

Sej: 27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Ciencias



**CUANTIACION Y CARACTERIZACION DE PROTEO-
GLICANOS SULFATADOS EN EL PLASMA SEMINAL
HUMANO NORMAL Y PATOLOGICO.**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G A

P r e s e n t a:

María Guadalupe Campos Lara

México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Los glicosaminoglicanos son polímeros rectos compuestos de unidades disacáridas repetitivas consistentes en una hexosamina N-acetilada, con excepción del heparán sulfato y la heparina donde la hexosamina también puede encontrarse N-sulfatada, y un ácido hexurónico, el cual se encuentra desplazado por la galactosa en el queratán sulfato. En los glicosaminoglicanos, exceptuando al ácido hialurónico, los grupos hexosaminil están esterificados con grupos sulfatos ya sea en posición 4 o 6. Las unidades disacáridas repetitivas se unen por medio de un enlace hexosaminídico al grupo hexuronídico del siguiente disacárido, de tal manera que las cadenas de carbohidratos consisten en unidades hexuronídicas y hexosaminídicas alternadas (1).

La presencia de grupos carboxilos y/o sulfatos en cada unidad disacárida confiere a las cadenas un fuerte carácter polianiónico, carácter que determina en gran parte sus propiedades físicas e influye considerablemente en su interacción con otras moléculas. La densidad de carga varía desde uno por disacárido, como en el ácido hialurónico, hasta un máximo de cuatro en la heparina que puede contener hasta tres grupos sulfatos

y un grupo carboxilo en cada disacárido (2).

De la evidencia estructural y de las investigaciones acerca de su biosíntesis, se deduce que normalmente los glicosaminoglicanos no se presentan in vivo como cadenas polisacáridas libres, sino como PROTEOGLICANOS en los que muchas cadenas de polisacáridos están unidas a una molécula de proteína por medio de enlaces covalentes específicos, dando lugar a moléculas complejas de multicadenas que constituyen polielectrolitos altamente cargados y de gran peso molecular. De hecho, la mayoría de los conocimientos actuales acerca de la estructura, -- distribución, biosíntesis y degradación de los glicosaminoglicanos se ha obtenido con péptido-polisacáridos (2, 3).

El nombre de proteoglicano viene a remplazar los términos como complejo proteína-polisacárido y condromucoproteína, que se han aplicado a varias preparaciones de glicosaminoglicano y proteína en formas mal definidas de asociación covalente y no covalente (2). Con la posible excepción del ácido hialurónico, que puede obtenerse de la mayoría de los tejidos y fluidos en alta proporción sin necesidad de proteólisis y en el cual la existencia de un enlace estable a la proteína es aún

cuestionable, la evidencia conclusiva es que los glicosaminoglicanos existen covalentemente ligados a una molécula de -- proteína, dando lugar a la introducción del termino proteo-- glicanos para nombrar a esta familia de moléculas en las que proteína y glicosaminoglicanos están unidos por enlaces covalentes (1, 2).

El tipo más común de enlace covalente carbohidrato-proteína encontrado en los glicosaminoglicanos es un enlace O-glucosídico entre el hidroxilo de la serina y la xilosa de la unidad trisacárida típica galactosil-galactosil-xilosa. También se ha establecido por medio de hidrólisis diferencial que la región de enlace tiene la secuencia O-serina-xilosa-galactosa-ácido glucurónico. Esta secuencia constituye la región de - enlace preponderante, aunque no la única, de los glicosaminoglicanos, con excepción del queratán sulfato (2,3).

Los glicosaminoglicanos presentan un amplio patrón de distribución en los tejidos de los mamíferos y de los vertebrados en general (2, 4). Se les encuentra principalmente en el tejido conectivo constituyendo la sustancia intersticial extracelular y como componentes estructurales principales de las cubiertas celulares. Aunque se localizan en mayor proporción

en cartilago, los glicosaminoglicanos están también presentes en hueso, piel, córnea, humor vítreo, paredes de vasos sanguíneos de varias tallas y válvulas cardiacas (5).

Asimismo, los glicosaminoglicanos se han extraído de diversos órganos - cerebro, ileon, músculo, bazo, pulmones, estómago, corazón, hígado, riñón y útero - encontrándose que en cada uno tiene una composición característica, difiriendo unos de otros en el tipo, la cantidad relativa y el peso molecular. Paralelamente se ha demostrado que el mismo tejido de diferentes mamíferos presenta los mismos tipos y proporciones de glicosaminoglicanos, aunque con diferentes pesos moleculares (4, 6, 7).

La distribución de los glicosaminoglicanos no se restringe solamente a los tejidos, también se les ha encontrado en el suero sanguíneo, líquido sinovial, líquido folicular, líquido amniótico y orina (8, 9, 10).

La información acerca de la función biológica de los glicosaminoglicanos y de sus complejos proteicos es escasa (1). Dado el carácter polianiónico de los glicosaminoglicanos y los proteoglicanos, estos biopolímeros interaccionan con diversidad

de moléculas tales como iones inorgánicos, alquilaminas, alcaloides, aminas biogénicas y proteínas (2).

Como componentes estructurales básicos de la matriz intercelular del tejido conectivo, los glicosaminoglicanos forman redes ramificadas que dan fuerza y sostén a los tejidos; pueden funcionar como barreras selectivas para la difusión de iones inorgánicos y moléculas cargadas entre células y capilares. Paralelamente se ha postulado que los glicosaminoglicanos podrían desempeñar un importante papel en la adhesión y agregación celular actuando como agentes cementantes y conectando las células en agregados definidos (5, 11). Los glicosaminoglicanos también interaccionan con otras proteínas diferentes a las que constituyen estructuralmente el tejido conectivo, como las lipoproteínas plasmáticas. Esta interacción depende principalmente de las fuerzas electrostáticas y se incrementan con la densidad de carga de los glicosaminoglicanos. Se cree que los complejos compuestos formados por las lipoproteínas plasmáticas y los glicosaminoglicanos presentes en las paredes arteriales constituyen un factor importante en el desarrollo de la arterioesclerosis (2).

Otro tipo de interacción de los glicosaminoglicanos con proteínas ha sido establecido; en él, la heparina induce una alteración en la conformación de la antitrombina III, que consiste en el decremento de la conformación beta con un incremento compensatorio del enrollamiento azaroso (12).

Finalmente, los glicosaminoglicanos desarrollan un importante papel clínico. Prácticamente cada glicosaminoglicano es responsable de uno o varios tipos de las enfermedades genéticas conocidas como mucopolisacaridosis. Estas enfermedades se caracterizan por la acumulación de glicosaminoglicanos incompletamente degradados, debido a una marcada disminución de la actividad de las hidrolasas específicas requeridas para su degradación normal; tal acumulación causa una distorsión de muchos tejidos con los consecuentes cambios somáticos, así como retraso mental (13, 14).

