



## A FUNÇÃO DA UBIQUITINA NA FERTILIDADE DE MACHOS

Monique Maytê Malho Gomes<sup>1</sup>, Fábio José Carvalho Faria<sup>2</sup>, Deiler Sampaio Costa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestranda em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, E-mail: monique.cbv@gmail.com

<sup>2</sup>Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul E-mail: fabio.faria@ufms.br

<sup>3</sup>Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul E-mail: deiler.costa@ufms.br

**Resumo:** Essa revisão tem por objetivo unir as principais e mais recentes publicações sobre a ubiquitina, um marcador molecular que atua juntamente com o complexo proteassoma 26S em todas as fases da espermiogênese, que tem como função marcar células anormais ocultas à microscopia convencional para serem degradadas, e como esse mecanismo pode auxiliar em uma melhor seleção para fertilidade de machos. Vários estudos têm sido publicados comprovando que com utilização de algumas técnicas de baixo custo com esses marcadores moleculares poderemos selecionar os espermatozoides morfológicamente normais dos anormais após a ejaculação, ou simplesmente utilizando como método adicional de seleção melhorando a viabilidade do sêmen, conseqüentemente a fertilidade. Tais pesquisas estão cada vez mais próximas de uma nova maneira de se avaliar sêmen, trazendo esses biomarcadores para o cotidiano de centros de reprodução o que poderá ser de grande valia nos estudos sobre infertilidade tanto em humanos como em animais de produção.

**Palavras chave:** espermatozoides, fertilidade, proteassoma, ubiquitina

### UBIQUITIN ROLE IN MALE FERTILITY

**Abstract:** This review aims to unite the most recent and most recent publications on ubiquitin, a molecular marker that works together with the 26S proteasome complex at all stages of spermiogenesis, whose function is to mark abnormal cells hidden under conventional microscopy to be degraded, and how this mechanism can aid in a better selection for male fertility. Several studies have been published proving that with the use of some low cost techniques with these molecular markers we can select the morphologically normal spermatozoa of the abnormal ones after ejaculation, or simply using as an additional method of selection, improving the viability of the semen, consequently the fertility. These researches are increasingly approaching a new way of evaluating semen, bringing these biomarkers into the daily life of breeding centers, which may be of great value in studies of infertility in both humans and farmanimals.

**Keywords:** fertility, proteasome, sperm, ubiquitin

### INTRODUÇÃO

O sistema ubiquitina-proteassoma e sua relação com a espermatogênese têm sido estudados em diversas espécies animais. A ubiquitina está presente em todas as fases da espermatogênese, e principalmente, na diferenciação celular onde ocorrem algumas remodelagens celulares (Zapata et al., 2015).

De modo geral, a via ubiquitina-proteassoma deficiente bloqueará a espermatogênese, o que interferirá no desempenho reprodutivo dos machos. Para um melhor entendimento, a ubiquitina, descoberta em 1975 é uma pequena proteína estável ao calor e que possui 8,5kDa. Além disso, é responsável por marcar proteínas celulares anormais que serão alvos para serem degradadas pelo proteassoma 26S, que é um grande complexo proteico com mais de 31 subunidades de 2500kDa. Desse complexo fazem parte outros dois subcomplexos, o 20S (*core* 20S) e a 19S (PA700), os quais, além de degradar proteínas marcadas pelas moléculas de ubiquitina na espermatogênese são relevantes para o ciclo celular normal (Hou & Yang, 2013).



O proteassoma 26S tem sido considerado de extrema importância para o ciclo celular, pois está envolvido em diversos processos biológicos como: resposta imune, apoptose, progressão do ciclo celular, transdução de sinal, metabolismo, degradação de proteínas envelhecidas incorretamente e degradação relacionada com retículo endoplasmático entre outras funções (Baracat-Pereira, 2014; Hou&Yang, 2013).

A maioria dos espermatozoides ubiquitinados são posteriormente fagocitados pelas células do epitélio do epidídimo. Contudo, uma porção de espermatozoides defeituosos escapa à fagocitose podendo ser encontrado no ejaculado (Sutovsky et al. 2001).

