foi avaliada através de uma câmara de Makler (Sefi Medical Instruments, Inc., Haifa, Israel) onde foi contado o número de espermatozóides móveis em uma população de 100 espermatozóides. A viabilidade espermática foi medida através da mistura de 10  $\mu$ L da amostra com igual volume de eosina-Y a 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 2 minutos. Então, 100 espermatozóides foram contados com auxílio de uma objetiva de contraste de fase com aumento de 400X. Os espermatozóides não corados foram considerados vivos. Para análise dos parâmetros de motilidade foi empregado um sistema computadorizado de análise de esperma (Cell Track/Sperm analysis system, Motion Analysis Corporation, Santa Rosa, CA) que avalia a motilidade, velocidade curvilínea, linearidade média, velocidade progressiva e deslocamento lateral da cabeça. Sete  $\mu$ L de cada amostra foram colocados sobre uma câmara de Makler para a videomicrografia, com uma objetiva de fase com aumento de 20X. O sistema foi calibrado para detectar 30

imagens/segundo com 15 segundos de duração para captura de imagem, e uma média de 4 a 8 pixels por espermatozóide móvel, sendo então contados aproximadamente 100 espermatozóides. Todas as análises foram realizadas de modo cego por um único observador. Estes parâmetros foram analisados aos 0, 60 e 180 minutos.

Para a análise estatística foi utilizado a análise de variância para comparar os grupos tratados contra o controle, através do programa Staquik statistical package (Lundon Software Inc., Chagrin Falls, OH). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

A motilidade espermática média do grupo controle foi de 22,54%, no grupo do VIP foi 22,19% e no PACAP27 foi 22,24% ( $p > 0,05$ ). Quanto à motilidade, aos 60 minutos após a administração dos peptídeos ao sêmen, identificamos: 21,1% de espermatozóides móveis no grupo controle, 22,4% no grupo do VIP e 22,5% no grupo de PACAP. E estes valores continuaram semelhantes aos 180 minutos também, isto é, 22,5%, 21,4% e 21,5% nos grupos controle, VIP e PACAP ( $p > 0,05$ ) (Tabela-1). A

**Tabela 1** – Análise da motilidade dos espermatozóides por grupo estudado

Tempo (minutos)	Controle (%)	VIP (%)	PACAP27 (%)
0	23,5*	23,5*	23,5*
60	21,1*	22,4*	22,5*
180	22,5*	21,4*	21,5*

\* $p > 0,05$

viabilidade dos espermatozóides foi, aos 0 minutos, 33,5% para todos os grupos, enquanto que aos 180 minutos foi 26,8%, 29,6% e 27,6%, respectivamente para controle, VIP e PACAP27 ( $p > 0,05$ ) (Tabela-2). Os demais parâmetros de motilidade, isto é, velocidade curvilínea, linearidade média, velocidade progressiva e deslocamento lateral da cabeça dos espermatozóides, analisados pelo computador, tam-

**Tabela 2** – Análise da viabilidade dos espermatozóides por grupo estudado

Tempo (minutos)	Controle (%)	VIP (%)	PACAP27 (%)
0	33,5*	33,5*	33,5*
60	27,8*	29,2*	30*
180	26,8*	29,6*	27,6*

\* $p > 0,05$

bém não demonstraram qualquer diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Existem muitas investigações sobre estimulação da motilidade espermática com o objetivo de aumentar as taxas de fertilização. A pentoxifilina produz uma estimulação in vitro dose-dependente da porcentagem de motilidade e da velocidade curvilínea (9). Este efeito pode ser causado pela inibição da AMPc-fosfodiesterase e também por aumento do AMP cíclico intracelular (9). Outras metilxantinas e fatores de ativação plaquetária podem também estimular os movimentos dos espermatozóides (9-11).

Existem 3 receptores de grande afinidade para o PACAP, espalhados no organismo: tipo I - específico para o PACAP27 e 38, e que fracamente apreende o VIP; tipo II (VIP 1) - não apresenta nenhuma diferença de afinidade entre PACAP e VIP (5); e tipo III (VIP 2) - está presente nos testículos (4). O hipotálamo contém as maiores concentrações destes peptídeos e seus respectivos receptores. Foram ainda identificados receptores em muitos outros tecidos, incluindo os testículos (1,12). Nos testículos, o PACAP foi localizado no interior dos túbulos seminíferos, nas espermátides próximas do lúmen, espermatogônias e espermatócitos primários (1,10,13), e também nas caudas de espermatozóides maduros (1). Através de radio-imunoensaio (imunoreatividade com um anti-soro específico), Li et al. (6) e Yanaihara et al. (14) localizaram PACAP nos acrossomas em desenvolvimento das espermátides, mas não em espermátides maduras. As células germi-

nativas mais maduras apresentam um grande número de receptores tipo I do PACAP27, principalmente nas suas caudas (1). A distribuição do receptor VIP II dentro dos túbulos seminíferos sugere um envolvimento com a maturação dos espermátócitos (10). O PACAP pode ainda modular a função das células de Sertoli (9,15).

Usando antagonistas do PACAP, Gozes et al. (16) demonstraram uma inibição da motilidade espermática, evidenciando o papel destes peptídeos na motilidade dos espermatozóides. Foi demonstrado que 200 nM de PACAP38, de PACAP27 e de VIP inibem a síntese de proteínas secretadas pela espermátide (5). O PACAP27 e VIP não apresentaram efeito sobre a viabilidade ou motilidade em geral dos espermatozóides, nesta série. Provavelmente o problema apresentado neste estudo está relacionado com a dose dos peptídeos, uma vez que os dados da literatura sugerem um efeito benéfico sobre a motilidade. Estes estudos com peptídeos devem ser desenvolvidos usando outras doses para tentar obter melhora da qualidade do sêmen descongelado.

