



Bioquímica do sêmen

Biochemistry of semen

André Belico de Vasconcelos

Instituto de Estudos Avançados em Veterinária “José Caetano Borges”, Universidade de Uberaba (FAZU), Uberaba, MG, Brasil

E-mail: andre_belico@yahoo.com.br

Resumo

Este trabalho elucida as questões bioquímicas do sêmen bovino, enfocando aspectos bioquímicos do metabolismo espermático e as características bioquímicas dos constituintes do plasma seminal. Preconiza também a técnica de calorimetria como um processo analítico que mede variações de energia em sistemas onde a temperatura tem um papel relevante. Técnica utilizada para medir diretamente a atividade metabólica de um sistema biológico, através da soma algébrica das mudanças de calor. A aplicação calorimétrica envolve como indicador a viabilidade espermática e a reatividade destas células em presença de varias substâncias (antibióticos, hormônios, substratos, etc). O que auxiliaria como ferramenta na elucidação das rotas metabólicas e a interação de moléculas exógenas nos espermatozóides bovinos.

Palavras-chave: bovino, calorimetria, metabolismo espermatozóide, plasma seminal.

Abstract

The aim of this study was to elucidate biochemical issues of bovine semen, focusing on biochemical aspects of sperm metabolism and the biochemical characteristics of seminal plasma constituents. It also announces the calorimetry technique as an analytical process which measures the energy variations on systems where the temperature plays an important role. The technique is used to measure straightforward the metabolic activity of a biological system, through the algebraic sum of heat changes. Calorimetry application involves, as indicator, the sperm viability and the reactivity of these cells in the presence of several substances (antibiotics, hormones, substrates, etc) that would help as a tool in the elucidation of metabolic routes and the interaction of exogen molecules in the bovine sperms.

Keywords: bovine, calorimetry, Seminal plasma, sperm metabolism.

Introdução

O objetivo deste trabalho é elucidar as questões bioquímicas do sêmen bovino, enfocando aspectos bioquímicos do metabolismo espermático e as características bioquímicas dos constituintes do plasma seminal, no sentido de prever quais são as interferências que atuam nas células espermáticas presentes nos constituintes plasmáticos. Objetiva-se assim criar um racíonio e um entendimento sobre a interação destes constituintes plasmáticos sobre o metabolismo dos espermatozóides quando estes estão se adaptando a um meio que favorece uma interação fisiológica e bioquímica para a fecundação.

Deste modo, este trabalho se reveste de especial relevância, tanto teórica quanto prática, agregando uma técnica de avaliação metabólica quantitativa que propicia a avaliação direta da interação de moléculas (hormônios, substratos, drogas) com os espermatozóides bovinos.

Bioquímica do espermatozóide:

Características químicas e metabólicas do espermatozóide bovino

Milhares de reações enzimáticas catalisadas são chamadas, coletivamente, de metabolismo, com o propósito definido de interagir entre si resultando em uma seqüência sistemática de transformações de energia (Gnaiger e Kemp, 1990). Nesta longa seqüência de reações intermediárias, a energia para o trabalho é extraída em vários pontos, principalmente para a produção de ATP, a partir de adenosina difosfato (ADP) e íons fosfato. A reação reversa provê a energia livre necessária à execução das diversas funções características à vida. Todo o calor produzido nos processos vitais é liberado para o meio ambiente e pode ser medido por um sistema adequado (Wilhoit, 1969; Wadsö, 1988).

O metabolismo espermático tem sido revisado desde 1981 por Hammerstedt, e são relatados pontos importantes como: os espermatozóides não sofrem divisão celular e também não apresentam características de

formação de componentes celulares. Assim, a produção de energia, ATP, é requerida para iniciar processos catabólicos através da via glicolítica, e favorece a manutenção da mobilidade e suporte no processo de balanço iônico (Mann, 1975).

Os espermatozoides bovinos apresentam a via metabólica baseado na rota aeróbica (Hammerstedt, 1975). Quando comparado a outros sistemas biológicos verifica-se que a rota metabólica apresenta três pontos de controle estabelecidos por enzimas, hexoquinase, fosfrutoquinase e pirovatoquinase. Baseado nesta característica dos pontos de controle, os espermatozoides bovinos utilizam como substrato principal a frutose, visto que estas células não conseguem de forma eficiente produzir ATP a partir da glicose posto que a quantidade destas enzimas é reduzida inviabilizando a formação de frutose a partir de glicose, via glicolítica inicial (Iskeep e Hammerstedt, 1983). Portanto, as células espermáticas utilizam diretamente a via Embden-Meyerhof onde o ATP é consumido durante o metabolismo da frutose e reconvertido durante o metabolismo das trioses. Estudos detalhados nos permitem calcular que o consumo teórico máximo será de 2mol de ATP sintetizado por mol de frutose degradada, a lactato. Muito mais ATP pode ser formado via oxidação mitocondrial. Este processo está ligado a propriedades cinéticas que são controladas por fatores como concentração inicial de substrato e concentração de produto formado.

