

## ATIVIDADE GLUTAMATO OXALOACETATO TRANSAMINASE (GOT) EM SÊMEN DE BOVINOS DO TIPO MANTIQUEIRA (1)

*(Glutamic oxaloacetic transaminase activity (GOT) in semen of Mantiqueira bulls)*

TEREZINHA APARECIDA MARTINS GOMES DE CASTRO (2), CANDIDO EDUARDO PAIVA MACHADO (2) e EVALDO FISCHER FERRAZ (3)

**RESUMO:** Foi determinada a atividade glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) em amostras de sêmen de oito bovinos do tipo mantiqueira. A metodologia seguida foi a utilizada em eritroenzimologia, após lise das células espermáticas e liberação da enzima que foi determinada espectrofotometricamente a 340nm e 37°C, durante dez minutos. Os valores médios de atividade enzimática, expressos em unidades por miligrama de proteína, foram, respectivamente, 68,25 e 287,62 para o sêmen total e para espermatozoides. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que o método empregado pode ser recomendado como mais um parâmetro destinado a determinar a composição bioquímica do sêmen de bovinos.

### INTRODUÇÃO

Embora a análise bioquímica do sêmen seja realizada rotineiramente em muitos países, pouco se tem feito, no Brasil, nesse campo.

Além das características morfológicas para avaliação da qualidade do sêmen, tem-se dado atenção ao estudo das características físicas, químicas e bioquímicas, com o objetivo de melhor avaliar a sua qualidade.

Têm-se estudado os teores de ácido cítrico e frutose, e, mais recentemente, os pesquisadores voltaram sua atenção às atividades de enzimas, tanto no espermatozóide como no plasma seminal, de várias espécies, procurando estabelecer correlações significativas entre essas atividades e algumas características do sêmen, incluindo, entre elas, sua capacidade fecundante. Assim, estudaram-se as atividades de enzimas glicolíticas, proteolíticas, do ciclo de Krebs, de transaminases e fosfomonoesterases.

Dentre as enzimas, as transaminases (glutamato oxaloacetato transaminase e glutamato piruvato transaminase) se destacaram pela sua atividade relativamente alta no sêmen de mamíferos, e as evidências revelam que elas são capazes de realizar a conversão alanina-piruvato.

FLIPSE<sup>2</sup> determinou os níveis de atividade glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e glutamato piruvato transaminase (GPT) em sêmen de bovinos, tanto no espermatozóide como no plasma seminal, encontrando correlações positivas entre concentração espermática e níveis de GOT e GPT no plasma seminal. As análises enzimáticas de GOT feitas em 63 amostras de sêmen pertencentes a 25 touros deram em média  $623 \pm 48$  unidades sigma Frankel/mililitro.

MURDOCH & WHITE<sup>4</sup>, estudando a distribuição e origem de enzimas no sêmen de mamíferos, encontraram correlações significativas entre atividade GOT e a porcentagem de espermatozoides vivos e motilidade no sêmen de bovinos. Os valores de atividade enzimática de GOT em amostras de sêmen de bovinos foi  $505 \pm 113$  unidades sigma Frankel/mililitro.

ROUSSEL & STALLCUP<sup>6</sup> estudaram a relação da enzima GOT no espermatozóide e plasma seminal com outras características do sêmen. Verificaram que a atividade GOT do espermatozóide livre do plasma seminal está associada com a fisiologia do sêmen, observando correlações altamente significativas entre GOT e motilidade, densidade

(1) Projeto IZ-440/1. Recebido para publicação a 9 de setembro de 1982.

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

(3) Da Seção de Bacteriologia Animal, Divisão de Biologia Animal, Instituto Biológico, São Paulo (SP).

espermática e porcentagem de células vivas. A média dos valores de atividade enzimática de GOT encontrados em 149 amostras do sêmen de doze touros holstein foi 345,5 unidades sigma Frankel/mililitro.

PACE & GRAHAM<sup>5</sup>, estudando a liberação de GOT de espermatozoides de bovinos, concluíram que a maioria de GOT é encontrada na célula espermática e não no plasma seminal. Observaram que em 98 amostras de sêmen, houve uma correlação significativa ( $r = 0,21$ ,  $p \leq 0,05$ ) entre GOT/

10<sup>9</sup> espermatozoides e fertilidade. Outra correlação significativa ( $r = 0,25$ ,  $p \leq 0,05$ ), também encontrada entre fertilidade e quantidade de enzima que permanece na célula, após congelamento normal, é importante para a fertilização. Os valores encontrados, após liberação máxima de GOT, foram 423 IU e 381 IU em condições normais de liberação de enzima.

No presente trabalho, determinaram-se os níveis de atividade GOT em sêmen de bovinos do tipo mantiqueira.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de sêmen de oito touros do tipo mantiqueira, com idade variando de 2,5 a 4,5 anos, mantidos em condições normais de manejo e alimentação, pertencentes à Estação Experimental de Zootecnia de Pindamonhangaba. Todas as amostras foram antes analisadas do ponto de vista morfológico, pois, apesar de serem touros saudáveis e em franco período de coleta, poderiam ocorrer alterações na qualidade do sêmen.

### Coleta de sêmen

Os ejaculados foram obtidos pelo processo de coleta, através de vagina artificial. Determinaram-se o volume e o pH das amostras, a densidade espermática e a motilidade dos espermatozoides.

O material coletado era mantido refrigerado, até o momento de uso, período esse não superior a três horas.

