



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LUANA GRASIELE PEREIRA BEZERRA

**DESCRIÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE ESPERMATOZOIDES A FRESCO E
CRIOPRESERVADOS DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

MOSSORÓ-RN

2018

LUANA GRASIELE PEREIRA BEZERRA

**DESCRIÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE ESPERMATOZOIDES A FRESCO E
CRIOPRESERVADOS DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido, como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva, Prof.
Dr.

Co-orientadora: Ana Liza Paz Souza Batista,
Profa. Dra.

MOSSORÓ

2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B574 Bezerra, Luana Grasielle Pereira.
d Descrição ultraestrutural de espermatozoides a fresco e criopreservados de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). / Luana Grasielle Pereira Bezerra. - 2018.
77 f. : il.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva.
Coorientador: Ana Liza Paz Souza Batista.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2018.

1. Biobanco. 2. espermatozoide. 3. microscopia eletrônica de transmissão. 4. microscopia eletrônica de varredura. 5. mamíferos silvestres.
I. Silva, Alexandre Rodrigues, orient. II. Batista, Ana Liza Paz Souza, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LUANA GRASIELE PEREIRA BEZERRA

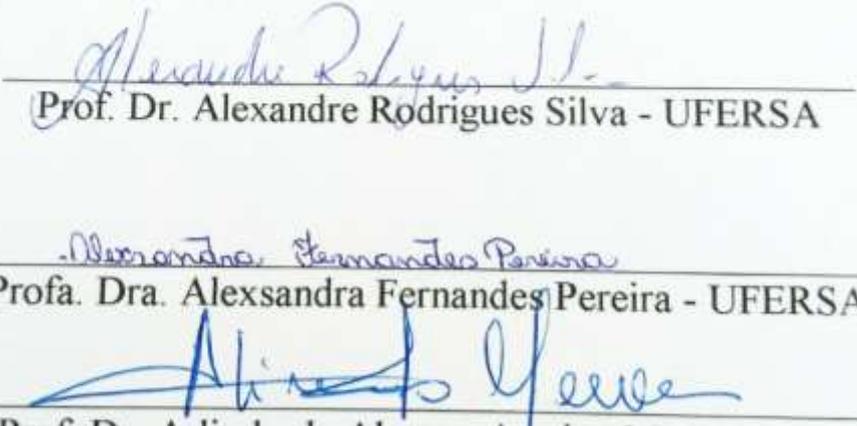
**DESCRIÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE ESPERMATOZOIDES A FRESCO E
CRIOPRESERVADOS DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido, como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia.

Defendida em: 29 de junho de 2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva - UFERSA

Prof.ª Dra. Alexsandra Fernandes Pereira - UFERSA

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura - UFC

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LUANA GRASIELE PEREIRA BEZERRA – Nascida no Município de Mossoró – RN, no dia 12.01.1990, filha de Almir Bezerra da Silva e Maria do Socorro Pereira da Silva, concluiu o Ensino Médio no colégio Classe A em Porto Velho-RO. Graduou-se em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2015.2, onde foi bolsista do Programa de Iniciação Científica Institucional (PICI) por sete meses e do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) por dois anos e cinco meses. Durante a graduação, desenvolveu trabalhos com tecnologia de sêmen e conservação de material genético de espécies silvestres. Em dezembro de 2015, foi selecionada para cursar mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA/UFERSA).

A **Luiz Neto Pereira** (*in memoriam*), meu tio, que muito amou sua família e foi um incentivador durante minha trajetória na graduação e mestrado.

A minha família e amigos que fizeram do meu sonho realidade, proporcionando forças para que eu não desistisse de ir atrás do que eu buscava para minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai Celestial pelo seu imenso amor por mim, pelo dom da vida, pela oportunidade de obter mais conhecimento, melhorar minha formação e me aperfeiçoar como ser humano. Pela saúde e proteção todos os dias em que precisei ficar fora de casa e por ter colocado pessoas tão boas em meu caminho que me ajudaram imensamente.

Ao meu melhor exemplo, Jesus Cristo, que sempre me dá força e coragem nos momentos de maiores dificuldades.

Aos meus pais, Almir Bezerra da Silva e Maria do Socorro Pereira da Silva, muito obrigada pelo amor incondicional, pela educação que vocês proporcionaram a mim e ao Roni Pereira. Sei dos muitos sacrifícios para nos criar. Muito obrigada pelo exemplo de pessoas que vocês são nos ensinando sempre o caminho da honestidade. Amo vocês!

A minha melhor escolha, meu eterno companheiro, Maicon Alves Araújo, obrigada por ser meu refúgio, minha base de sustentação muitas vezes que pensei que desmoronaria, obrigada pelo seu amor, carinho, paciência, conselhos, apoio e cuidado constante. Sem você esse caminho teria sido bem mais difícil. Te amo para sempre vida!

Ao irmão mais chato e legal de todos, Roni Pereira, muito obrigada pela amizade.

Aos avós mais fofos que alguém poderia ter, Vovó Raimunda Gomes e Vovô João Barnabé, muito obrigada por tudo que vocês me ensinam. Amo vocês!

Aos meus tios, tias, primos e primas muito obrigada pelo apoio!

A minha sogra Dona Socorro Alves obrigada por ligar quase todos os dias enquanto estive em Fortaleza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva, por ter me aceitado como orientanda e assim ter permitido que eu fizesse parte do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal. Muito obrigada pelos ensinamentos, por ser um exemplo de profissional responsável, competente, honesto e por sua dedicação.

A minha co-orientadora, Ana Liza Souza, por estar comigo desde a iniciação científica contribuindo com o meu amadurecimento acadêmico, pelos ensinamentos na bancada, na vida e todas as considerações em nossos trabalhos. Obrigada também pela amizade!

A minha segunda família, obrigada Família LCGA! Obrigada por me ensinar o valor do trabalho em equipe. De fato, aquele que caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza vai mais longe!!! Obrigada as amigas Livia Campos, Andréia Silva, Camila Praxedes e Lizziane Constância pelo companheirismo, por me escutarem nos momentos de aflições, pelos conselhos, ensinamentos e momentos de descontração! Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura e ao Fabio Vasconcelos pelo intermédio junto à Central Analítica da UFC onde foram realizadas as imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Herlon Victor Rodrigues Silva por ter me ajudado com a Microscopia Eletrônica de Transmissão.

As minhas vizinhas de condomínio durante minha temporada em Fortaleza e colegas de laboratório, Moêmia Portela, Kamila Sousa e Arabela Guedes, obrigada por tudo meninas!

As minhas amigas de Belém, Patrícia Souza e Danuza Leão, muito obrigada pela energia positiva de vocês, pela calma e tranquilidade que sempre me passavam!

Aos componentes da banca por terem aceitado o convite, pelos comentários e correções do trabalho.

Ao Prof. Dr. Moacir por estar sempre disponível nos ajudando nas coletas.

As pessoas que me hospedaram em Fortaleza, Dona Aurilene, Thiago Fernandes, João Xavier e Dona Rosélia Fernandes, muito obrigada por terem me acolhido quando eu mais precisei!

A equipe do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres por cuidar dos animais e por todo suporte durante as coletas.

Aos animais, sem eles não existiria essa pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido pela contribuição em minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse a este momento.

Muito Obrigada!

*“Só podemos alcançar o impossível,
Se acreditarmos que é possível”*

Alice no País das Maravilhas

DESCRIÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE ESPERMATOZOIDES A FRESCO E CRIOPRESERVADO DE CATETOS (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). BEZERRA, Luana Grasielle Pereira. Descrição ultraestrutural de espermatozoides a fresco e criopreservados de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2018.

RESUMO: A presente dissertação teve por objetivo descrever a ultraestrutura de espermatozoides frescos e criopreservados de catetos por meio das microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET). Para tanto, três catetos machos adultos foram submetidos à eletroejaculação e o sêmen obtido foi imediatamente avaliado quanto à motilidade, integridade e funcionalidade da membrana, integridade da cromatina e morfologia por meio da microscopia de luz. Posteriormente, as amostras foram criopreservadas em diluente Tris acrescido de gema de ovo (20%) e glicerol (6%), descongeladas após uma semana e avaliadas. Amostras de sêmen fresco e descongelado foram combinadas em pools distintos de espermatozoides que foram processados para MEV e MET, sendo microfotografadas e avaliadas. Após a descongelação, observou-se um declínio na motilidade espermática, integridade e funcionalidade da membrana ($P < 0,05$), porém a morfologia espermática e a integridade da cromatina avaliadas pela microscopia de luz não foram significativamente afetadas. Por meio da MEV, identificou-se que os espermatozoides de catetos apresentam cabeça achatada em forma de pá, medindo $6,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de comprimento e $3,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de largura, com um vasto acrossomo ($4,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$) apresentando uma clara demarcação entre a região pós-acrossomal, sendo delimitada por uma borda distendida, denominada de espessamento marginal. As caudas normais mediram $38,1 \mu\text{m}$, sendo formadas por uma extensa peça intermediária de $15,5 \mu\text{m}$ de comprimento. Nas amostras descongeladas, tanto a MEV quanto a MET forneceram informações sobre crioinjúrias não detectadas através da microscopia de luz como a presença de vesículas no acrossomo, membrana plasmática frouxa, mitocôndrias vacuolizadas, fibras densas desorganizadas e cromatina descondensada. Em conclusão, o presente estudo fornece a primeira descrição da ultraestrutura dos espermatozoides de catetos. Além disso, a MEV e a MET contribuíram na identificação de alguns danos nanométricos provocados pelo processo de criopreservação, fornecendo informações valiosas para o aprimoramento de importantes protocolos usados para a formação de biobancos.

Palavras-chaves: Biobanco, espermatozoide, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, mamíferos silvestres

ULTRASTRUCTURAL DESCRIPTION OF FRESH AND CRYOPRESERVED SPERMATOOZOA FROM COLLARED PECCARIES (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758).

BEZERRA, Luana Grasielle Pereira. Ultrastructural description of fresh and cryopreserved spermatozoa from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). 2018. Thesis (Master degree in Animal Science: Morphophysiology and Animal Biotechnology) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2018.

ABSTRACT: The objective of the present work was to describe the ultrastructure of fresh and cryopreserved spermatozoa from collared peccaries by scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Three adult males were submitted to electroejaculation and semen was immediately evaluated for motility, membrane integrity and functionality, chromatin integrity and morphology. Subsequently, the samples were cryopreserved in Tris extender plus egg yolk (20%) and glycerol (6%), thawed after one week and evaluated. Samples of fresh and frozen-thawed semen were combined in distinct pools that were processed for SEM and TEM,. After thawing, there was a decline in sperm motility, membrane integrity and functionality ($P < 0.05$), sperm morphology and chromatin integrity assessed by light microscopy were not significantly affected. Analysis by SEM revealed that collared peccaries' sperm presents a flattened head in a paddle format, measuring $6.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in length and $3.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in width. Collared peccaries' sperm had a long acrosome ($4.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$), presenting a clear demarcation across the post-acrosomal region, being delimited by a distended border, called the marginal thickening. Normal tails measured $38.1 \mu\text{m}$, formed by an extensive midpiece with $15.5 \mu\text{m}$ in length. In frozen-thawed analysis by SEM and TEM detected presence of vesicles in the acrosome, loose plasma membrane, vacuolized mitochondria, dense fibers disorganized, and decondensed chromatin. In conclusion, we provide the first description of the ultrasctruture on sperm from collared peccaries. Moreover, SEM and TEM help us to identify some nanometric damage caused by freezing-thawing procedures, thus providing valuable information for the improvement of protocols used for biobanking formation.

Keywords: Biobank, spermatozoa, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, wild mammals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura. (Fonte: Dedavid; Gomes; Machado, 2007).....27

Figura 2. Comparação entre microscópio óptico, microscópio eletrônico de varredura e microscópio eletrônico de transmissão (Fonte: Cruz, 2009).30

CAPÍTULO 1

Figure 1. Morphological defects found in fresh and frozen- thawed sperm from collared peccaries. (A) Normal sperm. (B) - Defect in acrosome. (C) - Detached head (arrow). (D) – Abnormal head. (E) – Coiled tail. (F) – Midpiece broken at neck. 71

Figure 2. Scanning electron micrograph of fresh sperm from collared peccaries. (A) - normal sperm, H: head, IP: intermediate piece and MP: main part. (B) - sperm head with plasma membrane integrity, marginal tracking (MT) surrounding the acrosome (Ac) which is relatively long, clear demarcation between the acrosome and the post-acrosomal area (PA). 72

Figure 3. Scanning electron micrograph of frozen-thawed sperm from collared peccaries (Pecari tajacu) showing injuries. (A) - normal sperm. (B) - sperm with broken tail. (C) acrosome damaged. (D) - loose plasma membrane. (E) - bent tail..... 73

Figure 4. Transmission electron microscopy of fresh sperm from collared peccaries. (A) - transverse cut of the sperm head, acrosome (Ac), surrounding the nucleus (Nu), possibly start of acrosomal reaction shown by the formation of a vesicle (arrow). (B) and (C) - longitudinal and transversal cut respectively of the main piece with integral axonema (Ax) and outer dense fibers (ODF) surrounded by the fibrous sheath (FS) supported by the longitudinal columns (asterisk). (D) and (E) - transversal and longitudinal sections respectively of the intermediate piece showing the mitochondria (M) juxtaposed forming the mitochondrial sheath involving the outer fibrous sheath (OFS) formed by the outer dense fibers and plasma membrane (arrow) with ripples. 74

Figure 5. Transmission electron microscopy of frozen-thawed sperm from collared peccaries (*Pecari tajacu*). (A) - longitudinal section of the spermatozoa head showing the loose plasma membrane (arrow), the irregularly shaped acrosomes. (B) - presence of vesicles (V) around sperm heads demonstrating acrosomal reaction and electron lucent nuclear dot (arrows). (C) - Longitudinal cut of the intermediate piece showing loose plasma membrane (arrow), mitochondria (M) with vacuolization. (D) - Cross section of intermediate piece showing disorganization of the fibers and loss of mitochondria.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características do sêmen de catetos obtidos por eletroejaculação. 19

CAPÍTULO 1

Table 1. Morphological defects (mean \pm SEM) detected on collared peccaries' fresh and frozen-thawed sperm through light microscopy. 70

LISTAS DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor
>	Maior
10 ⁶	Milhões
°C	Graus Celsius
Kg	Kilograma
G	Gramma
µg	Micrograma
g/mol	Gramma/mol
ml	Mililitro
µL	Microlitro
M	Molar
Mol/L	Mol/litro
mOsm	Miliosmol
Cm	Centímetro
Nm	Nanômetro
H	Hora
Min	Minuto
S	Segundo
N ₂	Nitrogênio
Ca ²⁺	Íon Cálcio
Ax	Axonema
N	Núcleo
n°	Número
Fig	Figura
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Tri-fosfato
CASA	Análise Computadorizada de Sêmen
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
CEUA	Comitê de Ética e Uso de Animais

CFDA	6-Diacetato de Carboxifluoresceína
EP	Erro Padrão
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Desoxyribonucleic Acid)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais
ICMbio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IP	Iodeto de Propídio
IUCN	União Internacional de Conservação da Natureza (International Union for Conservation of Nature)
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
ME	Microscopia eletrônica
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
pH	Potencial hidrogeniônico
RN	Rio Grande do Norte
SE	Erro Padrão
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. ASPECTOS REPRODUTIVOS DO CATETO MACHO	19
2.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE CATETOS ESTADO DA ARTE	20
2.3. CRIOINJÚRIAS EM ESPERMATOZOIDES	22
2.4. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES	23
2.5. USO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA PARA AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS ESPERMÁTICAS	26
2.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura	26
2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão	29
REFERÊNCIAS	33
3. JUSTIFICATIVA	43
4.1. OBJETIVO GERAL	44
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
CAPÍTULO 1	45
Ultrastructural description of fresh and frozen-thawed sperm derived from collared peccaries (<i>Pecari tajacu</i> Linnaeus, 1758)	45
ANEXO A: Carta de submissão do artigo “ Ultrastructural description of fresh and frozen/thawed sperm derived from collared peccaries (<i>Pecari tajacu</i> Linnaeus, 1758) ”	76

1. INTRODUÇÃO

Os catetos são mamíferos silvestres amplamente distribuídos no continente americano. Eles possuem um importante papel ecológico na manutenção de florestas tropicais pois são dispersores de sementes e predadores de várias espécies vegetais (BRICEÑO-MÉNDEZ et al., 2017). Adicionalmente, fazem parte da dieta de grandes felídeos, contribuindo para a manutenção de seus predadores (SCOGNAMILLO et al., 2003). Os catetos também modificam fisicamente ambientes, criando habitats que podem ser colonizados por outras espécies, sendo conhecidos como engenheiros de ecossistemas. Na Amazônia peruana, eles mantêm *wallows* que funcionam como local de reprodução para espécies de anuros durante as estações secas (BECK; THEBPANYA; FILIAGGI, 2010).