En el campo de la Biología de la Reproducción, los glicosaminoglicanos parecen jugar un importante papel en el proceso de la fertilización. Así lo demuestra la secreción de estos compuestos por las células de la granulosa, de donde pasan a formar parte del líquido folicular porcino y, posteriormente, de la

secreción tubaria que estará presente al llevarse a cabo la - fertilización (15, 16). Los proteoglicanos recientemente también han sido encontrados en el líquido folicular de bovinos y del humano (9). De lo anterior se desprende que no es aventurado pensar que los proteoglicanos pudieran desempeñar un papel muy importante en la capacitación y/o la reacción acrosomal del espermatozoide de mamíferos. Recientemente se ha comprobado que la producción in vitro de proteoglicanos por las células de la granulosa de bovino ocurre en respuesta a la - hormona folículo estimulante (17).

Recientes estudios demuestran que los glicosaminoglicanos estimulan la conversión in vitro de proacrosina a acrosina en el jabalí; que los glicosaminoglicanos que producen dicha estimulación no son específicos de especie y órgano, y que podrían funcionar en la regulación de la conversión in vivo de proacrosina a acrosina (18, 19). Este hallazgo es consistente con el hecho de que los proteoglicanos de líquido folicular bovino aumentan la reacción acrosomal en espermatozoides de estos mamíferos (20).

Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la

heparina comercial y los glicosaminoglicanos obtenidos de óvulos de erizo de mar (Toxopneustes roseus) inducen la descondensación del núcleo del espermatozoide humano, fenómeno que es necesario para la fusión de los pronúcleos. Este efecto descondensante inducido por la heparina no sucedió en espermatozoides de toro, conejo y carnero bajo las mismas condiciones experimentales (21, 22).

Además de los cambios inducidos in vitro por los glicosaminoglicanos en los espermatozoides de algunos mamíferos, se sabe también que en estas células acontecen cambios bioquímicos y fisiológicos muy importantes ocasionados por la interacción de los diferentes componentes del plasma seminal, tanto en el momento como después de la eyaculación. Es probable que entre los compuestos responsables de los cambios experimentados por los espermatozoides al contacto con el plasma seminal se encuentren estructuras del tipo de los proteoglicanos y/o glicosaminoglicanos libres.

El semen humano está constituido por dos fases: una líquida - llamada plasma seminal, y otra celular compuesta por los espermatozoides, los cuales generalmente están contaminados con cantidades variables de leucocitos, células epiteliales de --

descamación y granulaciones de origen desconocido. El semen presenta características particulares y puede tener variaciones aun tratándose del mismo individuo. Los dos componentes del semen son diferentes en su origen, composición y función. Los espermatozoides son producidos en el testículo, mientras que el plasma seminal se forma por la contribución de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias del aparato reproductor masculino (23). Las secreciones de estas glándulas no son vertidas al tracto genital masculino simultáneamente, sino que lo hacen de una manera secuencial bien conocida (24).

La formación del plasma seminal se lleva a cabo de la siguiente manera. Primero, son enviadas las secreciones de las glándulas de Cowper y de Littré, cuya combinación constituye un volumen total de 0.2 ml. Se cree que este fluido tiene una función lubricante; muy poco se sabe acerca de su composición bioquímica, habiéndose solamente reportado que es rico en mucoproteínas. La segunda secreción es la prostática que contribuye con aproximadamente 0.5 ml al volumen total del semen; está caracterizada por un alto contenido de fosfatasa ácida y ácido cítrico, así como por la presencia de zinc y de otras

enzimas. La secreción prostática es seguida por los fluidos ricos en espermatozoides del ampulla y del epidídimo. La última y más voluminosa porción de fluido se deriva de las vesículas seminales. El fluido vesicular provee la mayor parte del eyaculado con 2 a 2.5 ml de volumen, y está caracterizado por la presencia de azúcares reductores, particularmente fructosa, y por un alto contenido de prostaglandinas (23, 29).

Tradicionalmente se ha considerado al plasma seminal como el medio natural de transporte de los espermatozoides hacia el tracto reproductor femenino. El plasma seminal es un fluido con gran capacidad amortiguadora que contiene diversos nutrientes para los espermatozoides y mantiene la concentración de éstos entre 50 y 150 millones de células por mililitro en un volumen promedio de 3 ml de eyaculado (23, 30).

Usualmente la valoración de la fertilidad masculina se ha basado en exámenes de la fase celular del semen. Sólo recientemente se han tratado de considerar las características bioquímicas del plasma seminal para valorar la fertilidad en el varón. Por ejemplo, los valores de zinc, ácido cítrico y fosfatasa ácida se han considerado como parámetros específicos de

funcionalidad de la glándula prostática; y las concentraciones de fructosa constituyen el indicativo clínico de funcionalidad de las vesículas seminales. En base a estos estudios se ha logrado establecer que si los patrones de actividad secretora y de composición bioquímica se modifican, esto trae consigo problemas muy serios de fertilidad en el hombre (24).

Estos hallazgos muestran claramente que la importancia del plasma seminal no se reduce simplemente a transportar los espermatozoides. Se ha demostrado que la composición bioquímica del plasma seminal determina en gran parte los cambios de movilidad, sobrevivencia, metabolismo y composición química del espermatozoide (25, 26, 27, 31). También se ha demostrado que la interacción del plasma seminal con el espermatozoide promueve una eficiente penetración de la célula al moco cervical (28).

Los estudios de la composición química del plasma seminal humano normal han revelado una gran complejidad. El plasma seminal contiene varios iones como zinc, calcio, sodio, etc., aminoácidos, lípidos, carbohidratos, lipoproteínas, glicoproteínas, enzimas, etc. Algunos de estos componentes normalmen-

te se encuentran en concentraciones muy elevadas en comparación a las encontradas en otros fluidos corporales. Las funciones de los constituyentes más característicos del plasma seminal son aun desconocidas e incluso es probable que existan otros componentes de relevancia bioquímica que no se han descubierto y que pudieran tener implicaciones directas o alguna relación con los problemas de infertilidad masculina (29, 30).