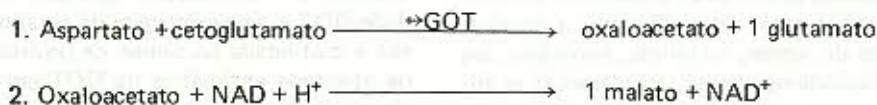
### Preparo da amostra e determinação da atividade enzimática

Os espermatozoides foram separados do plasma seminal por centrifugação a 2.500 rpm, por dez minutos, a 4°C. O plasma seminal foi retirado cui-

dadosamente (sendo usado para determinação da atividade fosfomonoesterase) e o sedimento ressuspenso em três volumes de solução salina tamponada e homogeneizada.

Essa suspensão de espermatozoides foi novamente centrifugada nas condições acima mencionadas. A operação se repetiu duas vezes. Após a terceira ressusensão, o sedimento foi suspenso em dois volumes de solução salina tamponada, fazendo-se a lise das células espermáticas, por processo de congelamento (gelo seco e acetona) e descongelamento rápido (banho-maria a 37°C). Essa fase visou romper as membranas e liberar a enzima contida no citoplasma.

Nos lisados assim obtidos, foram determinadas a concentração protéica, pelo processo de BUCKER<sup>1</sup>, e a atividade enzimática, segundo a metodologia de MEDEIROS<sup>3</sup>. A atividade enzimática foi determinada no sêmen total e espermatozoides, após lise das células e diluição 1:10 em solução salina tamponada. A teoria do método de determinação baseia-se nas seguintes reações:



A leitura foi feita em espectrofotômetro Gilford 2-400-S a 340nm e 37°C, utilizando-se de

cubetas de 1cm de capacidade e 1cm de passagem de luz durante dez minutos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os volumes dos ejaculados obtidos variaram de 5 a 10ml, com uma motilidade de 60 a 80%, e a concentração espermática de 0,8 a 1,28 milhão de espermatozoides por milímetro cúbico.

Os valores da atividade enzimática encontram-se no quadro 1, sendo expressos em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína. As médias e os respectivos desvios padrões de ativi-

dade enzimática de GOT para o sêmen total e espermatozóide livre de plasma seminal, foram, respectivamente,  $68 \pm 15$  e  $287 \pm 61$ .

Pelos resultados do quadro 1, verifica-se que esta atividade enzimática se concentra, na sua quase totalidade, no espermatozóide, estando de acordo com PACE & GRAHAM<sup>5</sup>.

Quanto aos valores de atividade enzimática, observa-se que os resultados variaram dentro de um limite de normalidade (FLIPSE<sup>2</sup>; MURDOCH & WHITE<sup>4</sup>; PACE & GRAHAM<sup>5</sup>; ROUSSEL & STALLCUP<sup>6</sup>), podendo essa variação ser devida a raça, idade do animal, alimentação e condições ambientes.

Quadro 1. Atividade glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) em sêmen total e espermatozóide de bovinos (expressa em mg de proteína)

Amostra	Densidade espermática x 100/ml	GOT	
		Sêmen total	Espermatozóides
1	0,82	76	217
2	1,03	71	306
3	0,93	66	273
4	1,19	60	368
5	0,99	52	284
6	0,91	68	254
7	0,80	101	209
8	1,28	52	390
Média		68,25	287,62
Desvio padrão		14,75	61,03
Coefficiente de variação (%)		21,61	21,21

## CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, verificados pelos baixos valores do coeficiente de variação, concluiu-se que a metodologia seguida pode ser usada rotineiramente, pois é relativamente simples, per-

mitindo ser recomendada para estudo da atividade enzimática de GOT em espermatozóides de bovinos e na tecnologia destinada ao congelamento de sêmen.

**SUMMARY:** The purpose of this paper was the determination of the activity of glutamic oxaloacetic transaminase, using technique standards in erythroenzimology; this would permit to establish standards of activity of glutamic oxaloacetic transaminase in spermatozoa for study of their metabolic behaviour in different physiological and experimental conditions. Thus, the activity of GOT was determined in spermatozoa from eight mantiqueira bulls. The results showed that the employed had good reproductibility and the variation coefficients within of the normal limits. It was concluded that this methodology may be recommended for the establishment of the enzymatic standard in spermatozoa of bulls.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Luiz Octávio Medeiros a orientação do trabalho e o franqueamento de 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 - BUCKER, T. Über ein phosphatübertragendes gärungsferment. *Biochim. Biophys. Acta*, New York, 1:292-314, 1947.
- 2 - FLIPSE, R. J. Metabolism of bovine semen. IX. Glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase activities. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 111., 43:773-6, 1960.
- 3 - MEDEIROS, L. O. Contribuição a eritroenzimologia de cavalos puro sangue inglês e sua aplicabilidade ao diagnóstico de anemia infecciosa equina. Tese de Livre-Docência. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1973. 120 f. Mimeo.
- 4 - MURDOCH, R. N. & WHITE, I. G. Studies of the distribution and source of enzymes in mammalian semen. *Austr. J. Biol. Sci.*, Melbourne, Vic., 21(3):483-92, 1968.
- 5 - PACE, M. M. & GRAHAM, E. F. The release of glutamic oxaloacetic transaminase from bovine spermatozoa as test method of assessing semen quality and fertility. *Biol. Reprod.*, New York, 3:140-6, 1970.
- 6 - ROUSSEL, J. D. & STALLCUP, O. T. Parallelism between semen characteristics and bovine blood serum phosphatase and transaminase. *Fert. Ster.*, Baltimore, Ma., 17(1):483-7, 1966.