

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS RADIAÇÕES ULTRAVIOLETAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS OVINAS

RAFAEL MIELKE BARBOSA¹; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER²;
DANIELE SENNA³, ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR³; CARINE DAHL CORCINI⁴

¹ Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – rafaelmielkeb@gmail.com

²Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – stelagheller@hotmail.com

³ Instituto de Ciências Biológicas – FURG varelafras@gmail.com

⁴Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos das radiações ultravioletas (UV) em animais submetidos a coleta de semen, para realização de protocolos de resfriamento e criopreservação tem despertado interesse da comunidade científica. As celulas espermáticas possuem baixas concentrações do aminoácido mycosporine-like (MAAS), que protege a célula contra danos do UV, com isso essas células possuem uma inferior capacidade de reparação do DNA, além de uma menor capacidade antioxidante.

Estudos mostraram que a UV causa danos celulares, como: efeitos indiretos no DNA, pela formação de compostos químicos como ROS (Espécie Reativa de Oxigênio), que interagem com o DNA podendo quebrar cadeias de DNA-proteínas; ligações cruzadas; sítios lábeis alcalinos e gerar a inativação de enzimas. Além disso, ROS interagem com lipídios da membrana plasmática promovendo a oxidação de ácidos graxos insaturados diminuindo a fluidize de membrana prejudicando os gametas de animais marinhos (THOMA, 1999; DAHMS & LEE, 2010), o que é inviável em células espermáticas submetidas a protocolos de refrigeração e criopreservação.

Com o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da UVB em doses abaixo do considerado ambiental, nas estruturas fisiológicas e morfológicas de espermatozoides ovinos sob parâmetro in vitro, quando submetidos a radiação e posterior refrigeração a 5°C por período de 48 horas.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados sete carneiros sem raça definida, sexualmente maduros e clinicamente saudáveis, sob mesmas condições de manejo e alimentação. Os animais foram submetidos a seis coletas de sêmen, pelo método de vagina artificial em presença da fêmea (Evans e Maxwell, 1997), totalizando 42 ejaculados. Apenas ejaculados que apresentaram motilidade maior ou igual a 70% e vigor maior ou igual a 3 (CBRA, 2013), foram utilizados no experimento. A concentração mínima foi de $2,0 \times 10^9$ espermatozoides viáveis/mL, sendo essa avaliação realizada pelo método de contagem em câmara de Neubauer (CBRA, 2013). As amostras foram diluídas em Tris Gema, na diluição final (4×10^7 espermatóides viáveis/mL) e submetidas a radiação UVB nos diferentes tempos: 0, 30s, 60s, 90s, 120s e 150s, correspondentes as seguintes doses: 0 – 2,199 mJ/cm² – 4,398 mJ/cm² – 6,597 mJ/cm² – 8,796 mJ/cm² – 10,995 mJ/cm²; todas abaixo da dose ambiental que é 558 J/cm². As avaliações foram em duplicatas e realizadas nas 0, 24 e 48h, mantidas em caixa condicionadora a temperatura de 5°C, sendo incubadas a temperatura de 37°C/10min antes das análises. Os espermatozoides foram avaliados nos parâmetros in vitro de: motilidade espermática total e progressiva pelosistema *computer assisted sperm*

analysis (CASA); integridade membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, integridade de DNA e acrossoma microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), utilizando o filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516-617 nm.

Análise Estatística realizada pelo teste ANOVA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da cinética espermática de células ovina no momento zero, 24 horas e 48 após a exposição à radiação UVB, e armazenados a 5°C em diferentes tempos avaliados pelo sistema *computer assisted sperm analysis* (CASA) estão definidos nas tabelas. A motilidade total, quando comparado ao controle teve uma redução nos tempos de 30s (2,199 mJ/cm²), 60s (4,398 mJ/cm²), 90s (6,597 mJ/cm²) e 120s (8,796 mJ/cm²), no período de 24 horas após a exposição ao UVB. Não apresentando maiores relevâncias estatísticas comparado ao controle referente a motilidade.

