

ENZIMAS NO TESTÍCULO DE RATOS EM ALGUMAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

HELION PÓVOA JR.*
LÍGIA FERNANDES*
NEUSA MARCONDES*
MARIA MARFISA AGUIAR VICENTE*

Dosou-se a atividade da GOT, GPT e ceruloplasmina no testículo de ratos normais (a atividade testicular destas enzimas é relativamente baixa) e injetados com cloreto de cádmio (que lesa o testículo), assim como em animais com este órgão lesado e que se administrou testosterona, estradiol, progesterona e gonadotrofina coriônica. Podemos observar alterações significativas das enzimas por ação destes diferentes hormônios.

Infelizmente, como pouco se sabe sobre a função destas enzimas neste órgão, torna-se difícil interpretar os nossos achados.

A ceruloplasmina é uma proteína que foi isolada do plasma sanguíneo em 1948 (King, 1965). Seu peso molecular é de 150000 contendo 8 átomos de cobre por molécula (0,32%). Sua função é desconhecida, assim como seus substratos naturais. Encontra-se presente no fígado e rim e mais recentemente foi descrita na supra-renal (Ferreira et al., 1970, e Póvoa Jr., Souza & Spuza, 1974). A administração de estrogênios aumenta a ceruloplasmina em indivíduos normais, enquanto o ACTH a diminui (Póvoa Jr. et al., 1973b). É uma oxidase muito ativa para inúmeros substratos como a adrenalina, serotonina e aminas sintéticas (King, 1965). A ceruloplasmina foi estudada no sêmen, tendo sido encontrados valores baixos para esta enzima. Não obstante, indivíduos azoospermicos possuem níveis extremamente diminuídos da mesma, o que faz pressupor grande importância fisiológica para esta proteína (Abreu et al., 1966).

As transaminases são enzimas que se encontram amplamente difundidas nos tecidos animais e vegetais. O fosfato de piridoxal é o seu grupo ativo (Wroblewski, 1958). Encontram-se abundantemente no fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, pulmão e rim (Póvoa Jr. et al., 1973). Também, podemos observar que a supra-renal é muito rica em transaminase glutâmico oxalacética (GOT) e transaminase glutâmico pirúvica (GPT) (Ferreira et al., 1970 e Póvoa Jr. et al., 1974).

O estudo da composição enzimática do líquido seminal tem sido exaustivamente realizado nos últimos anos (Mann, 1964). Em algumas destas enzimas observamos uma correlação positiva entre número de espermatozoides e a atividade dos mesmos. Indivíduos normospermicos possuem níveis elevados no sêmen, enquanto em oligospermicos caem significativamente. Isto ocorre com a transaminase glutâmico oxalacética (GOT) (Póvoa Jr. & Villela, 1960 e Póvoa Jr. 1964), ceruloplasmina (Abreu et al., 1966) aldolase

*Instituto Oswaldo Cruz, Caixa Postal 926, 20000 – Rio de Janeiro, Brasil.

Recebido para publicação em 20 de outubro de 1976.

e desidrogenase láctica (Póvoa Jr. 1966). Com a transaminase glutâmico pirúvica (GTP), não observamos o mesmo, embora se encontre abundantemente neste líquido (Póvoa Jr., 1964).

Encontramos poucos trabalhos concernentes ao estudo da composição enzimática do testículo. Em alguns casos, apenas o estudo histoquímico foi realizado.

É o que ocorre por exemplo nos casos de desidrogenase láctica e glicose 6 fosfato desidrogenase. Ambas diminuem no epitélio o germinativo após a injeção de estriol, elevando-se contudo a níveis acima do normal após a ministração de gonadotrofina sérica ou coriônica (Meyer, 1968). A desidrogenase láctica apresenta uma intensidade de coloração, paralela à espermatogênese, aumentando sua concentração proporcionalmente ao gradiente da onda espermatogênica (Roussel & Stalcup, 1968). Também a desidrogenase succínica foi descrita no testículo do rato (Peyre, Joffre & Debords, 1968).