Mesmo sendo muito importantes na natureza, os caititus encontram-se quase ameaçados na Mata Atlântica devido principalmente a perda de habitat e a caça predatória (DESBIEZ et al., 2012). Já ao leste e sul da Argentina, a espécie encontra-se já extinta (GONGORA et al., 2011). Desta forma, o decréscimo populacional dos catetos pode acarretar enormes prejuízos uma vez que essa espécie é de extrema importância para a manutenção da biodiversidade (SILVA et al., 2011). Neste sentido, estudos acerca da sua biologia reprodutiva são essenciais para auxiliar o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas que possam contribuir para a sua própria conservação, bem como serem extrapoladas para espécies filogeneticamente próximas como o taguá (*Catagonus wagneri*), o qual tem sido classificado como ameaçado de extinção (ALTRICHTER et al., 2015).

Estudos abordando os aspectos reprodutivos dos machos (GARCIA; KAHWAGE; OHASHI, 2009), características do sêmen (PEIXOTO et al., 2012), morfologia espermática (SOUSA et al., 2013a). A aplicação de biotécnicas reprodutivas como a vitrificação de tecido testicular (SILVA et al., 2017), criopreservação de espermatozoides epididimários (BEZERRA et al., 2014) e sêmen (CASTELO et al., 2010a) também já foram relatadas.

Embora os atuais dados de morfometria dos espermatozoides de catetos forneçam importantes informações, a técnica utilizada por Sousa et al. (2013a) por meio da microscopia de luz, com um poder de resolução e aumento limitados, não permitiu análise de danos ultraestruturais, os quais muitas vezes são as reais causas dos defeitos de cabeça e cauda antes e após a criopreservação (MORIETTI; SUTERA; COLLODEL, 2016). Adicionalmente, existe a necessidade de investigar os danos ocorridos durante a criopreservação de sêmen buscando o aperfeiçoamento dos protocolos de congelamento e conseqüentemente melhores resultados (HASHIDA et al., 2005; FRANCISCATO, 2015). Nesse contexto a microscopia eletrônica

(ME) surge como um método eficaz para a análise morfológica em escala nanométrica, pois possui maior poder de resolução e aumento (KLEIN; BUHR; FRASE, 2012). Com a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é possível obter micrografias tridimensionais com minúcias da superfície e da profundidade, e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) fornece imagens bidimensionais, permitindo a observação do interior do tecido ou célula com riqueza de detalhes (GALLETI, 2003). Dessa forma, a ME parece ser uma ferramenta valiosa para caracterizar a ultraestrutura de espermatozoides de catetos, bem como os danos sofridos durante o processo de criopreservação.

Assim, tendo em vista a importância dos conhecimentos acerca da fisiologia reprodutiva de catetos, bem como o aprimoramento das biotécnicas reprodutivas, justifica-se a realização deste estudo por possibilitar maior precisão quanto ao conhecimento da ultraestrutura de espermatozoides frescos e dos danos causados pela criopreservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS REPRODUTIVOS DO CATETO MACHO

Os catetos em condições normais reproduzem-se o ano todo e sua maturidade sexual é atingida por volta dos 11 meses (BELLANTONI, 1991). Apresentam bolsa escrotal localizada na região pélvica entre a região perineal e inguinal (SONNER; SANTOS; MIGLINO, 2004). Os testículos são de formato ovalado achatado, pesando em torno de $23,7 \pm 1,8$ g, possuindo no testículo direito $4,7 \pm 0,3$ cm de comprimento, $2,4 \pm 0,3$ cm de altura e $2,1 \pm 0,3$ cm de largura. Já no testículo esquerdo, o comprimento é de $4,7 \pm 0,4$ cm, a altura de $2,4 \pm 0,3$ cm, largura de $2,1 \pm 0,3$ cm e um volume testicular médio de $33,9 \pm 6,2$ cm³ (COSTA et al., 2010; PEIXOTO et al., 2012). Segundo Costa et al. (2010), o ciclo espermatogênico (com base em 4,5 ciclos) e a espermatogênese tem duração de $12,3 \pm 0,2$ e $55,1 \pm 0,7$ dias, respectivamente, sendo a produção diária de espermatozoides por grama de testículo de aproximadamente $23,4 \pm 2,0 \times 10^6$. O pênis do cateto apresenta-se na forma espiralada, semelhante ao do suíno doméstico (SOUZA, 2015).

Para a obtenção do ejaculado de catetos, o método utilizado tem sido a eletroejaculação (CASTELO et al., 2010a), fazendo-se necessário o uso de anestésico tanto para o bem estar do animal como da equipe que o assiste (COSTA; PAULA, 2005; SOUZA et al., 2009). O sêmen possui três frações: uma clara (constituída de secreção das glândulas acessórias, pobre em células), uma rica (que contém a maior parte das células espermáticas ejaculadas) e uma fração gel (COSTA; PAULA, 2005). Outras características foram relatadas por Peixoto et al. (2012) que avaliaram um total de 52 amostras provenientes de catetos criados no semiárido brasileiro e observaram as características contidas na tabela 1.

Tabela 1. Características do sêmen de catetos obtidos por eletroejaculação.

Parâmetros Seminais	Médias \pm Erro Padrão
Volume (mL)	$3,5 \pm 3,8$
Concentração (espermatozoides/mL) ($\times 10^9$)	$0,8 \pm 0,7$
Motilidade (%)	$85,1 \pm 10,7$
Vigor (%)	$4,2 \pm 0,9$
Viabilidade da membrana espermática (%)	$86,3 \pm 13,3$
Funcionalidade da membrana espermática (%)	$76,9 \pm 13,2$
Morfologia normal (%)	$79,9 \pm 12,8$

Fonte: Peixoto et al. (2012).

A morfometria espermática também já foi determinada por meio de microscopia de luz, observando que a cabeça do espermatozoide de cateto se apresenta de forma discretamente alongada com uma base mais fina que o ápice medindo $6,3 \pm 0,02$ μm de comprimento e $4,2 \pm 0,02$ de largura. A cauda é inserida na região posterior da cabeça pela peça de conexão, possui um formato cônico, estreitando-se à medida que se aproxima da porção final, ocupando 89% do tamanho de todo espermatozoide medindo cerca de $32,2 \pm 0,08$ μm de comprimento. Já a peça intermediária, encontra-se na porção anterior da cauda, medindo $13,3 \pm 0,03$ μm de comprimento (SOUSA et al., 2013a).

Além disso, a caracterização do perfil proteico do plasma seminal já foi realizada. Santos et al. (2014) detectaram 23 proteínas no plasma seminal, sendo as mais abundantes as clusterínas, espermadesinas PSP1 e bodesinas 2 exercendo importantes funções na proteção espermática e participando da interação entre oócito e espermatozoide.

Adicionalmente aos estudos descritivos dos aspectos reprodutivos dos catetos foram realizadas pesquisas envolvendo a aplicação de biotécnicas reprodutivas, como a criopreservação de sêmen para a conservação do material genético por longos períodos, sendo o primeiro passo para a formação de bancos de germoplasma visando a conservação da espécie (CASTELO et al., 2010).

2.2. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE CATETOS ESTADO DA ARTE

Com o intuito de salvaguardar o material genético de catetos, tanto com fins de conservação como de multiplicação daqueles espécimes zootecnicamente interessantes, têm sido desenvolvidas várias pesquisas no tocante à formação de biobancos, tendo como principal ponto de partida a criopreservação do sêmen destes animais (SILVA et al., 2011). Neste sentido, o primeiro sucesso foi relatado por Castelo et al. (2010a), os quais demonstraram que o sêmen poderia ser congelado em um diluente à base de Tris-hidroximetil-aminometano (TRIS) adicionado de frutose ou glicose, gema de ovo e glicerol, obtendo após da descongelação motilidades totais por volta de 35% e 45% de viabilidade. Além disso, demonstraram não ser necessária a centrifugação das amostras, principalmente por que os espermatozoides parecem ser bastante sensíveis a este procedimento, o qual lhes promoveu um aumento no percentual de células decapitadas. Castelo et al. (2010b) ainda testaram dois protocolos de descongelação (37 °C por 1 min ou 55 °C por 7 s, seguidos de 30 s adicionais a 37 °C), descongelando com sucesso

as amostras com ambos protocolos, alcançando motilidade pós-descongelação em torno de 30%, sem diferença significativa entre os mesmos.

Como alternativa ao diluente à base de Tris, testou-se um diluente à base de água de coco em pó (ACP®), o qual possibilitou a obtenção de recuperação de $48 \pm 6,1\%$ de espermatozoides móveis pós-descongelação (SILVA et al. 2012). No uso deste mesmo diluente, os autores demonstraram ser possível a criopreservação de sêmen utilizando-se uma curva mais rápida ($-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) que a preconizada nos experimentos anteriores ($-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Além disso, demonstraram que as amostras poderiam ser armazenadas tanto em palhetas de 0,25 mL quanto nas de 0,5 mL, sendo sugerida a descongelação a $37^{\circ}\text{C}/1$ min, uma vez que a descongelação a $70^{\circ}\text{C}/8$ s reduziu a viabilidade das células (SILVA et al., 2013).

Em termos de crioprotetores, Alves et al. (2013) testaram diferentes associações entre a gema de ovo (5, 10 e 20%) como crioprotetor externo e o glicerol (3 ou 6%) como crioprotetor interno para o sêmen, adicionados ao diluente à base de Tris. Os autores concluíram que os melhores resultados de viabilidade espermática ($47,8 \pm 5\%$) foram obtidos quando utilizada a associação entre 20% de gema de ovo e 3% de glicerol. Entretanto, por se tratar de um produto biológico, a gema de ovo pode carrear substâncias contaminantes e quando utilizado no sêmen pode prejudicar a qualidade do mesmo e ainda veicular doenças através da sua utilização em técnicas reprodutivas como a inseminação artificial (PILLET et al., 2011). Assim, Souza et al. (2015) mostraram ser possível a utilização da lipoproteína de baixa densidade (LDL) purificada ao invés da gema de ovo por completo, como componente do diluente à base de Tris para a congelamento do sêmen de catetos. Posteriormente, estes mesmos autores (SOUZA et al., 2016) demonstraram a possibilidade de substituir totalmente a gema de ovo pelo gel de *Aloe vera* a 20%, não apenas para a criopreservação do sêmen, mas também para sua refrigeração por até 36 horas.

Além da procura de bons parâmetros espermáticos pós-descongelação, há uma busca por uma maior longevidade da célula espermática após a criopreservação, tendo em vista o tempo que o espermatozoide precisa para chegar ao oócito e fecundá-lo. Campos et al. (2014) por meio de um teste de termorresistência em espermatozoides descongelados, observou uma viabilidade espermática satisfatória por apenas 15 min após a descongelação. Recentemente, Bezerra et al. (2017) propuseram a adição de um detergente à base de dodecil sulfato de sódio (Equex STM® paste) ao diluente, o que possibilitaria duplicar o tempo de viabilidade espermática após a descongelação.

Apesar dos grandes avanços obtidos no desenvolvimento de protocolos para a criopreservação do sêmen de catetos, é notória a necessidade de aperfeiçoamento dos mesmos no intuito de promover uma melhor viabilidade e longevidade das células após a descongelação. Assim, para evitar as crioinjúrias decorrentes do processamento, é necessário conhecê-las em profundidade, objetivando, desse modo, um ajuste dos protocolos.

2.3. CRIOINJÚRIAS

Para que o protocolo de congelação seja considerado eficaz, o espermatozoide deve manter a capacidade fecundante após a descongelação e, para tanto, deve ser capaz de manter a habilidade de produzir energia via metabolismo, manter a configuração normal e integridade da membrana plasmática, manter sua motilidade, bem como a integridade acrossomal (LEMMA, 2011). No entanto, o processo de criopreservação pode causar danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais à célula, comprometendo a motilidade, viabilidade e a capacidade fecundante do espermatozoide (LEBOEUF; RESTALL; SALAMON, 2000).

O conhecimento dos danos ocasionados durante a criopreservação às células espermáticas é de extrema importância para avaliar a eficácia e para o aprimoramento dos protocolos de congelação. Nesse sentido, sabe-se que as lesões observadas nas células espermáticas devido a congelação são causadas principalmente pela formação de cristais de gelo intracelular ou pela exposição prolongada a soluções concentradas levando a desidratação celular (PEGG, 2002).

Devido a membrana plasmática e a membrana acrossomal serem as partes mais sensíveis do espermatozoide são essas as primeiras estruturas a sofrerem modificações (KROGENAEEs et al., 1994). Além disso, a membrana acrossomal externa é mais vulnerável que as partes internas e a membrana interna (SALAMON; MAXWELL, 1995). Consequentemente tais danos podem comprometer a penetração e fecundação do oócito (MEDEIROS; FORELL; OLIVEIRA, 2002). Neste sentido, as células espermáticas pós-descongelação devem apresentar membrana plasmática íntegra para a manutenção da homeostase, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema, acrossoma normal para que ocorra reação acrossômica e liberação de enzimas necessárias para a fecundação (RODRIGUEZ-MARTINEZ; ZHANG; LARSSON, 1997; PONS-REJRAJI et al., 2009).

Modificações na estrutura da cromatina são observadas como consequência da desnaturação do DNA (GILLAN; MAXWELL, 1999). Alterações da bainha mitocondrial caracterizadas pela perda de conteúdo mitocondrial, alterações na forma e arquitetura e perdas de proteínas também

já foram relatadas (SALAMON; MAXWELL, 1995), podendo comprometer a produção de adenosina tri-fosfato (ATP) (WATSON, 1995).

É importante ressaltar que os danos ultraestruturais são sempre acompanhados por alterações bioquímicas ou mesmo pela perda de seu conteúdo vital (SALAMON; MAXWELL, 1995). Como por exemplo, o aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) que induzem danos ao DNA espermático e causam rápida perda do potencial fertilizante dos espermatozoides por meio da peroxidação lipídica da membrana plasmática (BALL et al., 2001). Também são observadas perdas de lipoproteínas e aminoácidos (PILLET et al., 2011; SALAMON; MAXWELL, 1995). Diminuição de 15-50% do colesterol e tendo em vista o importante papel decapacitante e de proteção da integridade da membrana plasmática perdas assim podem levar a prejuízos como instabilidade da membrana do espermatozoide, interações intramoleculares responsáveis pelo estado capacitado e aumenta da fluidez da membrana (NAUK; LANSBERG; SHEIKIN, 1970; CROSS, 1998; HAIDL; OPPER, 1997; DAVIS, 1980). Ainda o aumento do conteúdo de sódio e diminuição do conteúdo de potássio dos espermatozoides que por sua vez em concentrações desequilibradas podem comprometer a manutenção da excitabilidade dos espermatozoides, o pH ótimo e a pressão osmótica dentro e fora da célula (PROFIROV; IVANOV; POPOVA, 1986; DHAMI; SAHNI, 1993). O decréscimo na atividade da fosfatase pode afetar tanto o metabolismo quanto a sinalização celular (GOLUBJ; BALASHOV, 1980; BEZERRA, 2015).

Desse modo, as mudanças criogênicas ultraestruturais e bioquímicas dos espermatozoides podem ser responsáveis pela diminuição da integridade funcional, sobrevida *in vivo* e capacidade fecundante, necessitando de atenção especial por isso têm sido estudados extensivamente (PEÑA et al., 2011).

2.4.AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPERMATOZOIDES

Sabe-se que nenhum teste isolado é capaz de prever a fertilidade das amostras de sêmen, mas o exame de várias características pode determinar um maior potencial de fertilidade (ARRUDA et al., 2006). Os parâmetros rotineiramente avaliados nos ejaculados são a motilidade, concentração, morfologia e integridade das membranas plasmática e acrossomal (CRESPILHO et al., 2009). Usualmente, estas avaliações são realizadas sob microscopia de luz, de modo subjetivo (ARRUDA et al., 2011). Buscando diminuir esta imprecisão, a análise computadorizada (CASA) vem sendo proposta (AVANZI et al., 2011) e a cada dia, tornando-se mais rotineiramente utilizada nos laboratórios. Em adição, o estudo detalhado de

determinados compartimentos ou regiões da célula espermática tem sido também possibilitado pelo uso de marcadores fluorescentes, seja por meio da microscopia de fluorescência ou, mais objetivamente, pelo sistema de citometria de fluxo (BRISOLA et al., 1999; NIŻAŃSKI; PARTYKA; RIJSSELAERE, 2012).

Com o objetivo de aumentar a acurácia em prever o potencial de fertilidade do sêmen, outros testes complementares vêm sendo utilizados rotineiramente. Dentre estes, podem ser citados o teste de termo-resistência (ROCA et al., 2010; BARROS et al., 2012), o teste hiposmótico (BITTENCOURT et al., 2005; SANTOS et al., 2013), a avaliação da integridade da cromatina (BELETTI; MELLO, 2004) e os testes de ligação espermática a substratos heterólogos (BRITO et al., 2017; CAMPOS et al., 2017). Dentre as várias possibilidades de testes utilizados, a avaliação da morfologia espermática permanece como um parâmetro de extrema importância pois para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável é necessário que sua morfologia seja normal (RODRIGUEZ-MARTINEZ; ZHANG; LARSSON, 1997).

Segundo Arruda et al. (2011) a alteração morfológica é uma das características que mais se correlacionam com a fertilidade, isto pôde ser observado em experimentos em cães no qual foi encontrada uma correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais e a taxa de fertilidade *in vivo* (MICKELSEN et al., 1993; OETTLE, 1993). Nos gatos domésticos, ejaculados com mais de 60% de alterações morfológicas resultaram em menores taxas de penetração na zona pelúcida quando comparados com ejaculados que apresentaram menos de 40% de morfologia anormal, demonstrando que a morfologia espermática tem sido relacionada à fertilidade *in vitro* (HOWARD et al., 1991). Em suínos domésticos a proporção de espermatozoides normais apresentou correlação com a taxa de não retorno, demonstrando que para compensar a má qualidade do sêmen é necessário uma dose inseminante mais concentrada (ALM et al., 2006).

