

ENZIMAS GLICOLÍTICAS EM ESPERMATOZÓIDES DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA: RECOMENDAÇÃO DE MÉTODOS (*)

(Glycolytic enzymes in spermatozoa from Holstein bulls: recommendation of methods)

IVALDO FISCHER FERRAZ (1), DÉBORA LEWIN PLUT (1) e OCTAVIO SAMPAIO LEITE (1)

RESUMO

Foram determinadas as atividades da hexoquinase, fosfoglicoisomerase, piruvatoquinase e lactato desidrogenase em espermatozóides de bovinos da raça holandesa, empregando-se uma metodologia simplificada, comumente usada em eritroenzimologia. Em vista da obtenção de baixos coeficientes de variação, o que indica boa reprodutibilidade dos resultados, essa metodologia é recomendada para o estudo das atividades enzimáticas em espermatozóides daquela espécie.

INTRODUÇÃO

Vários critérios são utilizados para avaliação da qualidade do sêmen, isto é, de sua capacidade potencial de promover a fecundação. Assim, são geralmente considerados, para essa finalidade, os seguintes caracteres dos espermatozóides: concentração, grau de motilidade, porcentagem de vivos e morfologia.

São usuais, também, várias provas bioquímicas, como redução do azul de metileno, índice de flutólise e medida do consumo de oxigênio.

Em que pese essa multiplicidade de testes, nenhum deles é inteiramente satisfatório, quando utilizado isoladamente.

A investigação científica tem-se valido da enzimologia de espermatozóides, na tentativa de estabelecer correlações entre atividade enzimática e características do sêmen, conforme se depreende

das observações de BUCKLAND² FLIPSE³, ROUSSEL & STALLCUP¹², SMITH; MAYER; MERILAN^{13, 14, 15} e STALICUP & HAYDEN¹⁷.

Assim, por exemplo, FLIPSE³ e ROUSSEL & STALLCUP¹² encontraram correlações entre a atividade da glutamato-oxalacetato transaminase (GOT) e qualidade do sêmen, em bovinos. Por sua vez, BUCKLAND² surpreendeu correlação entre aconitase e capacidade de fecundação, em espermatozóides de galo.

No que tange à influência de tratamentos tecnológicos nos resultados da atividade enzimática, merecem destaque as observações de MURDOCH & WHITE⁶ e PACE & GRAHAM⁷. Segundo esses autores, resfriamentos bruscos, velocidade de cen-

(*) Projeto IZ-450.

(1) Da Seção de Reprodução e Inseminação Artificial, Divisão de Técnica Básica e Auxiliar.

trifugação e porcentagem de glicerol (durante a congelação) modificam a liberação e atividade de determinadas enzimas das células. Os dois últimos autores preconizam o emprego da atividade da GOT como teste de fertilidade do sêmen em bovinos.

Afigura-se muito importante a análise bioquímica efetuada por PETERSON & FREUND^{8,9}, em espermatozóides oriundos da espécie humana. Esses investigadores apresentam os valores obtidos para enzimas e compostos intermediários do metabolismo da glicose.

É notório o fato de que inúmeras são as metodologias empregadas para o estudo bioquímico dos espermatozóides, gerando obstáculos inclusive na interpretação dos resultados obtidos pelos diferentes autores.

Por isso, foram levados em conta, neste estudo, os aspectos relativos à amostragem, isolamento e lavagem dos espermatozóides, considerando-se, ainda, as condições de manutenção das atividades enzimáticas. As técnicas bioquímicas empregadas foram aquelas normalmente

utilizadas em eritroenzimologia, que, por suas facilidades de execução, mesmo em laboratórios menos equipados, podem ser recomendadas para células seminais.

Pesquisas desse gênero são da mais alta importância, pois, a partir de condições previamente padronizadas, pode-se analisar o comportamento metabólico dos espermatozóides como resposta a inúmeros fenômenos biológicos e experimentais (BUCKLAND² KOEFOED-JOHNSEN & MANN⁴, PETERSON & FREUND⁸, SRIVASTAVA; ADAMS; HARTREE¹⁰).

O presente trabalho visou avaliar a adequabilidade de métodos simplificados para o estudo das atividades enzimáticas de espermatozóides, e é parcela de uma linha de pesquisa idealizada no sentido de proporcionar possíveis correlações entre metabolismo de espermatozóides e qualidade do sêmen.

