



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

*PRESENCIA Y CARACTERIZACION PARCIAL  
DE PROTEOALUCANOS EN PLASMA SEMINAL  
OBTENIDO DE SUJETOS FERTILES Y CON  
PROBLEMAS DE FERTILIDAD.*

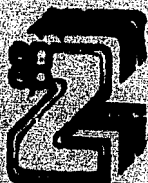
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ALFREDO CAMPOS LOPEZ



MEXICO, D. F.

1986.



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 está 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.

## CONTENIDO

I.-	INTRODUCCION.....	1
II.-	GENERALIDADES.....	3
1.-	Composición bioquímica del semen humano.....	3
2.-	Bioquímica del plasma seminal y su participación en las características del espermatozoide.....	4
3.-	Nomenclatura de proteoglucanos... ..	6
4.-	Biosíntesis y distribución de proteoglucanos.....	10
5.-	Agregación de proteoglucanos.....	12
6.-	Métodos de extracción de proteoglucanos en cartílago.....	14
7.-	Biología de proteoglucanos.....	17
III.-	OBJETIVOS.....	20
IV.-	METODOLOGIA.....	21
1.-	Obtención de muestras biológicas.	21
2.-	Clasificación y manipulación de las muestras.....	21
3.-	Obtención de los proteoglucanos del plasma seminal humano normal y patológico.....	23
4.-	Separación de los proteoglucanos por filtración en columna.....	24

V.-	RESULTADOS.....	39
VI.-	DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	52
VII.-	BIBLIOGRAFIA.....	57

I N T R O D U C C I O N .

## I.- INTRODUCCION.

La infertilidad es la incapacidad procreativa tanto en el hombre como en la mujer, aun cuando en la mujer es posible una concepción pero no puede llevarse a término el embarazo. La incapacidad procreativa en el hombre se conoce como infertilidad masculina y las principales causas de esta infertilidad son:

- a) Una impotencia generandi (incapacidad de fecundar) sobre la base de un trastorno de la espermatogénesis (azoospermia, oligospermia, astenospermia, teratospermia, síndrome de Klinefelter), de una concepción antifisiológica del esperma o de un trastorno del mecanismo de evacuación.
- b) Una impotencia coendi determinada por una disminución o falta de libido, por fallo de erección, por eyaculación precoz o por una incapacidad para la introducción del pene, de origen psíquico (miedo al fracaso).
- c) Una formación de anticuerpos autoinmunes contra el propio esperma.

Puede afirmarse que del 10 al 15% de los matrimonios no tienen hijos sin proponérselo. Sobre la frecuencia y distribución de las causas, solo pueden darse valores promedio, puesto que las estadísticas difieren razonablemente las unas de las otras.

Del 35 al 40% de los matrimonios estériles deben ser atribuidos a una facultad procreativa alterada del hombre. En cerca

del 50% existe un trastorno de la capacidad de concepción de la mujer. El 10-15% restante se carga en la cuenta de factores casales no dilucidables.

En la gran mayoría de los matrimonios afectados son las mujeres las que consultan al médico a causa de su deseo de tener hijos. La frecuencia de la infertilidad masculina obliga a incluir al hombre en la aclaración anamnésica y diagnóstica de su incapacidad procreativa (1).

GENERALIDADES.



## II.- GENERALIDADES.

1.- Composición bioquímica del semen humano. 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 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 (2). Las secreciones de estas glándulas no son vertidas al tracto genital masculino simultáneamente, sino que lo hacen de una manera secuencial bien conocida (3).

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 reportado solamente 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 del ampulla y del epidídimo ricos en espermatozoides. La última y más voluminosa porción del 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 (2,4).

2.- Bioquímica del plasma seminal y su participación en las características del espermatozoide. Tradicionalmente se ha considerado al plasma seminal como un medio natural del 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 (2,5).

Usualmente la valoración de la fertilidad masculina se ha basado en exámenes de la fase celular del semen. Solo 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 (3). 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 (6,7,8,9). También se ha demostrado que la interacción del plasma seminal con el espermatozoide promueve una eficiente penetración de la célula al moco cervical (10).

