

Estudo da estabilidade espermática de ouriço-do-mar em diferentes condições de conservação e perfil de toxicidade do metronidazol

Zenaldo Porfírio¹ & Valter Alvino¹

¹ Deptº Microbiologia Aplicada/CCBj/UFAL. Praça Afrânio Jorge s/n, Prado. CEP 57010-020, Maceió, AL, Brasil. Tel.: 55 82 3223-5829; Fax.: 55 82 3221-2501. E-mail: porfírio@fapeal.br; valteralvinos@hotmail.com

Abstract. Study of the spermatic stability of sea urchin at different conservation conditions and toxicity profile of metronidazol.

The sea urchins *Arbacia lixula* were collected next to the reefs of Ponta Verde's beach in Maceió. At the laboratory, 2,5 ml of potassium chloride (KCl) 0,5M was injected around of the mouth region, that to eliminate the cells after a few minutes. The sperms were identified for their white color and the eggs were identified for their orange color. To determine the preservation form the sperms had been submitted in temperature of 2-8°C and 0°C. With passing of the time activations with sea water had been made and the cells were observed in optic microscope with increase of 200X. For determination of the metronidazole toxicity, 10%, 20%, 30% and 50% of metronidazole solution 0,5% were added to the activity sperms and their motility were monitored. After that the cells were quantified. At first they were observed that there were 65% of sperms cells with motility. The sperms that had been conditioned in closed pipes with cotton have showed minor conservation time to that they had been conditioned in locked pipes. We conclude that metronidazole concentrations of or more than 30% are toxicity for the sperms and the semen desiccation and the low temperature are factors unfavorable to preservation of sperms cells.

Key-words: Motility, sperm, drug, urchin.

Resumo: Os ouriços-do-mar da espécie *Arbacia lixula* foram coletados próximo aos recifes da praia de Ponta Verde, na cidade de Maceió. No laboratório, injetou-se 2,5mL de cloreto de potássio (KCl) a 0,5M ao redor da região peribucal, o que provocou a eliminação dos gametas após alguns minutos. Os espermatozoides foram identificados por apresentarem cor esbranquiçada e os óvulos pela cor alaranjada. Para a determinação da forma de acondicionamento, os espermatozoides foram submetidos às temperaturas de 2-8°C e 0°C dentro de tubos fechados com tampa rosqueada e tubos fechados com algodão, e com o passar do tempo foram feitas ativações em água do mar, visualizando-se em microscópio óptico com aumento de 200x as células ativas. Para a toxicidade do metronidazol, soluções na concentração de 10%, 20%, 30% e 50% foram adicionadas aos espermatozoides ativados, monitorando-se a motilidade e em seguida o número de células presentes na amostra foi determinado. Observou-se que inicialmente havia 65% de células espermáticas com viabilidade. Os espermatozoides que foram acondicionados em tubos fechados com algodão apresentaram menor tempo de conservação comparados aos que foram acondicionados em tubos rosqueados. Já a temperatura de 2-8°C foi a que manteve por um maior período de tempo a viabilidade das células espermáticas. Desta forma concluímos que concentrações de metronidazol iguais ou acima de 30% mostraram ser tóxicas aos espermatozoides e que o ressecamento do sêmen e a baixa temperatura são fatores desfavoráveis para a preservação das células espermáticas.

Palavras-chave: Motilidade, esperma, droga, ouriço-do-mar.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, têm-se observado um grande número de casos de infertilidade humana. Dentre essas causas, a masculina constitui até 50% dos casos e caracteriza-se pelas alterações na motilidade e na morfologia dos espermatozoides, principalmente pelo uso de algumas drogas (SANZ *et al.*, 1999; YANAGIMACHI, 1994).

A motilidade é um dos principais fatores para que ocorra a fecundação. Experimentos em ratos realizados por WOODS & GARSIDE (1996), demonstraram que machos tratados com alfa-clorohidrina tinham diminuição da motilidade dos espermatozoides e eram incapazes de fecundar as fêmeas.

REDDY *et al.* (1996) relataram que em humanos, quando algumas drogas são aplicadas no canal vaginal antes das relações sexuais, há perda da motilidade dos espermatozoides com conseqüente incapacidade de fecundação pelos mesmos, o que ratifica o poder espermicida que algumas drogas possuem.

