

II SIMPÓSIO NACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO VII SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UFPA CAMPUS CASTANHAL

Inclusão, desenvolvimento socioambiental e produção de conhecimento na Amazônia

05 A 07
NOVEMBRO
2024



UFPA
CASTANHAL



Apoio:

PROEX
Pró-Reitoria de Extensão | UFPA

PROEG
Pró-Reitoria de Ensino de Graduação | UFPA

PROPESP
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação | UFPA

MORFOMETRIA DA CABEÇA ESPERMÁTICA UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGE-J DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE MACACO- DE-CHEIRO (*SAIMIRI COLLINSI*)

***MORPHOMETRY OF THE SPERM HEAD USING THE IMAGE-J SOFTWARE
OF CRYOPRESERVED SEMEN OF SQUIRREL MONKEY (SAIMIRI
COLLINSI)***

***MORFOMETRIA DE LA CABEZA DEL ESPERMATICA DEL SEMEN
CONGELADO DEL MONO ARDILLA (SAIMIRI COLLINSI) USANDO EL
SOFTWARE IMAGE-J***

Roberta Pampolha Athayde¹
Ester Vitória Gonzaga Damasceno²
Danuza Leão Leite³
Andressa Pantoja Ribeiro⁴
Fabrício Quaresma de Sousa⁵
Josye Bianca Santos⁶
Adriana Novaes dos Reis⁷
Sheyla Farhayldes Souza Domingues⁸

¹ Graduando de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará,
robertapamathayde@gmail.com

² Graduando de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará,
ester.gonzaga@castanhal.ufpa.br

³ Médica Veterinária, Centro Nacional de Primatas, danleao.88@gmail.com

⁴ Graduando de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará,
andressapantojar@gmail.com

⁵ Graduando de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará,
fabricioquaresma63@gmail.com

⁶ Doutoranda, Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia,
Universidade Federal do Pará, josyebssantos@gmail.com

⁷ Professora, Universidade Federal do Pará, adriananreis@gmail.com

⁸ Professora, Universidade Federal do Pará, shfarha@ufpa.br

PALAVRAS-CHAVE: primata neotropical, criopreservação espermática, biotecnologia da reprodução.

INTRODUÇÃO

A espécie *S. collinsi* é um importante modelo experimental para o desenvolvimento de técnicas de congelação de sêmen de primatas neotropicais (Sampaio et al., 2017). Contudo, ainda são necessários estudos que propiciem melhorias nos protocolos de congelação de sêmen nesta espécie (Oliveira et al., 2015). Desta forma, o objetivo deste estudo é analisar os efeitos da congelação na morfologia da cabeça espermática do sêmen de *S. collinsi* utilizando o software Image-J.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A cabeça do espermatozoide (SPTZ) é composta por três partes principais: núcleo que abriga o DNA altamente compactado (Steinberg et al., 2019); acrossoma, uma estrutura vesicular localizada na porção anterior da cabeça, contendo enzimas necessárias para a penetração na zona pelúcida do óvulo (Moore, 2008); e a membrana plasmática que envolve a cabeça do SPTZ, e é crucial para a manutenção da integridade celular (Holt, 2000).

O processo de criopreservação do sêmen envolve as etapas de coleta, diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento (Sieme; Oldenhof; Wolkers, 2015). No sêmen *in natura*, os SPTZ mantêm sua morfologia íntegra, com a preservação do acrossoma e do núcleo (Blesbois; Brillard, 2007). Na etapa de diluição, espera-se que o diluidor seja capaz de manter a morfologia normal e funcionalidade dos SPTZ para as etapas subsequentes (Morrell; Hodges, 1998).

Durante o resfriamento gradual, que podem alcançar temperaturas entre -5°C e -10°C, os SPTZ são expostos a estresses térmicos (Sieme; Oldenhof; Wolkers, 2015), que podem provocar desordens na compactação do DNA e danos ao acrossoma (Watson, 2000). Evidências sugerem que o processo de resfriamento pode levar à desestabilização parcial do acrossoma e à perda da integridade nuclear, resultando em alterações morfológicas na cabeça dos SPTZ (Woelders; Zuidberg; Hiemstra, 2006). A adição de crioprotetores extracelulares no resfriamento, como a gema de ovo, promovem estabilidade da membrana plasmática, interagindo com as moléculas que formam a bicamada de fosfolipídeos (Morrell; Hodges, 1998).

