



**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

**PURIFICAÇÃO DA FOSFOLIPASE A₂ E ANÁLISE
BIOQUÍMICA DO PLASMA SEMINAL DE OVINOS E
CAPRINOS**

Hélio José Antunes Franco

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências na área de Química Analítica.**

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Canduri

São Carlos/2010

*Aos Professores por transferirem aquilo que sabem
com tanta dedicação e zelo; Quanto melhor é adquirir
a sabedoria do que o ouro, e quanto mais excelente é
escolher o entendimento do que a prata.*

À todos aqueles que não estão presentes neste momento, mas vivem na lembrança e na recordação para sempre, em especial, meu pai, Helio Sebastião, meus tios, Jayme e Carmem, Geraldo, Ulisses e Elza e às minhas avós, Zenaide e Mariquinha.

À minha mãe, Maria José, que com muito amor e luta me ajudou a chegar até aqui e a minha namorada, Priscila, pelo apoio e incentivo durante toda minha vida acadêmica.

Agradecimentos

À Deus, pelo grande presente da vida e por mais uma etapa vencida.

Ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, que através de seus docentes e funcionários, transferiu conhecimentos em nível de excelência acadêmica.

À Professora Dra. Fernanda Canduri pela orientação, receptividade, atenção e por estar sempre disposta a resolver os problemas encontrados durante este projeto.

Ao Professor Dr. Otávio Henrique Thiemann por ceder gentilmente seu laboratório para algumas etapas deste trabalho.

À Ms. Susana, técnica do laboratório do Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, pela atenção e grande ajuda prestada durante algumas etapas do trabalho.

À Cidinha, técnica do laboratório desse instituto, pela atenção, ajuda e colaboração em várias ocasiões que dela necessitei.

À todos do laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica pela horas passadas juntas durante o desenvolvimento do trabalho.

À todos professores do Instituto de Química de São Carlos que contribuíram de forma efetiva na minha formação.

À todos que participaram de forma direta ou indireta deste trabalho, que por alguma eventualidade não foram citados.

O caminho não escolhido

*Num bosque amarelo dois caminhos se separavam,
E lamentando não poder escolher os dois
E sendo apenas um viajante, fiquei muito tempo parado
E olhei para um deles tão distante quanto pude
Até onde se perdia na mata;*

*Então segui o outro, como sendo mais merecedor,
E tendo talvez melhor direito,
Porque coberto de mato e querendo uso
Embora os que por lá passaram
Os tenham realmente percorrido de igual forma,
E ambos ficaram essa manhã
Com folhas que passo nenhum pisou.
Oh, guardei o primeiro para outro dia!
Embora sabendo como um caminho leva para longe,
Duvidasse que algum dia voltasse novamente.*

*Direi isto suspirando
Em algum lugar, daqui a muito e muito tempo;
Dois caminhos se separavam em um bosque, e eu....
Eu escolhi o menos percorrido
E isso fez toda a diferença.*

Robert Frost, 1916

Resumo

A quantificação dos componentes bioquímicos como frutose, ácido cítrico e proteína total existentes no plasma seminal de caprinos e ovinos localizados na região Centro-Oeste do Brasil é uma forma de avaliar a atividade fisiológica e bioquímica espermatóicas. Estes dados servem como indicadores de prováveis problemas com os testículos e glândulas acessórias desses animais e de sua respectiva fertilidade. A frutose e o ácido cítrico são importantes para o sêmen como fonte de energia metabólica e como componente de sistema tampão, respectivamente. A frutose é um marcador da função secretora das vesículas seminais, e é um componente importante para a sobrevivência dos espermatozoides em condições anaeróbicas e está estreitamente relacionada com a motilidade inicial das células espermatóicas. Sendo assim, os objetivos do presente projeto foram analisar quantitativamente esses componentes do plasma seminal de bodes e carneiros sob latitude 20°31'S em quatro épocas do ano e purificar, através de técnicas cromatográficas, a enzima fosfolipase A₂, importante proteína presente no plasma seminal. As análises bioquímicas foram feitas usando-se um espectrofotômetro UV/Vis para obtenção da curva padrão e para a determinação das concentrações mensais e da concentração anual média dos constituintes analisados. A purificação da PLA₂ foi feita por cromatografia líquida preparativa usando-se como fase estacionária a coluna Superdex 75-16/60 (GE HealthCare) de exclusão por tamanho e membranas semipermeáveis de 10 e 30 kDa. Como resultado das análises bioquímicas, obteve-se a concentração anual média de proteínas totais de 3,27 ± 0,60 g/dL para ovinos e de 5,02 ± 0,43 para caprinos, ácido cítrico de 1015,33 ± 66,50 µg/mL para ovinos e de 1584,35 ± 143,90 µg/mL para caprinos e frutose de 23,40 ± 4,80 mg/dL para ovinos e 72,73 ± 18,50 mg/dL para caprinos. Os resultados mostraram que a PLA₂ extraída do plasma seminal de ovinos tem massa molecular próxima de 13,8 kDa e a PLA₂ do plasma seminal de caprinos tem massa molecular próxima a 12,8 kDa.

Abstract

Quantification of biochemical components in seminal plasma including fructose, citric acid and total protein of goat and sheep of the Midwest region of Brazil is one way of evaluating the biochemical and physiological activity of the sperm. These data serve as indicators of potential problems with the testicles and accessory glands of these animals and their relative fertility. The fructose and citric acid are important for the semen as a source of metabolic energy and as a component of a buffer, respectively. Fructose is a marker of secretory function of seminal vesicles, important for the survival of spermatozoa under anaerobic conditions, and is closely related to the initial motility of sperm cells. Therefore, the objectives of this project were to quantitatively analyze these components in the seminal plasma of goats and sheep in latitude 20° 3 1'S in four seasons and purify by chromatographic techniques the enzyme phospholipase A₂, an important protein in the seminal plasma. Biochemical analysis were done using a spectrophotometer UV / Vis to obtaining the standard curve and to determine the monthly and annual average concentration of the constituents analyzed. The purification of PLA₂ was performed by preparative liquid chromatography using the column as stationary phase Superdex 75-16/60 (GE HealthCare) by size exclusion and semipermeable membranes 10 and 30 kDa. As a result of biochemical analysis, we obtained the annual average concentration of total protein of 3,27 ± 0,60 g / dL for sheep and 5,02 ± 0,43 g/dL for goats, citric acid of 1015,33 ± 66, 50 g / mL for sheep and 1584,35 ± 143,90 g / mL for goats and fructose 23,40 ± 4,80 mg / dL for sheep and 72,73 ± 18,50 mg / dL for goats. The results showed that the PLA₂ extracted from seminal plasma of sheep has a molecular mass of 13,8 kDa and the next PLA₂ from goat seminal plasma has a molecular mass close to 12,8 kDa.

Lista de figuras

Figura 1A - Mecanismo de reação de uma fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	26
Figura 1B - PLA ₂ interagindo com o fosfolípido da membrana lipídica	26
Figura 1C - Fosfolipase A ₂ libera por hidrólise o resíduo de ácido graxo da posição C2 do fosfolípido para gerar o lisofosfolípido correspondente.	26
Figura 2 – Fórmula estrutural do ácido cítrico	27
Figura 3 – Fórmula estrutural da frutose	28
Figura 4 – Foto de um espectrofômetro	30
Figura 5 – Equilíbrio químico do corante Coomassie Brilliant Blue	31
Figura 6 – Interação entre os nitrogênios peptídicos e o íon cobre	32
Figura 7 - Foto de um cromatógrafo	33
Figura 8 – Esquema ilustrativo de uma cromatografia por exclusão de tamanho	34
Figura 9 – Fórmula estrutural do dodecilsulfato de sódio (SDS)	35
Figura 10 – Relação logarítmica entre a massa molecular de uma proteína e sua mobilidade eletroforética em SDS-PAGE	36
Figura 11 – Esquema ilustrativo de uma eletroforese em gel	37
Figura 12 - Animais doadores do plasma seminal	40

Figura 13 – Reação de Seliwanoff	42
Figura 14 – Estrutura do ácido cítrico e ácido aconítico	44
Figura 15 – Concentrador com membrana semipermeável	49
Figura 16 – Curva padrão de BSA	52
Figura 17 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de proteínas totais nos 12 meses do ano e a média anual para ovinos	53
Figura 18 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de proteínas totais nos 12 meses do ano e a média anual para caprinos	55
Figura 19 – Curva padrão para ácido cítrico	56
Figura 20 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de ácido cítrico nos 12 meses do ano e a média anual para ovinos	57
Figura 21 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de ácido cítrico nos 12 meses do ano e a média anual para caprinos	59
Figura 22 – Curva padrão para frutose	60
Figura 23 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de frutose nos 12 meses do ano e a média anual para ovinos	61
Figura 24 - Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de frutose nos 12 meses do ano e a média anual para caprinos	63
Figura 25 – Cromatograma do pool de proteínas	64
Figura 26 – Cromatogramas obtido após eluição das amostras do	

plasma seminal de ovinos e caprinos	65
Figura 27 - Gel de eletroforese SDS-PAGE a 15% após a cromatografia	66
Figura 28 – Gel de eletroforese SDS-PAGE a 15% de amostras de PLA ₂ de ovinos e caprinos ainda não isoladas em caprinos	67
Figura 29 - Gel de eletroforese SDS-PAGE a 15% mostrando a PLA ₂ de caprinos isolada	67
Figura 30 – Foto da placa de ágar com emulsão de gema de ovo 5% em meio LB com amostras brutas (plasma seminal), amostras de PLA ₂ , tampão de controle e descarte do concentrador	70
Figura 31 – Placas de ágar com emulsão de gema de ovo 5% em meio LB com amostras brutas e PLA ₂ isolada de caprinos e ovinos	72
Figura 32 – Gráfico do pH durante a reação da PLA ₂ e seu substrato	73

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	15
1.1 – Aspectos Gerais	15
1.2 – Fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	23
1.3 – Ácido Cítrico	27
1.4 – Frutose	27
1.5 – Técnicas Analíticas	29
1.5.1 – Espectrofometria	29
1.5.2 – Método de Bradford	30
1.5.3 – Método do Biureto	31
1.5.4 – Cromatografia	32
1.5.4.1 – Cromatografia de filtração em gel	33
1.5.5 - Eletroforese	35
2- OBJETIVOS	38
3- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	39
3.1 - Animais, alimentação e localização	39
3.2 - Análise Bioquímica do plasma seminal por Espectrofotometria	41
3.2.1 - Quantificação de Frutose	42

3.2.1.1 – Preparação do padrão para frutose	42
3.2.1.2 – Análise Quantitativa	43
3.2.2 - Quantificação de Ácido Cítrico	43
3.2.2.1 – Preparação do padrão para Ácido Cítrico	44
3.2.2.2 – Análise Quantitativa	44
3.2.3 – Quantificação de Proteína Total	45
3.2.3.1 – Preparação do padrão usando BSA	45
3.2.3.2 – Análise Quantitativa	46
3.3 – Determinação da massa molecular e purificação da PLA ₂ do plasma seminal de ovinos e caprinos por cromatografia líquida	46
3.3.1 - Preparação da fase móvel	46
3.3.2 – Separação das amostras por exclusão molecular	47
3.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%	47
3.5 - Concentração da enzima purificada	48
3.6 – Teste para verificar a atividade enzimática da PLA ₂ em placa contendo ágar e emulsão de gema de ovo 5% (v/v)	50
3.7 – Teste para avaliar a atividade da PLA ₂ a partir da variação do pH acompanhadas em pHmetro digital	51
3.8 – Cálculo da concentração de PLA ₂ purificada de caprinos e ovinos pelo método de Bradford	51

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 - Quantificação de Proteínas Totais em ovinos	52
4.2 – Quantificação de Proteínas Totais em caprinos	54
4.3 - Quantificação de Ácido Cítrico em ovinos	56
4.4 - Quantificação de Ácido Cítrico em caprinos	58
4.5 – Quantificação de Frutose em ovinos	60
4.6 – Quantificação de Frutose em caprinos	62
4.7 – Determinação da massa molecular da fosfolipase A ₂ (PLA ₂) por cromatografia de exclusão por tamanho	64
4.8 – Purificação da PLA ₂	64
4.9 – Cálculo da concentração da PLA ₂ pelo método de Bradford	68
4.9.1 – Concentração na amostra de caprinos	68
4.9.2 – Concentração na amostra de ovinos	69
4.10 – Testes da atividade biológica da PLA ₂ purificada	70
4.10.1 – Teste da atividade utilizando emulsão de gema de ovo 5% (v/v) em meio LB	70
4.10.2 – Teste da atividade enzimática por acompanhamento do pH em pHmetro digital	72
5- CONCLUSÃO	75
Referências Bibliográficas	77



1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos Gerais

A ovinocultura é uma das atividades pecuárias com maior tradição e representatividade no Sul, enquanto a caprinocultura é predominante no Nordeste do nosso país. O sistema de exploração tradicional em regime extensivo foi, nos últimos anos, gradualmente substituído por um regime mais equilibrado, com recurso à suplementação alimentar em épocas de carência e à utilização de pastagens melhoradas. A utilização de raças locais, que dadas as suas potencialidades produtivas e reprodutivas, exigem menos do ambiente comparativamente a raças exóticas, constitui em alguns casos, um meio importante de subsistência para as populações rurais que as exploram (ANUALPEC 2003).

No Estado de Mato Grosso do Sul, esta atividade pecuária abandonou nos últimos anos, a condição secundária, para constituir-se na principal exploração econômica de muitas propriedades rurais e já desponta como atividade importante no contexto econômico do Estado, que atualmente possui um rebanho de 405.157 cabeças, segundo dados Anualpec (2003).

Analisando-se a localização geográfica dos genótipos ovinos no Brasil, tem-se, ao longo dos últimos setenta anos, aquelas raças puras bem como suas derivações selecionadas pela sua aptidão para a produção de lãs finas (Merina Australiano e Ideal) e aquelas consideradas de “dupla aptidão” (Corriedale e Romney Marsh) localizadas nas regiões temperadas (Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina) e em alguns



pequenos grupamentos no Estado de São Paulo. Já a região tropical foi ocupada quase que exclusivamente por raças deslanadas que tiveram um crescimento altamente significativo, principalmente durante a última década (Anualpec, 2003).

A reprodução na espécie ovina e caprina apresenta diversas particularidades entre elas o fato da ovelha apresentar gestação de cinco meses, sendo possível o acasalamento de animais entre o primeiro e segundo ano de vida. Além disso, a maioria das raças ovinas e caprinas apresenta estacionalidade reprodutiva com a concentração das ocorrências deaios no final de verão e durante o outono. A temporada de nascimento usualmente ocorre nos meses de inverno ou início da primavera. Os ovinos apresentam um ciclo curto de produção, com a possibilidade de cordeiros serem abatidos em seu primeiro ano de vida (BICUDO, 2002).

A atividade reprodutiva é a expressão fisiológica de um conjunto complexo de mecanismos e fenômenos que obedecem a rígido controle endógeno de um sistema hierarquizado de órgãos que se inter-relacionam, utilizando a bioquímica. A compreensão desse universo ainda é restrita, porém nos últimos anos o aumento do conhecimento se acelerou e como conseqüência as biotécnicas aplicáveis à reprodução sofreram evolução e se diversificaram (BICUDO, 1999).

A presença de certos componentes bioquímicos no sêmen está envolvida com a função de fertilidade, metabolismo da célula espermática, e criopreservação. O conhecimento dos componentes químicos existentes no plasma seminal torna-se imprescindível e necessário para se avaliar a atividade bioquímica e fisiológica da célula espermática (NUNES, 1982).



Os componentes bioquímicos do ejaculado são os responsáveis por uma série de reações bioquímicas relacionadas diretamente com os processos vitais da célula espermática e por indicadores de funcionamento correto dos distintos órgãos integrantes do sistema reprodutor masculino (IBARRA; NAVARIDAS, 1992).