## REFERÊNCIAS

1. Shivers BD, Görcs TJ, Gottschall PE, Arimura A: Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology*, 128: 3055-3065, 1991.
2. Myata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino U, Uehara A, Jiang L, Culler M, Coy DH: Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 164: 567-574, 1989.
3. Myata A, Jiang L, Dahl RR, Kitada C, Fujino M, Minamino N, Arimura A: Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun*, 170: 643-648, 1990.
4. Kremples K, Usdini TB, Harta G, Mezey E: PACAP acts through VIP type 2 receptors in the rat testis. *Neuropeptides*, 29: 315-320, 1995.
5. Li M, Nakayama K, Shuto Y, Somogyvari-Vigh A, Arimura A: Testis-specific prohormone convertase PC4 processes the precursor of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Peptides*, 19: 259-268, 1998.
6. West AP, McKinnell C, Sharpe RM, Saunders PT: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide can regulate testicular germ cell protein synthesis in vitro. *J Endocrinol*, 144: 215-223, 1995.
7. Leung PS, Wong TP, Wong PY, Chan HC: Localization and distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the rat epididymis. *Cell Biol Int*, 22: 193-198, 1998.
8. El-Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I: Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod*, 58: 116-123, 1998.
9. Hellstrom WJG, Sikka SC: Pentoxifylline stimulates the movement characteristics of cryopreserved sperm. *Surg Forum*, 40: 648-650, 1989.
10. Sikka SC, Hellstrom WJG: Functional evaluation and motility parameters of pentoxifylline-stimulated cryopreserved human sperm. *ARTA*, 1: 309-319, 1991.
11. Hellstrom WJG, Wang R, Sikka SC: Platelet-activating factor stimulates motion parameters of cryopreserved human sperm. *Fertil Steril*, 56: 768-770, 1991.
12. Heindel JJ, Powell CJ, Paschall CS, Arimura A, Culler MD: A novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating peptide, modulates Sertoli cell function in vitro. *Biol Reprod*, 47: 800-806, 1992.
13. Hannibal J, Fahrenkrug J: Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene by rat spermatogenic cells. *Regulatory Peptides*, 55: 111-115, 1995.
14. Yanaihara H, Vigh S, Kosicz T, Somogyvari-Vigh A, Arimura A: Immunohistochemical demonstration of the intracellular localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat testis using the stamp preparation. *Regul Pept*, 78: 83-88, 1998.
15. Heindel JJ, Sneed J, Powell CJ, Davis B, Culler

MD: A novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, regulates the function of rat granulosa cells in vitro. *Biol Reprod*, 54: 523-530, 1996.

16. Gozes I, Perl O, Zamostiano R, Rubinraut S, Fridkin M, Shocat L, Lewin LM: Multiple ac-

tions of a hybrid PACAP antagonist: neuronal cell killing and inhibition of sperm motility. *Ann N Y Acad Sci*, 865: 266-273, 1998.

*Received: June 15, 1999*

*Accepted after revision: October 11, 1999*

## RESUMO

### ESTIMULAÇÃO DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA COM PEPTÍDIOS

A motilidade espermática é muito importante no processo normal de fertilização. Esta motilidade, após o descongelamento do sêmen, fica muito prejudicada e representa um problema, mesmo para alguns dos processos de fertilização assistida. Até agora poucos avanços ocorreram neste campo, através do emprego de pentoxifilina e fator de ativação de plaquetas. O polipeptídeo pituitário ativador da adenilatociclase 27 (PACAP 27) é um peptídeo com capacidade de estimular a guanilatociclase, e pertence à mesma família do polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP). Está presente na cauda dos espermatozóides e pode estar relacionado com a motilidade espermática. O objetivo deste estudo é estabelecer se o PACAP 27 e o VIP apresentam alguma ação sobre a motilidade espermática após o descongelamento do sêmen.

Foram misturadas 12 amostras de sêmen descongelado com peptídeos (PACAP 27 e VIP) com o intuito de melhorar a motilidade espermática. Avaliamos a viabilidade e a percentagem de motilidade espermática, bem como parâmetros de motilidade analisados por computador.

O índice de viabilidade no momento inicial foi de 33,5%, nos 3 grupos. Aos 60 minutos foi de 27,9%, 29,2% e 30% nos grupos controle, VIP e PACAP, respectivamente, e aos 180 minutos, foi de 26,8% no grupo controle, 29,6% no grupo de VIP e 27,6% no grupo do PACAP ( $p > 0,05$ ). Quanto à motilidade, aos 60 minutos após a administração dos peptídeos ao sêmen, identificamos: 21,1% no grupo controle, 22,4% no grupo do VIP e 22,5% no grupo de PACAP ( $p > 0,05$ ). E estes valores continuaram semelhantes aos 180 minutos também, isto é, 22,5%, 21,4% e 21,5% nos grupos controle, VIP e PACAP. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos demais parâmetros de motilidade, avaliados por computador, entre os 3 grupos.

Concluímos que tanto o PACAP27 como o VIP não apresentam nenhum efeito sobre a viabilidade ou motilidade dos espermatozóides descongelados.

**Unitermos:** fertilidade, motilidade espermática, PACAP, polipeptídeo, VIP, espermatozóides  
**Braz J Urol**, 26: 43-47, 2000

#### Correspondence address:

Carlos Teodósio Da Ros  
Av. Carlos Gomes, 403 / 604  
Porto Alegre, RS, 90480-003  
Fax: (51) 328-1975  
E-mail: daros@voyager.com.br