Habiendo establecido la importancia de los glicosaminoglicanos en algunos eventos de la fertilización, su presencia en diferentes fluidos biológicos y la importancia de los estudios bioquímicos del plasma seminal en la determinación de problemas de infertilidad en el hombre, resulta interesante estudiar la presencia de los glicosaminoglicanos en el plasma seminal de sujetos normales y de pacientes con diferentes problemas de fertilidad, con el objeto de establecer un parámetro bioquímico que pudiera correlacionarse al menos parcialmente con los problemas de infertilidad en el hombre.

MATERIAL

Y

METODOS

1. Muestras biológicas.

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron muestras de semen recién eyaculado por masturbación de sujetos -- normales y fértiles, y de sujetos que acudían a los laboratorios de Andrología del Centro Médico La Raza del Instituto -- Mexicano del Seguro Social por tener problemas de fertilidad. En todos los casos el tiempo de abstinencia sexual previo a la colección de las muestras no fue menor de tres días.

2. Clasificación y manipulación de las muestras de semen humano.

Los criterios utilizados para la clasificación de las muestras de semen humano (32) fueron los siguientes:

NORMOZOOSPERMIA: entre 50 y 150 millones de espermatozoides por mililitro.

OLIGOZOOSPERMIA: menos de 20 millones de espermatozoides por mililitro.

ASTENOZOOSPERMIA: menos del 60% de movilidad de los espermatozoides.

OLIGOASTENOSPERMIA: menos de 20 millones de espermatozoides por mililitro y menos del 60% de movilidad.

AZOOSPERMIA: cero espermatozoides.

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos, para permitir su licuefacción, e inmediatamente después se hicieron las espermatobioscopías correspondientes para su clasificación, estimando los siguientes parámetros: gra-

do de licuefacción, volumen, pH, grado de contaminación celular, porcentaje de movilidad y cantidad de espermatozoides. - Esta valoración se realizó dentro de las primeras dos horas - después de la colección de las muestras.

La presencia de contaminantes se determinó observando tres diferentes campos al microscopio óptico Zeiss. Las muestras que presentaron más de cinco células diferentes de espermatozoides en el campo de observación (500 aumentos) fueron descartadas de las normales.

La movilidad de los espermatozoides fue valorada por simple - apreciación personal en el campo de observación de 500 aumentos y se aceptaron como muestras normales aquellas que tuvieron como mínimo 60% de movilidad progresiva.

La cantidad de espermatozoides se determinó utilizando el método del hematocitómetro (33). Este método consiste en aspirar, con una micropipeta para glóbulos blancos, la suspensión celular de volumen conocido hasta el aforo de 0.5 e inmediatamente después aspirar hasta el aforo de 1.1 la solución fijadora que contiene formaldehído al 1% y citrato de sodio al --

2.9%; se agita vigorosamente la pipeta para homogeneizar la suspensión y se desechan las tres primeras gotas. A continuación se llenan las cámaras de un hematocitómetro Neubauer con la suspensión celular, y se coloca el hematocitómetro dentro de una cámara húmeda durante 10 minutos para que todas las células se sedimenten. Una vez transcurrido el tiempo de sedimentación, se coloca el hematocitómetro en un microscopio óptico en contraste de fases, procediendo a contar los espermatozoides que se encuentran en los cuadros extremos y en el central de la cuadrícula. El número de células de cada cuadro se suma, el resultado se multiplica por 20, factor de la dilución empleada, y finalmente por 50,000, factor de multiplicación correspondiente a los cuadros considerados. De esta manera se obtiene como resultado el número de espermatozoides expresado en millones por mililitro de la suspensión celular original.

Inmediatamente después de haber realizado la valoración de las muestras, el plasma seminal se separó de los espermatozoides por centrifugación durante 15 minutos, a 2200 g, en una centrifuga Sorvall GLC-1, y se guardó en congelación hasta reunir un

volumen adecuado (aproximadamente 20 mililitros) para su procesamiento. El tiempo de congelación no excedió de tres meses, periodo durante el cual, bajo condiciones de oscuridad y aproximadamente a -10°C , el plasma seminal no altera su composición significativamente (34).

3. Obtención de los glicosaminoglicanos de plasma seminal humano normal y patológico.

Material utilizado en la obtención de los proteoglicanos:

- etanol absoluto
- cloroformo-metanol, 2:1, v/v
- etanol-éter, 1:1, v/v
- amortiguador para la digestión enzimática, pH 5.5:
 - . acetato de sodio 0.1 M
 - . cloruro de sodio 0.3 M
 - . ácido tetracético etilendiamino 5 mM
 - . cisteína 5 mM
- ácido tricloroacético al 5 y 8%
- amortiguador para diálisis, pH 5.5:
 - . acetato de sodio 10 mM
 - . cloruro de sodio 0.1 M

- acetato de potasio al 5% en etanol absoluto
- cloruro de cetil piridinio (CPC) al 5%
- cloruro de litio 2 M.

El procedimiento para la obtención de los proteoglicanos se llevó a cabo en cinco fases que se describen a continuación.

A. Desnaturalización del material biológico.

Cada lote de 20 ml de plasma seminal se homogeneizó con 80 ml de etanol. El homogeneizado se incubó en un baño de ebullición durante 15 minutos, se retiró del baño y se dejó enfriar. Una vez frío el material desnaturalizado, se centrifugó durante 15 minutos a 2000 g, en una centrífuga Internacional Universal, modelo UV. El precipitado se resuspendió en etanol al 80% y se volvió a centrifugar (35).

B. Extracción de lípidos.

El material desnaturalizado se resuspendió en cloroformo-metanol, 2:1, v/v, y se dejó a temperatura ambiente durante 18 horas. El extracto lipídico se descartó por filtración, utilizando un filtro de vidrio (Pyrex, ASTM 40-60 C). El material deslipidizado se lavó primero con cloroformo-metanol, 2:1, v/v, luego con etanol-éter, 1:1, v/v, y finalmente con éter -

anhidro, obteniéndose de esta manera un polvo blanco y seco (36).

C. Digestión enzimática.

Se llevó a cabo una digestión enzimática exhaustiva utilizando papaína Difco en proporción de 2 mg de enzima por 100 mg de material deslipidizado, en el amortiguador de acetatos, pH 5.5. La digestión se realizó a 65°C, temperatura a la cual la actividad enzimática es máxima. El sistema de digestión se centrifugó durante 15 minutos a 2000 g, y al sobrenadante, que es el extracto de la digestión enzimática, se añadió ácido tricloroacético a una concentración final del 8%, y permaneció en refrigeración durante 20 minutos; se centrifugó nuevamente, y el residuo de la centrifugación se lavó con ácido tricloroacético al 5%; finalmente, se juntaron los sobrenadantes de los dos lavados con ácido tricloroacético (36).