O cloreto de cádmio conquanto seja pouco tóxico, quando ministrado por via oral (Moekawa et al., 1968), provoca necrose dos túbulos seminíferos de ratos; o mesmo ocorre após uma única injeção de 1 mg por via subcutânea. Após 7 – 14 dias, aparece uma destruição irreversível, que parece dever-se à lesão vascular primitiva (Yoshikawa, 1969, Joffre & Ravault, 1970, Knorre, 1968 e Takkar et al., 1968). Esta lesão pode ser impedida se for injetado previamente selênio ou zinco (Gunn, Goule & Anderson, 1968). Não se conhece o mecanismo de ação do selênio. Quanto ao zinco, parece ser indispensável à manutenção do epitélio germinativo e a espermatogênese, visto que a dieta pobre neste metal provoca atrofia testicular e diminuição da concentração de zinco nesta glândula (Mann, 1964). O cádmio possivelmente interfere com o zinco por um mecanismo competitivo.

Estudamos a atividade das enzimas no testículo de ratos normais e após injeção subcutânea de cloreto de cádmio (0,5 mg/100g). Também estudamos a ação de diferentes hormônios nos ratos tratados com cloreto de cádmio, determinando-se a atividade enzimática nos testículos de ratos injetados com testosterona, estradiol, progesterona e gonadotrofina coriônica.

Como não encontramos dados na literatura referentes à dosagem destas enzimas (GOT, GPT e ceruloplasmina) no testículo do rato, achamos interessante relatar os nossos valores destas proteínas em ratos normais e em diferentes condições experimentais.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos em nossas experiências um total de 60 ratos Wistar mantidos em dieta hiperprotéica e pesando 250 gramas, aproximadamente.

Foram divididos em 6 grupos:

I – Controle – ratos normais.

II – Cloreto de cádmio – estes animais receberam uma injeção deste sal por via intraperitoneal numa dose de 0,006 mg/g de peso corporal. Após 18 dias os animais eram sacrificados e os testículos retirados, sendo um deles utilizado para estudo bioquímico e o outro para estudo histológico. Para estudo bioquímico, os testículos eram retirados, pesados e triturados com celite em soro fisiológico numa proporção de 1g de tecido para 20ml de líquido, sendo imediatamente congelados os homogeneizados. Em todos, houve destruição total de epitélio germinativo.

III – Condições experimentais semelhantes às do anterior, tendo apenas sido injetada testosterona (0,1mg) em dias alternados (via subcutânea) até o sacrifício do animal.

IV – Condições experimentais semelhantes às do grupo II, tendo sido injetado estradiol (0,5mg) em dias alternados (via subcutânea) até o sacrifício do animal.

V – Condições experimentais semelhantes às do grupo II, tendo sido injetada progesterona (2,5mg) em dias alternados (via subcutânea) até o sacrifício do animal.

VI – Condições experimentais semelhantes às do grupo II, tendo sido injetada gonadotrofina coriônica (10 UI) em dias alternados (via subcutânea) até o sacrifício do animal.

As transaminases foram dosadas segundo o método de Reitman & Frankel, 1957 e expressas em un/g de tecido. A ceruloplasmina era determinada segundo Ravin, 1961, após prévia incubação a 60°C por 1 hora para destruir substâncias que interferem na atividade desta enzima. Como se sabe a ceruloplasmina é termo-estável (King, 1965). Os resultados de ceruloplasmina foram representados em mg/g de tecido.

RESULTADOS

Acham-se expressos na tabela 1. Analisando-se a mesma verificamos que:

1) Existe ceruloplasmina no testículo normal embora sua atividade seja bastante pequena.

2) Existe GOT e GPT nos testículos normais em atividade reduzida, quando comparada com outros tecidos.

3) A atividade da ceruloplasmina aumentou significativamente no testículo, após a lesão pelo cloreto de cádmio. A gonadotrofina coriônica e a testosterona baixaram significativamente a atividade da enzima testicular, enquanto o estradiol elevou-a.

4) A atividade da GOT baixou significativamente no testículo de animais lesados com cloreto de cádmio. Todas as substâncias hormonais injetadas (testosterona, estradiol, progesterona e gonadotrofina coriônica) aumentaram significativamente a enzima.