Foram determinadas as atividades das seguintes enzimas: hexoquinase, fosfoglicoisomerase, piruvatoquinase e lactato desidrogenase, que estão posicionadas nos passos iniciais e finais da via glicolítica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas nove amostras de sêmen provenientes de três touros da raça holandesa, dois da variedade malhada de preto e um da malhada de vermelho, saudáveis e mantidos em regime de estabulação no recinto do Instituto de Zootecnia da Secretaria da Agricultura, em São Paulo.

Os ejaculados foram obtidos pelo processo de coleta através de vagina artificial e variaram de 4 a 10 ml. Imediatamente após a coleta, foram efetuados exames subjetivos, ao microscópio, a fim de caracterizar as amostras quanto à sua densidade e motilidade espermáticas.

Foram também determinadas as concentrações de espermatozóides, por mé-

todo fotométrico, mediante a técnica descrita por PLUT; GOUVÊA; CAMPOS¹⁰, com auxílio do espectrofotômetro Coleman Junior, modelo 6A.

Os ejaculados analisados apresentavam boa motilidade (65 a 80%), e as concentrações de espermatozóides variavam de 0,78 a 1,38 milhão por milímetro cúbico de sêmen.

Todo material coletado era imediatamente mantido resfriado até o momento de sua utilização, tempo esse nunca superior a duas horas.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O ESTUDO ENZIMÁTICO

O sêmen total era submetido à centrifugação em centrífuga refrigerada (5°C), durante dez minutos e a velocidade de 1.500 rpm.

Desprezado o sobrenadante, adicionava-se solução de Krebs-Ringer, isenta de cálcio, tamponada com Tris-HCl a pH 7,0, como indicado por MURDOCH & WHITE¹⁰ até que fosse atingido o volume inicial do sêmen total. Após homogeneização, a suspensão assim obtida era novamente centrifugada, nas condições descritas. Essa operação de lavagem era repetida (geralmente duas vezes) até que o líquido sobrenadante estivesse claro. Ao sedimento celular, obtido por aspiração do sobrenadante da última lavagem, adicionava-se a solução Krebs-Ringer de modo a obter-se uma concentração aproximada de 10⁶ espermatozoides por milímetro cúbico. Esta suspensão final, agora denominada "suspensão padronizada de espermatozoides" (SPE), era novamente caracterizada no que tange à concentração de células espermáticas. Para a determinação desta última, adotou-se a técnica de PLUT; GOUVÊA; CAMPOS¹⁰, após ter-se cali-

brado o espectrofotômetro para as condições da SPE.

Nas determinações das atividades enzimáticas foi empregada a metodologia proposta por BEUTLER¹, modificada aqui apenas em relação às diluições e volumes tomados da amostra, a fim de que os gráficos fossem lineares e homogêneos.

Foram, assim, obtidos lisados celulares, diluindo-se uma alíquota da SPE com solução-tampão (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,1), na proporção de 1:9. Os tubos de ensaio eram vedados com parafilme e levados ao processo de congelamento e descongelamento rápido, por três vezes. Para tanto, empregou-se, respectivamente, mistura refrigerante (gelo seco e acetona) e banho-maria tépido. Essa etapa visou romper membranas e liberar as enzimas normalmente contidas no citoplasma.

As determinações das atividades enzimáticas foram efetuadas nesses lisados celulares, empregando-se um espectrofotômetro de marca Gilford 2400-S em 340 nm e a 37°C. Foram utilizadas abetas de 1 ml de capacidade e 1 cm de passagem de luz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para as atividades enzimáticas acham-se no quadro I, onde elas estão expressas em unidades por 10⁶ espermatozoides. O número de unidades de atividade enzimática corresponde ao número de micromóis de substrato transformados por minuto, nas condições do ensaio.

Pode-se verificar, através do desvio-padrão e coeficiente de variabilidade, que a variação entre amostras de um mesmo touro, e mesmo de touros diferentes, foi muito pequena.

Optou-se por bovinos de uma única raça em razão de que diferença de com-

portamento metabólico poderia apresentar-se por interferência de fatores raciais, como ocorre, por exemplo, em outros tipos celulares (MEDEIROS et alii², RAPOPORT¹¹).