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 normalmente se encuentran en concentraciones muy elevadas en comparación a la encontradas en otros fluidos corporales.

Las funciones de los constituyentes más característicos del plasma seminal son aun desconocidos 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 (4,5). Un ejemplo de ello son las macromoléculas del tipo de glucoproteínas conocidas como proteoglucanos de

los cuales poco se conoce acerca de su función biológica.

3.- Nomenclatura de proteoglicanos. Los proteoglicanos son complejos mixtos constituidos por cadenas de polisacáridos unidas a una molécula de proteína mediante enlaces covalentes glicosídicos específicos, dando lugar a moléculas complejas de polielectrolitos altamente cargados y de gran peso molecular (11).

La porción polisacárida unida a la proteína es un polímero recto compuesto de unidades disacáridas repetitivas en las que una hexosamina N-acetilada (D-glucoamina o Dgalactosamina), con excepción del heparan sulfato y la heparina donde la hexosamina también puede encontrarse N-sulfatada, está siempre unida a un ácido hexurónico (D-glucurónico o su 5-epímero idurónico o ambos), el cual se encuentra desplazado por la galactosa en el keratán sulfato. En las unidades disacáridas, exceptuando el ácido hialurónico, los grupos hexosaminil están esterificados con grupos sulfatos ya sea en posición 4 ó 6. Las unidades disacáridas repetitivas se unen por medio de un enlace hexosaminídico al grupo hexuronídico del siguiente disacárido, de tal manera que las unidades de carbohidratos consisten en unidades hexuronídicas y hexosaminídicas alternadas (12), tabla No. 1.

La presencia de grupos carboxilo y/o sulfatos en cada unidad disacárida confiere a las cadenas un fuerte carácter polianiónico, carácter que determina en gran parte sus propieda-

des fisicoquímicas e influye considerablemente en su interacción con otras moléculas (11).

El nombre proteoglucanos viene a remplazar los términos complejo proteína-polisacárido y condonucoproteína, que se habían aplicado a varias preparaciones de glucosaminoglucanos y proteína en formas mal definidas de asociación covalente y no covalente (11). 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 glucosaminoglucanos existen covalentemente ligados a una molécula de proteína, dando lugar a la introducción del término proteoglucanos para nombrar a esta familia de moléculas (11,12), tabla No. 2.

El tipo más común de enlace covalente carbohidrato-proteína encontrado, es un enlace O-glicosídico 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 (11,13).

Tabla No. 1. Composición de glucosaminoglucanos.

	Unidad disacárida repetitiva		Sulfato	Otros azúcares residuales, incluidos en la región de enlace.
	Acido hexurónico	Hexosamina		
Acido hialurónico	Acido D-glucurónico	D-glucosamina		?
Condroitin 4-sulfato	Acido D-glucurónico	D-galactosamina	O-sulfato	D-xilosa, D-galactosa
Condroitin 6-sulfato	Acido D-glucurónico	D-galactosamina	O-sulfato	D-xilosa, D-galactosa
Dermatan sulfato	Acido L-idurónico o Acido D-glucurónico	D-galactosamina	O-sulfato	D-xilosa, D-galactosa
Keratan sulfato	D-galactosa	D-glucosamina	O-sulfato	D-manosa, D-fucosa, Acido siálico, D-galactosamina
Heparan sulfato	Acido L-idurónico o Acido D-glucurónico	D-glucosamina	O-sulfato y N-sulfato	D-xilosa, D-galactosa
Heparina	Acido L-idurónico o Acido D-glucurónico	D-glucosamina	O-sulfato y N-sulfato	D-xilosa, D-galactosa

Tabla No. 2. Nomenclatura de proteoglicanos y glucosaminoglicanos.

