

## **Avaliação da cinética espermática ovina expostas a diferentes concentrações de radiações ultravioletas**

**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>**

*1 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – [rafaelmielkeb@gmail.com](mailto:rafaelmielkeb@gmail.com)*

*2 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – [stelaqheller@hotmail.com](mailto:stelaqheller@hotmail.com)*

*3 Instituto de Ciências Biológicas – FURG [varelajras@gmail.com](mailto:varelajras@gmail.com)*

*4 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – [corcincid@gmail.com](mailto:corcincid@gmail.com)*

***Agradecimento a CAPES e o CNPq pelas bolsas de estudo do primeiro, segundo e terceiro autor.***

### **1. INTRODUÇÃO**

Os efeitos das radiações ultravioletas (UV) em animais submetidos a coleta de sêmen, 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 dos efeitos dos raios ultravioletas (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.

Ainda pode-se ter a interferência dos ROS através da integridade do acrossoma impedindo a incorporação do espermatozoide no gameta feminino (SEAYER et al., 2009), e de mitocôndria da qual é altamente sensível e fonte de energia para célula localizada na peça intermediária do espermatozoide. Com isso devido a danos a estes possíveis locais previamente definidos existe a avaliação de microscopia da cinética espermática que estima através de parâmetros morfológicos da célula, possíveis irregularidades e atualmente servem como constituinte de exame andrológico de machos e de utilização para os processos de criopreservação de sêmen.

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 24 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 e 24h, 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, distância linear progressiva e velocidade linear progressiva pelo sistema computer assisted sperm analysis (CASA); integridade membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria e integridade de acrossoma através do 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. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da cinética espermática avaliados no CASA não apresentaram nenhuma diferença estatística, tanto nas concentrações de 199 mJ/cm<sup>2</sup>; 4,398 mJ/cm<sup>2</sup>; 6,597 mJ/cm<sup>2</sup>; 8,796mJ/cm<sup>2</sup>; 10,995 mJ/cm<sup>2</sup> tanto imediatamente quanto 24h após exposição a radiação. Este dado indicaria que a célula espermática não sofreria nenhum tipo de dano quando exposta a radiação, pois pela avaliação morfológica da célula não se tem diferença como seria o esperado. Quando em dano de mitocôndria induz que houvesse variação de motilidade total e progressiva e distância linear progressiva. Já quando houvesse dano em acrossoma esperaria-se danos principalmente na amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide. No caso de dano na integridade de membrana poderia haver variação na distância e velocidade linear progressiva, variação no batimento flagelar cruzado e motilidade progressiva.

Tabela 1 – Avaliação de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Distância linear progressiva (DSL), Velocidade linear progressiva (VSL) Integridade de Acrossoma (IA), Integridade de Membrana (IM) e Funcionalidade de Mitocôndria (FM) das células espermáticas ovinas imediatamente após a exposição a diferentes doses de UVB.

Variável	Tempo de Exposição (S)					
	0	30	60	90	120	150
MT*(%)	83.0 ± 1.1	77.4 ± 2.1	78.4 ± 1.8	76.8 ± 2.3	77.1 ± 2.3	84.2 ± 1.1
MP*(%)	57.5 ± 1.7	53.9 ± 2.3	55.0 ± 2.1	53.7 ± 2.3	54.1 ± 2.3	60.1 ± 1.9
DSL*(µm)	16.1 ± 0.5	16.8 ± 0.6	16.4 ± 0.6	16.2 ± 0.6	16.7 ± 0.6	16.4 ± 0.6
VSL*(µm/s)	37.5 ± 1.1	39.0 ± 1.2	37.8 ± 1.3	37.2 ± 1.3	38.7 ± 1.3	38.4 ± 1.3
IA (%)	93.7 ± 1.2	87.0 ± 2.0	83.4 ± 3.2	85.8 ± 3.3	87.4 ± 2.1	84.5 ± 2.2
IM (%)	58.7 ± 3.6	55.5 ± 2.0	56.7 ± 2.9	50.1 ± 2.7	55.9 ± 3.0	47.9 ± 2.0
FM (%)	81.2 ± 1.9	76.9 ± 3.4	84.2 ± 1.4	80.6 ± 1.4	75.7 ± 3.0	71.4 ± 3.7