5) Também houve um decréscimo significativo da atividade de GPT, após lesão pelo cádmio. As substâncias hormonais injetadas provocaram um aumento significativo desta atividade, exceção feita à progesterona que baixou acentuadamente a GPT.

DISCUSSÃO

O cloreto de cádmio como se sabe lesa o epitélio germinativo testicular, tendo surgido ultimamente diversos trabalhos (Gunn et al., 1968, Jofre & Ravault, 1970, Knorre, 1968, Moekawa et al., 1968, Takkar et al., 1968 e Yoshikawa, 1969) sobre o mecanismo de ação desta substância e as alterações químicas que a mesma provoca.

Estudamos a composição enzimática do testículo, já que não encontramos dados concernentes à atividade de ceruloplasmina, GOT e GPT neste órgão. Pudemos observar que o testículo normal é muito pobre em ceruloplasmina (cerca de 4 vezes mais pobre que a supra-renal, que por sua vez contém uma atividade significativamente menor que o rim e fígado, órgãos comprovadamente ricos nesta enzima).

TABELA 1

Enzimas no Testículo de Ratos em algumas Condições Experimentais

| | <i>Grupo I</i> § | <i>Grupo II</i> § | <i>Grupo III</i> § | <i>Grupo IV</i> § | <i>Grupo V</i> § | <i>Grupo VI</i> § |
|-----------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Peso ratos (g) | 227,7 ± 6,7 | 251,3 ± 4,4 | 258,1 ± 5,1 | 261,2 ± 5,5 | 236,0 ± 3,9 | 249,4 ± 3,9 |
| Variação | (185–266) | (232–275) | (239–285) | (232–274) | (218–262) | (238–269) |
| Peso testíc. (g) | 0,508 ± 0,02 | 0,664 ± 0,04 | 0,641 ± 0,1 | 0,649 ± 0,04 | 0,343 ± 0,04 | 0,226 ± 0,01 |
| Variação | (0,374–0,599) | (0,426–0,911) | (0,251–0,615) | (0,515–0,961) | (0,195–0,330) | (0,161–0,315) |
| GOT (un/g) | 2554 ± 123 | 1275,2 ± 68,0 | 1494,4 ± 125,9 | 2006,4 ± 178,2 | 2203,2 ± 179,0 | 1446,4 ± 174,9 |
| Variação | (1696–3120) | (880–1520) | (720–2112) | (1280–3200) | (1520–3312) | (1120–3000) |
| Signif. es- tativ. | | t = 28,7 p < 0,001 | t = 4,9 p < 0,001 | t = 12,2 p < 0,001 | t = 15,4 p < 0,001 | t = 7,2 p < 0,001 |
| GPT (un/g) | 728,6 ± 71,1 | 164,1 ± 25,3 | 273,6 ± 50,1 | 336,9 ± 46,5 | 112,0 ± 20,8 | 224,6 ± 33,8 |
| Variação | (288–1036) | (72–316) | (72–504) | (72–576) | (43–216) | (43–432) |
| Signif. es- tativ. | | t = 23,6 p < 0,001 | t = 6,2 p < 0,001 | t = 10,3 p < 0,001 | t = 5,0 p < 0,001 | t = 4,5 p < 0,001 |
| Cerulopl. (mg/g) | 0,084 ± 0,011 | 0,575 ± 0,1 | 0,169 ± 0,02 | 0,776 ± 0,05 | 0,587 ± 0,06 | 0,042 ± 0,005 |
| Variação | (0,026–0,131) | (0,393–1,181) | (0,075–0,315) | (0,517–1,106) | (0,262–0,757) | (0,018–0,064) |
| Signif. es- tativ. | | t = 20,4 p < 0,001 | t = 16,2 p < 0,001 | t = 6,1 p < 0,001 | t = 0,4 N. S. | t = 22,2 p < 0,001 |

§ Os valores se acham expressos em média aritmética ± desvio padrão.