De acordo com Arruda et al. (2015) e (Sixt&Dahlmann, 2008), disseram que alguns sinais bioquímicos e morfológicos de ubiquitina foram encontrados na superfície de espermatozoides defeituosos após a ejaculação, atuando como um possível controle de qualidade dos espermatozoides durante a passagem pelo epidídimo. Dessa forma, é possível que com essas evidências haja grande atuação dos proteassomas extracelulares e ubiquitinas no processo da fertilização.

Esta revisão teve por objetivo levantar estudos relacionados à ubiquitina e descrever como este biomarcador poderá viabilizar a fertilidade dos machos.

## DESENVOLVIMENTO

Os subcomplexos do proteassoma 26S, o 20S (*core* 20S) e a 19S (PA700) se ligam através de várias atividades enzimáticas. Uma delas é o envolvimento de moléculas de ubiquitina em um resíduo de Lys-63 em cadeias terminais, quando ocorre essa ligação sugere um sinal de reparação de DNA. A ubiquitinação da proteína-alvo acontece devido a eventos sequenciais de atividades enzimáticas as quais resultam em uma ligação isopeptídica entre a proteína-alvo e a ubiquitina, e entre as moléculas de ubiquitina para originarem uma proteína poliubiquitinada (Baracat-Pereira, 2014).

Com isso, para ocorrer a degradação através do proteassoma 26S, essa sequência inicia-se com a enzima ativadora de ubiquitina (E1) que exerce sua função com a presença de ATP e formará a ubiquitina-AMP, a qual através de uma ligação tioéster unirá um resíduo de cisteína da enzima E1 com um resíduo (GLY-76) da ubiquitina. Em seguida após essa ativação, a ubiquitina é transferida para a enzima carreadora de ubiquitina (E2). Com isso, a enzima ubiquitinaligase (E3) liga-se a proteína-alvo e, finalmente fixa a molécula de ubiquitina ao substrato proteico (Yi et al, 2007; Hou&Yang, 2013; Baracat-Pereira, 2014).

Para ser conhecido como sinal de degradação esse processo descrito tem que acontecer pelo menos quatro vezes, ou seja, tem que haver pelo menos a formação de quatro moléculas de ubiquitina ligadas à proteína-alvo para que o proteassoma 26S inicie sua atividade de degradação (Baracat-Pereira, 2014). Sutovsky (2001) em seu estudo cita que, espermatozoides ubiquitinados encontrados em ejaculados de animais de produção, ou mesmo padrões de identificação dessas moléculas de ubiquitina nos espermatozoides, poderiam fornecer informações úteis para a seleção de reprodutores em fase precoce da sua vida reprodutiva. Já em humanos, as pesquisas com ubiquitina podem ser utilizadas para problemas como infertilidade masculina, pois os marcadores epididimais para infertilidade humana têm seus epítopos marcados com ubiquitina na superfície do espermatozoide podem ser um alvo para um imun contraceptivo interferindo no processo de fertilização.



Odhiambo et al. (2011) publicaram que o objetivo da avaliação da qualidade do sêmen utilizada normalmente é prever o potencial de fertilidade de cada indivíduo de forma rápida. Com isso, a utilização de biomarcadores moleculares como a ubiquitina e lectina para avaliação da qualidade espermática pode eliminar a necessidade da avaliação visual por microscopia, que por muitas vezes são subjetivas. O autor destaca que a técnica para tal é simples e fácil de operar, utilizando apenas um citômetro de fluxo exclusivo para espermatozoides. Foram coletadas amostras de dois touros leiteiros e as amostras foram marcadas com anti-ubiquitina conjugada com fluorescência, sendo que o mesmo descreve que os anticorpos ligam-se exclusivamente à superfície do espermatozoide anormal e a lectina PNA liga-se à superfície do acrossomo danificado. Seus resultados revelaram que, padrões de espermatozoides ubiquitinados apareceram, quando havia defeitos de cauda e cabeça, e baixos níveis de ubiquitina e lectina quando os espermatozoides eram morfológicamente normais. Em espermatozoides normais com acrossomas danificados, a fluorescência da lectina PNA aumentou. Alguns espermatozoides com destacamento de acrossoma obviamente, só apareceram resíduos dos biomarcadores (Odhiambo et al. 2011). Concluíram, que há um potencial para aumentar a disseminação e adoção desses biomarcadores para análise de citometria de fluxo da qualidade espermática.