Segundo Nunes (1982) a produção espermática está relacionada com diversos fatores e foram classificados como sendo:

- **Climáticos:** animais submetidos ao ritmo luminoso de 8 e 16 horas de escuridão por um período de 10 meses, apresentam durante o outono e parte da primavera, um quadro espermático superior. O sêmen de carneiros submetidos a uma luminosidade crescente apresenta qualidade média sempre inferior ao sêmen de outros animais examinados no outono.

-**Alimentares:** caprinos comparados com três níveis energéticos alimentares, classificados como alto, médio e baixo, apresentaram alterações nos ejaculados apenas aqueles animais com baixo nível energético e decréscimo do volume espermático, diminuição no número de espermatozóides por ejaculado, diminuição na taxa de frutose, queda na motilidade inicial e aumento de espermatozóides anormais. Já no nível médio energético não se observou alteração e os mantidos em níveis altos, houve variação inversa às do nível baixo, não mostrando nenhum efeito indesejável sob a produção espermática.

-**Fatores estacionais:** alteram a produção de espermatozóides no período do verão e outono e a produção mínima ocorre na primavera, sendo que as taxas de



espermatozóides anormais estavam inversamente relacionadas com o fotoperíodo crescente.

Estudo realizado por Ibarra e Navaridas, (1992) confirma que as variações estacionais influenciam diretamente no volume e taxa de frutose do ejaculado no plasma seminal. Para Iritani et al., (1963) a justificativa é a presença da enzima fosfolipase “A₂”, mais elevada na estação não reprodutiva, interferindo na qualidade seminal e sua congelação, portanto, a necessidade de uma programação para coleta de sêmen e estoque respectivo na estação reprodutiva é de suma importância.

Nunes (1982), Iritani et al. (1963) e Machado et al. (1999) afirmam que as características da qualidade seminal são baixas quando há alterações em fatores ambientais, temporários e circunstanciais.

O estudo bioquímico do sêmen pode detectar problemas com as glândulas acessórias, variações na atividade plasmática e no sistema enzimático dos espermatozóides. A avaliação dos aspectos físicos e morfológicos, assim como os parâmetros bioquímicos, podem identificar a maior ou menor capacidade de fertilização dos espermatozóides (RODRIGUES, 1997).

As glândulas vesiculares são responsáveis pela secreção de líquido seminal que tem como função nutrir gametas, manter o pH seminal, fonte de energia para o espermatozóide pelo seu grande conteúdo de frutose (CLAVERT et al., 1981). Já o plasma seminal é um meio complexo, contendo vários produtos bioquímicos originados dos ductos deferentes, vesículas seminais, próstata, glândulas bulbouretrais e glândula de Litre (CHEMINEAU et al., 1991).



O caprino apresenta determinada estacionalidade reprodutiva que depende das variáveis intrínsecas como peso, idade, raça e das variáveis extrínsecas como o fotoperíodo, latitude, temperatura e alimentação. Animais criados em regiões tropicais, próximos a linha do equador, não sofrem influência de fotoperíodo e temperatura, como animais criados em regiões de clima temperado, onde há grandes variações de temperatura e luminosidade (NUNES, 1982).

O conhecimento das relações clima – animal – vegetal permite mensurar com maior exatidão a influência que o meio ambiente exerce sobre a produção agropecuária e, conseqüentemente, cria mecanismos de ação para aumentar a produtividade (NUNES, 1982; IBARRA et al., 1992).

Em geral, temperaturas médias acima de 27°C, associadas à umidade relativa do ar acima de 70%, são suficientes para limitar processos fisiológicos de animais, quando transferidos de um ambiente temperado original para regiões tropicais (GALLOWAY, 1979).

Para se avaliar a atividade bioquímica e fisiológica espermática é necessário conhecer as concentrações e função dos componentes bioquímicos existentes no plasma seminal (GONZALES, 1984). O plasma seminal contém uma variedade de constituintes bioquímicos, alguns dos quais são relativamente específicos no mecanismo de regulação do espermatozóide, entretanto, as exatas funções desses componentes seminais, para controlar a motilidade espermática, ainda não estão bem elucidadas (STRZESEK et al., 1992).

Em certos animais pode haver uma predisposição genética para a função



anormal dos testículos, resultando em manifestações clínicas que vão desde azoospermia até a produção de tipos específicos de defeitos espermáticos. Podendo, no entanto, haver uma interação entre estresse ambiental e a predisposição genética. A qualidade do sêmen na estação sexual está por volta de 65% enquanto que na estação não sexual os níveis caem para 50% (GALLOWAY, 1979).

Fatores climáticos como temperaturas altas induzem ao aparecimento de espermatozoides mortos e/ou anormais, afetando também a motilidade espermática e da porcentagem de espermatozoides móveis, e um incremento na porcentagem de alterações morfológicas espermáticas (GONÇALVES et al., 2002).

Hiroe et al., (1960) afirmaram que a condição de armazenamento do plasma seminal, a frequência de ejaculações, nível de glicose no sangue e a condição nutricional, podem interferir fortemente na produção e metabolismo da frutose e Pinheiro et al., (1996a,b) cita que os valores para frutose, ácido cítrico e proteína total foram inferiores na estação seca do ano.

Gonçalves et al, (2002) afirma que níveis elevados de testosterona plasmática, não só conduzem a uma melhor demonstração da libido, como são responsáveis pela elevação dos níveis de frutose e ácido cítrico.

Simplicio e Machado (1989) relatam que a metodologia para análise seminal varia de autor para autor, interferindo nos resultados; além disso, ainda há escassez na produção dos trabalhos em tecnologia do sêmen caprino, sendo que a importância do número de bodes e de amostras (ejaculados) para detectarem-se diferenças entre tratamentos é limitante.

A escolha de reprodutores com perímetro escrotal e comprimento testicular está



intimamente relacionado com a produção espermática, relação esta importante para determinar a capacidade reprodutiva animal e, assim, tentar diminuir os entraves ocasionados pelas estações climáticas durante o ano (ELOY, 1984).

Estudos relacionados com a conservação espermática com finalidade de inseminação artificial envolvem vários fatores, como análises bioquímicas dos componentes seminais e condições de armazenamento. As respostas relacionadas à lavagem do plasma seminal foram melhores em carneiros que bodes, sem adição de gema de ovo para a viabilidade com sêmen fresco e após congelação (RITAR; SALAMOM, 1982).

No período da estação reprodutiva a gema de ovo foi empregada na congelação de sêmen como diluidor e incubado por 6h pós-descongelação, sendo que a sobrevivência espermática declinou de 12% em março para 1,5% em agosto. Os melhores resultados foram os coletados em junho com variação individual entre bodes, parecendo existir diferença estacional na congelabilidade do sêmen caprino, sendo que na pós-descongelação é pior na primavera, porém mais estudos são necessários (ALEU, 1992).

A qualidade e quantidade do sêmen caprino são afetadas por regiões temperadas e possuem estação reprodutiva bem definida (CORTEEL, 1981). A congelabilidade do sêmen de bodes Angorá não apresentou efeito significativo em relação a estação reprodutiva (LOUBSER; van NEIKERK, 1983). Em ovinos há superioridade da congelação do sêmen na estação reprodutiva em relação ao período de anestro estacional (COLAS; BRICE, 1976).



A congelação e descongelação de sêmen de bodes da raça Boer foram testadas em diferentes épocas do ano (quatro estações) e há influência dos períodos estacionais e a localização geográfica da coleta de sêmen e raça respectiva são importantes fatores na congelabilidade do sêmen (TULI; HOLTZ, 1995).

Nos machos ovinos e caprinos a atividade espermática sofre grande variação em função da estacionalidade e nessas espécies há um decréscimo na quantidade e qualidade da produção do sêmen (PELLETIER et al., 1988), principalmente, na contra estação reprodutiva (março a agosto em países temperados) (CORTEEL, 1975). No entanto, é possível manter a qualidade do sêmen caprino com o fotoperíodo artificial alterando os dias sem alterar a fertilidade espermática (DELGADILLO et al., 1992).

As glândulas sexuais acessórias e célula espermática são as principais produtoras das proteínas presentes no plasma seminal. Mesmo que sejam muitas e pouco conhecidas, sabe-se que quando presentes em concentração normal, guardam uma relação positiva com a função espermática e refletem a integridade do sistema reprodutor masculino, todavia, sua excessiva liberação pode indicar alterações do estado funcional do espermatozóide (RODRIGUES, 1997).

As proteínas influenciam na sobrevivência da célula espermática, comportam-se como indicadores de patologias do aparelho reprodutor masculino e estão intimamente relacionadas com a congelabilidade do sêmen (FREITAS; NUNES, 1992). As proteínas do sêmen são responsáveis pela prevenção da aglutinação espermática e da perda de material nutriente intracelular (SANTANA et al., 1998c). A exposição prolongada do



espermatozóide no plasma seminal tem sido descoberta como um efeito adverso na função espermática e a separação do plasma seminal em mamíferos são uma prática rotineira laboratorial.

Conhecer a variação do exame andrológico e do plasma seminal de carneiros e bodes em quatro épocas do ano, suas proteínas e o estudo da estrutura-função das mesmas, implicará na melhoria das condições de congelabilidade do sêmen para aplicação na reprodução assistida desses animais da região Centro-Oeste do Brasil e promoverá um acréscimo no setor produtivo, reprodutivo e biotecnológico da ovinocaprinocultura brasileira.

1.2 - Fosfolipase A₂ (PLA₂)

Fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas capazes de hidrolisar a posição sn-2 de fosfolipídeos (SOUBEYRAND et al., 1997). No sistema reprodutivo, tem função nos eventos de maturação do espermatozóide, particularmente na reação acrossomal (FRY et al., 1992; ROLDAN; FRAGIO, 1993).

A reação acrossomal permite a liberação de enzimas hidrolíticas, as quais são requeridas para que o espermatozóide penetre na camada acelular que circunda o oócito (YANAGIMACHI, 1988).

PLA₂ pertencem a dois grupos principais: as PLA_{2s} de baixa e de alta massa molecular. As de alta massa molecular também chamada de PLA₂ citoplasmáticas são proteínas de 85kDa encontradas em muitos tipos de células (SHARP et al., 1989). Elas



são específicas para ácido araquidônico e possuem atividade limitada de lisofosfolipase e fosfolipase A₁. PLA₂ de baixa massa molecular formam uma família de enzimas homólogas de 14 a 20 kDa, que são encontradas em muitos fluidos secretórios, bem como, no citoplasma de muitos tipos de células (DENNIS, 1994; SCOTT; SIGLER, 1994). São importantes enzimas regulatórias em numerosos sistemas fisiológicos tais como inflamação, remodelamento de membranas, e na sinalização celular (MUKHEIJEE et al., 1994).

A fosfolipase A₂ é uma enzima secretada pela glândula bulbouretral de bodes e carneiros, presente no sêmen e que coagula em diluentes com gema de ovo e hidrolisa lecitina dos ácidos graxos e lisolecitina, além de ser tóxica ao espermatozóide (ROY, 1957; IRITANI; NISHIKAWA, 1963; PELLICER-RUBIO et al, 1997; PELLICER-RUBIO; COMBANOURS, 1998). A gema de ovo pode preservar sêmen de bode por até 3 dias sem decrescer a motilidade abaixo de 50% (SHAMSUDDIN; AMIRI; BHUIYAN, 2000).

Apesar de muitos estudos terem sido realizados para caracterizar a fosfolipase A₂ presente no espermatozóide e plasma seminal de muitas espécies, somente a enzima do plasma seminal humano foi purificada e sequenciada (TAKAYAMA et al., 1991) e, definitivamente, classificada em um grupo particular de PLA₂. A enzima possui 14kDa, e é idêntica à enzima sinovial (HARA et al., 1988), sugerindo que o mesmo deve ser verdade para outras espécies de mamíferos.

Estudos realizados com secreções seminais em bovinos mostram que há diferenças significantes quando comparados com PLA₂ de plasma seminal humano (WURL; KUNZE, 1985). As atividades encontradas no plasma seminal de bovinos,



ovinos e porcinos resultam em cerca de 1, 10 e 0,03%, respectivamente, da atividade de PLA₂ do plasma seminal humano, sugerindo que diferenças qualitativas devem existir entre os tipos de PLA₂ encontrados em diferentes espécies (SOUBEYRAND et al., 1997). A purificação e posterior estudo estrutural da enzima devem revelar as razões por trás dessas diferenças. A figura 1A mostra o mecanismo reacional de uma fosfolipase A₂ (parte de sua estrutura encontra-se em verde sendo complexada pelo íon cálcio) interagindo com um fosfolípídeo em vermelho (OLIVEIRA, 2006). A figura 1B mostra um fosfolípídeo interagindo com a PLA₂ e a figura 1C mostra o ponto de clivagem no fosfolípídeo pela PLA₂.

A presença do íon cálcio é essencial para as fosfolipases cálcio-dependentes que, na ausência deste íon, são biologicamente inativas. Sua função é participar com a carga positiva na interação com grupos eletronegativos do sítio ativo, bem como, com uma molécula de água, e com o substrato (fosfolípídeo). O cálcio, neste caso, tem como função promover reações de hidrólise do substrato, estabilizando seu grupo fosfato, liberando um ácido graxo livre da posição C2 e, por último, o lisofosfolípídeo (Figura 1A). A PLA₂ de plasma seminal enquadra-se neste grupo (DOUARD et al., 2004).

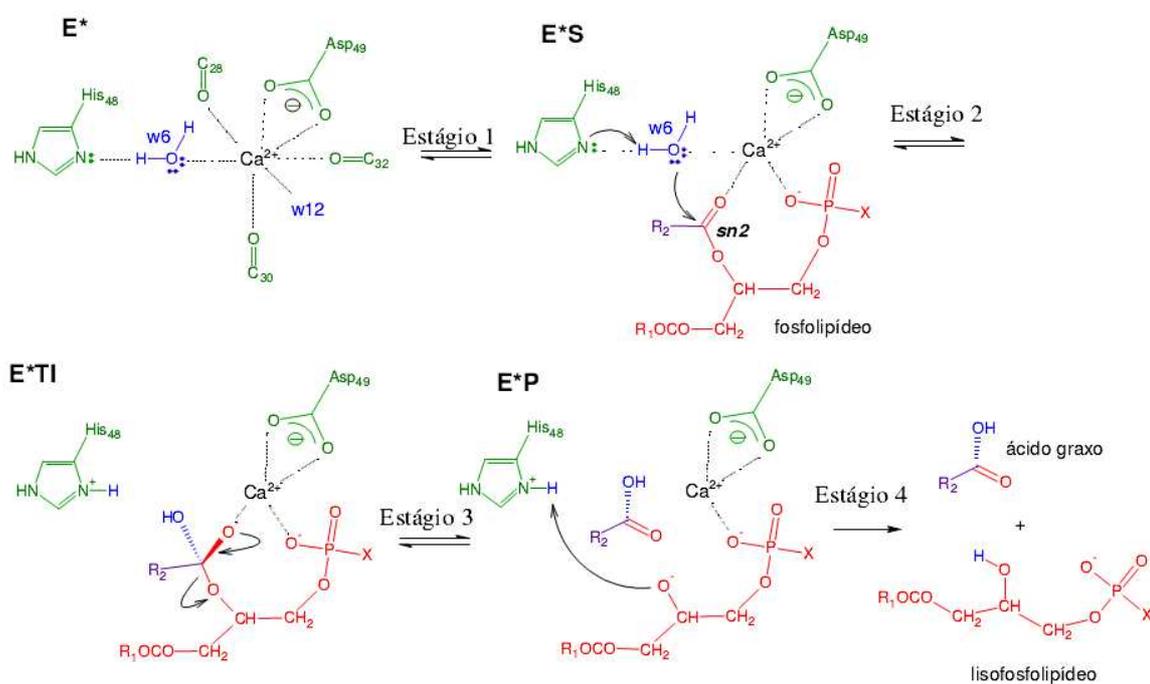


Figura 1A – Mecanismo de ação de uma fosfolipase A₂ (em verde) sobre seu substrato, um fosfolípido (em vermelho) (OLIVEIRA, 2006).

