

AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE ESPERMATOZOIDE CAPRINO CRIOPRESERVADO, ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

*(Ultrastructural evaluation of cryopreserved caprine
sperm through transmission electronic microscopy)*

Ney Rômulo de Oliveira PAULA^{1*}; Clarissa de Castro e BRAGA²; Laércio Fontinele
Bandeira de MACÊDO³; Letícia Soares de Araújo TEIXEIRA²; Kenney de
Paiva PORFIRIO⁴; Ana Lys Bezerra Barradas MINEIRO¹;
Janaina de Fátima Saraiva CARDOSO¹

¹Dpto de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário
Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina/PI. CEP: 64.049-550.

*E-mail: neyromulo@ufpi.edu.br

ABSTRACT

The ultrastructure evaluation allows the analysis of the sperm cell in a subcellular proportion that is not observed in optical microscopy. Transmission electron microscopy (MET) is a tool used to determine the size and shape of inorganic and biological structures based on the interaction of electrons incident on matter. In this sense, with the use of MET, the objective was to evaluate the ultrastructural changes after the semen manipulation, mainly in the freeze-thaw process, which were not observed in tests using optical microscopy, that is, the morphological integrity of the membranes and goat sperm organelles. The evaluation took place at the Institute of Biosciences of the University of Brasília (UnB). The semen straws were thawed and washed in PBS. Then, they were centrifuged and fixed, contrasted in bloc and subjected to dehydration. The samples were placed for polymerization and ultrathin cuts were made and stored until the time of MET evaluation. In the ultrastructural analyzes by MET in the present work, no harmful actions occurred in either the control or experimental groups. The head regions (plasma membrane and acrosome) remained preserved, with no change in DNA. In conclusion, MET is especially useful tool for cell evaluation.

Key words: animal reproduction, electron microscopy, goat, small ruminants.

INTRODUÇÃO

A avaliação da ultraestrutura da célula permite a análise espermática em uma proporção subcelular que não é observada em microscopia óptica. Essa avaliação é importante para observar possíveis alterações estruturais dos componentes do espermatozoide que possam ocorrer na escala nanométrica. Nesta escala, as alterações somente podem ser observadas em equipamentos mais precisos, como o microscópio eletrônico de transmissão (SOARES *et al.*, 2011).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta utilizada para determinar o tamanho e a forma das estruturas inorgânicas e biológicas baseada na interação dos elétrons incidentes sobre a matéria (SILVA, 2010).

A utilização da MET como técnica de avaliação espermática é substancialmente menor que as demais avaliações espermáticas, devido principalmente ao custo operacional da técnica. No entanto, é uma técnica de grande importância devido à possibilidade de avaliação das estruturas da célula espermática em uma escala muito pequena, favorecendo a visualização de alterações não observadas por meio dos testes comuns (SILVA, 2010).

Os testes possibilitaram a avaliação de modificações ultraestruturais após a manipulação do sêmen, principalmente no processo de congelação-descongelação, que não eram observados em testes utilizando microscopia óptica (SILVA *et al.*, 2013). Em estudos realizados por Moura *et al.* (2013), a avaliação qualitativa da ultraestrutura dos espermatozoides por meio da MET possibilitou identificar danos espermáticos que não seriam perceptíveis na análise por microscopia óptica (SILVA *et al.*, 2009).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo a utilização de avaliações laboratoriais que permitam analisar as funções espermáticas associada à avaliação ultraestrutural (membranas e organelas) do espermatozoide e fazer uma análise das células espermáticas após a descongelação.

MATERIAL E MÉTODOS

Local experimental e comissão de ética

A integridade morfológica das membranas e organelas dos espermatozoides pós-descongelação foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), no Instituto de Biociências da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Estadual do Piauí (CEUA/UESPI), protocolo nº 07614/2018.