O metronidazol é o fármaco mais importante do grupo de 5-nitroimidazoles, possuindo toxicidade contra microrganismos anaeróbicos, sendo a molécula de DNA o principal alvo de sua ação biológica. O mecanismo de ação do metronidazol depende do processo de redução do grupo nitro e, em meio ácido, a redução é pH-dependente envolvendo quatro elétrons na completa redução ao derivado hidroxilamínico. Em meio aprótico a redução do metronidazole acontece em duas etapas: a primeira envolvendo um elétron para formar o radical nitro e a segunda etapa envolve mais três elétrons até a formação da hidroxilamina (Fig.1)(LA-SCALEA *et al.*, 1999).

O metronidazol tem mostrado um importante papel no tratamento de infecções de microrganismos anaeróbicos, tendo como vantagens o grande número de bactérias anaeróbicas Gram-negativas sensíveis ao composto e a fácil absorção pela via oral, apresentando valores semelhantes aos administrados via intravenosa, o que faz com que haja rápida morte bacteriana, boa penetração tissular e cerebral (FREEMAN, *et al.* 1997).

Os equinodermas constituem um grupo que continua a desempenhar um papel importante nos estudos de embriologia e biologia celular, particularmente porque oferecem algumas vantagens como as de poderem ser obtidos em grande número em nosso litoral; seus gametas serem facilmente obtidos e visualizados em microscópio óptico; seus óvulos serem facilmente fertilizados e, quando fecundados ao mesmo tempo, apresentarem um período de clivagem em que se dividem sincronicamente (BEIG & CRUZ-LANDIM, 1975).

O objetivo do presente estudo foi analisar qual a melhor forma de conservação dos espermatozoides de ouriço-do-mar e determinar o perfil toxicológico do metronidazol. Avaliaram-se ainda, o tempo de ativação dos espermatozoides em água do mar; qual a melhor temperatura de conservação e o número de espermatozoides ativos em cada ativação.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do ouriço-do-mar

Os ouriços-do-mar da espécie *Arbacia lixula* foram coletados próximo aos recifes da praia de Ponta Verde, na cidade de Maceió, nos períodos de maré baixa. Foram levados ao Laboratório de

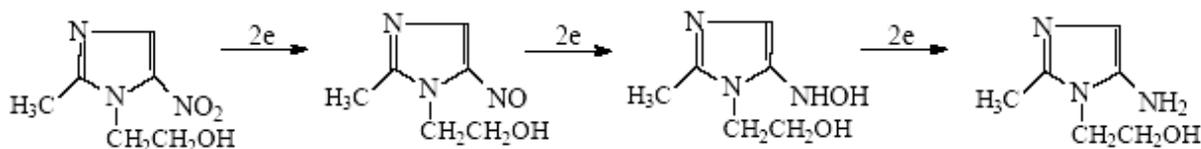


Figura 1. Etapas de redução do metronidazol (LA-SCALEA *et al.*, 1999).

Microbiologia Aplicada (L@MA) e mantidos em aquários de fluxo de água até a hora da extração dos gametas sexuais.

Obtenção dos gametas

No laboratório, os animais retirados do aquário foram lavados em água corrente para retirar possíveis impurezas existentes nos gonósporos. Os ouriços foram apoiados sobre uma bancada com a região peribucal voltada para cima, na qual injetou-se 2,5mL de cloreto de potássio (KCl) a 0,5M ao redor dessa região. Isto provocou a eliminação dos gametas após alguns minutos.

Os espermatozoides, identificados pela cor esbranquiçada, foram coletados com pipeta Pasteur e colocados em tubo de ensaio sem haver contato com água do mar para evitar a conseqüente ativação. Os óvulos, caracterizados pela cor alaranjada, foram acondicionados em Becker de 40ml.

Teste de capacitação da motilidade espermática

Foram colocadas alíquotas de 2mL, 3mL, 5mL e 6mL de sêmen em tubos fechados com algodão hidrófobo e em tubos fechados com tampa de rosca e posteriormente acondicionados em temperaturas de 2-8°C e 0°C. Em alguns tubos foi adicionado glicerol na concentração de 18%. Com o passar do tempo foram feitas ativações com água do mar filtrada em temperatura ambiente para determinar quantos espermatozoides tinham capacidade de adquirir motilidade. Foi depositado 10 µL de espermatozoides sobre uma lâmina e visualizados em microscópio óptico com aumento de 200x.

Teste com solução de metronidazol injetável 0,5%

Para a realização dessa análise, 20µL de sêmen foi diluído em 10 ml de água do mar filtrada, ativando os gametas. Foi distribuído 1ml dessa solução em tubos de ensaio recobertos com folha de alumínio e em tubos sem essa proteção ambos fechados com tampa de rosca sob temperatura ambiente, logo em seguida concentrações de 10%, 20%, 30% e 50% da solução contendo metronidazol foram adicionadas. Monitorou-se a

motilidade espermática por 10h, observando com quanto tempo os espermatozoides eram totalmente inativados e em seguida quantificou em câmara de Neubauer o número de células espermáticas presentes na amostra.

