RENATA LANÇONI

Papel da ubiquitina em garanhões com alta e baixa congelabilidade e aplicação da Coenzima Q-10 como promotora da função mitocondrial espermática

Pirassununga

2018

RENATA LANÇONI

Papel da ubiquitina em garanhões com alta e baixa congelabilidade e aplicação da Coenzima Q-10 como promotora da função mitocondrial espermática

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento: Reprodução Animal

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga

2018

VERSÃO CORRIGIDA

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3724
FMVZ

Lançoni, Renata
Papel da ubiquitina em garanhões com alta e baixa congelabilidade e aplicação da Coenzima Q-10 como promotora da função mitocondrial espermática / Renata Lançoni. – 2018.
65 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Citoesqueleto. 2. Criopreservação. 3. Equinos. 4. Qualidade espermática. 5. Ubiquinol. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel da ubiquitina em garanhões com alta e baixa congelabilidade e aplicação da coenzima Q-10 como promotora da função mitocondrial espermática ", protocolada sob o CEUA nº 9044141216 (ID 003340), sob a responsabilidade de **Rubens Paes de Arruda** *e equipe; Renata Lançoni* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2017.

We certify that the proposal "Ubiquitin role in stallions with high and low freezability and application of coenzyme Q-10 as a promoter of sperm mitochondrial function", utilizing 8 Equines (8 males), protocol number CEUA 9044141216 (ID 003340), under the responsibility of **Rubens Paes de Arruda** *and team; Renata Lançoni* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 01/2017 a 12/2018 Área: Reprodução Animal

Origem:	Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga						
Espécie:	Equideos	sexo:	Machos	Idade:	2 a 30 anos	N:	8
Linhagem:	Garanhões BH, Mangalarga, Árabes.			Peso:	350 a 700 kg		

Local do experimento: As análises do sêmen serão realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo no Campus USP Fernando Costa, Pirassununga, SP. Serão utilizados 8 garanhões, sendo 4 deles instalados em haras nos arredores de Pirassununga e 4 pertencentes a Prefeitura do Campus USP Fernando Costa, Pirassununga, SP.

São Paulo, 26 de outubro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LANÇONI, Renata.

Título: Papel da ubiquitina em garanhões com alta e baixa congelabilidade e aplicação da Coenzima Q-10 como promotora da função mitocondrial espermática

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, Santo Durvalino Lançoni, por ter se esforçado imensamente ao longo de sua vida para me proporcionar a chance do estudo, por sempre estar de ouvidos abertos para escutar meus medos, minhas dificuldades, me mostrando de um jeito leve, bem-humorado, sábio e acolhedor que tudo tem solução, mas que a solução não vem sozinha, ela depende das nossas atitudes e do nosso esforço. Me mostrou com seu exemplo que devemos ser fortes, trabalhadores e compromissados. Te admiro e te amo muito. Obrigada por tudo, obrigada por tanto.

A minha mãe, Laide Sertório que sempre se fez presente e especialmente neste ano (talvez o mais difícil de sua vida) não mediu esforços para me amparar e me dar apoio. Foi um ano decisivo para você, cheio de desafios e conquistas. Você merece mais que meus agradecimentos, merece meus parabéns pela força que demonstrou. Amo você.

Aos meus irmãos Fabio Augusto Lançoni e Ana Claudia Lançoni Figueiredo por todo apoio e amor dado a mim, a irmã caçula. Como sempre digo, vocês são as melhores pessoas que eu conheço, possuindo uma personalidade admirável e eu tenho um amor infinito por vocês. Obrigada por terem nos dado os melhores presentes da família, João Augusto e Sophia, que nos trazem alegrias diariamente. Vocês são meus pilares de sustentação, espero sempre retribuir tudo que fazem por mim. Obrigada por serem tão presentes. Um privilégio da vida ter vocês como irmãos.

Ao meu companheiro de vida, Samuel Oliveira Silva, que está ao meu lado no dia a dia, incluindo os momentos bons, felizes, de lazer, de descanso, ruins, pesados, estressantes e intensos. A pessoa que recebe toda a energia do meu dia quando chego em casa, seja de vitória e de dever cumprido, ou de medos e inseguranças, sempre me mantendo em equilíbrio. Obrigada por entender meu trabalho, minha rotina, por apoiar minhas decisões e por facilitar minha vida com a sua simples presença. Você me completa. Fui abençoada quando te conheci. Amo você.

À minha família inteira, incluindo tios, tias, primos, e a Vó divina. Obrigada por serem exatamente assim, cada um com sua particularidade me permitiram crescer em uma família unida, presente e cheia de amor. Obrigada especialmente ao Tidi e ao Tio Zé que me levaram para o sítio desde criança e talvez sejam os principais responsáveis por eu ter escolhido a medicina veterinária como profissão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda pela impecável orientação acadêmica durante esses 6 anos. É indiscutível que o Sr. não mede esforços para me passar todos os ensinamentos possíveis, se preocupa sinceramente com minha formação profissional e sempre me ajudou em absolutamente tudo que precisei. Aprendi muito com o Sr. e penso que não poderia ter escolhido orientador e caminho melhor do que esse. Além de toda gratidão que tenho por ter me ensinado cientificamente, também agradeço muito a amizade criada nesses anos, em uma relação cheia de boas conversas e risadas nos cafés. Agradeço por se importar tanto e por sempre pensar no meu futuro, isso não tem preço. Te admiro como pessoa e como profissional. Será meu eterno orientador e terá minha eterna gratidão.

A Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini por ter me acompanhado durante toda a pós-graduação, sempre me auxiliando e ajudando da melhor maneira possível. Obrigada pela dedicação do seu tempo a todos nós da equipe do LBSA. A Sra. possui uma personalidade admirável e espero que conserve isso sempre.

À Central internacional de Reprodução Equina Rancho das Américas que abriu as portas para que a maioria das amostras de sêmen deste experimento fossem adquiridas. Nos proporcionando trabalhar nas melhores condições possíveis, alterando uma rotina intensa em prol do nosso experimento. Muito obrigada ao Dr. Valdemar, a Melissa e a toda a equipe envolvida.

Às meninas que me ajudaram tanto na fase experimental, Carla Patrícia Teodoro de Carvalho, Gabriela Bertaiolli Zoca, Laura Nataly García Oliveros e Ângela Gonella Diaza, obrigada pela paciência, pelo esforço e pela indispensável ajuda que me deram.

Ao Prof. Dr. Paulo H. Mazza Rodrigues e ao Leonardo Batissaco pelo auxílio na estatística.

Aos meus professores da graduação e grandes amigos Cabral e Adauto, por sempre estarem presentes e torcerem por mim. Vocês sempre acreditaram no meu potencial mais do que eu e me depositaram muita confiança, isso me fez crescer. Levo vocês sempre no coração.

Aos queridos amigos que fiz durante a pós-graduação, Bruna, Danilo, Maíra, Milena, Fernanda, Guta, Kleber, Bati, Vini obrigada pelos momentos incríveis que passei com vocês, vocês tornaram essa fase cheia de histórias divertidas! Levarei daqui amizades e lembranças para a vida.

A todos os pós-graduandos que convivi durante esses anos no CBRA e a todos os estagiários que passaram pelo Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) neste período, deixando suas contribuições, amizades e bons momentos.

A todos os Professores do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ USP pelos conhecimentos compartilhados tanto informalmente quanto nas disciplinas oferecidas. Cada ponto de vista diferente contribuiu para meu senso crítico e minha formação acadêmica em meio a pessoas tão experientes e inteligentes. Muito obrigada!

Aos membros da banca Profa. Eneiva Carla C. Celeghini, Profa. Bruna M. M. Oliveita, Profa. Letícia Z. Oliveira e Prof. Gabriel A. Monteiro por terem aceitado o convite e nos disponibilizado tempo e atenção, tornando possível a melhora de nossos trabalhos com suas sugestões. São profissionais que admiro muito.

Ao setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus USP de Pirassununga por nos permitir utilizar os garanhões e as instalações.

Aos funcionários do CBRA e do setor de equideocultura que tanto nos ajudaram no manejo dos garanhões.

Ao Clayton por toda ajuda durante esses anos de pós-graduação, por sempre nos atender prontamente com muita paciência e dedicação.

À Harumi pelo auxílio em todas as documentações, sempre tão ágil e eficiente.

À FMVZ USP pela oportunidade de realizar a pós-graduação em condições privilegiadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do auxílio a pesquisa 2016/14.626-7.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

LANÇONI, R. **Papel da ubiquitina em garanhões com alta e baixa congelabilidade e aplicação da Coenzima Q-10 como promotora da função mitocondrial espermática.** 65 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Estudos demonstram que existe grande variabilidade na qualidade de sêmen entre garanhões, isso influencia na capacidade de resistir a criopreservação. A coenzima Q-10 (CoQ-10), é um cofator na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, essencial para a produção de energia em forma de ATP e pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade do sêmen criopreservado equino. Por outro lado, a ubiquitina é uma molécula que está envolvida em uma via de degradação de proteínas danificadas, ou com erros de síntese. Este processo ocorre na passagem do espermatozoide pelo epidídimo e está relacionado com a infertilidade no macho. Sendo assim, este trabalho possuiu como objetivos tentar melhorar a qualidade do sêmen criopreservado equino através da adição da CoQ-10 ao protocolo de criopreservação, além de avaliar a marcação da proteína ubiquitina e sua relação com os garanhões de alta e baixa qualidade espermática. Levando em consideração esses objetivos, delineou-se dois experimentos. Em ambos foram utilizados 4 garanhões com alta e 4 com baixa qualidade espermática. Cada animal foi submetido a 5 colheitas de sêmen seguidas de congelações. **Experimento 1**: o sêmen foi criopreservado com a adição de duas concentrações da CoQ-10: 50 µM e 1 mM, a amostra controle foi criopreservada com diluidor Botucrio®. As partidas de sêmen foram analisadas quanto às características de motilidade espermática (CASA), integridades de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial (através das sondas fluorescentes iodeto de propídeo, *Hoechst* 33342, JC-1 e FITC-PSA), alterações no citoesqueleto (*phalloidin-FITC*) e função mitocondrial (DAB). **Experimento 2**: foram comparadas a quantidade de ubiquitina presente nos espermatozoides de garanhões de alta e baixa qualidade seminal pela técnica de imunofluorescência, além disso foram feitas análises de morfologia espermática (DIC) e correlacionadas com a localização e intensidade de ubiquitina presente nos espermatozoides. Foi possível notar com o experimento 1 que a CoQ-10 na concentração de 1 mM preservou de maneira mais efetiva as características do sêmen pós-descongelação quando comparada ao controle. Já no experimento 2, foi constatado que garanhões com baixa qualidade espermática possuem maior quantidade de espermatozoides marcados com ubiquitina em seu ejaculado e a localização da ubiquitina em cabeça, peça

intermediária e cauda dos espermatozoides está diretamente correlacionada com respectivos defeitos morfológicos encontrados.

Palavras chave: Citoesqueleto. Criopreservação. Equinos. Qualidade espermática. Ubiquinol.

ABSTRACT

LANÇONI, R. **Role of ubiquitin in stallions with high and low freezability and application of coenzyme Q-10 as a promoter of sperm mitochondrial function.** 65 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Studies have shown that there is great variability in the quality of semen among stallions, and that influences the ability to resist cryopreservation. Coenzyme Q-10 (CoQ-10) is a cofactor in the electron transport chain in the mitochondria, essential for energy production in the ATP form and may be an alternative to improve the quality of equine cryopreserved semen. Ubiquitin is a molecule that is involved in a pathway of degradation of damaged proteins, or with errors of synthesis. This process occurs in the sperm passage through the epididymis and is related to male infertility. Therefore, the objective of this thesis was to try to improve the quality of equine cryopreserved semen through the addition of (CoQ-10) to the cryopreservation protocol and also to study the protein ubiquitin and its relation to stallions of high and low seminal quality. Considering these objectives, two experiments were outlined. In both of them, 4 stallions with high seminal quality and 4 with low seminal quality were used. Each animal was submitted to 5 semen collections followed by freezing. **Experiment 1**: the semen was cryopreserved with the addition of two concentrations of CoQ-10: 50 μM and 1 mM, the control sample was cryopreserved with Botucrio®. Semen samples were analyzed for sperm motile characteristics (CASA); plasma membrane integrity, acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential (through fluorescence probe propidium iodide, Hoechst 33342, JC-1 and FITC-PSA); cytoskeleton (phalloidin-FITC) and mitochondrial function (DAB). **Experiment 2**: the amounts of ubiquitin present in the spermatozoa of high and low semen quality stallions were compared by immunofluorescence technique. Also, sperm morphology (DIC) analysis were done and were correlated with the location and intensity of ubiquitin present in spermatozoa. It was possible to note from experiment 1 that CoQ-10 at 1 mM concentration improved post-thaw semen quality when compared to the control. In the experiment 2, we found that stallions with low seminal quality have a higher amount of spermatozoa marked with ubiquitin in their ejaculate and the location of the ubiquitin in the head, middle part and tail of the spermatozoa is directly correlated with the respective morphological defects in such locations.

