



Efeito da adição de taurina sobre espermatozoides ovinos refrigerados a 5°C

Effect of taurine addiction on ram sperm cooled at 5°C

Vitória Gasperin Guazzelli Costa, Antonio Sergio Varela Junior, Stela Mari Meneghello Gheller, Geórgia Cruz Tavares, Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira, Carine Dahl Corcini¹

Grupo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal/ReproPEL, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

¹Correspondência: corcinicd@gmail.com

Resumo

O objetivo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de taurina ao diluente de resfriamento de sêmen ovino. Foram utilizados neste experimento 40 ejaculados de oito carneiros, diluídos nos tratamentos: controle Tris-gema (T1) adicionado de taurina nas concentrações de 1 µM (T2), 2 µM (T3) e 3 µM (T4), sob refrigeração a 5°C por 48 h e avaliados através da análise de parâmetros de qualidade espermática de integridade de membrana, DNA e acrossoma, funcionalidade de mitocôndria e motilidade espermática. Observou-se que a motilidade espermática nas 48 h foi inferior no T2 (29,3%) em relação ao T4 (37,6%) ($P < 0,05$). Quanto aos parâmetros de integridade de membrana e DNA não se verificou diferença estatística entre os tratamentos. Para integridade de acrossoma, em amostras de sêmen fresco, encontrou-se 59,0%, e após 48 h de refrigeração, foram observadas taxas integridade nos grupos adicionados de taurina de 50,7% (T2), 51,3% (T3) e 51,6% (T4), que não diferiram do sêmen fresco. Conclui-se que a taurina nas concentrações testadas foi eficiente para manter a integridade de acrossoma no sêmen ovino refrigerado a 5°C.

Palavras-chave: análise espermática, antioxidante, tris-gema.

Summary

The objective of this work was to assess the effect of different concentrations of taurine added to ram sperm cooling extender. We used in this experiment 40 ejaculates from eight rams, diluted according to the following treatments: Tris-yolk control (T1) taurine-added at the concentrations of 1 µM (T2), 2 µM (T3) and 3 µM (T4), under 5°C refrigeration for 48 hours and assessed through sperm quality parameters of membrane integrity, DNA and acrosome, mitochondrial functionality and sperm motility. We observed that sperm motility within 48 hours was lower in T2 (29.3%) when compared to T4 (37.6%) ($P < 0.05$). As for the parameters membrane integrity and DNA we did not observe statistical differences among the treatments. As for acrosome integrity, in fresh semen samples, we obtained 59.0%, and after 48 hours refrigeration we observed integrity rates in the taurine-added groups of 50.7% (T2), 51.3% (T3) and 51.6% (T4), that did not differ from fresh semen. In conclusion, the concentrations of taurine we tested was efficient to keep acrosome integrity within cooled ram sperm at 5°C.

Keywords: sperm analysis, antioxidant, tris-yolk.

Introdução

A inseminação artificial (IA) tem um importante papel no incremento genético do rebanho ovino (Maxwell e Watson, 1996). Atualmente, é possível realizar a IA utilizando amostras de sêmen fresco, refrigerado e congelado (O'Hara et al., 2010). Entretanto, a IA com sêmen congelado apresenta algumas limitações decorrentes da redução da qualidade seminal, necessitando que seja realizada através de laparoscopia para que os índices de fertilidade sejam satisfatórios (Kershaw et al., 2005). Desta forma, destaca-se o aumento da IA com sêmen refrigerado, devido a praticidade e viabilidade que esta técnica oferece, quando comparada a outras formas de conservação e utilização do sêmen (Salamon e Maxwell, 1995).