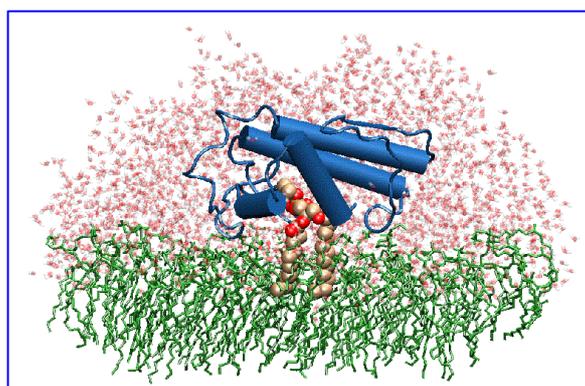
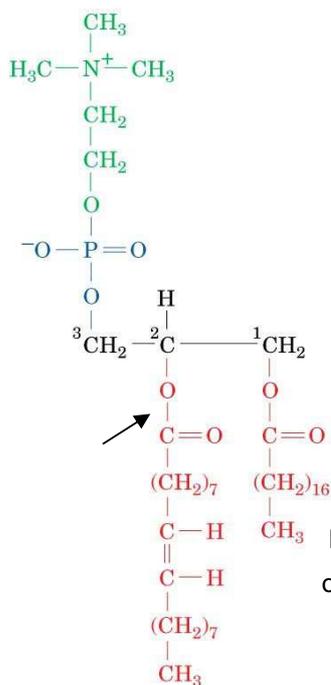


Figura 1B: Acima, a PLA₂ (em azul) interagindo com o fosfolípido da membrana lipídica (em verde).

Figura 1C: À esquerda, a fosfolipase A₂ libera por hidrólise, o resíduo de ácido graxo da posição C2 do fosfolípido para gerar o lisofosfolípido correspondente.



1.3 – Ácido Cítrico

O ácido cítrico, ou ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico é um ácido orgânico fraco, presente na maioria das frutas, sobretudo em cítricos como o limão e a laranja. Sua fórmula química é $C_6H_8O_7$. É usado como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante, dando um sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e de bebidas. Em bioquímica, é importante o seu papel como intermediário do ciclo do ácido cítrico, de forma que ocorre no metabolismo de quase todos os seres vivos. A figura 2 mostra a fórmula estrutural do ácido cítrico.

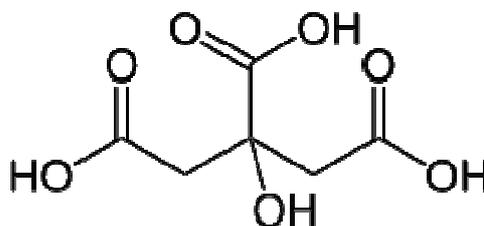


Figura 2 – Fórmula estrutural do ácido cítrico

1.4 – Frutose

A frutose é um monossacarídeo ($C_6H_{12}O_6$), com os carbonos dispostos em anel (Figura 3), sendo muito encontrada em frutas. Como possui um grupo cetona como grupo característico, a frutose é considerada uma cetose e como possui 6 carbonos, é considerada uma hexose. É, portanto, uma ceto-hexose. Tem uma estrutura em anel pentagonal com dois grupos metilos.

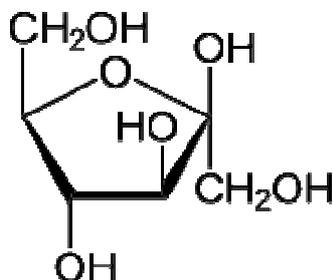


Figura 3 – Fórmula estrutural da frutose

A frutose e o ácido cítrico são importantes para o sêmen como fonte de energia metabólica e como componente de sistema tampão, respectivamente (TUTIDA, 1999). A frutose é um marcador da função secretora das vesículas seminais, importante para a sobrevivência dos espermatozóides em condições anaeróbicas e está estreitamente relacionada com a motilidade inicial das células espermáticas. O ácido cítrico reflete a atividade secretora da próstata e, ainda que a sua função não seja conhecida, parece ter papel importante como ativador da fosfatase ácida, mantendo também o equilíbrio osmótico, junto com o sódio e o potássio, favorecendo, assim, a motilidade dos espermatozóides (TUTIDA, 1999).

Por outro lado, as concentrações de frutose e de ácido cítrico, no plasma seminal, estão diretamente relacionadas com a atividade da testosterona, constituindo, portanto, um indicador da função endócrina dos tecidos. Há evidências de que o nível de ácido cítrico no plasma seminal reflita o estado androgênico, já que existe uma correlação positiva com a testosterona sanguínea, estando ainda



sujeito às variações estacionais, especialmente, no garanhão e no bode (TUTIDA, 1999).

1.5 - Técnicas Analíticas

1.5.1 - Espectrofotometria

A espectrofotometria é o método de análise óptica mais usado nas investigações biológicas e fisico-químicas. O espectrofotômetro, mostrado na Figura 4, é um instrumento que permite comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto, e uma quantidade conhecida da mesma substância denominada padrão. Todas as substâncias podem absorver energia radiante, mesmo o vidro que parece completamente transparente absorve comprimentos de ondas que pertencem ao espectro visível. A água absorve fortemente na região do infravermelho. A absorção das radiações ultravioletas, visíveis e infravermelhas dependem das estruturas das moléculas, e é característica para cada substância química. Quando a luz atravessa uma substância, parte da energia é absorvida (absorbância); a energia radiante não pode produzir nenhum efeito sem ser absorvida. A cor das substâncias se deve a absorção de certos comprimentos de ondas da luz branca que incide sobre elas, deixando transmitir aos nossos olhos apenas aqueles comprimentos de ondas não absorvidos.



Figura 4 – Foto de um espectrofotômetro UV-Vis.

1.5.2 - Método de Bradford

O método de Bradford é uma técnica para a determinação da concentração de proteínas que utiliza o corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250 (BRADFORD, 1976), (figura 5). Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.



Figura 5 - Equilíbrio químico do corante Coomassie Brilliant Blue. Na ausência da macromolécula, o corante é vermelho, se tornando azul na interação proteína-corante.

1.5.3 – Método do Biureto

O método se baseia na reação do reativo do biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução, sendo o tartarato de sódio o recomendado. O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica, como mostrado na figura 6. O produto de reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm (ZAIA et al., 1998). Apesar da banda na região de 270 nm aumentar em seis vezes a sensibilidade do método do biureto, a banda na região de 540 nm é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270 nm causando muita interferência no método (ZAIA et al., 1998).

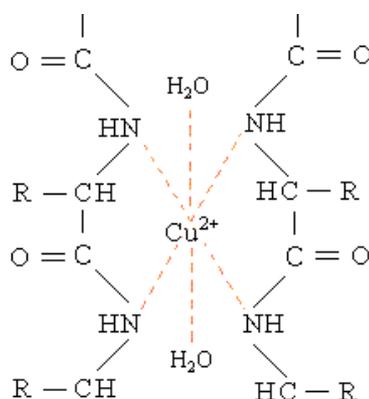


Figura 6 – Interação entre os nitrogênios das ligações peptídicas da proteína com o íon cobre.

1.5.4 – Cromatografia

O processo de cromatografia foi descoberto em 1903 por Mikhail Tswett, que separou pigmentos de plantas solubilizados usando adsorventes sólidos. Na maioria dos procedimentos cromatográficos modernos, a mistura de substâncias a ser fracionada é dissolvida em um líquido (a fase móvel), e esse líquido é passado através de uma coluna contendo uma matriz sólida e porosa (a fase estacionária). À medida que os solutos fluem através da coluna, eles interagem com a fase estacionária, e sua eluição é retardada. Tal retardamento depende das propriedades de cada soluto. Se a coluna for comprida o suficiente, as substâncias com as diferentes taxas de migração serão separadas. Os procedimentos cromatográficos mais úteis para purificar proteínas são classificados de acordo com a natureza da interação da proteína e a fase estacionária. Um cromatógrafo típico é mostrado na figura 7.



Figura 7 – Foto de um cromatógrafo Akta Purifier (GE HealthCare).

1.5.4.1 – Cromatografia de filtração em gel

Na cromatografia de filtração em gel, também chamada de cromatografia de exclusão por tamanho ou peneira molecular, as moléculas são separadas de acordo com seu tamanho e forma. A fase estacionária consiste em esferas de gel contendo poros cujos intervalos de tamanho são relativamente estreitos. O tamanho dos poros é determinado pela quantidade de ligações cruzadas entre os polímeros do material do gel. Se uma solução aquosa de moléculas de vários tamanhos for passada através da coluna que contém tal “peneira molecular”, as moléculas que forem muito grandes para entrar nos poros serão excluídas do volume de solvente no interior das esferas, permanecendo na solução que as contorna. Portanto, as moléculas grandes atravessam a coluna mais rapidamente do que as moléculas pequenas que passam através dos poros. Pelo fato dos poros das esferas possuírem certo intervalo de



tamanho, a filtração em gel pode ser usada para separar uma ampla variedade de moléculas; as moléculas maiores, com acesso a um número menor de poros, eluirão primeiro, comparadas com as moléculas um pouco menores que possuem acesso a um número maior de poros (VOET et al., 2008). A figura 8, ilustra uma cromatografia de exclusão por tamanho mostrando duas proteínas, A e B, sendo eluídas. A proteína A, por ser maior, não consegue penetrar nos poros do material da fase estacionária, por isso, percorre a coluna primeiro e é eluída antes da proteína B.

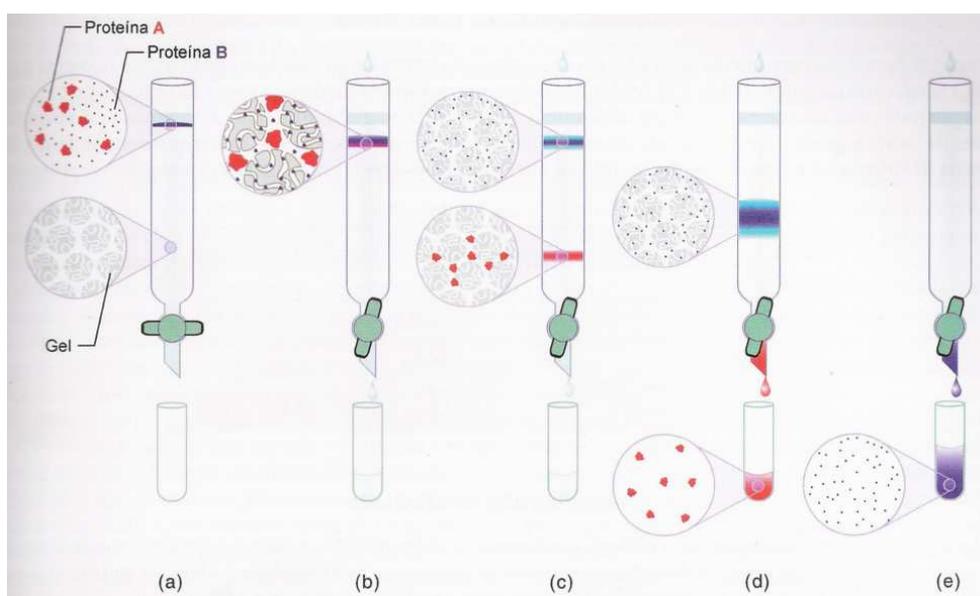


Figura 8 – Esquema ilustrativo de uma cromatografia de exclusão por tamanho. (a) Início da separação cromatográfica (b) Proteína A (maior) começa a ser separada (c) Proteína A está próxima da eluição (d) Proteína A eluída (e) Proteína B (menor) eluída por último (VOET et al., 2008).



1.5.5 - Eletroforese

A eletroforese de proteínas é normalmente realizada em géis de agarose ou poliacrilamida com um tamanho de poros característicos. As separações moleculares, portanto, baseiam-se nos efeitos de peneiramento (tamanho e forma) e na mobilidade eletroforética (carga elétrica). Contudo, a eletroforese difere-se da filtração em gel pelo fato de a mobilidade das moléculas pequenas serem maior do que a das grandes com a mesma densidade de carga. O pH no gel deve ser alto o suficiente (normalmente em torno de 9) de forma que praticamente todas as proteínas possuam carga líquida negativa e movam-se em direção ao ânodo que a voltagem é aplicada. Moléculas de tamanho e carga similares movem-se como uma banda única através do gel. Após a eletroforese, as bandas separadas podem ser visualizadas por uma técnica apropriada, como mergulhar o gel em uma solução de um corante que se liga fortemente às proteínas (p. ex., azul brilhante de Coomassie). Dependendo das dimensões do gel e da técnica de visualização utilizada, as amostras contendo menos do que 1 ng de proteína podem ser separadas e detectadas por eletroforese em gel (VOET et al., 2008). Em uma das formas de eletroforese, em gel de poliacrilamida (PAGE – de *polyacrylamide gel electrophoresis*), o detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) é usado para desnaturar as proteínas (Figura 9).

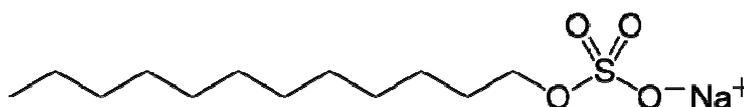


Figura 9 – Fórmula estrutural do dodecilsulfato de sódio (SDS).



Moléculas anfífilas como o SDS interferem nas interações hidrofóbicas que normalmente estabilizam as proteínas. As proteínas em geral assumem uma forma cilíndrica na presença de SDS. Além disso, a maioria das proteínas liga-se ao SDS na proporção de 1,4 g de SDS por grama de proteína (cerca de uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos) (VOET et al., 2008). A carga negativa que o SDS transfere mascara a carga intrínseca da proteína. O resultado é que as proteínas tratadas com SDS possuem formas similares e razões carga/massa parecidas. Em consequência disso, a SDS-PAGE separa as proteínas somente por efeitos de filtração em gel, isto é, de acordo com a massa molecular. Em SDS-PAGE a mobilidade relativa das proteínas varia, linearmente com o logaritmo de suas massas moleculares, como mostrado na figura 10.

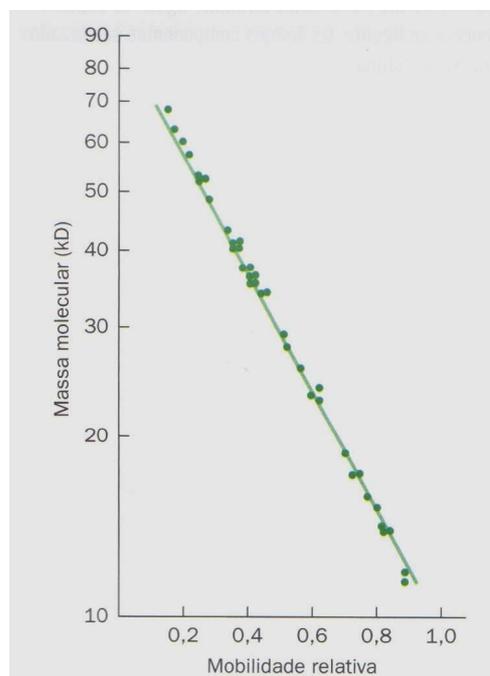


Figura 10 – Relação entre a massa molecular de uma proteína e sua mobilidade eletroforética em SDS-PAGE. (VOET *et al*, 2008)

Em conseqüência, a massa molecular de uma proteína pode ser determinada com exatidão de 5 a 10% fazendo-se sua eletroforese em presença de proteínas “marcadoras” de massa molecular conhecida, e cobrindo uma faixa na qual a massa molecular da proteína de interesse esteja situada (Figura 11). Pelo fato de o SDS romper as interações não-covalentes entre os polipeptídeos, a SDS-PAGE fornece a massa molecular das subunidades das proteínas feitas de múltiplas subunidades. A possibilidade de as subunidades serem ligadas por ligações dissulfeto pode ser testada por meio da realização da SDS-PAGE na presença e na ausência de agentes redutores, como o 2-mercaptoetanol ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), que quebra essas ligações.