O restante das tabelas que trazem as avaliações em microscópio de fluorescência da qualidade das estruturas das células espermáticas após a exposição à radiação UVB em tempos diferentes, sendo que as duas últimas correspondem ao tempo de armazenamento refrigerado a 5°C no período de 24h s e 48hs após a exposição, respectivamente. Nas tabelas revelaram que não houve danos significativos no DNA. Em contrapartida, a UVB prejudicou o acrossoma, membrana e a mitocôndria, com maiores danos no maior tempo (150s =10,995 mJ/cm²). Os danos ocorreram somente no momento da exposição (Hora zero) (Tabela 1), mostrando que com o tempo de 24h (Tabela 2) e 48hs (Tabela 3) após a radiação e acondicionado a 5°C os danos se mantiveram e sem agravamento.

Tabela 1 – Avaliação de Motilidade Total, Motilidade Progressiva, Integridade de Acrossoma, Integridade de DNA, Integridade de Membrana e

| Variável | Tempo de Exposição (S) (%) | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Motilidade Total | | 73.4 ± 1.1 | 74.9 ± 1.2 | 76.2 ± 1.0 | 72.5 ± 1.4 | 75.9 ± 1.0 | 73.2 ± 1.1 |
| Motilidade Progressiva | | 49.8 ± 1.3 | 52.0 ± 1.5 | 52.8 ± 1.3 | 51.0 ± 1.6 | 53.3 ± 1.2 | 51.6 ± 1.4 |
| Integridade de Acrossoma | | 76.9 ± 1.8 | 77.2 ± 1.5 | 77.1 ± 2.3 | 73.6 ± 2.0 | 72.5 ± 5.7 | 76.2 ± 1.9 |
| Integridade de DNA | | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| Integridade de Membrana | | 43.9 ± 2.2 | 46.2 ± 2.4 | 48.4 ± 2.1 | 44.1 ± 2.5 | 48.7 ± 2.4 | 50.2 ± 1.5 |
| Funcionalidade de Mitocôndria | | 65.7 ± 2.4 | 68.6 ± 3.3 | 73.9 ± 3.1 | 69.4 ± 2.5 | 67.8 ± 3.0 | 64.5 ± 3.0 |

Funcionalidade de Mitocôndria das células espermáticas ovinas imediatamente após a exposição a diferentes doses de UVB.

Radiação 0s = 0; 30s=199 mJ/cm²; 60s= 4,398 mJ/cm²; 90s =6,597 mJ/cm²; 120s= 8,796mJ/cm²; 150s= 10,995 mJ/cm².

Tabela 2– Avaliação de Motilidade Total, Motilidade Progressiva, Integridade de Acrossoma, Integridade de DNA, Integridade de Membrana e Funcionalidade de Mitocôndria das células espermáticas ovinas, analisadas 24hr após a exposição a diferentes doses de UVB refriados a 5°C.

| Variável | Tempo de Exposição (S) | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| (%) | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| Motilidade Total | 83.0 ± 1.1 ^{ab} | 77.4 ± 2.1 ^c | 78.4 ± 1.8 ^{bc} | 76.8 ± 2.3 ^c | 77.1 ± 2.3 ^c | 84.2 ± 1.1 ^a |
| Motilidade Progressiva | 57.5 ± 1.7 ^{ab} | 53.9 ± 2.3 ^b | 55.0 ± 2.1 ^{ab} | 53.7 ± 2.3 ^b | 54.1 ± 2.3 ^b | 60.1 ± 1.9 ^a |
| Integridade de Acrossoma | 93.7 ± 1.2 ^a | 87.0 ± 2.0 ^{ab} | 83.4 ± 3.2 ^b | 85.8 ± 3.3 ^b | 87.4 ± 2.1 ^{ab} | 84.5 ± 2.2 ^b |
| Integridade de DNA | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| Integridade de Membrana | 58.7 ± 3.6 ^a | 55.5 ± 2.0 ^{abc} | 56.7 ± 2.9 ^{ab} | 50.1 ± 2.7 ^{bc} | 55.9 ± 3.0 ^{ab} | 47.9 ± 2.0 ^c |
| Funcionalidade de Mitocôndria | 81.2 ± 1.9 ^{ab} | 76.9 ± 3.4 ^{abc} | 84.2 ± 1.4 ^a | 80.6 ± 1.4 ^{ab} | 75.7 ± 3.0 ^{bc} | 71.4 ± 3.7 ^c |

Letras distintas na mesma linha apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-wallis ($P<0,05$).