Keywords: Cytoskeleton. Cryopreservation. Equine. Sperm quality. Ubiquinol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espermatozoides criopreservados de garanhões marcados por imunifluorescência com o anticorpo KM691 para detecção de ubiquitina (marcação verde: ubiquitina, marcação azul: corante nuclear DAPI). **A** - Classificação 1: célula I; Classificação 2: + peça intermediária, + cauda. **B** - Classificação 1: célula II; Classificação 2: +++ peça intermediária, + cauda. **C** - Classificação 1: célula IV; Classificação 2: +++ cabeça, +++ peça intermediária e +++ cauda. **D** - Controle negativo..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias (± E.P.M.) da porcentagem de células que apresentaram integridade de membrana plasmática (IPM); integridade acrossomal (IA); alto potencial de membrana mitocondrial (HMMP) e células que apresentavam integridade de membrana plasmática, acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIHM) em ejaculados criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos..... 41

Tabela 2 - Médias (± E.P.M.) das características de motilidade (CASA) em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos a diferentes tratamentos..... 41

Tabela 3 - Coeficientes de correlação de Pearson entre os defeitos morfológicos, a quantidade de marcação e localização da ubiquitina presente em espermatozoides criopreservados de garanhões..... 58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Médias (± E.P.M.) da funcionalidade mitocondrial de espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos..... 39

Gráfico 2 - Médias (± E.P.M.) de espermatozoides sem a despolimerização dos filamentos de actina em ejaculados criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos..... 40

Gráfico 3 - Médias (± E. P.M.) das porcentagens de espermatozoides de garanhões *bad* e *good freezers* marcados com ubiquitina por imunofluorescência de acordo com a classificação 1 (I, II, III, IV)..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina di-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
BF	*Bad Freezers*
BSA	Soro Albumina Bovina
CASA	Sistema de análise computadorizada da motilidade espermática
CCO	Citocromo C-oxidade
CONT	Controle
CoQ-10	Coenzima Q-10
DAB	Diaminobenzidina
E.P.M	Erro padrão da média
GF	*Good Freezers*
IA	Inseminação Artificial
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
mg	Miligramas
mM	Milimolar
µM	Micromolar
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
RAP	Células Rápidas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SUP	Sistema Ubiquitina-proteassoma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL..... 18

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 20

2.1 COMO A COENZIMA Q-10 PODE MELHORAR A FUNCIONALIDADE DO ESPERMATOZOIDE EQUINO?..... 20

2.2 QUAL A RELAÇÃO ENTRE A UBIQUITINA E A INFERTILIDADE NO MACHO?..... 22

2.3 HIPÓTESES..... 25

2.4 OBJETIVOS..... 26

REFERÊNCIAS..... 26

3 COENZIMA Q-10 AUXILIA A PRESERVAÇÃO DA FUNCIONALIDADE MITOCONDRIAL E DO CITOESQUELETO DE ACTINA DOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE EQUINOS..... 31

3.1 INTRODUÇÃO..... 31

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... 33

3.2.1 Seleção dos animais e colheita de sêmen..... 33

3.2.2 Procedimentos laboratoriais pré-congelação do sêmen..... 34

3.2.3 Tratamentos aplicados aos diluidores de criopreservação..... 34

3.2.4 Criopreservação do sêmen..... 34

3.2.5 Análises do sêmen pós-descongelação..... 35

3.2.5.1 Motilidade espermática..... 35

3.2.5.2 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial..... 36

3.2.5.3 Análise da funcionalidade mitocondrial..... 36

3.2.5.4 Análise das alterações no citoesqueleto de actina..... 37

3.2.6 Análise estatística..... 37

3.3 RESULTADOS..... 38

3.3.1 Funcionalidade mitocondrial (DAB – diaminobenzidina)..... 38

3.3.2 Despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto..... 39

3.3.3 Avaliações das membranas e mitocôndrias espermáticas por meio de sondas fluorescentes..... 40

3.3.4 Características da motilidade espermática..... 41

3.4 DISCUSSÃO..... 41

REFERÊNCIAS..... 43

4 PAPEL DA UBIQUITINA EM GARANHÕES COM ALTA E BAIXA QUALIDADE SEMINAL E CORRELAÇÕES COM OS DEFEITOS MORFOLÓGICOS ESPERMÁTICOS..... 49

4.1 INTRODUÇÃO..... 49

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... 51

4.2.1 Seleção dos garanhões..... 51

4.2.2 Colheita e manipulação do sêmen..... 51

4.2.3 Procedimentos laboratoriais pré-congelação do sêmen..... 51

4.2.4 Criopreservação do sêmen..... 52

4.2.5 Análises do sêmen..... 52

4.2.5.1 Análises da morfologia espermática..... 53

4.2.5.2 Marcação e quantificação da ubiquitina espermática..... 53

4.2.6 Análise estatística..... 56

4.3 RESULTADOS..... 56

4.4 DISCUSSÃO..... 58

REFERÊNCIAS..... 61

5 CONCLUSÕES GERAIS..... 65

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

A criopreservação é uma ferramenta importante para preservar os espermatozoides de qualquer espécie por um período de tempo indeterminado. A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado tem se tornado cada vez mais frequente na criação de animais domésticos, incluindo os equinos (AL-ESSAWE et al., 2018). O uso do sêmen congelado possui grandes vantagens como possibilitar a venda do sêmen para qualquer lugar do mundo, permitir o armazenamento dos espermatozoides até o momento ideal para a inseminação da égua em estro, preservar os gametas masculinos durante anos para uso em futuras gerações e aumentar a relação entre égua e garanhão (BRADFORD; BUHR, 2002). Especificamente para criação de equinos, a possibilidade de utilização do sêmen congelado proporciona maior flexibilidade e facilita o fornecimento durante períodos de maior demanda de sêmen refrigerado e fresco (estação de monta) ou quando o garanhão está em período de competição (AL-ESSAWE et al., 2018). No entanto, embora seja possível notar nítida evolução com relação à técnica, principalmente com o desenvolvimento de novos diluidores, as taxas de concepção ainda são menores quando comparadas com monta natural, sêmen fresco ou refrigerado (BRADFORD; BUHR, 2002). Isso significa que a técnica ainda demanda outros estudos para que seja possível o entendimento dos processos que ocorrem, para que se possa fazer uso de técnicas que causem menos lesões às células de forma que a qualidade do sêmen pré-congelação seja menos comprometida por esse processo permitindo assim o aumento das taxas de concepção com sêmen criopreservado.

Existem variáveis que influenciam nos resultados das taxas de fertilidade com sêmen criopreservado, como dose inseminante, momento da inseminação e local da deposição no útero. Outra limitação do sêmen congelado equino é devido a alta variabilidade entre garanhões e entre ejaculados de um mesmo garanhão com relação a capacidade espermática de sobreviver à criopreservação (AMANN; PICKETT, 1987; VIDAMENT et al., 1997). Devido a individualidade dos garanhões, pode-se classifica-los em duas categorias, os que possuem espermatozoides que resistem bem ao processo de criopreservação, ou seja, apresentam boa congelabilidade e os que possuem espermatozoides que não suportam os processos pelo qual as células precisam ser submetidas durante a congelação, ou seja, apresentam baixa congelabilidade.

As mitocôndrias são muito conhecidas por produzir energia em forma de ATP. Os espermatozoides do garanhão dependem da energia produzida pela fosforilação oxidativa (que ocorre nas mitocôndrias) para manter a motilidade, diferente do que ocorre em outras espécies,

como suínos, em que os espermatozoides dependem mais da via glicolítica do que da fosforilação oxidativa para manutenção da motilidade (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2010; MARIN et al., 2003). De acordo com estudos, as mitocôndrias parecem ser as estruturas celulares mais susceptíveis a danos durante a criopreservação e refrigeração (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). Isto ocorre devido às alterações na osmolaridade que acabam prejudicando mais as mitocôndrias do que a membrana plasmática, destacando a importância de desenvolver estratégias para proteger esta organela durante a criopreservação (GALLON et al., 2006).

Uma das estruturas celulares que é muito influenciada durante a criopreservação e merece um estudo mais profundo neste processo é o citoesqueleto. Em espermatozoides de mamíferos ele é, em parte formado de proteínas actina, tubulina e proteínas associadas que, para alguns deles, são isoformas expressas especificamente durante toda a espermatogênese ou apenas limitada em alguns estágios (FOUQUET; KANN, 1994), sendo actina e α-tubulina as principais proteínas do citoesqueleto, as quais são responsáveis pela regulação do volume celular (NARESH, 2016). Alguns danos causados a célula durante o processo de criopreservação têm sido atribuídos ao citoesqueleto de actina, principalmente as alterações na membrana plasmática, devido a sua estreita associação com o citoesqueleto, que é extremamente importante para a manutenção da forma normal da célula e do movimento celular coordenado. Durante a criopreservação de espermatozoides bovinos, observou-se uma significante queda da expressão de actina, alterações na sua localização dentro da célula, além de mudanças no volume celular (FELIPE-PEREZ et. al. 2012)

A CoQ-10 está envolvida na cadeia respiratória mitocondrial que consiste em uma série de carregadores que agem sequencialmente, sendo a maioria deles proteínas integrais em grupos prostéticos capazes de aceitar e doar um ou dois elétrons. Além do NAD e das flavoproteínas, outros três tipos de moléculas carregadoras de elétrons funcionam na cadeia respiratória: a CoQ-10, que é uma quinona hidrofóbica (também conhecida como ubiquinona ou Coenzima Q) e dois tipos diferentes de proteínas que contém ferro (citocromos e proteínas ferro-enxofre). A CoQ é uma benzoquinona solúvel em lipídeos (NELSON; COX, 2014).

A ubiquitina é uma proteína envolvida em uma via de degradação de proteínas das células. Tal via proteolítica é não lisossomal e dependente de ATP. As proteínas que serão destruídas são marcadas por meio da ligação de cadeias de poli-ubiquitina e se tornam poli-ubiquitinadas. Estas são reconhecidas e degradadas por um grande complexo conhecido como proteossomo 26S. Tais proteínas marcadas podem ser as que regulam determinadas funções e

que por isso existem por curtos períodos de tempo, proteínas danificadas, ou proteínas com erros de síntese. A ubiquitina é uma proteína altamente conservada (composta por 76 resíduos de aminoácidos), por isso é essencialmente idêntica em organismos muito diferentes, como em leveduras e humanos. Ela se liga covalentemente a proteínas destinadas à destruição (NELSON; COX, 2014).

Sendo assim, este trabalho de pesquisa teve dois experimentos delineados com os seguintes objetivos: adicionar a CoQ-10 ao protocolo de criopreservação do sêmen equino para tentar manter a integridade e funcionalidade dos espermatozoides pós-descongelação, além de estudar o papel da ubiquitina nos garanhões com alta e baixa qualidade espermática e suas correlações com os defeitos morfológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMO A COENZIMA Q-10 PODE MELHORAR A PRESERVAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO ESPERMATOZOIDE EQUINO?

A coenzima Q (CoQ) refere-se a uma série homóloga de compostos de ocorrência natural que contém uma estrutura de anel benzoquinona com uma cadeia lateral isoprenóide de comprimentos variados. Nos seres humanos e em várias outras espécies de mamíferos, a cadeia lateral é composta por 10 unidades de isopreno, sendo assim chamada de coenzima Q-10 (CoQ-10), cuja nomenclatura química é 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona (SINATRA et al., 2013). Como a CoQ é pequena e hidrofóbica, ela é livremente difusível dentro da bicamada lipídica da membrana mitocondrial interna e capaz de movimentar equivalentes redutores entre outros carregadores de elétrons e prótons, ela desempenha um papel central em acoplar o fluxo de elétrons ao movimento de prótons (NELSON; COX, 2014).

Portanto, a CoQ-10 desempenha um papel crucial na bioenergética celular atuando como um cofator na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (cadeia respiratória), sendo assim essencial para a produção de energia em forma de ATP (ERNSTER; DALLNER, 1995). Além de atuar como transportadora de elétrons e prótons na mitocôndria, sua forma reduzida (chamada de ubiquinol) exerce um papel de potente antioxidante lipofílico e é capaz de “reciclar” e “regenerar” outros antioxidantes como tocoferol e ascorbato (SINATRA et al.,

2013). A CoQ-10 foi utilizada pela primeira vez como medicamento para pacientes com insuficiência cardíaca, mas seu uso tem crescido e atualmente ela é usada também como suplemento alimentar que visa melhorar a bioenergética celular, neutralizando o estresse oxidativo e prevenindo algumas doenças relacionadas com a idade (BALERCIA et al., 2009). Tais características relacionadas à CoQ-10 levaram-na a ser estudada no tratamento de infertilidade, por meio de aplicação exógena.

Levando-se em consideração que as mitocôndrias são as principais responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos espermatozoides, um antioxidante que atue a nível mitocondrial e que também possa atuar como regulador das funções bioenergéticas mitocondriais pode ser a melhor opção para controlar a elevada produção de ROS e prevenir os danos causados por eles, como fragmentação da cromatina, por exemplo (GIBB; AITKEN, 2016). Sendo assim, segundo Gibb e Aitken (2016), uma substância como a CoQ-10, que possui propriedades antioxidantes e ainda participa da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, regulando a bioenergética celular, pode ser uma das melhores opções para preservação do sêmen.

Foram constatadas por Alleva et al. (1997) interessantes correlações entre a presença da CoQ-10 no plasma seminal de homens e características espermáticas. Neste trabalho observaram correlação positiva significativa entre a contagem espermática total e a quantidade de CoQ-10 presente no plasma seminal, também observaram correlação positiva significativa entre a motilidade e a quantidade de CoQ-10, além disso, correlação negativa entre a quantidade de hidroperóxidos no plasma e a quantidade de CoQ-10. Ainda em trabalhos realizados em humanos, a utilização da CoQ-10 mostrou melhoras nas características espermáticas de pacientes inférteis, ou seja, com baixa qualidade espermática, mas não apresentou diferenças em pacientes que já possuíam boa qualidade seminal (LEWIN; LAVON, 1997; NADJARZADEH et al., 2011).

Lewin e Lavon (1997) observaram aumento significativo da motilidade espermática em homens com astenospermia, utilizando uma concentração de 50µM de CoQ-10 no sêmen. Também foi notado que a suplementação oral com 60mg/dia de CoQ-10 aumentou as taxas de fertilização na ICSI, concluindo que sua aplicação pode melhorar as funções espermáticas de alguns pacientes. Isso provavelmente ocorre pelo fato de que as mitocôndrias, localizadas na peça intermediária dos espermatozoides, local onde ocorre intensa produção de energia por meio da síntese de ATP são dependentes da disponibilidade de CoQ-10, desta forma, sua

deficiência pode explicar a reduzida motilidade dos espermatozoides em alguns casos (LEWIN; LAVON, 1997).