RESULTADOS

Após a ativação dos espermatozoides em água do mar foi observado que inicialmente havia 65% de células espermáticas com viabilidade, em todas as ativações, conforme as Figuras 2-4.

De acordo com os resultados apresentados, o volume foi um fator relevante para o acondicionamento das células espermáticas em tubos fechados com algodão. Uma amostra contendo 3 mm³ de espermatozoides apresentou uma sobrevivência de 120h a mais quando comparada a uma amostra contendo 2 mm³ (Fig.2).

Já em tubos rosqueados observou-se que entre amostras contendo 5 mm³ e 6 mm³ o decaimento da capacidade de ativação em temperatura 2-8°C foi em proporções semelhantes (Fig.3).

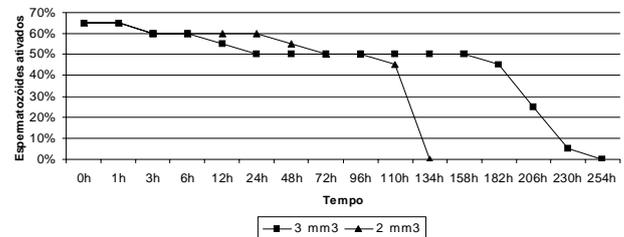


Figura 2. Comparação entre a capacidade de ativação dos espermatozoides acondicionados em temperatura de 2-8°C sob o volume de 2 mm³ e 3 mm³ em tubos fechados com algodão.

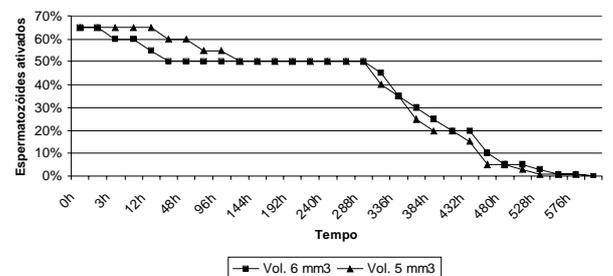


Figura 3. Comparativo da capacidade de ativação em água do mar dos espermatozoides acondicionados em geladeira sob o volume de 5 mm³ e 6 mm³ em tubo rosqueado.

Os espermatozoides que foram acondicionados em tubos fechados com algodão apresentaram menor tempo de conservação comparados aos que foram acondicionados em tubos rosqueados, os quais apresentaram sobrevida cinco vezes maior, como pode se observar na Figura 4.

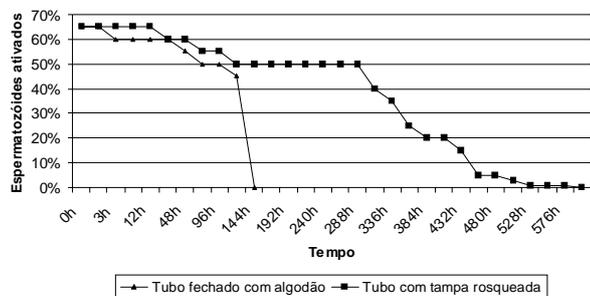


Figura 4. Comparativo da capacidade de ativação em água do mar dos espermatozoides acondicionados em geladeira com tubos fechados com algodão e tubos fechados com tampa rosqueada.

Após a primeira hora de acondicionamento das células espermáticas em temperatura de 0°C, não havia mais viabilidade para ativá-las em água do mar (Tab.1).

Quando o glicerol foi adicionado aos tubos contendo os espermatozoides houve uma considerável diminuição na capacidade de ativação de 65% para 45%, no tempo 0h. Após 1h de acondicionamento em temperatura de 0°C essa capacidade foi drasticamente reduzida para 5% e após 3h apenas 1% das células ainda conseguiram adquirir motilidade (Tab.2).

Tabela 1. Espermatozoides acondicionados em temperatura de 0°C.

Tempo de acondicionamento	% espermatozoides ativados
0h	65
1h	0

Tabela 2. Espermatozoides acondicionados em temperatura de 0°C com glicerol 18%.

Tempo de acondicionamento	% espermatozoides ativados
0h	45
1h	5
3h	1
6h	0

O metronidazol mostrou-se tóxico às células espermáticas nas dosagens de 30% e 50% nos experimentos realizados em tubos não-protetidos da luminosidade paralisando-as imediatamente depois que a droga foi adicionada (Tab.3).