Estudos com sêmen ovino resfriado demonstram que a utilização por até doze horas apresenta as mesmas taxas de prenhez que o sêmen fresco, porém após este período ocorre redução nas taxas de fertilidade (Menchaca et al., 2005). Quando o sêmen é refrigerado a temperaturas entre 4-5°C, ocorre um gradual declínio na motilidade, integridade de membrana espermática e nas taxas de fertilidade (Maxwell e Salamon, 1993; De Lamirande et al., 1992). A produção de radicais livres também é apontada como uma das principais causas de redução da capacidade fecundante e sobrevivência das células espermáticas (Baumber et al., 2000). Neste sentido, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de avaliar a ação dos antioxidantes no sêmen de mamíferos: GSH e ácido ascórbico em sêmen de equinos (Aurich et al., 1997; Baumber et al., 2000), superóxido dismutase e catalase em sêmen de ovinos (Maxwell e Stajanov, 1996), glutatona, cisteína e 2-Mercaptoetanol em bovinos (Bilodeau et al., 2001).



A taurina é um aminoácido intracelular com ação antioxidante produzido a partir da metionina (Birdsall, 1998; Dawson et al., 2002; Lourenco e Camilo, 2002) que possui a capacidade de atravessar a membrana da célula espermática, inibindo a peroxidação lipídica e protegendo a célula contra o acúmulo de espécies reativas do oxigênio (Foot et al., 2002).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de taurina adicionadas ao diluente de resfriamento de sêmen ovino, a 5°C, por um período de 48h, sobre os parâmetros de qualidade espermática.

Material e Métodos

Todos os procedimentos realizados durante a execução deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPeL), sob registro número 7791.

Animais

Foram utilizados oito carneiros sem raça definida (SRD), sexualmente maduros e clinicamente saudáveis, alojados em instalações da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), sob as mesmas condições de manejo e alimentação. Os animais foram submetidos a cinco coletas de sêmen, uma vez por semana entre os meses de março e abril, pelo método de vagina artificial em presença da fêmea (Evans e Maxwell, 1997), totalizando 40 ejaculados, cada um representando uma unidade experimental

Apenas ejaculados que apresentaram motilidade maior ou igual a 70% e vigor maior ou igual a 3 (escala de 0 a 5; Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 2013), foram utilizados no experimento. A concentração mínima foi de $2,0 \times 10^9$ espermatozoides viáveis/mL, sendo essa avaliação realizada pelo método de contagem em câmara de Neubauer (CBRA, 2013).

Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste experimento eram provenientes da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.

Diluyente e tratamentos

A constituição do diluente base foi Tris-gema (Evans e Maxwell, 1997), com pH 6,9 e osmolaridade de 380 mOsm. As amostras foram diluídas em diluente base (1:1, v/v) no momento da coleta, para manutenção das células espermáticas. O material coletado e diluído em Tris Gema foi levado ao laboratório, onde passou pela análise imediata de motilidade e vigor espermático. Nas amostras que atingiram os padrões mínimos estabelecidos, foi realizada a diluição final (4×10^7 espermatozoides viáveis/mL) nos seguintes tratamentos: Controle Tris-gema (T1) e adição de taurina ao diluente base nas concentrações de 1 μ M (T2), 2 μ M (T3) e 3 μ M (T4) (Bucak e Tekin, 2007). A curva de resfriamento foi realizada em caixa condicionadora (Koolmate, Minitube, Ge), com taxa de resfriamento de 0,3-0,5°C/min até atingir a temperatura de 5°C, permanecendo as amostras armazenadas durante 48 h.

Avaliações *in vitro*

Antes das análises, as amostras resfriadas foram mantidas em banho Maria (10 min/37°C). Foram analisadas 200 células por amostra, nas 0, 2 e 48 h para o parâmetro de motilidade espermática e nas 0 e 48 h para os demais parâmetros utilizados

Motilidade Espermática

Foi avaliada através de visualização em microscopia óptica (Olympus CHK2-F-GS, América INC, São Paulo, SP) uma alíquota de 10 μ L de sêmen, entre lâmina e lamínula, mantidas a temperatura de 37°C sobre placa aquecida nas 0, 2, 48 h. A análise foi realizada sob aumento de 200x (CBRA, 2013) com escala de 0 a 100%.

Integridade de Membrana

Conforme protocolo descrito por Harrison e Vickers (1990), uma alíquota de 10 μ L foi exposta à combinação das sondas fluorescentes, diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (IP), seguida por incubação durante 5 min em sala escura. Esta avaliação foi feita com aumento de 400x em

microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), utilizando o filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516-617 nm. As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha ou verde/vermelha foram consideradas lesadas.