Ainda, a avaliação da morfologia espermática pode fornecer dados sobre o sistema reprodutor do macho, pois qualidade do sêmen por meio do estudo da morfologia do espermatozoide também pode refletir a saúde dos túbulos seminíferos, epidídimos e glândulas anexas (BARTH; OKO, 1989). Uma alta frequência de espermatozoides anormais ou alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade (ARRUDA et al., 2011). Dessa forma para se determinar as anormalidades morfológicas foram elaborados sistemas de classificação, sendo baseadas na região da célula (cabeça e cauda) (NOAKES; PARKINSON; ENGLAND, 2001), origem testicular ou extratesticular (defeitos primários, secundários ou terciários)

(LAGERLOF, 1934) ou ainda grau de importância (defeitos menores e maiores) (BLOM, 1973). As anormalidades primárias são aquelas que se originam no epitélio seminífero durante a espermatogênese, anormalidades secundárias são defeitos que se originam distalmente ao epitélio seminífero nas vias intra e extratesticulares durante o armazenamento e a ejaculação e as terciárias são originadas pela manipulação dos espermatozoides após a ejaculação (LAGERLOF, 1934). Já os defeitos menores podem não indicar defeitos na espermatogênese, não afetando a fertilidade desde que não alcancem níveis elevados e os defeitos maiores quando em porcentagens elevadas têm sido relacionados a distúrbios da espermatogênese, podendo ser relacionados quando em alta porcentagem, a alterações da fertilidade ou infertilidade (BLOM, 1973).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a morfologia da célula espermática. Nesse sentido, podem ser realizados esfregaços de células com corantes (Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras e outros) e analisadas em microscopia de luz (SOUSA, 2013a), tendo como vantagem uma melhor visualização do acrossoma (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). A técnica em câmara úmida permite uma avaliação da morfologia espermática sem artefatos induzidos pelo processo de coloração pois é utilizada a microscopia de contraste de fases ou microscopia de contraste de interferência diferencial sem necessidade de uso de corantes (ZAMBELLI et al., 1993; SCHÄFER; HOLZANN, 2000; ARRUDA et al., 2011). Outra opção para avaliação da morfologia são os sistemas de análise da morfometria espermática automatizada (Automated Sperm Morphometry Analyse - ASMA) que tentam superar os problemas da subjetividade dos métodos de avaliação visual através de uma avaliação computadorizada realizada pelo *software* Metrix (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) (BATISTA; GUERRA, 2010; ARRUDA et al., 2011). Adicionalmente, para uma maior riqueza de detalhes podem ser realizadas análises morfológicas através da microscopia eletrônica (SILVA et al., 2009).

Nos catetos, a morfometria e morfologia espermática foram estudadas por meio da microscopia de luz, utilizando-se diferentes colorações. De forma geral, cabeças destacadas e defeitos na cauda foram as anormalidades espermáticas mais frequentes em todas as colorações testadas. No entanto, o corante Rosa de Bengala apresentou melhores resultados pois apresentou melhor visualização da cauda, peça intermediária e cabeça dos espermatozoides. Já o corante Eosina-Nigrosina não permitiu uma adequada impregnação e alguns dos espermatozoides apresentaram pouco contraste com o fundo da lâmina. Em adição, uma maior incidência de cauda fortemente enrolada foi verificada com o uso do corante Azul de Bromofenol. No tocante

à morfometria espermática, os autores relataram que a cauda ocupa a maior proporção (89%) do espermatozoide, e a cabeça apresenta-se discretamente alongada (SOUSA et al., 2013a).

2.5. USO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA PARA AVALIAÇÕES MORFOLÓGICAS ESPERMÁTICAS

Usualmente, as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados com corantes e analisados sob microscopia de luz (ARRUDA et al., 2011). Tendo como vantagens ser uma técnica bem estabelecida que permite uma boa visualização do contorno e divisões da célula espermática, permitindo identificar alterações na morfologia de forma simples, prática, com baixo custo e, principalmente, aplicável a campo (CHEMINEAU et al., 1991), a avaliação morfológica espermática através da microscopia de luz possui limitações pois não contempla detalhes da ultraestrutura das células, não sendo possível a avaliação mais minuciosa das organelas.

Com um poder de aumento e maior resolução que a microscopia de luz o microscópio eletrônico possibilitou a observação direta de aspectos ultraestruturais das células. Como resultado dessas novas observações, a compreensão sobre a organização dos tecidos e animais foi enormemente ampliada, e muitas ideias a respeito da construção e função celulares foram fortemente alteradas (GALLETTI, 2003). A microscopia eletrônica é uma importante técnica para determinar o tamanho e a forma de estruturas inorgânicas e biológicas que se baseia na interação de elétrons incidentes sobre a matéria (SILVA et al., 2009).

No estudo da morfologia de espermatozoides, a microscopia eletrônica permite visualizar várias regiões, como acrossomo, cromatina, teca perinuclear, mitocôndrias, axonema, periaxonema e outras estruturas que não são detectáveis por microscopia de luz, permitindo uma avaliação mais complexa, detalhada e fidedigna (MORIETTI; SUTERA; COLLODEL, 2016). Em várias espécies, estudos acerca da morfologia espermática já foram abordados utilizando as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (GOULD; ZANEVELD; WILLIAMS, 1971; HAFEZ; KANAGAWA, 1973; BUSTOS-OBREGON; FLÉCHON, 1975; WOODALL; GIBBON, 1995; SOUSA et al., 2013b).

2.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

Por meio da MEV, é possível observar amostras em alta resolução na ordem de 2 a 5 nm em instrumentos comerciais, já os instrumentos de pesquisa avançada podem alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al., 1987). Além da alta resolução, outra importante

característica da MEV é a profundidade de campo, resultando em imagens de aparência tridimensional (RAMOS, 2013).

Nesses sofisticados equipamentos, um feixe de elétrons varre a superfície, ponto a ponto por linhas sucessivas, e o sinal da interação do feixe incidente com a superfície da amostra resulta na imagem (Figura 1). O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores adequados e convertidos em um sinal de vídeo (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

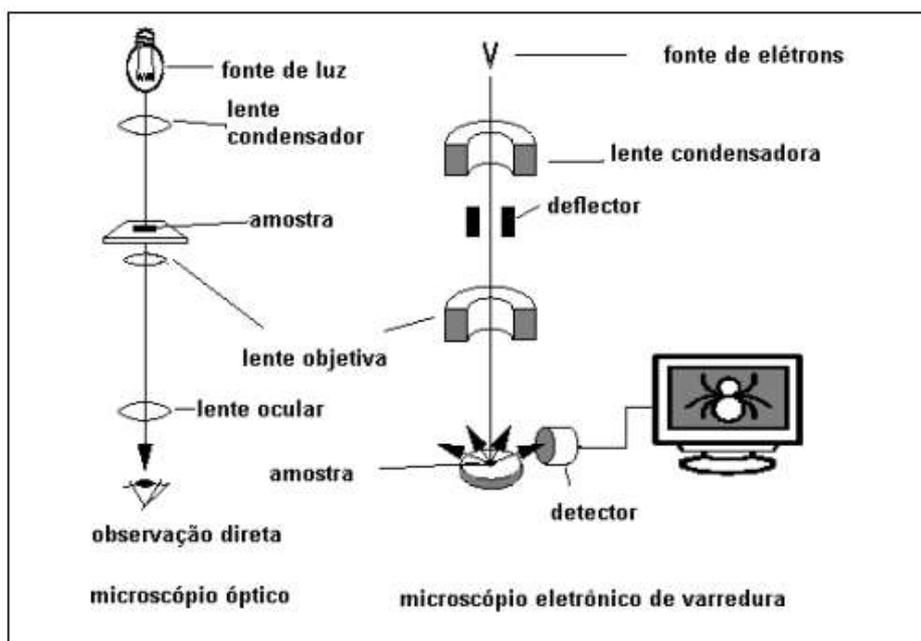


Figura 1. Comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura (Fonte: DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Estudos descritivos da morfologia de espermatozoides utilizando a MEV já foram relatados em várias espécies. Em hamsters, a MEV permitiu a identificação de espermatozoides com cabeças planas que se estreitam na porção anterior, formando uma curvatura de $\sim 90^\circ$, além de uma peça intermediária compreendendo aproximadamente 50% da cauda. Nas células espermáticas humana, foi identificado que as cabeças possuem extremidades posteriores arredondadas e planas anteriormente, além disso há presença de cristas e sulcos na parte posterior. Em coelhos, a MEV possibilitou a observação de um acrossoma bem evidente como um inchaço na margem anterior da cabeça com linhas demarcatórias do segmento equatorial com muito mais próximas do que o verificado nos hamsters, e com a parte central e a cauda semelhantes às dos espermatozoides humanos (GOULD; ZANEVELD; WILLIAMS, 1971). Já Hafez e Kanagawa, (1973) utilizaram a MEV para tecer comparações quanto à morfologia de

espermatozoides de humanos, macacos e coelhos, sendo identificadas semelhanças entre os espermatozoides de humanos e macacos, como a cabeça achatada e ovóide com superfície rugosa e rígida na porção anterior e na posterior superfície lisa com poucos grânulos. Neste mesmo trabalho, a MEV foi também eficiente na identificação de alterações espermáticas tais como cabeças de formato esferoides ou elipsoides sem achatamento, cabeças duplicadas, pequenas, caudas múltiplas e peças intermediárias finas.

Dentre os roedores cavimorfos, por meio da MEV, foram estudados espermatozoides de 20 espécies, compreendendo 5 famílias, sendo observadas grandes diferenças inter e intrafamiliares em tamanho e forma, refletindo a natureza plástica da morfologia espermática nos táxons analisados. Nas famílias Abrocomidae e Myocastoridae, os espermatozoides apresentaram cabeças simetricamente arredondadas e afiladas ao extremo apical. Já nas espécies da família Ctenomyidae, os gametas apresentaram -se parecidos com pás, assimétricos e de cauda longa, enquanto que na família Caviidae, foram descritos espermatozoides com cabeças simetricamente ovais e bulbosas. Espermatozoides extremamente grandes, com cabeça truncada e semelhantes a remo, diferindo dos ovóides comuns encontrados nos Octodontidae foram característicos de *Tympanoctomys barrerae*, sendo esses espermatozoides macrocefálicos correlacionados com o aumento quântico no conteúdo de DNA, refletido pelo tamanho do genoma da espécie (GALLARDO et al., 2002).

Em suínos, bovinos e ovinos foi possível observar semelhanças nos espermatozoides das três espécies tais como cabeças em forma de pá e três regiões distintas: o espessamento marginal, o segmento equatorial e a região pós-acrossomal. No entanto, também foram encontradas diferenças, como a superfície do acrossoma mais áspera em suínos que nas demais espécies (BUSTOS-OBREGON; FLÉCHON, 1975).

Utilizando a MEV, a morfologia do espermatozoide de cervos (*Rusa timorenses*) também foi caracterizada, no qual observou-se espermatozoide de $\sim 66,2 \pm 0,7 \mu\text{m}$ de comprimento, cabeças achatadas em formato de pás, pescoço curto, cauda subdividida em peça principal, peça central e peça final. Espermatozoides anormais também foram observados apresentando cabeças afiladas, microcefálica, espermatozoides sem cabeças e caudas dobradas (MAHRE et al., 2014).

Na Amazônia, recentemente, o espermatozoide do boto cor de rosa (*Inia geoffrensis*) foi caracterizado por meio da MEV, revelando uma cabeça alongada em forma de elipsoide, com a região anterior mais fina que a região posterior e superfície lisa, uma cauda longa com uma peça central bem distinguível (AMARAL et al., 2017).

Além dos trabalhos descritivos utilizando espermatozoides frescos, também já foram relatados estudos utilizando a MEV como ferramenta de avaliação da eficiência dos protocolos de refrigeração e congelamento, abordando o efeito da baixa temperatura nos espermatozoides refrigerados e criopreservados. Dessa forma, em caprinos, a MEV foi utilizada para descrever os danos no acrossoma de espermatozoides durante a diluição, refrigeração e congelamento. Assim, verificou-se que durante a congelamento ocorrem as maiores alterações ultraestruturais do que na diluição e refrigeração como a protrusão na capa anterior, inchaço do acrossoma e perda de conteúdo acrossomal e que essas modificações possuem relação direta com o extravasamento das enzimas transaminase glutâmico oxaloacética (GOT), transaminase glutâmico pirúvica (GPT), hialuronoglucosaminidase, fosfatase ácida e fosfatase alcalina (CHAUHAN et al., 1994).

Já em gatos domésticos, o impacto de diferentes condições de armazenamento de espermatozoides do epidídimo (armazenamento prolongado, criopreservação e liofilização) foram testadas mostrando que espermatozoides liofilizados apresentaram deformidades morfológicas graves, rompimento de cabeças, caudas ou membranas plasmáticas e acrossomas perdidas o que refletiu numa baixa taxa de clivagem de oócitos (RINGLEB et al., 2011).

Outras aplicações da MEV envolvem a imunolocalização do heterodímero PSP-I/PSP-II, uma das principais proteínas do plasma seminal de suínos capaz de preservar, *in vitro*, a viabilidade, motilidade e atividade mitocondrial de espermatozoides. No estudo de Caballero et al. (2006), investigou-se o efeito da exposição de espermatozoides (1 milhão/mL) a 1,5 mg/mL de PSP-I/PSP-II por 0,5, 5 e 10 h a 38°C nas características espermáticas e as mudanças na localização da proteína. Assim foi constatado que a exposição à PSP-I/PSP-II preservou a viabilidade espermática, motilidade e atividade mitocondrial, quando comparada a espermatozoides não expostos. A PSP-I/PSP-II foi localizada, principalmente, na área acrossomal, sendo redistribuída para a área pós-acrossomal ou perdida durante a incubação *in vitro*, com isso pode-se mostrar que o efeito protetor do heterodímero está relacionado à sua adesão à área acrossômica.

2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é bastante vinculada aos estudos de materiais biológicos, pois é uma ferramenta que permite definição de imagens intracelulares e detalhes mais finos de uma estrutura celular, permitindo estudos de morfologia, aspectos gerais

das organelas e também da interação de parasitas com as células de impossível visualização na microscopia de luz (GALLETI, 2003).

Na MET, um feixe de elétrons é emitido sob alta tensão em cortes extremamente finos e a imagem é formada pelo impacto dos elétrons transmitidos e difratados (Fig. 2). As imagens formadas pela MET são bidimensionais pois as amostras devem ser extremamente finas sendo difícil obter informação sobre estruturas em três dimensões (KLEIN; BUHR; FRASE, 2012).

Estudos abordando a caracterização morfológica da célula espermática utilizando a MET já foram relatados. Em espécies silvestres, como o tatu (*Euphractus sexcinctus*), Sousa et al. (2013b) verificaram a presença de pontos eletrolucentes no núcleo e a presença de cerca de 45 espirais de mitocôndrias no meio da bainha mitocondrial como uma peculiaridade do espermatozoide desta espécie.

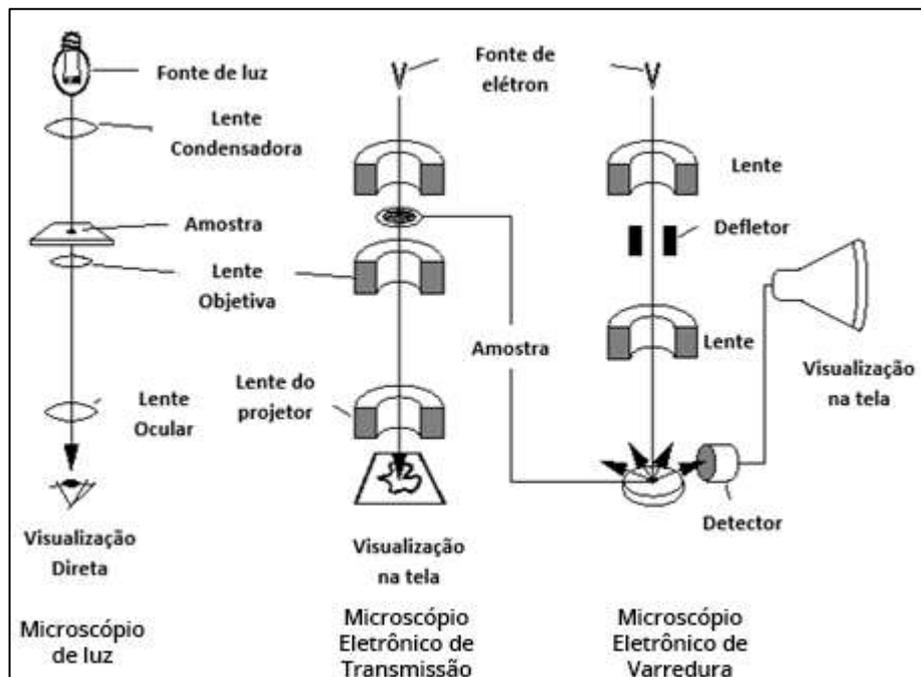


Figura 2. Comparação entre microscópio óptico, microscópio eletrônico de varredura e microscópio eletrônico de transmissão. (Fonte: CRUZ, 2009).