Delineamento experimental

O protocolo utilizado foi o de Burgess *et al.* (2001), em que as palhetas de sêmen de caprinos foram descongeladas a 37 °C e lavadas em PBS a 37 °C. Em seguida, foram centrifugadas a 5.000g e fixadas em glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (0,1M). Foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio em tampão fosfato, contrastadas em bloco com acetato de uranila (2,5%), submetidas à desidratação em séries crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 15min. em cada etapa. As amostras, posteriormente foram mantidas por 12 horas em mistura acetona e resina Epon. As amostras foram transferidas para resina pura onde ficaram por mais 12 horas. Finalmente foram incluídas em resina Epon (Sigma, St. Louis, MO, USA) em suporte de silicone e colocadas para polimerização em estufa a 65 °C. Foram realizados cortes ultrafinos em ultramicrótomo EM UC6 (Leica, Wetzlar, Alemanha) em corte de 70nm.

Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila (5%) por 1:15min. e citrato de chumbo por 4min., e estocado em dissecador até o momento da avaliação em MET (JEOL, modelo JEM 1011, Tóquio, Japão) equipado com câmara CCD Gatan (Califórnia, EUA).

Análise Estatística

As análises da avaliação espermática por microscopia eletrônica de transmissão foram apresentadas de forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais destaques ultraestruturais verificados pela avaliação espermática por microscopia eletrônica de transmissão, estão descritos nas Figuras 1 e 2.

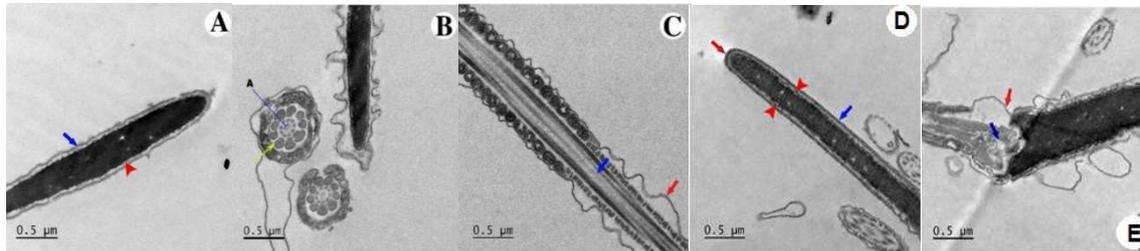


Figura 01: Análise ultraestrutural, em microscopia eletrônica de transmissão, de espermatozoides caprinos criopreservados em ACP-101c + 2,5% de gema de ovo de *Gallus gallus domesticus*. (Fonte: Arquivo pessoal, 2020)

De acordo com a Fig. 01, podemos descrever os principais achados ultraestruturais verificados: **A** = Membrana plasmática (seta), região de acrossoma e cromatina (cabeça de seta) bem preservadas; **B** = transição da peça intermediária para o flagelo, colar mitocondrial (seta) preservado com organelas intactas e axonema (letra A), preservado, com elementos do citoesqueleto visíveis e de aspecto usual; **C** = região do flagelo com disposição dos microtúbulos (seta azul) de aspecto usual. Deslocamento da membrana compatível com região terminal do flagelo (seta vermelha). Maior grau de preservação; **D** = cabeça do sptz, em corte transversal, com a membrana (seta azul) e acrossoma (seta vermelha) com aspectos preservados. Cromatina com deslocamento de membrana (cabeça de setas), com pontos eletrólucidos indicando perda de material. **E** = região de centríolo com alterações ultraestruturais indicadas pelo descolamento da membrana (seta vermelha), regiões anormais eletrólucidas dentro do centríolo (seta azul) com estruturas membranares circulares e mitocôndrias laterais degeneradas.