Em relação às altas concentrações de substrato como frutose ou glicose, os espermatozoides podem sofrer um efeito denominado de “Efeito Glicose”. Este pode estar relacionado a um aumento exagerado de glicose com posterior redução da concentração de O₂, o que favorece o processo de fermentação, prejudicial às células espermáticas (Hipakka e Hammerstedt, 1978).

O metabolismo espermático como todas as células biológicas apresenta o metabolismo exógeno, através de substratos (glicose e frutose), que são transportados para dentro das células e são direcionadas, unicamente, para a via Embden-Meyerhof. As células espermáticas, não apresentam enzimas para atuar na via das pentoses, nem para o metabolismo do glicogênio (Iskeep e Hammerstedt, 1983), a captação de substrato, por via exógena, é feita por receptores de membrana denominados GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5, que são distribuídos por toda membrana espermática. Os receptores GLUT3 e GLUT5 estão presentes na peça intermediária, o GLUT1 na peça principal e o GLUT2 na parte final da cauda e é caracterizado pela alta afinidade por frutose. O GLUT4 se expressa nas células germinativas, principalmente durante a espermatogênese (Ângulo *et al.*, 1998). Quanto ao metabolismo endógeno, provavelmente, representado pela β -oxidação de ácidos graxos, provenientes de fosfolipídeos, hipotetiza-se que seja, portanto, limitado pela ação da enzima fosfolipase em razão a hidrólise, conversão de CoA-ester e transporte mitocondrial (Mann, 1975; Iskeep e Hammerstedt, 1985), todavia, estudos ainda estão sendo realizados para descrever melhor o metabolismo endógenos dos espermatozoides bovinos.

Bioquímica do plasma seminal

Fatores químicos em geral e atributos fisiológicos dos órgãos específicos ligados a secreções do trato reprodutivo masculino serão descritos em dois parâmetros. (1) A composição dos fluídos; (2) A interação das secreções das glândulas acessórias com as células espermáticas. A grande complexidade de substâncias do plasma seminal é decorrente da quantidade de glândulas presentes que auxiliam indiretamente na eficiência da fecundação.

Diversos fatores interferem na composição do plasma seminal, o que dificulta o esclarecimento real destas substâncias. No caso de bovinos, a ação da coleta com vagina artificial, ou por eletro ejaculação ocasiona mudanças significativas nos constituintes do plasma, como também a própria frequência de coletas. Fatores laboratoriais relacionados à separação dos constituintes do plasma são outros fatores intrínsecos. As células espermáticas também podem interferir indiretamente, nas reais concentrações e determinações destes constituintes. Exemplificado pela técnica de centrifugação, a força centrípeta gerada pela técnica pode levar a saída de substâncias do interior do espermatozoide e contaminar o plasma seminal e até mesmo propiciar a saída de proteínas da própria membrana pelo efeito físico direto. Outro fator que determinaria certa flutuação do constituinte pode estar ligado a estímulos diretos nas glândulas, uma vez que a próstata pode ser muito estimulada e a vesícula seminal muito pouca, o vice-versa.

As secreções podem ser divididas em diferentes frações apresentando funções diversificadas na cópula, na preservação do sêmen, no metabolismo e transporte espermático para o trato genital feminino, além de proteções imunológicas (Tischner *et al.*, 1974; Mann, 1975; Rodger, 1975; Varner *et al.*, 1987). O plasma seminal apresenta distintas substâncias entre eletrólitos, sódio e o cloreto, os quais são os íons proeminentes no plasma diretamente relacionados à osmolaridade destas células. No plasma seminal ocorre alta concentração de potássio, cerca de 100mM, (este é proveniente da vesícula seminal), além dos não eletrólitos como carboidratos, aminoácidos uma quantidade de aminas alifáticas e aromáticas e também peptídeos de vários pesos moleculares.