Na etapa de congelação, são adicionados crioprotetores intracelulares, que previnem a formação de cristais de gelo intracelulares, os quais podem promover a ruptura de estruturas intracelulares (Getachew; Goshu; Lemma, 2023). Após congelação e descongelamento, o acrossoma frequentemente exibe rupturas ou até mesmo a completa perda de sua estrutura, o que compromete a liberação eficiente das enzimas hidrolíticas essenciais para o processo de fertilização (Royere et al., 1991) e o núcleo pode apresentar dispersão da cromatina ou fragmentação do DNA, fatores que aumentam significativamente o risco de infertilidade (Hammerstedt; Graham, 1992).

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

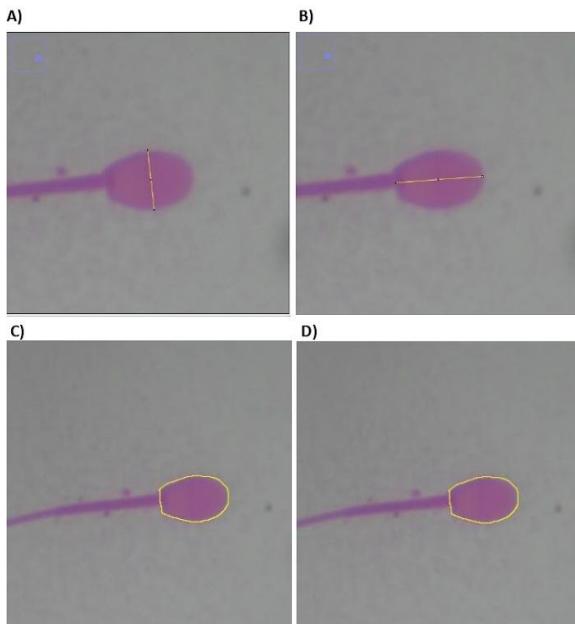
Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelos órgãos ambientais (Ministério do Meio Ambiente, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade SISBIO/ICMBio/MMA nº69137-1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto Evandro Chagas (nº.25/2019/CEPAN/IEC/SVS/MS).

Entre setembro de 2023 e fevereiro de 2024, foram realizadas coletas de sêmen em seis machos adultos de *Saimiri collinsi* do Centro Nacional de Primatas (CENP) em Ananindeua, PA. A coleta foi feita por eletroejaculação, com os animais previamente contidos e anestesiados, e os procedimentos de diluição e congelação ocorreram no Laboratório de Reprodução Animal do CENP. A avaliação da morfometria espermática foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (BIOMEDAM), em Castanhal, PA.

Dois diluentes foram preparados, com a fração A contendo Tes-Tris e a fração B contendo BotuBOV®. O sêmen foi incubado em banho-maria por uma hora com a fração A e, após esse período, foi realizado o resfriamento, a fração B foi adicionada gradualmente a cada 10 minutos, finalizando o resfriamento em 90 minutos a -4°C. Os SPTZ foram analisados em quatro etapas: *in natura*, diluído em fração A, resfriado contendo a fração B e descongelado.

Para a morfometria da cabeça espermática, esfregaços foram preparados com 5 µL de corante rosa bengala e 5 µL de sêmen, em lâminas pré-aquecidas a 37°C, sendo fotografados 50 SPTZ por lâmina, totalizando 600 imagens, capturadas por microscopia de campo claro (NIKON Eclipse Ni-U) com aumento de 1000x. As imagens foram analisadas no software Image-J, medindo quatro parâmetros da cabeça: área, perímetro, comprimento e largura. A análise estatística foi realizada no Graphpad Prism 9.3.1, utilizando testes de Kolmogorov-Smirnov e ANOVA para avaliar diferenças significativas entre as etapas analisadas.

FIGURA 1. Morfometria da cabeça dos espermatozoides com o software Image J. A) e B) representam a mensuração de largura e comprimento, respectivamente. C) representa o perímetro. D) corresponde à área. Fonte: Autoria própria (2024).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias quanto ao comprimento, largura, perímetro e área da cabeça nas quatro etapas do processo de congelação estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1: Média (\pm DP) da morfometria espermática em espermatozoide de *Saimiri collinsi* nas diferentes etapas de congelação.