Já em relação às dosagens de 10% e 20% realizadas em tubos não-protetidos da luminosidade, quando a droga foi adicionada aos espermatozoides, houve diminuição da motilidade quase paralisando as células. Porém, 30 min depois, estes espermatozoides conseguiam readquirir motilidade. A quantidade que se apresentava ativa após a adição do metronidazol, na dosagem de 10% era semelhante à quantidade observada antes da adição da droga. Na dosagem de 20% houve efeito semelhante mas, o número de espermatozoides ativos após a adição da droga foi 30% menor que o observado inicialmente (Tab.3). Esses espermatozoides mantiveram-se ativos durante as 10h em que foram observados sem apresentar alterações significativas quanto à motilidade. Assim, como não houve paralisação de todos os espermatozoides após a adição da droga nas doses de 10% e 20%, o resultado foi considerado como tempo indeterminado (Tab.3 e 4).

Nos experimentos com os tubos protegidos da luminosidade, as dosagens de 30% e 50% também mostraram-se tóxicas às células espermáticas paralisando-as imediatamente após a adição do metronidazol (Tab.4).

Com a dosagem de 10% o efeito foi semelhante aos resultados obtidos com os tubos sem proteção da luminosidade. Entretanto, para a dosagem de 20% houve redução do número de

Tabela 3. Observação do perfil toxicológico do metronidazol em células espermáticas contidas em tubos não-protetidos da luminosidade durante 10 horas sob temperatura ambiente.

Dosagem	Tempo de paralisação	Nº espermatozoides
10%	Indeterminado*	8.755/0,9mm ³
20%	Indeterminado*	12.779/0,9mm ³
30%	Imediato	9.683/0,9mm ³
50%	Imediato	10.161/0,9mm ³

*Indeterminado= tempo de motilidade acima de 10 horas.

espermatozoides que conseguiram readquirir motilidade. Após 30min da adição da droga, essa diminuição foi de até 50%, quando comparadas às observadas inicialmente.

Tabela 4. Perfil toxicológico do metronidazol em células espermáticas contidas em tubos protegidos da luminosidade durante 10h sob temperatura ambiente.

Dosagem	Tempo de paralisação	Nº espermatozoides
10%	Indeterminado*	2.814/0,9mm ³
20%	Indeterminado*	3.056/0,9mm ³
30%	Imediato	3.333/0,9mm ³
50%	Imediata	3.356/0,9mm ³

*Indeterminado= tempo de motilidade acima de 10 horas.

DISCUSSÃO

Segundo DE ROBERTIS & DE ROBERTIS JR. (1993) quando há ATP disponível para os flagelos, estes organóides começam uma atividade rítmica que pode persistir durante alguns minutos ou até horas, sendo necessária a interação entre a tubulina e dineína para isso. Em nossos estudos, esse sistema foi evidenciado quando se adicionou água do mar aos espermatozoides dos ouriços.

A motilidade é um indicador da eficiência do processo de congelamento e descongelamento (CROSS & HANKS, 1991). Nesta pesquisa, o acondicionamento dos espermatozoides em temperatura de 0°C inativou a capacidade dessas células adquirir motilidade quando postas em contato com água do mar. De acordo com WASTSON (1995), entre os principais fatores envolvidos está o efeito osmótico do processo de congelar e descongelar sobre a membrana plasmática dos espermatozoides, conduzindo a alterações da permeabilidade e, conseqüentemente, de morte celular.

Já os danos sub-letais, que promoveram a diminuição gradativa do número de espermatozoides que possuíam viabilidade, resultaram de uma combinação de fatores, incluindo desidratação e rehidratação celular, além de alterações bioquímicas e fisiológicas, como diminuição da atividade enzimática, ativação da

cascata da peroxidação lipídica, com conseqüente geração de espécies reativas de oxigênio com danos oxidativos (BARTHELEMY *et al.*, 1990).

Desde a década de 60, a criopreservação do sêmen humano é realizada rotineiramente, usando o glicerol como o crioprotetor (SHERMAN, 1964). Entretanto, quando ele é adicionado antes do congelamento ocorrem danos à membrana plasmática, alterando a integridade e a função normal (TADEI *et al.*, 2001). Esses dados corroboram com nossos resultados, onde ocorreu morte das células espermáticas em menos de 6h de conservação quando elas foram acondicionadas em temperatura de 0°C.