Funcionalidade mitocondrial

Foi avaliada com o uso de uma sonda específica, Rodamina 123 (Rh123), juntamente com IP, segundo Garner et al. (1997). Uma alíquota de 10 µL do sêmen foi incubada a 37°C por 5 min, em sala escura. As células foram avaliadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), em filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516-617 nm. As células que apresentavam a peça intermediária com intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias íntegras (funcionalmente ativas), enquanto as células sem ou com pouca intensidade de fluorescência verde na peça intermediária foram consideradas não funcionais.

Integridade de Acrossoma

Foi realizada segundo o protocolo de (Kawamoto et al., 1999) onde inicialmente amostras com 20 µL foram centrifugadas a 300 G por 10 min, sendo o sobrenadante retirado e desprezado. A partir dessas amostras foram confeccionados esfregaços em lâminas onde depois de secas, foram submersas em álcool etílico absoluto, para que houvesse a fixação das células na lâmina, por 5 min, e posteriormente eram lavadas em PBS. Em uma sala escura, foi adicionado às amostras, 20 µL de lecitina de *Arachis hypogaea* conjugada (FITC-PNA)(20 mg/mL), que permanecia por 10 min sobre as lâminas. Posteriormente, as lâminas eram lavadas em água deionizada e drenadas. As lâminas foram avaliadas sob um aumento de 1000x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP) em filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516-617 nm. As células com acrossoma que não apresentavam rugosidades, vacúolos e emitiam fluorescência verde foram consideradas íntegras, distinto desses padrões, foram classificadas como células com acrossoma danificado.

Análise estatística

De acordo com o teste de Shapiro-Wilk, os dados não apresentaram distribuição normal. Assim, os efeitos dos tratamentos sobre as respostas foram avaliados pela análise de variância de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Para efeitos de interpretação, todos os resultados foram relatados em suas escalas originais. Todas as análises foram conduzidas com Statistix® (2014).

Resultados

Ao final das avaliações espermáticas, observou-se que para o parâmetro de motilidade total espermática a média encontrada para os ejaculados à fresco foi de 76,2%. A adição de taurina ao diluente de refrigeração, em qualquer uma das concentrações utilizadas, não diferiu dos valores encontrados no T1, nas 0 e 2 h de exposição aos tratamentos, porém nas 48 h o T2 apresentou resultado inferior ao T4 ($P < 0,05$; Tab. 1).

Tabela 1. Motilidade espermática do sêmen ovino (média ± erro padrão da média) mantido sob resfriamento a 5°C por 48 h em diluente Tris-gema com adição de diferentes concentrações de taurina.

Tratamento	0 h	2 h	48 h
Sêmen Fresco	76,2 ± 1,4 ^a		
T1 (controle)	67,4 ± 2,9 ^b	57,4 ± 2,6 ^a	34,3 ± 2,6 ^{ab}
T2	65,1 ± 2,6 ^b	55,9 ± 2,5 ^a	29,3 ± 2,8 ^b
T3	64,1 ± 1,4 ^b	54,4 ± 2,5 ^a	32,2 ± 2,6 ^{ab}
T4	68,7 ± 2,6 ^b	59,8 ± 2,7 ^a	37,6 ± 2,5 ^a

^{a,b} Letras distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

No presente estudo, a adição de taurina em todas as concentrações correspondentes ao T2, T3 e T4, foram capazes de manter a taxa de integridade de acrossoma espermático nas 48 h de resfriamento semelhante ao sêmen fresco. Observou-se nas amostras de sêmen fresco valores de integridade de acrossoma de 59,0%, e nas 48 h de refrigeração taxas de 50,7% (T2), 51,3% (T3) e 51,6% (T4) Tabela 2. Para os demais parâmetros analisados (integridade de membrana e funcionalidade de mitocôndria) a adição de taurina não foi eficiente para manter os parâmetros seminais até as 48 h de resfriamento ($P < 0,05$; Tab. 2).

