



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS: FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA



**EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B NA MORFOFISIOLOGIA DA
CÉLULA ESPERMÁTICA DE OVINOS DURANTE O ARMAZENAMENTO A
5º C.**

DANIELE SOUZA DE SENNA CESTARO

Orientadora: Prof^a. Dr^a *Carine Dahl Corcini*

Rio Grande, julho de 2016.

**EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B NA MORFOFISIOLOGIA DA
CÉLULA ESPERMÁTICA DE OVINOS DURANTE O ARMAZENAMENTO A
5º C.**

DANIELE SOUZA DE SENNA CESTARO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas, Fisiologia Animal
Comparada da Universidade Federal
do Rio Grande, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Carine Dahl Corcini

Rio Grande, julho de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
INTRODUÇÃO GERAL	8
Radiação Ultravioleta B	8
Sêmen Ovino	10
Motilidade espermática	12
Funcionalidade Mitocondrial	13
Integridade de Membrana.....	14
Integridade do DNA	15
Acrossoma.....	16
Redução da Temperatura Espermática	17
OBJETIVOS	19
Objetivo Geral.....	19
Objetivos Específicos.....	19
ARTIGO	20
Resumo.....	21
1. Introdução	Erro! Indicador não definido.
2. Materiais e Métodos	23
3. Resultados	28
4. Discussão.....	30
5. Agradecimento	33
6. Declaração de Interesse	34
7. Referências	36
8. Tabelas	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERENCIAS GERAIS	52

*Onde você vê um obstáculo,
Alguém vê o término da viagem
E o outro vê uma chance de crescer.*

*Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.*

*Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...*

*Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.*

*Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro comprehende as limitações do companheiro,
Percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.*

*E que é inútil querer apressar o passo do outro,
A não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.*

*"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura".*

FERNANDO PESSOA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sem ele não chegaria onde sempre sonhei.

Aos meus pais, Rubens e Carmen que sempre me ensinaram a dar valor aos estudos e me incentivarem a nunca desistir. Por estarem junto em todos os momentos da minha caminhada, sendo sempre meu porto seguro.

Ao meu marido Leonardo pelo apoio que encontro sempre, cumplicidade, amor. À minha pequena/grande e doce Sophia, que deu um sacode e acelerou tudo do meu mestrado. Amo demais!

À minha orientadora pelo carinho e atenção que sempre me recebeu, pela ajuda para agilizar meu experimento porque a Sophia já estava quase nascendo.

Ao professor Antônio Sergio sempre disposto a me auxiliar sempre que precisava.

Aos docentes da FURG, Ana Votto, Daza Filgueira e Marcelo Vargas que me emprestaram as lâmpadas de UVA, UVB e IR adiando experimentos de seus orientados para que eu pudesse seguir meu experimento. Além disso, obrigada Ana e Daza a me ajudarem a entender e aplicar os cálculos das doses.

À UFPel por me ceder o espaço do laboratório e os equipamentos para a realização dos experimentos.

Às colegas que conheci na UFPel, Alessandra da Silva e Stela Gheller, foram minha base durante a experimentação. Muito obrigada pelo trabalho de vocês, pela dedicação, por tudo que me ensinaram, desculpem os sábados que ao invés de descansarem tinham alguma análise do meu experimento para terminar. Eternamente grata a vocês!

Aos colegas que sempre estiveram dispostos a me ajudar de alguma forma: Estela Fernandes, Diego Martins, Jessica Ribeiro.

Às técnicas do laboratório de histologia da FURG por ajudarem na obtenção dos materiais de consumo para dar continuidade aos experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, por todo auxílio na construção de meu conhecimento.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigada!!!

RESUMO GERAL

Apesar de animais mamíferos apresentarem reprodução interna, a aplicação de tecnologias com a utilização de gametas pode leva-los a receberem alguma quantidade de radiação ultravioleta B durante sua manipulação. O sêmen é normalmente acondicionado em recipientes transparentes que permitem a passagem da radiação podendo alterar a função espermática. Além disso, o processo de resfriamento para armazenagem de gametas causa diminuição da viabilidade, fazendo uma somatória de situações que afetam a integridade e qualidade espermática. O objetivo desde estudo é avaliar os efeitos da radiação ultravioleta B sobre a morfofisiologia da célula espermática de ovinos. Foram utilizadas doses de sêmen fresco de 7 animais, em 6 coletas, totalizando 42 ejaculados. As amostras foram diluídas com Tris Gema e receberam radiação UVB em tempos diferentes: 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. As avaliações foram em duplicatas e realizadas imediatamente após a exposição à radiação, em seguida as amostras foram conservadas em caixa condicionadoras a 5° C para análise em 24 e 48 horas após a exposição. Os espermatozoides foram avaliados quanto à: motilidade no sistema *computer assisted sperm analysis* (CASA); integridade membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, integridade de DNA e acrossoma em microscópio de fluorescência. A exposição ocasionou danos nas seguintes estruturas: acrossoma, membrana e mitocôndria. Não observou-se dano ao DNA em nenhuma dose de radiação. O tempo de 24h e 48h após a exposição à UVB condicionado em 5° C não se observou perdas na qualidade *in vitro* das estruturas celulares. A cinética espermática ficou alterada em vários aspectos na zero hora, principalmente na motilidade total e progressiva que em doses menores diminuiu a motilidade e na maior dose ficou igual ao controle na zero hora. Assim, a UVB promoveu uma diminuição da qualidade das estruturas espermáticas sem interromper a motilidade.

INTRODUÇÃO GERAL

Radiação Ultravioleta B

A camada de ozônio realiza uma proteção contra as radiações eletromagnéticas emitidas pelo sol. Porém, com a rarefação desta camada, devido ao aumento da ação antrópica, níveis altos de radiação ultravioleta (UVR) conseguem atingir a superfície terrestre, podendo prejudicar os sistemas biológicos (WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION, 1994; BONAVENTURA et al., 2006). As UVR agem diferentemente nos sistemas biológicos.

Os efeitos das UVRs em animais com reprodução externa tem despertado o interesse da comunidade científica. Os espermatozoides são mais sensíveis as UVRs porque faltam aminoácidos, como o mycosporine-like (MAAS), que protegem contra UVR, possuem uma inferior capacidade de reparação do DNA e uma menor capacidade antioxidante devido ao pequeno volume citoplasmático, possuem uma maior área de superfície em relação ao volume e níveis elevados de ácidos poli-insaturados (PUFAs) nas suas membranas intracelulares, tornando-os predispostos a peroxidação lipídica (LPO) (KARENTZ et al., 1997;AITKEN et al., 1998; DONNELLY et al., 2000; ADAMS et al., 2001; LU & WU, 2005a). Acredita-se que a UVC (200-290 nm), por reagir com moléculas de ozônio não consegue, ou apenas níveis mínimos ultrapassam essa barreira, logo é pouco relevante ecologicamente (DAHMS & LEE, 2010). A UVA (320-400 nm) interage muito pouco com a camada de ozônio, sendo que cerca de 90% atinge a superfície terrestre (KEVIN, 1994). Estudos mostraram que a UVA 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).

A UVB (290-320 nm) é mais nociva em relação à UVA, pois causa danos diretamente no DNA, induz a formação de dímeros de pirimidinas, aumenta o estresse oxidativo, ativa genes do ciclo celular que levam a apoptose (LESSER, 2006; DAHMS & LEE, 2010). Em minhocas, a irradiação ultravioleta A e B reduziu em até 70% a fertilidade dos casulos, diminuindo a sobrevivência dos mesmos (HAMMAN et al., 2003), devido ao aumento da produção de ROS durante a oxidação de lipídios nas células, sendo que a oxidação dos ácidos graxos essenciais pode perturbar a estrutura fina e função das membranas celulares (MISRA et al., 2005).

Efeitos prejudiciais à reprodução também ocorreram em mexilhão *Dreissena polymorpha* de água doce. Óvulos e espermatozoides irradiados com UVB e inseminados tiveram uma paralisação ou atraso da meiose, alteração na integridade do acrosoma e a incorporação do espermatozoide no citoplasma do ovo foram diminuídas (SEAVER et al., 2009). Em espermatozoides de ouriço-do-mar *Sphaerechinus granularis* a UVB causou a diminuição da capacidade de fertilização e nos ovos levaram ao atraso do desenvolvimento com as consequentes anomalias na morfologia embrionária (NAHON et al., 2009).

Estudos com gametas de mamíferos expostas a radiações UVB ainda são escassos. Isso se deve ao fato da fecundação ocorrer internamente, logo à possibilidade dos gametas terem contato com qualquer tipo de radiação é nula. Porém, com o aumento de uso de métodos de criopreservação de gametas para uso posterior em biotécnicas de

reprodução, principalmente os espermatozoides que durante a coleta, são colocados em recipiente transparentes e assim serem expostos à radiação UVB podendo ocorrer danos na sua morfologia e fisiologia que poderão acarretar em comprometimento do processo de fertilização. Assim, é necessária a avaliação do manejo do sêmen logo após a coleta para descobrir as causas da recorrência de perda de qualidade espermática durante a utilização em técnicas reprodutivas, logo a UVB pode ser um dos prováveis vetores que diminua o êxito nesses procedimentos mesmo em doses muito baixas.

Além disso, alguns pesquisadores estão utilizando espermatozoides como fonte alternativa de material biológico para a diminuição ou substituição do uso de animais como cobaias em investigações experimentais (VICENTE-CARRILLO et al., 2015). Os espermatozoides são altamente sensíveis, sua fisiologia com mitocôndrias concentradas na peça intermediária permite estudos sobre o seu funcionamento e como são afetadas pelas perturbações, possuindo a mesma sensibilidade mitocondrial que as células somáticas (ANDERSSON et al., 2010; VICENTE-CARRILLO et al., 2015).