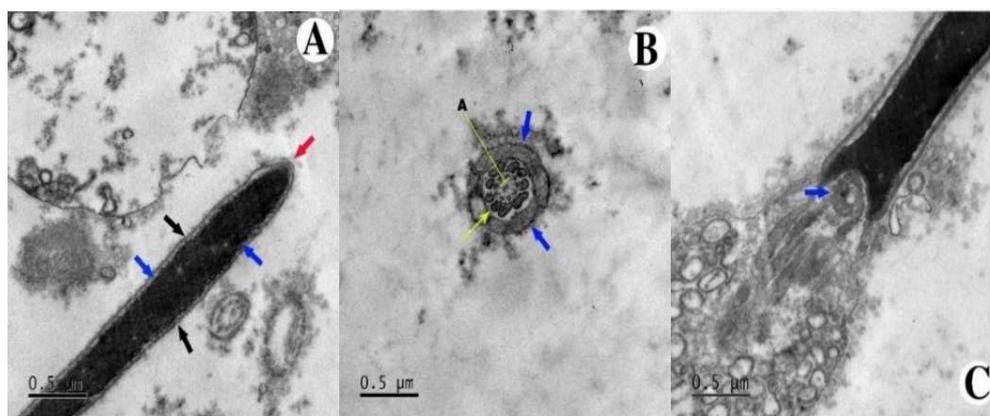


Figura 02: Análise ultraestrutural de espermatozoides caprinos pós-descongelamento criopreservados em ACP-101c adicionado de 10% de gema de ovo de *Numida meleagris*, através de microscopia eletrônica de transmissão.

(Fonte: Arquivo pessoal, 2020)

Na Fig. 02, verifica-se os seguintes achados ultraestruturais: **A** = região da cabeça preservada, membranas íntegras (setas azuis e pretas) e acrossoma (seta vermelha) preservado. Cromatina íntegra com aspecto ultraestrutural normal em corte longitudinal; **B** = região de transição entre a peça intermediária e flagelo. Mitocôndrias preservadas (setas e axonenema com ultraestrutura, corte transversal indicado pela letra A); **C** = centríolo parcialmente preservado em corte longitudinal. Região abaixo do centríolo com pequenas vesículas indicativas de degeneração celular e perda de estabilidade estrutural da cauda do espermatozoide.

CONCLUSÕES

Portanto, a análise ultraestrutural dos espermatozoides caprinos criopreservados com ACP-101c[®] com gema de ovo de *Gallus gallus domesticus* ou com gema de ovo de *Numida meleagris*, demonstraram que ambas as constituições dos crioprotetores preservam tanto as membranas quanto às organelas espermáticas de modo satisfatório. A avaliação da integridade das diferentes membranas (citoplasmática, acrossomal e nuclear), assim como a avaliação da integridade das organelas podem ser verificadas em detalhes com o uso da MET, o que a torna uma importante técnica para a avaliação de novos diluidores/crioprotetores utilizados para o sêmen caprino.

REFERÊNCIAS

- BURGESS, C.M.; BREDL, J.C.S.; PLUMMER, J.M.; INGLATERRA, G.C. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.57, supl.1, p.357-363, 2001.
- ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology*, v.76, n.1, p.23-32, 2011.
- FRANCO, J.G.Jr.; MAURI, A.L.; PETERSEN, C.G.; MASSARO, F.C.; SILVA, L.F.I.; FELIPE, V.; CAVAGNA, M.; PONTES, A.; BARUFFI, R.L.R.; OLIVEIRA, J.B.A.; VAGNINI, L.D. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v.35, n.1, p.46-51, 2011.
- LAVOLPE, M.; LORENZI, D.; GRECO, E.; NODAR, F.; SEDÓ, C. A. Relationship Between Sperm DNA Fragmentation and Nuclear Vacuoles. *JBRA Assisted Reproduction*, v.19, n.2, p.70-74, 2015.
- MOURA, C.S.; NUNES, A.K.S.; SILVA, B.S.; PEIXOTO, C.A.; SILVA, A.R.; SILVA, S.V.; GERRA, M.M.P. Efeito da temperatura de descongelamento na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, n.4, p.1057-1064, 2013.

SILVA, E.C.B. Efeito da adição de diferentes crioprotetores e antioxidantes na criopreservação do sêmen de ovinos da raça Santa Inês. 2010. 95p. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; CASTELO, T.S.; LIMA, G.L.; SILV, A.M.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. *Cryobiology*, v.67, n.1, p.50-55, 2013.

SILVA, R.A.C.; SOUZA, T.O.; DIAS, L.P.; ANDRADE, T.J.A.S. Ação do extrato metanólico da Moringa oleifera sobre o crescimento micelial de fitopatógenos. In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Inovação Tecnológica, 4., 2009, Belém-PA. Anais... Belém: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Inovação Tecnológica, 2009.

SOARES, A.T.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; LEMOS, P.F.B.A.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutathione reduzida. *Ciência Rural*, v.41, n.11, p.1991-1997, 2011.