Tabela 2. Parâmetros avaliados (média ± erro padro da média) de sêmen ovino mantido sob resfriamento a 5°C por 48 h em diluente Tris-gema com adição de diferentes concentrações de taurina.

	0	T1	T2	T3	T4
Membrana	53.8 ± 2.4 ^A	37.1 ± 2.4 ^B	41.2 ± 1.8 ^B	39.3 ± 2.3 ^B	40.6 ± 2.3 ^B
Mitocôndria	63.2 ± 2 ^A	42.1 ± 1.7 ^B	43.2 ± 1.5 ^B	42.6 ± 1.8 ^B	45.3 ± 1.8 ^B
Acrossoma	59.0 ± 1.7 ^A	49.0 ± 2.5 ^B	50.7 ± 2.5 ^{AB}	51.3 ± 2.2 ^{AB}	51.6 ± 2.4 ^{AB}

^{A,B} Letras distintas indicam diferença estatística nas linhas (ANOVA, P < 0,05).

Discussão

A taurina é caracterizada por ser um antioxidante não enzimático, ou seja, é uma micromolécula que tem a função de proteger os espermatozoides das ações deletérias das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Barreiros et al., 2006), diminuindo as concentrações desses agentes oxidantes à níveis fisiológicos no sêmen e mantendo a fertilidade nos padrões adequados (Agarwal e Saleh, 2002). Para a variável de motilidade espermática, o tratamento controle com Tris-gema (T1) apresentou valores semelhantes aos tratamentos adicionados de taurina. Esses valores de motilidade são similares aos encontrados por Ari et al. (2011), utilizando diluente Tris-gema (20% gema), com taxas de motilidade nas 48 h de 36,5%. Na integridade de membrana e funcionalidade mitocondrial das amostras refrigeradas, não se evidenciou diferença estatística durante o período analisado. Estes resultados corroboram com Bucak et al. (2007), onde na criopreservação de sêmen ovino, a taurina não mostrou efeito positivo sobre a viabilidade e integridade de membrana espermática pós-descongelamento.

A peroxidação lipídica parece ser uma das causas mais importantes de disfunção espermática, alterando a sensibilidade da membrana plasmática que reveste o espermatozoide. Essa membrana, em pequenos ruminantes, devido ao alto teor de ácidos graxos poliinsaturados presentes na mesma, garante ao espermatozoide a fluidez necessária para que ele participe dos eventos de fusão de membranas associados com a fertilização (Aitken, 1995). Sarlos et al. (2002) trabalhando com sêmen de carneiros refrigerado, adicionado de antioxidantes, observou um prolongamento da motilidade e integridade das membranas espermáticas. Esses dados demonstrados podem ser devido as concentrações de taurina utilizadas em nosso estudo, onde as mesmas não conseguiram reduzir os danos ocasionados pela produção de radicais livres, esses provenientes do catabolismo espermático celular que mesmo em temperatura de 5°C corresponde a 10% quando comparada a temperatura basal (Squires et al., 1999).

Neste estudo, foi possível constatar uma manutenção da integridade de acrossoma espermático nas 48 h, quando comparado o sêmen fresco (T0) a todos os tratamentos adicionados de taurina. Em estudo realizado por Maxwell e Stojanov (1996) com sêmen ovino resfriado, verificou-se um efeito semelhante na adição de antioxidantes, catalase, superóxido dismutase, citocromo C e glutatona peroxidase ao diluente Tris-gema. Neste, todos os antioxidantes foram hábeis em melhorar tanto a sobrevivência quanto a integridade acrossomal do espermatozoide, durante o armazenamento do sêmen. A taurina, por ser utilizada pelas células espermáticas para regulação do seu volume intracelular, permitindo que elas se ajustem ao desbalanço osmótico, evita que ocorram lesões em suas membranas (Tappaz, 2004).