Sêmen Ovino

A principal estrutura presente no sêmen é o espermatozoide, uma célula independente que apresenta motilidade que permite o deslocamento dentro do trato reprodutivo feminino, no caso de reprodução interna, até o encontro com o óóbito. Os espermatozoides possuem três regiões distintas: cabeça, peça intermediária e cauda (Fig.1). Na cabeça espermática está o material genético do progenitor (DNA) e o acrosoma, estrutura de suma importância na interação óóbito-espermatozoide. As mitocôndrias ficam na peça intermediária, elas produzem a energia que ativam o

movimento do flagelo na cauda (RUSSEL et al., 1990; YANAGIMACHI, 1994; CHRISTOVAN et al., 2004).

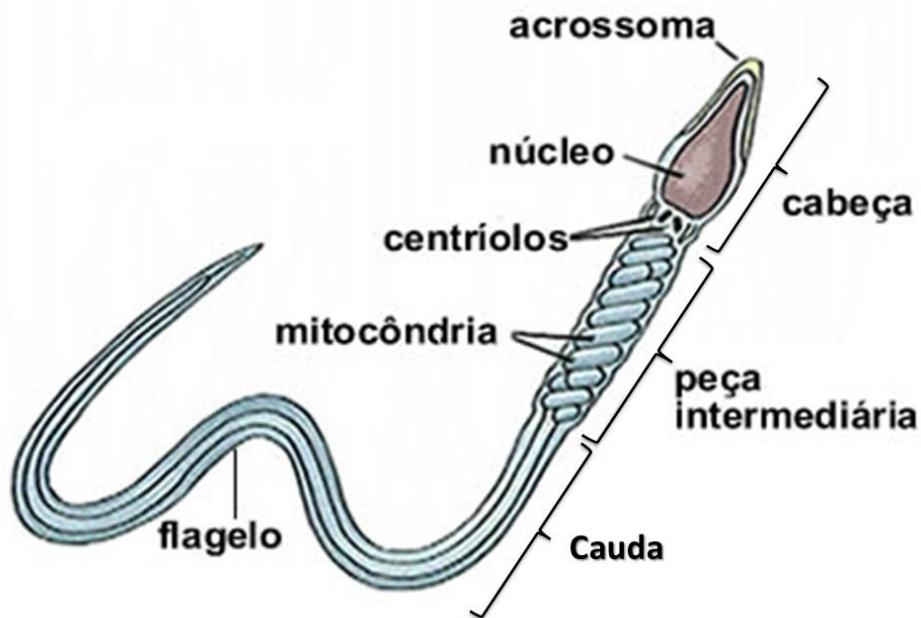


Figura 1: Regiões do espermatozoide (adaptado de: Brasil Escola).

Os ejaculados de ovino possuem uma alta concentração de células espermáticas, isto é, mais de 100 milhões de espermatozoides e que podem ser coletados rotineiramente com vagina artificial sem desconforto deste particular, garantindo, assim, disposição de numerosas células de testes sem sacrificar animais experimentais. Considerando a rotina na coleta de sêmen ovino, 2 a 3 vezes por semana, para fins da reprodução, é possível selecionar machos com boa qualidade do ejaculado (SALAMON & MAXWELL, 2000). A utilização de ejaculados garante uma fonte de baixa variação de viabilidade, que é um pré-requisito para a repetibilidade dos ensaios *in vitro*.

Atualmente, a utilização de biotécnicas com células reprodutivas vem abrindo mais espaço para medicina reprodutiva humana e animal (CASTRO et al., 2011; ROMÃO et al., 2013) como a criopreservação e a inseminação artificial. Para que os

espermatozoides tenham uma maior durabilidade utiliza-se um diluente que forneça nutrientes e mantenha um pH adequado, proteja a célula gamética contra danos na sua membrana, choque térmico e lesões mecânicas causadas durante transporte (AISEN et al., 2005; VERSTEGEN et al., 2005).

Essas técnicas de reprodução assistida promovem a preservação da variabilidade do material genético e aumentam a eficiência reprodutiva. Com isso, torna-se possível a formação de bancos de germoplasma que geram a preservação *ex situ* de espécies ameaçadas de extinção (CABRITA, et al., 2010) como a espécie *Crioula Lanada*. Além disso, conserva material genético de espécies de produção, fato que favorece a produção de alimentos.

Essas técnicas reprodutivas com espermatozoides ovinos são extensivamente pesquisadas, pois ainda existe grande dificuldade de manter a qualidade do espermatozoide após congelamento e de realizar com êxito a fertilização *in vitro*. Por esses motivos, ovinos foram escolhidos para esse estudo, pois durante a coleta seminal os espermatozoides podem entrar em contato com UVB e prejudicar e/ou alterar o resultado final do procedimento.

Motilidade espermática

Durante a espermatogênese, o espermatozoide sofre modificações em suas estruturas que o preparam para adquirir características morfológicas para quando entrar no trato reprodutivo feminino (NISHIMUNE & OKABE, 1993). Características morfológicas como a motilidade progressiva, capacitação, reação acrossônica, ligação e penetração no oócito levando ao desenvolvimento embrionário (JONES, 1998; DAVID et al., 2015). Logo, qualquer falha nesse processo leva a prejuízos na

fecundação. Assim, a motilidade do espermatozoide é um instrumento importante para avaliação da qualidade espermática dos animais em estudo.

Para avaliação da motilidade existem duas formas conhecidas: observação de um técnico treinado através de microscopia ou, pelo sistema *computer assisted sperm analysis* (CASA). Ambas se mostraram eficientes através de seus resultados obtidos (NASCIMENTO et al., 2010; VIVEIROS et al., 2010). O sistema *computer assisted sperm analysis* (CASA) faz uma análise mais completa do comportamento do espermatozoide como: frequência do batimento da cauda, linearidade, velocidade espermática e balanço (RURANGWA et al., 2001). É uma ferramenta completa para estabelecer parâmetros espermáticos.

Funcionalidade Mitocondrial

No espermatozoide, as mitocôndrias localizam-se na peça intermediária. Elas produzem, através de reações de oxidação da cadeia respiratória a síntese de adenosina trifosfato (ATP), a energia necessária para o batimento do flagelo promovendo a motilidade, hipertivação e a penetração no óócitos (BARTH & OKO, 1989; ALBERTS et al., 1999). Contudo, alterações na funcionalidade mitocondrial refletem em problemas na fertilidade do animal.

Estudos em humanos mostraram que com a diminuição da funcionalidade da mitocôndria, reduz a motilidade dos espermatozoides promovendo redução da fertilidade (GRAHAM, 2001; MARCHETTI et al., 2004). Além disso, durante o processo de produção de ATP, naturalmente são produzidos subprodutos como espécies reativas de oxigênio (ROS) que são prejudiciais que podem causar disfunção espermática (AITKEN et al., 1998). Os principais mecanismos de defesa do

espermatozoide ficam no plasma seminal, que é retirado quando vai para o resfriamento. Durante o processo de maturação, o espermatozoide elimina grande parte do seu citoplasma ficando com pouca defesa antioxidante, assim qualquer alteração de ROS pode prejudicá-lo.

Com isso, avaliar a funcionalidade mitocondrial do espermatozoide é mais uma ferramenta de verificação de sua integridade. Através de sondas fluorescentes como a Rodamina 123, juntamente com microscopia de fluorescência, é possível compreender os mecanismos de regulação e controle da produção energética (COSSARIZZA et al., 1993; ARRUDA et al., 2004). Assim, o estado funcional em que a mitocôndria se encontra traduz-se através do acúmulo ou não de Rodamina 123 nas peças intermediárias. Mitocôndrias coradas fortemente com fluorescência verde estão íntegras, enquanto que, fluorescência verde claro, as mitocôndrias são consideradas não funcionais.

Integridade de Membrana

Manter a integridade da membrana plasmática do espermatozoide é importante para a manutenção da qualidade espermática. A membrana separa o meio interno do meio externo e desempenha vários processos relacionados ao metabolismo celular através de sua permeabilidade seletiva (SINGER & NICOLSON, 1972; AMANN & PICKETT, 1987; COOPER, 1996). A membrana plasmática é composta por uma dupla camada de fosforolipídios que se estruturam formando um modelo chamado de “mosaico fluído”, apresentando também moléculas de colesterol e proteínas (STRYER, 1996; HEIDEMANN, 1999).

Segundo Lenzi et al. (1996) a membrana plasmática do espermatozoide se modifica desde o processo de espermatogênese até a penetração do oócito, mostrando que é de essencial importância para a fertilidade do espermatozoide. Dessa forma, a avaliação da membrana espermática é um instrumento eficaz para verificação da integridade do espermatozoide. Com a utilização de sondas fluorescentes, como o diacetato de carboxifluoresceína e o iodeto de propídio em conjunto, pode-se verificar como se encontra a membrana. O diacetato de carboxifluoresceína tem afinidade pelos lipídeos e cora de verde todas as células integrais, enquanto que, o iodeto de propídio cora o DNA em vermelho mostrando que houve ruptura na membrana, também pode ser encontrado células coradas de verde e vermelho ao mesmo tempo, ambas são consideradas lesadas (GILLAN et al., 2005).

Integridade do DNA

Outro fator a ser verificado na célula espermática é a integridade do DNA. Na cabeça do espermatozoide, a cromatina é fortemente enovelada, mais compacta, com o auxílio de proteínas que o enovelam, isso protege o DNA de agentes exógenos prejudiciais e mantém o genoma transcricionalmente inativo (POGANY et al., 1981; SINGH et al., 2003; DIETRICH et al., 2005; PARTYKA et al., 2010). Porém, fenômenos como o estresse oxidativo e deficiências em processos naturais promovem quebras da fita de DNA podem levar a danos irreversíveis no DNA do espermatozoide levando a casos de infertilidade (IRVINE et al., 2000; SHARMA et al., 2004; O'BRIEN & ZINI, 2005).

Portanto, para o desenvolvimento de um embrião saudável é fundamental que o DNA esteja íntegro no espermatozoide. Um espermatozoide com DNA fragmentado

ocasionará em incapacidade de fertilização, através da inabilidade do espermatozoide em alcançar o sítio de fertilização ou para iniciar o bloqueio da polispermia durante penetração no oócito, atrasos no desenvolvimento embrionário e aborto (SAACKE et al., 1994; VARELA et al., 2012b; VICENTE-FIEL et al., 2014). Com o uso do corante fluorescente *acridine orange* é possível verificar a integridade do DNA, emitindo fluorescência verde se estiver intacto (fita dupla do DNA) e laranja nos casos lesão (fita simples) (ARRUDA et al., 2004).