Odhiambo et al. (2014) examinou a qualidade dos ejaculados de 466 bezerros e através de técnicas como nanopurificação, pôde separar espermatozoides que apresentavam defeitos, de espermatozoides identificados como viáveis para posterior congelamento para que pudessem ser utilizados espermatozoides viáveis para fertilização *in vitro*.

Nesse mesmo, analisou a taxa de concepção em bovinos de corte inseminados com esse sêmen nanopurificado. Utilizou de técnicas como nanopurificação, separação magnética e imunofluorescência para confirmar a presença de ubiquitina nos espermatozoides pelas nanopartículas com anti-ubiquitina. Através da separação magnética, os autores sugeriram a possibilidade de separar os espermatozoides bioquimicamente anormais marcados com ubiquitina, o que melhoraria as taxas de fertilidade. Nesse caso, a nanopurificação poderia ser útil para a recuperação de espermatozoides de amostras de sêmen com baixa qualidade proveniente de estresse térmico por exemplo. Essa técnica poderia ajudar a prolongar a temporada de coleta durante vários meses.

Citometria de fluxo mostrou-se nesse estudo resultados positivos na avaliação da qualidade de sêmen, e podem ser utilizados como marcadores moleculares adequados para o controle de qualidade de espermatozoides. Com esse trabalho, Odhiambo et al. (2011) chegaram à conclusão que a marcação pela ubiquitina representaria um passo para melhor controle de qualidade de sêmen.

Em estudo com suínos, foram avaliadas duas proteínas marcadoras de fertilidade 15-lipoxigenase (15-LOX) e ubiquitina. Os autores analisaram 116 ejaculados de 18 javalis férteis durante oito meses. Os ejaculados foram analisados por meio de Western blot (semi-quantitativa), densitometria e citometria de fluxo, com anticorpos contra 15-LOX e UBI. Os dados foram correlacionados com as taxas de parição e o número total de leitões nascidos de 1754 serviços de inseminação artificial e foram comparados com uma análise de sêmen microscópica convencional. Esses dados sugeriram que a estimativa da fertilidade do javali pode ser alcançada dentro do grupo de javalis férteis pelo uso de marcadores de fertilidade. A citometria de fluxo pareceu mais informativa e mais prática do que o Western blot semi-quantitativo. Esta tecnologia poderia ser mais bem utilizada para a seleção de touros mais férteis em um programa de inseminação artificial (Lovercamp, K.W. et al., 2007).

Já em outro estudo, Vernocchi et al. (2014) utilizaram espermatozoides de felinos *felis catus* investigaram se ubiquitina poderia ser considerada um biomarcador de qualidade do sêmen do epidídimo de felinos. Foram utilizados 10 felinos sexualmente maduros e coletados espermatozoides epididimários após a orquiectomia. A morfologia e a integridade acrosomal dos espermatozoides foram correlacionadas com os padrões de ubiquitinação das proteínas em amostras de sêmen. Foi avaliada também a modificação das duas principais proteínas do citoesqueleto (actina e tubulina) e da proibitina, uma proteína envolvida no ciclo celular, que sofre ubiquitinação no sêmen bovino, para investigar a possível correlação de espermatozoides com sua morfologia.



A avaliação da ubiquitinação de proteínas do sêmen foi feita através da análise de Western Blot utilizando anticorpos específicos, denominados anti-ubiquitina, anti-actina, anti-tubulina e anti-proibitina. Cada amostra foi solubilizada em tampão de lise e quantificada em relação aos seus níveis de proteína pelo método de Bradford. Em seguida, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de sulfato de dodecilo por sonicação e centrifugação. Membrana, proteínas ubiquitinadas, actina, tubulina e proibitina foram detectadas por um imunoenensaio de quimioluminescência. Os resultados indicaram que o aumento dos espermatozoides ubiquitinados foi inversamente associado à concentração espermática, motilidade e morfologia normal, indicando que a ubiquitinação pode ser considerada como um biomarcador de baixa qualidade do sêmen. Nos gatos não houve correlações positivas ou negativas entre a qualidade do sêmen e ubiquitinação (Vernocchi et al. 2014).