Nogueira et al. (2015) aplicaram a CoQ-10 e o α-tocoferol (associados e separados) ao sêmen equino refrigerado. Os resultados mostraram que a adição da CoQ-10 no grupo tratado melhorou a motilidade quando comparada ao controle. Já a associação da CoQ-10 com o α-tocoferol demonstrou maior prevenção da peroxidação lipídica ao fim de 48 horas de refrigeração. Porém, em estudo realizado por Rossi, Famolo e Mantovani (2016) também com a utilização da CoQ-10 em associação ou não com a Vitamina E em sêmen criopreservado e refrigerado de garanhões, não foram encontradas diferenças significativas na motilidade espermática quando comparadas às amostras controle.

Recentemente a CoQ-10 também foi estudada em sêmen criopreservado de garanhões por Carneiro et al. (2018) utilizando concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 µmols/L. Tais concentrações foram testadas no diluidor de centrifugação (a base de leite desnatado) e no diluidor de congelação. Foi encontrado que a CoQ-10 na concentração de 75 µmols/L apresentou melhores resultados pós-descongelação, principalmente quando adicionada ao diluidor de centrifugação.

Por isso, devido às características de atuação da CoQ-10 nas mitocôndrias e pela importância da produção de ATP mitocondrial principalmente no sêmen de equinos, o experimento 1 deste trabalho de pesquisa foi delineado para estudar seu efeito no sêmen criopreservado de garanhões.

2.2 QUAL A RELAÇÃO ENTRE A UBIQUITINA E A INFERTILIDADE NO MACHO?

A ubiquitina foi descoberta em 1975 (GOLDSTEIN et al., 1975), isolada a partir do timo e nesta época foi-lhe atribuída a função de induzir a diferenciação dos linfócitos B, dois anos mais tarde foi identificada associada à histona 2A (GOLDKNOPF; BUSCH, 1977). A relação da ubiquitina com a proteólise intracelular só foi descrita posteriormente, em 1980, por Avram Hershko e Aaron Ciechanover. Ela é uma proteína pequena composta por 76 resíduos aminoácidos em sequência altamente conservada que foi identificada em células de animais, plantas, leveduras e bactérias. Foi inicialmente purificada no timo de bezerros, no timo humano,

no testículo de trutas e posteriormente nos testículos de bovinos. Possui ampla distribuição nos organismos e foi identificada como o fator de proteólise dependente de ATP (LOIR et al., 1984). Esta proteólise é realizada por meio do sistema ubiquitina-proteossomo (SUP). Este sistema consiste na ligação do proteossomo 26S a proteínas marcadas. O proteossomo 26S é um complexo de protease específico da ubiquitina (SUTOVSKY et al., 2015), ou seja, ao ser detectada uma proteína mal formada na membrana celular, a ubiquitina se ligará a ela e ativará o proteossomo 26S para que ocorra a proteólise.

A conjugação covalente de moléculas de ubiquitina a uma proteína marca-a para degradação pelo proteossomo 26S (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). O sistema ubiquitina-proteossomo (SUP), que ocorre em todas as células eucarióticas é responsável por marcar e destruir proteínas danificadas, mal formadas, ou as que não serão mais utilizadas. No aparelho reprodutor do macho, ocorre durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo e é de extrema importância. Dentro deste processo, a ubiquitina ligada de forma covalente origina cadeias de poli-ubiquitina no substrato, tornando-o “ubiquitinado”, ou seja, estas cadeias de poli-ubiquitina se ligam às proteínas que devem ser destruídas, sinalizando-as para o proteossomo 26S que é a estrutura capaz de fazer a degradação proteolítica juntamente com suas subunidades (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002).

A ubiquitinação (ou conjugação com ubiquitina) consiste numa modificação pós-traducional reversível que se traduz na formação de uma ligação isopeptídica entre a ubiquitina e a proteína-substrato e envolve pelo menos a ação de três classes de enzimas: E1 (enzima ativadora da ubiquitina); E2 (enzimas conjugadoras de ubiquitina) e E3 (ligases de ubiquitina-proteína) (BASKA et al., 2008).

A quantidade de ubiquitina nos espermatozoides e sua correlação com a fertilidade ainda não é muito explorada em equinos, porém, em humanos foram encontrados altos níveis de ubiquitina em homens com infertilidade hereditária (RAWE et al., 2002) e também em casos de infertilidades severas idiopáticas (SUTOVSKY; TERADA; SCHATTEN, 2001).

Em humanos e outros mamíferos, a infertilidade no macho tem sido associada a altos níveis de proteínas na superfície do espermatozoide que reagem a anticorpos anti-ubiquitina (SUTOVSKY et al., 2001; SUTOVSKY; TERADA; SCHATTEN, 2001). Tais proteínas que reagem à ubiquitina são secretadas pelo epitélio epididimal (FRAILE et al., 1996) e se ligam, predominantemente, a espermatozoides que possuem defeitos morfológicos (SUTOVSKY et al., 2001). Em equinos, foi notado que existe associação entre a quantidade de ubiquitina e defeitos de cauda, espermatozoides com defeitos de cabeça e presença de vacúolos nucleares

(SUTOVSKY et al., 2003). Entretanto, é interessante ressaltar que alguns pacientes humanos com ubiquitina alta detectada não tiveram alta porcentagem de defeitos morfológicos identificáveis em análise por microscopia (SUTOVSKY; HAUSER; SUTOVSKY, 2004). Este fato sugere que a análise de ubiquitina pode complementar as avaliações seminais e identificar problemas de infertilidade que exames convencionais não são capazes de detectar.

A ubiquitinação dentro do epidídimo ainda está sendo decifrada, alguns relatos independentes mostram que a ubiquitina é sintetizada pelas células principais do epitélio epididimal para o lúmen, onde se misturam com a passagem dos espermatozoides (SUTOVSKY; HAUSER; SUTOVSKY, 2004). Apesar da necessidade de maiores estudos com relação a ubiquitina, sabe-se que pelo menos parte dos espermatozoides são removidos durante a passagem pelo epidídimo. Durante este caminho, espermatozoides com gotas citoplasmáticas, que contém ubiquitina, são removidos por mecanismo de fagocitose das células do epitélio epididimal (HERMO; DWORKIN; OKO, 1988).

Sutovsky et al. (2001) demonstraram que espermatozoides anormais encontrados em machos férteis de várias espécies de mamíferos, são marcados com ubiquitina durante sua passagem pelo epidídimo. Em garanhões, baixos níveis de ubiquitina em espermatozoides presentes no testículo foram encontrados, em contrapartida, altas quantidades estavam presentes na cabeça do epidídimo e em seu lúmen. Espermatozoides defeituosos isolados do epidídimo, principalmente com alterações de cauda e cabeça, células somáticas e células imaturas presentes no lúmen do epidídimo também apresentaram alta ubiquitinação (SUTOVSKY et al., 2003).

A presença da ubiquitina no espermatozoide pode ser detectada por um teste sensível e objetivo que consiste na marcação da ubiquitina na superfície das células por meio do anticorpo anti-ubiquitina (KM 691) que pode ser detectado por imunofluorescência e analisado por microscopia de epifluorescência ou por citometria de fluxo (SUTOVSKY; TERADA; SCHATTEN, 2001; SUTOVSKY et al., 2001).

Odhiambo et al. (2011) avaliaram a presença da ubiquitina em touros juntamente com a análise do acrossoma utilizando a sonda PNA por citometria de fluxo e obtiveram correlações positivas entre a quantidade defeitos morfológicos e a marcação de ubiquitina nas células, sugerindo que a análise de marcação de ubiquitina por citometria de fluxo poderia substituir futuramente as análises de morfologia espermática por microscopia.

O anticorpo KM 691 já foi validado e utilizado em espermatozoides equinos, como a ubiquitina é uma proteína muito conservada, não possui mudanças entre espécies diferentes. Em equinos ela foi marcada para tentar estudar seu efeito com relação a sazonalidade na espécie, no trabalho de Sutovsky (2003) foram utilizados quatro garanhões, dois sabidamente férteis de acordo com dados de fertilidade de estações de monta, um deles ainda fértil, porém senil, vinha apresentando diminuição no tamanho dos testículos e queda na qualidade seminal nos últimos anos e um garanhão com histórico de subfertilidade (SUTOVSKY et al., 2003). Este garanhão com histórico de subfertilidade apresentou níveis mais altos de ubiquitina, porém, isto foi constatado em apenas 1 garanhão subfértil. Por isso, levando-se em consideração toda a literatura envolvendo a função da ubiquitina na infertilidade do macho o segundo experimento deste trabalho foi delineado com o objetivo de estudar melhor a relação da ubiquitina com a qualidade seminal de garanhões.

2.3 HIPÓTESES

Experimento 1:

- A utilização de 1 mM e 50 µM de CoQ-10 no diluidor de criopreservação melhora a funcionalidade mitocondrial do sêmen pós-descongelação quando comparado ao tratamento controle.

- A adição de CoQ-10 ao diluidor de criopreservação possui maior atuação nas características espermáticas de garanhões que não apresentam bons resultados na congelação (*bad freezers*).

Experimento 2:

- Ejaculados de garanhões *bad freezers* possuem maior quantidade de espermatozoides marcados com ubiquitina em sua superfície de membrana do que espermatozoides de garanhões *good freezers*.

- Espermatozoides de garanhões *bad freezers* possuem maior intensidade de marcação de ubiquitina nas membranas da cabeça, peça intermediária e cauda.

- Alta quantidade de ubiquitina presente nos espermatozoides está diretamente correlacionada com a porcentagem de defeitos morfológicos encontrados.

2.4 OBJETIVOS

Experimento 1:

- Avaliar se a CoQ-10 adicionada ao diluidor de congelação é capaz de preservar a qualidade do sêmen criopreservado equino.

- Investigar a resposta de garanhões *bad* e *good freezers* ao tratamento com a CoQ-10.

Experimento 2:

- Identificar a quantidade de ubiquitina presente nos garanhões com diferentes qualidades espermáticas.

- Realizar análises de correlações entre a quantidade de ubiquitina presente nos espermatozoides dos garanhões e os defeitos morfológicos encontrados.

REFERÊNCIAS

AL-ESSAWE, Essraa. M. et al. Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. **Cryobiology**, v. 81, p. 145-152, 2018.

ALLEVA, Renata et al. The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. **Molecular aspects of medicine**, v. 18, p. 221-228, 1997.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of equine veterinary science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

BALERCIA, Giancarlo et al. Coenzyme Q10 and male infertility. **Journal of endocrinological investigation**, v. 32, n. 7, p. 626-632, 2009.

BASKA, Kathleen M. et al. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. **Journal of cellular physiology**, v. 215, n. 3, p. 684-696, 2008.

BRADFORD, Laurie L.; BUHR, Mary M. Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. **Journal of equine veterinary science**, v. 22, n. 12, p. 546-550, 2002.

CARNEIRO, Joao AM et al. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. **Animal reproduction science**, v. 192, p. 107-118, 2018.

CIECHANOVER, Aaron et al. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 16, p. 7525-7528, 1980.

ERNSTER, L.; DALLNER, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease**, v. 1271, n. 1, p. 195-204, 1995.

FELIPE-PÉREZ, Yazmin Elizabeth et al. Cytoskeletal proteins F-actin and β-dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm. **Cryobiology**, v. 64, n. 2, p. 103-109, 2012.

FOUQUET, Jean-Pierre; KANN, Marie-Louise. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. **Biology of the Cell**, v. 81, n. 2, p. 89-93, 1994.

FRAILE, B. et al. Light and electron microscopic immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in the human epididymis and vas deferens. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 2, p. 291-297, 1996.

GALLON, Frédérique et al. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 5, p. 1526-1530, 2006.

GIBB, Zamira; AITKEN, Robert J. Recent developments in stallion semen preservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 43, p. S29-S36, 2016.

GLICKMAN, Michael H.; CIECHANOVER, Aaron. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GOLDKNOPF, Ira L.; BUSCH, Harris. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 3, p. 864-868, 1977.

GOLDSTEIN, Gideon et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 1, p. 11-15, 1975.

HERMO, Louis; DWORKIN, Joel; OKO, Richard. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. **American journal of anatomy**, v. 183, n. 2, p. 107-124, 1988.

LEWIN, Aby; LAVON, Haim. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 18, p. 213-219, 1997.

MARIN, Silvia et al. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **FEBS letters**, v. 554, n. 3, p. 342-346, 2003.

NADJARZADEH, A. et al. Coenzyme Q10 improves seminal oxidative defense but does not affect on semen parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: a randomized double-blind, placebo controlled trial. **Journal of endocrinological investigation**, v. 34, n. 8, p. e224-e228, 2011.

NARESH, Sai. Effect of cooling (4 C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. **Cryobiology**, v. 72, n. 1, p. 7-13, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Metabolismo das proteínas. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Sarvier, 2006. cap. 27, p. 1024-1068.

NOGUEIRA, B. G. et al. Coenzyme Q10 and α-Tocopherol Prevent the Lipid Peroxidation of Cooled Equine Semen. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 6, p. 1003-1010, 2015.

ODHIAMBO, J. F. et al. Adaptation of ubiquitin-PNA based sperm quality assay for semen evaluation by a conventional flow cytometer and a dedicated platform for flow cytometric semen analysis. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1168-1176, 2011.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. et al. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 114, n. 4, p. 393-403, 2009.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. et al. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 458-465, 2010.

RAWE, V. Y. et al. Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath. **Human Reproduction**, v. 17, n. 8, p. 2119-2127, 2002.