Nombre anterior	Nombre común
Proteín-polisacárido (complejo)	} Proteoglicano
Condomucoproteína	
Mucopolisacáridos	Glucosaminoglicano
Acido hialurónico	No cambia
Condroitin sulfato A	Condroitin 4-sulfato
Condroitin sulfato C	Condroitin 6-sulfato
Condroitin sulfato B	Dermatan sulfato
Heparitin sulfato	} Heparan sulfato
Heparin monosulfato	
Heparina	No cambia
Keratosulfato	Keratan sulfato

4.- Biosíntesis y distribución de proteoglucanos. El estudio de proteoglucanos ha beneficiado el desarrollo en el área de biosíntesis de glucoproteínas y como podría esperarse, se ha observado que los carbohidratos de ambas clases de compuestos son formados esencialmente por la misma ruta. En su forma simple, la biosíntesis del conjugado carbohidrato-proteína ocurre como sigue: la proteína esencial es sintetizada primero en los ribosomas de la misma forma como ocurre para proteínas simples y la adición de los grupos carbohidratos, que toman lugar en una forma escalonada, monosacárido por monosacárido, ocurre por transferencia del grupo glucosíl apropiado de un nucleótido-azúcar. Alternativamente, algunos oligosacáridos se ensamblan primero en la misma manera escalonada sobre lípidos poliprenoles, y el oligosacárido entero se transfiere a la proteína esencial para el alargamiento de la cadena (11), figura No. 1.

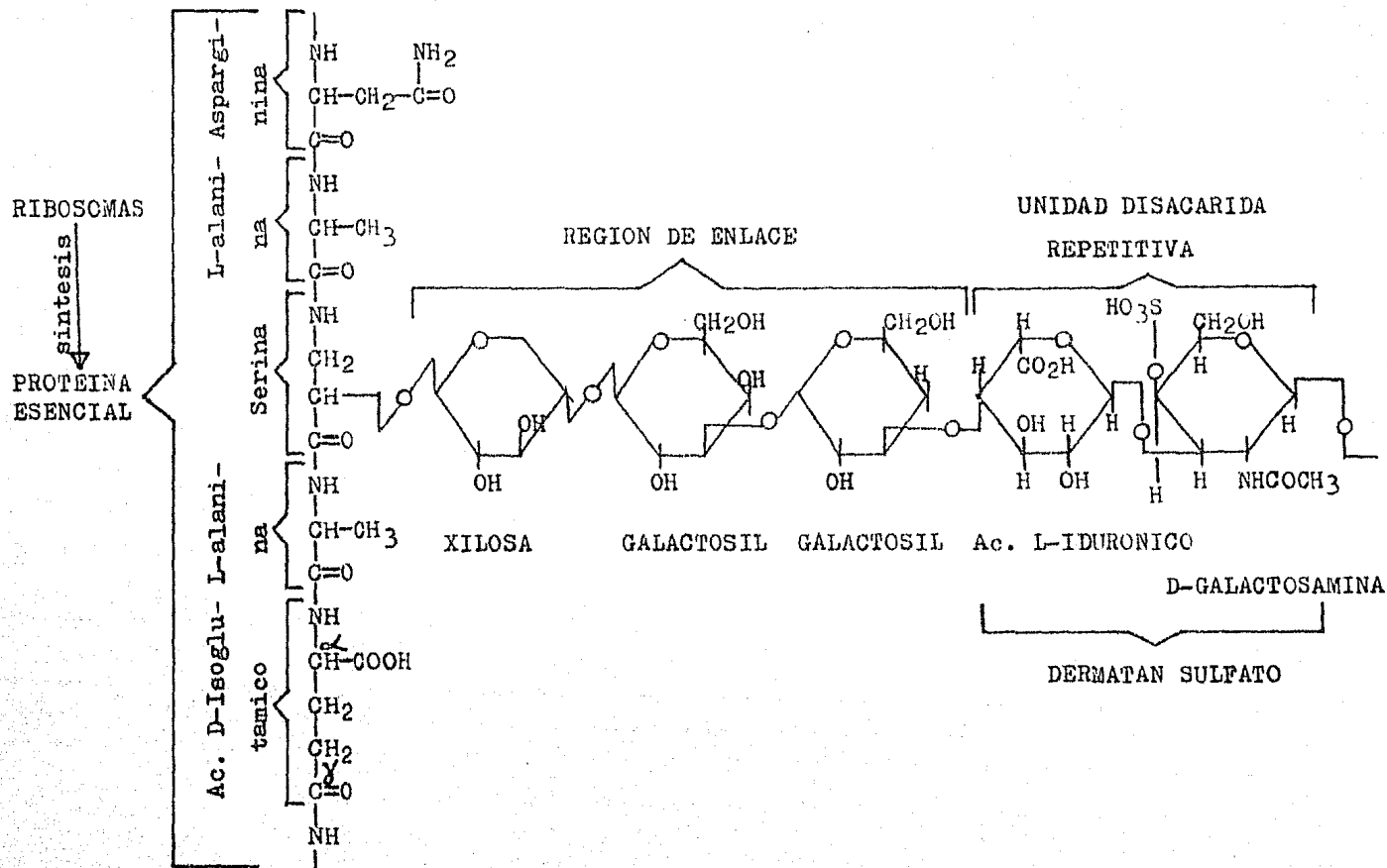
La mayoría de los proteoglucanos de tejido conectivo, son sintetizados por la misma ruta, que es la más directa, pero se debe enfatizar que la información disponible no es suficiente para excluir la participación de lípidos intermedios en estos procesos de un estado u otro (11).