O metronidazol, antibiótico extensamente utilizado para o tratamento de infecções por protozoários e bactérias anaeróbicas, quando em concentrações de até 10 mg/mL, não apresentou efeito tóxico sobre os espermatozoides de coelho e de humano (FREEMAN, *et al.*, 1997; FOOTE, 2002). Estudos realizados por McCLAIN *et al.* (1989), evidenciaram que altas doses de metronidazol, administradas em ratos, causavam infertilidade, enquanto que baixas doses não alteravam a fertilidade. Nesta pesquisa, quando dosagens acima de 30% eram adicionadas aos espermatozoides de ouriço-do-mar, havia inativação da motilidade. Essa toxicidade pode ter sido causada pela formação de derivados letais da droga ou à acumulação do peróxido de hidrogênio em virtude da auto-oxidação, como relatado por SCHMIDT *et al.* 1977.

A luz é um fator importante para a estabilidade do metronidazol. Irradiação com luz UV (254 nm) em soluções de metronidazol aceleraram a degradação se comparado com amostras luz-protegidas (WANG & YEH, 1993). Em nossos estudos, isto se evidenciou na dosagem de 20%. Quando comparamos os experimentos realizados em tubos protegidos da luminosidade, notamos que houve diferença de 20% em relação a quantidade de espermatozoides que readquiriram motilidade, comparados aos tubos não-protegidos, enfatizando a degradação do metronidazol pela luz.

Desta forma concluímos que concentrações de metronidazol iguais ou acima de 30% mostraram ser tóxicas aos espermatozoides e que o ressecamento do sêmen e a baixa temperatura são fatores desfavoráveis para a preservação das células espermáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTHELEMY, C.; ROYERE, D.; HAMMAHAH, S.; LEBOS, C.; THARANNE, M.J.; LANSAC, J. 1990. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Archives of Andrology*, **25**: 29-40.
- BEIG, D. & CRUZ-LANDIM, C. 1976. Ultra-estrutura do espermatozoide de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinodermata). *Ciência e Cultura*, **28** (11): 1291-1298.
- CROSS, N.L. & HANKS, S.E. 1991. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reproduction*, **6**: 1279-1283.
- DE ROBERTIS, E.D.P. & DE ROBERTIS JR, E.M.F. 1993. **Guanabara Koogan**. Bases da Biologia Celular e Molecular. O Citoesqueleto e os Sistemas Contráteis da Célula. Segunda edição. Rio de Janeiro. 4: 80-81.
- FOOTE, R.H. 2002. Effects of metronidazole, ipronidazole, and dibromochloropropane on rabbit and human sperm motility and fertility. *Reproductive Toxicology*, **16**(6): 749-755.
- Freeman, C.D.; Klutman, N.E.; Lamp, K.C. 1997. Metronidazole: a therapeutic review and update. *Drugs*, **54**: 679-708.
- LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S.H.P.; GUTZ I. G.R. 1999. Voltammetric Behaviour of Metronidazole at Mercury Electrodes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **10**(2): 127-135.
- McCLAIN, R.M.; DOWNING, J.C.; EDGCOMB, J.E. 1989. Effect of metronidazole on fertility and testicular function in male rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, **12**(3): 386-396.
- REDDY, K.V.; SAHANI, K.S.; MEHERJI, K.P. 1996. Spermicidal activity of magainins: in vitro and in vivo studies. *Contraception*, **53**: 205-210.
- SANZ, E.; AVILA, L.M.; GAITÁN, P.; ESCOBAR, M.; SANTOS, A.M.; FERNÁNDEZ, A.; ALBERTO, J.; MADERO, J.I. 1999. Importancia de las glándulas sexuales accesorias en el eyulado. Medifertil. *Programa de medicina Reproductiva*. Calle 127 No. 28-75 Santafé de Bogotá Colombia.
- SHERMAN, J.K. 1964. Low temperature research on spermatozoa and eggs. *Cryobiology*, **1**: 103-29.
- SCHMIDT, G.W.; MATLIN, K.S.; CHUA, N.H. 1977. A rapid procedure for selective enrichment of photosynthetic electron transport mutants. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **74**(2): 610-614.
- TADEI, A.R.; BARBATO, F.; ABELLI, L.; CANESE, S.; MORETTI, F.; RANA, K.J.; FAUSTO, A.M.; MAZZINI, M. 2001. Cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology*, **42**: 244-255.
- WANG, D.P. & YEH, M.K. 1993. Degradation kinetics of metronidazole in solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **82**(1): 95-98.
- WASTSON, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil*, **7**: 871-91.
- WOODS, J. & GARSIDE, D. A. 1996. An in vivo and in vitro investigation into the effects of α -chlorohydrin on sperm motility and correlation with fertility in the han wistar rat. *Reproductive Toxicology*, **10**(3): 199-207.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, **2** (4): 371-372.

Recebido: 11/04/2007

Revisado: 05/11/2007

Aceito: 28/04/2008