Afigura-se muito importante o fato de terem sido examinadas, preliminarmente, as características do sêmen, pois, embora se tratasse de exemplares sadios e em franco período sexual, alterações transitórias podem ocorrer na qualidade do sêmen.

Por outro lado, a determinação do número de espermatozoide, por método de grande precisão, possibilitou orientar a obtenção da SPE.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O ESTUDO ENZIMÁTICO

O sêmen total era submetido à centrifugação em centrífuga refrigerada (5°C), durante dez minutos e a velocidade de 1.500 rpm.

Desprezado o sobrenadante, adicionava-se solução de Krebs-Ringer, isenta de cálcio, tamponada com Tris-HCl a pH 7,0, como indicado por MURDOCH & WHITE⁶ até que fosse atingido o volume inicial do sêmen total. Após homogeneização, a suspensão assim obtida era novamente centrifugada, nas condições descritas. Essa operação de lavagem era repetida (geralmente duas vezes) até que o líquido sobrenadante estivesse claro. Ao sedimento celular, obtido por aspiração do sobrenadante da última lavagem, adicionava-se a solução Krebs-Ringer de modo a obter-se uma concentração aproximada de 10⁶ espermatozoides por milímetro cúbico. Esta suspensão final, agora denominada "suspensão padronizada de espermatozoides" (SPE), era novamente caracterizada no que tange à concentração de células espermáticas. Para a determinação desta última, adotou-se a técnica de PLUT; GOUVÊA; CAMPOS¹⁰, após ter-se cali-

brado o espectrofotômetro para as condições da SPE.

Nas determinações das atividades enzimáticas foi empregada a metodologia proposta por BEUTLER⁷, modificada aqui apenas em relação às diluições e volumes tomados da amostra, a fim de que os gráficos fossem lineares e homogêneos.

Foram, assim, obtidos lisados celulares, diluindo-se uma alíquota da SPE com solução-tampão (Tris-HCl 0,05 M, pH 8,1), na proporção de 1:9. Os tubos de ensaio eram vedados com parafilme e levados ao processo de congelamento e descongelamento rápido, por três vezes. Para tanto, empregou-se, respectivamente, mistura refrigerante (gelo seco e acetona) e banho-maria tépido. Essa etapa visou romper membranas e liberar as enzimas normalmente contidas no citoplasma.

As determinações das atividades enzimáticas foram efetuadas nesses lisados celulares, empregando-se um espectrofotômetro de marca Gilford 2400-S em 340 nm e a 37°C. Foram utilizadas abetas de 1 ml de capacidade e 1 cm de passagem de luz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para as atividades enzimáticas acham-se no quadro I, onde elas estão expressas em unidades por 10⁶ espermatozoides. O número de unidades de atividade enzimática corresponde ao número de micromóis de substrato transformados por minuto, nas condições do ensaio.

Pode-se verificar, através do desvio-padrão e coeficiente de variabilidade, que a variação entre amostras de um mesmo touro, e mesmo de touros diferentes, foi muito pequena.

Optou-se por bovinos de uma única raça em razão de que diferença de com-

portamento metabólico poderia apresentar-se por interferência de fatores raciais, como ocorre, por exemplo, em outros tipos celulares (MEDEIROS et alii⁸, RAPOPORT¹¹).

Afigura-se muito importante o fato de terem sido examinadas, preliminarmente, as características do sêmen, pois, embora se tratasse de exemplares sadios e em franco período sexual, alterações transitórias podem ocorrer na qualidade do sêmen.

Por outro lado, a determinação do número de espermatozoide, por método de grande precisão, possibilitou orientar a obtenção da SPE.

SUMMARY

The purpose of this investigation was to evaluate the suitability of simplified methods, commonly used in erythroenzymology, for the study of enzymatic activities in spermatozoa; this would permit to establish standards of activities in such cells, for the study of their metabolic behaviour in different physiological and experimental conditions. Thus, the activities of hexokinase, phosphoglucose isomerase pyruvate kinase and lactate dehydrogenase were determined in spermatozoa from Holstein bulls, using nine ejaculates collected from three bulls.