ROSSI, Melissa; FALOMO, Maria Elena; MANTOVANI, Roberto. Role of coenzyme Q and vitamin E on stallion semen motility evaluated both in frozen and cooled-stored semen. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 595-603, 2016.

SINATRA, Stephen T. et al. Coenzyme Q10 in equine serum: response to supplementation. **Journal of equine veterinary science**, v. 33, n. 2, p. 71-73, 2013.

SUTOVSKY, Peter et al. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **Journal of cell science**, v. 114, n. 9, p. 1665-1675, 2001.

SUTOVSKY, Peter et al. Differential ubiquitination of stallion sperm proteins: possible implications for infertility and reproductive seasonality. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 2, p. 688-698, 2003.

SUTOVSKY, Peter; HAUSER, Russ; SUTOVSKY, Miriam. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 628-638, 2004.

SUTOVSKY, Peter; TERADA, Yukihiro; SCHATTEN, Gerald. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. **Human Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 250-258, 2001.

VIDAMENT, M. et al. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 907-917, 1997.

Coenzima Q-10 auxilia a preservação da funcionalidade mitocondrial e da actina dos espermatozoides criopreservados de equinos

3. COENZIMA Q-10 AUXILIA A PRESERVAÇÃO DA FUNCIONALIDADE MITOCONDRIAL E DA ACTINA DOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE EQUINOS

3.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos garanhões foram selecionados geneticamente com base em seu pedigree e desempenho atlético ao invés de serem selecionados quanto ao potencial de fertilidade. Como resultado, a qualidade do sêmen e fertilidade desses animais são bastante variáveis (ALLEN; WILSHER, 2012). Sendo assim, alguns ejaculados são considerados de baixa qualidade e não resistem bem ao processo de congelação, chamados comumente de *bad freezers* (BF) enquanto outros podem resistir melhor a esses processos, sendo considerados *good freezers* (GF). Esta variação considerável entre os garanhões causa dificuldade na utilização em larga escala do sêmen criopreservado equino (AL-ESSAWE et al., 2018). Por isso, há muitos estudos tentando melhorar a qualidade do sêmen de garanhões para que seja utilizado com maior eficiência nas biotécnicas reprodutivas como inseminação artificial e transferência de embriões (AFFONSO et al., 2017; LANÇONI et al. 2018; NASCIMENTO et al., 2008; TSUNODA et al., 2015).

Estudos recentes indicam que as mitocôndrias são estruturas “chaves” na função espermática e sofrem grandes alterações durante a criopreservação (PEÑA et al., 2015). Existem diferenças entre as espécies sobre a geração de energia intracelular. Os espermatozoides de humanos, ratos e touros também produzem ATP pela glicólise, ao contrário do que ocorre em garanhões em que novas evidências indicam que a fosforilação oxidativa mitocondrial é a principal fonte de ATP (ORTEGA-FERRUSOLA et al. 2010; GIBB et al.2014). Então, a funcionalidade mitocondrial é especialmente importante para espermatozoides equinos.

A Coenzima Q-10 (CoQ-10) é uma molécula lipídica presente em células de mamíferos capaz de promover a geração de energia através da troca de elétrons e prótons na cadeia de transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna (LEWIN; LAVON, 1997). Devido a sua atuação direta e importante na produção de energia intracelular, ela está envolvida com vários processos do organismo, como doenças cardíacas, neuro-degenerativas, entre outras (LITTARRU; TIANO, 2010). Além de sua função na bioenergética celular, a CoQ-10 é

considerada o único antioxidante lipossolúvel sintetizado endogenamente (TURNEM et al., 2004).

Ambos os aspectos da CoQ-10, tanto sua ação na bioenergética celular quanto seu papel como antioxidante podem indicar possível envolvimento com a infertilidade no macho. Por um lado, é sabido que um grande número de mitocôndrias está presente no espermatozoide devido à sua alta demanda energética para a motilidade (FAWCETT, 1975). Por outro lado, a proteção das membranas contra o estresse oxidativo pode preservar melhor a integridade espermática (BALERCIA et al., 2009).

O citoesqueleto celular fica susceptível a sofrer danos quando submetidos a biotécnicas que envolvam alterações no volume celular. Durante a criopreservação do sêmen ocorrem variações de osmolaridade e temperaturas que inevitavelmente atingem os espermatozoides, causando danos subletais as células. No processo de congelação, as células são expostas à cristalização de gelo extracelular que resulta no aumento da concentração dos solutos nos canais aquosos não congelados entre os cristais de gelo (WATSON, 2000). O espermatozoide responde a isso perdendo água de seu interior para o meio extracelular, diminuindo ligeiramente seu volume. Apesar de décadas de estudos tentando melhorar os protocolos de criopreservação para aumentar a sobrevivência espermática e manter sua função, os mecanismos biológicos fundamentais responsáveis pelos danos ainda não foram completamente solucionados (CORREA et al., 2007).

O citoesqueleto de actina é organizado em uma rede intracelular dinâmica e desempenha um papel crucial na regulação do formato celular, migração e interação celular com matrizes extracelulares (CORREA et al., 2007, LIU et al., 2005). A presença de actina na cauda do espermatozoide é importante para a regulação da motilidade espermática e sua presença na cabeça sugere um possível envolvimento na reação acrossomal. Foi relatado que a polimerização da actina é importante para o início da motilidade espermática durante a maturação pós-testicular (LIN et al., 2002). A “rede” de actina sofre reorganização em resposta ao estresse osmótico em todos os organismos e tem sido proposto que os defeitos de membrana plasmática são causados por uma perda de estrutura do citoesqueleto de actina (CORREA et al., 2007).

A regulação do volume dos espermatozoides é um processo vital para o sucesso da criopreservação (PETRUNKINA et al., 2005) e o citoesqueleto celular, principalmente a actnia e a α-tubulina (que são as proteínas presentes em maior quantidade no citoesqueleto) possuem um papel extremamente importante nesta regulação (PEDERSEN et al., 2001). Durante a formação dos polímeros de f-actina, processo também conhecido como polimerização, a actina

se liga a um ATP que por sua vez é hidrolisado em ADP. O alongamento do filamento de actina ocorre em suas duas extremidades (HOLMES et al., 1990). Estudos vem demonstrando que há uma alteração na localização dos filamentos de actina no processo de criopreservação (NARESH, 2016; GARCIA et al., 2012). A localização da actina entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa em várias espécies de mamíferos sugere que ela tenha um importante papel na capacitação e reação acrossomal (BREITBART et al., 2005, CABELLO-AGUEROS et al., 2003).

Os componentes do citoesqueleto do espermatozoide são responsáveis por modular o formato da célula e gerar movimento flagelar. A interação do ATP com as ATPases nos braços de dineína dos pares de microtúbulos promove seu deslizamento e faz com que o flagelo se movimente (EDDY et al., 2003). Com isso, é possível notar a alta importância da função citoesqueleto no espermatozoide e sua relação com função mitocondrial e produção de ATP. Durante o processo de criopreservação espermática é inevitável que esta estrutura não seja atingida.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da CoQ-10 adicionada ao diluidor na criopreservação de sêmen de garanhões *bad* e *good freezers* analisando a qualidade das células por meio de motilidade espermática e integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, mas focando na atuação da CoQ-10 na funcionalidade mitocondrial e citoesqueleto dos espermatozoides.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Seleção dos animais e colheita de sêmen

Foram utilizados 8 garanhões adultos de sela que foram separados em duas categorias: *bad* e *good freezers*. O grupo *bad freezers* apresentou média da motilidade progressiva (MP) de 16,3% e o grupo de garanhões *good freezers* apresentou média da MP de 55,1% em análises realizadas pós-descongelação de 5 ejaculados colhidos de cada animal. Antes do início do experimento, os animais estavam em colheitas de sêmen regulares três vezes por semana. Para o presente experimento, foram realizadas 5 colheitas de cada garanhão (n=40). Previamente a cada colheita de sêmen o pênis foi lavado criteriosamente e em seguida realizada a colheita com vagina artificial. Os procedimentos realizados neste experimento estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP n° do protocolo 9044141216.

3.2.2 Procedimentos laboratoriais pré-congelação do sêmen

Imediatamente após a colheita o sêmen foi filtrado para a separação da parte rica em espermatozoides da parte gelatinosa. Para a análise da motilidade espermática (de maneira subjetiva) foi retirada uma alíquota de sêmen e diluído 3:1 em diluidor a base de leite desnatado (Max Sêmen®, Rancho das Américas, Porto Feliz, SP, Brasil) e armazenado durante 5 minutos em banho-maria seco antes da avaliação. Em seguida, o sêmen era colocado em lâmina pré-aquecida e analisado quanto a motilidade subjetiva (%) e vigor espermático (1-5) em microscópio de contraste de fase em aumento de 100x. A concentração espermática foi realizada com o equipamento Nucleo Counter®, (ChemoMetec, Denmark) segundo recomendações do fabricante. O ejaculado total foi diluído na proporção 1:1 em diluidor a base de leite desnatado (Max Sêmen®, Rancho das Américas, Porto Feliz, SP, Brasil) e, subsequentemente, aliquotado em tubos de 15 mL e centrifugado a 500 x g durante 12 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a concentração ajustada para $200x10^6$ sperm/mL nos respectivos diluidores de congelação, controle ou tratados, detalhados a seguir.

3.2.3 Tratamentos aplicados aos diluidores de criopreservação

Neste estudo foi utilizada a CoQ-10 da Sigma-Aldrich® (C9538). Cada ejaculado foi dividido em três tratamentos. Como tratamento controle foi utilizado o diluidor comercial Botucrio® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), os outros tratamentos foram feitos com duas concentrações de CoQ-10, baseadas em bons resultados em outras espécies observados na revisão de literatura (Lewin e Lavon, 1997; Rossi et. al., 2016) e também baseados em testes feitos previamente ao início do experimento. As concentrações escolhidas foram 50 µM de CoQ-10 e 1 mM de CoQ-10 adicionadas ao mesmo diluidor do tratamento controle. Então, os diluidores preparados foram aliquotados e armazenados em freezer a -18°C para uso posterior (uma alíquota era descongelada no momento de cada colheita). Sendo assim, os tratamentos foram determinados como: Controle (CONT), 50 µM de CoQ-10 e 1 mM de CoQ-10.

3.2.4 Criopreservação do sêmen

Assim como foi descrito anteriormente, o sêmen foi centrifugado e ressuspendido em seu respectivo diluidor de criopreservação (controle ou tratado) na concentração de $200x10^6$

sperm/mL. Então, a amostra foi armazenada em palhetas de sêmen de 0.5 mL que já estavam identificadas e em seguida foram cuidadosamente fechadas com esferas de metal.

A criopreservação do sêmen foi realizada utilizando o equipamento TK 3000® (TK tecnologia em congelação LTDA, Uberaba, MG, Brasil). As palhetas foram refrigeradas até 5°C, utilizando a curva de refrigeração de -0,5°C/min. Ao atingir esta temperatura a amostra permanecia por mais 30 minutos em estabilização (tempo de equilíbrio). Em seguida, a curva de congelação foi procedida. Nesta, a temperatura diminuía 20°C/min de 5°C até -120°C (LANÇONI et al., 2017). Então, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido (-196°C). Após o término desse procedimento, as palhetas foram organizadas em *racks* e armazenadas em botijão criogênico.

3.2.5 Análises do sêmen pós-descongelação

Para as análises pós-descogelação, eram descongeladas duas palhetas por partida de cada tratamento (CONT, 50 µM de CoQ-10 e 1 mM de CoQ-10). A descongelação era realizada em banho-maria a 37°C durante 30 segundos.

3.2.5.1 Motilidade espermática

A motilidade espermática foi avaliada pelo sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analisys*) usando o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA). O *setup* foi ajustado previamente para análise de espermatozoides equinos. Para a avaliação, a amostra espermática foi diluída chegando a concentração de $40x10^6$ espermatozoides/mL nos mesmos diluidores que haviam sido congeladas (CONT, 50 µM de CoQ-10 e 1 mM de CoQ-10). Em seguida, 10 µL do sêmen diluído foi colocado na câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) e as seguintes características de motilidade foram analisadas: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %) e células rápidas (RAP, %).

3.2.5.2 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Esta técnica foi adaptada de Celeghini et al. (2007). Inicialmente, preparou-se 150 µL de sêmen diluído em meio TALP *sperm*, na concentração de $25x10^6$ espermatozoides/mL, em tubo de microcentrífuga e foram adicionados 3 µL de iodeto de propídeo (PI 0,5 mg/mL), 2 µL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL), 6 µL de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1, 153 µM) e 80 µL de aglutinina de Pisum sativum conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 µg/mL). Em seguida, a amostra foi incubada durante 8 min a 37°C no escuro. Então, uma alíquota de 4 µL da amostra foi analisada usando aumento de 1000x em microscópio de epifluorescência (Nikon, modelo Eclipse 80i). Foram contadas 200 células por amostra.

3.2.5.3 Análises da funcionalidade mitocondrial

Foi utilizado teste citoquímico desenvolvido por Hrudka (1987). O teste visa avaliar a atividade mitocondrial baseando-se na oxidação da 3-3'diaminobenzidina (DAB) pelo Citocromo C, o que inclui a citocromo C-oxidase (CCO), por meio de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, nas mitocôndrias. A enzima CCO tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células. Para a realização da técnica, foi utilizada uma alíquota de 25 µL de sêmen incubada com 25 µL de DAB (1 mg/ml em PBS) a 37°C durante uma hora. Após a incubação, foram feitos esfregaços fixados em formol a 10% durante 10 minutos. As lâminas foram secas no ar sob proteção da luz e depois contadas 200 células de cada amostra e classificadas como descrito por Hrudka (1987) em 4 classes:

DAB 1: espermatozoides com peça intermediária totalmente corada, com praticamente todas as mitocôndrias ativas, indicando alta atividade mitocondrial.