D. Diálisis y precipitación.

Los sobrenadantes de la digestión enzimática se dializaron contra la solución para diálisis. Al material dializado se adicionaron 3 volúmenes de solución alcohólica de acetato de potasio al 5%, y se mantuvo en reposo durante 72 horas a -10°C.

En estas condiciones se formó un precipitado en el cual se encuentran los glicosaminoglicanos sulfatados. Este precipitado se lavó sucesivamente con etanol, etanol-éter y éter (36).

E. Purificación.

El material obtenido por precipitación en frío se disolvió en agua destilada; se adicionó cloruro de cetil piridinio al 5% para precipitar selectivamente los proteoglicanos. El exceso de CPC se eliminó disolviendo el material en cloruro de litio 2 M y precipitando con etanol frío en tres ocasiones. Finalmente los proteoglicanos obtenidos se lavaron sucesivamente con etanol, etanol-éter y éter (36).

4. Determinación de la composición química de los glicosaminoglicanos.

Para la estimación cuantitativa de los diferentes componentes que estructuran los proteoglicanos, se utilizaron métodos fotolorimétricos mediante el procedimiento de interpolación, usándose un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 21.

Hexosaminas

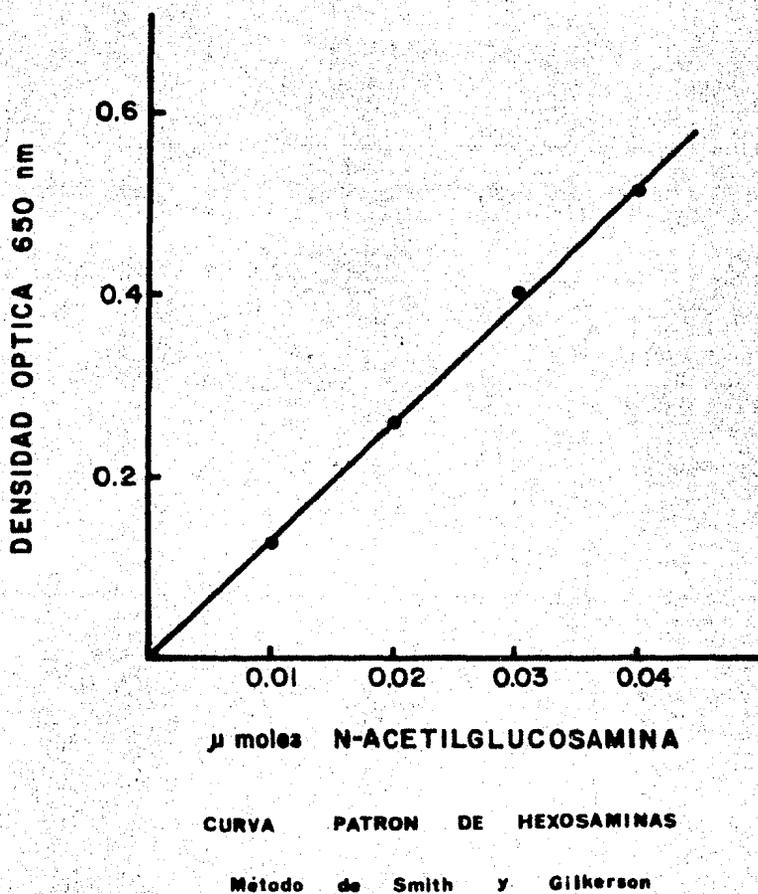
Reactivos:

- solución 10 mM de N-acetil D-glucosamina
- ácido clorhídrico a una concentración final en el sistema de 0.5 M
- nitrito de sodio al 2.5%
- sulfamato de amonio al 12.5%
- hidrocloreuro de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona al 0.25%
- cloruro férrico anhidro al 0.5%.

Método y fundamento.

La determinación de las hexosaminas se realizó utilizando el método de Smith y Gilkerson (37), el cual se basa en la determinación del cromóforo formado por interacción del hidrocloreuro de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona y las anhidrohexosas producidas por la desaminación de las hexosaminas en condiciones de acidez moderada. La intensidad del color del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de las anhidrohexosas formadas, y tiene una longitud de onda de absorción máxima a 650 nm. La figura No. 1 muestra la curva patrón de este método; en esta curva, al igual que en las subsecuentes,

FIGURA No.1



los valores expresan el promedio de 3 determinaciones por duplicado.

Acidos urónicos

Reactivos:

- glucuronolactona al 0.005%
- tetraborato de sodio 0.025 M en ácido sulfúrico
- carbazol al 0.125 % en etanol.

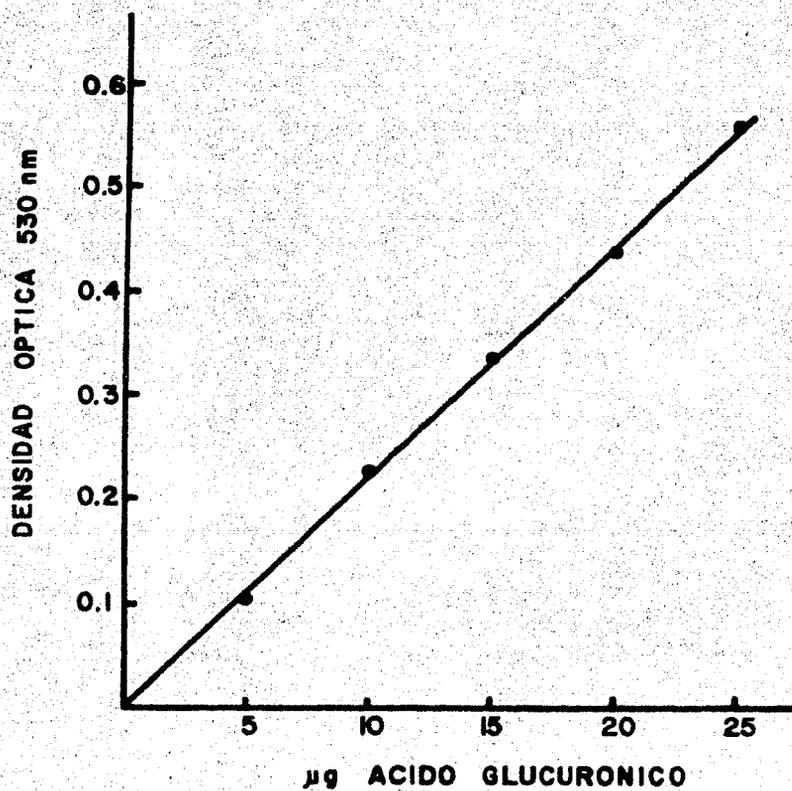
Método y fundamento.