Acrossoma

O espermatozoide de mamíferos apresenta na porção anterior de sua cabeça uma estrutura chamada de acrossoma. O acrossoma é uma região que contém duas camadas de membranas com vários tipos de proteínas cobrindo o núcleo, é responsável pela interação espermatozoide e oócito (BARTH & OKO, 1989). Durante o processo de fecundação, o espermatozoide se liga a proteínas específicas do oócito, que ativam a reação acrossomal. As membranas, externa e interna, do acrossoma se fundem liberando enzimas proteolíticas que farão a fusão do espermatozoide com o oócito (SILVA, 1998; FLESCH & GADELLA, 2000; SENGER, 2003).

Falhas ou erros durante a reação acrossomal tornam o espermatozoide incapaz de fertilizar o oócito (GADELLA et al., 2001; AREEKIJSEREE & VEERAPRADITSIN, 2007). Assim, a manipulação de gametas pode promover danos no acrossoma e torna-lo infértil. Técnicas utilizando microscópio de epifluorescência e os compostos fluorescentes: iodeto de propídio e FITC-PNA (Lectina de *Arachis hypogaea* conjugada ao corante isotiocianato de fluoresceína - FITC) permite a verificação do estado em que se encontra o acrossoma. Se a célula estiver com a

morfologia normal (lisa) com fluorescência verde é considerada normal, enquanto que, se a célula estiver corada de verde ou vermelha com a morfologia anormal (rugosa), são consideradas espermatozoides com acrossoma lesado (KAWAMOTO et al., 1999).

Redução da Temperatura Espermática

Mudanças de temperatura modificam a permeabilidade da membrana celular e alteram o metabolismo celular, aumentando ou diminuindo a atividade enzimática. Com isso, é possível a utilização de baixas temperaturas para a conservação e prolongamento da sobrevivência celular (HAZEL, 1984; COSTA & FERREIRA, 1991). Segundo Vishwanath et al. (1996), existem duas principais técnicas de reduzir a temperatura e assim conservar as células: resfriamento e congelamento. Estas técnicas são largamente utilizadas para a conservação de espermatozoides de várias espécies e permite a ampliação de estudos na área de reprodução assistida (ALMOND et al., 1994; HAMMERSTEDT et al., 1990; FOOTE e PARKS, 1993; MAXWELL & SALAMON, 1993).

Em ovinos, o processo de resfriamento entre 15° e 5°C deixa a célula vulnerável a danos irreversíveis em várias estruturas, esses são causados possivelmente por choque térmico (WATSON, 2000). Na membrana espermática a redução de temperatura modifica sua fluidez, entrando em um estado gelatinoso, pois as cadeias dos ácidos graxos ficam rígidas e paralelas, tornando-se propensas a rupturas (STRYPER, 1992). As proteínas diminuem suas funções enzimáticas e a atividade de transporte através da membrana (AMANN & GRAHAM, 1993). Além disso, os carboidratos responsáveis pelo reconhecimento do ovócito pelo espermatozoide também podem ser afetados alterando a capacidade fertilizante (ALBERTS et al., 1999; WATSON, 2000).

Outra estrutura do espermatozoide ovino que pode ser gravemente danificada com o resfriamento é o acrossoma. A diminuição da temperatura promove a maturação excessiva da membrana plasmática, capacitando os espermatozoides e ativando a reação acrossomal (SALAMON & MAXWELL, 1995; BEDFORD et al., 2000; GADELLA et al., 2001). Isso acontece porque o choque térmico promove a diminuição da permeabilidade seletiva da membrana, reduzindo a atividade metabólica e a motilidade (WHITE, 1993; BAILEY et al., 2000), o que torna o espermatozoide inviável para a fertilização.

Porém, é possível diminuir esses danos adicionando componentes protetores ao diluente ou controlando a taxa de refrigeração. Um composto que ajuda a aumentar a viabilidade e a durabilidade do sêmen resfriado é a gema de ovo, em concentração de 20% adicionado ao diluente. Acredita-se que sua fração lipoproteica de baixa densidade (LDL) faz a proteção da célula espermática, prevenindo os choques térmicos durante o resfriamento (SALAMON & MAXWELL, 2000). O resfriamento de sêmen de ovino a 5°C reduz seu metabolismo em 10% mantendo sua sobrevivência, nessas condições o sêmen pode ser conservado até 24 horas conservando seu grau de fertilidade em parâmetro aceitável (EVANS & MAXWELL, 1990; SQUIRES et al., 1999).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da radiação UVB sobre a morfofisiologia da célula espermática de ovinos.

Objetivos Específicos

Determinar a motilidade, integridade de membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, Integridade do DNA e do acrossoma de espermatozoides ovinos após exposição à UVB em diferentes tempos antes do resfriamento.

Determinar se o efeito é potencializado após a exposição com o tempo de armazenamento resfriado a 5°C no período de 24 a 48 horas através das seguintes avaliações: Motilidade, Integridade de membrana plasmática, Funcionalidade de mitocôndria, Integridade do DNA e do Acrossoma.

ARTIGO

Ultraviolet B damages sperm mitochondrial function and membrane integrity in the ram

(a ser submetido ao periódico *International Journal Of Radiation Biologia*)

**Ultraviolet B damages sperm mitochondrial function and membrane integrity in
the ram**

Daniele S. de S. Cestaro¹, Antonio Sergio Varela Junior, Stela M. M. Ghelle²,
Alessandra C. da Silva³, Ana Paula Votto, Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira,
Carine D. Corcini⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada,
Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

² ReproPel, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de
Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

³ ReproPel, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de
Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

⁴ ReproPel, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de
Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

Correspondente: corcinicd@gmail.com (55) 53 32759161.

Keywords: Acrosome, spermatozoa, Computer-assisted sperm analysis.

Abstract

The objective from the study is to evaluate the effects of ultraviolet B radiation on morphophysiology the spermatozoa ram. Six ejaculates from seven rams were used in experiment, totaling 42 ejaculates. The ejaculates were diluted with Tris-egg yolk, which received UVB radiation at different times: 0, 30s, 60s, 90s, 120s and 150s. The evaluations were carried out in duplicate and immediately after the exposure, the samples were subsequently stored in conditioner box at 5 ° C for analysis at 24 and 48 hours. The sperm were evaluated for: motility in computer assisted sperm analysis system (CASA); plasma membrane integrity, mitochondrial function, DNA integrity and acrosomal fluorescence microscope. The exposure caused damage to the acrosome, membrane and mitochondria. The DNA remained intact. The time of 24h and 48h at 5 ° C did not change structures. The sperm kinetics was changed in several respects, motility was lower than the control when had exposure in lower exposure time. The damage was exacerbated in periods of 24 and 48 hours on various parameters of sperm kinetics. Thus, UVB has promoted a reduction in the quality of sperm motility structures without breaking.

1. Introduction

The Ultraviolet B (UVB) (290-320 nm) is most damaging with regard to UVA as directly causes damage in DNA, induces the formation of pyrimidine dimers, increases oxidative stress, cell cycle activates genes that lead to apoptosis (LESSER, 2006; DAHMS e LEE, 2010). In earthworms, ultraviolet irradiation A and B reduces by 70% the fertility of cocoons, reducing their survival (HAMMAN et al., 2003), due to increase in ROS production during the oxidation of lipids in the cells, and the oxidation of the essential fatty acids can change the fine structure and function of cell membranes (MISRA et al., 2005).

In mussel *Dreissena polymorpha* freshwater, exposure to ultraviolet also affect reproduction. Ovules and sperm irradiated with UVB and inseminated had a paralyze or delay meiosis, and changes in acrosome integrity and the incorporation of the sperm into the cytoplasm of the oocyte were decreased (SEAVER et al., 2009). In sperm urchin sea *Sphaerechinus granularis* UVB caused the reduction of fertilization capacity and eggs led to developmental delay and consequent abnormalities in embryo morphology (NAHON et al., 2009).

Studies with gamete exposed to UVB radiation mammals are still scarce. This is because the fertilization occurs internally, then the possibility of gametes have contact with any type of radiation is nule. However, with the increased use of gametes methods of cryopreservation for later use in biotechnical reproduction, especially the sperm cells in the collection and then are placed in transparent container and thus be exposed to UVB radiation can result in damage to their morphology and physiology that may result in impairment of the fertilization process. the evaluation of the handling of semen immediately after collection to discover the causes of sperm quality loss recurrence is required for use in reproductive techniques, and UVB can be one of the probable vectors that decrease the success in these procedures even at very low doses.

Spermatozoa are highly sensitive, their physiology with mitochondria concentrated in the intermediate part allows studies on its functioning and possible damage. Spermatozoa mitochondrial have the same sensitivity that the somatic cells with the great advantage of being closer to the physiological since it does not need cultivation (ANDERSSON et al., 2010; VICENTE-CARRILLO et al., 2015).

The objective of this study was to evaluate the effects of UVB radiation on morfofisiologia of sperm cells of ram. Also, determine if this effect is enhanced after exposure to the cold storage time at 5 ° C within 24 to 48 hours.

2. Material and methods

All chemicals used in this study were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) except when mentioned differently.

2.1. Animals

Seven adult crossbred rams (in average two years old) were used in this study. All animals were sexually mature and clinically healthy. The rams were kept under semi-extensive conditions at Federal University of Pelotas (UFPel), in Pelotas-RS, Brazil, (31°45'S latitude and 52°21'W longitude), receiving concentrated diet twice daily and with ad libitum access to water. Six ejaculates were collected using an artificial vagina (one per ram) (EVANS e MAXWELL, 1987), in August and kept at 35°C. Only from ejaculates with sperm motility equal or greater than 70% (CBRA 2013) and used 42 ejaculated in total.