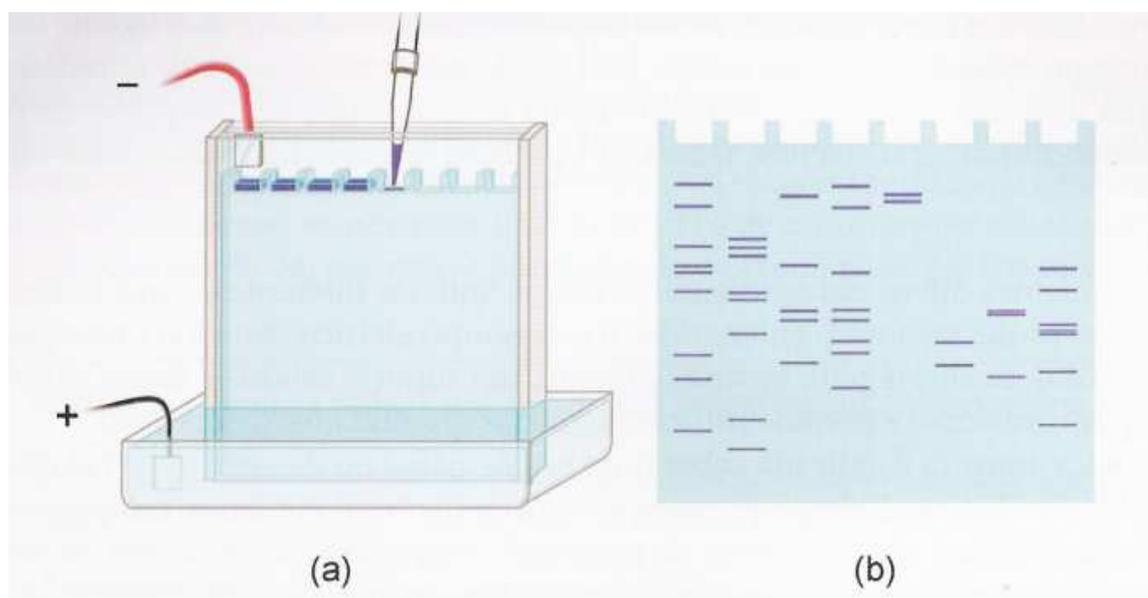


Figura 11 – Esquema ilustrativo de uma eletroforese em gel. (a) aplicação de amostras nos reservatórios individuais; (b) representação do gel mostrando as amostras após a eletroforese.



2 - OBJETIVOS

- 2.1 - Quantificar, através da técnica de espectrofotometria, a concentração de proteínas totais, ácido cítrico e frutose do plasma seminal de bodes e carneiros sob latitude 20°31'S em quatro épocas do ano e determinar a concentração anual média desses constituintes em cada espécie.
- 2.2 - Purificar através de técnicas cromatográficas, a enzima fosfolipase A₂ existente no plasma seminal de bodes e carneiros, e analisar sua atividade biológica após a purificação.
- 2.3 - Determinar a massa molecular da enzima fosfolipase A₂ extraída do plasma seminal de ovinos e caprinos por eletroforese em gel de poliacrilamida e através da técnica de cromatografia de exclusão por tamanho usando-se um pool de proteínas de massa molecular conhecida como padrão.



3 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 - Animais, alimentação e localização

A primeira parte do experimento foi realizada em uma propriedade rural localizada no município de Campo Grande (latitude 20°31'S, longitude 54°38'W), estado de Mato Grosso do Sul, com altitude de 530 m. O clima da região, segundo a classificação de Köppen (PELL et al., 2007), é do tipo tropical semi-úmido, subtipo AW, apresentando, como característica, a má distribuição das chuvas, com a ocorrência de um período seco bem definido durante os meses mais frios (maio a setembro) e um período chuvoso durante os meses mais quentes (outubro a abril).

A precipitação normal varia em torno de 1.500 milímetros ao ano, com temperatura média anual de 22,5°C e umidade relativa de 70%. A diferença de períodos escuros entre o solstício de verão e solstício de inverno é de 2 (duas) horas e 29 (vinte e nove) minutos. Foram utilizados 10 bodes da raça Bôer e 10 carneiros da raça Ile de France (Figura 12) localizados na referida propriedade, com regime extensivo *Brachiaria brizantha* c.v *Marandu* e suplementado com ração protéica (18%PB), 200g/dia ao final do dia, conforme manejo da propriedade, sal mineral e água “*ad libitum*”.

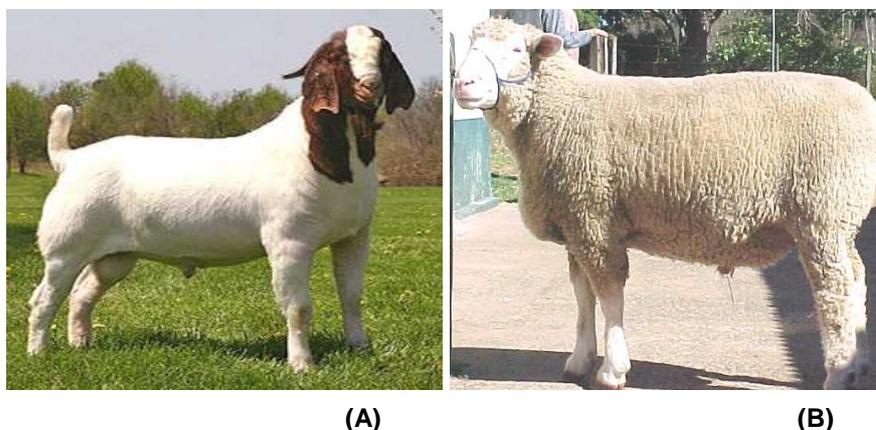


Figura 12: Animais doadores. (A) Bode da raça Bôer (caprino) e (B) Carneiro da raça Ile-de-France (ovino).

A extração do sêmen foi feita através da técnica de eletroejaculação em períodos e horas idênticas para todos os animais. A eletroejaculação é uma técnica para coletar sêmen de pequenos ruminantes, principalmente, aqueles que não se adaptam a vagina artificial e para bodes pode ser empregada com sucesso, sendo que, se usa baixa voltagem e frequência (CARTER et al., 1990).

Após a colheita e avaliação do sêmen pela equipe do Prof. Dr. Antonio Carlos Duenhas Monreal, do laboratório de Biofisiofarmacologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, foi feita a centrifugação das amostras à 3000 rpm durante 15 minutos para separação dos espermatozóides, e isolar o plasma seminal para as análises bioquímicas, realizadas durante este projeto.



3.2 - Análise bioquímica do plasma seminal por espectrofotometria

Todos os testes foram realizados utilizando espectrofotômetro UV/Vis, marca Jasco, modelo V-630, do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica - BMB, do Instituto de Química de São Carlos. Para todos os testes foi feito a leitura do branco (solução sem o analito de interesse) antes das amostras.

Os experimentos foram feitos em duas etapas, abrangendo o ano todo, portanto, as quatro estações existentes. Na etapa 1, os meses analisados foram: setembro, outubro, novembro, dezembro de 2008, janeiro e fevereiro de 2009. Na etapa 2, as amostras analisadas foram dos seguintes meses: março, abril, maio, junho, julho e agosto de 2009. Todas as análises foram repetidas por duas vezes sendo que para cada amostra os testes foram feitos em duplicata. Para o cálculo das concentrações, utilizou-se as curvas padrão obtidas experimentalmente, onde a equação da reta foi aplicada, sendo:

$$y = ax + b$$

(y = concentração; a: coeficiente angular; b: coeficiente linear e x: absorvância)

As concentrações anuais médias dos constituintes do plasma seminal foram determinadas assim como o limite de confiança da média, dado pela equação abaixo:

$$\mu = M \pm t \cdot s/\sqrt{N}$$

onde M é a média anual das concentrações, t é o parâmetro de *Student* (tabelado) e N é o número de medidas. Para este trabalho, como N = 12 (12 meses), t = 2,20 com 95 % de probabilidade, segundo a literatura (BACCAN et al., 1979).



3.2.1 - Quantificação de Frutose

As reações de quantificação de frutose foram feitas pela modificação do método de Seliwanoff (PINHEIRO, 1996). A reação é descrita na figura 13, mostrando a desidratação da cetose em meio ácido e a formação de produto colorido, na presença de resorcinol alcoólico.

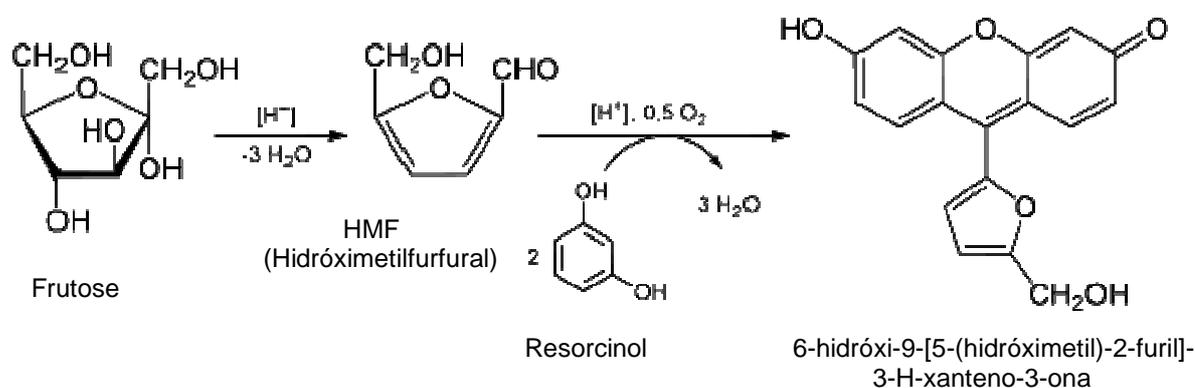


Figura 13 – Reação de Seliwanoff (Seliwanoff, 1887).

3.2.1.1 – Preparação do padrão para obtenção da curva padrão de frutose

Partindo-se de uma solução padrão de frutose a 0,2% (m/v) de concentração inicial, preparou-se por diluição com água destilada mais quatro soluções de frutose em 0,02%, 0,05%, 0,10%, 0,15%. Todas essas soluções foram analisadas em 450 nm. Na sequência, de posse dos valores de absorbância relativos a cada concentração, plotou-



se um gráfico e obteve-se a curva padrão para frutose, através da melhor reta entre os pontos obtidos.

3.2.1.2 – Análise Quantitativa

A análise quantitativa foi feita como descrita a seguir.

Foram pipetados 50 μ L de plasma seminal, que foram diluídos em 0,95 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 1,0 ml de sulfato de zinco 2% (m/v) e 1,0 ml de hidróxido de sódio 0,4% (m/v).

Na sequência, essa mistura foi aquecida em água fervente por 2 minutos e, então, centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm, sendo que toda esta etapa foi necessária para a desproteínização das amostras. Seguidamente, foi utilizado 1,0 ml da mistura, que foi tratada com resorcinol alcoólico 0,1 % (m/v) e 3,0 ml de HCl 30% (v/v) .

Em seguida, toda a mistura foi aquecida em banho maria à 85°C por 20 minutos, e após o resfriamento, foi feita a análise em comprimento de onda de 450 nm, sendo que o resultado final foi expresso em mg/dL.

3.2.2- Quantificação de Ácido Cítrico

As reações de quantificação de ácido cítrico foram feitas segundo o método desenvolvido por Saffran e Denstedt, (1948). O método baseia-se na determinação de baixas concentrações de ácido cítrico, pela formação de um produto de cor



amarela, o ácido aconítico, formado pela reação com ácido tricloroacético, anidrido acético e piridina, como mostrado na figura 14. Pelo controle da temperatura, o ácido cítrico agora insaturado, torna-se colorido a 0°C.

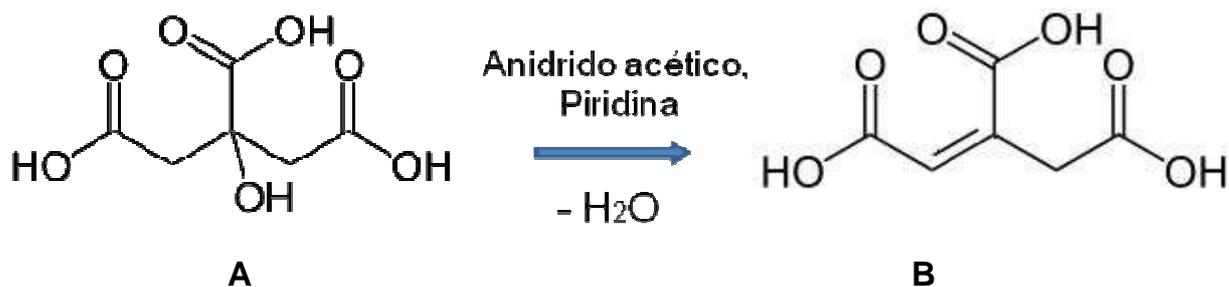


Figura 14 – A) - Ácido cítrico e B) Ácido Aconítico

3.2.2.1 – Preparação do padrão para obtenção da curva padrão para Ácido Cítrico

Inicialmente, preparou-se uma solução de ácido cítrico 0,6% (m/v). Sequencialmente, essa solução foi diluída com água destilada à 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%. Essas novas soluções foram analisadas em comprimento de onda em 420 nm, sendo que, as absorbâncias obtidas foram plotadas em gráfico para obtenção da curva padrão.

3.2.2.2 – Análise Quantitativa

Nesta etapa, foram pipetados 100 µL de plasma seminal e diluído em 0,9 mL de água destilada. Na sequência, adicionou-se 1,0 mL de ácido tricloroacético 10% (v/v) e



a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm. Após esta etapa, foi retirado uma alíquota de 0,5 mL e adicionado a 4,0 mL de anidrido acético, ficando em banho-maria à 60°C, durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado a esta solução 0,5 mL de piridina sendo levada novamente a banho-maria a 60°C, por 40 minutos. Numa etapa posterior, as amostras foram transferidas para um recipiente com gelo para o resfriamento e posterior leitura em espectrofotômetro a 420 nm. O resultado final foi expresso em µg/mL.

3.2.3 – Quantificação de Proteína Total

A quantificação de proteína total foi feita pelo método do Biureto (RODRIGUES, 1997). Rapidamente, grupos amida a partir da ligação peptídica, complexam-se aos íons cobre do reagente de Biureto em pH alcalino, apresentando cor que varia do verde ao alaranjado, proporcional a concentração de proteína em solução.

3.2.3.1– Preparação do padrão usando BSA para obtenção da curva padrão para quantificação de proteínas totais

A curva padrão foi feita usando-se albumina do soro bovino (BSA). A proteína foi preparada na concentração 10 mg/mL. Após esta etapa, esse padrão foi diluído em cinco outras soluções de concentração 1, 2, 3, 4 e 5 mg/mL. Na sequência, essas soluções foram levadas ao espectrofotômetro e a leitura foi feita em 550 nm para obtenção da curva padrão.



3.2.3.2 – Análise Quantitativa

Para as análises, 100 μ L de plasma seminal reagiram com 2,0 mL do reagente de Biureto, promovendo o surgimento de uma coloração específica para as amostras protéicas, a qual é mais intensa conforme a concentração, que foi mensurada no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 550 nm, e expressa em g/dL.