La determinación de ácidos urónicos se realizó de acuerdo al método de Bitter y Muir (38), cuyo fundamento consiste en que los ácidos hexurónicos al ser tratados con un ácido mineral - concentrado forman un producto intermediario que conserva el grupo carboxilo y, que al combinarse con el carbazol, da lugar al cromóforo correspondiente cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de ácidos urónicos y presenta una longitud de onda de absorción máxima a 530 nm. La figura No. 2 muestra la curva patrón de este método.

Sulfato

Reactivos:

FIGURA No.2



CURVA PATRON DE ACIDOS URONICOS

Método de Bitter y Muir

- sulfato de sodio al 0.0147 %
- ácido clorhídrico, ácido nítrico, agua, 1:1:2, v/v/v
- amortiguador de cloruro de bario:
 - . ácido acético 2 M, 10 ml
 - . cloruro de bario 0.005 M, 2 ml
 - . bicarbonato de sodio 0.02 M, 8 mlEstas tres soluciones se mezclaron y aforaron a 100 ml con etanol.
- solución de rodizonato de sodio: a una solución de rodizonato de sodio al 0.025% se añadieron 50 mg de L-ácido ascórbico, agitando hasta una completa disolución que se aforó a 50 ml con etanol.

Método y fundamento.

La determinación del contenido de sulfato se basó en el método de Terho y Hartiala (39), de acuerdo al cual la estimación de sulfato presente en glicosaminoglicanos se realiza con rodizonato de sodio, reactivo que con el ión bario forma un compuesto colorido cuya longitud de onda de absorción máxima se presenta a 520 nm; este compuesto en presencia de sulfato inorgánico da lugar a la formación de sulfato de bario, disminuyendo la intensidad del color; de esta disminución se calcula la can-

tividad de sulfato presente. La figura No. 3 muestra la curva patrón de este método.

Proteínas

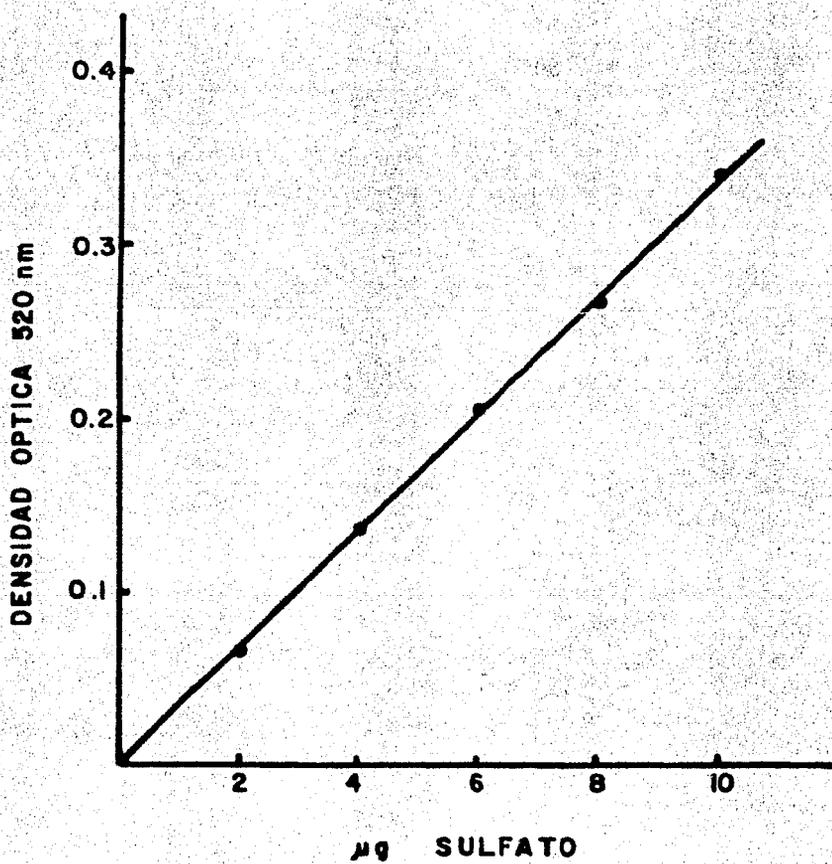
Reactivos:

- albúmina al 0.05 %
 - solución cupro-alcalina que se preparó mezclando 50 ml de solución de carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0.1 N, con 1 ml de solución de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5 % en tartrato de sodio y potasio al 1 %.
 - reactivo de Folin, agua, 1:2, v/v
 - amortiguador de carbonatos:
 - . carbonato de sodio 0.2 M, 30 ml
 - . bicarbonato de sodio 0.2 M, 20 ml
- Estas dos soluciones se mezclaron y se ajustó el pH a 10.1.

Método y fundamento.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (40), cuyo principio se basa en que las proteínas tratadas con una solución alcalina de cobre forman un complejo cobre-proteína que reduce el reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin) originándose un cromóforo cuya intensidad de color es

FIGURA No.3



CURVA PATRON DE SULFATO

Método de Terho y Harilala

directamente proporcional a la concentración de proteínas y absorbe a 750 nm. La figura No. 4 muestra la curva patrón de este método.

Ácidos siálicos

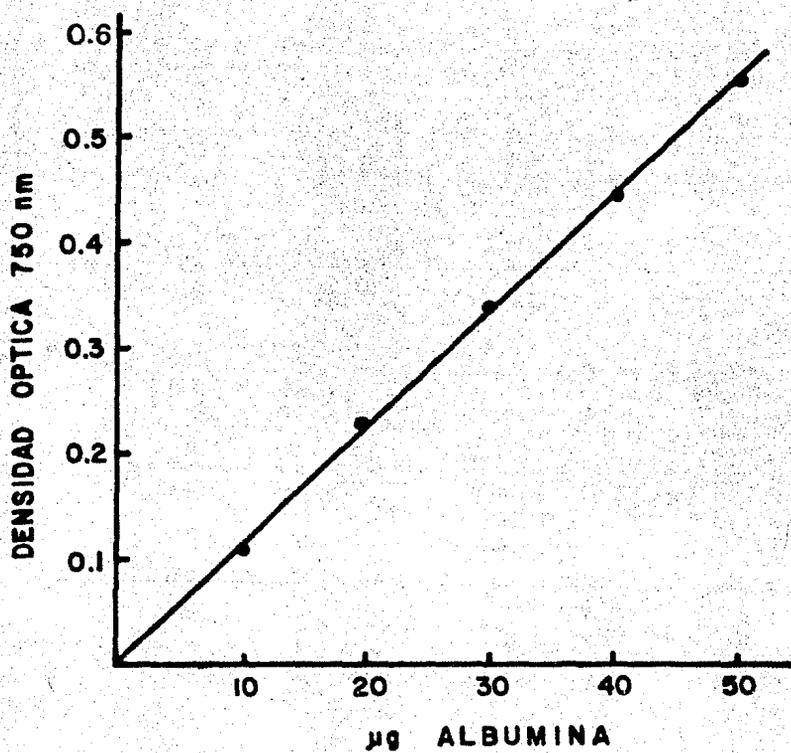
Reactivos:

- ácido N-acetil neuramínico al 0.03 %
- ácido sulfúrico 0.1 N
- metaperiodato de sodio 0.2 M en ácido fosfórico 9 M
- arsenito de sodio al 10 % en sulfato de sodio 0.5 M
- ácido tiobarbitúrico al 0.6 % en sulfato de sodio 0.5 M
- ciclohexanona.