Experimentos clínicos têm demonstrado que a taurina possui efeitos estabilizantes, sendo reguladora da homeostase de Ca²⁺ (Tang et al., 2000; Oliveira et al., 2010). Este fato previne a capacitação espermática, processo que pode ser favorecido pelo maior ingresso de cálcio no interior da célula durante a refrigeração, quando há instabilidade das membranas celulares ocasionadas pela desestabilização correlacionada com aumento da fluidez da bicamada lipídica. Esse fato ocorre pela perda de 28% do conteúdo de colesterol da membrana plasmática nos processos de resfriamento e congelamento do sêmen, que leva à reações acrossômicas prematuras, denominado de criocapacitação (Bailey et al., 2000; Moore et al., 2005).

Conclusão

Conclui-se que a adição de taurina ao diluente base Tris-gema nas concentrações de 1, 2 e 3 µM, foi eficiente para manter a integridade de acrossoma por até 48 h em espermatozoides ovinos resfriados a 5°C.

Referências

- Agarwal A e Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin N Am*, v.29, n.4, p.1-12, 2002.
- Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, n.4, p.659-668, 1995.
- Ari UÇ, Kulaksiz R, Öztürkler Y. Freezability of Tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. *Reprod Domest Anim*, v.46, n.6, p.975-979, 2011.
- Aurich JE, Schonherr U, Hoppe H, Aurich C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled stored stallion semen. *Theriogenology*, v.48, n.2, p.185-192, 1997.



- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N.** Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*, v.21, p.1-7, 2000.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina VR, Davies-Morel MC.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl*, v.21, n.6, p.895-902, 2000.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP.** Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova*, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA.** Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, n.2, p.275-286, 2001.
- Birdsall TC.** Therapeutic Applications of Taurine. *Alternative Medicine Review*, v.3, n.2, p.128-136, 1998.
- Bucak MN, Tekin N.** Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Res*, v.73, n.1, p.103-108, 2007.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, p.49, 2013.
- Dawson RJ, Biasetti M, Messina S, Dominy J.** The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. *Amino Acids*, v.22, n.4, p.309-24, 2002.
- De Lamirande E, Gagnon C.** Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl*, v.13, n.5, p.368-378, 1992.
- Evans G, Maxwell WMC.** Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sidney: Butterworths, p.194, 1997.
- Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT.** Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.71, n.1, p.13-23, 2002.
- Garner DL, Thomas AC, Joerg HW, Dejarnette JM, Marshall CE.** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.57, n.6, p.1401-1406, 1997.
- Harrison RAP, Vickers SE.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.88, n.1, p.343-352, 1990.
- Kawamoto A, Kazutomo O, Kishikawa H, Zhu LQ, Azuma C, Murata Y.** Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. *Fertil Steril*, v.71, n.3, p.497-501, 1999.
- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ.** The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, v.64, n.5, p.1225-1235, 2005.
- Lourenco R, Camilo ME.** Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutr Hosp*, n.17, n.6, p.262-70, 2002.
- Maxwell WM, Salamon S.** Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod Fertil Dev*, v.5, n.6, p.613-638, 1993.
- Maxwell WMC, Stojanov T.** Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev*, v.8, n.6, p.1013-1020, 1996.
- Maxwell WMC, Watson PF.** Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.42, n.1, p.55-65, 1996.
- Menchaca A, Pinczak A, Queirolo D.** Storage of ram semen at 5°C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim Reprod*, v.2, p.195-198, 2005.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK.** Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241-249, 2005.
- O'Hara L, Hanrahan JP, Richardson L.** Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm, *Theriogenology*, v.73, n.4, p.54-549, 2010.
- Oliveira MWS, Minotto JB, Oliveira MR, Zanotto-Filho A, Behr GA, Rocha RF, Klamt F.** Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species, *Pharmacological Reports*, v.62, n.1, p.185-193, 2010.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*, v.37, n.3, p. 185-249, 1995.
- Sarlos P, Molnár A, Kókai M, Gábor G, Rátky J.** Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen, *Acta Vet Hung*, v.50, n.2, p.235-245, 2002.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE.** Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University (Bulletin, 9), 1999.
- Tang XC, Rao MR, Hu G, Wang H.** Alterations of amino acid levels from striatum, hippocampus, and cerebral ischemia in gerbil. *Acta Pharm*, v.21, n.9, p.819-823, 2000.
- Taapaz ML.** Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter. Molecular identification and regulations. *J. Neurochem*, v.29, p.83-96, 2004.
-