3.3 – Determinação da massa molecular e purificação da PLA₂ do plasma seminal de ovinos e caprinos por cromatografia líquida

A determinação da massa molecular e a purificação da PLA₂ foi realizada por cromatografia líquida preparativa, em equipamento Akta Purifier, marca General Electric (GE), utilizando como fase estacionária a coluna Superdex 75-16/60 (GE HealthCare) com volume de 120 mL, que separa proteínas de 3.000 à 70.000 Da. O fluxo de eluição foi de 1,5 mL/min, e frações de 2,0 mL foram coletadas. A fase móvel utilizada para o pool de proteínas foi tampão Tris-HCl 0,10 mol/L em pH 6,8 e para as amostras foi tampão Colina 0,15 mol/L, NaCl 0,2 mol/L, pH 5,5.

3.3.1 – Preparação da fase móvel

O tampão da fase móvel das amostras foi preparado utilizando-se Cloreto de Colina, marca Sigma, e Cloreto de Sódio, marca J. T. Baker. Foi preparado 1 litro de solução em água deionizada, com concentração final de Colina 0,15 mol/L e NaCl



0,2 mol/L, pH 5,5. Para o pool de proteínas, o tampão usado como fase móvel foi preparado usando-se Tris (hidroximetil aminometano), marca Bio-Rad, na concentração 0,1 mol/L e pH 6,8.

3.3.2 – Separação por exclusão molecular das amostras de Caprinos e Ovinos

Em cada experimento, foram utilizados 5 mL de plasma seminal. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, à 4°C durante 10 minutos. O material depositado ao fundo foi descartado e o sobrenadante foi transferido para um tubo falcon onde o volume final da amostra foi ajustado novamente para 5 mL pela adição de água mili-Q, e injetado no equipamento. Durante a eluição das amostras que percorreram a coluna cromatográfica, foi obtido um cromatograma que registrou os picos de absorção a 280 nm, permitindo que os tubos onde as amostras de PLA₂ foram detectadas, fossem armazenadas imediatamente a 4°C.

3.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%

As frações recolhidas após cada separação cromatográfica foram devidamente selecionadas pela análise do cromatograma obtido e armazenadas a 4°C. A análise do cromatograma foi necessária para a separação das frações que seriam aplicadas no gel para a eletroforese. Após a seleção das amostras, pipetou-se 40 µL de cada fração



eluída. Na sequência, a cada amostra de 40 μL foi adicionado 20 μL de tampão de amostra 2x (Tris-HCl 0,188 mol/L, pH 6,8 contendo SDS 6%, EDTA 6 mmol/L, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,01% e β -mercaptoetanol 10%). Posteriormente, essas amostras foram aquecidas por, aproximadamente, 10 minutos para desnaturação das proteínas. Após o aquecimento, foram utilizados 15 μL de cada amostra, as quais foram aplicadas no gel de poliacrilamida 15% na presença de um marcador de massa molecular entre 14.000 e 66.000 Da (Sigma), que foi utilizado como parâmetro de comparação para a análise das bandas do gel.

A eletroforese foi desenvolvida segundo o método de Laemmli (1970), para análise do conteúdo protéico do plasma seminal, bem como, para análise da fosfolipase A_2 isolada. O experimento desenvolveu-se por, aproximadamente, 2 horas com voltagem inicial de 100 V até a entrada da amostra no gel de resolução, quando neste momento, a voltagem aplicada foi elevada à 130 V. Após esta etapa, o gel foi mantido no corante azul de Coomassie durante 10 minutos e em seguida foi descorado em água destilada a quente por, aproximadamente, 10 minutos para visualização da distribuição das bandas.

3.5 - Concentração da enzima purificada

Após a análise dos géis de eletroforese, todas as frações obtidas na etapa cromatográfica referentes às bandas observadas nos géis na faixa de 14 kDa foram selecionadas, e as amostras de ovinos e caprinos armazenadas a 4°C. Posteriormente, essas amostras foram concentradas em concentrador com membranas



semipermeáveis (figura 15). Este trabalho usou-se membranas de 10 kDa, as quais permitem apenas a passagem de moléculas de massa molecular <10 kDa. Moléculas maiores ficam retidas na membrana, o que para as enzimas alvo é fundamental, pois suas massas moleculares estão na faixa de 14 kDa. Esta etapa, além de concentrar as amostras, também teve por objetivo eliminar contaminantes de baixa massa molecular observadas no gel e que não foram eliminadas durante a purificação. O contaminante de alta massa molecular, observado no gel de eletroforese, foi eliminado usando-se uma membrana semipermeável de 30 KDa, e a PLA₂ pôde ser recolhida na parte inferior do concentrador, após sucessivas lavagens com tampão, desta vez já purificada. A análise da pureza foi avaliada pela eletroforese SDS-PAGE. Estas etapas adicionais só foram realizadas para as amostras de caprinos, uma vez que as amostras de ovinos foram isoladas após a purificação e concentração usando membrana de 10 kDa.



Figura 15 - Concentrador com membrana semipermeável.



3.6 – Teste para verificar a atividade enzimática da PLA₂ utilizando emulsão de gema de ovo a 5% (v/v) em meio LB

Após a concentração da amostra, foram feitos testes de atividade enzimática para confirmar se a proteína isolada realmente se tratava da proteína alvo do estudo.

Foram feitas placas contendo meio LB (Luria-Bertani) - Ágar misturadas à emulsão de gema de ovo na concentração de 5% (v/v). Em cada placa foram feitos 4 poços (figura 30, em *Resultados e Discussão*), afim de adicionar diferentes amostras. A emulsão de gema de ovo é rica em fosfolipídeos e gera um ambiente favorável à atuação da enzima potencialmente isolada, desde que, fosfolipídeos são substratos naturais da enzima, e a emulsão favorece a interação lipídeo-água, propício à atuação da fosfolipase A₂ na sua forma biologicamente ativa. Em cada placa foram adicionadas aproximadamente, 20 µL de tampão colina (tampão de eluição) no poço 1, 20 µL de extrato bruto (plasma seminal) no poço 2, 20 µL de amostra de PLA₂ isolada no poço 3 e 20 µL do descarte do concentrador (tampão descartado após a etapa de concentração da enzima) no poço 4, respectivamente. A formação de anéis nas superfícies dos poços indica a reação entre a proteína e a emulsão adicionada ao meio LB, sendo que esta reação comprovaria a presença da fosfolipase A₂ na sua forma biologicamente ativa.

Adicionalmente, foi feita nova placa contendo meio LB e emulsão de gema de ovo a 5% (v/v), utilizando-se 40 µL de extrato bruto no poço 1 e 40 µL de PLA₂ no poço 2. O objetivo foi verificar se haveria alterações nos resultados obtidos, devido ao maior



volume de enzima em contato com o meio, observando o efeito da interação enzima-substrato.

3.7 – Teste para avaliar a atividade da PLA₂ por acompanhamento do pH em função do tempo de reação em pHmetro digital

A atividade da fosfolipase A₂ também foi verificada através de testes de acompanhamento da variação do pH (DE HAAS et al., 1968) em função do tempo da reação em pHmetro digital, marca Gehaka, modelo PG 1800. Como substrato foi utilizado uma emulsão de gema de ovo 5% (v/v) em presença de desoxicolato de sódio 0,0027 mol/L e cloreto de cálcio 0,006 mol/L. A solução foi preparada com volume final de 20 mL, sendo ajustado seu pH inicial para 8,0 a temperatura ambiente. A esta solução, foram adicionados 200 µL da amostra contendo a enzima PLA₂ proveniente do plasma seminal de caprinos, e a variação do pH foi acompanhada em função do tempo, onde no decorrer da reação ácidos graxos foram formados pela ação da enzima sob o substrato, rico em fosfolipídeos.

Este experimento não foi realizado com amostras de PLA₂ de ovinos.

3.8 – Cálculo da concentração de PLA₂ purificada de caprinos e ovinos pelo método de Bradford

Após todas as etapas de purificação da enzima foram calculadas as suas concentrações nas amostras de caprinos e ovinos, seguindo a metodologia proposta por Bradford, 1976. Os detalhes estão expressos nos resultados do trabalho.



4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- Quantificação de Proteínas Totais do Plasma Seminal de Ovinos

Após a realização dos testes utilizando o reagente de Biureto, com o objetivo de quantificar o conteúdo de proteínas totais presentes no plasma seminal de ovinos, foi feita a medida de absorvância a 550 nm das diferentes amostras coletadas durante os doze meses do ano. A partir da curva padrão obtida e mostrada na figura 16, as concentrações foram calculadas e estão expressas em g/dL (Tabela 1).

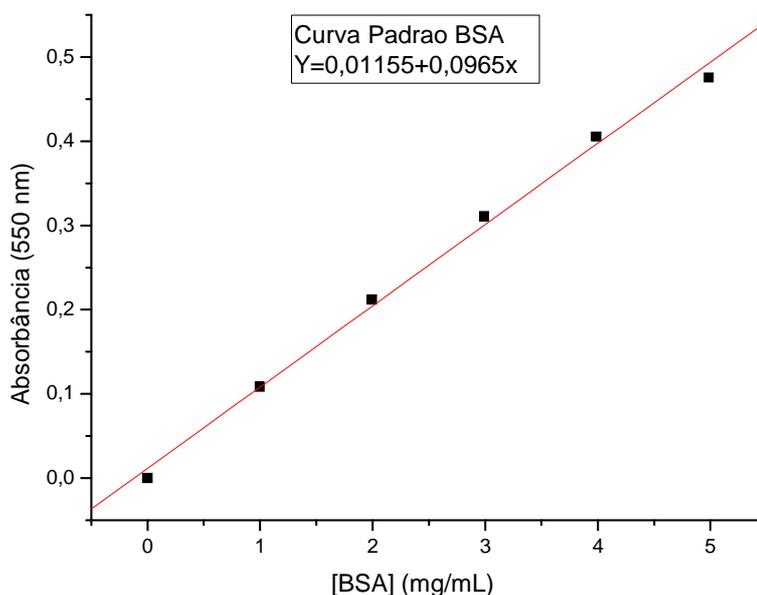


Figura16 – Curva padrão de BSA

O gráfico referente aos dados apresentados na tabela 1, está representado na figura 17



Tabela 1 – Concentração de proteínas totais do plasma seminal de ovinos nos 12 meses do ano e a média anual.

MESES	(Concentração g/dL)
Set	3,01
Out	3,50
Nov	4,10
Dez	2,60
Jan	3,02
Fev	4,70
Mar	4,53
Abr	2,03
Mai	3,70
Jun	1,86
Jul	3,96
Ago	2,23
Média anual	3,27 ± 0,60

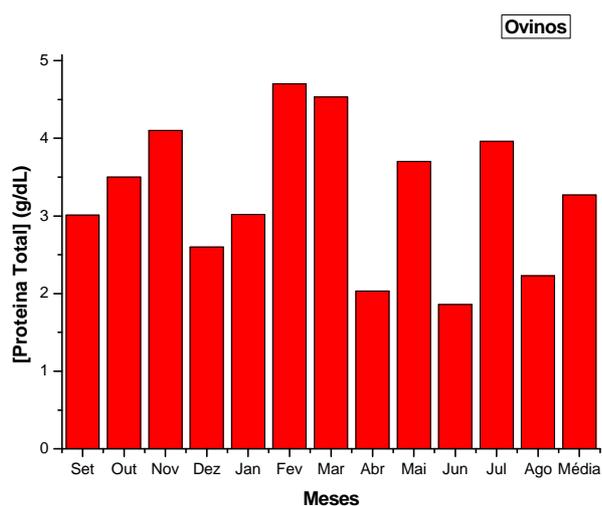


Figura 17 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de proteínas totais nos 12 meses do ano e a concentração anual média para o plasma seminal de ovinos.



4.2 – Quantificação de Proteínas Totais do Plasma Seminal de Caprinos

Da mesma forma, foi feita a medida de absorbância a 550 nm, das diferentes amostras coletadas durante os doze meses do ano para o plasma seminal de caprinos. A partir da curva padrão mostrada na figura 16, as concentrações de proteínas totais foram calculadas e estão expressas em g/dL (Tabela 2).

O gráfico referente aos dados apresentados na tabela 2, está representado na figura 18.

Tabela 2 – Concentração de proteínas totais do plasma seminal de caprinos nos 12 meses do ano e a média anual.

MESES	(Concentração g/dL)
Set	5,10
Out	4,70
Nov	6,50
Dez	5,80
Jan	6,00
Fev	5,65
Mar	4,10
Abr	5,10
Mai	4,55
Jun	4,50
Jul	4,75
Ago	3,50
Média anual	5,02 ± 0,43

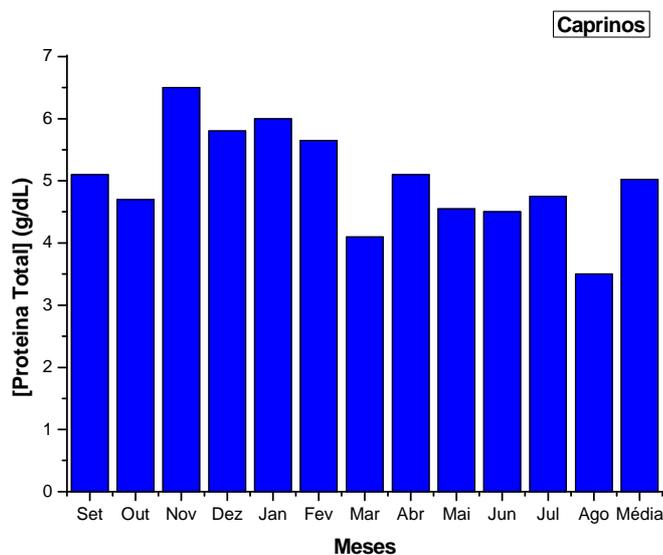


Figura 18 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de proteínas totais nos 12 meses do ano e a concentração anual média para o plasma seminal de caprinos.

Analisando-se os dois gráficos obtidos, figuras 17 e 18, observa-se que durante praticamente o ano todo há uma maior concentração protéica em caprinos, também observada na concentração anual média, sendo uma característica própria do animal ser mais rico nesse composto. Observa-se que para caprinos, nos meses mais chuvosos (setembro à fevereiro) há uma maior concentração de proteínas totais, devido as condições climáticas aumentarem a disponibilidade alimentar e, com isso, favorecerem o enriquecimento do plasma seminal. Para os ovinos, os meses que as amostras possuem maior concentração protéica são fevereiro e março, não havendo nesse caso tanta influência do período chuvoso nessa espécie. Fazendo-se uma comparação anual entre os dois animais, observa-se que os caprinos mantêm uma regularidade maior na concentração anual de proteínas totais, enquanto os ovinos possuem maiores variações durante o ano em termos de quantidade protéica. Em



comum, estas duas espécies mostram possuir menor quantidade de proteína total para o mês de agosto, como pode ser observado nos gráficos das figuras 17 e 18.

4.3 - Quantificação de Ácido Cítrico do Plasma Seminal de Ovinos

Após a realização dos testes para determinação da concentração de ácido cítrico do plasma seminal de ovinos, segundo o método de Saffran e Denstedt, (1948), foi feita a medida de absorbância a 420 nm das diferentes amostras coletadas durante os doze meses do ano. A partir da curva padrão obtida e mostrada na figura 19, as concentrações foram calculadas e estão expressas em $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

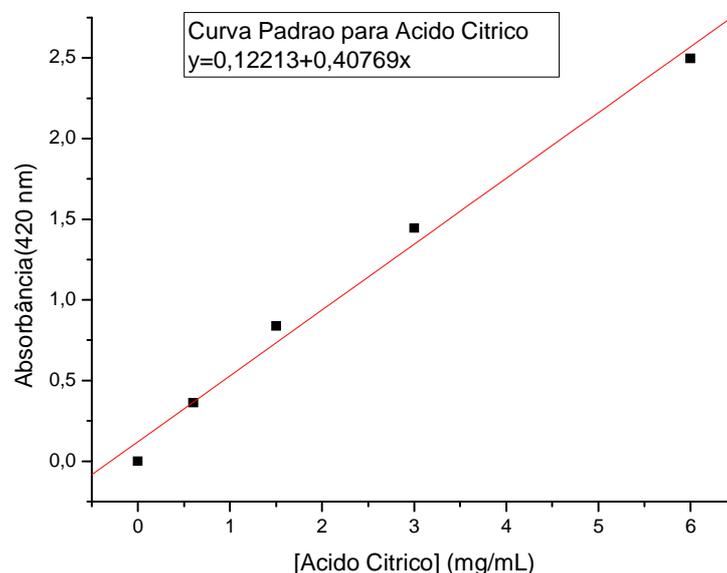


Figura 19 – Curva padrão para ácido cítrico

O gráfico referente aos dados apresentados na tabela 3, está representado na figura 20.