Método y fundamento.

La determinación de ácidos siálicos se efectuó utilizando el método de Warren (41), el cual se basa en la oxidación del ácido neuramínico por medio de periodato, oxidación que resulta en la formación del ácido β -formilpirúvico que se acopla al ácido tiobarbitúrico, formando un cromóforo cuya intensidad de color es directamente proporcional al contenido de ácido neuramínico y cuya longitud de onda de absorción máxima se presen-

FIGURA No.4



CURVA PATRON DE PROTEINAS

Método de Lowry

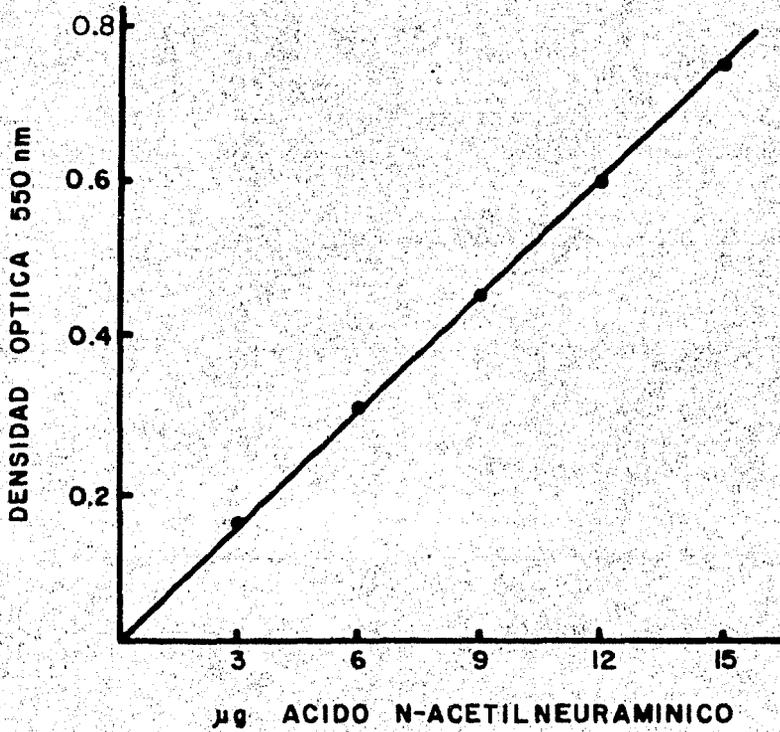
ta a 550 nm. La figura No. 5 muestra la curva patrón de este método.

5. Caracterización de los proteoglicanos.

Para llevar a cabo la caracterización de los proteoglicanos - extraídos del plasma seminal humano normal y patológico, se realizó una electroforesis en tiras de acetato de celulosa - con glicosaminoglicanos estándares y los proteoglicanos obtenidos del plasma seminal. Los estándares utilizados fueron condroitín 4-sulfato, condroitín 6-sulfato y dermatán sulfato a una concentración de 10 mg/ml de agua, mientras que los proteoglicanos obtenidos se prepararon a una concentración de -- 6 mg/100 ul de agua. Se utilizaron también mezclas de los estándares antes mencionados, cuya composición química se encuentra descrita en la Tabla No. 1.

La electroforesis se llevó a cabo aplicando las muestras de - glicosaminoglicanos, con un aplicador Beckman, en una tira de acetato de celulosa (Microzone Plus, Beckman, 57 x 144 mm) -- previamente sumergida en el amortiguador de ácido clorhídrico 0.2 N, pH 2.0 ajustado con piridina (42). El tiempo de corrida fue de 120 minutos, con voltaje constante de 100 voltios, -

FIGURA No.5



CURVA PATRON DE ACIDOS SIALICOS

Método de Warren

corriente variable inicial de 8 mA que al final de la corrida llegó a 16 mA, y temperatura ambiente. Al término del tiempo de corrida la tira de acetato de celulosa se sumergió en una solución de azul de toluidina al 0.2 % en ácido acético al -- 2 % durante 5 minutos, y se decoloró con ácido acético al 2 % durante 5 minutos en dos ocasiones (16).

TABLA No. 1 COMPOSICION DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS (2)

	Unidad disacárida repetitiva		Sulfato	Otros azúcares, incluyendo los de la región de enlace
	Acido hexurónico	Hexosamina		
Acido hialurónico	D-ácido glucurónico	D-glucosamina		
Condroitín 4-sulfato	D-ácido glucurónico	D-galactosamina	O-sulfato	D-xilosa, D-galactosa
Condroitín 6-sulfato	D-ácido glucurónico	D-galactosamina	O-sulfato	D-xilosa, D-galactosa
Dermatán sulfato	L-ácido idurónico o D-ácido glucurónico	D-galactosamina	O-sulfato	D-xilosa, D-galactosa
Queratán sulfato	D-galactosa	D-glucosamina	O-sulfato	D-manosa, D-fucosa, ácido siálico, D-galactosamina
Heparán sulfato	D-ácido glucurónico o L-ácido idurónico	D-glucosamina	O-sulfato y N-sulfato	D-xilosa, D-galactosa
Heparina	D-ácido glucurónico o L-ácido idurónico	D-glucosamina	O-sulfato y N-sulfato	D-xilosa, D-galactosa

RESULTADOS

Los resultados revelan la presencia de proteoglicanos en el plasma seminal tanto normal como patológico. Existe una marcada disminución en las cantidades de los proteoglicanos obtenidos del plasma seminal de hombres infértiles, en comparación con los obtenidos del plasma seminal de sujetos normales. En los casos de infertilidad idiopática y de azoospermia, la disminución fue del 50 %, y del 70 % en los casos de oligoastenospermia y astenospermia (Tabla No. 2).