DAB 2: espermatozoides com mais da metade das mitocôndrias coradas, indicando atividade mitocondrial média a alta.

DAB 3: espermatozoides com menos da metade das mitocôndrias coradas, indicando baixa atividade mitocondrial.

DAB 4: espermatozoides com peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondrial.

3.2.5.4 Análises das alterações no citoesqueleto de actina

Para visualização dos filamentos de actina foi utilizado protocolo adaptado de Brener et al. (2003) e García et al. (2012). As modificações nos protocolos foram previamente validadas por nosso grupo de pesquisa. Sendo assim, eram adicionados 25 µL de sêmen em 150 µL de solução salina tamponada com Tris (TBS 10x, com pH ajustado para 7,4). Em seguida, foram feitos esfregaços do sêmen diluído em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina. A fixação foi feita com formaldeído 5% durante 10 minutos. Então, as lâminas eram lavadas em PBS, permeabilizadas em acetona refrigerada durante 10 minutos e secas ao ar durante 10 minutos. Após a secagem as amostras foram reidratadas em TBS contendo 1% de BSA por um período de 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 5 µL de faloidina conjugada com FITC (2 mM em DMSO) sob lamínula (tamanho 24 x 60 mm) e incubadas ao abrigo da luz, em temperatura ambiente (22°C) durante 60 minutos. Ao final do tempo de incubação as lâminas foram avaliadas em microscopia de epifluorescência em aumento de 1000x. Foram contadas 200 células no total e classificadas em alto ou baixo brilho na região pós-acrossomal, baseando-se nos padrões de intensidade de brilho como descrito por Brener et al., (2003) e García et al., (2012).

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ($P < 0.05$) os dados foram transformados e reavaliados. Comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo procedimento MIXED do SAS (versão 9.4; SAS institute, Inc., Cary, NC, USA), tendo o tratamento como efeito fixo e como efeitos aleatórios os garanhões, a qualidade de suas congelações (*bad* ou *good freezers*) e o ejaculado dentro de cada garanhão. As diferenças entre tratamentos foram obtidas por meio do teste de Tukey. A probabilidade de $P \leq 0.05$ foi considerada como diferença significativa e a probabilidade entre $P > 0.05$ e ≤ 0.10 indica que a diferença aproximou-se de ser significativa (tendência). Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.).

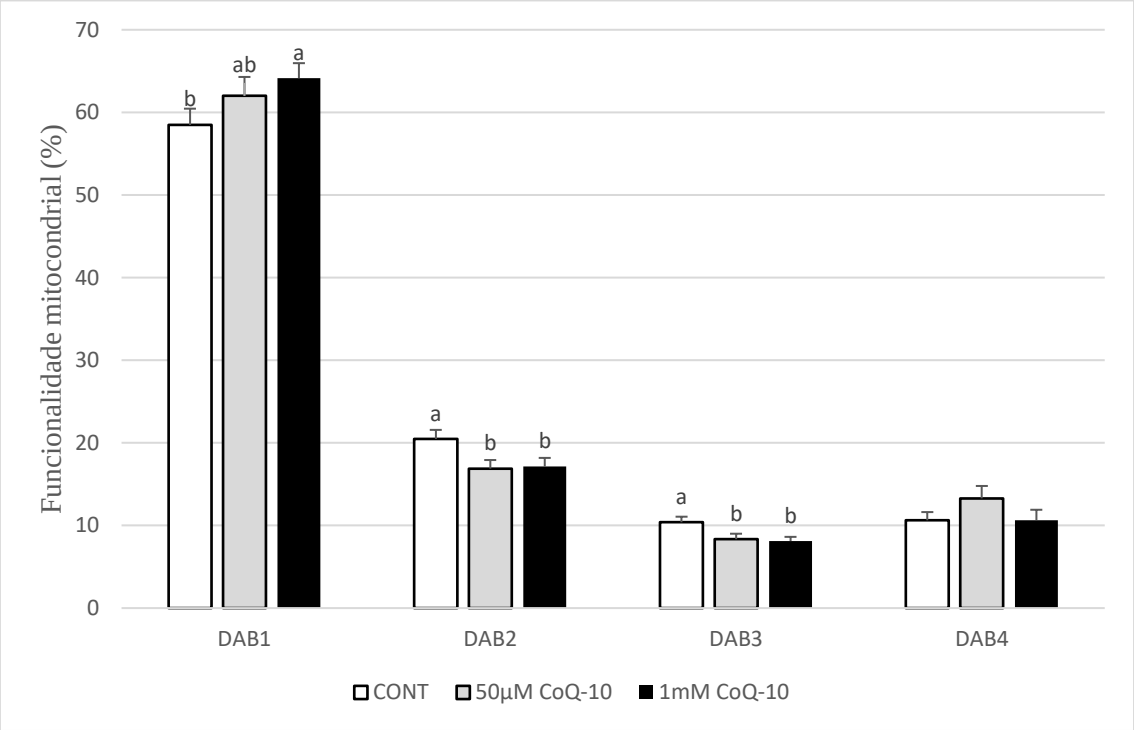
3.3 RESULTADOS

As variáveis analisadas não apresentaram interação entre os fatores, ou seja, não houve interação entre qualidade seminal (garanhões *bad* e *good freezers*) e tratamentos. Por isso, os dados dos garanhões *bad* e *good* estão apresentados juntos, separados apenas por tratamentos.

3.3.1 Funcionalidade mitocondrial (DAB - diaminobenzidina)

Na análise da funcionalidade mitocondrial pela técnica DAB, foi observado que o tratamento CoQ-10 1 mM apresentou maior porcentagem de células na classificação DAB 1, ou seja, espermatozoides que possuíam a peça intermediária totalmente corada, com praticamente todas as mitocôndrias ativas, indicando alta atividade mitocondrial (gráfico 1).

Gráfico 1 – Médias (± E.P.M.) da funcionalidade mitocondrial de espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos.

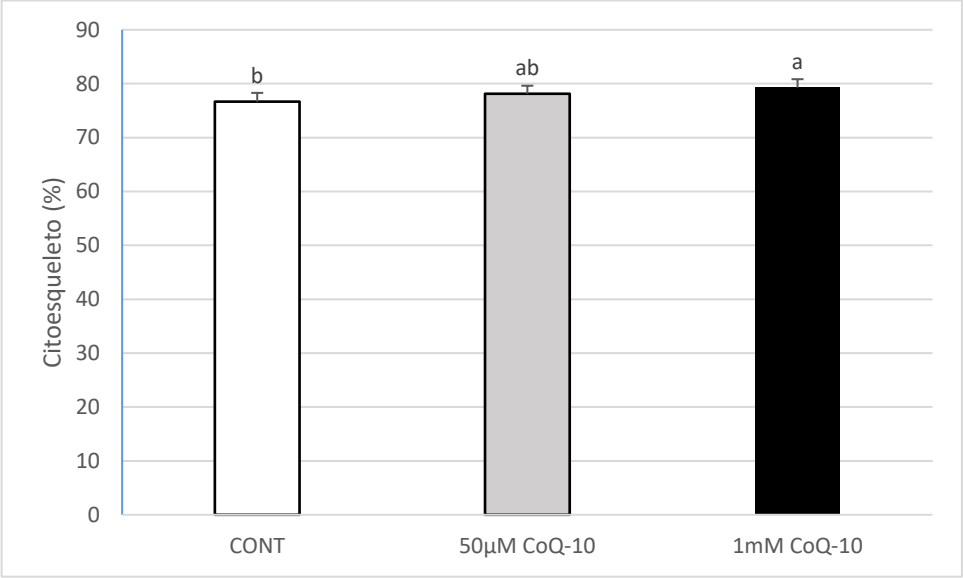


[a, b] Barras com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey. Legenda: DAB 1: espermatozoides com peça intermediária totalmente corada, com praticamente todas as mitocôndrias ativas, indicando alta atividade mitocondrial. DAB 2: espermatozoides com mais da metade das mitocôndrias coradas, indicando atividade mitocondrial média a alta. DAB 3: espermatozoides com menos da metade das mitocôndrias coradas, indicando baixa atividade mitocondrial. DAB 4: espermatozoides com peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondrial.

3.3.2 Despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto

A análise do citoesqueleto espermático com a sonda fluorescente faloidina conjugada com FITC demonstrou que o tratamento 1 mM de CoQ-10 preservou de maneira mais eficiente o citoesqueleto celular durante o processo de criopreservação, apresentando maior porcentagem de células sem despolimerização dos filamentos de actina na avaliação pós-descongelação.

Gráfico 2 – Médias (± E.P.M.) de espermatozoides sem a despolimerização dos filamentos de actina em ejaculados criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos.



[a, b] Barras com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey.

3.3.3 Avaliações de membranas e mitocôndrias espermáticas por meio de sondas fluorescentes

Os dados de integridade de membrana plasmática (IPM), potencial de membrana mitocondrial (HMMP) e integridade acrossomal (IA), foram avaliados pelas sondas fluorescentes e estão descritos na Tabela 1. Foi possível observar que houve aumento (tendência estatística, $P > 0.05$ e ≤ 0.10) da porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIHM) que se deu devido ao aumento da porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial (HMMP), sendo que as amostras tratadas com CoQ-10 preservaram melhor esses parâmetros das células quando comparadas ao controle.

Tabela 1 – Médias (± E.P.M.) da porcentagem de células que apresentaram integridade de membrana plasmática (IPM); integridade acrossomal (IA); alto potencial de membrana mitocondrial (HMMP) e células que apresentavam integridade de membrana plasmática, acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIHM) em ejaculados criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos.

Sperm Characteristics (%)	**Treatments**			**Mean**
	Control	**50 µM CoQ-10**	**1 mM CoQ-10**	
IPM	27.78 ± 2.00	29.02 ± 1.91	29.35 ± 1.88	28.72 ± 1.10
IA	75.15 ± 1.20	71.78 ± 1.72	74.15 ± 1.84	73.68 ± 0.93
HMMP	26.57 ± 1.93[b]	28.48 ± 1.84[a]	28.80 ± 1.84[a]	27.95 ± 1.07
PIAIHM	26.27 ± 1.90[b]	28.20 ± 1.82[a]	28.50 ± 1.85[a]	27.65 ± 1.06

[a,b] Linhas com letras minúsculas diferentes indicam tendência estatística ($P > 0.05$ e ≤ 0.10) pelo teste de Tukey.

3.3.4 Características da motilidade espermática

Não foram observadas diferenças estatísticas nas características de motilidade espermática entre os tratamentos aplicados ao sêmen.

Tabela 2 – Médias (± E.P.M.) das características de motilidade (CASA) em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos a diferentes tratamentos.

Sperm Characteristics	**Treatments**			**Mean**
	Control	**50 µM CoQ-10**	**1 mM CoQ-10**	
Total motility (%)	52.35 ± 4.22	55.10 ± 4.35	53.65 ± 4.32	53.70 ± 2.46
Progressive motility (%)	35.52 ± 3.51	36.05 ± 3.56	35.57 ± 3.61	35.71 ± 2.04
Rapid cells (%)	44.95 ± 4.20	47.00 ± 4.37	46.02 ± 4.42	45.99 ± 2.48

3.4 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para avaliar o efeito da CoQ-10 na bioenergética celular e também investigar seus possíveis efeitos no citoesqueleto, integridades de membranas e motilidade espermática. Para atingir este objetivo, foram utilizadas duas concentrações que foram pré-determinadas com base em revisão de literatura (LEWIN; LAVON, 1997; ROSSI et. al., 2016) e testes prévios realizados pela equipe de pesquisa.

A CoQ-10 possui algumas funções essenciais no corpo humano, o principal papel dela é o transporte de elétrons e prótons no processo de produção de energia, levando à síntese de

ATP na membrana mitocondrial. Portanto, é óbvio que todo processo de produção de energia celular depende da disponibilidade de CoQ-10. Nos espermatozoides, a maioria da CoQ-10 está concentrada nas mitocôndrias da peça intermediária, ficando disponível para ser utilizada em processos dependentes de ATP como a motilidade espermática entre outros (LEWIN; LAVON, 1997). Além disso, o ubiquinol, forma reduzida da CoQ-10, age como um potente antioxidante em diversos sistemas biológicos, como membranas e lipoproteínas, protegendo-as da oxidação e evitando a formação de hidroperóxidos, prevenindo assim a peroxidação lipídica (ALLEVA et al. 1997; BENTINGER et al. 2007). Tais propriedades da CoQ-10 resultaram em boas características espermáticas no presente estudo, fazendo com que o potencial de membrana mitocondrial e a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e alto potencial de membrana mitocondrial fossem maior ($P > 0.05$ e ≤ 0.10) nos grupos tratados com CoQ-10 quando comparados ao controle.

As características de motilidade espermática analisadas pelo sistema CASA não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, diferente do encontrado por Nogueira et al. (2015) e Yousefian, Zare-Shahneh e Zhandi (2014) em sêmen refrigerado de garanhões. Carneiro et al. (2018), utilizando concentrações de 0, 25, 50 e 75 µmols/L de CoQ-10, encontraram diferenças na motilidade espermática no sêmen criopreservado de garanhões *bad freezers* no tratamento com 75 µmols/L de CoQ-10. Esta variação entre apresentar ou não diferenças estatísticas na motilidade espermática, provavelmente é devido ao fato de cada trabalho ter utilizado diferentes concentrações de CoQ-10.