Nos marsupiais da espécie *Lagorchestes hirsutus*, a ultraestrutura dos espermatozoides foi descrita pela primeira vez por Johnston et al. (2003). Foram revelados aspectos incomuns da estrutura espermática em espécies de macropodídeos, como o nucleoplasma periférico na maioria dos espermatozoides forma uma série irregular de evaginações distintas anteriormente não descritas nos espermatozoides de qualquer outro marsupial. Além disso, a morfologia mitocondrial consiste em grandes lamelas concêntricas achatados muitas vezes com um centro eletro denso que não é típico de nenhum outro espermatozoide macropodídeo descrito.

Já em musaranho-elfante *Rhynchocyon chrysopygus* a ultraestrutura dos espermatozoides descrita não diferiu muito entre as subfamílias Rhynchocyoninae e Macroscelidina marcada pela presença de um subacrosoma pontiagudo curto semelhante entre os três grupos, considerado uma característica ancestral. No entanto, foram observadas apenas cerca de 24 giros de mitocôndrias na peça intermediária sendo este número menor que em qualquer outra espécie das famílias citadas (WOODALL; GIBBON, 1995).

Em jumentos (*Equus asinus*), a infertilidade foi associada a defeito microtubular nos espermatozoides avaliados por MET, nos quais foram observados acúmulo desordenado de microtúbulos na região da cabeça, causando protusões irregulares na região do colo espermático (CRESPILHO et al., 2006).

Adicionalmente, essa técnica é usada para avaliar protocolos de criopreservação e os efeitos das baixas temperaturas sobre a ultraestrutura dos espermatozoides em várias espécies. Dessa forma, em cães, a MET foi utilizada para comparar os efeitos da criopreservação sobre a morfologia dos espermatozoides, mostrando que as diferenças mais marcantes entre amostras frescas e descongeladas foram observadas sobre a peça intermediária, uma vez que os espermatozoides frescos mostraram peça intermediária bem conservada, já as amostras descongeladas mostraram sinais de danos, como a vacuolização mitocondrial (SILVA et al., 2009).

O efeito da suplementação com Trolox (30, 60 e 120 nmol ml⁻¹), análogo sintético de vitamina E, que é o principal antioxidante protetor para a membrana plasmática, foi avaliado por meio da MET em espermatozoides criopreservados caprinos, sendo constatados nos grupos controle (sem adição do Trolox) e Trolox 30 nmol ml⁻¹ diversas células com inchaço, ondulação e ruptura da membrana plasmática, bem como reação acrossômica. Nas amostras do grupo Trolox 60 nmol ml⁻¹, foi observado um grande número de espermatozoides com integridade da membrana plasmática e acrossomal, mostrando a capacidade do Trolox de proteger membranas dos espermatozoides contra o estresse oxidativo, porque é um inibidor de EROs nas estruturas celulares de mamíferos (SIKKA, 2004). Já nas amostras de sêmen congeladas com Trolox 120 nmol ml⁻¹ apenas algumas células com inchaço na membrana plasmática foram encontradas (SOARES et al., 2014).

No sêmen de búfalo, a ultraestrutura do espermatozoide vitrificado na presença de colesterol carregado por ciclodextrinas foi avaliada, observando nos espermatozoides criopreservados níveis elevados de membranas plasmáticas e mitocondriais deteriorados do que nas amostras frescas e que a suplementação com o colesterol carregado por ciclodextrina ao diluente Tris-

gema de ovo-glucose melhorou a qualidade dos espermatozoides após a criopreservação, demonstrando que o efeito protetor do colesterol é provavelmente devido à diminuição da deterioração mitocondrial e da membrana plasmática (EZZ et al., 2017).

Nos ovinos, avaliou-se o efeito do tempo de refrigeração (24 e 48 h) a 5°C sobre a morfologia sendo constatado que após 24 h há perda da integridade da membrana plasmática e vesiculações no acrossoma e as 48 h sinais de degeneração nas mitocôndrias, ocasionando depleção de ATP e a perda de motilidade, resultando em redução da fertilidade (RAJASHRI et al., 2017).

Em suínos, foram avaliados os efeitos da refrigeração, congelação e descongelação na integridade da membrana plasmática, cinética e expressão de transportadores de açúcar transportadores de glicose-3 e -5 (GLUT-3 e GLUT-5) em espermatozoides. Sendo demonstrado a partir da imunocitoquímica associada a microscopia eletrônica que os espermatozoides expressaram os transportadores de hexose GLUT-3 e GLUT-5. A expressão do transportador de hexose GLUT-3, no entanto mostrou distribuição diferente em termos de localização e concentração entre os espermatozoides, bem como durante as várias etapas da congelação e descongelação. Uma imunorreatividade forte do GLUT-3 foi observada na membrana acrossomal espermática a 17°C especialmente na metade anterior da cabeça delimitada pelo segmento equatorial. A região pós-acrossomal apresentou imunorreatividade moderada com o anti-GLUT-3, enquanto a peça de conexão, a peça intermediária e a parte principal da cauda apresentaram imunorreatividade fraca. Esse padrão de reatividade foi mantido a 5°C depois de adicionar glicerol durante a criopreservação, no entanto, após a descongelação a marcação tornou-se menos clara em termos de intensidade e distribuição. Já a imunomarcção da hexose GLUT-5 em 17°C foi localizada, principalmente nos segmentos apicais e principais da região acrossomal, com uma marcação moderada na região pós-acrossomal. No entanto, imunorreatividade forte foi detectada ao longo da peça de conexão, peça intermediária e peça principal. Ao contrário do GLUT-3, o padrão de imunomarcção foi mantido a 5°C e pós-descongelação, indicando que a criopreservação afetou o estado dos espermatozoides suínos, alterando a distribuição de alguns receptores de membrana (SANCHO et al., 2007).

Embora existam vários estudos da morfologia espermática ultraestrutural em diversas espécies, em catetos, ainda não foram relatadas pesquisas envolvendo espermatozoides à fresco bem como após a congelação.

REFERÊNCIAS

ALM, K.; PELTONIEMI, O. A. T.; KOSKINEN, E.; ANDERSSON, M. Porcine Field Fertility with Two Different Insemination Doses and the Effect of Sperm Morphology. **Reproduction in Domestic Animals**, 41: 210–213, 2006.

ALTRICHTER, M.; TABER, A.; NOSS, A.; MAFFEI, L.; CAMPOS, J. *Catagonus wagneri*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**: e.T4015A72587993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20152.RLTS.T4015A72587993.en>.> Downloaded on 27 March 2018.

ALVES, H. M.; OLIVEIRA, I. R. S.; CASTELO, T. S.; LIMA, G. L.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A. P.; DE PAULA, V. V.; SILVA, A. R. Comparison of Different Glycerol and Egg Yolk Concentrations Added to Tris-based Extender for the Collared Peccaries (*Tayassu tajacu*) Semen Freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, 48: 506-511, 2013.

AMARAL, R. S.; SILVA, V. M. F.; DOMINGOS, F. X. V.; MARTIN, A. R. Morphology and Ultrastructure of the Amazon River Dolphin (*Inia geoffrensis*) Spermatozoa. **The Anatomical Record**, 300:1519–1523, 2017.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. *In*: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, PR. Londrina. **Anais do 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 157-164, 2006.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEME, K. M.; JAIME, J. D. Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 35: 145-151, 2011.

AVANZI, B. R.; RAMOS, R. S.; NICHI, M.; FIORATTI, E. G.; DELL'AQUA JR, J. A.; WECHSLER, F. S.; PAPA, F. O. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. **Veterinária e Zootecnia**, 2: 226-238, 2011.

BALL, B. A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. **Theriogenology**, 56: 577-589, 2001.

BARROS, M. H. C.; SHIOMI, H. H.; AMORIM, L. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D. Semen cryopreservation of Piau swine breed submitted to three freezing protocols. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 41(4): 914-922, 2012.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, p. 285, 1989.

BATALHA, L. M.; OBA, E. Caracterização morfométrica e morfológica de célula espermática de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) [Morphometrical and morphological

characterization of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) spermatic cells]. **Archives of Veterinary Science**, 11: 66-72, 2006.

BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. New techniques for the assessment of goat semen quality: a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 34(3): 125-132, 2010.

BECK, H.; THEBPANYA, P.; FILIAGGI, M. Do Neotropical peccary species (Tayassuidae) function as ecosystem engineers for anurans? **Journal of Tropical Ecology**, 26: 407-414, 2010.

BELLANTONI E. **Habitat use by mule deer and collared peccaries in an urban environment**. Tucson, AZ: University of Arizona, 2-33, 1991.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, 62: 398-402, 2004.

BEZERRA, J. A. B.; SILVA, A. M. ; SOUSA, P. C. ; CASTELO, T. S. ; LIMA, G. L. ; SILVA, A. R. Teste de termorresistência na avaliação dos espermatozoides epididimários de catetos (*Pecari tajacu*) criopreservados com diferentes diluentes. In: VII Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, 2014, Mossoró, RN. Anais do VII Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal. Mossoró, RN: **Revista Acta Veterinaria Brasilica**, 8: 5-56, 2014.

BEZERRA, L. G. P.; SOUZA, A. L. P.; LAGO, A. E. A.; SILVA, A. M.; CAMPOS, L. B.; OLIVEIRA, M F.; SILVA, A. R. Addition of Equex STM Paste to Tris extender increases the post thawing longevity of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) sperm. In: VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction, November, 2016, Campos do Jordão, SP, Brazil. **Animal Reproduction**, 14: 237, 2017.

BEZERRA, L. L. **Análise bioquímica e proteômica do plasma seminal equino e sua relação com a criopreservação do sêmen**. Tese (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2015.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; 1, SANTOS, A. D. F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; LEANDRO, E. E. S.; GUIMARÃES, J. D. Use of hipoosmotic test to evaluate the efficacy of different protocols of cryopreservation of the goat semen. **Ciência Animal Brasileira**, 6(3): 213-218, 2005.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, 25: 383-391, 1973.

BRICEÑO-MÉNDEZ, M.; NARANJO, E. J.; ALTRICHTER, M.; MANDUJANO, S. Availability of two species of fruits and their influence on the social structure of *Tayassu pecari* and *Dicotyles tajacu*. **THERYA**, 8:193-198, 2017.

BRISOLA, L. B. S.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C.; MONTAGNER, M. M. Integrity of sperm plasm membrane, nucleus and mitochondria after freezing ram semen with ethylene glycol. **Ciência Rural**, 29(3): 527-531, 1999.

BRITO, M. M.; LOSANO, J. D. A.; ANGRIMANI, D. S. R.; LÚCIO, C. F.; DALMAZZO, A.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Sperm-binding to the perivitelline membrane of chicken egg

yolk as a functional test for sperm evaluation in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 54(4): 366-374, 2017.

BUSTOS-OBREGON, E.; FLÉCHON, J.-E. Comparative Scanning Electron Microscope Study of Boar, Bull and Ram Spermatozoa. **Cell and Tissue Research**, 161: 329-341, 1975.

CABALLERO, I.; VÁZQUEZ, J. M.; GARCÍA, E. M.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E. A.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; EKWALL, H.; RODRÍGUEZ- MARTÍNEZ, H. Immunolocalization and Possible Functional Role of PSP-I/ PSP-II Heterodimer in Highly Extended Boar Spermatozoa. **Journal of Andrology**, 27(6), 2006

CAMPOS, L. B.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. M.; SOUZA, A. L. P.; CASTELO, T. S.; MAIA, K. M.; PEREIRA, A. F.; SILVA, A. R. Estimating the binding ability of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) sperm using heterologous substrates. **Theriogenology**, 92: 57-62, 2017.

CAMPOS, L. B.; SILVA, M. A.; BEZERRA, J. A. B.; CASTELO, T. S.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. Sobrevivência de espermatozoides de catetos (*Pecari tajacu*) após congelação-descongelação no uso de diferentes diluentes. **Acta Scientiae Veterinariae**, 42: 1217, 2014.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology**, 74: 940-50, 2010.

CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S.B.; LIMA, G. L.; ALVES, H. M.; OLIVEIRA, I. R.; SANTOS, E. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Cryobiology**, 61: 275-9, 2010a.

CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A. P.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris-based extenders. **Theriogenology**, 74: 1060-1065, 2010b.

CHAUHAN, M. S.; KAPILA, R.; GANDHI, K. K.; ANAND, S. R. Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Andrologia**, 26: 21-26, 1994.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J. C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Reproduction and Health Paper. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 115-161, 1991.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Coleta e avaliação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*), **Biota Neotropica**, 5: 131-136, 2005.

COSTA, G. M. J.; LEAL, M. C.; SILVA, J. V.; FERREIRA, A. C. S.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenic Cycle Length and Sperm Production in a Feral Pig Species (Collared Peccary, *Tayassu tajacu*). **Journal of Andrology**, 31(2), 2010.

CRESPILHO, A. M.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PAPA, F. O. Infertility associated with microtubular defect in a donkey (*Equus asinus*) spermatozoa evaluated by transmission electron microscopy. **Ciência Rural**, 36(5): 1507-1510, 2006.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? **Vet Zootec**, 16: 335-342, 2009.

CRUZ, W. S. **Microscopy**, 2009. Disponível em: <<http://www.nslc.wustl.edu/courses/bio101/cruz/Microscopy/microscopy.htm>> Acesso em: 29 de maio de 2018.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, 59:7-11, 1998.

DAVIS, B. K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. **Archive of Andrology**, 5:249-254, 1980.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras: Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DESBIEZ, A. L. J.; KEUROGHLIAN, A.; BEISIEGEL, B. M.; MEDICI, P. E.; GATTI, A.; PONTES, A. R. M.; CAMPOS, C. B.; TÓFOLI, C. F.; MORAES JUNIOR, E. A.; AZEVEDO, F. C.; PINHO, G. M.; CORDEIRO, J. L. P.; SANTOS JÚNIOR, T. S.; MORAIS, A. A.; MANGINI, P. R.; FLESHER, K.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. Avaliação do Risco de Extinção do Cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Número Temático: Avaliação do Estado de Conservação dos Ungulados. **Biodiversidade Brasileira**, Ano II, Nº 3, 74-83, 2012.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L. Comparative assment of certain biochemical and mineral constituents of seminal plasma and their interrelationships in ox and buffalo bulls. **Liar**, 14(2):98-100, 1993.

EZZ, M. A.; MONTASSER, A. E.; HUSSEIN, M.; ELDESOUKY, A.; BADR, M.; HEGAB, A. E.; BALBOULA, A.; ZAABEL, S. M. The effect of cholesterol loaded cyclodextrins on post-thawing quality of buffalo semen in relation to sperm DNA damage and ultrastructure. **Reproductive Biology**, 17: 22–50, 2017.

FRANCISCATO, D. A. Características físicas e morfológicas do sêmen de *Bos taurus* e *Bos indicus* antes e após a criopreservação. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária- UNESP, Campus de Jaboticabal- SP, 2015.

GALLARDO, M. H.; MONDACA, F. C.; OJEDA, R. A.; KÖHLER, N.; GARRIDO, O. Morphological diversity in the sperms of caviomorph rodents. **Mastozoología Neotropical / J. Neotrop. Mammal**, 9(2): 159-170, 2002.

GALLETI, S. R. Introdução a microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, 65: 33-35, 2003.

GARCIA, A. R.; KAHWAGE, P. R.; OHASHI, O. M. Aspectos reprodutivos de caititus (*Tayassu tajacu*) [Reproductive features of collared peccary (*Tayassu tajacu*)]. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 33(2): 71-81, 2009.

GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **Journal Reproduction Fertility Supplement**. 54, 271–283, 1999.

GOLUBJ, V. S.; BALASHOV, N. G. **Changes of some biochemical and biological characteristics of ram spermatozoa during freezing in different media (in Russian)**. Proc. Inst. Control of Veterinary Products, Agricultural Ministry of the USSR, Moscow, pp. 109-114.

GONGORA, J.; REYNA-HURTADO, R.; BECK, H.; TABER, A.; ALTRICHTER, M.; KEUROGHLIAN, A. *Pecari tajacu*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2011**: e.T41777A10562361. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20112.RLTS.T41777A10562361.n> Downloaded on 27 March 2018.

GOULD, K. G.; ZANEVELD, L. J. D.; WILLIAMS, W. L. Scanning Electron Microscopy of Mammalian Gametes. **Archives of Gynecology and Obstetrics**., 210: 235-250, 1971.

HAFEZ, E. S. E.; KANAGAWA, D. V. M. Scanning electron microscopy of human, monkey, and rabbit spermatozoa. **Fertility and Sterility**, 24(10), 1973.

Haidl, G.; Oppen, C. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. **Human Reproduction**, 12: 2720-2723, 1997.

HASHIDA, N. H.; ABDULLAH, R. B.; RAJIKIN, M. H.; MAT NOOR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosomereacted goat sperm. **Biomedical Research**, 16 (2): 119-123, 2005.

HOWARD, J. G.; BUSH, M.; MORTON, C.; MORTON, F.; WENTZEL, K.; WILDT, D. E. Comparative semen cryopreservation in ferrets (*Mustela putorius furo*) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen–thawed spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 92: 109-118, 1991.