2.2. Extenders e treatments

The extender base is Tris- Egg yolk (EVANS e MAXWELL, 1987), with pH 6,9 and osmolality 360 mOsm. The samples were diluted based extender (1: 1, v / v) upon collection for maintenance of sperm cells. The collected and diluted material Tris egg yolk was taken to the laboratory, where he spent the immediate analysis of motility and sperm vigor. In the samples that reached the minimum established standards, the final dilution was performed (4×10^7 viable sperm / ml) in the samples then were exposed to radiation. After exposure treatments were stored under refrigeration at a temperature of 5 ° C in a conditioning box (Koolmate, Minitube, Georgia) for a period of 24h and 48h.

2.3. UVB irradiation protocol

The expositions were held in a closed box, with the walls painted black so that the radiation was only the lamp used. One mL of semen from each animal was distributed in each well of the plate, each male satisfy a line board, each column corresponding to a dose of radiation exposure. The irradiation intensity was measured using a photometer Radiometer (International Light Technologies, ILT1400). UVB irradiation lamp was $73.3 \mu\text{W} / \text{cm}^2$.

The semen samples were exposed to ultraviolet B radiation, using a UVB lamp (VL: 115 C, 30 W; peak at 312 nm) Vilber Lourmat, Marne Lavalee, France for 0, 30s, 60s, 90s, 120s and 150s (AMARAL et al., 2013). The corresponding UVB doses were: 0; $2,199 \text{ mJ/cm}^2$; $4,398 \text{ mJ/cm}^2$; $6,597 \text{ mJ/cm}^2$; $8,796 \text{ mJ/cm}^2$ and $10,995 \text{ mJ/cm}^2$.

2.4. Sperm *in vitro* evalutation

The evaluations were performed at 0, 24, 48 hours after dilution and exposure to radiation. Before the analysis, all samples were heated in a water bath (10 min / 37°C).

The samples Sperm kinetics parameters were evaluated using a computer assisted semen analyses system (SpermVision®, Minitube, Tiefenbach, Germany) in an optical microscope (Axio Scope A1®, Zeiss, Jena, Germany) at 200 X. Spermatozoa were evaluated in six automated randomized fields, considering: total and progressive sperm motility; distance average path (DAP); distance in a curved line (DCL); distance in a straight line (DSL); velocity average path (VAP); velocity in a curved line (VCL); velocity in a straight line (VSL); straightness (STR); linearity (LIN); wobble (WOB); amplitude of lateral head displacement (ALH); and beat cross frequency (BCF).

The evaluations of sperm membrane, acrosome and DNA integrity and mitochondria functionality were conducted with an epifluorescent microscope (Olympus BX 51, América INC, São Paulo - Brasil), with filter wave length of 450-520

nm. Sperm membrane integrity was evaluated using carboxyfluorescein diacetate (CFDA; C5041) and propidium iodide (PI; P4170) (Harrison e Vickers , 1990), under 400 x magnification. In each slide, 200 cells were counted and classified as intact (green fluorescence) or not intact (red fluorescence or simultaneous red and green fluorescence). Acrosome integrity was evaluated using FITC-PNA (L7381) by counting 200 cells in dry slides. Acrosomes were classified as intact, when presented red fluorescence and normal conformation, or not intact, when presented green fluorescence or no fluorescence and conformation distinct from that from normal spermatozoa (Kawamoto et al. 1999). DNA Integrity was evaluated by the technique described by Evenson et al. (1999) using Acridine Orange (2 mg / mL in deionized H₂O). The cells were considered normal DNA (double-stranded) that presented green fluorescence and when the cell had red or yellow coloration was considered methylated DNA (single-). The mitochondria functionality was evaluated by the technique described by Garner et al. (1986). The combination of fluorescent probes rhodamine 123 (Rh123) (R8004-5mg) with propidium iodide (PI). Cells that had intermediate piece with an intense green fluorescence was seen with intact mitochondria (functionally active), while cells with little or no green fluorescence intensity on the intermediate piece were considered non-functional.

2.5. Statistical analyses

As the Shapiro-Wilk test Indicated lack of normality. Subsequently, date were compared among treatments using Kruskal Wallis. The treatments were considered independent variables, and the motility time parameters, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, membrane integrity, DNA integrity, mitochondria functionality, were considered dependentes. To variables allow interpretation, results

Were Reported in Their original scales. All analyzes Were done with Statistix® (2013).
(Statistix 2008).

3. Results

Here table I

The results of kinetics ovine sperm cells at time zero after exposure to UVB radiation at different times evaluated by the system computer assisted sperm analysis (CASA) are defined in Table I. At time 120 seconds ($10,995 \text{ mJ/cm}^2$), STR and LIN had the reduced kinetics, but in 60 seconds ($4,398 \text{ mJ/cm}^2$) both were increased compared to control without radiation. The BCF and WOB did not differ from control when exposed for longer periods. Finally, ALH, VCL, total motility and progressive motility, in the long ($10,995 \text{ mJ/cm}^2$) they had an increase in movement in the control, and in less time had a decrease of sperm kinetics.

Here table II

In Table II shows the sperm kinetics of sheep cells 24 hours after exposure to UVB radiation, items DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, total motility and progressive motility, manteram be no significant changes. The WOB had a small fall in 60 seconds ($4,398 \text{ mJ/cm}^2$), followed by an increase in 120 seconds ($8,796 \text{ mJ/cm}^2$) and ALH reduce movement in higher doses UVB ($8,796 \text{ mJ/cm}^2$ e $10,995 \text{ mJ/cm}^2$). The LIN and STR presented a acréssimo behavior in the movement as the exposed dose different from the BCF had sperm kinetics variation unrelated to the exposure time.

Here Table III

In the 48 hour period shown in Table III displays the kinetics ovine sperm cells. Only the total and progressive motility showed no significant change over time after exposure. DAP, DCL, PRV and VCL statistical variations were identical with motion reduction in 60 seconds exposure ($4,398 \text{ mJ/cm}^2$) and increased when exposed for 120 seconds ($8,796 \text{ mJ/cm}^2$). The rest of the parameters: ALH, BCF, ADSL, LINE, STR, VSL and WOB showed relatively similar behavior with greater sperm kinetics in exposure times to high UVB.

Here Tables IV, V e VI

The tables IV, V and VI show the averages found in reviews fluorescence microscope of the quality of sperm cell structures after exposure to UVB radiation at different times. Damage occurred only at the time of exposure (time zero) (Table IV), demonstrating that with a time of 24 hours (Table V) and 48h (Table VI) after radiation and stored at 5°C did not worsened the damage. Table IV revealed no significant DNA damage. On the other hand, UVB damaged acrosome the, mitochondrion membrane and with greater damage to the longer time ($150\text{s} = 10,995 \text{ mJ/cm}^2$).

4. Discussion

Many studies have been highlighting the effect of UV in the reproductive cells of aquatic animals such as sea urchin (AU et al., 2002; LU e WU, 2005a, 2005b), mussel (SEAVER et al., 2009), fish (VETTER et al., 1999; BROWMAN et al., 2000; RICK et al., 2014) with a focus on environmental exposure doses. In humans UVB radiation is used in clinical trials with sperm (MALLIDIS et al., 2011; AMARAL et al., 2013). Information UVB exposure effect had not been experimentally conducted with ram sperm cells. Thus by using reproduction biotechnologies, semen which was previously directly deposited on the female reproductive tract without exposure now be exposed and may have a decreased fertility as this study demonstrates.

Mitochondria are cellular organelles of essential importance for the success in assisted reproduction, they provide the energy needed to beat the scourge, so sperm moves in the female reproductive tract into the oocyte and eventually penetrate the zona pellucida (BARTH e OKO, 1989; ALBERTS et al., 1999; O'CONNELL et al., 2002). The results of this study showed that in longer exposure time (120s and 150s) were less functional mitochondria confirming the deleterious effect of UVB, similar to results obtained by Lu and Wu (2005b). Hegedus et al. (2014) suggest that mitochondrial damage is a characteristic of UVB irradiation, found in a study a comparison between the production of ROS and a slight increase in mitochondrial membrane potential indicating mitochondrial uncoupling.

Another important parameter evaluated for the maintenance of sperm quality is membrane integrity. The sperm membrane performs various processes related to cellular metabolism through its selective permeability (SINGER e NICOLSON, 1972; AMANN e PICKETT, 1987; COOPER, 1996). The sperm membrane was also impaired

after exposure to UVB, especially in the higher exposure period (150s), perhaps due to changes in the phospholipid composition of the membrane or its membrane potential.

Another area affected by UVB in the experiment was the sperm acrosome. It is the region in the anterior portion of the sperm head that covers the core, it contains two layers of membrane with various proteolytic enzymes that are the fusion of sperm to the oocyte (BARTH e OKO, 1989; SILVA, 1998; FLESCH e GADELLA, 2000; SENGER, 2003). Our results showed that the higher the longer exposure time was the damage, that is, the sperm were trained early, except 120s that the result was equal to 30s. Similar to the results obtained by Seaver et al. (2009), who in his study found that sperm with damaged acrosome could bind to the oocyte, but does not penetrate it, preventing fertilization. It can be seen that UVB has the greatest effect changes in the membranes, which have in their composition of phospholipids, cholesterol and proteins that DNA at the doses tested.

All evaluated structures: DNA, mitochondria, membrane and acrosome; had no harmful effects potentiated within 24 to 48 hours stored cold at 5 ° C after exposure to UVB, all cell damage occurred at time zero exposure. Unlike the results in sperm kinetics sheep cell in all periods (0, 24 and 48 hours) most of the evaluated parameters were significant changes.

The motility of the sperm is an important criterion for evaluation of sperm quality (AU et al., 2002), any failure in this process leads to losses at fertilization. CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) is an automated system that provides accurate, precise and meaningful information of the individual movement of each cell and subpopulations of sperm cells (Amann and KATZ., 2004; MATOS et al, 2008). It is an enhancement tool for knowledge and skills to analyze sperm (VERSTEGEN et al., 2002; MATOS et al., 2008).