Devido às características da CoQ-10 foi observado por meio da técnica DAB que o tratamento preservou melhor a atividade mitocondrial dos espermatozoides criopreservados equinos na concentração de 1 mM. O DAB é uma técnica citoquímica baseada na oxidação da 3´3 diaminobenzidina pelo complexo citocromo C e posterior deposição do composto nas mitocôndrias. Tal complexo está intimamente relacionado à respiração celular e ao metabolismo energético mitocondrial dos espermatozoides (HRUDKA, 1987). Isto ocorreu provavelmente devido a atuação direta da CoQ-10 na cadeia de transporte de elétrons da membrana mitocondrial, melhorando este processo e ativando atividade mitocondrial. Este achado de melhora no tratamento 1 mM CoQ-10 em relação ao controle é de extrema importância, Casey et al. (1993) descobriram, para sêmen refrigerado equino uma alta correlação ($r = 0,99$) entre espermatozoides com membrana plasmática íntegra e função mitocondrial. Além disso, isto pode aumentar a produção e disponibilidade de ATP para os espermatozoides.

Tem sido hipotetizado por alguns trabalhos que o citoesqueleto de actina é danificado durante o processo de criopreservação (WATSON, 1995; WATSON, 2000). Flores et al. (2010) mostraram pela técnica de imunocitoquímica a presença de actina na região pós-acrossomal e na parte caudal da peça intermediária em sêmen fresco de suínos bem como sua presença ao longo de toda cauda. A fase de refrigeração, aumentou a intensidade da actina na região pós-acrossomal.

Os elementos do citoesqueleto são sensíveis a variações de temperatura, principalmente durante a refrigeração e criopreservação, em outros tipos celulares, a refrigeração resultou em despolimerização prematura dos filamentos de actina (WATSON, 2000; HALL et al., 1993). É muito importante que este componente celular seja mais estudado quando se trata de protocolos de refrigeração e criopreservação de sêmen, pois é diretamente atingido durante essas biotécnicas. O citoesqueleto de actina possui um importante papel na regulação do volume celular, motilidade espermática, além de sua relação com a integridade de membrana plasmática, reação acrossomal e capacitação. Devido a isso, uma ferramenta que auxilia na preservação do citoesqueleto durante o processo de criopreservação pode ser uma descoberta que auxilie na evolução e melhora da biotecnologia de criopreservação do sêmen equino. Sendo assim, este estudo foi o primeiro que encontrou que a CoQ-10 na concentração de 1 mM preservou melhor o citoesqueleto espermático durante a criopreservação. Isto contribui cientificamente para futuras melhorias no processo de criopreservação espermática em garanhões.

Portanto, é possível concluir com este trabalho que a CoQ-10 adicionada na concentração de 1 mM ao diluidor de congelação durante o processo de criopreservação do sêmen equino, preserva a funcionalidade das mitocôndrias e o citoesqueleto de actina dos espermatozoides submetidos ao processo de congelação.

REFERÊNCIAS

AFFONSO, Fernanda J. et al. Addition of Antioxidants Myoinositol, Ferulic Acid, and Melatonin and Their Effects on Sperm Motility, Membrane Integrity, and Reactive Oxygen Species Production in Cooled Equine Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 59, p. 57-63, 2017.

AL-ESSAWE, Essraa M. et al. Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. **Cryobiology**, v. 81, p. 145-152, 2018.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S. The influence of mare numbers, ejaculation frequency and month on the fertility of Thoroughbred stallions. **Equine veterinary journal**, v. 44, n. 5, p. 535-541, 2012.

ALLEVA, Renata et al. The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. **Molecular aspects of medicine**, v. 18, p. 221-228, 1997.

BALERCIA, Giancarlo et al. Coenzyme Q10 and male infertility. **Journal of endocrinological investigation**, v. 32, n. 7, p. 626-632, 2009.

BENTINGER, Magnus; BRISMAR, Kerstin; DALLNER, Gustav. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v. 7, p. S41-S50, 2007.

BREITBART, Haim; COHEN, Gili; RUBINSTEIN, Sara. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. **Reproduction**, v. 129, n. 3, p. 263-268, 2005.

CABELLO-AGÜEROS, José F.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Enrique O.; MÚJICA, Adela. The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. **Cell motility and the cytoskeleton**, v. 56, n. 2, p. 94-108, 2003.

CARNEIRO, Joao AM et al. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. **Animal reproduction science**, v. 192, p. 107-118, 2018.

CASEY, PATRICK J. et al. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of andrology**, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CORREA, Liane M.; THOMAS, Alysia; MEYERS, Stuart A. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 6, p. 942-953, 2007.

EDDY, Edward M.; TOSHIMORI, Kiyotaka; O'BRIEN, Deborah A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy research and technique**, v. 61, n. 1, p. 103-115, 2003.

FAWCETT, Don W. The mammalian spermatozoon. **Developmental biology**, v. 44, n. 2, p. 394-436, 1975.

GARCÍA, B. Macías et al. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1280-1289, 2012.

HALL, Susan M.; EVANS, Joanna; HAWORTH, Sheila G. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 9, n. 1, p. 106-114, 1993.

HOLMES, Kenneth C. et al. Atomic model of the actin filament. **Nature**, v. 347, n. 6288, p. 44, 1990.

LANÇONI, Renata et al. Melatonin added to cryopreservation extender improves the mitochondrial membrane potential of post-thawed equine sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2018.

LEWIN, Aby; LAVON, Haim. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 18, p. 213-219, 1997.

LIN, M.; HESS, R.; AITKEN, R. J. Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (Macropus eugenii): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. **Reproduction**, v. 124, n. 1, p. 107-117, 2002.

LITTARRU, Gian Paolo; TIANO, Luca. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. **Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 250-254, 2010.

LIU, D. Y.; CLARKE, G. N.; BAKER, H. W. G. Exposure of actin on the surface of the human sperm head during in vitro culture relates to sperm morphology, capacitation and zona binding. **Human Reproduction**, v. 20, n. 4, p. 999-1005, 2005.

NARESH, Sai. Effect of cooling (4° C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. **Cryobiology**, v. 72, n. 1, p. 7-13, 2016.

NASCIMENTO, J. et al. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of equine veterinary science**, v. 28, n. 6, p. 351-358, 2008.

NOGUEIRA, B. G. et al. Coenzyme Q10 and α-Tocopherol Prevent the Lipid Peroxidation of Cooled Equine Semen. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 6, p. 1003-1010, 2015.

PEDERSEN, Stine F.; HOFFMANN, Else Kay; MILLS, J. W. The cytoskeleton and cell volume regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 130, n. 3, p. 385-399, 2001.

PETRUNKINA, A. M. et al. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1390-1406, 2005.

ROSSI, Melissa; FALOMO, Maria Elena; MANTOVANI, Roberto. Role of coenzyme Q and vitamin E on stallion semen motility evaluated both in frozen and cooled-stored semen. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 595-603, 2016.

TURUNEN, Mikael; OLSSON, Jerker; DALLNER, Gustav. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1660, n. 1, p. 171-199, 2004.

TSUNODA, Roberta Harue et al. Addition of Pentoxifylline to Skim Milk–Based Extender on Frozen-Thawed Equine Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 10, p. 823-829, 2015.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

YOUSEFIAN, Iman; ZARE-SHAHNEH, Ahmad; ZHANDI, Mahdi. The effect of coenzyme q10 and α-tocopherol in skim milk–based extender for preservation of caspian stallion semen in cool condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 8, p. 949-954, 2014.

Papel da ubiquitina em garanhões com alta e baixa qualidade seminal e correlações com os defeitos morfológicos espermáticos

4 PAPEL DA UBIQUITINA EM GARANHÕES COM ALTA E BAIXA QUALIDADE SEMINAL E CORRELAÇÕES COM OS DEFEITOS MORFOLÓGICOS ESPERMÁTICOS

4.1 INTRODUÇÃO

A ubiquitina é uma proteína pequena composta por 76 resíduos aminoácidos em sequência altamente conservada que foi identificada em células de animais, plantas, leveduras e bactérias. Foi inicialmente purificada no timo de bezerros, no timo humano, no testículo de trutas e posteriormente nos testículos de bovinos. Possui ampla distribuição nos organismos e foi identificada como o fator de proteólise dependente de ATP (LOIR et al., 1984). Esta proteólise é realizada através do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP). Este sistema consiste na ligação do proteassoma 26S a proteínas mal formadas, com erros de síntese ou que não serão mais usadas. O proteassoma 26S é um complexo de protease específico da ubiquitina (SUTOVSKY et al., 2015), ou seja, ao ser detectada uma proteína mal formada na membrana celular, a ubiquitina se ligará a ela e ativará o proteassoma 26S para que ocorra a proteólise.

No aparelho reprodutor do macho, a existência de um mecanismo ativo de controle da qualidade dos espermatozoides no epidídimo de mamíferos é sugerida pela redução na porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos entre cabeça e cauda do epidídimo (BASKA et al., 2008). A ubiquitina atua principalmente no epidídimo se ligando covalentemente a agregados proteicos mal formados na superfície dos espermatozoides defeituosos pós-testiculares. Ela é secretada pelas células do epitélio epididimal através de um mecanismo de secreção apócrina envolvendo o deslocamento e a ruptura de bolhas apicais das células epiteliais epididimais, assim o conteúdo proteico é exportado e o SUP se incorpora ao fluido epididimário. Então, ao longo da passagem dos espermatozoides pelo epidídimo o SUP atua e as células epiteliais fagocitam os espermatozoides marcados com a ubiquitina e os eliminam, porém, quando há grande quantidade de células marcadas, não é possível a fagocitose de todos os espermatozoides e eles serão pertencentes ao ejaculado (SUTOVSKY et al., 2001).

Em touros, foi constatado que espermatozoides com defeitos se tornam ubiquitinados (ou seja, possuem marcação de ubiquitina na membrana externa) durante sua passagem pelo epidídimo (SUTOVSKY et al., 2001). Em humanos foram encontrados altos níveis de ubiquitina em homens com infertilidade hereditária que possuíam displasia da bainha fibrosa,

ou também conhecida como síndrome de *stump tail* (RAWE et al., 2002). Foi observado recentemente que o revestimento com ubiquitina pode dar aos espermatozoides defeituosos e fragmentados uma carga positiva promovendo sua aglutinação (SUTOVSKY et al., 2015).

O primeiro estudo realizado sobre a função da ubiquitina nos testículos e epidídimos de garanhões objetivou examinar se o sistema proteolítico dependente de ubiquitina poderia estar envolvido em mudanças sazonais na espermatogênese no garanhão, determinar se este sistema desempenha um papel na regulação da maturação espermática do garanhão e realizar um estudo preliminar sobre a possível associação entre o nível de ubiquitinação espermática e a fertilidade do garanhão (SUTOVSKY et al., 2003). Foi observado que não há significante reatividade à ubiquitina nos testículos, da mesma forma, menor acúmulo de substratos reativos à ubiquitina foi identificado nas glândulas sexuais acessórias, porém, há alta reatividade identificada no epidídimo.

A ubiquitina também já foi estudada como um biomarcador para infertilidade em homens, examinando as relações entre a ubiquitina espermática e parâmetros seminais de pacientes com sinais clínicos de infertilidade por diferentes etiologias, os pacientes inférteis (n = 28) apresentaram maior quantidade de marcação de ubiquitina nas células do que os doadores férteis em análises por citometria de fluxo (SUTOVSKY; HAUSER; SUTOVSKY, 2004). Além disso, níveis altos de ubiquitinação foram detectados em homens com síndrome de infertilidade masculina hereditária (RAWE et al., 2002), porém também foram detectados em casos de infertilidade idiopática (SUTOVSKY; TERADA; SCHATTEN, 2001).

Diante disto, este trabalho possuiu como objetivo estudar a quantidade de ubiquitina presente em garanhões com alta e baixa qualidade espermática e correlacionar a localização da ubiquitina nos espermatozoides (cabeça, peça intermediária ou cauda) com os defeitos morfológicos identificados.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Seleção dos garanhões

Foram utilizados oito garanhões adultos de sela que foram separados em duas categorias: *bad* e *good freezers*. O grupo *bad freezers* apresentaram média da motilidade progressiva (MP) de 16,3% e o grupo de garanhões *good freezers* apresentaram média da MP de 55,1% em análises realizadas pós-descongelação nos cinco ejaculados colhidos de cada animal. A motilidade espermática foi avaliada pelo sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analisys*) usando o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA). O *setup* foi ajustado previamente para análise de espermatozoides equinos. Para a avaliação, a amostra espermática foi diluída em $40x10^6$ espermatozoides/mL. Em seguida, 10 µL do sêmen diluído foi colocado na câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel).

4.2.2 Colheita e manipulação do sêmen

Antes do início do experimento, os animais estavam em colheitas de sêmen regulares três vezes por semana. Para o presente experimento, foram realizadas cinco colheitas de cada garanhão (8 garanhões x 5 colheitas n=40). Previamente a cada colheita de sêmen o pênis foi lavado criteriosamente e em seguida realizada a colheita com vagina artificial. Os procedimentos realizados neste experimento estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP n° do protocolo 9044141216.

4.2.3 Procedimentos laboratoriais pré-congelação do sêmen

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi filtrado para a separação da parte rica em espermatozoides da parte gelatinosa. Para a análise da motilidade espermática (de maneira subjetiva) foi retirada uma alíquota de sêmen e diluído 3:1 em diluidor a base de leite desnatado (Max Sêmen®, Rancho das Américas, Porto Feliz, SP, Brasil) e mantido durante cinco minutos

em banho-maria seco antes da avaliação. Em seguida, o sêmen foi colocado em lâmina pré-aquecida e analisado quanto a motilidade subjetiva (%) e vigor espermático (1-5) em microscópio de contraste de fase em aumento de 100x. A concentração espermática foi realizada com o equipamento Nucleo Counter®, (ChemoMetec, Denmark) segundo recomendações do fabricante. O ejaculado total foi diluído na proporção 1:1 em diluidor a base de leite desnatado (Max Sêmen®, Rancho das Américas, Porto Feliz, SP, Brasil) e, subsequentemente, aliquotado em tubos de 15 mL e centrifugado a 500 x g durante 12 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a concentração ajustada para $200x10^6$ sperm/mL utilizando diluidor Botucrio® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

4.2.4 Criopreservação do sêmen

Assim como foi descrito anteriormente, o sêmen foi centrifugado e ressuspendido em diluidor de congelação (Botucrio®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) na concentração de $200x10^6$ sperm/mL. Então, a amostra foi envasada em palhetas de sêmen de 0.5 mL previamente identificadas com nome do garanhão e data da colheita, em seguida foram cuidadosamente fechadas com esferas de metal.