No se encontraron diferencias significativas en la composición química de los proteoglicanos obtenidos de individuos normales y los de pacientes con infertilidad idiopática. En cambio, sí hay importantes diferencias de composición química de los proteoglicanos obtenidos de individuos con azoospermia, oligoastenospermia, y más aun, en los de pacientes con astenospermia, en los que las proporciones de sulfatos y de ácidos urónicos son muy elevadas, y muy disminuidas las proporciones de hexosaminas y ácidos siálicos. En todos los casos estudiados la cantidad de proteínas permaneció constante (Tabla No. 3).

Los intentos de caracterización estructural de estos complejos moleculares mediante electroforesis revelaron que, tomando en

cuenta la movilidad relativa de los estándares utilizados en comparación con la correspondiente a los proteoglicanos estudiados, podría proponerse la posibilidad de que en todos los casos estudiados el mucopolisacárido unido al resto de la proteína correspondiera al dermatán sulfato. No obstante las diferencias en las proporciones porcentuales de casi todos los componentes que forman parte estructural de los proteoglicanos, el procedimiento electroforético no nos permitió observar diferencias, al menos bajo las condiciones descritas: esto posiblemente puede deberse a la presencia de proteína unida al mucopolisacárido (Figura No. 6).

TABLA No. 2 PROTEOGLICANOS OBTENIDOS DEL PLASMA SEMINAL HUMANO (mg/100 ml)

Normospermico	Infertilidad idiopática	Azoospermico	Oligoastenospermico	Astenospermico
50	28	24	17	16

Los números expresan valores promedio de tres determinaciones

**TABLA No. 3 COMPOSICION QUIMICA DE LOS PROTEOGLICANOS
OBTENIDOS DEL PLASMA SEMINAL (PORCENTAJES EN PESO SECO)**

Componente	Plasma seminal humano				
	Normospermico	Infertilidad idiopática	Azoospermico	Oligoastenospermico	Astenospermico
Hexosaminas	28	28	24	24	18
Acidos urónicos	37	40	51	49	52
Sulfato	5	7	7	8	12
Proteínas	13	11	10	10	11
Acidos siálicos	17	14	8	9	7

Las cantidades porcentuales relativas representan valores promedio de tres determinaciones

FIGURA No. 6

Electroforesis en acetato de celulosa de los glicosaminoglicanos estándares y de los proteoglicanos obtenidos del plasma -- seminal humano normal y patológico.

- C4S - Condroitín 4-sulfato
- DS - Dermátán sulfato
- C6S - Condroitín 6-sulfato
- N - Proteoglicanos de plasma seminal normal
- n - Proteoglicanos de plasma seminal de infertilidad idiopática
- Az - Proteoglicanos de plasma seminal azoospermico
- As - Proteoglicanos de plasma seminal astenospémico
- O1As- Proteoglicanos de plasma seminal oligostenospémico

DISCUSSION

Es evidente que el plasma seminal, además de funcionar como el medio natural de transporte de los espermatozoides juega, por sus características fisicoquímicas y bioquímicas, un papel -- determinante para la movilidad y sobrevivencia de los esper-- matozoides (25, 26, 27, 28, 43). La movilidad de los esperma-- tozoides es uno de los factores más importantes para evaluar el potencial de fertilidad en el varón: sin embargo, aún no ha sido posible establecer un método generalizado para la eva-- luación de esta característica fundamental de los espermatozoi-- des. Mientras que algunos grupos utilizan como criterio de - evaluación la movilidad del espermatozoide en el plasma semi-- nal, otros consideran como criterio de movilidad la velocidad de penetración del espermatozoide a través del moco cervical.

Independientemente del procedimiento utilizado para la valora-- ción de las características de la movilidad, ésta debe ser de-- terminada por diferentes factores, todos ellos relacionados - con las características bioquímicas y fisicoquímicas del plas-- ma seminal (44). Estas, en última instancia, están determina-- das por la óptima o la deficiente funcionalidad secretora de las glándulas sexuales accesorias del tracto genital masculi--

no. De ahí la importancia del análisis de los componentes bioquímicos del plasma seminal, que provee estimable información sobre la función secretora de esos órganos: información que resulta valiosa tanto en el estudio de los comunes pero problemáticos desórdenes de secreción de las glándulas sexuales accesorias masculinas, así como en el estudio de los factores que influyen en la movilidad y sobrevivencia de los espermatozoides.

Recientemente se ha demostrado que los espermatozoides de semen patológico tienen similares concentraciones de fosfolípidos y concentraciones significativamente altas de colesterol en comparación con las encontradas en espermatozoides de semen normal. Sin embargo, solamente los espermatozoides de oligoastenospermicos mostraron una relación colesterol/fosfolípidos significativamente mayor. Este comportamiento es indicativo de que los lípidos se intercambian libremente entre espermatozoides y plasma seminal, en tal forma que la composición lipídica de la membrana del espermatozoide se correlaciona con la composición lipídica del plasma seminal (45).

Es probable que la presencia de los proteoglicanos en el plas-

ma seminal humano pudiera tener alguna implicación en el proceso de coagulación-licuefacción del semen, ya que un estudio paralelo al presente demuestra que los proteoglicanos obtenidos del plasma seminal de sujetos normales y de oligoastenopérmicos con coágulo se comportaron de manera muy diferente al separarlos en columna (Sephacril S 200) (46).

Los resultados obtenidos en esta fase inicial de nuestro estudio con una evidencia más para afirmar que las modificaciones de las características bioquímicas y fisicoquímicas del plasma seminal son un reflejo de la potencialidad fertilizante del varón, y que los proteoglicanos presentes en el plasma seminal, con las cantidades y variaciones en su composición química, de alguna manera, al menos parcialmente, están participando en las características de fertilidad de los casos estudiados.

Sin embargo, el grado de avance de nuestro estudio no nos -- permite establecer ninguna explicación definitiva que precise las causas que determinaron las variaciones cuantitativas y cualitativas entre los proteoglicanos del plasma seminal humano normal y los de las patologías estudiadas.

Solamente cuando se determine la estructura detallada de las

proteínas a las que se encuentran ligados los glicosaminoglicanos, así como las proporciones relativas de acetilglucosamina, acetilgalactosamina, ácido idurónico y ácido glucurónico, podría ser interpretado el significado fisiológico de la presencia de los proteoglicanos en el plasma seminal.