Os níveis dos outros íons reúnem diretamente concentrações de algumas proteínas. A alta concentração de cálcio no plasma é decorrente do próprio íon cálcio que pode estar agregado com outras substâncias como ácido cítrico, ou ligado à proteína formando a calmodulina. Há indícios na literatura sobre o papel regulatório da calmodulina na concentração de cálcio intracelular é possivelmente, sobre a ação do AMP-cíclico. Assim,

acredita-se que este complexo está diretamente relacionado a hormônios esteróides e receptores na membrana plasmática, visto que o cálcio tem a função fisiológica e bioquímica de segundo mensageiro. O zinco é outro eletrólito, secretado pela próstata, em conjunto com as protaminas que apresentam a função de estabilização do DNA espermático, bem como, de manutenção da estabilidade da estrutura de membrana e da motilidade espermática (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

Nestas diferentes frações a pré-secreção assume a função de limpeza da uretra, apresentando alta concentração de cloreto de sódio secretado pelas glândulas bulbo-uretrais (Mann, 1975; Aurich *et al.*, 1997). A fração do sêmen na qual apresenta-se uma grande concentração de espermatozóides, contém ergotionina e glicerilfosforilcolina (GPC), além de traços de ácido cítrico. Estes componentes do sêmen têm como função proteger os espermatozóides contra agentes peroxidantes, e desempenham importante papel no metabolismo (Marden e Werthessen, 1956). Entre os vários constituintes do plasma seminal estão também as proteínas secretadas pelas vesículas sexuais (Mann e Lutwak-Mann, 1981). A função de todas as proteínas ainda não está clara (Manjunath e Thérien, 2002), contudo, pleiteia-se que elas interagem diretamente com a superfície dos espermatozóides atuando como fatores decapacitantes e promotores da fertilidade (Gadella e Colenbrander, 2003; Jelínková *et al.*, 2003).

Calorimetria

A técnica de calorimetria é um processo analítico que mede variações de energia em sistemas onde a temperatura tem um papel relevante (Chagas, 1992). Ela é utilizada para medir diretamente a atividade metabólica de um sistema biológico, através da soma algébrica das mudanças de calor que ocorrem em todos os processos celulares, mesmo os de natureza desconhecida (Bottcher e Furst, 1996; Nässberger *et al.*, 1986).

A aplicação de mensuração termoquímica tem se tornado de grande interesse biológico, pois possibilita a predição de valores numéricos como entalpia (H^0) e entropia (S^0) que elucidam a importância de carboidratos como a frutose e glicose na avaliação metabólica das células espermáticas, pois a energia liberada e/ou mensurada está relacionada, diretamente, ao trabalho que é realizado pela célula, em especial os espermatozóides. Isto seria idealizado através de uma bomba calorimétrica, esta por sua vez mensuraria processos irreversíveis como energia máxima disponibilizada por um período de tempo e o trabalho realizado neste mesmo período. A aplicação calorimétrica envolve como indicador a viabilidade espermática e a reatividade destas células em presença de várias substâncias (antibióticos, hormônios, substratos, etc) o que auxiliaria como ferramenta na elucidação das rotas metabólicas e a interação de moléculas exógenas nos espermatozóides bovinos.

As medidas calorimétricas do metabolismo celular têm como princípio, que todas as atividades metabólicas são acompanhadas pela produção de calor característico exotérmico ou endotérmico (Loike *et al.*, 1981; Kemp, 1991, 2001). Isto pode oferecer informações sobre o metabolismo através de suas conseqüências térmicas.

No trabalho realizado por Inskeep e Hammerstedt (1983) foi estudado o metabolismo do espermatozóide bovino através de ensaios calorimétricos com o intuito de avaliar sua viabilidade, bem como possíveis rotas metabólicas. Estes autores demonstraram que os espermatozóides bovinos apresentam propriedades metabólicas simples quando em presença de substratos extracelulares. Isso foi possível através de constantes termodinâmicas que relacionaram taxas quantitativas importantes do metabolismo através da técnica de calorimetria, concluindo que 10% de todo calor produzido pelos espermatozóides é proveniente de substratos endógenos. Além disso, reservas endógenas providas do armazenamento de componentes, tais como: glicogênio e lipídios podem ser imediatamente mobilizados como energia celular requerido via ATP produzidos nas suas rotas.

Trabalhos experimentais

Vasconcelos *et al.* (2003) realizaram estudos do metabolismo espermático equino utilizando um microcalorímetro de condução. Estes trabalhos já enviados para publicação descrevem dois experimentos: o primeiro sobre a determinação a concentração ideal de glicose para avaliar o metabolismo espermático equino, no prelo na revista Brazilian Archives of Biology and Technology e segundo, sobre avaliação do metabolismo do espermatozóide equino quando submetido ao resfriamento – submetido e já revisto, aguarda parecer final e publicação pela revista Andrologia. Trabalhos recentes, desenvolvidos, têm com o intuito de avaliar *in vitro* o fluxo de calor por microcalorimetria das células espermáticas em presença de indutores da capacitação (heparina e ionóforo de cálcio). O objetivo geral desses trabalhos é comparar diversas quantidades molares de heparina ou ionóforo de cálcio sobre a taxa de reação acrossômica induzida, através do fluxo de calor liberado pelas células espermáticas.