A criopreservação do sêmen foi realizada utilizando o equipamento TK 3000® (TK tecnologia em congelação LTDA, Uberaba, MG, Brasil). As palhetas foram refrigeradas a 5°C, utilizando a curva de refrigeração de -0,5°C/min. Ao atingir esta temperatura o sêmen permanecia por mais 30 minutos em estabilização (tempo de equilíbrio). Em seguida, a curva de congelação foi procedida. Nesta, a temperatura diminuía -20°C/min de 5°C até -120°C. Então, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido (-196°C). Após o término desse procedimento, as palhetas foram organizadas em *racks* e armazenadas em botijão criogênico.

4.2.5 Análises do sêmen

Foram realizadas análises de morfologia espermática por microscopia de contraste de interferência deferencial (DIC) e marcação da ubiquitina nos espermatozoides por meio de imunofluorescência. Para que fossem realizadas as análises, foram descongeladas duas palhetas

de cada partida de sêmen. A descongelação era realizada em banho-maria a 37°C durante 30 segundos.

4.2.5.1 Análises da morfologia espermática

A amostra espermática foi fixada em solução salina tamponada contendo 4% de formaldeído previamente aquecida a 37º C. Para avaliação da morfologia espermática foram avaliadas 200 células pela técnica de câmara úmida, sob microscopia de contraste de interferência diferencial - DIC (Nikon, Modelo Eclipse 80i, Tóquio, Japão) com aumento de 1.000x. As células foram classificadas de acordo com adaptação de Varner (2008), Brito (2007) e Blom (1973) em porcentagem de Defeitos Espermáticos Maiores: defeitos de acrossomo, gota protoplasmática proximal, teratológicas, *pouch formation*, defeitos de cabeça (subdesenvolvida, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal e contorno anormal), defeitos de peça intermediária, defeitos de cauda (enrolada na cabeça, fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota); Defeitos Espermáticos Menores: gota protoplasmática distal, defeitos de cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal), inserção da cauda anormal (oblíqua e retroaxial) e Defeitos Totais (soma dos defeitos maiores e menores).

4.2.5.2 Marcação e quantificação da ubiquitina espermática

O sêmen descongelado passou por duas “lavagens” por centrifugação a 500 x *g* durante 5 minutos em meio KMT. Em seguida, o pellet foi ressuspendido em 500 µL de KMT e eram feitos esfregaços (3 por amostra) em lâminas (StartFrost, Knittel Glass, Germany) que posteriormente eram deixados para secar em mesa aquecedora durante 5 min. Após secagem, as lâminas eram submersas em 2% de formaldeído em PBS e fixadas durante 40 min. Então, eram realizadas 3 lavagens em PBS durante 5 min. Logo após as lavagens as lâminas eram “bloqueadas” em 5% de BSA em PBS por 40 min e circundadas com caneta hidrofóbica para então serem incubadas com o anticorpo primário KM691 (Kamyia Biomedical Company, USA) na diluição 1:100 em câmara úmida durante 40 min. Depois da incubação com o anticorpo primário as lâminas foram novamente lavadas por 3 vezes em PBS durante 5 min. Em seguida,

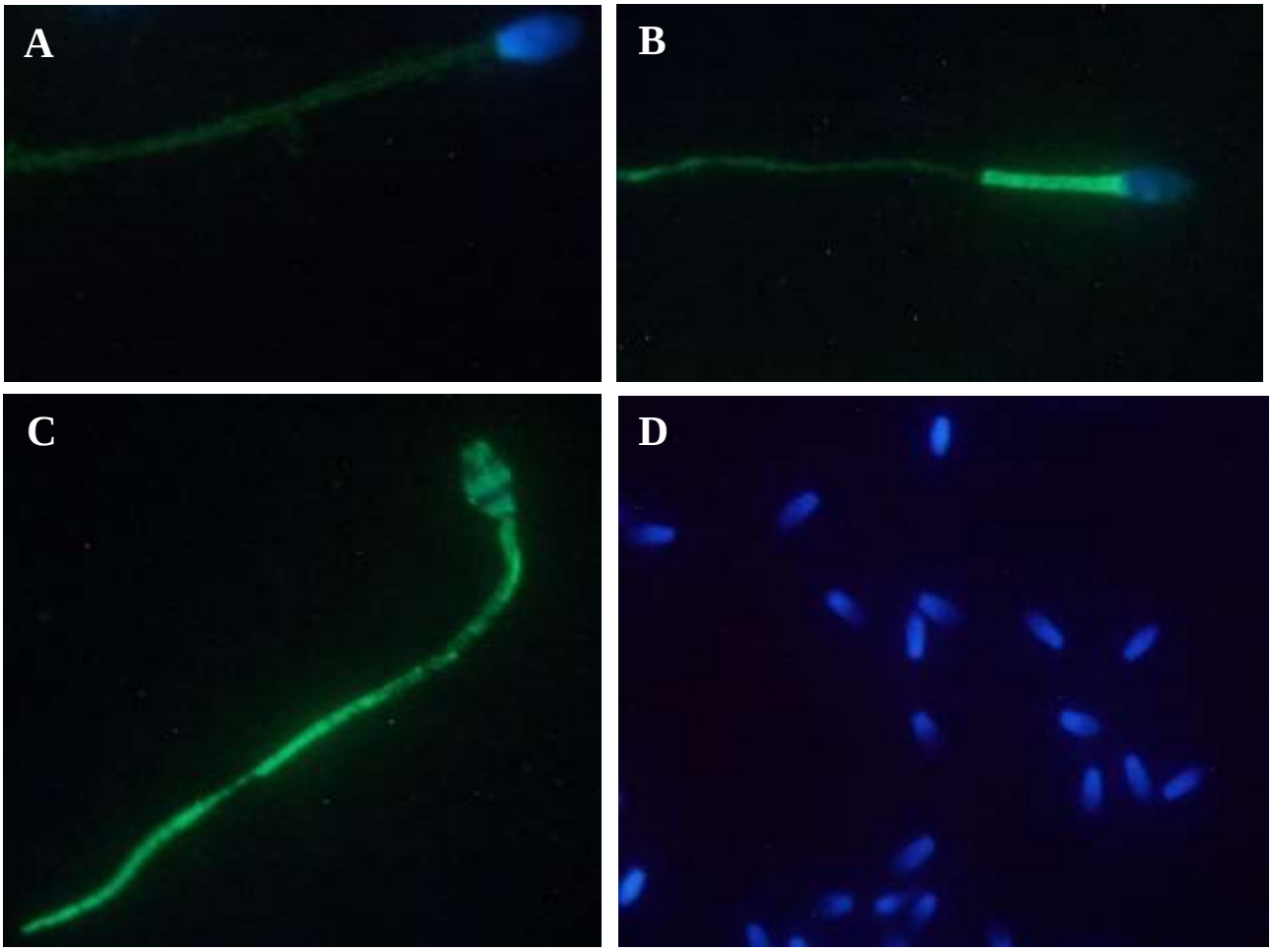
eram incubadas com o anticorpo secundário (Anti-mouse IgM-FITC, Cod F9259, Sigma-Aldrich) em câmara úmida por 40 min e então, 3 lavagens durante 5 min em PBS. Para finalizar, as amostras eram incubadas durante 10 min com contra-coloração nuclear DAPI (Cod P36941, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) (SUTOVSKY et al., 2001; SUTOVSKY et al., 2003). Em todas as análises eram feitas lâminas que serviam como controle negativo em que se realizava todo o protocolo de fixação, porém não era adicionado o anticorpo primário (KM691) apenas o anticorpo secundário era incubado para detectar qualquer tipo de reação inespecífica de marcação. Ou seja, na lâmina de controle negativo não se deveria enxergar nenhum tipo de marcação em verde, apenas a coloração nuclear (azul). Foram contadas 200 células por amostra.

Classificação quanto a intensidade e localização da ubiquitina nos espermatozoides (figura 1):

Classificação 1 - De I a IV de acordo com a intensidade de ubiquitina por todo o espermatozoide (I = nenhuma ou muito pouca marcação de ubiquitina e IV = muita marcação de ubiquitina).

Classificação 2 - De acordo com a localização e intensidade de marcação da ubiquitina na célula. Sendo assim, eram considerados cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides e cada estrutura classificada quanto a sua intensidade de brilho denominada em +, ++ ou +++. Como exemplo, é possível citar uma célula com + na cabeça, +++ na peça intermediária e ++ na cauda, isso significa que esta célula apresentava pouca marcação na cabeça, muita marcação na peça intermediária e marcação intermediária na cauda.

Figura 1 – Espermatozoides criopreservados de garanhões marcados por imunifluorescência com o anticorpo KM691 para detecção de ubiquitina (marcação verde: ubiquitina, marcação azul: corante nuclear DAPI). **A** - Classificação 1: célula I; Classificação 2: + peça intermediária, + cauda. **B** - Classificação 1: célula II; Classificação 2: +++ peça intermediária, + cauda. **C** - Classificação 1: célula IV; Classificação 2: +++ cabeça, +++ peça intermediária e +++ cauda. **D** - Controle negativo.



Legenda: Classificação 1 – os espermatozoides eram classificados de I a IV de acordo com a intensidade de ubiquitina por toda a célula (I = nenhuma ou muito pouca marcação de ubiquitina e IV = muita marcação de ubiquitina). Classificação 2 - De acordo com a localização e intensidade de marcação da ubiquitina na célula. Sendo assim, eram considerados cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides e cada estrutura classificada quanto a sua intensidade de brilho denominada em +, ++ ou +++.

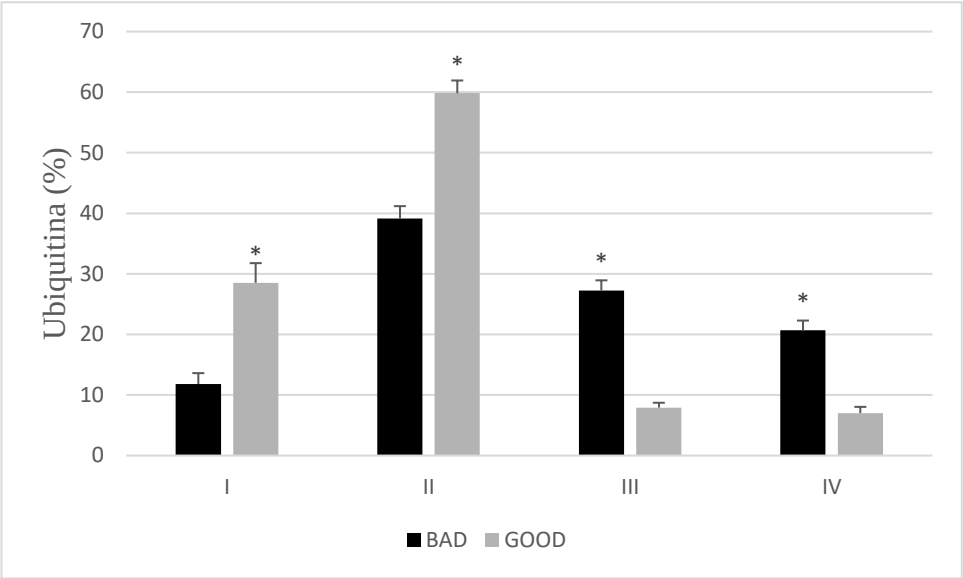
4.2.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ($P < 0.05$) os dados foram transformados ou retirados os outliers e reavaliados. O "Teste T" foi aplicado para identificar diferenças estatísticas na quantidade de ubiquitina entre os grupos *bad* e *good freezers*. Além disso, foram realizadas correlações de Pearson entre os defeitos morfológicos espermáticos e a localização e intensidade da ubiquitina nos espermatozoides utilizando o PROC CORR do programa SAS (versão 9.4; SAS institute, Inc., Cary, NC, USA). A probabilidade de $P \leq 0.05$ foi considerada como diferença significativa. Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.).

4.3 RESULTADOS

Pode-se observar no gráfico 3 que a porcentagem de células com alta quantidade de ubiquitina (III e IV) é significativamente maior nos garanhões *bad freezers*. Já o grupo *good freezers* apresentou maior quantidade de células com baixa marcação para ubiquitina (I e II).

Gráfico 3 – Médias (± E. P.M.) das porcentagens de espermatozoides de garanhões *bad* e *good freezers* marcados com ubiquitina por imunofluorescência de acordo com a classificação 1 (I, II, III, IV).



*Nas barras indicam diferença estatística (P < 0.05) dentro de cada classificação (I, II, III, IV) pelo Teste T. Legenda: Classificação 1 – os espermatozoides eram classificados de I a IV de acordo com a intensidade de ubiquitina por toda a célula (I = nenhuma ou muito pouca marcação de ubiquitina e IV = muita marcação de ubiquitina).

A classificação 2 utilizada na leitura da ubiquitina gerou dados que foram utilizados nas análises de correlação, juntamente com os dados de defeitos morfológicos encontrados nas partidas de sêmen. É possível observar na tabela 3 que houve importantes correlações significativas entre a localização da ubiquitina nos espermatozoides e os defeitos morfológicos apresentados.

Tabela 3 – Coeficientes de correlação de Pearson entre os defeitos morfológicos, a quantidade de marcação e localização da ubiquitina presente em espermatozoides criopreservados de garanhões.