B I B L I O G R A F I A

1. Meyer, K. (1969). Biochemistry and biology of mucopolysaccharides. *Am. J. Med.* 47: 664-672.
2. Muir, H., Hardingham, T.E. (1975). Structure of proteoglycans. En: MTP International Review of Science, Biochemistry series one, Biochemistry of carbohydrates. Ed. Whelan, W.H., pp. 153-222. Baltimore, University Park, U.S.A.
3. Muir, H. (1969). The structure and metabolism of mucopolysaccharides and the problem of the mucopolysaccharidoses. *Am. J. Med.* 47: 673-690.
4. Toledo, O., Dietrich, C.P. (1977). Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 498: 114-122.
5. Lesson, C.R., Lesson, T.S. (1977). *Histología*. Ed. Interamericana. México.
6. Likar, I., Likar, L. (1964). Acid mucopolysaccharides and mast cells in the bovine uterus at different stages of the sexual cycle. *Acta Endocr.* 46: 493-506.
7. Dietrich, C.P. et al. (1976). Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and - in their respective mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. - Comm.* 71: 1.10.
8. Hata, R., et al. (1978). Low-sulfated chondroitin sulfate in human blood and urine. *Biochim. Biophys. Acta* 543: 156-166.
9. Delgado, N. et al. Datos no publicados.
10. Ting-Yang, L., Schafer, I.A. (1974). Glycosaminoglycan --- composition of human amniotic fluid. *Biochim. Biophys. Acta* 354: 264-274.
11. Bychkov, S.M., Kuzmina, S.A. (1977). Role of glycosaminoglycans in red cells aggregation and adhesion. *Byuul. Eksp. - Biol. Med.* 83: 284-288.
12. Villanueva, G., Danishefsky, I. (1977). Evidence for a heparin induced conformational change on antithrombin III. - *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 74: 803-809
13. McKusick, V. et al. (1965). The genetic mucopolysaccharidoses. *Medicine* 44: 445-483.
14. Dorfman, A., Matalon, R. (1976). The mucopolysaccharidoses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: 630-637.

15. Yanagishita, M. et al. (1979). Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *J. Biol. Chem.* 254: 911-920.
16. Ax, R.L. Ryan, R.J. (1979). The porcine ovarian follicle. IV. Mucopolysaccharides at different stages of development. *Biol. Reprod.* 20: 1123-1132.
17. Bellin, M.E. et al. (1983). Proteoglycan production by bovine granulosa cells in vitro occurs in response to FSH. - *Mol. Cell. Endocr.* 29: 51-65.
18. Wincek, T.J. et al. (1979). Fertilization: a uterine glycosaminoglycan stimulates the conversion of sperm proacrosin to acrosin. *Science* 209: 553-554.
19. Parrish, R.F., et al. (1980). Glycosaminoglycan stimulation of the in vitro conversion of boar proacrosin into acrosin. *J. Androl.* 1: 89-95.
20. Lenz, R.W., et al. (1982). Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 106: 1092-1098.
21. Delgado, N. et al. (1980). Species specific decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Arch. Androl.* 4: 305-313.
22. Delgado, N. et al. (1982). Decondensation of human sperm nuclei blycosaminoglycan-sulfate from sea urchin egg. *J. - Exp. Zool.* 224: 457-460.
23. Polakosky, K.L. et al. (1977). Biochemistry of human seminal plasma. *En : Human semen and fertility regulation in men.* Ed. E.S.E. Hafez, pp. 133, 143, Saint Louis.
24. Eliasson, R. (1968). Biochemical analyses of human semen in the study of the physiology and pathophysiology of the male accessory genital glands. *Fertil. Steril.* 19: 334-350.
25. Lindholmer, Ch. (1974). The importance of seminal plasma - for human sperm motility. *Biol. Reprod.* 10: 533-545.
26. Paz, G. et al. (1977). Human semen analysis: seminal plasma and prostatic fluid composition and their interrelations with sperm quality. *Int. J. Fertil.* 22: 140-147.
27. Corteel, J. M. (1979). Effets du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoides conservés in vitro. *Reprod. Nutrit. Develop.* 76: 1111-1123.

28. Overstreet, J. W. (1980). The importance of seminal plasma for sperm penetration of human cervical mucus. *Fertil. Steril.* 34: 569-572.
29. Zaneveld, L. (1975). The human ejaculate and its potential for fertility control. En: Control of male fertility. Ed. Sciarra, J., Markland, C., Speidel, J., pp. 41-53, University of Minnesota.
30. Hafez, E.S.E. (1980). The Semen. En: Human Reproduction, - Hafez, E.S.E. (ed.), Harper & Row Pubs., Hagerstown, Maryland, U.S.A.
31. Huacuja, L. et al. (1973). A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. *Life Sci.* 13: 1383-1394.
32. Zaneveld, L. (1979). Proposed clinical nomenclature. *Amer. Soc. of Andrology.* March 13-16. Houston, Texas.
33. Belsey, M.A. et al. (1980). Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Press Concern Singapore. World Health Organization, Switzerland, pp. 11-12.
34. Huacuja, L. Datos no publicados.
35. Inoue, S., Yosizawa, Z. (1966). Purification and properties of sulfated sialopolysaccharides isolated from pig colonic mucosa. *Arch. Biochem. Biophys.* 117: 257-265.
36. Svejcar, J., Robertson, V. (1967). Microseparation and determination of mammalian acidic glycosaminoglycans. *Anal. Biochem.* 18: 333-350.
37. Smith, L., Gilkerson, E. (1979). Quantitation of glycosaminoglycans hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal. Biochem.* 98: 478-480.
38. Bitter, T., Muir, H. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4: 330-334.
39. Terho, T., Hartiala, K. (1971). Method for determination of sulfate content of glycosaminoglycans. *Anal. Biochem.* 41: 471-476.
40. Lowry, O. et al. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
41. Warren, L. (1963). Thiobarbituric acid assay of sialic acids. *Meth. Enzimol.* 6: 463-465.

42. Kinoshita, S. (1974). Some observations on a protein-mucopolysaccharide complex found in sea urchin embryos. *Exp. Cell Res.* 85: 31-40.
43. Zaneveld, L. et al. (1974). Scanning electron microscopy of the human, guinea-pig and rhesus monkey seminal coagulum. *J. Reprod. Fert.* 40: 223-225.
44. Rosado, A. et al. (1982). Role of seminal plasma and sperm fertilizability. En: *Instrumental insemination*. Eds. Hafez, E.S.E., Semm, K., pp. 35-52, Netherlands.
45. Huacuja, L. et al. (1981). Exchange of lipids between spermatozoa and seminal plasma in normal and pathological human semen. *Arch. Androl.* 7: 343-349.
46. Huacuja, L. Datos no publicados.