Parâmetros	In Natura	Diluído	Resfriado	Descongelado
Comprimento	$5590 \pm 341,1^{\text{ab}}$	$5674 \pm 294,4^{\text{a}}$	$5534 \pm 363,2^{\text{b}}$	$5406 \pm 241,4^{\text{c}}$
Largura	$3956 \pm 242,2^{\text{b}}$	$4053 \pm 186,3^{\text{a}}$	$3954 \pm 170,2^{\text{b}}$	$3929 \pm 185,0^{\text{b}}$
Perímetro	$16387 \pm 752,8^{\text{b}}$	$16834 \pm 791,8^{\text{a}}$	$16179 \pm 806,5^{\text{b}}$	$15925 \pm 582,2^{\text{c}}$
Área	$18513 \pm 1446^{\text{b}}$	$19383 \pm 1405^{\text{a}}$	$17928 \pm 1662^{\text{b}}$	$17442 \pm 1120^{\text{c}}$

^{a-c} Letras minúsculas diferentes entre colunas significam diferença estatística entre as etapas de criopreservação ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos demonstram que houve aumento da cabeça dos SPTZ com a diluição seminal, e diminuição das médias nas etapas subsequentes do processo de congelação. As alterações dos parâmetros lineares observadas neste estudo podem estar associadas ao padrão de osmolaridade da membrana, que, por meio de gradientes de concentração, regula o fluxo de água para dentro e fora da célula (Sieme; Oldenhoef; Wolkers, 2015).

Sugere-se que na etapa de diluição, na qual o sêmen foi expandido apenas em Tes-Tris, esta gerou um meio extracelular hipotônico, promovendo a entrada de água na célula (Sieme; Oldenhoef; Wolkers, 2015), resultando em médias mais elevadas. Em contraste, nas etapas de resfriamento e congelação-descongelação, na qual houve a adição do crioprotetor Botu-BOV® que é acrescido de crioprotetores extra e intracelular (Arakaki et al., 2019), observaram-se médias reduzidas, sugerindo que houve uma desidratação, a qual é prevista nestas etapas (Morrell; Hodges, 1998). O gradiente osmótico e a temperatura são responsáveis pelos dois processos cinéticos que ocorrem durante a congelação, a perda de água da célula e o crescimento do gelo intracelular, respectivamente, e podem interferir diretamente nos parâmetros morfológicos do SPTZ (Sieme; Oldenhoef; Wolkers, 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da morfometria da cabeça espermática em *Saimiri collinsi* revelou importantes alterações decorrentes das etapas de congelação seminal, que impactam diretamente na morfologia dos SPTZ. A análise morfométrica da cabeça se mostrou uma ferramenta valiosa para avaliar essas mudanças, contribuindo para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação mais eficazes para esta espécie.

REFERÊNCIAS

- ARAKAKI, P. R. et al. Semen cryopreservation in golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*. **American Journal of Primatology**, v. 81, n. 12, p. e23071, 2019.
- BLESBOIS, E.; BRILLARD, J. P. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. **Animal**, v. 1, n. 10, p. 1472–1481, 2007.
- GETACHEW, T.; GOSHU, G.; LEMMA, A. Effects of Using Commercial and Homemade Extenders on Sperm Quality of Liquid Stored Semen of Horro Chicken Breed. **Journal of World's Poultry Research**, 2023.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, n. 1, p. 26–38, 1 fev. 1992.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47–58, 1 jan. 2000.
- MOORE, K. L. **Embriologia Basica**. Elsevier Brasil, 2008.
- MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1–4, p. 43–63, out. 1998.
- OLIVEIRA, K. G. et al. Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. **Theriogenology**, v. 84, n. 5, p. 743–749.e1, set. 2015.
- ROYERE, D. et al. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 5, p. 328–332, out. 1991.
- SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 50 Suppl 3, p. 20–26, set. 2015.
- STEINBERG, E. R. et al. Sperm Morphology in Neotropical Primates. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 839, out. 2019.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2 jul. 2000.

WOELDERS, H.; ZUIDBERG, C. A.; HIEMSTRA, S. J. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. **Poultry Science**, v. 85, n. 2, p. 216–222, fev. 2006.

SAMPAIO, W.V.; OLIVEIRA, K.G.; LEÃO, D.L.; CALDAS-BUSSIERE, M.C.; QUEIROZ, H.L.; PAIM, F.P.; DOMINGUES, S.F.S. Morphologic Analysis Of Sperm From Two Neotropical Primate Species: Comparisons Between The Squirrel Monkeys Saimiri Collinsi And Saimiri Vanzolinii. **Zygote**, 2017.