	Intensidade e localização da ubiquitina nos espermatozoides								
Defeitos morfológicos	**Cab+**	**Cab++**	**Cab+++**	**PI+**	**PI++**	**PI+++**	**Cau+**	**Cau++**	**Cau+++**
Acrossoma	-0,14	0,47*	0,35*	-0,12	0,68*	0,05	-0,15	0,70*	0,38*
Gota proximal	0,01	-0,18	-0,24	-0,12	-0,38*	0,17	-0,07	-0,35*	0,07
Subdesenvolvida	0,13	0,5*	0,33*	-0,05	0,37*	0,05	-0,12	0,37*	0,40*
Cauda enrolada cab	-0,10	0,49*	0,59*	-0,24	0,66*	0,27	-0,09	0,75*	0,45*
Cabeça isolada pato.	0,06	0,66*	0,59*	-0,36*	0,59*	0,42*	-0,28	0,64*	0,56*
Estreita na base	-0,11	0,05	0,15	-0,07	0,005	0,05	0,06	-0,02	-0,04
Cabeça piriforme	0,10	0,29	0,26	-0,17	0,26	0,12	-0,16	0,12	0,12
Pequena anormal	-0,08	0,34*	0,40*	0,14	0,41*	0,05	0,29	0,36*	-0,09
Contorno anormal	0,52*	0,42*	0,22	-0,32*	0,07	0,44*	-0,23	-0,07	0,08
Pouch formation	0,04	0,21	0,36*	0,15	0,16	-0,009	0,25	0,13	-0,11
Formas teratologi.	0,28	0,11	0,06	-0,53*	-0,15	0,71*	-0,22	-0,05	0,29
Peça intermediária	0,11	0,22	0,18	-0,60*	-0,04	0,8*	-0,23	0,09	0,48*
Fortemente dob/enr	0,47*	0,26	0,17	-0,56*	0,06	0,59*	-0,43*	0,10	0,21
Dobrada com gota	0,25	0,03	-0,09	-0,28	-0,16	0,18	-0,38*	-0,23	0,07
Total def. maiores	0,23	0,57*	0,63*	-0,39*	0,29	0,66*	-0,05	0,32*	0,35*
Cabeça isola. norm.	-0,06	0,30	0,14	-0,11	0,24	0,05	-0,16	0,31*	0,4*
Cauda dob/enrolada	0,10	0,03	0,17	-0,006	0,12	-0,02	-0,10	0,11	-0,12
Gota distal	0,10	-0,13	-0,22	-0,22	-0,23	0,23	-0,18	-0,19	0,04
Total def. menores	0,10	-0,09	-0,18	-0,23	-0,18	0,23	-0,22	-0,14	0,08
Defeitos totais	0,25	0,56*	0,60*	-0,42*	0,26	0,69*	-0,08	0,30	0,35*

*Indicam r significativo ($P < 0.05$).Legenda: Classificação 2 - De acordo com a localização e intensidade de marcação da ubiquitina na célula. Sendo assim, eram considerados cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides e cada estrutura classificada quanto a sua intensidade de brilho denominada em +, ++ ou +++. **Cab**: cabeça, **PI**: peça intermediária, **Cau**: cauda.

4.4 DISCUSSÃO

O estudo de Sutovsky et al. (2001) demonstrou que os espermatozoides defeituosos de mamíferos adquirem ubiquitina na superfície durante a passagem pelo epidídimo. Embora seja provável que espermatozoides defeituosos sejam ubiquitinados por causa de danos estruturais, não está claro como essas células são reconhecidas e como são eliminadas após a fagocitose. Uma possível explicação é que a ubiquitinação epididimal está na interseção, ou talvez no ponto final comum de vários mecanismos apoptóticos que ocorrem nos testículos (HIKIM; SWERDLOFF, 1999).

Em estudo realizado em equinos para identificação da relação da ubiquitina com a sazonalidade (SUTOVSKY et al., 2003), embora não tenha incluído grande número de garanhões, as medidas de ubiquitina em espermatozoides ejaculados fornecem evidências

preliminares de que o sistema de ubiquitina pode estar envolvido com diminuições na quantidade espermática nas diferentes estações ou devido a patologias (ou em ambos) no número de espermatozoides de garanhões. Isto é semelhante às observações anteriores em homens inférteis (SUTOVSKY; TERADA; SCHATTEN, 2001).

A ubiquitina se acumula nos tecidos apoptóticos e pode desempenhar um papel fundamental na regulação das moléculas sinalizadoras envolvidas na execução da morte celular programada (JESENBERGER; JENTSCH, 2002). Recentemente, foi relatado que uma proteína semelhante à ubiquitina, a FAT10, expressa em células somáticas que foi capaz de iniciar a apoptose, fornecendo assim uma possível ligação entre estes dois sistemas (apoptose e ubiquitinação) (RAASI; SCHMIDTKE; GROETTRUP, 2001). Baska et al. (2008) identificaram componentes enzimáticos necessários para a ubiquitinação além de ubiquitina e proteassomos no fluido epididimário de bovinos, também sugeriram neste estudo a ação da ubiquitina no final da maturação espermática no epidídimo, atuando na retirada de gotas citoplasmáticas.

Foi possível notar neste presente estudo que a quantidade de ubiquitina em espermatozoides de garanhões com baixa qualidade seminal e que eram considerados bad freezers foi significantemente maior ($P < 0.05$). Isso demonstra que estes animais provavelmente possuem falhas na espermatogênese, resultando em grande quantidade de espermatozoides defeituosos, assim, o SUP atuando no epidídimo não é capaz de eliminar todas as células com defeitos refletindo em maior marcação de ubiquitina nos espermatozoides ejaculados.

No presente trabalho, foi possível observar interessantes correlações entre os defeitos espermáticos e a marcação de ubiquitina nas células (tabela 3). Alta marcação de ubiquitina na cabeça do espermatozoide (Cab+++) apresentou correlação positiva significativa ($P < 0.05$) com defeitos de acrossoma ($r = 0,35$), com células subdesenvolvidas ($r = 0,33$), cauda enrolada na cabeça ($r = 0,59$), cabeça isolada patológica ($r = 0,59$), cabeça pequena anormal ($r = 0,40$) e *pouch formation* ($r = 0,36$). Estes dados encontrados sugerem que a ubiquitina marca a membrana dos espermatozoides com defeitos morfológicos sinalizando essa má formação para a atuação de “eliminação” do epidídimo.

Além das correlações apresentadas com alta quantidade de ubiquitina na cabeça dos espermatozoides, também houve correlações significativas ($P < 0.05$) positivas para alta marcação de ubiquitina na peça intermediária (PI+++) com formas teratológicas ($r = 0,71$), defeitos de peça intermediária ($r = 0,8$) e caudas fortemente dobradas ou enroladas ($r = 0,59$) nestes casos, além de serem significativas, apresentam forte coeficiente de correlação. Essas

correlações encontradas entre alta ubiquitina na cabeça do espermatozoide com defeitos apresentados na cabeça e alta marcação de ubiquitina na peça intermediária com defeitos de peça intermediária demonstram que a marcação da ubiquitina na célula ocorre no respectivo local onde existe o defeito morfológico.

Em estudo realizado entre 28 homens inférteis e 15 doadores férteis, foi verificado que os inférteis apresentavam maior marcação de ubiquitina nas células (SUTOVSKY; HAUSER; SUTOVSKY, 2004), assim como foi encontrado no presente trabalho nos garanhões de baixa qualidade seminal em comparação com os de alta qualidade. Além disso, ainda no trabalho de Sutovsky, Hauser e Sutovsky (2004) foi observado correlação significativa (r = 0,73) entre a % de espermatozoides anormais e a quantidade de ubiquitina na amostra, porém, em humanos, a ubiquitina foi analisada por citometria de fluxo, não sendo possível comparar a localização dela nas células, assim como foi realizado neste trabalho com os garanhões.

O fato de ter sido encontradas várias correlações positivas da morfologia espermática com a quantidade e localização da ubiquitina nas células pode levar futuramente a analisar a morfologia espermática de outro modo, assim como sugeriu Odihambo et al. (2011), pois apesar da disponibilidade de sistemas de análise de sêmen auxiliados por computador há mais de 20 anos, sua adaptação à avaliação morfológica, especialmente para o sêmen de animais de criação, não foi otimizada (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Este problema poderia ser resolvido pela disponibilidade de fluorocromos sensíveis e adequados a citômetros de fluxo para análise de sêmen, já que a técnica de citometria de fluxo permite avaliação de grande quantidade de células em um tempo muito menor. Além disso, a ubiquitina já foi validada em análises de citometria (RAWE et al.,2002).

Porém, apesar de ter sido encontrado altas correlações de marcação de ubiquitina com defeitos morfológicos espermáticos, ao longo das análises de imunohistoquímica no microscópio de epifluorescência foi observado que muitos espermatozoides com alta marcação de ubiquitina não possuíam defeitos morfológicos aparentes, o que corrobora com o encontrado por Sutovsky, Hauser e Sutovsky (2004) em alguns pacientes humanos com ubiquitina alta detectada mas que não tiveram alta porcentagem de defeitos morfológicos identificáveis na análise subjetiva por microscopia. Este fato sugere que a análise de ubiquitina pode complementar as análises seminais e identificar problemas de infertilidade que exames convencionais não são capazes de detectar, isso demonstra que esta análise pode ser complementar à morfologia espermática, identificando células mal formadas molecularmente.

Odhiambo et al. (2014) realizaram interessante trabalho em touros onde utilizaram nanopartículas magnéticas para separar os espermatozoides marcados com ubiquitina. Foi utilizado o anticorpo reagente à ubiquitina associado a uma nanopartícula magnética, assim, foi possível observar que a amostra de sêmen que havia sido "purificada", ou seja, onde haviam sido retirados os espermatozoides marcados com ubiquitina apresentaram menor porcentagem de espermatozoides com defeitos, consequentemente maior porcentagem de células normais. Porém, infelizmente não foi encontrada diferença estatística entre as taxas de concepção do sêmen "purificado" e do sêmen convencional, ambos com dose inseminante de 10 milhões de espermatozoides.

Portanto, é possível concluir com este trabalho que a ubiquitina está presente em maior quantidade nos espermatozoides de garanhões que possuem baixa qualidade espermática, além disso foram encontradas importantes correlações entre a localização da ubiquitina nos espermatozoides e defeitos morfológicos das células. Isto sugere que a ubiquitina possui o papel de sinalizar a presença de espermatozoides com defeitos morfológicos através da marcação da membrana espermática.

REFERÊNCIAS

BASKA, Kathleen M. et al. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. **Journal of cellular physiology**, v. 215, n. 3, p. 684-696, 2008.

BRITO, Leonardo FC. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.

FRAILE, B. et al. Light and electron microscopic immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in the human epididymis and vas deferens. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 2, p. 291-297, 1996.

GLICKMAN, Michael H.; CIECHANOVER, Aaron. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GOLDKNOPF, Ira L.; BUSCH, Harris. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 3, p. 864-868, 1977.

GOLDSTEIN, Gideon et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 1, p. 11-15, 1975.

HERMO, Louis; DWORKIN, Joel; OKO, Richard. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. **American journal of anatomy**, v. 183, n. 2, p. 107-124, 1988.

HIKIM, AP Sinha; SWERDLOFF, Ronald S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. **Reviews of reproduction**, v. 4, n. 1, p. 38-47, 1999.

JESENBERGER, Veronika; JENTSCH, Stefan. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 2, p. 112, 2002.

LOIR, M. et al. Purification and characterization of ubiquitin from mammalian testis. **FEBS letters**, v. 169, n. 2, p. 199-204, 1984.

ODHIAMBO, J. F. et al. Adaptation of ubiquitin-PNA based sperm quality assay for semen evaluation by a conventional flow cytometer and a dedicated platform for flow cytometric semen analysis. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1168-1176, 2011.

ODHIAMBO, John F. et al. Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 4, 2014.

RAASI, Shahri; SCHMIDTKE, Gunter; GROETTRUP, Marcus. The ubiquitin-like protein FAT10 forms covalent conjugates and induces apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38, p. 35334-35343, 2001.

RAWE, V. Y. et al. Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath. **Human Reproduction**, v. 17, n. 8, p. 2119-2127, 2002.

SUTOVSKY, Peter et al. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **Journal of cell science**, v. 114, n. 9, p. 1665-1675, 2001.

SUTOVSKY, Peter et al. Differential ubiquitination of stallion sperm proteins: possible implications for infertility and reproductive seasonality. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 2, p. 688-698, 2003.

SUTOVSKY, Peter et al. Negative biomarker-based male fertility evaluation: sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 4, p. 554, 2015.

SUTOVSKY, Peter; HAUSER, Russ; SUTOVSKY, Miriam. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 628-638, 2004.

SUTOVSKY, Peter; TERADA, Yukihiro; SCHATTEN, Gerald. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. **Human Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 250-258, 2001.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 448-462, 2008.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

Conclusões gerais

5 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados do experimento 1 deste trabalho de pesquisa, podemos concluir que a utilização da CoQ-10 adicionada ao diluidor de criopreservação na concentração de 1 mM traz melhorias à biotécnica e, consequentemente, melhora os parâmetros do sêmen pós-descongelação. As análises mostraram boa atuação da CoQ-10 na função mitocondrial espermática e na preservação do citoesqueleto celular, estruturas que são diretamente atingidas e facilmente danificadas durante a congelação do sêmen.

Já no experimento 2, foi relatado que garanhões com baixa qualidade seminal apresentam maior quantidade de espermatozoides reativos ao anticorpo anti-ubiquitina, ou seja, maior quantidade de células marcadas com ubiquitina em seu ejaculado. Também foi possível constatar que a localização da ubiquitina possui importantes correlações com defeitos morfológicos espermáticos encontrados no sêmen desses garanhões.