Radiação 0s = 0; 30s=199 mJ/cm²; 60s= 4,398 mJ/cm²; 90s =6,597 mJ/cm²; 120s= 8,796mJ/cm²; 150s= 10,995 mJ/cm².

Tabela 3– Avaliação de Motilidade Total, Motilidade Progressiva, Integridade de Acrossoma, Integridade de DNA, Integridade de Membrana e Funcionalidade de Mitocôndria das células espermáticas ovinas, analisadas 48 hrs após a exposição a diferentes doses de UVB refriados a 5°C.

| Variável | Tempo de Exposição (S) | | | | | |
|-------------------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| (%) | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| Motilidade Total | 61.1 ± 1.7 | 60.8 ± 1.6 | 62.6 ± 1.4 | 59.2 ± 1.8 | 60.9 ± 1.7 | 63.9 ± 1.7 |
| Motilidade Progressiva | 42.4 ± 1.7 | 41.7 ± 1.6 | 43.6 ± 1.4 | 40.5 ± 1.8 | 41.0 ± 1.6 | 44.6 ± 1.7 |
| Integridade de Acrossoma | 63.6 ± 1.2 | 60.8 ± 4.5 | 63.6 ± 2.1 | 64.1 ± 1.7 | 61.4 ± 2.0 | 59.6 ± 1.4 |
| Integridade de DNA | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 |
| Integridade de Membrana | 42.1 ± 2.8 | 44.8 ± 2.8 | 45.8 ± 2.1 | 45.0 ± 1.0 | 45.9 ± 2.3 | 44.8 ± 2.6 |
| Funcionalidade de Mitocôndria | 55.1 ± 3.7 | 56.2 ± 3.3 | 54.6 ± 3.7 | 54.0 ± 2.6 | 54.9 ± 2.3 | 51.5 ± 2.2 |

Radiação 0s = 0; 30s=199 mJ/cm²; 60s= 4,398 mJ/cm²; 90s =6,597 mJ/cm²; 120s= 8,796mJ/cm²; 150s= 10,995 mJ/cm².

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, a célula espermática sofre interferência da radiação ultravioleta, com danos em sua estrutura funcional: funcionalidade de mitocondria, integridade de membrana e acrosoma, mesmo sem alterar sua motilidade e integridade de DNA. Assim, surge a possibilidade de se ampliar estudos sobre os efeitos de outras radiações ultravioletas na morfofisiologia espermáticas e como podem agir quando realizadas análises *in vitro* de diferentes estruturas celulares em conjunto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, M. A., MIKKOLA, R., RASIMUS, S., HOORNSTRA, D., SALIN, P., RAHKILA, R., HEIKKINEN, M., MATTILA, S., PELTOLA, J., KALSO, S., SALKINOJA-SALONEN, M.. Boarspermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. *Toxicology in Vitro*. Vol. 24: p. 2041–2052. 2010.
- ARRIGO, K. R.. Impact of ozone depletion on phytoplankton growth in the Southern Ocean: large spatial scale and temporal variability. *Mar. Ecol. Progr. S.* Vol. 114: p. 1–12. 1994.
- DAHMS, H., LEE, J.. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology*. Vol. 97: p. 3–14. 2010.
- KARENTZ, D., DUNLAP, W. C., BOSCH, I.. Temporal and spatial occurrence of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in tissues of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* during springtime ozone-depletion. *Mar Biol.* Vol. 129: p. 343–353. 1997.
- THOMA, F.. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J.* Vol. 18: p. 6585–6598. 1999.
- VICENTE-CARRILLO, A., EDEBERT, I., GARSIDE, H., COTGREAVE, I., RIGLER, R., LOITTO, V., MAGNUSSON, K. E., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.. Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: Implications for drug toxicity testing and the 3R principles. *Toxicology in Vitro*. Vol. 29 (3): p. 582-591. 2015.