Tabela 3 – Concentração de ácido cítrico do plasma seminal de ovinos nos 12 meses do ano e a média anual.

MESES	(Concentração µg/mL)
Set	1070,50
Out	1113,00
Nov	1205,00
Dez	973,00
Jan	1037,50
Fev	1180,00
Mar	925,00
Abr	960,00
Mai	930,00
Jun	965,00
Jul	920,00
Ago	905,00
Média anual	1015,33 ± 66,50

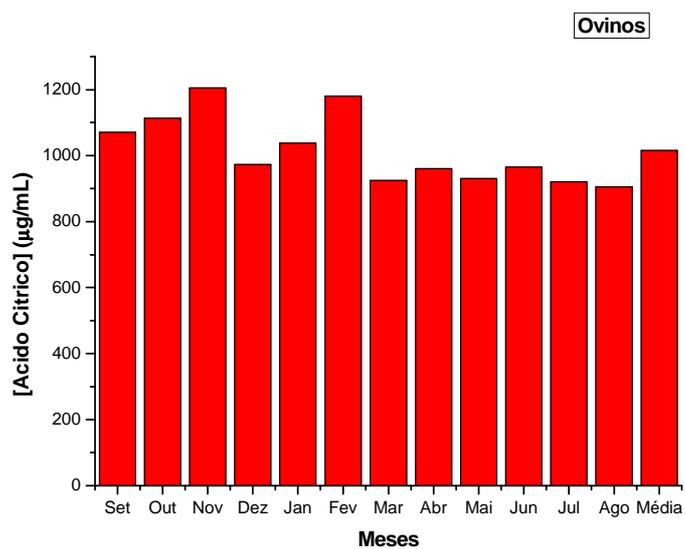


Figura 20 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de ácido cítrico nos 12 meses do ano e a concentração anual média para o plasma seminal de ovinos.



4.4 - Quantificação de Ácido Cítrico do Plasma Seminal de Caprinos

Paralelamente aos testes realizados para a determinação da concentração de ácido cítrico do plasma seminal de ovinos durante os 12 meses do ano, estes mesmos testes foram feitos para caprinos. A partir da curva padrão, as concentrações foram calculadas e estão expressas em $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). O gráfico referente aos dados apresentados na tabela 4, está representado na figura 21.

Tabela 4 – Concentração de ácido cítrico do plasma seminal de caprinos nos 12 meses do ano e a média anual.

MESES	(Concentração $\mu\text{g/mL}$)
Set	1472,00
Out	1444,00
Nov	1744,00
Dez	1689,00
Jan	1560,50
Fev	1592,50
Mar	1630,00
Abr	1675,00
Mai	1840,00
Jun	1870,00
Jul	910,00
Ago	1585,00
Média anual	1584,35 \pm 143,90

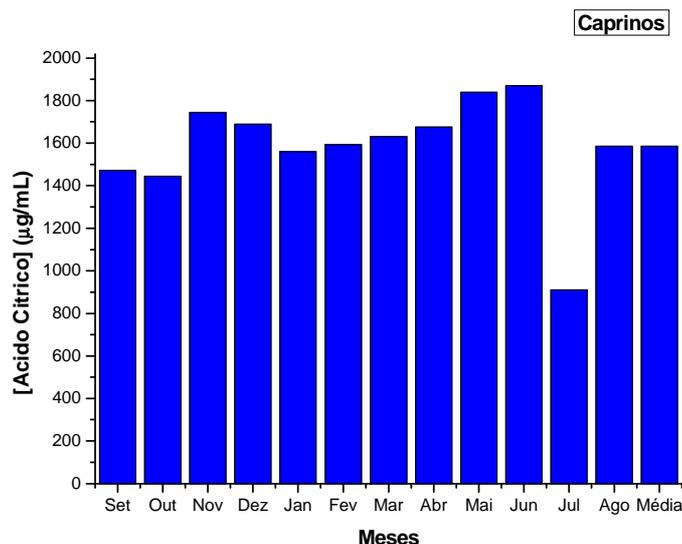


Figura 21 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de ácido cítrico nos 12 meses do ano e a concentração anual média para o plasma seminal de caprinos.

Pode-se observar que pelos gráficos das figuras 20 e 21, que para a concentração de ácido cítrico, tanto para ovinos como caprinos, há uma regularidade anual na quantidade desse composto, com exceção do mês de julho, para caprinos, onde há uma baixa quantidade de ácido cítrico, comparado aos demais meses do ano. Novamente, observa-se pela média anual, que caprinos possuem maior quantidade deste de composto, evidenciando que o sêmen desse animal é mais rico que de ovinos, em termos de quantidade de ácido cítrico. Observa-se que para ambas as espécies existem uma grande concentração desse componente no mês de novembro, também influenciado pelo período mais chuvoso em relação aos demais meses. Em ovinos, houve uma maior linearidade da quantidade de ácido cítrico, bem diferente da quantidade de proteína total, que sofre grandes variações durante o ano. Para caprinos, observa-se que há uma ascendência na concentração iniciada no mês de



janeiro e que vai até julho, onde ocorre o fim do período reprodutivo do animal (NUNES, 1982).

4.5 – Quantificação de Frutose do Plasma Seminal de Ovinos

Após as reações de quantificação de frutose segundo Pinheiro, (1996), as 12 amostras obtidas do plasma seminal de ovinos foram mensuradas no comprimento de onda de 450 nm. As concentrações referentes às absorbâncias obtidas estão listadas na tabela 5, e estão expressas em mg/dL. A curva padrão para frutose obtida é mostrada na figura 22.

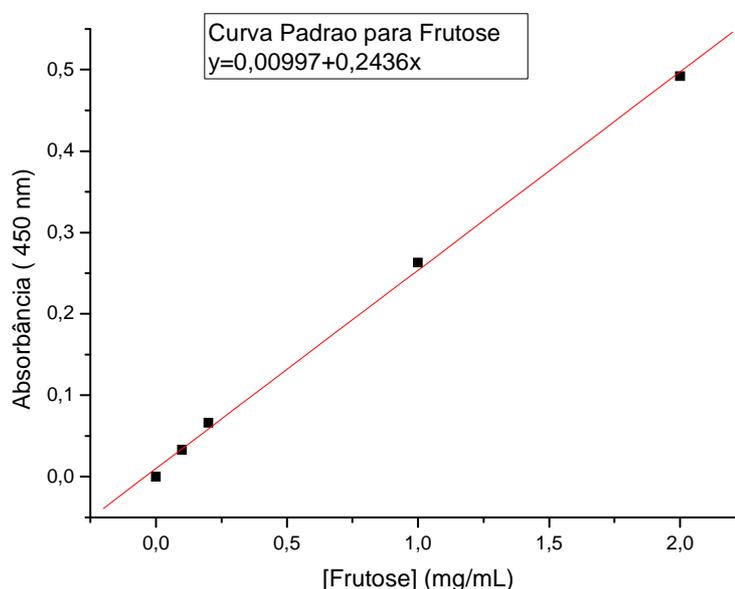


Figura 22- Curva padrão para frutose

O gráfico referente aos dados da tabela 5 está representado na figura 23.



Tabela 5 – Concentração de frutose do plasma seminal de ovinos nos 12 meses do ano e a média anual.

MESES	(Concentração mg/dL)
Set	21,80
Out	26,40
Nov	42,80
Dez	17,20
Jan	26,40
Fev	25,80
Mar	16,20
Abr	16,50
Mai	23,00
Jun	29,50
Jul	25,00
Ago	10,20
Média anual	23,40 ± 4,80

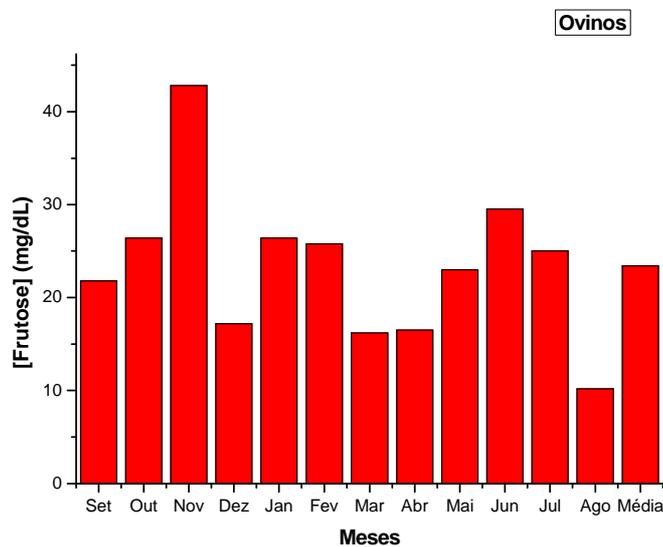


Figura 23 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de frutose nos 12 meses do ano e a concentração anual média para o plasma seminal de ovinos.



4.6 – Quantificação de Frutose do Plasma Seminal de Caprinos

Após as reações de quantificação de frutose segundo Pinheiro, (1996), as 12 amostras obtidas do plasma seminal de caprinos foram mensuradas no comprimento de onda de 450 nm. As concentrações referentes às absorvâncias obtidas estão listadas na tabela 6, e estão expressas em mg/dL.

O gráfico referente aos dados da tabela 6 está representado na figura 24.

Tabela 6 – Concentração de frutose do plasma seminal de caprinos nos 12 meses do ano e a média anual.

MESES	(Concentração mg/dL)
Set	56,60
Out	62,80
Nov	106,60
Dez	104,20
Jan	109,20
Fev	84,40
Mar	62,00
Abr	42,80
Mai	81,10
Jun	101,20
Jul	27,70
Ago	34,10
Média anual	72,73 ± 18,50

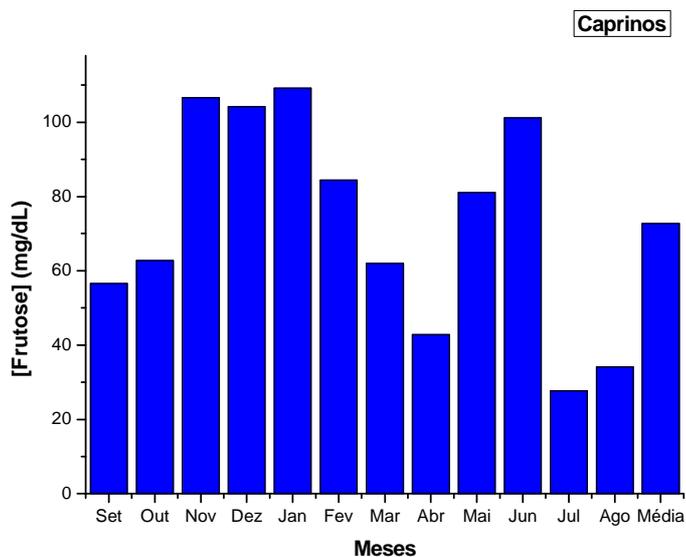


Figura 24 – Gráfico de barras mostrando a variação da concentração de frutose nos 12 meses do ano e a concentração anual média para o plasma seminal de caprinos.

Os gráficos das figuras 23 e 24 mostram que há uma grande diferença na concentração anual média de frutose entre ovinos e caprinos, sendo que caprinos possui uma quantidade bem maior desse componente. Para caprinos, há uma maior concentração durante os meses mais chuvosos, que vai de novembro à fevereiro e, da mesma forma que ocorre com a concentração de ácido cítrico, há uma variação crescente similar que inicia-se em março e vai até junho, final do período reprodutivo do animal. Também, observa-se pelos gráficos, que o mês de agosto, final do período de estiagem, as amostras apresentam baixa concentração de frutose para ambas as espécies, se comparado com os demais meses do ano, período de maior escassez nutricional (pouca pastagem).



4.7 – Determinação da massa molecular da PLA₂ por cromatografia de exclusão de tamanho usando-se um pool de proteínas como padrão.

Coluna usada: Superdex 75 – 16/60

Tampão de eluição: Tris-HCl 0,10 mol/L, pH 6,8

Tabela 7: Pool de proteínas usadas como padrão

Fração	Proteína	mg/mL (pool)	MM (kDa)
1	Apoferritina	2,5	480
2	λ-globulina	2,5	160
3	BSA	2,5	67
4	Ovoalbumina	2,0	45
5	Anidrase Carbonica	2,0	30
6	Citocromo C	1,0	12,3

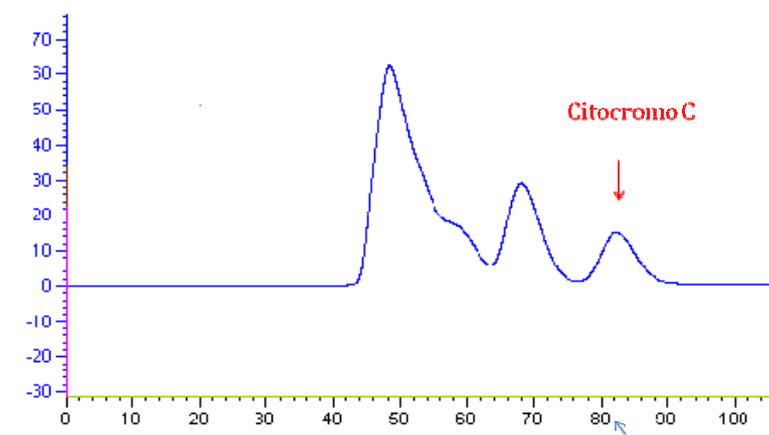


Figura 25 – Cromatograma do pool de proteínas

Pela análise do cromatograma obtido mostrado na figura 25, observou-se que o Citocromo C, com massa molecular de 12,3 kDa, foi eluído num volume próximo a 80 mL. Nesse mesmo volume, acredita-se que houve a eluição da fosfolipase A₂, que segundo a literatura e os resultados obtidos no presente trabalho, possui massa molecular próxima do Citocromo C, ou seja, na faixa de 14 kDa.

4.8 - Purificação da fosfolipase A₂ (PLA₂)

Após centrifugação, o plasma seminal de caprinos e ovinos foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular (Figura 26), como descrito na parte experimental.



A figura 27 mostra o padrão de bandas obtido no gel de eletroforese a 15%, das frações eluídas da coluna de exclusão molecular.

No padrão de bandas obtido a partir do gel de eletroforese a 15% para ovinos, (figura 27A), observou-se que nas canaletas 7 e 8 a proteína PLA₂ presente nestas amostras ainda não estavam totalmente isoladas.

No gel obtido para as amostras de caprinos (figura 27B), observa-se que as canaletas de 12 a 15 mostram amostras parcialmente puras, que necessitavam de outras etapas de purificação. Ainda pode-se dizer que pela análise das eletroforeses realizadas, a concentração protéica em amostras de caprinos sempre foi maior que de ovinos, resultando em bandas mais densas e largas em todos os géis analisados (figura 27 e 28). Essa observação confirma os dados obtidos nas análises de proteína total, onde sempre foi observada maior concentração de proteínas no plasma seminal de caprinos, em comparação aos ovinos.