N. S. – Não significativo.

A GOT é encontrada em pequena quantidade no testículo (cerca de 10 vezes a do soro sangüíneo do rato e de 20 a 50 vezes menor que no fígado, músculo estriado ou cardíaco, pulmão, rim e supra-renal, os mais ricos nesta atividade enzimática).

A atividade da GPT também é baixa no testículo (728,6 un/g) e que corresponde a cerca de 3 vezes à do soro sangüíneo do rato e de 50 – 80 vezes menor que no fígado, rim e músculo estriado, que são os que contêm a maior atividade enzimática no organismo.

O cloreto de cádmio aumenta acentuadamente a atividade da ceruloplasmina ($t = 20,4$, $p < 0,001$). Já com a GOT e GPT, este metal provoca uma diminuição significativa das atividades enzimáticas (GOT: $t = 28,7$, $p < 0,001$ e GPT: $t = 23,6$, $p < 0,001$).

A testosterona é secretada pelas células de Leydig e provoca alterações histoquímicas no testículo (Mann, 1964). Quanto às alterações bioquímicas estudadas, pudemos observar uma elevação significativa da atividade da GOT ($t = 4,9$, $p < 0,001$) e GPT ($t = 6,2$, $p < 0,001$), o oposto ocorrendo com a ceruloplasmina cuja atividade decresceu acentuadamente ($t = 16,2$, $p < 0,001$).

O estradiol é secretado possivelmente pelas células de Leydig, embora alguns admitam que provavelmente as células do epitélio germinativo o secretam (Williams, 1974). Provoca uma diminuição na desidrogenase láctica testicular (estudo histoquímico) (Meyer, 1968). Sua função no homem ainda é desconhecida, talvez participando do feedback testículo-hipotálamo-adeno-hipófise (Williams, 1974). Todas as enzimas estudadas tiveram sua atividade no testículo aumentadas acentuadamente após a injeção de estríol: GOT ($t = 12,2$, $p < 0,001$), GPT ($t = 10,3$, $p < 0,001$) e ceruloplasmina ($t = 6,1$, $p < 0,001$).

A progesterona no homem é secretada pelo córtex da supra-renal provocando alterações ainda pouco conhecidas no testículo (Williams, 1974). Aumenta significativamente a atividade da GOT ($t = 15,4$, $p < 0,001$) e diminui a da GPT ($t = 5,0$, $p < 0,001$). Não houve alteração significativa no que concerne a ceruloplasmina.

A GC (gonadotrofina coriônica) possui uma ação estimulante sobre as células de Leydig. Aumenta significativamente a atividade da GOT ($t = 7,2$, $p < 0,001$) e da GPT ($t = 4,5$, $p < 0,001$), baixando acentuadamente a da ceruloplasmina ($t = 22,2$, $p < 0,001$).

SUMMARY

GOT, GPT and ceruloplasmin activities have been determined in testicle of normal rats. Low activities were found for every enzyme. In animals injected with cadmium chloride, there were significant alterations in enzyme activities.