JOHNSTON, S. D.; DADDOW, L.; CARRICK, F. N.; JAMIESON, B.; SMITH, L. CAUDA epididymal spermatozoa of the rufous hare wallaby, *Lagorchestes hirsutus* (Metatheria, Mammalia) imaged by electron and confocal microscopy. **Acta Zoologica**, 84: 139-143, 2003.

KLEIN, T.; BUHR, E.; FRASE, C. G.; TSEM: A Review of Scanning Electron Microscopy in Transmission Mode and Its Applications. In: Hawkes, P. (Ed.). **Advances in Imaging and Electron Physics**, 171, Cap 6: 297- 356, 2012.

KROGENAES, A.; BERG, A. K.; HAFNE, A. L.; ENGELAND, E. Membrane alterations in Bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 35:17-26, 1994.

LAGERLOF, N. Morphologische Untersuchungen uber. Veranderim spermabild und in den Hoden bei Bulle mit Verminderter oder auf gehobe ver Fertilitat. **Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica**, 1: 254, 1934.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, 62: 113-141, 2000.

LEMMA, A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In: Manafi, M. (Ed.) **Artificial Insemination in Farm Animals**, In Tech, p. 191-216, 2011.

MAHRE, M. B.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; JESSE, F. F. A.; AZLAN, C. A.; KHUMRAN, A. M.; JAJI, A. Z. Sperm attributes and morphology on Rusa timorensis: Light and scanning electron microscopy. **Animal Reproduction Science**, 148: 245-250, 2014.

MEDEIROS, C. M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T.; RODRÍGUEZ, J. L. "Current Status of Sperm Cryopreservation: Why Isn't It Better?" **Theriogenology**, 57(1): 327- 344, 2002.

MICKELSEN, W. D.; MEMON, M. A.; ANDERSON, P. B.; FREEMAN, D. A. The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. **Theriogenology**, 39: 553-560, 1993.

MORIETTI, E.; SUTERA, G.; COLLODEL, G. The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, 62, 171-183, 2016.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**, 11: 901-909, 1987.

NAUK, V. A.; LANSBERG, E. S.; SHEIKIN, V. N. Cryogenic changes in ram spermatozoa (in Russian). **Ovtsevodstvo**, 10: 25-27, 1970.

NIŻAŃSKI, W.; PARTYKA, A.; RIJSSELAERE, T. Use of Fluorescent Stainings and Flow Cytometry for Canine Semen Assessment. **Reproduction in Domestic Animals**, 47: 215–221, 2012.

NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J.; ENGLAND, G. C. W. **Veterinary Reproduction and Obstetrics**, 8.ed. Saunders, 2001.

OETTLE, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, 47: 257-260, 1993.

PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, 20 (1): 5–13, 2002.

PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, M. A.; CASTELO, T. S.; SILVA, A. M.; BEZERRA, J. A. B.; SOUZA, A. L. P.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758). **Animal Reproduction Science**, 134:191–196, 2012.

PEÑA, F. J.; GARCIA, B. M.; SAMPER, J. C.; APARICIO, I. M.; TAPIA, J. A.; FERRUSOLA, C. O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, 76:1177-1186, 2011.

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, 75:105–14, 2011.

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, 21, 525–537, 2009.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A. simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 22:87-95, 1991.

PROFIROV, Y.; IVANOV, N.; POPOVA, P. Role of the plasma membrane in potassium, sodium and calcium content of ram spermatozoa after deep freezing (in Bulgarian). **Veterinarno-meditsinski Nauki**, 23:73-77, 1986.

RAMOS, T. M. **Potencialidades da microscopia eletrônica (transmissão e varredura) e microscopia confocal como ferramentas para análises de amostras biológicas**. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

RAJASHRI, M.; REDDY, K. R.; KUMARI, G. A.; KUMARI, N. N.; KESHARWANI, S.; SRINIVAS, G. Qualitative ultrastructural changes and morphometry of deccani sheep spermatozoa preserved with egg yolk citrate extender. **Journal of Applied and Natural Science**, 9 (3): 1515-1521, 2017.

RINGLEB, J.; WAURICH, R.; WIBBELT, G.; STREICH, W. J.; JEWGENOW, K. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. **Reproduction, Fertility and Development**, 23: 818-825, 2011.

ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. Factors influencing boar sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, 84: 2692-2699, 2010.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B. R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, 25, 108-126, 1997.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; FRANCESCHINI, P. H.; ESPER, C. R. Sperm membrane and seminal plasma 2D protein profiles and their relation with

bull's fertility. In: 15th International Congress on Animal Reproduction **Proceedings...**, p.187, 2004.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, 37: 185-249, 1995.

SANCHO, S.; CASAS, I.; EKWALL, H.; SARAVIA, F.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; FLORES, E.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCIA-GIL, N.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs, **Reproduction**, 134: 111–121, 2007.

SANTOS, E. A. A.; SOUSA, P.C.; MARTINS, J. A. M. ; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; OLIVEIRA, M. F.; MOURA, A. A. A.; SILVA, A. R. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Reproduction**, 753-764, 2014.

SANTOS, E. A. A.; SOUSA, P. C.; PEIXOTO, G. C. X.; SIMÃO, B. R.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A.R. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, 65(4): 1257-1260, 2013.

SCHÄFER, S.; HOLZMANN, A. The use of transmigration and SpermacTM stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 59: 201- 211, 2000.

SCOGNAMILLO, D.; MAXIT, I. E.; SUNQUIST, M.; POLISAR, J. Coexistence of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) in a mosaic landscape in the Venezuelan llanos. **Journal of Zoology London.**, 259: 269-279, 2003.

SHIA, L.; RENB, Y.; ZHOUA, H.; HOUA, G.; XUNA, W.; YUEB, W.; ZHANG, C.; YANG, R. Effect of rapid freezing–thawing techniques on the sperm parameters and ultrastructure of Chinese Taihang black goat spermatozoa. **Micron**, 57: 6-12, 2014.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Jornal of Andrology**, 25:5-18, 2004.

SILVA, A. M.; CAMPOS, L. B.; PRAXEDES, E. C. G.; MAIA, K. M.; MOREIRA, S. S. J.; BEZERRA, L. G. P.; APOLINÁRIO, C. A. C.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Avaliação da viabilidade de tecido testicular fresco ou vitrificado de catetos (*Pecari tajacu*) utilizando diferentes métodos de dissociação celular. In. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 22, 2017, Santos, SP. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2017.

SILVA, A. R., FONTENELE-NETO, J. D., CARDOSO, R. C. S., SILVA, L. D. M., CHINIRÉA, V. H., LOPES, M. D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, 10: 595-601, 2009.

SILVA, A. R.; SILVA, M. A.; LIMA, G. L.; SOUZA, A. L. P.; CASTELO, T. S. Strategies for the conservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758) germplasm in the caatinga biome. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 35(2): 118-123, 2011.

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

SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C. X.; LIMA, G. L.; BEZERRA, J. A. B.; CAMPOS, L. B.; PAIVA, A. L.; PAULA, V. V.; SILVA, A. R. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. **Theriogenology**, 78: 605-611, 2012.

SOARES, A. T.; SILVA, S. V.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. Ultrastructure evaluation of goat spermatozoa after freezing in a skim milk-based extender with Trolox supplementation **Andrologia**, 1-7, 2014.

SONNER, J. B.; SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A. Morfologia dos testículos em queixadas (*Tayassu peccari* Link 1795) (Morphology of testicles in white lipped peccary (*Tayassu peccari* Link 1795)). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 26: 83-85, 2004.

SOUSA, P. C.; SANTOS, E. A. A.; BEZERRA, J. A. B.; LIMA, G. L.; CASTELO, T. S.; FONTENELE-NETO, J. D.; SILVA, A. R. Morphology, morphometry and ultrastructure of captive six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) sperm. **Animal Reproduction Science**, in Press, 2013b.

SOUSA, P. C.; SANTOS, E. A. A.; SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; BARROS, F. F. P. C.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(7): 924-930, 2013a.

SOUZA, A. L. P.; CASTELO, T. S.; QUEIROZ, J. P. A. F.; BARROS, I. O.; PAULA, V. V. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by eletroejaculation. **Animal Reproduction Science**, 116: 370-375, 2009.

SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; CASTELO, T. S.; OLIVEIRA, M. G. C.; PAULA, V. V.; SILVA, A. R. Sperm characteristics following freezing in extenders supplemented with whole egg yolk and different concentrations of low-density lipoproteins in the collared peccary (*Pecari tajacu*). **Reproductive Biology**, 15: 223-228, 2015.

SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Use of Aloe vera-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. **Theriogenology**, 85: 1432-1438, 2016.

SOUZA, A. L. P. **OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE CATETOS (*Pecari tajacu* LINNEAUS, 1758)**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró – RN, 2015.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, 7: 871-891, 1995.

WOODALL, P. F.; FITZGIBBON, C. Ultrastructure of Spermatozoa of the Yellow-rumped Elephant Shrew *Rhynchocyon chrysopygus* (Mammalia: Macroscelidea) and the Phylogeny of Elephant Shrews. **Acta Zoologica**, 76(1): 19-23, 1995.

ZAMBELLI, D.; BERGONZONI, M. L.; DE FANTI, C.; CARLUCCIO, A. Tecniche per la valutazione morfologica degli spermatozoi di gatto, coniglio e cane. **Atti del Convegno Nazionale SISVET XLVII Riccione**, 29: 279-283, 1993.

3. JUSTIFICATIVA

Devido a relevante função ecológica dos catetos que atuam na manutenção de espécies animais e vegetais, é de extrema importância aprimorar o conhecimento acerca da sua biologia reprodutiva, pois essas informações poderão auxiliar o desenvolvimento de biotécnicas visando a conservação da espécie, auxiliar sua reprodução em cativeiro, bem como a de espécies próximas. Embora já tenham sido realizados diversos estudos no tocante os aspectos reprodutivos dos catetos, ainda não existem relatos detalhados acerca da ultraestrutura das diferentes regiões e compartimentos de seus espermatozoides. Adicionalmente, existe a necessidade de uma descrição mais minuciosa a respeito das crioinjúrias ultraestruturais dos espermatozoides, pois essas informações poderão avaliar a eficiência do protocolo de congelamento quanto a capacidade de conservar a ultraestrutura das células espermáticas, possibilitando assim o seu aprimoramento.

Desse modo, o conhecimento que esse estudo irá proporcionar poderá contribuir para o conhecimento dos aspectos reprodutivos dos catetos, bem como para o aprimoramento do protocolo de criopreservação de sêmen da espécie. Consequentemente, tais informações poderão auxiliar a formação bancos de germoplasma masculino, útil para a conservação de indivíduos geneticamente valiosos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Descrever a ultraestrutura de espermatozoides frescos e criopreservados de catetos

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a morfometria da célula espermática de catetos, por inteiro e por região, utilizando a microscopia eletrônica de varredura;
- Descrever os detalhes ultraestruturais acerca das diferentes regiões morfológicas do espermatozoide de catetos por meio da microscopia eletrônica de varredura e transmissão;
- Identificar danos morfológicos no espermatozoide a fresco de catetos utilizando as diferentes técnicas de microscopia eletrônica;
- Avaliar as crioinjúrias decorrentes dos processos de congelação e descongelação do sêmen de catetos por meio das técnicas de microscopia eletrônica.

CAPÍTULO 1

Ultrastructural description of fresh and frozen-thawed sperm derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

Ultrastructural description of fresh and frozen/thawed sperm derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

Running Title: The *Pecari tajacu* sperm ultrastructure

Luana Grasielle Pereira Bezerra, e-mail: luana_grasielly@yahoo.com.br¹

Ana Liza Paz Souza, e-mail: aninhavet2@hotmail.com²

Herlon Victor Rodrigues Silva, e-mail: herlonvrs@hotmail.com³

Fábio Roger Vasconcelos, e-mail: fr.vasconcelos@yahoo.com.br⁴

Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura, e-mail: arlindo.moura@gmail.com⁴

Alexsandra Fernandes Pereira, e-mail: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br¹

Moacir Franco de Oliveira, e-mail: moacir@ufersa.edu.br¹

Alexandre Rodrigues Silva, e-mail: legio2000@yahoo.com¹

¹ Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA, Campus Mossoró, RN, Brazil

² Universidade Federal do Ceará – UFC, Campus Sobral, CE, Brazil

³ Universidade Estadual do Ceará – UECE, Campus Fortaleza, CE, Brazil

⁴ Universidade Federal do Ceará – UFC, Campus do Pici, Fortaleza, CE, Brazil

Author for correspondence: Alexandre R. Silva, Laboratory of Animal Germplasm Conservation, Department of Animal Sciences, UFRSA, Av. Francisco Mota, 572, Costa e Silva, Mossoró, RN, Brazil, E-mail: legio2000@yahoo.com

Abstract

The objective of the present study was to describe, through scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), the ultrastructure of peccaries' fresh and frozen-thawed sperm. For that, semen derived from 3 mature males was obtained by electroejaculation and evaluated for motility, membrane integrity, membrane functionality, chromatin integrity and morphology through light microscopy. Samples were frozen using a Tris extender plus egg yolk (20%) and glycerol (6%). Then, fresh and frozen-thawed semen samples were mixed in different sperm pools that were processed for SEM and TEM. Sperm motility, membrane integrity and functionality were impaired ($P < 0.05$) by freezing-thawing procedures, but sperm morphology and chromatin integrity evaluated by light microscopy were not significantly affected. The SEM revealed that peccaries' sperm presents a flattened head in a paddle format, measuring $6.07 \mu\text{m}$ in length and $3.84 \mu\text{m}$ in width, with a vastus acrosome ($4.46 \mu\text{m}$). Normal tails measure $38.11 \mu\text{m}$, being formed by an extensive midpiece with $15.52 \mu\text{m}$ in length. In frozen-thawed samples, both SEM and TEM provide us information about damage undetected through light microscopy as the presence of vesicles in the acrosome, loose plasma membrane, vacuolized mitochondria, dense fibers disorganized, and decondensed chromatin. In conclusion, we provide the first description of the sperm ultrastructure in collared peccaries. Moreover, SEM and TEM help us to identify some nanometric damage provoked by freezing-thawing procedures, thus providing valuable information for the improvement of such important protocols used for biobanking formation.

Keywords: *Tayassu tajacu*; transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, morphology, freezing-thawing, semen.

Research Highlights

In peccaries the acrosome covers about $\frac{3}{4}$ of the sperm's head.

Vesicles in the acrosome, loose plasma membrane, vacuolized mitochondria, dense fibers disorganized, and decondensed chromatin are observed in thawed spermatozoa of peccaries.

Information on the damages caused by freezing may help in the improvement of the cryopreservation protocol for peccaries semen.

Introduction

Collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) are ungulates of great ecological importance since they participate in vegetal dynamics through the predation of several species of plants, and act as seed dispersers (Pérez-Irineo & Santos-Moreno, 2016). Moreover, they integrate into food chains as part of the diet of predators (Scognamillo, Maxit, Sunquist, & Polisar, 2003). Despite their great relevance, these animals are suffering a reduction in population due to habitat loss and predatory hunting in some biomes, such as the Atlantic Forest and Caatinga (Desbiez et al., 2012).

To help the conservation of collared peccaries, the development of protocols for semen collection and freezing have been proposed in order to form a biobank (Castelo et al., 2010; Souza et al., 2016). In this sense, a knowledge of peccaries' male reproduction is essential for this purpose. Currently, it is well known that the ejaculate can be easily obtained by electroejaculation (Souza et al., 2009), and then evaluated by conventional analysis of sperm concentration, motility, and viability (Peixoto et al., 2012). Regarding morphological analysis, peccaries' sperm are usually evaluated through stained semen smears under light microscopy (Sousa et al., 2013).

Even if light microscopy is widely used for sperm analysis in various species, it presents limitations with regards to its capability of detecting sperm damages that can occur on a

nanometric scale (Morietti, Sutera & Collodel, 2016). It is well known that freezing protocols can induce some alterations on the sperm and provoke different responses on the structural components of the head, mid-piece, and tail (Nagy et al., 1999). In this scenario, electron microscopy techniques have been reported as efficient tools for the nanoscale analysis of the damage induced by cryopreservation on sperm in domestic (Moura et al., 2013) and wild (Sousa et al., 2016) mammals.

Scanning electron microscopy (SEM) provides three-dimensional micrographs with details of cell surface and depth (McClusky, 2003). It was a useful tool for the evaluation of the effects derived from the temperature reduction during refrigeration or cryopreservation of the sperm of goats (Chauhan, Kapila, Gandhi & Anand, 1994), rams (Rajashri et al., 2017) and boars (Ringleb, Waurich, Wibbelt, Streich & Jewgenow, 2011). In addition, transmission electronic microscopy (TEM) techniques provides two-dimensional images, allowing the observation of the interior of the cells with a wealth of detail. With this technique, damage derived from cryopreservation protocols were identified on a nanometric scale in elephants (*Elephas maximus*) (Sa-Ardrit et al., 2006), dogs (Silva et al., 2009), boars (Gutiérrez-Pérez, Juárez-Mosqueda, Carvajal & Ortega, 2009), rams (Silva et al., 2013a), goats (Li-guang et al., 2014), and bulls (Khalil, El-Harairy, Zeidan, Hassan & Mohey-Elsaeed, 2018).

