

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

RAFAEL MIELKE BARBOSA<sup>1</sup>; STELA MARI MENEGHELLO GHELLER<sup>2</sup>;  
DANIELE SENNA<sup>3</sup>, ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR<sup>3</sup>; CARINE DAHL  
CORCINI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – [rafaelmielke@gmail.com](mailto:rafaelmielke@gmail.com)

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – [stelagheller@hotmail.com](mailto:stelagheller@hotmail.com)

<sup>3</sup> Instituto de Ciências Biológicas – FURG [varelajras@gmail.com](mailto:varelajras@gmail.com)

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – [corcinicd@gmail.com](mailto: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 células 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 fluidez 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 ( $4 \times 10^7$  espermatozoides 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/cm<sup>2</sup> – 4,398 mJ/cm<sup>2</sup> – 6,597 mJ/cm<sup>2</sup> – 8,796 mJ/cm<sup>2</sup> – 10,995 mJ/cm<sup>2</sup>; todas abaixo da dose ambiental que é 558 J/cm<sup>2</sup>. 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 pelo sistema *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/cm<sup>2</sup>), 60s (4,398 mJ/cm<sup>2</sup>), 90s (6,597 mJ/cm<sup>2</sup>) e 120s (8,796 mJ/cm<sup>2</sup>), 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 e 48h 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/cm<sup>2</sup>). Os danos ocorreram somente no momento da exposição (Hora zero) (Tabela 1), mostrando que com o tempo de 24h (Tabela 2) e 48h (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

VariávelTempo 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/cm<sup>2</sup>; 60s= 4,398 mJ/cm<sup>2</sup>; 90s =6,597 mJ/cm<sup>2</sup>; 120s= 8,796mJ/cm<sup>2</sup>; 150s= 10,995 mJ/cm<sup>2</sup>.

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 resfriados a 5°C.

VariávelTempo de Exposição (S) (%)	0	30	60	90	120	150
Motilidade Total	83.0 ± 1.1 <sup>ab</sup>	77.4 ± 2.1 <sup>c</sup>	78.4 ± 1.8 <sup>bc</sup>	76.8 ± 2.3 <sup>c</sup>	77.1 ± 2.3 <sup>c</sup>	84.2 ± 1.1 <sup>a</sup>
Motilidade Progressiva	57.5 ± 1.7 <sup>ab</sup>	53.9 ± 2.3 <sup>b</sup>	55.0 ± 2.1 <sup>ab</sup>	53.7 ± 2.3 <sup>b</sup>	54.1 ± 2.3 <sup>b</sup>	60.1 ± 1.9 <sup>a</sup>
Integridade de Acrossoma	93.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	87.0 ± 2.0 <sup>ab</sup>	83.4 ± 3.2 <sup>b</sup>	85.8 ± 3.3 <sup>b</sup>	87.4 ± 2.1 <sup>ab</sup>	84.5 ± 2.2 <sup>b</sup>
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 <sup>a</sup>	55.5 ± 2.0 <sup>abc</sup>	56.7 ± 2.9 <sup>ab</sup>	50.1 ± 2.7 <sup>bc</sup>	55.9 ± 3.0 <sup>ab</sup>	47.9 ± 2.0 <sup>c</sup>
Funcionalidade de Mitocôndria	81.2 ± 1.9 <sup>ab</sup>	76.9 ± 3.4 <sup>abc</sup>	84.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	80.6 ± 1.4 <sup>ab</sup>	75.7 ± 3.0 <sup>bc</sup>	71.4 ± 3.7 <sup>c</sup>

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

Radiação 0s = 0; 30s=199 mJ/cm<sup>2</sup>; 60s= 4,398 mJ/cm<sup>2</sup>; 90s =6,597 mJ/cm<sup>2</sup>; 120s= 8,796mJ/cm<sup>2</sup>; 150s= 10,995 mJ/cm<sup>2</sup>.

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 resfriados a 5°C.

VariávelTempo 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/cm<sup>2</sup>; 60s= 4,398 mJ/cm<sup>2</sup>; 90s =6,597 mJ/cm<sup>2</sup>; 120s= 8,796mJ/cm<sup>2</sup>; 150s= 10,995 mJ/cm<sup>2</sup>.



#### 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 mitocôndria, integridade de membrana e acrossoma, 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.*, 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.