Sutovsky et al. (2015) relatou que os espermatozoides defeituosos revestidos com ubiquitina apresentam carga positiva o que promove a sua aglutinação. A ubiquitinação superficial poderia proteger o epidídimo da resposta autoimune induzida por antígenos específicos de espermatozoides que não estão mais na membrana plasmática, o que poderia levar a uma infertilidade auto-imune. Com isso, a ubiquitinação foi sugerida para facilitar a remoção de espermatozoides defeituosos durante a passagem pelo epidídimo. Níveis elevados de ubiquitina no sêmen correlacionam-se com os resultados de fertilidade podendo ser medido através de anticorpos anti-ubiquitina e fluorocromos.

Outro estudo de Sutovsky et al. (2004) examinou as relações entre os níveis de ubiquitina nos espermatozoides e os parâmetros de uma população de homens de uma clínica de infertilidade com etiologias variadas. Esses autores compararam o sêmen de 28 pacientes com infertilidade com 15 férteis, a imunoreatividade da anti-ubiquitina foi medida através de imunoenensaio de espermatozoides-ubiquitina e as análises de sêmen foram realizadas por meio de análise de sêmen assistida por computador. Apresentaram correlações positivas entre espermatozoides ubiquitinados com porcentagem de morfologia anormal. Nos 28 pacientes inférteis houveram elevados níveis de espermatozoides ubiquitinados. Concluíram, portanto, que, quanto maior o nível de espermatozoides ubiquitinados, menores a concentração espermática, motilidade e porcentagem morfológica normal, o que faz da ubiquitina um bom biomarcador de qualidade para sêmen humano.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que a ubiquitina como biomarcador é uma provável ferramenta a ser utilizada e incluída para que a avaliação de fertilidade em machos torne-se mais precisa o que auxiliará nos métodos de avaliação de sêmen já existentes. Poderá viabilizar e aperfeiçoar a forma de analisar a fertilidade do macho, tanto em animais de produção como para tratamentos da infertilidade humana.

## LITERATURA CITADA

- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GARCIA, A.R. ET AL. Morfologia Espermática de Touros: Interpretação e impacto na fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, jan./mar. 2015.
- BARACT-PEREIRA, M.C. Degradação de Proteínas – Via Ubiquitina-Proteassoma 26S. (Ed) *Bioquímica de Proteínas Fundamentos Estruturais e Funcionais*. 1. ed. Viçosa, MG: ED UFV, 2014. p.169-190.
- HOU, C.-C.; YANG, W.-X. New insights to the ubiquitin-proteasome pathway (UPP) mechanism during spermatogenesis. *Molecular Biology and Reproduction*, v.40, n.4, p.3213–3230, 2013.
- LOVERCAMP, K.W.; SAFRANSKI, T.J.; FISCHER, K.A. et al. Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as fertility markers in boars. *Theriogenology*, v.67, n.4, p.704–718, 2007.
- ODHIAMBO, J.F.; SUTOVSKY, M.; DEJARNETTE, J.M. 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, p.1168-1176, 2011.
- ODHIAMBO, J.F.; DEJARNETTE, J.M.; GEARY, T.W. et al. Increased Conception Rates in Beef Cattle Inseminated with Nanopurified Bull Semen. *Biology of reproduction*, v.91, p.1-10, 2014.
- SIXT, S.U.; DAHLMANN, B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin — Incidence and relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1782, p.817-823, 2008.



- SUTOVSKY,P.;MORENO, R.;RAMALHO, J. et al. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science*.114, p.1665-1675, 2001.
- SUTOVSKY,P.;RUSS HAUSER,R.; SUTOVSKY, M. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Reproduction*. v.19, n.3 p.628±638, 2004.
- SUTOVSKY, P.; AARABI, M.; VIZUETE, A.M. et al. Negative biomarker based male fertility evaluation: sperm phenotypes associated with molecular - level anomalies. *Asian Journal of Andrology*.v.17, p554–560, 2015.
- VERNOCCHI,V.; MORSELLI, M.G.; VARESI, S. et al. Sperm ubiquitination in epididymal feline semen. *Theriogenology*.v.82, p.636-642, 2014.
- Yi,-J.Y.; MANANDHAR,G.; SUTOVSKY, M. et al. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-Activity Is Involved in Sperm Acrosomal Function and Anti-Polyspermy Defense During Porcine Fertilization. *Biology of reproduction*.v.77, p.780–793, 2007.
- ZAPATA, C.H.; MORALES, R.P.; JARA, G.M. Papel del sistema ubiquitina proteasoma en la spermatogenesis. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, v.2, n.4, p621-634, 2015.