Therefore, we aimed to apply scanning and transmission electron microscopy to provide the first ultrastructural description of the sperm of the collared peccary and to identify the possible ultrastructural damages caused by semen freezing/thawing processes.

Materials and methods

The ethics committee of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) has approved the experimental protocols as well as the animal care procedures adopted (Process no.

23091.008820/2016-03). In addition, experiments were approved by Brazilian Ministry of the Environment (SISBIO N° 37329). The reagents used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, United States).

Animals and semen collection

The animals used were obtained from the Center for the Multiplication of Wild Animals (CEMAS/UFERSA; Scientific register N° 12.492-0004/IBAMA), located at 5°11'S and 37°20'W, at an average altitude of 16 m. Sperm samples were obtained from three sexually mature males aged 27.8 ± 2.8 month during the dry period, in August 2017. The animals were maintained outdoors in paddocks (20 m × 3 m) with a covered area of (3 m × 3 m) and fed sow food and fruits (with water available ad libitum). Animals were fasted for 12 h before the experiments began. They were then physically restrained using a hand net and anesthetized using an intravenous administration of Propofol (Propovan, Cristalia, Fortaleza, Brazil) given as a bolus (5 mg/kg) (Souza et al., 2009). They were kept in lateral recumbency, and the semen was collected by an electroejaculation protocol previously established for the species (Castelo et al., 2010).

Semen evaluation

Semen was processed at the Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA-UFERSA). Fresh ejaculates were individually evaluated for aspects, color, and volume. The sperm concentration was determined using a Neubauer counting chamber (Silva et al., 2014). Sperm motility was analyzed using a computer-assisted sperm assessment (IVOS 7.4G; Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA) using the settings previously validated for the

species (Souza, Lima, Peixoto, Oliveira & Silva, 2016). Five independent and nonconsecutive microscopic fields were randomly selected and scanned.

Rose bengal-stained smears were prepared to evaluate the sperm morphology using light microscopy (1000×), counting 200 cells per slide (Sousa et al., 2013). The functional integrity of the sperm membrane was verified by evaluating the sperm osmotic response under a hypo-osmotic swelling test, using distilled water (0 mOsm/L) as the hypo-osmotic solution. A total of 200 cells were examined, and those with a swollen coiled tail were considered as presenting a functional membrane (Santos et al., 2013).

For the evaluation of the plasma membrane integrity, we used a fluorescent solution that contained the fluorophores diacetate 6-carboxyfluorescein (CFDA) and propidium iodide (PI). Samples were incubated for 10 min and evaluated by epifluorescence microscopy (Episcopic Fluorescent attachment EFA Halogen Lamp Set; Leica, Kista, Sweden). For each sample stained with CFDA/PI, 200 sperms were counted and classified as having or not having an intact membrane, according to color (Silva et al., 2012).

The evaluation of chromatin condensation was conducted according to the methodology described by Beletti & Mello (2004) with modifications. Briefly, semen smears (10 µL) were fixed in (3:1, v/v) ethanol:acetic acid for 1 min and in ethanol (70%) for 3 min, after which they were subjected to 4 M HCl solution for 25 min. Finally, they were washed in distilled water and dried at room temperature (~27°C). Then, 5 µL of toluidine blue pH 4.0 was deposited on the smears, covered by a coverslip and the spermatozoa were evaluated. We counted 500 cells that were classified as normal when presenting a light-blue color or with a decondensed chromatin when presenting a dark-blue or violet color.

Semen freezing and thawing

Samples were diluted in TRIS-egg yolk-glycerol extender (20%) at 27°C and equilibrated for 40 min to reach 15°C in a biological incubator (Quimis, Diadema, SP, Brazil). The incubator was then adjusted to establish the temperature at 5°C for 30 min. At that point, the sample was added to the extender with 6% glycerol, also at 5°C, which resulted in a final concentration of 3% glycerol and 100×10^6 sperm/mL. Finally, the samples were packed into 0.25 mL plastic straws (IMV Technologies, L'Aigle, France) that were placed horizontally in an insulated box for 5 min, at 5 cm above N₂ vapors, and then plunged into liquid N₂ for storage at -196°C, after a fast freezing rate of -40°C/min. After one week, frozen straws were thawed by immersion in a water bath at 37°C for 1 min (Silva et al., 2013b). Samples were evaluated as described for fresh semen.

Scanning electron microscopy

SEM was conducted at the Analytical Center of the Universidade Federal do Ceará (UFC). For SEM analysis, semen from the three individuals was pooled to form two groups: fresh and frozen-thawed samples. The semen pools were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min to separate the cells, then the supernatant was removed and the pellets formed by spermatozoa were fixed in Karnovsky's reagent (paraformaldehyde 4% and glutaraldehyde 2.5% in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2) at 27°C. After fixation, three washes of 5 min each were performed with 0.1 M sodium cacodylate buffer. Then, the samples were dehydrated and subjected to acetone baths in increasing concentrations (50, 70, 90, and 100%) for 10 min each. The pellets were broken, and one drop (300 µL) of the suspension was deposited on a glass coverslip and air-dried. The coverslips were mounted onto stubs with the aid of carbon tape. For metallization, the stubs were placed on a metallizer (Q150T ES; Quorum Technologies, Guelph, Ontario, Canada) and metallized with a 20 nm layer of gold for later observation with a scanning electron

microscope (Quanta 450-FEG; FEI, Hillsboro, OR, USA). The description of peccaries' sperm by SEM was conducted according to that previously reported for domestic swine by Bustos-Obregon & Fléchon (1975).

Transmission electron microscopy – TEM

TEM was performed at the Electron Microscopy Facility (Dept. Cell Biology and Development – ICB) at the University of São Paulo (USP). Semen samples from the three individuals were pooled in two groups: fresh and frozen/thawed samples. Each pool was centrifuged at $800 \times g$ for 10 min. Pellets were fixed using Karnovsky's reagent and maintained at 4°C. Then, pellets were post-fixed with osmium tetroxide (1%), dehydrated in propylene oxide, and embedded in EPON resin (Embed 812; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, United States). Ultra-fine sections (60–70 nm) were manually stained with uranyl acetate and lead citrate. Random fields were examined by a transmission electronic microscope (JEOL 1010; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) and photographed for further analysis and description. The description of the peccaries' sperm by TEM was conducted according to that previously reported for domestic swine (Boonkusol, Saikhun & Ratanaphumma, 2010; Lydka, Piasecka, Gaczarzewicz, Koziorowski & Bilinska, 2012).

Data analysis

Results for general sperm analysis were expressed as means (\pm SEM). All analyses were performed using Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The data were first examined for normality by the Shapiro–Wilk test and for homoscedasticity by Levene's test. In view of some data that did not present a normal distribution, an arcsine transformation was

conducted for percentage values. Comparisons among fresh and frozen/thawed semen were evaluated by ANOVA followed by Student's *t*-test. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Results related to SEM and TEM were subjectively described.

Results

General sperm analysis

The collared peccaries' ejaculates presented a white color, watery aspect, and pH 7.0, with a mean volume of 2.5 ± 0.8 mL and a sperm concentration of $196.7 \pm 29.6 \times 10^6$ sperm/mL. In addition, the fresh samples presented a mean of $72.3 \pm 9.9\%$ motility, $91.0 \pm 2.5\%$ functional membranes, $82.7 \pm 1.9\%$ sperm with intact membranes and $99.9 \pm 0.1\%$ chromatin integrity. After thawing, a significant decrease ($P < 0.05$) in sperm parameters was evidenced, being the mean values of $25.0 \pm 15\%$ motility, $59.7 \pm 9.7\%$ membrane functionality, and $56.0 \pm 12.0\%$ intact membranes. Regarding chromatin integrity, this characteristic was not affected by freezing/thawing procedures ($P > 0.05$), and values of $99.9 \pm 0.1\%$ were also verified.

The evaluation of sperm morphology through light microscopy is presented in Table 1. No differences were found between fresh and frozen/thawed samples ($P > 0.05$). A morphologically normal sperm and the main morphological defects observed in peccaries' sperm are demonstrated in Figure 1.

Scanning electron microscopy

The SEM revealed that collared peccaries' sperm presents a flattened head in a paddle format, measuring $6.07 \mu\text{m}$ in length and $3.84 \mu\text{m}$ in width, with an intact and uninterrupted surface (Fig. 2A). The vastus acrosome occupied most of the head length, approximately 4.46

μm , with a clear demarcation between the post-acrosomal region being delimited by a distended border and marginal thickening (Fig. 2B). Normal tails measured $38.11 \mu\text{m}$, and were formed by an extensive midpiece of $15.52 \mu\text{m}$ in length (Fig. 2A).

In frozen/thawed samples, normal spermatozoa were also observed (Fig. 3A); however, some defects were evidenced, such as broken tails (Fig. 3B), damaged acrosomes (Fig. 3C) and plasma membranes (Fig. 3D), and coiled tails (Fig. 3E).

Transmission electron microscopy

By means of TEM, the presence of a homogeneous nucleus, and some acrosomal vesicles indicating probable initiation of the acrosome reaction, were noted in the head of some fresh sperm (Fig. 4A). In the main and mid pieces of the tail, the presence of an intact axoneme with conventional structure was identified (Fig. 4B, 4D, and 4E), as well as the presence of nine outer dense fibers (ODFs) with drop formats around the axoneme (Fig. 4C and 4D), and an external fibrous sheath (Fig. 4C). The mitochondria were juxtaposed, thus forming the mitochondrial sheath, which was surrounded by the plasma membrane with some undulations (Fig. 4D and 4E).

The TEM of the frozen/thawed samples showed that the procedures adopted were able to maintain the intact ultrastructure of some normal sperm. However, ultrastructural damages were identified in the acrosome and plasma membrane of various cells as changes in the acrosome morphology (Fig. 5A) of many acrosomal vesicles, thus indicating acrosome reactions (Fig. 5B) and the loss of plasma membrane (Fig. 5A and 5B). The presence of electron-lucent nuclear points (Fig. 5B), mitochondria with vacuolization (Fig. 5C), fiber disorganization, and mitochondrial losses (Fig. 5D) were also observed in frozen/thawed samples.

Discussion

Electron microscopy techniques allow us to evaluate the efficiency of the currently adopted protocol for freezing/thawing the sperm of collared peccaries. Even if the protocol was capable of maintaining the ultrastructural integrity of frozen/thawed sperm similar to that of fresh samples, various sperm damages provoked by the freezing/thawing procedures were only visible on a nanometric scale.

Before the present study, morphological evaluation of peccaries' sperm had been usually conducted by light microscopy (Sousa et al., 2013), which is a fast, easy, and low-cost technique that allows the visualization of the contour and divisions of the sperm, allowing the identification of changes in morphology, and may also be applicable to the field (Silva, Silva, Cavalcante, Ferreira & Souza, 2008). In peccaries, light microscopy allows us to identify a series of secondary defects, probably provoked by sperm manipulation and the freezing/thawing process. However, it was not efficient enough to detect damage provoked by the freezing/thawing procedures; no differences in morphology between fresh and frozen/thawed samples were identified in the present study.

In this context, electron microscopy considerably contributes to the science, because it allows the formation of high-resolution images for the study of cell ultrastructure, and provides a wealth of information and details complementing the information obtained through light microscopy. In the present study, besides evaluating the damage provoked by sperm freezing/thawing, SEM and TEM allowed us to conduct the first ultrastructural characterization of the sperm of collared peccaries. The cell head measured 6.07 μm in length and 3.84 μm in width, similar to measurements verified for the domestic swine, a species closely related phylogenetically to the collared peccary (Cavalcante-Filho, Miglino, Machado, Bevilacqua & Neves, 1998); its sperm's measurements were 7.3 μm in length and 4.1 μm in width (Bustos-Obregon and Fléchon, 1975). In both species, the tail occupies most of the spermatozoa (around 6/7 of the total length). Additionally, the acrosomes are very vast, covering about 3/4 of the

length of the heads, with a marginal thickening (Bustos-Obregon & Fléchon, 1975). In collared peccaries, however, a peculiar feature is the presence of a well-marked demarcation between the acrosome and the post-acrosomal region. We emphasize that a previous study conducted by our team had explored the collared peccaries' sperm morphometry (Sousa et al., 2013) using light microscopy. However, information regarding details of the acrosome and the presence of marginal thickening were only now possible with the use of SEM.

In fresh sperm, TEM helped us to identify the presence of a vesicle into the acrosome (Fig. 4A), probably indicating the beginning of an acrosome reaction, as previously reported in fresh sperm derived from the domestic swine (Bonet, Briz & Fradera, 1993). It is known that the formation of these vesicles occurs from the fusion of the plasma membrane with the external acrosomal membrane (Eilts, 2005). It is possible that this could be caused by the procedures necessary to prepare the samples for electron microscopy. In peccaries, a great sensitivity of the spermatozoa to centrifugation was previously reported (Castelo et al., 2010). This process increases defects in sperm morphology, promoting changes in the acrosome even before and after freezing/thawing.

Furthermore, the amount of acrosomal vesicles increased in the frozen/thawed samples. Besides provocation by TEM procedures, these may be related to cryocapacitation, which is an acceleration in the capacitation process provoked by the freezing/thawing procedure. In fact, this is an event frequently reported as a factor related to the reduction of frozen/thawed sperm longevity in the female genital tract (Watson, 1995). It is generally caused by an intracellular increase in the Ca^{2+} concentration due to the inhibition of the Ca^{2+} ATPase enzyme, because of the decrease in temperature (Green & Watson, 2001). Besides the Ca^{2+} influx into the cell, there is also reorganization and increase in the plasma membrane fluidity in order to adapt to the temperature changes; the cell modifies its phospholipid translocation with the externalization of phosphatidylserine (Silva et al., 2009). Thus, the occurrence of sperm capacitation at an

undesired moment would damage sperm viability and directly impair their fertilizing capability (Pons-Rejraji, Bailey & Leclerc, 2009).

The performance of the plasma membrane is essential for the survival of cells (Arruda et al., 2006), since it exerts a fundamental role in cell coating and cellular homeostasis, which are directly related to the fertilization process (Dell'Acqua, Papa, Zahn, Alvarenga & Leonardo, 2002). According to Arruda *et al.* (2006), damage to its structure may compromise the capacity of sperm in connecting to the zona pellucida, penetrating the oocyte, and fusing with the oolemma. In the present study, the cryopreservation process caused plasma membrane distension in some cells (Figs. 3C, 5A, and 5C). This could be the reason why previous studies had showed a reduction the binding capability of the sperm of collared peccaries after freezing/thawing procedures compared to that of fresh samples (Campos et al., 2017).

In routine sperm analysis, the chromatin condensation can be assessed by analyzing semen smears stained with Toluidine blue dye and analyzed through light microscopy (Beletti & Mello, 2004). This dye has characteristic metachromasia; that is, it promotes color changes due to binding to structures in cells and tissues, in which case it has been associated with chromatin condensation due to the reduction in disulfide bonds between protamines and its binding to free phosphate groups in DNA (Exbrayat, 2013). However, the difference between a cell with the condensed chromatin to another with decondensed chromatin is only related to the dye intensity in the cell, making the evaluation quite subjective. Therefore, the presence of nuclear electron-lucent points in thawed sperm, as evidenced by TEM, highlighted some chromatin damage (Bloom & Fawcett, 1994), which were not detected by light microscopy. Similar results were reported in a bovine study, in which the increase of chromatin decondensation in thawed semen was related to the loss of protamine from the nucleus (Kipper et al., 2017). Moreover, such DNA lesions induced by cryopreservation can also be mediated by the oxidative stress derived from semen processes (Thomson et al., 2009). As a consequence, the excessive instability of

sperm chromatin could lead to fertility problems (Morandi Filho, Beletti & Oliveira, 2015) such as modify the shape of the sperm head and negatively influence the motility (Beletti, Costa & Guardieiro, 2005), as well as impair the fertilization and formation of normal embryos, since DNA damage can induce apoptosis and embryo fragmentation (Beletti, 2013). It is necessary to emphasize that even if chromatin instability was identified after freezing/thawing of the sperm of peccaries, the occurrence of this damage was less than 1%, thus evidencing the efficiency of the protocol adopted in preserving the germplasm of this species.

In some collared peccaries' sperm tails, TEM allowed us to identify vacuolization and loss of mitochondria (Fig. 5C and 5D), as well as disorganization of the fibers (Fig. 5D). These modifications could have interfered with the sperm motility, which decreased from $72.3 \pm 9.9\%$ in fresh samples to $25.0 \pm 15.0\%$ in frozen/thawed samples. In fact, a reduction in sperm motility after thawing/freezing procedures has been described not only in collared peccaries (Alves et al., 2013, Souza et al., 2016) but also in various other wild animals as bears (*Ursus thibetanus japonicus*) (Okano, Murase & Tsubota, 2004), white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *C.s. cottoni*) (Hermes et al., 2005), deer (*Cervus elaphus hispanicus*) (Martínez-Pastor et al., 2009), and Asian elephants (*Elephas maximus*) (Saragusty et al., 2009). The ODFs are important for the stability and elastic retreat of the sperm tail, as well as for support of the beating of the flagellum (Baltz, Williams & Cone, 1990; Lindemann, 1996). In mice, the impaired development of ODFs was pointed out as one of the causes of abnormalities due to a faulty head–tail binding, indicating the important function of the fibers in sperm morphology and motility (Yang et al., 2012). Deformations in the mitochondria may cause a decrease in the energy production required for the beating of the flagellum due to changes in the oxidative phosphorylation and transport of protons performed at the internal mitochondrial crest. Thus, these changes are directly related to the decrease in sperm motility (Celeghini, Arruda, Andrade, Nascimento & Raphael, 2007).