Studies have used the house to correlate data of sperm motility with fertilization success, as the decline in VSL in rats increased linear motile spermatozoa in rainbow trout and increased VAP cocks, human and sheep are listed the improvement in fertility capacity (MOORE and AKHONDI, 1996; LAHNSTEINER et al, 1998;. FARRELL et al, 1998;. YOUN et al, 2011;. GUAN et al, 2014.). In general, samples with high levels of VAP, VSL, VCL, LIN and BCF have better migration and penetration in cervical mucus (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al, 2002, MATOS et al., 2008.). In our results, VSL and VAP had no statistical changes in relation to the exposure time at the time zero, or in the period of 24 hours after exposure. Parameters such as BCF and LIN are controversial because some studies have positive correlation with fertilization rate and other is negative (VERSTEGEN et al., 2002). In this study, LIN BCF and had statistically significant results, but whether to increase or decrease the sheep fertility capacity, only with future testing.

In many studies the sperm motility was considered a good indicator of male fertility in several species (GADEA, 2005, KASIMANICKAM et al., 2007; BROEKHUIJSE et al., 2012) including ovine (DAVID et al., 2015; YÁNIZ et al., 2015). In the present study, 150s exposure time to UVB and then analyzed in CASA showed a significant increase in total and progressive motility. Thus, the UVB irradiation level required to stop the gametic function is less than that required to inhibit sperm motility, which means that the irradiated sperm may be mobile (SEAVER et al., 2009), but may not have the skills to fertilization due to UVB affect the structures of the sperm..

The DNA integrity showed no significant damage in this experiment, unlike other studies that the damage was immediately apparent and severe (VETTER et al., 1999; BROWMAN et al., 2000; DAHMS e LEE, 2010; HEGEDUS et al., 2014).

Thus, exposure to low doses of UVB in ram semen damaged the structural quality of sperm, but not to the point of interrupting motility. So it is necessary that during the collections and when stored semen must be fully protected from sun exposure, this may be the cause of sperm quality loss recurrence during use in reproductive techniques. In addition, this study showed that spermatozoa may be used as an alternative source of biological material to reducing or replacing the use of animals as guinea pigs for experimental investigations with radiation, especially in studies that relate radiation and its effects on mitochondria.

5. Acknowledgements

We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES, Brasilia, DF, Brazil) by post graduate scholarships awarded to D. Senna, AC Silva and SMM Gheller. C.D. Corcini is a research fellow from CNPq (306356/2014-7). We would also like to thank the members of the Comparative Animal Reproduction (Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil) group for their assistance.

6. Conflict of interest: none.

7. Referencias

- Adams NL, Shick JM. 2001. Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol* 138:267–280.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59:1037-1046.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1999. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula, 5^a ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul.
- Amann RP, Katz DF. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl* 25:317-325.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci* 7:145-174.
- Amaral S, Redmann K, Sanchez V, Mallidis C, Ramalho-Santos J, Schlatt S. 2013. UVB irradiation as a tool to assess ROS-induced damage in human spermatozoa. *Andrology*. 1:707-714.
- Andersson MA, Mikkola R, Rasimus S, Hoornstra D, Salin P, Rahkila R, Heikkinen M, Mattila S, Peltola J, Kalso S, Salkinoja-Salonen M. 2010. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. *Toxicol In Vitro* 24:2041–2052.
- Au DWT, Chiang MWL, Tang JYM, Yuen BBH, Wang YL, Wu RSS. 2002. Impairment of sea urchin sperm quality by UV-B radiation: predicting fertilisation success from sperm motility. *Mar Pollut Bull* 44:583–589.

Barth AD, Oko RJ. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Estados Unidos: Iowa State University Press.

Black HS. 1987. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol* 46:213–221.

Bonaventura R, Poma V, Russo R, Zito F, Matranga V. 2006. Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Mar Biol* 149:79–86.

Broekhuijse MLWJ, Sostaric E, Feitsma H, Gadella BM. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J. Anim. Sci* 90:779–789.

Browman HI, Alonso Rodriguez C, Beland F, Cullen JJ, Davis RJ, Kouwenberg JHM, Kuhn P, McArthur B, Runge JA, St-Pierre JF, Vetter RD, 2000. The impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: a synthesis of results from the estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Mar Ecol Prog Ser* 199:293–311.

CBRA: Colégio Brasileiro De Reprodução Animal. 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, pp.49.

Cooper GM. 1996. The cell: a molecular approach. Washington: ASM Press. pp. 673.

Dahms H, Lee J. 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquat Toxicol* 97:3–14.

David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, Druart X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Anim Reprod Sci.* Article in Press. pp. 7.

Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. 2000. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis* 15(1):61–68.

Evans G, Maxwell WMC. 1987. Salomon's artificial insemination of sheep and goats. Sidney: Butterworths. pp 194.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, Angelis P, Claussen OP. 1999. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14(4):1039-1049.

Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted spermanalysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49:871–879.

Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469(3):197-235.

Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63:431–444.

Garner DL, Pinkel D, Johnson LA. 1986. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod* 34:127-138.

Guan Y, Malecki IA, Hawken PAR, Linden MD, Martin GB. 2014. Under-nutrition reduces spermatogenic efficiency and sperm velocity, and increases sperm DNA damage in sexuallymature male sheep. *Anim Reprod Sci* 149:163–172.

Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescente probes to assess membrane integrityin mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 88:343-352.

Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. 2003. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role of catalase. *J Biol Chem* 278:22432–22436.

Hegedus C, Boros G, Emri E, Miko E, Kariko K, Emri G, Bai P, Remenyik EVA. 2014. The implication of mitochondria in the UVB-driven pathways. *J Invest Dermatol* 134(2):S88-S88.

Kasimanickam R, Kasimanickam V, Thatcher CD, Nebel RL, Cassell BG. 2007. Relationships among lipid peroxidation, glutathione per- oxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology* 67:1004–1012.

Karentz D, Dunlap WC, Bosch I. 1997. 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* 129:343–353.

Kawamoto A, Kazutomo O, Kishikawa H, Zhu L, Azuma C, Murata Y. 1999. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. *Fertil Steril* 71:497-501.

Kevin RA. 1994. Impact of ozone depletion on phytoplankton growth in the Southern Ocean: large spatial scale and temporal variability. *Mar Ecol Progr 114:1-12.*

Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA, 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* 163:163–181.

Lesser MP. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu Rev Physiol* 68:253–278.

Lu XY, Wu RSS. 2005a. UV induces reactive oxygen species, damages sperm, and impairs fertilisation in the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Mar Biol* 148:51–57.

Lu XY, Wu RSS. 2005b. Ultraviolet radiation damages sperm mitochondrial function and membrane integrity in the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Ecotoxicol Environ Safety* 61:53–59.

Mallidis C, Wistuba J, Bleisteiner B, Damm OS, Gross P, Wübbeling F, Fallnich C, Burger M, Schlatt S. 2011. In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. *Hum Reprod* 26:1641–1649.

Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R. 2008. Computer-assisted sperm analysis (CASA): a review. *Rev Bras Reprod Anim.* 32(4):225-232.

Misra RB, Lal K, Farooq M, Hans RK. 2005. Effect of solar UV radiation on earthworm (*Metaphire postuma*). *Ecotoxicol Environ Safety* 62:391–396.

Moore HDM, Akhondi MA, 1996. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: Epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens. *J Androl* 17:50–60.

Mortimer ST. 2000. Casa- Practical aspects. *J Androl.* pp 515-524.

Nahon S, Porras VAC, Pruski AM, Charles F. 2009. Sensitivity to UV radiation in early life stages of the Mediterranean sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Sci Total Environ* 407:1892–1900.

O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. 2002. The effect of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.* 17:704–709.

Paz ML, González Maglio DH, Weill FS, Bustamante J, Leoni J. 2008. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24:115–122.

Rick IP, Mehlis M, Eßer E, Bakker TCM. 2014. The influence of ambient ultraviolet light on sperm quality and sexual ornamentation in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Oecologia* 174:393–402.

Seaver RW, Ferguson GW, Gehrmann WH, Misamore MJ. 2009. Effects of Ultraviolet Radiation on Gametic Function During Fertilization in Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*). *J. Shellfish Res.* 28(3):625-633.

Senger PL. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2^a ed. Pullman (WA): Current Conceptions. pp. 271.

Silva, AEDF. 1998. Reação acrossómica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. pp. 38.

Singer SJ, Nicolson GL. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-31.

Thoma F. 1999. Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J* 18:6585–6598.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179.

Vetter RD, Kurtzman A, Mori T. 1999. Diel cycles of DNA damage and repair in eggs and larvae of Northern Anchovy, *Engraulis mordax*, exposed to solar ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol*. 69:27–33.

Vicente-Carrillo A, Edebert I, Garside H, Cotgreave I, Rigler R, Loitto V, Magnusson KE, Rodríguez-Martínez H. 2015. Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: Implications for drug toxicity testing and the 3R principles. *Toxicol In Vitro* 29(3):582-591.

Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schüller J, Scharffetter-Kochanek, K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* 63:41–51.

World Meteorological Organization. 1994. Scientific assesment of ozone depletion. Global ozone Research and Monitoring Project 37, United Nations Environment Programme.

Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P. 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim Reprod Sci* 156:128–134.

Youn JS, Cha SH, Park CW, Yang KM, Kim JY, Koong MK, Kang IS, Song IO, Han SC. 2011. Predictive value of sperm motility characteristics assessed by computer-assisted sperm analysis in intrauterine insemination with superovulation in couples with unexplained infertility. *Clin Exp Reprod Med* 38:47–52..

8. Tables

Table I: Mean values and standard deviations kinetics of ram sperm cells zero time point after exposure to UVB at different times.