Estes trabalhos tornam-se inovadores como estudo biotecnológico pela agregação de várias técnicas para avaliação do sêmen bovino. Inova ainda, por iniciar uma linha de pesquisa que avança indo além do melhoramento de organismos (Bovino) ao lidar, e sim, com melhoramento das predições da qualidade do sêmen. Considera-se que dado o caráter pioneiro destes trabalhos com a abertura de uma nova linha de pesquisa poderá estimular novas investigações que resultarão no desenvolvimento de novos protocolos para o congelamento do

sêmen, em decorrência da introdução de um parâmetro de avaliação mais atual no contexto biotecnológico ligado a reprodução de grandes animais.

Referências

- Angulo C, Rauch MC, Droppelman A, Reyes AM, Slebe JC, Delgado-López F, Guaiquil VH, Vera JC, Concha II.** Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem*, v.71, p.189-203, 1998.
- Aurich JE, Schonherr U, Hoppe H, Aurich C.** Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v.48, p.185-192, 1997.
- Bottcher H, Furst P.** A new microcatheter enables microcalorimetric assessment of thermogenesis after stimulation in cell cultures. *J Biochem Biophys Methods*, v.32, p.191-194, 1996.
- Chagas AP.** O que mede num calorímetro? *Química Nova*, v.15, p.90-94, 1992.
- Gadella BM, Colenbrander B.** Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: Workshop on Transporting Gametes and Embryos, 12, 2003, Brewster, Mass. *Proceedings ...*. Newmarket, UK: R & W Publications Newmarket, 2003. p.43-48.
- Gnaiger E, Kemp RB.** Anaerobic metabolism in aerobic mammalian cells: information from the ratio of calorimetric heat flux and respirometric oxygen flux. *Biochim Biophys Acta*, v.10, p.328-332, 1990.
- Hammerstedt RH.** Tritium release from [2-³H] D-glucose as a monitor of glucose consumption by bovine sperm. *Biol Reprod*, v.12, p.545-551, 1975.
- Hiipakka RA, Hammerstedt RH.** 2-Deoxyglucose transport and phosphorylation by bovine sperm. *Biol Reprod*, v.19, p.368-379, 1978.
- Inskoop PB, Hammerstedt RH.** A colorimetric method to assess endogenous metabolism and its application to the study of bovine sperm. *J Biochem Biophys Methods*, v.7, p.199-210, 1983.
- Inskoop PB, Hammerstedt RH.** Endogenous metabolism by Sperm in response to altered cellular ATP requirements. *J Cell Physiol*, v.123, p.180-190, 1985.
- Jelínková P, Manásková P, Tichá M, Jonáková V.** Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. *Int J Biol Macromol*, v.32, p.99-107, 2003.
- Kemp RB.** Calorimetric studies of heat flux in animal cells. *Thermochim Acta*, v.10, p.253-267, 1991.
- Kemp RB.** The application of heat conduction microcalorimetry to study the metabolism and pharmaceutical modulation of cultured mammalian cells. *Thermochim Acta*, v.380, p.229-244, 2001.
- Loike JD, Silverstein SC, Sturtevant JM.** Application of differential scanning microcalorimetry to the study of cellular processes: heat production and glucose oxidation of marine macrophages. *Proc Natl Acad Sci*, v.78, p.5958-5962, 1981.
- Manjunath P, Thérien I.** Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v.53, p.109-119, 2002.
- Mann T.** Biochemistry of stallion semen. *J Reprod Fertil*, v.23, p.47-52, 1975.
- Mann T, Lutwak-Mann C.** *Male reproductive function and semen general features of the seminal plasma*. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1981. p.28-34.
- Marden W, Werthessen NT.** Influence of seminal fluid on sperm motility. *Fertil Steril*, v.7, p.508-515, 1956.
- Nässberger L, Jensen E, Monti M, Floren CH.** Microcalorimetric investigation of metabolism in rat hepatocytes cultured on microplates and in cell suspensions. *Biochim Biophys Acta*, v.3, p.353-358, 1986.
- Rodger JC.** Seminal plasma an unnecessary evil. *Theriogenology*, v.3, p.237-246, 1975.
- Tischner M, Kosiniak K, Bielanski W.** Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. *J Reprod Fertil*, v.41, p.329-335, 1974.
- Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM.** Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology*, v.28, p.709-723, 1987.
- Vasconcelos AB.** *Utilização de microcalorimetria de condução na avaliação metabólica do espermatozóide equino*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 2003.
- Wadsö I.** Progress and problems in microcalorimetric work in mammalian cell systems. *Thermochim Acta*, v.137, p.1-10, 1988.
- Wilhoit RC.** Thermodynamic properties of biochemical substances. In: Brown HD (Ed.). *Biochemical microcalorimetry*. New York: Academic Press, 1969. p.33-81.