The results showed that the methods employed had good reproductibility, since the variation coefficients of the activities for enzyme were low. It was concluded that the methodology employed may be recommended for establishing standards of enzymatic activities in bull spermatozoa. The values obtained in this paper, however, cannot be considered as representative of a population, since the number of animals was not sufficient for that purpose.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Luiz Octávio Medeiros a orientação deste trabalho e o ter-lhes franqueado seu laboratório, no setor de

Hematologia do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — BEUTLER, E.R. — *Red-cell metabolism; a manual of biochemical methods*. New York, Grune & Stratton, 1971. 180 p.
- 2 — BUCKLAND, R.B. — The activity of six enzymes of chicken seminal plasma and sperm. 2- The relationship between enzyme activity and fertility of fresh and stored semen. *Poultry Sci.*, Ithaca, N.Y., 50(6): 1734-42, 1971.
- 3 — FLIPSE, R.J. — Metabolism of bovine semen. IX. Glutamic-oxaloacetic and glutamic-pyruvic transaminase activities. *J. Dairy Sci.*, Champaign, Ill., 43(6): 773-6, 1960.
- 4 — KOEFOED JOHNSEN, H.H. & MANN, T. — Studies on the metabolism of semen. 9. Effect of surface-active agents with special reference to the oxidation of succinate by spermatozoa. *Biochem. J.*, London, 57(3): 406-10, 1954.
- 5 — MEDEIROS, L.O. et alii — Capacidade glicolítica dos eritrócitos de diferentes animais domésticos. *R. Atual. Vet.*, SP, 3(19): 26-8, 1974.
- 6 — MURDOCH, R.N. & WHITE, I.G. — Studies of the distribution and source of enzymes in mammalian semen. *Austral. J. Biol. Sci.*, Melbourne, Vic., 21(3): 483-90, 1968.
- 7 — PACE, M.M. & GRAHAM, E.F. — The release of glutamic-oxaloacetic transaminase from bovine spermatozoa as a test method of assessing semen quality and fertility. *Biol. Reprod.*, New York, 3: 140-6, 1970.
- 8 — PETERSON, R.N. & FREUND, M. — Profile of glycolytic enzyme activities in human spermatozoa. *Fert. Steril.*, Baltimore, Md., 21(2): 151-8, 1970.
- 9 — ——— — Glycolysis by human spermatozoa; levels of glycolytic intermediates. *Biol. Reprod.*, New York, 5: 221-7, 1971.
- 10 — PLUT, D.L.; GOUVÊA, A.C.; CAMPOS, B.E.S. — Determinação da concentração de espermatozoides em sêmen bovino pelo método espectrofotométrico. *B. Indústria. anim.*, SP, n.s. 30(2): 227-36, 1973.
- 11 — RAPOPORT, S. — The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes. In: CAMPBELL, P.N. & GREVILLE, G.D. ed. — *Essays*

Biochem. New York, Academic Press, 1968. v. 4, p. 69-103.

J. Dairy Sci., Champaign, Ill., 40(5): 516-20, 1957.

- 12 — ROUSSEL, J.D. & STALLCUP, O.T. — Parallelism between semen characteristic and glutamic-oxaloacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase activities. *J. Dairy Sci.*, Champaign, Ill., 48(12):1684-87, 1965.
- 13 — SMITH, J.T.; MAYER, D.T.; MERILAN, C.P. — Effect of egg yolk and its isolated constituents upon the dehydrogenase activity of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, Champaign, Ill., 39(5): 552-60, 1956.
- 14 — ——— — Seasonal variation in the succinic dehydrogenase activity of bovine spermatozoa.
- 15 — SMITH, J.T.; MAYER, D.T.; MERILAN, C.P. — Effect of washing upon the dehydrogenase activity of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, Champaign, Ill., 40(5): 521-7, 1957.
- 16 — SRIVASTAVA, P.N.; ADAMS, C.E.; HARTREE, E.F. — Enzymic action of acrosomal preparations on the rabbit ovum "in vitro". *J. Reprod. Fert.*, Oxford, 10(1):61-7, 1965.
- 17 — STALLCUP, O.T. & HAYDEN, J.S. — Lactic dehydrogenase activity in bovine semen. *J. Dairy Sci.*, Champaign, Ill., 43(2): 266-9, 1960.