Variables	Tempo de exposição (s)					
	0	30	60	90	120	150
ALH	3.2 ± 0.04 ^b	3.3 ± 0.06 ^{ab}	3.2 ± 0.07 ^b	3.2 ± 0.06 ^b	3.3 ± 0.06 ^b	3.5 ± 0.07 ^a
BCF	29.5 ± 0.02 ^{ab}	29.8 ± 0.2 ^a	29.1 ± 0.3 ^b	29.7 ± 0.3 ^{ab}	29.6 ± 0.3 ^{ab}	29.3 ± 0.2 ^{ab}
DAP	22.9 ± 0.6	23.7 ± 0.7	22.7 ± 0.7	23.0 ± 0.7	23.5 ± 0.7	23.8 ± 0.7
DCL	37.2 ± 0.8	38.9 ± 1.0	36.7 ± 1.1	38.1 ± 1.2	38.2 ± 1.2	39.1 ± 1.1
DSL	16.1 ± 0.5	16.8 ± 0.6	16.4 ± 0.6	16.2 ± 0.6	16.7 ± 0.6	16.4 ± 0.6
LIN	0.423 ± 0.01 ^{abc}	0.426 ± 0.01 ^{abc}	0.438 ± 0.01 ^a	0.420 ± 0.01 ^{bc}	0.431 ± 0.01 ^{ab}	0.413 ± 0.01 ^c
STR	0.690 ± 0.01 ^{bc}	0.700 ± 0.01 ^{ab}	0.712 ± 0.01 ^a	0.692 ± 0.01 ^{bc}	0.698 ± 0.01 ^{abc}	0.681 ± 0.01 ^c
VAP	53.2 ± 1.2	54.3 ± 1.4	52.3 ± 1.6	52.9 ± 1.6	54.5 ± 1.5	55.8 ± 1.6
VCL	86.2 ± 1.8 ^{ab}	89.7 ± 2.2 ^{ab}	84.5 ± 2.4 ^b	87.2 ± 2.5 ^{ab}	88.1 ± 2.5 ^{ab}	91.2 ± 2.6 ^a
VSL	37.5 ± 1.1	39.0 ± 1.2	37.8 ± 1.3	37.2 ± 1.3	38.7 ± 1.3	38.4 ± 1.3
WOB	0.609 ± 0.01 ^{ab}	0.604 ± 0.01 ^{ab}	0.612 ± 0.01 ^{ab}	0.601 ± 0.01 ^b	0.614 ± 0.01 ^a	0.605 ± 0.01 ^{ab}
Motility 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
Motility Progress	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

Distance average path (DAP); distance in a curved line (DCL); distance in a straight line (DSL); velocity average path (VAP); velocity in a curved line (VCL); velocity in a straight line (VSL); straightness (STR); linearity (LIN); wobble (WOB); amplitude of lateral head displacement (ALH); and beat cross frequency (BCF). Different letters in a line indicate difference statistic for Kruskal-wallis ($P<0,05$).

Radiation 0s = 0; 30s=199 mJ/cm²; 60s= 4,398 mJ/cm²; 90s =6,597 mJ/cm²; 120 s= 8,796mJ/cm²; 150s= 10,995 mJ/cm². N= 42 ejaculates

Table II: Mean values and standard deviations kinetics of ram sperm cells 24 hs point after exposure to UVB at different times.

Variable	Exposition Time (s)					
	0	30	60	90	120	150
ALH	3.8 ± 0.05 ^a	3.7 ± 0.1 ^a	3.7 ± 0.1 ^a	3.6 ± 0.1 ^{ab}	3.4 ± 0.1 ^b	3.4 ± 0.1 ^b
BCF	29.6 ± 0.3 ^{ab}	29.2 ± 0.2 ^b	30.5 ± 0.2 ^a	30.4 ± 0.3 ^a	30.2 ± 0.3 ^{ab}	30.5 ± 0.3 ^a
DAP	26.4 ± 0.5	26.4 ± 0.6	27.0 ± 0.5	26.9 ± 0.5	26.3 ± 0.6	27.1 ± 0.7
DCL	48.2 ± 1.0	48.0 ± 1.1	49.5 ± 0.9	48.6 ± 0.9	46.9 ± 1.0	48.6 ± 1.1
DSL	18.1 ± 0.4	18.3 ± 0.5	19.0 ± 0.4	19.5 ± 0.4	19.2 ± 0.5	20.0 ± 0.6
LIN	0.374 ± 0.01 ^c	0.379 ± 0.01 ^c	0.380 ± 0.01 ^{bc}	0.396 ± 0.01 ^{ab}	0.405 ± 0.01 ^a	0.403 ± 0.01 ^a
STR	0.679 ± 0.01 ^c	0.683 ± 0.01 ^c	0.695 ± 0.01 ^{bc}	0.716 ± 0.01 ^{ab}	0.720 ± 0.01 ^a	0.726 ± 0.01 ^a
VAP	61.4 ± 1.2	61.5 ± 1.4	62.5 ± 1.1	62.1 ± 1.2	60.5 ± 1.3	62.2 ± 1.5
VCL	111.8 ± 2.2	111.2 ± 2.7	114.2 ± 2.0	111.8 ± 2.1	107.6 ± 2.4	111.3 ± 2.6
VSL	42.3 ± 1.0	42.6 ± 1.1	44.1 ± 0.9	45.1 ± 1.0	44.3 ± 1.1	45.2 ± 1.3
WOB	0.548 ± 0.01 ^{ab}	0.553 ± 0.01 ^{ab}	0.546 ± 0.01 ^b	0.551 ± 0.01 ^{ab}	0.560 ± 0.01 ^a	0.553 ± 0.01 ^{ab}
Motility 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
Motility Progress	49.8 ± 1.3	52.0 ± 1.5	52.8 ± 1.3	51.0 ± 1.6	53.3 ± 1.2	51.6 ± 1.4

Distance average path (DAP); distance in a curved line (DCL); distance in a straight line (DSL); velocity average path (VAP); velocity in a curved line (VCL); velocity in a straight line (VSL); straightness (STR); linearity (LIN); wobble (WOB); amplitude of lateral head displacement (ALH); and beat cross frequency (BCF). Different letters in a line indicate difference statistic for Kruskal-wallis ($P<0,05$).

Radiation 0s = 0; 30s=199 mJ/cm²; 60s= 4,398 mJ/cm²; 90s =6,597 mJ/cm²; 120 s= 8,796mJ/cm²; 150s= 10,995 mJ/cm². N= 42 ejaculates

Tabela III: Mean values and standard deviations kinetics of ram sperm cells 48 hs point after exposure to UVB at different times.

Variable	Exposition time (s)					
	0	30	60	90	120	150
ALH	3.8 ± 0.08 ^{ab}	3.9 ± 0.06 ^a	3.6 ± 0.09 ^b	3.8 ± 0.06 ^{ab}	4.0 ± 0.04 ^a	3.9 ± 0.05 ^a
BCF	28.8 ± 0.3 ^{cd}	29.8 ± 0.3 ^{bc}	28.5 ± 0.3 ^d	31.2 ± 0.3 ^a	30.5 ± 0.2 ^{ab}	30.2 ± 0.2 ^{ab}
DAP	27.9 ± 0.6 ^{ab}	27.8 ± 0.5 ^{ab}	27.2 ± 0.7 ^b	28.2 ± 0.5 ^{ab}	29.7 ± 0.5 ^a	28.6 ± 0.5 ^{ab}
DCL	52.0 ± 1.3 ^{ab}	53.2 ± 1.0 ^{ab}	50.3 ± 1.3 ^b	52.4 ± 0.8 ^{ab}	54.9 ± 0.8 ^a	51.8 ± 0.9 ^{ab}
DSL	18.2 ± 0.4 ^c	18.7 ± 0.4 ^{bc}	19.0 ± 0.5 ^{bc}	19.6 ± 0.3 ^{abc}	20.8 ± 0.4 ^a	19.9 ± 0.4 ^{ab}
LIN	0.357 ± 0.01 ^b	0.352 ± 0.01 ^b	0.381 ± 0.01 ^a	0.374 ± 0.01 ^a	0.375 ± 0.01 ^a	0.380 ± 0.01 ^a
STR	0.660 ± 0.01 ^c	0.670 ± 0.0 ^{bc}	0.703 ± 0.01 ^a	0.695 ± 0.01 ^a	0.695 ± 0.01 ^a	0.688 ± 0.01 ^{ab}
VAP	64.9 ± 1.5 ^{ab}	64.4 ± 1.2 ^{ab}	63.0 ± 1.7 ^b	65.6 ± 1.1 ^{ab}	68.9 ± 1.1 ^a	66.5 ± 1.1 ^{ab}
VCL	120.4 ± 2.9 ^{ab}	122.4 ± 2.2 ^{ab}	116.2 ± 3.1 ^b	121.1 ± 1.9 ^{ab}	126.9 ± 1.9 ^a	119.9 ± 2.1 ^{ab}
VSL	42.4 ± 0.9 ^c	43.3 ± 0.8 ^{bc}	44.0 ± 1.2 ^{bc}	45.7 ± 0.8 ^{abc}	48.4 ± 0.9 ^a	46.1 ± 0.9 ^{ab}
WOB	0.537 ± 0.01 ^b	0.524 ± 0.01 ^c	0.538 ± 0.01 ^b	0.536 ± 0.01 ^{bc}	0.539 ± 0.01 ^{ab}	0.551 ± 0.01 ^a
Motility 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
Motility Progress	42.4 ± 1.7	41.7 ± 1.6	43.6 ± 1.4	40.5 ± 1.8	41.0 ± 1.6	44.6 ± 1.7

Distance average path (DAP); distance in a curved line (DCL); distance in a straight line (DSL); velocity average path (VAP); velocity in a curved line (VCL); velocity in a straight line (VSL); straightness (STR); linearity (LIN); wobble (WOB); amplitude of lateral head displacement (ALH); and beat cross frequency (BCF).

Different letters in a line indicate difference statistic for Kruskal-wallis (P<0,05).

Radiation 0s = 0; 30s=199 mJ/cm2; 60s= 4,398 mJ/cm2; 90s =6,597 mJ/cm2; 120 s= 8,796mJ/cm2; 150s= 10,995 mJ/cm2. N= 42 ejaculates

Table IV: Mean of the assessments membrane integrity, DNA, and acrosomal ram sperm and mitochondria functionality after exposure to UVB at different doses and armazenameto 5°C for 24 hours (n= 42 ejaculates)..

