

Efeito da terapia mitocondrial na qualidade espermática pós-descongelamento em bovinos

Álvaro de Miranda Alves¹, Roberta Ferreira Leite¹, João Diego de Agostini Losano², Ken Kawaoka Nagai¹,
Raphaella Gabrielle Brito Sousa¹, Henrique Thomazo Frias¹, Larissa Araújo Stábile¹, Thawan Santana
Piemonte¹, Marcilio Nichi^{1*}

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

² Department of Animal Sciences, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida

*e-mail: mnichi@usp.br

A criopreservação espermática é considerada um processo - chave para o uso das biotecnologias reprodutivas em bovinos. No entanto, tal técnica causa redução da qualidade espermática, sendo o estresse oxidativo um dos principais mecanismos envolvidos em injúrias espermáticas pós-descongelamento. Neste contexto, acredita-se que a mitocôndria possua um papel central no desequilíbrio oxidativo durante a criopreservação espermática, por ser a principal fonte liberadora de espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim, uma possível alternativa para melhorar a qualidade espermática pós-criopreservação seria uma terapia específica tendo como alvo essa organela. Uma molécula promissora seria o MitoTEMPO, capaz de quelar metais de transição responsáveis pela reação de Fenton, prevenindo a geração do radical hidroxila. Além disso, esta molécula possui papel na matriz mitocondrial com ação mimética de superóxido dismutase, o que, no entanto, pode levar a um acúmulo de peróxido de hidrogênio. Desta forma uma associação com mecanismos voltados ao peróxido de hidrogênio seria necessária (e.g., GSH). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o tratamento com o protetor mitocondrial MitoTEMPO, associado ou não à GSH, é capaz de prevenir a produção excessiva de EROS por meio da proteção e manutenção da função mitocondrial, melhorando aspectos quantitativos e qualitativos espermatozoides criopreservados de bovinos. Para tanto, ejaculados de 17 touros (N=17) foram submetidos a criopreservação com diluidores suplementados com diferentes concentrações dos antioxidantes supracitados. Cada ejaculado foi dividido em 8 alíquotas, contendo concentrações crescentes da molécula MitoTEMPO (0, 25, 50 e 100 µM) com ou sem GSH (0 e 5 mM). Após a diluição de cada ejaculado nos meios contendo seus respectivos tratamentos antioxidantes, as amostras foram submetidas à criopreservação, descongelamento e avaliação espermática. Observamos que as amostras tratadas com 50 µM de MitoTEMPO + 5 mM GSH apresentaram redução na porcentagem de células com alta atividade mitocondrial (51.59 ± 3.22) em relação aquelas sem GSH (41.41 ± 2.99). Nesse mesmo grupo houve aumento de ALH (6.08 ± 0.17) em relação ao grupo sem GSH (5.52 ± 0.18) e redução da linearidade (51.06 ± 1.30) em relação ao grupo sem GSH (55.18 ± 1.31). Ainda a associação dos tratamentos com GSH houve aumento de lesão de membrana acrossomal em todas as doses de MitoTEMPO avaliadas. A suplementação somente com o MitoTEMPO não apresentou melhoras significativas na qualidade espermática após a descongelamento. Os resultados do presente estudo indicam que a suplementação com MitoTEMPO e GSH nas doses utilizadas, associados ou não, não melhoram a qualidade espermática após a descongelamento.

Palavras chave: GSH. MitoTEMPO. Estresse redutivo. Antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio.

Effect of mitochondrial therapy on post-thaw sperm quality in bulls

Álvaro de Miranda Alves¹, Roberta Ferreira Leite¹, João Diego de Agostini Losano², Ken Kawaoka Nagai¹,
Raphaella Gabrielle Brito Sousa¹, Henrique Thomazo Frias¹, Larissa Araújo Stábile¹, Thawan Santana
Piemonte¹, Marcilio Nichi^{1*}

¹Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of Sao Paulo

²Department of Animal Sciences, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida

*e-mail: mnichi@usp.br

Sperm cryopreservation is considered a key process for the use of reproductive biotechnologies in cattle. However, this technique causes a reduction in sperm quality, with oxidative stress being one of the main mechanisms involved in post-thaw sperm injuries. In this context, mitochondria are believed to play a central role in oxidative imbalance during sperm cryopreservation, as they are the main source of reactive oxygen species (ROS). Thus, a possible alternative to improve post-thawed sperm quality would be a specific therapy targeting this organelle. A promising molecule would be MitoTEMPO, capable of chelating transition metals responsible for the Fenton reaction, preventing the generation of the hydroxyl radical. Additionally, this molecule plays a role in the mitochondrial matrix with a superoxide dismutase mimetic action, which, however, may lead to hydrogen peroxide accumulation. Thus, an association with mechanisms focused on hydrogen peroxide would be necessary (e.g., GSH). Therefore, the aim of the present study was to evaluate whether treatment with the mitochondrial protector MitoTEMPO, alone or in combination with GSH, is able to prevent excessive ROS production by protecting and maintaining mitochondrial function, improving quantitative and qualitative aspects of cryopreserved bull sperm. For this purpose, ejaculates from 17 bulls (N=17) were subjected to cryopreservation using extenders supplemented with different concentrations of the aforementioned antioxidants. Each ejaculate was divided into 8 aliquots, containing increasing concentrations of the MitoTEMPO (0, 25, 50, and 100 μ M) associated or not with GSH (0 and 5 mM). After dilution of each ejaculate in media containing their respective antioxidant treatments, the samples were subjected to cryopreservation, thawing, and sperm evaluation. We observed that samples treated with 50 μ M MitoTEMPO + 5 mM GSH showed a reduction in the percentage of cells with high mitochondrial activity (51.59 ± 3.22) compared to those without GSH (41.41 ± 2.99). In the same group, there was an increase in ALH (6.08 ± 0.17) compared to the group without GSH (5.52 ± 0.18) and a reduction in linearity (51.06 ± 1.30) compared to the group without GSH (55.18 ± 1.31). Furthermore, the association of treatments with GSH resulted in an increase in acrosomal membrane damage at all evaluated doses of MitoTEMPO. Supplementation with MitoTEMPO alone did not show significant improvements in sperm quality after thawing. The results of the present study indicate that supplementation with MitoTEMPO and GSH at the doses used, either alone or in combination, does not improve sperm quality after thawing.

Keywords: GSH. MitoTEMPO. Reductive stress. Antioxidants. Reactive oxygen species.