In conclusion, we clearly characterize, for the first time, the ultrastructure of collared peccaries' sperm. Moreover, SEM and TEM allowed us to detect some sperm ultrastructural damages provoked by the freezing/thawing procedures that were not visible by light microscopy. In this context, further studies should be focused on reducing these damages in order to improve the efficiency of freezing/thawing protocols used for the formation of biobanks.

Acknowledgements

The authors thank CEMAS/UFERSA for providing the animals used for the experiment, the Analytical Center of the Universidade Federal do Ceará (UFC), Multiuser Laboratory of Electronic Microscopy of the Universidade de São Paulo (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) and Scanning and Transmission Electron Microscopy Laboratory (Universidade de São Paulo- FMVZ) for technical assistance. Luana G.P. Bezerra is a recipient of a grant by CNPq. Arlindo A. A. N. Moura, Alexsandra F. Pereira, Moacir F. Oliveira, and Alexandre R. Silva were recipients of a grant by CNPq.

References

- Alves, H. M., Oliveira, I. R. S., Castelo, T. S., Lima, G. L., Souza, A. L. P., Moreira, M. A. P., De Paula, V. V., & Silva, A. R. (2013). Comparison of Different Glycerol and Egg Yolk Concentrations Added to Tris-based Extender for the Collared Peccaries (*Tayassu tajacu*) Semen Freezing. *Reproduction in Domestic Animals*, 48, 506–511.
- Arruda, R. P., Celeghini, E. C. C., Andrade, A. F. C., Raphael, C. F., Peres, K. R., & Neves, L. C. (2006). Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. *In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*,

- Londrina, PR. Londrina. *Anais do 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*: [s.n.], 157–164.
- Baltz J. M., Williams, P. O., & Cone, R. A. (1990). Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biology of Reproduction*, 43, 485–491.
- Beletti, M. E. (2013). Sperm chromatin: breaking paradigms. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37, 92–96.
- Beletti, M. E., Costa, L. F., & Guardieiro, M. M. (2005). Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 22, 85–90.
- Beletti, M. E., & Mello, M. L. S. (2004). Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*, 62, 398–402. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>
- Bloom, W., & Fawcett, D. W. (1994) *A Textbook of Histology* (12th ed.) Chapman & Hall, New York.
- Bonet, S., Briz, M., & Fradera, A. (1993). Ultrastructural abnormalities of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 40, 383–396. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90276-B](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90276-B)
- Boonkusol, D., Saikhun, K., & Ratanaphumma, P. (2010). Effects of Extender and Storage Time on Motility and Ultrastructure of Cooled-Preserved Boar Spermatozoa. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 44, 582–589.
- Bustos-Obregon, E., & Fléchon, J.-E. (1975). Comparative Scanning Electron Microscope Study of Boar, Bull and Ram Spermatozoa. *Cell and Tissue Research*, 161, 329–341.
- Campos, L. B., Peixoto, G. C. X., Silva, A. M., Souza, A. L. P., Castelo, T. S., Maia, K. M. Pereira, A. F., & Silva, A. R. (2017). Estimating the binding ability of collared peccary

- (Pecari tajacu Linnaeus, 1758) sperm using heterologous substrates. *Theriogenology*, 92, 57–62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.008>
- Castelo, T. S., Bezerra, F. S., Lima, G. L., Alves, H. M., Oliveira, I. R., Santos, E. A., Peixoto, G. C. X., & Silva, A. R. (2010). Effect of centrifugation and sugar supplementation on the semen cryopreservation of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Cryobiology*, 61, 275–279. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.09.005>
- Cavalcante-Filho, M. F., Miglino, M. A., Machado, G. V., Bevilacqua, E. M. A. F., & Neves, W. C. (1998). Comparative study of the morphology of the stomach of White lipped peccary (*Tayassu pecari*) and of the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Brazilian Journal of Morphology Science*, 15, 203–207.
- Celeghini, E. C. C., Arruda, R. P., Andrade, A. F.C., Nascimento, J., & Raphael, C. F. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animal*, 42, 479–488. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x>
- Chauhan, M. S., Kapila, R., Gandhi, K. K., & Anand, S. R. (1994). Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrologia*, 26, 21–26.
- Dell'Aqua, J. A., Papa, F. O., Zahn, F. S., Alvarenga, M. A.; & Leonardo, H. (2002). Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 26, 189–191.
- Desbiez, A. L. J., Keuroghlian, A., Beisiegel, B. M., Medici, P. E., Gatti, A., Pontes, A. R. M., Campos, C. B., Tófoli, C. F., Moraes Junior, E. A., Azevedo, F. C., Pinho, G. M., Cordeiro, J. L. P., Santos Júnior, T. S., Morais, A. A., Mangini, P. R.; Flesher, K.,

- Rodrigues, L. F., & Almeida, L. B. (2012). Avaliação do Risco de Extinção do Cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Número Temático: Avaliação do Estado de Conservação dos Ungulados. *Biodiversidade Brasileira*, 3, 74–83.
- Eilts, B. E. (2005). Theoretical aspects of canine sêmen cryopreservation. *Theriogenology*, 64, 685–691. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.019>
- Exbrayat, J-M. (2013). Histochemical and cytochemical methods of visualization. Exbrayat, J-M. (1 st ed.). Histochemical methods. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 62–136.
- Gutiérrez-Pérez, O., Juárez-Mosqueda, M. L., Carvajal, S. U., & Ortega, M. E. T. (2009). Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*, 58, 287–292. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.02.003
- Green, C. E., & Watson, P. F. (2001). Comparasion of the capacitacion-like state of cooled boar spermatozoa whith true capacitation. *Reprodaction*, 122, 889–898. doi: 10.1530/rep.0.1220889
- Hermes, R., Hildebrandt, T. B., Blottner, S., Walzer, C., Silinski, S., Patton, M. L., Wibbelt, G., Schwarzenberger, F., & Göritz, F. (2005). Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *C.s. cottoni*): evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation. *Theriogenology*, 63, 219–238. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.04.007
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (in press). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation:

Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>

Kipper, B. H., Trevizan, J. T., Carreira, J. T., Carvalho, I. R., Mingoti, G. Z., Beletti, M. E., Perri, S. H. V., Franciscato, D. A., Pierucci, J. C., & Koivisto, M. B. (2017). Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. *Theriogenology*, 87, 154–160. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.017>

Li-guang, S., Ru-jie, Y., Wen-bin, Y., Wen-juan, X., Chun-xiang, Z., You-she, R., Lei, S., & Fu-lin., L. (2010). Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Animal Reproduction Science*, 118, 248–254. doi: [10.1016/j.anireprosci.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.10.003)

Lindemann, C. B. (1996). Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulation with the geometric clutch model. *Cell Motility Cytoskeleton*, 34, 258–270. doi: [10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1996\)34:4<258:AID-CM1>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1996)34:4<258:AID-CM1>3.0.CO;2-4)

Lydka, M., Piasecka, M., Gaczarzewicz, D., Kozirowski, M., & Bilinska, B. (2012). Administration of Flutamide Alters Sperm Ultrastructure, Sperm Plasma Membrane Integrity and its Stability, and Sperm Mitochondrial Oxidative Capability in the Boar: In Vivo and In Vitro Approach. *Reproduction in Domestic Animal*, 47, 635–643. doi: [10.1111/j.1439-0531.2011.01935.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01935.x)

Martínez-Pastor, F., Martínez, F., Álvarez, M., Maroto-Morales, A., García-Alvarez, O., Soler, A. J., Garde, J. J., de Paz, P., & Anel, L. (2009). Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology*, 71, 628–638. doi: [10.1016/j.theriogenology.2008.09.033](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.033)

- McClusky, L. M. (2003). A scanning electron microscopic study of germ cell maturation in the reproductive tract of the male soupfin shark (*Galeorhinus galeus*). *Acta Zoologica (Stockholm)* 84, 69–76.
- Morandi Filho, R., Beletti, M. E. & Oliveira, F. (2015). Ultrastructure of Bovine Sperm Chromatin. *Microscopy research and technique*, 78, 1117–1120.
- Moriatti, E., Suter, G., & Collodel, G. (2016). The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62, 171–183. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2016.1155242>
- Moura, C.S., Nunes, A. K. S., Silva, B. S., Peixoto, C. A., Silva, A. R., Silva, S. V., & Guerra, M. M. P. (2013). The effect of the thawing temperature on the integrity of canine cryopreserved sperm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65, 1057–1064.
- Nagy, S., Házás, G., Bali-Papp, A., Ivancsics, J., Sas, J. R. F., Kovács, A., & Foote, R. H. (1999). Evaluation of sperm tail membrane by light microscopy. *Theriogenology*, 52, 1153–1159.
- Okano, T., Murase, T., & Tsubota, T. (2004). Electroejaculation and Semen Cryopreservation of Free-Ranging Japanese Black Bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 66, 1371–1376.
- Peixoto, G. C. X., Silva, M. A., Castelo, T. S., Silva, A. M., Bezerra, J. A. B., Souza, A. L. P., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2012). Individual variation related to testicular biometry and semen characteristics in collared peccaries (*Tayassu Tajacu* Linnaeus, 1758).

Animal Reproduction Science, 134, 191–196. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.026>

Pérez-Irineo, G., & Santos-Moreno, A. (2016). Abundance, herd size, activity pattern and occupancy of ungulates in Southeastern Mexico. *Animal Biology*, 66, 97–109. doi: 10.1163/15707563-00002490

Pons-Rejraji, H., Bailey, J. L., & Leclerc, P. (2009). Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reproduction, Fertility and Development*, 21, 525–537. doi:10.1071/RD07170

Rajashri, M., Reddy, K. R., Kumari, G. A., Kumari, N. N., Kesharwani, S., & Srinivas, G. (2017). Qualitative ultrastructural changes and morphometry of deccani sheep spermatozoa preserved with egg yolk citrate extender. *Journal of Applied and Natural Science*, 9, 1515–1521.

Ringleb, J., Waurich, R., Wibbelt, G., Streich, W. J., & Jewgenow, K. (2011). Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *Reproduction, Fertility and Development*, 23, 818–825.

Sa-Ardrit, M., Saikhun, J., Thongtip, N., Damyang, M., Mahasawangkul, S., Angkawanish, T., Jansittiwate, S., Faisaikarm, T., Kitiyanant, Y., Pavasuthipaisit, K., & Pinyopummin, A. (2006). Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 29, 346–352.

- Santos, E. A. S., Sousa, P. C., Peixoto, G. C. X., Simão, B. R., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2013). Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65, 1257–60. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000400044>
- Saragusty, J., Hildebrandt, T. B., Behr, B., Knieriem, A., Kruse, J., & Hermes, R. (2009). Successful cryopreservation of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 115, 255–266. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.11.010
- Scognamillo, D., Maxit, I. E., Sunquist, M., & Polisar, J. (2003). Coexistence of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) in a mosaic landscape in the Venezuelan llanos. *Journal of Zoology*, 259, 269–279. doi:10.1017/S0952836902003230
- Silva, A. M., Peixoto, G. C. X., Bezerra, J. A. B., Castelo, T. S., Santos, E. A. A., & Silva, A. R. (2014). Relationship between Neubauer counting chamber and spectrophotometer used for the sperm concentration determination in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Ciência Rural*, 44, 1494–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130928>
- Silva, A. R., Fontenele-Neto, J. D., Cardoso, R. C. S., Silva, L. D. M., Chiniréa, V. H., & Lopes, M. D. (2009). Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciência Animal Brasileira*, 10, 595–601.
- Silva, L. M., Silva, C. M. G., Cavalcante, T. V., Ferreira, J. L., & Souza, J. A. T. (2008). Use of Bengal Rose Dye in Humid Preparation as a Method of Morphological Evaluation of Sperm Sheep. *Revista Científica de Produção Animal*, 10, 174–180.
- Silva, M. A., Peixoto, G. C. X., Castelo, T. S., Lima, G. L., Silva, A. M., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2013b). Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu*) semen using different freezing curves, straw sizes, and thawing rates. *Cryobiology*, 67, 50–55. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.009>

- Silva, M. A., Peixoto, G. C. X., Lima, G. L., Bezerra, J. A. B., Campos, L. B., Paiva, A. L., Paula, V. V., & Silva, A. R. C. (2012). Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) sêmen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology*, 78, 605–11. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.006>
- Silva, S. V., Soares, A. T., Batista, A. M., Almeida, F. C., Nunes, J. F., Peixoto, C. A., & Guerra, M. M. P. (2013a). Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 137, 37–44. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.12.002>
- Sousa, P. C., Santos, E. A. A., Silva, A. M., Bezerra, J. A. B., Souza, A. L.P., Lima, G. L., Oliveira, M.F., & Silva, A.R. (2016). Identification of ultrastructural and functional damages in sperm from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) due to cryopreservation. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36, 767–774. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2016000800015>
- Sousa, P. C., Santos, E. A. A., Souza, A. L. P., Lima, G. L., Barros, F. F. P. C., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2013). Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 924–930. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000700014>
- Souza, A. L. P., Castelo, T. S., Queiroz, J. P. A. F., Barros, I. O., Paula, V. V., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2009). Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. *Animal Reproduction Science*, 16, 370–5. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.02.017
- Souza, A. L. P., Lima, G. L., Peixoto, G. C. X., Oliveira, M. F., & Silva, A. R. (2016). Use of *Aloe vera*-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*)

sêmen. *Theriogenology*, 85, 1432–1438. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.007>

Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Jiliis, G. N., Zieschang, J.-A., & Clark, A. M. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24, 2061–2070. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/dep214>

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 871–891.

Yang, K., Meinhardt, A., Zhang, B., Grzmil, P., Adham, I. M., & Hoyer-Fender, S. (2012). The Small Heat Shock Protein ODF1/HSPB10 Is Essential for Tight Linkage of Sperm Head to Tail and Male Fertility in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 216–225. doi: 10.1128/MCB.06158-11

Table 1. Morphological defects (mean \pm SEM) detected on collared peccaries' fresh and frozen-thawed sperm through light microscopy.

Sperm characteristics (%)	Fresh	Frozen-thawed
Normal sperm	84.0 \pm 2.5	80.5 \pm 7.4
Tail defects		
Coiled tail	4.0 \pm 2.3	15.3 \pm 5.9
Strongly coiled tail	6.0 \pm 3.0	0.3 \pm 0.3
Broken tail	0.3 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3
Midpiece		
Folded Midpiece	4.0 \pm 0.6	0.3 \pm 0.3
Broken midpiece	0.7 \pm 0.3	0.2 \pm 0.2
Abaxial implantation	0	0.2 \pm 0.2
Head defect		
Abnormal head	0	0.3 \pm 0.3
Detached head	1.3 \pm 0.9	0.8 \pm 0.2
Acrosome defects	0	1.3 \pm 0.8
Total defects	16.0 \pm 2.5	19.5 \pm 7.4

No statistical difference was found between treatments ($P > 0.05$).

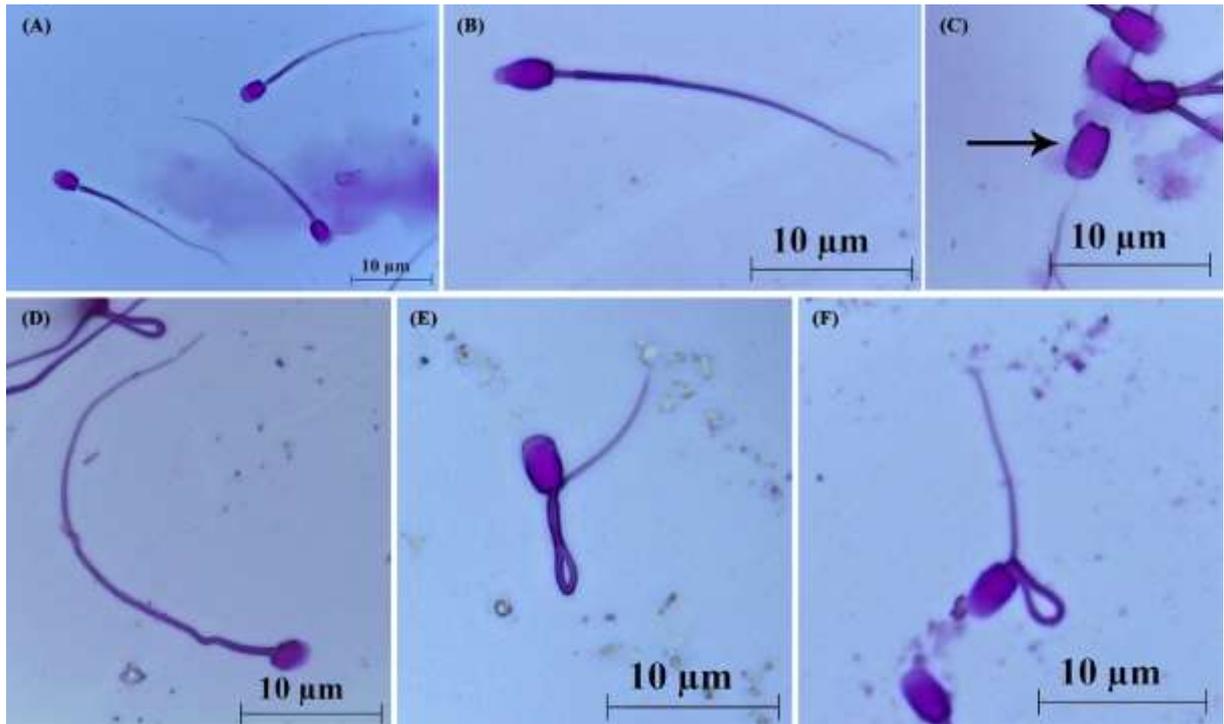


Figure 1. Morphological defects found in fresh and frozen- thawed sperm from collared peccaries. (A) Normal sperm. (B) - Defect in acrosome. (C) - Detached head (arrow). (D) – Abnormal head. (E) – Coiled tail. (F) – Midpiece broken at neck.