Variable	Tempo de exposição (s)					
	0	30	60	90	120	150
Acrossomal integrity (%)	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
DNA integrity (%)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Membrane Integrity (%)	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
Mitochondria Functional (%)	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

Different letters in a line indicate difference statistic for Kruskal-wallis (P<0,05).Radiation 0s = 0; 30s=199 mJ/cm2; 60s= 4,398 mJ/cm2; 90s =6,597 mJ/cm2; 120 s= 8,796mJ/cm2; 150s= 10,995 mJ/cm2.

Table V: Mean of the assessments membrane integrity, DNA, and acrosomal ram sperm and mitochondria functionality after exposure to UVB at different doses and armazenameto 5°C for 24 hours (n= 42 ejaculates).

Variable	Exposition time (s)					
	0	30	60	90	120	150
Acrossosomal integrity (%)	76.9 ± 1.8	77.2 ± 1.5	77.1 ± 2.3	73.6 ± 2.0	72.5 ± 5.7	76.2 ± 1.9
DNA integrity (%)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Membrane Integrity (%)	43.9 ± 2.2	46.2 ± 2.4	48.4 ± 2.1	44.1 ± 2.5	48.7 ± 2.4	50.2 ± 1.5
Mitochondria Functional (%)	65.7 ± 2.4	68.6 ± 3.3	73.9 ± 3.1	69.4 ± 2.5	67.8 ± 3.0	64.5 ± 3.0

No difference statistic for Kruskal-wallis (P<0,05). Radiation 0s = 0; 30s=199 mJ/cm2; 60s= 4,398 mJ/cm2; 90s =6,597 mJ/cm2; 120 s= 8,796mJ/cm2; 150s= 10,995 mJ/cm2.

Tabela VI: Mean of the assessments membrane integrity, DNA, and acrosomal ram sperm and mitochondria functionality after exposure to UVB at different doses and armazenameto 5°C for 48 hours (n= 42 ejaculates).

Variable	Exposition time (s)					
	0	30	60	90	120	150
Acrossomal integrity (%)	63.6 ± 1.2	60.8 ± 4.5	63.6 ± 2.1	64.1 ± 1.7	61.4 ± 2.0	59.6 ± 1.4
DNA integrity (%)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Membrane Integrity (%)	42.1 ± 2.8	44.8 ± 2.8	45.8 ± 2.1	45.0 ± 1.0	45.9 ± 2.3	44.8 ± 2.6
Mitochondria Functional (%)	55.1 ± 3.7	56.2 ± 3.3	54.6 ± 3.7	54.0 ± 2.6	54.9 ± 2.3	51.5 ± 2.2

No difference statistic for Kruskal-wallis (P<0,05).Radiation 0s = 0; 30s=199 mJ/cm2; 60s= 4,398 mJ/cm2; 90s =6,597 mJ/cm2; 120 s= 8,796mJ/cm2; 150s= 10,995 mJ/cm2. N= 42 ejaculates

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho traz novas perspectivas de estudos. Além da atual, muito utilizada, que é o estudo de espermatozoides para melhoramento de biotecnologias reprodutivas como inseminação artificial e criopreservação para benefício da produção de alimento e preservação de espécies em extinção. Ressalta sobre o uso de sêmen como uma opção de material biológico para a redução e/ou substituição da utilização de animais como cobaias em investigações experimentais, alguns estudos já demonstraram que apesar da redução de citoplasma no espermatozoide apresentam a mesma sensibilidade de células somáticas.

No presente estudo foram avaliados os efeitos da radiação UVB em diferentes tempos sobre a morfofisiologia da célula espermática de ovinos, mostrou a necessidade da proteção total do sêmen logo após a coleta, pois foram utilizadas doses abaixo das consideradas doses ambientais e trouxeram danos irreversíveis às células. Outro ponto a ser destacado é a presença de motilidade mesmo com baixa qualidade da estrutura celular, expondo que basear a qualidade espermática somente com motilidade pode induzir ao erro e falhas em experimentos na área reprodutiva.

Assim, surge a possibilidade de ampliar estudos com os efeitos de outras radiações ultravioletas sobre a morfofisiologia espermáticas e como podem agir se a exposição for em conjunto. A área de estudos reprodutivos está em pleno desenvolvimento e ainda tem muitos pontos que ainda faltam ser explorados.

REFERENCIAS GERAIS

- ADAMS, N. L., SHICK, J. M.. Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol.* Vol.138: p. 267–280. 2001.
- AISEN, E. M., QUINTANA, V., MEDINA, H., MORELLO & VENTURINO, A.. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*. Vol. 50: p. 239-249. 2005.
- AITKEN, R. J., GORDON, E., HARKISS, D., TWIGG, J. P., MILNE, P., JENNINGS, Z., IRVINE, D. S.. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. Vol. 59: p. 1037-1046, 1998.
- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Estrutura da membrana. In: ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. 5^a ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, p. 1294, 1999.
- AMANN, R. P., KATZ, D. F.. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* Vol. 25: p.317-325, 2004.
- AMANN, R. P., PICKETT, B. W.. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Scienci*. Vol. 7: p. 145-174. 1987.
- AMARAL, S., REDMANN, K., SANCHEZ, V., MALLIDIS, C., RAMALHO-SANTOS, J., SCHLATT, S.. UVB irradiation as a tool to assess ROS-induced damage in human spermatozoa. *Andrology*. Vol.1: p. 707-714. 2013.
- ANDERSSON, M. A., MIKKOLA, R., RASIMUS, S., HOORNSTRA, D., SALIN, P., RAHKILA, R., HEIKKINEN, M., MATTILA, S., PELTOLA, J. , KALSO, S., SALKINOJA-SALONEN, M.. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. *Toxicology in Vitro*. Vol. 24: p. 2041–2052. 2010.
- AREEKIJSEREE, M., VEERAPRADITSIN, T.. Caracterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. *Micron*. Vol. 39: p. 160-167. 2007.

- ARRUDA, R. P., CELEGHINI, E. C. C., ANDRADE, A. F. C., GARCIA, A. R., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C. F., SOUZA, L. W. O.. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina. Anais, Londrina, Brasil. P. 166-179. 2004.
- AU, D. W. T., CHIANG, M. W. L., TANG, J. Y. M., YUEN, B. B. H., WANG, Y. L., WU, R. S. S.. Impairment of sea urchin sperm quality by UV-B radiation: predicting fertilisation success from sperm motility. Mar. Pollut. Bull. Vol. 44: p. 583–589. 2002.
- BARTH, A. D., OKO, R. J.. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Estados Unidos: Iowa State University Press, 1989.
- BLACK, H. S. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. Photochem Photobiol Vol. 46: p.213–221. 1987.
- BONAVENTURA, R., POMA, V., RUSSO, R., ZITO, F., MATRANGA, V.. Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. Mar. Biol. Vol. 149: p. 79–86. 2006.
- BRASIL ESCOLA. Disponível em:
<http://brasilescola.uol.com.br/upload/conteudo/images/cf86a989eeecc4c38ea3257f5ef90d01.jpg> Acesso em abril de 2016.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J., SOSTARIC, E., FEITSMA, H., GADELLA, B. M.. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. J. Anim. Sci. Vol. 90: p. 779–789. 2012.
- BROWMAN, H. I., ALONSO RODRIGUEZ, C., BELAND, F., CULLEN, J. J., DAVIS, R. J., KOUWENBERG, J. H. M., KUHN, P., MCARTHUR, B., RUNGE, J. A., ST-PIERRE, J. F., VETTER, R. D.. The impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: a synthesis of results from the estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol.199: p.293–311. 2000.
- CABRITA, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRÃO, J., PÉREZ-CEREZALES, S., HERRÁEZ, M. P.. Review article Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. J Appl Ichthyol. Vol. 26: p. 623–635, 2010.
- CASTRO, S. V., CARVALHO, A. A., SILVA C. M. G., FASTINO, L. R., FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A.P.R.. Intracellular Cryoprotectant Agents:

Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinariae*. Vol. 39 (2): p. 957. 2011.

- CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, p.49, 2013.
- CHRISTOVAN, Y., JAMES, P., MACKIE, A., COOPER, T. G., JONES, R.. Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 216: p.41-46, p.3-24. 2004.
- COOPER, G. M. The cell: a molecular approach. Washington: ASM Press: p. 673. 1996.
- COSSARIZZA, A., BACCARANICONTRI, M., KALASHNIKOVA, G., FRANCESCHI, C.. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemistry Biophysic Research Communications*. Vol.. 197: p. 40-45, 1993.
- DAHMS, H., LEE, J.. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology*. Vol. 97: p. 3–14. 2010.
- DAVID, I., KOHNKE, P., LAGRIFFOUL, G., PRAUD, O., PLOUARBOUÉ, F., DEGOND, P., DRUART, X.. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*. Article in Press: p. 7. 2015.
- DIETRICH, G. J., SZPYRKA, A., WOJTCZAK, M., DOBOSZ, S., GORYCZKO, K., ZAKOWSKI, Ł., CIERESZKO, A.. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*. Vol. 64: p. 1809–1822. 2005.
- DONNELLY, E. T., MCCLURE, N., LEWIS, S. E. M.. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*. Vol. 15 (1): p. 61–8. 2000
- EVANS, G., MAXWELL, W. M. C.. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sidney: Butterworths, p.194. 1987.
- EVENSON, D. P., JOST, L. K., MARSHALL, D., ZINAMAN, M. J., CLEGG, E., PURVIS, K., ANGELIS, P., CLAUSSEN, O. P.. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. Vol. 14 (4): p.1039-1049. 1999.
- FARRELL, P. B., PRESICCE, G. A., BROCKETT, C. C., FOOTE, R. H.. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted

spermanalysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology Vol. 49: p. 871–879. 1998.