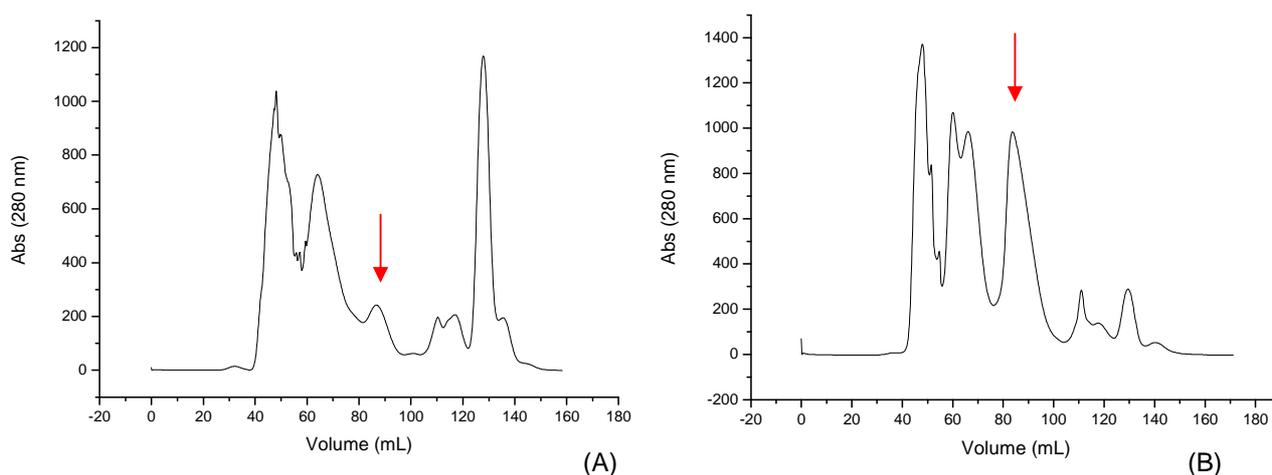
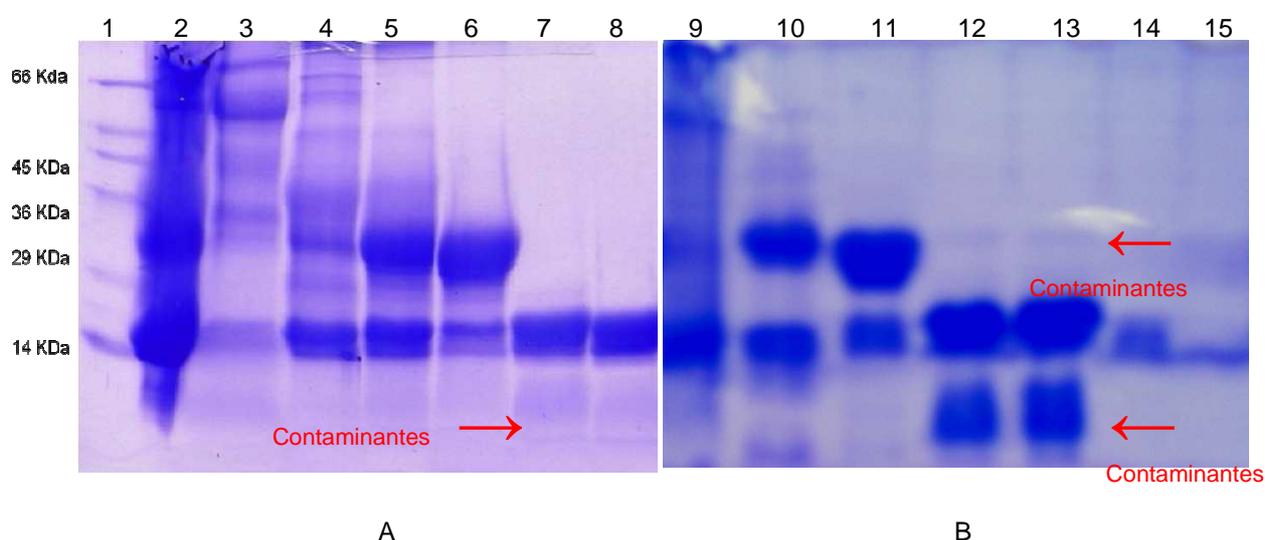


Figura 26 – Cromatogramas obtidos após eluição das amostras do plasma seminal de (A) Ovinos e (B) Caprinos, a partir da coluna de exclusão molecular.

Os cromatogramas da figura 26A e 26B mostram os picos relativos à PLA₂ (indicados com setas) sendo confirmados ser realmente da enzima após a análise dos géis de eletroforese. Pela análise gráfica, observa-se que o pico referente à amostra de caprinos é mais intenso que de ovinos, indicando uma maior concentração protéica nestes animais.



Após a análise eletroforética, todas as frações contendo PLA₂ de caprinos e ovinos foram selecionadas e concentradas em membrana semipermeável de 10 kDa. A amostra contendo PLA₂ de caprinos foi, adicionalmente, submetida à filtração em membrana semipermeável de 30 kDa para separação do contaminante de alta massa



molecular. Os resultados são mostrados nas figuras 28 e 29, respectivamente. A figura 28 mostra a PLA₂ de ovinos após o processo final de purificação, apresentando massa molecular estimada de 13,8 kDa, e na figura 29 observa-se a PLA₂ de caprinos, também purificada, com massa molecular estimada de 12,8 kDa, calculada a partir do gel.

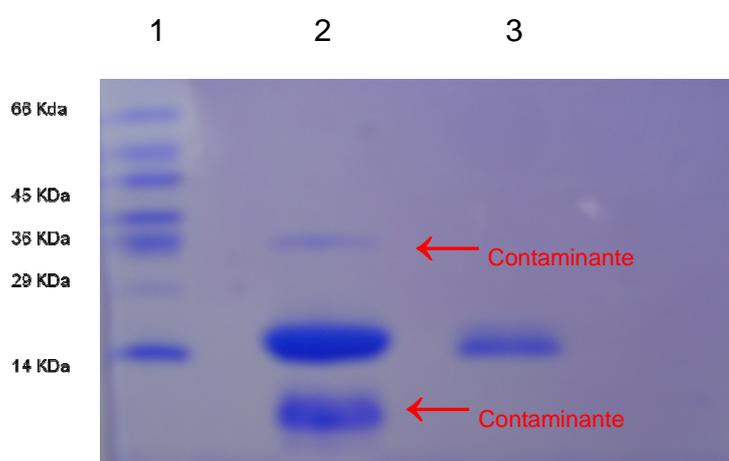


Figura 28 - Gel de eletroforese a 15% de amostras de PLA₂ de ovinos e caprinos; canaleta 1 – marcador de massa molecular; canaleta 2 - PLA₂ de caprinos com duas bandas de contaminantes; e canaleta 3 - PLA₂ isolada do plasma seminal de ovinos.

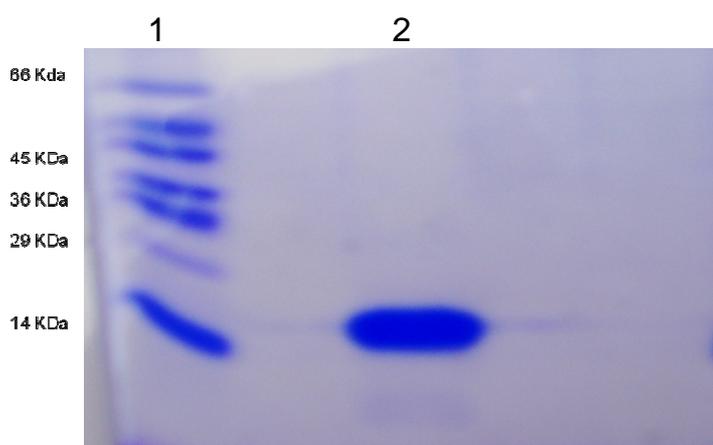


Figura 29 – Eletroforese SDS-PAGE a 15% mostrando o marcador de massa molecular na canaleta 1 e a PLA₂ isolada de caprinos na canaleta 2.



4.9 – Cálculo da concentração da PLA₂ pelo método de Bradford

Para o cálculo da concentração da PLA₂ de caprinos e ovinos, foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976), e a leitura das absorbâncias foi feita no aparelho Ultrospec 2000, da marca Pharmacia Biotec.

Para o cálculo das concentrações foi utilizado a equação da reta do gráfico padrão de BSA, obtida pelo método de Bradford.

$$\text{Concentração} = (\text{Abs} - 0,043)/0,0618$$

4.9.1 – Amostra de Caprinos

Para encontrar a concentração de PLA₂ do plasma seminal de caprinos foram utilizados 1000 µL de reação, sendo 800 µL de amostra (798 µL de água e 2 µL de amostra contendo a proteína), e 200 µL do reagente de Bradford.

Os testes foram feitos em duplicatas, obtendo-se as absorbâncias indicadas na tabela 8.

Tabela 8: Absorbâncias das amostras de PLA₂ do plasma seminal de caprinos.

Amostra 1 Absorbância (595 nm)	Amostra 2 Absorbância (595 nm)	Absorbância média
0,477	0,481	0,479



Sendo assim,

$$\text{Concentração} = (\text{Abs} - 0,0403)/0,0618$$

$$\text{Concentração} = (0,479 - 0,0403)/0,0618$$

$$\text{Concentração} = 7,098 \mu\text{g}/2 \mu\text{L} = 3,549 \mu\text{g}/\mu\text{L} \text{ ou } 3,549 \text{ mg/mL}$$

A concentração de 3,55 mg/mL de PLA₂ de caprinos após as etapas de purificação representam um rendimento de cerca de 7%, a partir do extrato bruto de plasma seminal, que apresenta em média 50 mg/mL de proteínas totais.

4.9.2 – Amostra de Ovinos

Para encontrar a concentração de PLA₂ do plasma seminal de ovinos foram utilizados 1000 μL de reação, sendo 800 μL de amostra (790 μL de água e 10 μL de amostra contendo a proteína), e 200 μL do reagente de Bradford.

Os testes foram feitos em duplicatas, obtendo-se as absorvâncias indicadas na tabela 9.

Tabela 9: Absorvâncias das amostras de PLA₂ do plasma seminal de ovinos.

Amostra 1 Absorvância (595 nm)	Amostra 2 Absorvância (595 nm)	Absorvância média
0,459	0,456	0,4575



Sendo assim,

$$\text{Concentração} = (\text{Abs} - 0,0403)/0,0618$$

$$\text{Concentração} = (0,4575 - 0,0403)/0,0618$$

$$\text{Concentração} = 6,750 \mu\text{g}/10 \mu\text{L} = 0,675 \mu\text{g}/\mu\text{L} \text{ ou } 0,675 \text{ mg/mL}$$

A concentração de 0,675 mg/mL de PLA₂ de ovinos após as etapas de purificação representam um rendimento de cerca de 2%, a partir do extrato bruto de plasma seminal, que apresenta em média 33 mg/mL de proteínas totais.

4.10 – Testes da atividade biológica da PLA₂ purificada

4.10.1 – Teste da atividade utilizando emulsão de gema de ovo 5% (v/v) em meio LB

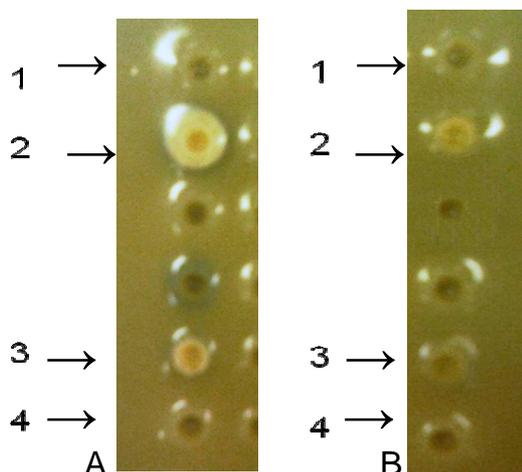


Figura 30 – Foto da placa contendo meio LB com emulsão de gema de ovo 5%.

(A) Placa com amostras de caprinos e (B) Placa com amostras de ovinos. No poço 1 – Tampão colina como controle (fase móvel da cromatografia), poço 2 – Amostra bruta (plasma seminal), poço 3 – PLA₂ purificada e poço 4- descarte do concentrador.



Analisando-se a figura 30, observa-se que no poço 1, referente ao controle, não foi observado reação (controle negativo). O tampão foi usado como controle para verificar se haveria alguma influência com relação ao substrato utilizado. No poço 2, onde foi utilizada amostra bruta (plasma seminal), apresenta formação de anéis (coloração mais clara), tanto para as amostras de caprinos como para ovinos. O controle positivo é devido a interação da fosfolipase A₂ com fosfolípidos (substrato) presentes na emulsão de gema de ovo. No poço 3, utilizando uma alíquota da fosfolipase A₂ purificada, também observa-se a formação de anéis, mostrando que a enzima está com sua atividade biológica preservada após a purificação. No poço 4, utilizando o descartado do concentrador, nada se evidenciou, mostrando que a membrana semipermeável de 10 KDa não permitiu que ambas PLA₂s fossem perdidas nesta etapa.

Comparando-se as duas espécies, observa-se que a amostra de caprinos é mais rica em PLA₂, comprovando os testes de quantificação, bem como, as análises dos géis de eletroforese. A maior concentração da enzima em caprinos gerou maior interação enzima-substrato na placa contendo emulsão de gema de ovo, como pode ser observado na figura 30, com a formação de anéis mais intensos.

Nas placas contendo o dobro do volume de amostras (40 µL de amostra em cada poço), foi possível observar as diferenças esperadas. Como resultado, houve a formação de anéis mais intensos resultantes do maior volume de enzima presente neste experimento. Neste teste, adicionou-se no poço 1 o extrato bruto e no poço 2 a enzima PLA₂ purificada. O resultado deste experimento pode ser visto na figura 31.

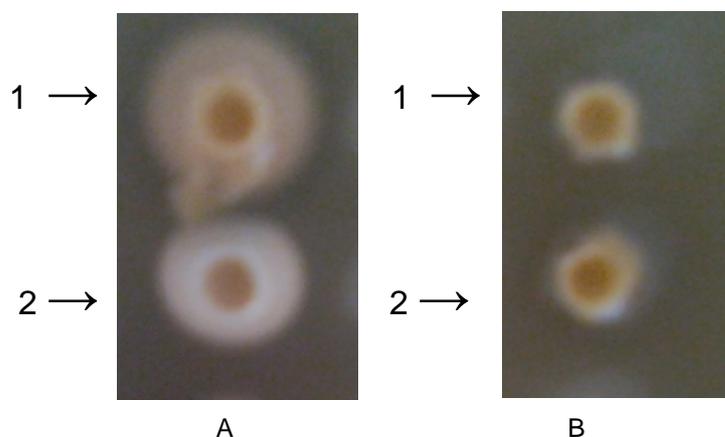


Figura 31 – Placas contendo emulsão de gema de ovo 5% (v/v) em meio LB – (A) amostras de caprinos e (B) amostras de ovinos. Poço 1 – Extrato bruto (plasma seminal) e poço 2 PLA₂ purificada.

4.10.2 – Teste da avaliação da atividade enzimática por acompanhamento do pH em função do tempo de reação usando pHmetro digital

Tabela 10 – Variação do pH em função do tempo durante a reação enzimática

Tempo (s)	pH	Tempo (s)	pH	Tempo (s)	pH
0	8,05	420	7,87	810	7,78
30	7,94	450	7,87	840	7,78
60	7,91	480	7,87	870	7,78
90	7,88	510	7,85	900	7,78
120	7,87	540	7,85	930	7,78
150	7,87	570	7,84	960	7,78
180	7,87	600	7,82	990	7,78
210	7,87	630	7,82	1020	7,78
240	7,87	660	7,80	1050	7,78
270	7,87	670	7,80	1080	7,78
300	7,87	700	7,80	1110	7,78
330	7,87	730	7,80	1140	7,78
360	7,87	760	7,79	1170	7,78
390	7,87	790	7,78	1200	7,78



Ao analisar-se o gráfico da figura 32 e a tabela 10, verificou-se que ocorre uma queda brusca do pH no momento da adição da amostra contendo a PLA₂, e que na sequência não houve mais variação ficando estável no intervalo de 120 a 480 segundos. Após esse tempo, o pH voltou a cair saindo de 7,87 até o momento em que estabiliza-se novamente em 7,78, não diminuindo mais até o final do experimento que ocorreu durante 20 minutos.