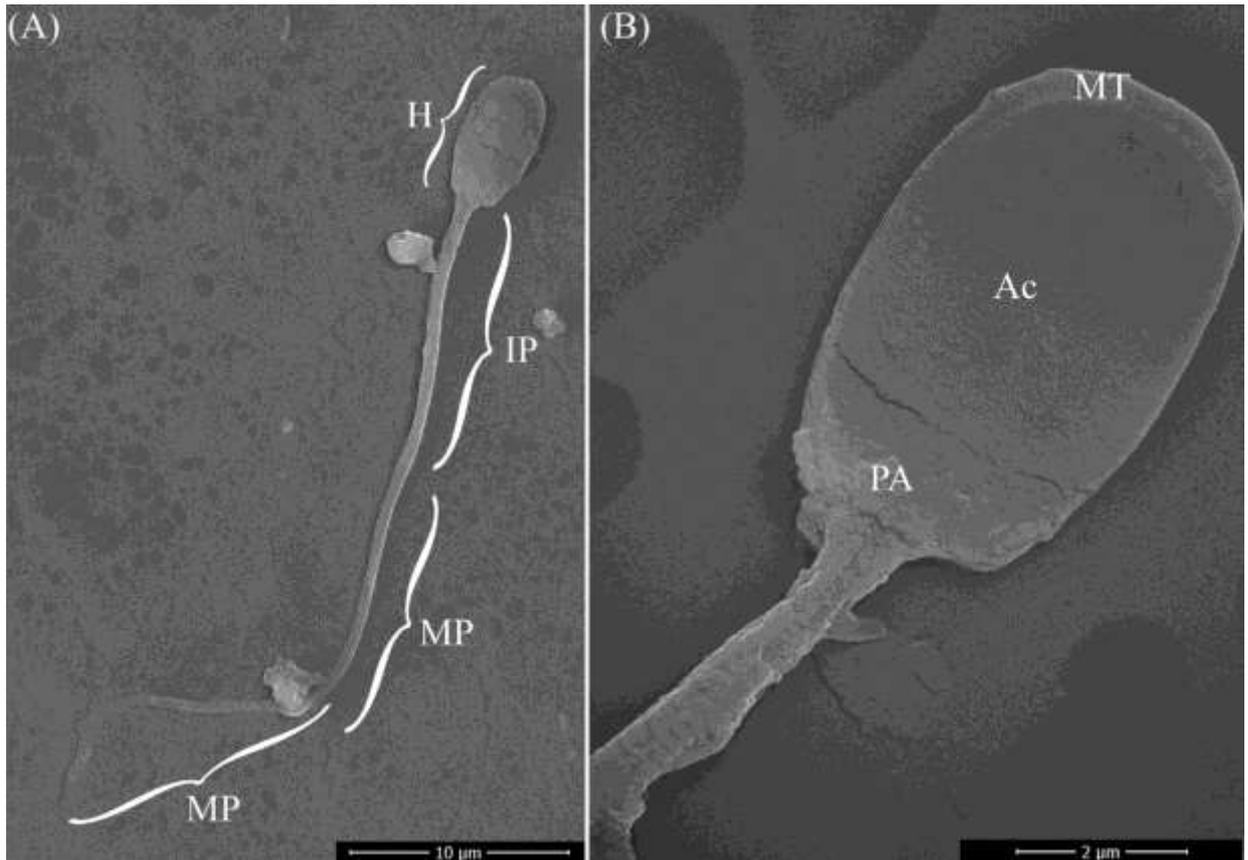


Figure 2. Scanning electron micrograph of fresh sperm from collared peccaries. (A) - normal sperm, H: head, IP: intermediate piece and MP: main part. (B) - sperm head with plasma membrane integrity, marginal tracking (MT) surrounding the acrosome (Ac) which is relatively long, clear demarcation between the acrosome and the post-acrosomal area (PA).

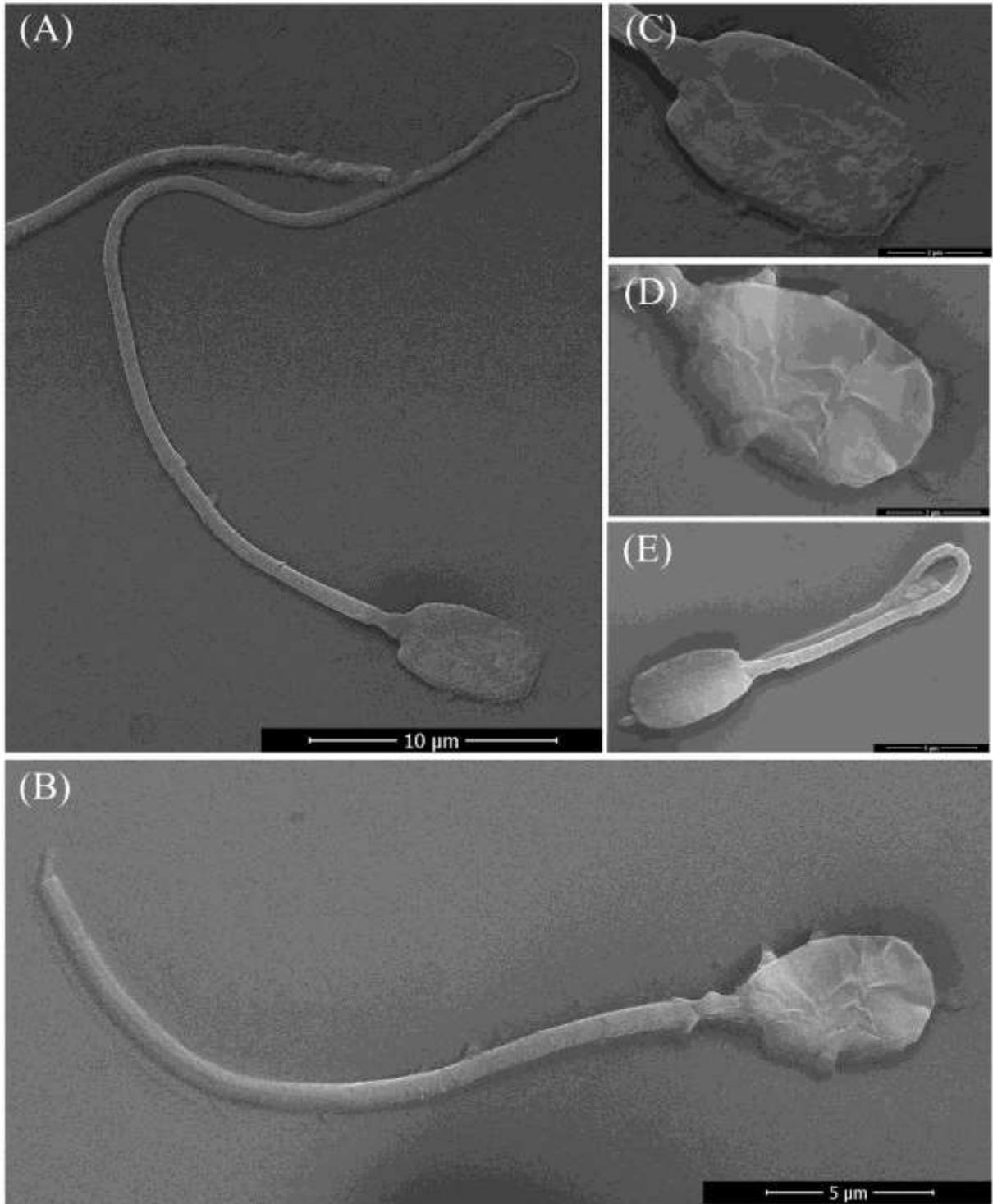


Figure 3. Scanning electron micrograph of frozen-thawed sperm from collared peccaries (*Pecari tajacu*) showing injuries. (A) - normal sperm. (B) - sperm with broken tail. (C) acrosome damaged. (D) - loose plasma membrane. (E) - bent tail.

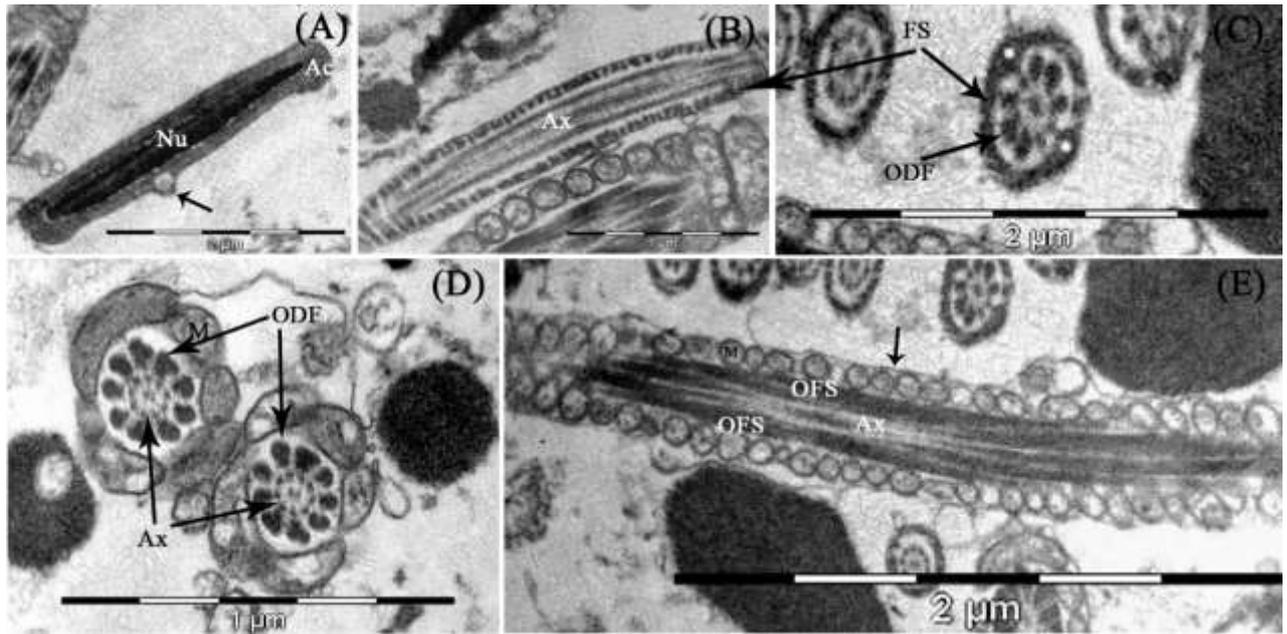


Figure 4. Transmission electron microscopy of fresh sperm from collared peccaries. (A) - transverse cut of the sperm head, acrosome (Ac), surrounding the nucleus (Nu), possibly start of acrosomal reaction shown by the formation of a vesicle (arrow). (B) and (C) - longitudinal and transversal cut respectively of the main piece with integral axonema (Ax) and outer dense fibers (ODF) surrounded by the fibrous sheath (FS) supported by the longitudinal columns (asterisk). (D) and (E) - transversal and longitudinal sections respectively of the intermediate piece showing the mitochondria (M) juxtaposed forming the mitochondrial sheath involving the outer fibrous sheath (OFS) formed by the outer dense fibers and plasma membrane (arrow) with ripples.

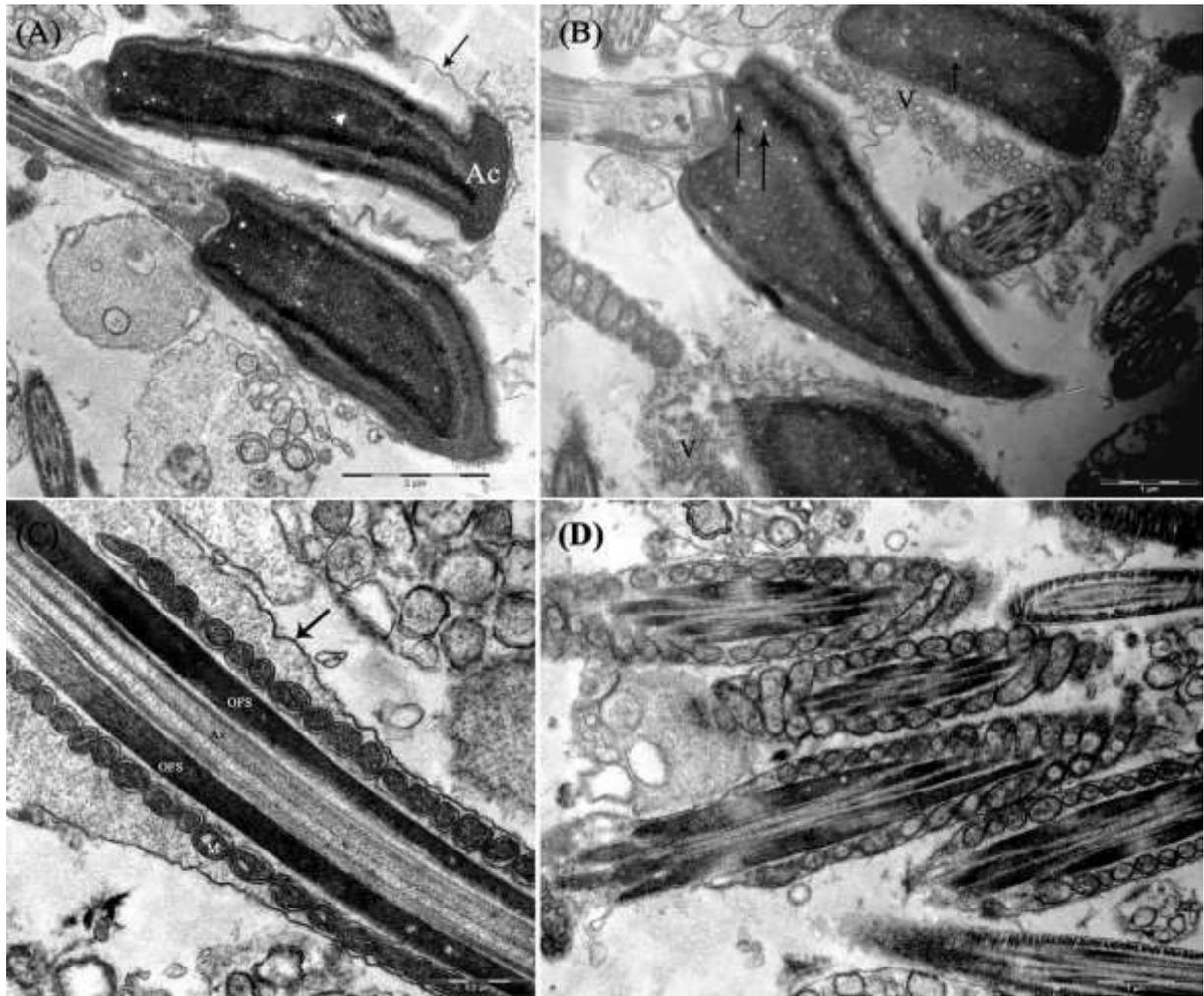


Figure 5. Transmission electron microscopy of frozen-thawed sperm from collared peccaries (*Pecari tajacu*). (A) - longitudinal section of the spermatozoa head showing the loose plasma membrane (arrow), the irregularly shaped acrosomes. (B) - presence of vesicles (V) around sperm heads demonstrating acrosomal reaction and electron lucent nuclear dot (arrows). (C) - Longitudinal cut of the intermediate piece showing loose plasma membrane (arrow), mitochondria (M) with vacuolization. (D) - Cross section of intermediate piece showing disorganization of the fibers and loss of mitochondria

ANEXO A: Carta de submissão do artigo “Ultrastructural description of fresh and frozen/thawed sperm derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)”

Microscopy Research and Technique

[# Home](#)

[/ Author](#)

Submission Confirmation [Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Microscopy Research and Technique

Manuscript ID
MRT-18-188

Title
Ultrastructural description of fresh and frozen/thawed sperm derived from collared peccaries
(*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758)

Authors
Bezerra, Luana Grazielle
Souza, Ana Lúcia
Silva, Helton Victor
Vasconcelos, Fábio
Moura, Arlindo
Pereira, Alessandra
Oliveira, Moadir
Silva, Alexandre Rodrigues

Date Submitted
12-Jun-2018

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

✉ @ScholarOneNews | ⚙ System Requirements | 📄 Privacy Statement | 📄 Terms of Use