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>. \*Avaliações de Cinética Espermática

Já na avaliação na microscopia de epifluorescência notou-se que houve variação tanto na integridade de membrana e de acrossoma, e de funcionalidade de mitocôndria imediatamente a exposição a radiação, com destaque na concentração de 10,995 mJ/cm<sup>2</sup>. No período de 24h após a exposição a radiação os tratamentos não tiveram diferença estatística comparada ao controle, percebendo que o efeito da radiação ficou estabilizado ao longo do período armazenado a 5°C.

Tabela 2– Avaliação de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), Distância linear progressiva (DSL), Velocidade linear progressiva (VSL) Integridade de Acrossoma (IA), Integridade de Membrana (IM) e Funcionalidade de Mitocôndria (FM) das células espermáticas ovinas analisadas 24h após exposição a diferentes doses de UVB resfriados a 5°C.

Variável	Tempo de Exposição (S)					
	0	30	60	90	120	150
MT*(%)	73.4 ± 1.1	74.9 ± 1.2	76.2 ± 1.0	72.5 ± 1.4	75.9 ± 1.0	73.2 ± 1.1
MP*(%)	49.8 ± 1.3	52.0 ± 1.5	52.8 ± 1.3	51.0 ± 1.6	53.3 ± 1.2	51.6 ± 1.4
DSL*(µm)	18.1 ± 0.4	18.3 ± 0.5	19.0 ± 0.4	19.5 ± 0.4	19.2 ± 0.5	20.0 ± 0.6
VSL*(µm/s)	42.3 ± 1.0	42.6 ± 1.1	44.1 ± 0.9	45.1 ± 1.0	44.3 ± 1.1	45.2 ± 1.3
IA (%)	76.9 ± 1.8	77.2 ± 1.5	77.1 ± 2.3	73.6 ± 2.0	72.5 ± 5.7	76.2 ± 1.9
IM (%)	43.9 ± 2.2	46.2 ± 2.4	48.4 ± 2.1	44.1 ± 2.5	48.7 ± 2.4	50.2 ± 1.5
FM (%)	65.7 ± 2.4	68.6 ± 3.3	73.9 ± 3.1	69.4 ± 2.5	67.8 ± 3.0	64.5 ± 3.0

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>. \*Avaliações de Cinética Espermática

#### 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 suas características cinéticas e estrutura morfológica da célula espermática. Assim, surge a possibilidade de se ampliar estudos sobre os efeitos de outras radiações ultravioletas na morfofisiologia espermática 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 detectingtoxicsubstances in indoor dustandaerosols. *Toxicology in Vitro*. Vol. 24: p. 2041–2052. 2010.

ARRIGO, K. R..Impactof ozone depletiononphytoplanktongrowth in the Southern Ocean: largespentialscaleand temporal variability. *Mar. Ecol. Progr.*, Vol. 114: p. 1-12. 1994.

DAHMS, H., LEE, J.. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effectsand responses. *AquaticToxicology*. Vol. 97: p. 3–14. 2010.

SEAVER, R.W., FERGUSON, G. W., GEHRMANN, W. H., MISAMORE, M. J.. Effects of Ultraviolet Radiation on Gametic Function During Fertilization in Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*). *Journal of Shellfish Research*. Vol. 28, I. 3: p. 625-633, 2009.

KARENTZ, D., DUNLAP, W. C., BOSCH, I.. Temporal andspatialoccurrenceof UV-absorbingmycosporine-like amino acids in tissuesoftheAntarcticseaurchin*Sterechinusneumayeri*duringspringtime 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, et al.. 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.