Se sabe poco de la estructura detallada de las proteínas esenciales de los proteoglucanos. Son presumiblemente caracterizadas por secuencia aminoácida.

El análisis de proteoglucanos sugiere que puede haber varia-



FIGURA No. 1. BIOSINTESIS DE PROTEOGLUCANOS.



ción en el número y tipo de cadenas de glucosaminoglucanos adicionados y también variación en su longitud y grado de sulfatación (11,14).

Los proteoglucanos presentan un amplio patrón de distribución en los tejidos de los mamíferos y de los vertebrados en general (12,15), son moléculas del espacio extracelular y son abundantes donde el espacio extracelular es grande. Estos tejidos tienen frecuentemente una función estructural tal como constituir cartílago, nucleos pulposos, córnea, piel y en las paredes de los vasos sanguíneos. En otros tejidos suaves como hígado, riñón y cerebro los proteoglucanos también están presentes, pero en pequeñas cantidades (16). Los proteoglucanos son sintetizados intracelularmente (la proteína esencial en los ribosomas y los carbohidratos parece ser que en el complejo de Golgi) y secretados hacia el espacio extracelular como ocurre con las fibras proteicas de colágeno las cuales forman parte del tejido conectivo. El proteoglucano intacto tal como el cartílago es una molécula extremadamente expandida y en comparación con proteínas globulares como fibrinógeno, globulina y lipoproteínas, son de mucho mayor tamaño (11,17), figura No. 2.

5.- Agregación de proteoglucanos. Los proteoglucanos han sido estudiados principalmente en cartílago donde se encuentran organizados como agregados multimoleculares por medio de una alta interacción específica con ácido hialurónico.