Accentuated alterations in enzyme activities were also found in animals with destroyed testicles after injection of several hormones (testosterone, estradiol, progesterone and chorionic gonadotrophin).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. A., ABREU, R. R. & PÓVOA JR., H., 1966 – “Ceruloplasmin in human semen” – *Experientia* 22, 507.
- FERREIRA, A. L. M., PESSANHA, F. S., SOARES, J. A. S., OLIVA, J. R., SOUZA, M. C. P., RESENDE, M. T. L. & PÓVOA JR., H., 1970 – “Enzimas na suprarenal de ratos em algumas condições experimentais” – *Arq. Bras. Endocri. Metab.* 19 :97.
- GUNN, S. A., GOULE, T. C. & ANDERSON, W. A., 1968 – “Mechanism of zinc cysteine and selenium protection against cadmium induced vascular injury to mouse testis of the rats” – *J. Repr. Fertil.* 15 (1) :65-70.
- JOFFRE, M. & RAVAUULT, J. P., 1970 – “Le determinisme hormonal de la régénération du tissu intersticiel testiculaire chez des rats soumis à l'action des sels de cadmium” – *Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie* 164(11) :2361.
- KING, J., 1965 – “Practical Clinical Enzymology” – D. Van Nostrand Comp. Ltd.
- KNORRE, D., 1968 – “Enzymic studies of rat tests during the thirty days after cadmium induced necrosis” – *Virchows Arch.* 345 (3) :255-63 apud *Chemical Abstr.* 1969 (70) 45518 m.
- MANN, T., 1964 – “The biochemistry of semen and of the male reproductive tract” – London: Methuen & Co. Ltd., 2nd. edition.
- MEYER, W., 1968 – “Histochemical behavior of some dehydrogenases in the Leydig cells of the rat testis during simultaneous estrone and gonadotrophin treatment” – *Acta Histochem.* 29(2) :376-90.
- MOEKAWA, K., TSENCE, Y., IMAMURU, K. & KONE, J., 1968 – “Injurious effect of orally administered cadmium on the testis of the rat” – *Dobetsugaky Zasshi* 77 :52-8, apud *Chem. Abstr.* 1968 (69) 85090.
- PEYRE, A., JOFFRE, M. & DEBORDS, E., 1968 – “L'activité succino deshydrogenasique du plexus pampiniforme du testicule du rat après administration de cadmium” – *Comptes Rendus des Seances de Laboratoire de Biologie* 162 (12) :2200.
- PÓVOA JR., H. & VILLELA, G. G., 1960 – “Transaminase in seminal plasma of man” – *Experientia* 16 (5) :199.
- PÓVOA JR., H., 1964 – “Transaminase in human semen” – *Investigat. Urology* 2(1) :1-6.
- PÓVOA JR., H., 1966 – “Contribuição ao estudo de enzimas no esperma humano” – *Revista da Associação Médica Brasileira* vol. 12, (10) :434-38.
- PÓVOA JR., H., ALMEIDA, P. C. C., ALVES, O. O. & MARCONDES N., 1973 a. – “Termoativação da Transaminase Glutâmico Oxaloacética” – *Memórias de Instituto Oswaldo Cruz*, tomo 71, fasc. 4 :419-24.
- PÓVOA JR., H., SOUZA, A. SARGENTELLI, L. & TEIXEIRA, L. C., 1973 b. – “Ceruloplasmina na obesidade e acromegalia” *Rev. Bras. Anal. Clin.* vol. 5 nº 3 :7-9.

- PÓVOA JR., H., SOUZA, A. C. & SOUZA, E. N. C.; 1974 – “ACTH e enzimas na suprarrenal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* tomo 72, fasc. 1/2, 1-4.
- RAVIN, H. A., 1961 – “An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin” – *J. Lab. Clin. Méd.* 58 :161.
- REITMAN, S. & FRANKEL, S., 1957 – “Glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases in serum” – *Amer. J. Clin. Path.* 28 :56.
- ROUSSEL, J. P., STALUP, O. T.; 1968 – “A cytochemical comparison between the activity of the lactydehydrogenase diphosphopyridine nucleotide diaphorase system in the testis and epididymis compares to some semen characteristics” – *Intern. J. Fertility* 13 (2), 142-53.
- TAKKAR, G. L., CHOWDHURY, S. R., KAR, A. B. & KAMBOJ, J., 1968 – “Calcification of the seminiferous tubules of the rat testis after administration” – *Acta Biol. Méd. Germ.* 20 (1) :97-102.
- YOSHIKAWA, H., 1969 – “Preventive effect of pretreatment with a small dose of metals. Effect on cadmium induced testicular damage in mice” – *Igaku to Sebutsu-gaku* 78 (1) :19-22. apud Chem Abstr. 37201 h (71) 1969.
- WILLIAMS, R. H., 1974 – Textbook of Endocrinology – W. B. Saunders Co. – Philadelphia.
- WROBLESWSKI, F., 1958 – “The clinical significance of alterations in transaminase activities of serum and other body fluids” from *Advances of Clinical Biochemistry* – edited by H. Sobotka and C. P. Stewart vol. I, pp. 313. Academic Press Inc.