- FLESCH, F. M., GADELLA, B. M.. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. Biochim Biophys Acta. Vol. 1469 (3): p. 197-235. 2000.
- FOOTE, R. H., PARKS, J. E.. Factors affecting preservation and fertility of bull sperm: a brief review. Reproduction Fertility and Development. Vol. 5: p. 665–673. 1993.
- GADEA, J.. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. Theriogenology. Vol. 63: p. 431–444. 2005.
- GADELLA, B. M., RATHI, R., BROUWERS, J. F., STOUT, T. A., COLENBRANDER, B.. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. Animal Reproduction Science. Vol. 68: p. 249-265. 2001.
- GARNER, D. L., PINKEL, D., JOHNSON, L. A.. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. Biology of Reproduction. Vol. 34: p. 127-38. 1986.
- GILLIAN, L., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C.. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology. Vol. 63: p. 445-57, 2005.
- GRAHAM, J. K.. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. Animal Reproduction Science. Vol. 68: p.239-247, 2001.
- GUAN, Y., MALECKI, I. A., HAWKEN, P. A. R., LINDEN, M. D., MARTIN, G. B.. Under-nutrition reduces spermatogenic efficiency and sperm velocity, and increases sperm DNA damage in sexuallymature male sheep. Animal Reproduction Science. Vol. 149: p. 163–172. 2014.
- HAMMAN, A., MOMO, F. R., DUHOUR, A., FALCO, L., SAGARLO, M. C., CUADRADO, M. E.. Effect of UV radiation on Eisenia fetida populations. Pedobiologia. Vol. 47: p. 842–845, 2003.
- HARRISON, R. A. P., VICKERS, S. E.. Use of fluorescente probes to assess membrane integrityin mammalian spermatozoa. Jounal Reproduction & Fertility. Vol.88: p 343-352, 1990.
- HECK, D. E., VETRANO, A. M., MARIANO, T. M., LASKIN, J. D.. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role of catalase. J. Biol. Chem. Vol. 278: p. 22432–22436. 2003.

- HEGEDUS, C., BOROS, G., EMRI, E., MIKO, E., KARIKO, K., EMRI, G., BAI, P., REMENYIK, E. V. A.. The implication of mitochondria in the UVB-driven pathways. *Journal Of Investigative Dermatology*. Vol. 134 (2): p. S88-S88. 2014.
- HEIDEMANN, S.R.. A base molecular e celular da regulação fisiológica In: CUNNINGHAM, J.G. (Ed). *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1999.
- IRVINE, D., TWIGG, J. P., GORDON, E. L., FULTON, N., MILNE, P. A.,AITKEN, R. J.. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Jounal Andrology*. Vol. 21: p. 33–44. 2000.
- JONES, R.. Spermiogenesis and sperm maturation to development of fertilizing capacity. In: LAURIA, A. GANDOLFI, F.; ENNE, G.; GIANAROLI, L. *Gametes, development and function*. Roma: Serono Symposia: p.205-218. 1998.
- KASIMANICKAM, R., KASIMANICKAM, V., THATCHER, C. D., NEBEL, R. L., CASSELL, B.G.. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*. Vol. 67: p. 1004–1012. 2007.
- 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.
- KAWAMOTO, A., KAZUTOMO, O., KISHIKAWA, H., ZHU, L., AZUMA, C., MURATA, Y.. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. *Fertility and Sterility*. Vol. 71: p.497-501, 1999.
- KEVIN, R. A.. 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.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R. A.. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*. Vol. 163: p. 163–181. 1998.
- LENZI, A., PICARDO, M., GANDINI, L., DONDERO, F.. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*. Vol. 2: p. 246-256, 1996.

- LESSER, M. P.. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* Vol. 68: p. 253–278. 2006.
- LU, X. Y., WU, R. S. S.. UV induces reactive oxygen species, damages sperm, and impairs fertilisation in the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Marine Biology*. Vol. 148: p. 51–57. 2005a.
- MALLIDIS, C., WISTUBA, J., BLEISTEINER, B., DAMM, O. S., GROSS, P., WÜBBELING, F., FALLNICH, C., BURGER, M., SCHLATT, S.. In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. *Human Reproduction*. Vol. 26: p. 1641–1649. 2011.
- MARCHETTI, C., JOUY, N., LEROY-MARTIN, B., DEFOSSEZ, A., FORMSTECHER, P., MARCHETTI, P.. Comparison of four fluorochromes for the detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*. Vol. 19: p. 2267-2276. 2004.
- MATOS, D. L., ARAÚJO, A. A., ROBERTO, I. G., TONIOLLI, R.. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim.* Vol. 32 (4): p. 225-232. 2008. Disponível em www.cbra.org.br
- MISRA, R. B., LAL, K., FAROOQ, M., HANS, R. K.. Effect of solar UV radiation on earthworm (*Metaphire posthuma*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 62: p. 391–396, 2005.
- MOORE, H. D. M., AKHONDI, M. A.. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: Epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens. *J. Androl.* Vol. 17: p. 50–60. 1996.
- MORTIMER, S. T.. Casa - Practical aspects. *J Androl.* p.515-524, 2000.
- NAHON, S., PORRAS, V. A. C., PRUSKI, A. M., CHARLES, F.. Sensitivity to UV radiation in early life stages of the Mediterranean sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Science of the total environment*. Vol. 407: p. 1892 – 1900, 2009.
- NASCIMENTO, A. F., MARIA, A. N., PESSOA, N. O., CARVALHO, M. A. M., VIVEIROS, A. T. M.. Out-of-season sperm cryopreserved in different freezing media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science*. Vol. 118 (2): p. 324-29, 2010.

- NISHIMUNE, Y.; OKABE, M.. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. *Development and Growth Differentiation*. Vol.34: p.479-486, 1993.
- O'BRIEN, J. & ZINI, A.. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology*. Vol. 65: p. 16–22. 2005.
- O'CONNELL, M., MCCLURE, N., LEWIS, S. E. M.. The effect of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.* Vol 17: p. 704–709. 2002.
- PARTYKA A., NIZANSKI, W., LUKASZEEWICZ, E.. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*. Vol. 74: p. 1019-1027, 2010.
- PAZ, M. L., GONZÁLEZ MAGLIO, D. H., WEILL, F. S., BUSTAMANTE, J., LEONI, J.. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* Vol. 24: p. 115–122. 2008.
- POGANY, G. C., CORZETT, M., WESTON, S., BALHORN, R.. DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res.* Vol. 36: p. 136:127–36. 1981.
- RICK, I. P., MEHLIS, M., EßER, E., BAKKER, T. C. M.. The influence of ambient ultraviolet light on sperm quality and sexual ornamentation in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Oecologia* Vol. 174: p. 393–402. 2014.
- ROMÃO, R.; MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; BARBAS, J. P.; HORTA, A. E. M.; CAROLINO, N.; BETTENCOURT, E.; PLANCHÀ, C.; RODRIGUES, P., PEREIRA, R. M.. Evaluation of two methods of in vitro production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen. *Small Ruminant Research*. Vol.110: p. 36-41, 2013.
- RURANGWA, E., VOLCKAERT, F. A. M., HUYSKENS, G., KIME, D. E., OLLEVIER, F.. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in african catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*. Vol.. 55: p. 751-69, 2001.
- RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA-HIKKIM, A. P.. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River, p.1-40. 1990.

- SAACKE, R. G., NADIR, S., NEBEL, R. L.. Relationship of semen qualityto sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. Theriogenology. Vol. 41: p. 45–50. 1994.
- 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.
- SENGER, P. L.. Pathways to pregnancy and parturition. 2. ed. Pullman (WA): Current Conceptions, p. 271. 2003.
- SHARMA, R. K., SAID, T., AGARWAL, A.. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. Asian Jounal Andrology Vol. 6: p. 139–48. 2004.
- SILVA, A. E. D. F. Reação acrossómica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 38. 1998.
- SINGER, S. J., NICOLSON, G. L.. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. Vol.175: p. 720-31, 1972.
- SINGH, N. P., MULLER, C. H., BERGER, R. E.. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertil Steril. Vol. 80: p. 1420–30. 2003.
- STRYER, L. Estrutura e dinâmica de membranas. In: _____. (Ed). Bioquímica. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 245-271. 1996a.
- 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.
- VARELA JUNIOR, A. S., CORCINI, C. D., GHELLER, S. M. M., JARDIM, R. D., LUCIA, T., STREIT, D. P., FIGUEIREDO, M. R. C.. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropodus*. Theriogenology. Vol. 78: p. 244-51, 2012b.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K.. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. Vol. 57: p. 149-179, 2002.
- VERSTEGEN, J. P., ONCLIN, K., IGUER-OUADA, M.. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: in vitro and in vivo studies. Theriogenology. Vol. 64: p. 720-73. 2005.

- VETTER, R. D., KURTZMAN, A., MORI, T.. Diel cycles of DNA damage and repair in eggs and larvae of Northern Anchovy, *Engraulis mordax*, exposed to solar ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol.* Vol. 69: p. 27–33. 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.
- VICENTE-FIEL, S., PALACÍN, I., SANTOLARIA, P., FANTOVA, E., QUINTÍN-CASORRÁN, F. J., SEVILLA-MUR, E., YÁNIZ, J. L.. In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Animal Reproduction Science*. Vol.146: p. 15–20. 2014.
- VIVEIROS, A. T. M., NASCIMENTO, A. F., ORFÃO, L. H., ISAÚ, Z. A.. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, v. 74, n. 40, p. 551-56, 2010.
- WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POÓR, I., NADERI, L., MA, W., SCHNEIDER, L. A., RAZI-WOLF, Z., SCHÜLLER, J., SCHARFFETTER-KOCHANEK, K.. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B*. Vol. 63: p. 41–51. 2001.
- WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. Scientific assessment of ozone depletion. Global ozone Research and Monitoring Project 37, United Nations Environment Programme. 1994.
- YANAGIMACHI, R.. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, p. 189-317, 1994.
- YÁNIZ, J. L., PALACÍN, I., VICENTE-FIEL, S., SÁNCHEZ-NADAL, J. A., SANTOLARIA, P.. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Animal Reproduction Science*. Vol. 156: p. 128–134. 2015.
- YOUN, J. S., CHA, S. H., PARK, C. W., YANG, K. M., KIM, J. Y., KOONG, M. K., KANG, I. S., SONG, I. O., HAN, S. C.. Predictive value of sperm motility characteristics assessed by computer-assisted sperm analysis in intrauterine insemination with superovulation in couples with unexplained infertility. *Clin. Exp. Reprod. Med.* Vol. 38: p. 47–52. 2011.