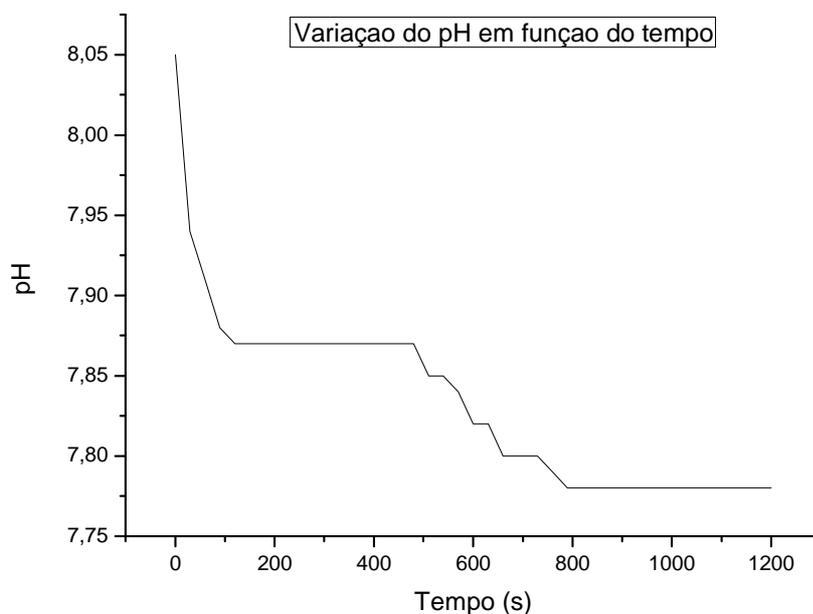


Figura 32 – Gráfico do pH em função do tempo para a reação da PLA₂ com seu substrato.

Acredita-se que a primeira queda do pH deve-se ao fato da amostra estar em tampão pH 5,5, favorecendo com isso um declínio do pH como visto no gráfico da



figura 32. A segunda diminuição do pH acredita-se que seja devido à ação da enzima PLA₂ sob o substrato (fosfolipídeos da emulsão de gema de ovo). A diminuição do pH devido à ação da enzima pode não ter sido imediata, uma vez que a fosfolipase A₂ é cálcio-dependente, e necessita complexar-se ao cálcio, presente na solução na forma de CaCl₂ para ter sua forma biologicamente ativa, e atuar sobre o substrato, gerando ácidos graxos na solução e diminuindo o pH. No entanto, esses testes foram preliminares e necessitam de mais estudos para obter-se resultados mais conclusivos e seguros sobre essa metodologia de análise da atividade enzimática da PLA₂.



5 - CONCLUSÃO

A análise quantitativa de frutose, ácido cítrico e proteínas totais do plasma seminal de ovinos e caprinos serviu para evidenciar-se o efeito de fatores climáticos e estacionais sobre a concentração destes componentes bioquímicos nestas espécies e como eles variam durante o ano. Observou-se que através de todos os métodos de quantificação usados e pelas concentrações anuais médias, o plasma seminal de caprinos da raça Bôer é mais rico em frutose, ácido cítrico e proteínas totais em relação ao de ovinos da raça Ile-de-France. Em relação a proteínas totais, pode-se dizer que para ambas as espécies houve grandes variações na concentração protéica durante o ano, prevalecendo para caprinos uma maior concentração nos meses chuvosos, que vai de novembro a fevereiro. Para ovinos houve maior concentração nos meses de fevereiro e março mostrando que esta espécie não foi tão influenciada pelo período de chuvas durante o ano. Em relação ao ácido cítrico não observou-se grandes variações na quantidade deste componente em nenhuma espécie nos 12 meses analisados, sendo pouco influenciado pelos fatores climáticos e estacionais do ano. Para a análise de frutose, conclui-se que através dos gráficos obtidos, a concentração em caprinos é muito maior em relação a ovinos, e sofre grandes variações durante o ano. No entanto, há uma similaridade entre as duas espécies observando-se um aumento na concentração de frutose que inicia-se em abril e vai até junho tanto para caprinos como ovinos.

Em relação a purificação da PLA₂, conclui-se que o resultado obtido foi bom, uma vez que, conseguiu-se a enzima isolada utilizando-se técnicas cromatográficas



adequadas e coluna de separação por exclusão por tamanho. A eficiência na extração foi maior para as amostras de plasma seminal de caprinos (17,75 mg de PLA₂ a partir de 5 mL de plasma seminal), mas apesar do baixo rendimento obtido na extração da PLA₂ do plasma seminal de ovinos (3,38 mg a partir de 5 mL), resultados mostraram que a atividade biológica foi preservada, e pôde ser comprovada, para ambas amostras, através dos testes realizados em placa contendo ágar e emulsão de gema de ovo a 5% (v/v) como substrato, onde visualizou-se a formação de anéis resultantes da interação enzima-substrato neste meio. Também foi feito um teste preliminar para avaliar a atividade da PLA₂ em solução contendo como substrato a emulsão de gema de ovo 5% (v/v) em presença de deoxicolato de sódio 0,0027 mol/L e cloreto de cálcio 0,006 mol/L. Acredita-se que a segunda diminuição do pH do meio observada, seja devido a liberação de ácidos graxos formados pela ação da enzima sobre o substrato, rico em fosfolipídeos. No entanto, para esta metodologia precisa-se de mais estudos e novos testes para confirmar se realmente a variação do pH foi resultante da ação enzimática, e com isso trabalhar de forma mais detalhada os resultados obtidos através deste método.

Chegou-se as massas moleculares de 13,8 kDa para a PLA₂ extraída do plasma seminal de ovinos e 12,8 kDa para a PLA₂ extraída do plasma seminal de caprinos. A análise dos géis de eletroforese após o processo de purificação e o cromatograma obtido à partir do pool de proteínas utilizadas como padrão serviram como parâmetro de comparação para esses resultados.



Referências Bibliográficas

ALEU, J.R.. VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Salamanca. Libro de Ponencias y mesas redondas. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 1992.

ANUALPEC 2.003 – Anuário da Pecuária Brasileira. FNP Consultoria e Agroinformativos, 2.003, 400p.

BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S.; BARONE, J.S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**, 2ª. Ed., 1979, 259 p.

BICUDO, SONY DIMAS. **Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina, biometria testicular, avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima**. Botucatu, 1999. 107 p. Tese Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 1999.

BICUDO, S.D. Sumário das pesquisas em reprodução ovina desenvolvidas na FMVZ UNESP Botucatu. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA, 6, 2002, Botucatu, SP. **Anais ...** Botucatu: FMVZ-UNESP, 2002.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248-254, 1976.

CARTER, P.D., HAMILTON, P.A., DUFTY, J.H. **Aust. Vet. J.** 67, 91-93, 1990.

CHEMINEAU, P.; COGNIÈ, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome: FAO (**Animal Production and Health Paper** nº 83), p. 222, 1991.



CLAVERT, A.; MONTAGNON, D.; BRUN, B. Pathological seminal plasma proteins by cellulose acetate electrophoresis. **Archives of Andrology**, n.6, p.53 – 60, 1981.

COLAS, G. Factors affecting the quality of ram semen. In: SHEEP PRODUCTION, 1983, London: Butlerworths, 1983. p. 453 – 65.

COLAS, G., BRICE, G. Proceed. In: 8th Int. Cong. Anim. Reprod. And A. I., Krakov 4, 1976, Poland, **Anais...**p. 346-50.

CORTEEL, J.M. Effect of washing on deep frozen goat semen preservation. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.** v. 15, p. 525-528, 1975.

CORTEEL, J.M. In Gall, C. (Ed.), Goat Production, Academia Press, London, pp. 171-191, 1981.

DE HAAS, G.H.; POSTEMA, N.M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L.L.M. – Purification and Properties of Phospholipase a from porcine pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta**, 159, 103-117, 1968.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **The Journal of Biological Chemistry**. 269, p. 13057-13060, 1994.

DELGADILLO, J.A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. **Small Rum. Res.**, v.9, p.47-59, 1992.

DOUARD, V., GASSAMA-DIAGNE, A., HERMIER, D., BLESBOIS, E. Activity of phospholipases A and lysophospholipase in turkey semen and oviducal fluid. **Poult Sci.** vol. 83, p. 1385-1393, 2004.



ELOY, A.M.X. **Parâmetros andrológicos em caprinos (*Capra hircus* L.) da raça Anglo-nubiana de diferentes idades e pesos corporais.** 1984. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1984.

FREITAS, V.J.F.; NUNES, J.F. Parâmetros andrológicos e seminais de carneiros deslanados criados na região litorânea do Nordeste Brasileiro em estação seca e chuvosa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.16, n.4, p. 95 – 104, 1992.

FRY, M.R., GHOSH, S.S., EAST, J.M., FRANSON, R.C. Role of human sperm phospholipase A₂ in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A₂ activity on membrane perturbations and oocyte penetration. **Biology of Reproduction**. 47, p. 751-759, 1992.

GALLOWAY, D.B. Fatores que alteram a fertilidade bovina. In: COLÉGIO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL, 1979, Belo Horizonte, 1979 p.209 – 256.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J. de F. Biotécnicas aplicadas a reprodução animal: Inseminação artificial em caprinos. São Paulo Ed. Varela, 2002, p.111 – 126.

GONZALES, C.I.M. **Características biológicas e bioquímicas do sêmen ovino em diferentes tempos de incubação a + 37°C.** 1984. 62f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1984.

HARA, S. KUDO, I., MATSUTA, K., MIYAMOTO, T., INOUE, K. Amino acid composition and NH₂-terminal amino acid sequence of human phospholipase A₂ purified from rheumatoid synovial fluid. **The Journal of Biochemistry** 104, p. 326-328, 1988.



HIROE, K.; TOMISUKA, Y.W.; MASSKI, J. Biochemical studies on the semen of domestic animals: On the chemical composition of seminal plasma of goats. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.6, n.1, p. 28 – 31, 1960

IBARRA, M.C.B.; NAVARIDAS, A.S. Variaciones estacionales de los niveles de frutosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de moruecos de raza Manchega. **Investigación Agraria Producción y Sanidad Animales**. v.7, n. 3. p. 235 – 240, 1992.

IRITANI, A., NISHIKAWA, Y. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen: IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. **Journal Animal Reproduction**, v. 8, n.1, p. 113-117, 1963.

IRITANI, A., NISHIKAWA, Y. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. II. Properties of the coagulating factor and influential condition for coagulation. In: SILVER JUBILE LAB. ANIM. HUSBANDRY KYOTO UNIVERSITY. 1961, Kyoto. **Proc...Kyoto**: 1961. p. 97-104.

LAEMMLI, U.K - "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". **Nature 227** (5259): 680–685, 1970

LOUBSER, P.G., VAN NIEKERK, C.H. Seasonal changes in sexual activity and semen quality in the Angora ram. 2. Semen volume, quality and freezability. **South African Journal of Animal Science**, 13, p. 161-163, 1983.

MACHADO, R.; PINHEIRO, R.R.; SIMPLICIO, A.A. Relação entre componentes bioquímicos do sêmen e do plasma seminal de caprinos. In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999, Porto Alegre, v.36, 1999, p.156.

MUKHERJEE, A.B., MIELE, L., PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. **Biochemical Pharmacology**, 48, p. 1-10, 1994.



NUNES, J.F. **Fisiologia sexual do macho caprino**. Sobral: Embrapa – CNPC. Novembro, 1982. 41p. (Circular técnico nº 5).

OLIVEIRA, T.C. **Mudanças Conformacionais Envolvidas na Ativação Interfacial de Fosfolipases A₂ – Uma Análise Computacional** - 2006 – 105p. – Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006 – Rio Grande do Sul

PEEL, M. C., FINLAYSON, B. L. AND MCMAHON, T. A. Updated world map of the Koppen – Geiger climate classification. **Hydrol. Earth Syst. Sci.** 11, p. 1633–1644, 2007

PELLETIER, J.; CHEMINEAU, P.; DELGADILLO, J.A. Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND AI, 11., 1988, Dublin. *Proceedings...* Dublin, 1988. v.5, p.211-219.

PELLICER-RUBIO, M.T., COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. **Journal of Reproduction and Fertility**, 112, p. 95-105, 1998.

PELLICER-RUBIO, M. T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1023-1031, 1997.

PINHEIRO, R.R.; MACHADO, R.; SIMPLICIO, A.A. Parâmetros bioquímicos do plasma seminal de três tipos raciais de caprinos do Nordeste do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Fortaleza/CE, Palestras, 1996a,b, p. 416 – 18.



RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen hawed spermatozoa of the Angora goat.

Australian Journal of Biological Science, v. 35, n. 3, p. 305-312, 1982.

RITAR, A. J., SALAMON, S. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. **Small Ruminant Research**, v. 4, p. 29-37, 1991.

RODRIGUES, L.F. DE S. **Efeito do método de colheita sobre os aspectos físicos, morfológicos e bioquímicos de sêmen de caprinos mestiços e ovinos deslanados da raça Santa Inês criados no estado do Ceará**. 1997, 67f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1997.

ROLDAN, E.R.S., FRAGIO, C. Phospholipase A₂ activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 13962-13970, 1993.

ROY, A. Egg-yolk coagulation in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature** v.179, p. 318-319, 1957.

SAFFRAN, M., DENSTEDT, O.F. A rapid method for the determination of acid citric. **Journal Biology Chemical**, v.175, n.10, p.849-55, 1948.

SANTANA, A.F.; COSTA,G.B. Comparação dos níveis de frutose no plasma seminal de ovinos deslanados no nordeste do Brasil. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária – UFBA**. Salvador. v.19, n.1, p. 21, 1998c.

SCOTT, D.L., SIGLER, P.B. **Adv. Protein Chem.** 45, 53-88, 1994

SELIWANOFF, T. Notiz über eine Fruchtzuckerreaction

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, v. 20, p. 181-182, 1887.



SHAMSUDDIN, M., AMIRI, Y., BHUIYAN, M.M.U. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods.

Reproduction in Domestic Animals, v. 35, p. 53-57, 2000.

SHARP, J.D., WHITE, D.L., CHIOU, X.G., GOODSON, T., GAMBOA, G.C., MCLURE, D., SIMPLICIO, A.A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1989, Belo Horizonte, Palestras. Belo Horizonte: v.8, 1989, p. 171 – 77.

SOUBEYRAND, S; KHADIR, A.; BRINDLE Y.; MANJUNATH P. Purification of a novel phospholipase A₂ from bovine seminal plasma. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, p. 222-227, 1997.

STRZESEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIAK, A. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, v.29, p.35 – 52, 1992.

TAKAYAMA, K., ILARA, S., KUDO, I., INOUE, K. Detection of 14-kDa group II phospholipase A₂ in human seminal plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 178, p. 1505-1511, 1991.

TULI R.K., HOLTZ W. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. **Theriogenology**, v. 43, 1359-1363, 1995.

TUTIDA, L.; BARBOSA, O. R.; MARTINS, E. N.; MACEDO, F. A. F.; MORAES, G. V. Influência das estações do ano na concentração de ácido cítrico e de frutose no sêmen de carneiros. **Acta Scientiarum**, v. 21, p. 607-612, 1999.

UPRETI, G.C., HALL, E.L., KOPPENS, D., OLIVER, J.E., VISHWANATH, R. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 107-121, 1999.



VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W., **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1264 p.

WURL, M., KUNZE, H. Purification and properties of phospholipase A₂ from human seminal plasma. **Biochim Biophys Acta**, v. 834, p. 411-418, 1985.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. **in The Physiology of Reproduction** (Knobil, E. & Neill, J., eds.), vol. 1, p. 135-186, 1988, Raven Press, New York

ZAIA D. A. M.; ZAIA C. T. B. V.; LICHTIG J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, vol.21, n.6, São Paulo, Nov./Dec. 1998.