

## Efeito do desacoplamento mitocondrial na criopreservação de espermatozoides ovinos

Henrique Thomazo Frias<sup>1\*</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpcao<sup>3</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil; <sup>2</sup>Department of Animal Sciences (IFAS) - University of Florida, Gainesville, USA; <sup>3</sup>Laboratório de Biologia dos Espermatozoides (BioSptz) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil

\*e-mail: henrique.frias@usp.br

O protocolo de congelamento de semen provoca alterações estruturais e metabólicas nos espermatozoides de diversas espécies. Uma das causas dessas alterações são as espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas responsáveis por danos de membrana, DNA e distúrbios mitocondriais nos espermatozoides que, por apresentarem citoplasma reduzido e quantidades limitadas de antioxidantes, são mais susceptíveis às ações desses radicais livres ao longo do processo de criopreservação. Uma alternativa à adição de substâncias antioxidantes no diluidor de sêmen (que combatem as EROs já formadas) seria prevenir a formação dessas EROs, sendo as mitocôndrias espermáticas uma das principais fontes desses radicais que podem ser formados na produção de ATP. O desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons modula a atividade mitocondrial, reduzindo o estresse oxidativo nessas organelas em alguns tipos celulares. De fato, estudos demonstraram os efeitos dessas moléculas desacopladoras no resfriamento e congelamento de sêmen em diversas espécies. Sendo assim, foi proposto a adição do desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenol (DNP) em crescentes concentrações no meio diluidor de criopreservação. Foram coletados 7 carneiros de raça mestiça condicionados, com vagina artificial. Em seguida, os ejaculados foram diluídos a uma concentração final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides por mL com o diluidor OptiXcell® (IMV Technologies®, Brasil) e separados de acordo com a concentração de DNP e suplementação ou não de glicose. Após a criopreservação, as amostras foram descongeladas e avaliadas para motilidade (CASA), integridade de membrana plasmática e acrossomal (FITC-PSA), status mitocondrial (ensaio DAB e sonda fluorescente JC-1), detecção de EROs (CellRox® green e DCFH), integridade de DNA (SCSA) e susceptibilidade à peroxidação lipídica (TBARS). Foi observada maior porcentagem de espermatozoides com baixa e ausência de atividade mitocondrial (DAB Classe III e IV) nas amostras tratadas com  $10\mu\text{M}$  de DNP em relação ao controle sem adição de glicose ( $P < 0.05$ ), o que poderia indicar um efeito de seleção na presença do desacoplador de células com maior atividade mitocondrial.

**Palavras-chave:** mitocôndria, congelamento de sêmen, carneiro.

## Effect of mitochondrial uncoupling on the ram sperm cryopreservation

Henrique Thomazo Frias<sup>1\*</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpcao<sup>3</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia – University of São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Department of Animal Sciences (IFAS) - University of Florida, Gainesville, USA; <sup>3</sup>Laboratório de Biologia dos Espermatozoides (BioSptz) – University of São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brazil

\*e-mail: henrique.frias@usp.br

The semen freezing protocol causes structural and metabolic changes in sperm from different species. One of the principal causes of these changes are reactive oxygen species (ROS), molecules responsible for plasma membrane disruption, DNA damage and mitochondrial disorders in sperm, which, due to their reduced cytoplasm and limited amounts of antioxidants, are more susceptible to the actions of these free radicals throughout of the cryopreservation process. An alternative to adding antioxidant substances to the semen extender (which combat already formed ROS) would be to prevent the formation of these ROS, with spermatid mitochondria being one of the main sources of these radicals that can be formed in the production of ATP. Uncoupling of the electron transport chain modulates mitochondrial activity, reducing oxidative stress in these organelles in some cell types. In fact, studies have demonstrated the effects of these uncoupling molecules on cooling and freezing semen in several species. Therefore, it was proposed to add the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) in increasing concentrations to the cryopreservation diluting medium. Seven mixed-breed rams ejaculates were collected utilizing an artificial vagina. Then, the ejaculates were diluted to a final concentration of  $100 \times 10^6$  spermatozoa per mL with the OptiXcell® extender (IMV Technologies®, Brazil) and separated according to the concentration of DNP and glucose supplementation or not. After cryopreservation, samples were thawed and evaluated for motility (CASA), plasma and acrosomal membrane integrity (FITC-PSA), mitochondrial status (DAB assay and JC-1 fluorescent probe), ROS detection (CellRox® green and DCFH), DNA integrity (SCSA) and susceptibility to lipid peroxidation (TBARS). A higher percentage of spermatozoa with low and absent mitochondrial activity (DAB Classes III and IV) was observed in samples treated with 10µM DNP compared to the control without glucose supplementation ( $P < 0.05$ ), which could indicate the selection of higher mitochondrial activity spermatozoa when in presence of the mitochondrial uncoupler.

**Key-words:** semen freezing, ovine, spermatozoa biotechnology, mitochondria.