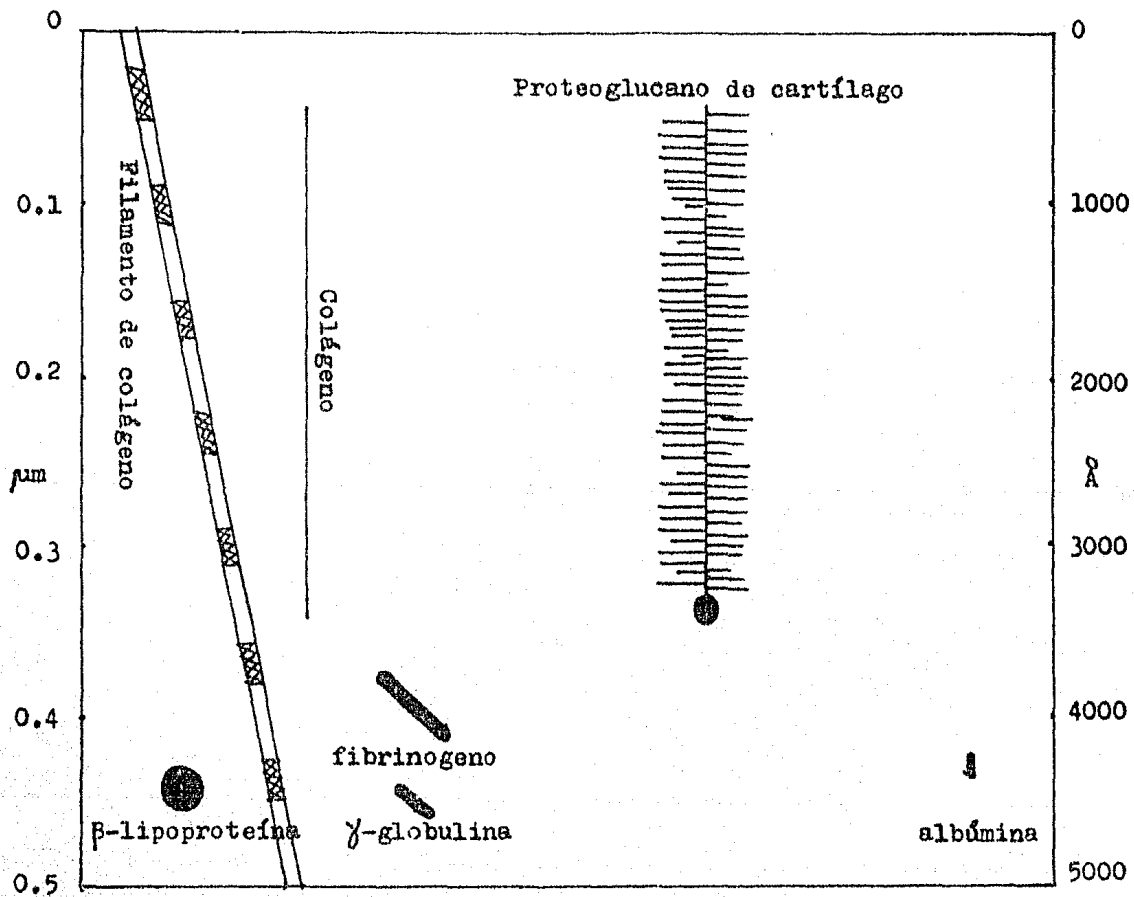


Figura No. 2. Dimensiones de proteoglucanos de cartílago, otras fibras comunes y proteínas globulares.

La adición de proteoglicanos y hialuronato es aún más estable por interacción con una proteína globular específica conocida como proteína de unión, la cual unida al proteoglicano en proporción estequiométrica y a un segmento mayor de la cadena de hialuronato cierran un sistema de tres componentes en el cual la disociación es inmesurablemente menor. La proteína globular, a un extremo de la proteína esencial, se combina con un segmento de la cadena de ácido hialurónico de cinco unidades disacáridas con N-acetilglucosamina al extremo reductor y ácido glucurónico al extremo no reductor, mientras que los proteoglicanos se mantienen enlazados al ácido hialurónico mediante puentes de disulfuro (17), figura No. 3.

6.- Métodos de extracción de proteoglicanos ensayados en cartilago. La mayoría de los estudios relacionados con la estructura de proteoglicanos han sido restringidos al cartilago. Existen una gran variedad de técnicas empleadas para la extracción y aislamiento de proteoglicanos de cartilago que han sido utilizadas para subfraccionarlos y poder determinar su heterogeneidad y polidispersidad. Estas técnicas han sido mejoradas para lograr su extracción y purificación por métodos que impiden su pérdida por disociación o precipitación; de este modo es posible obtener proteoglicanos en su estado nativo.

Estas técnicas de extracción de proteoglicanos son: extrac-

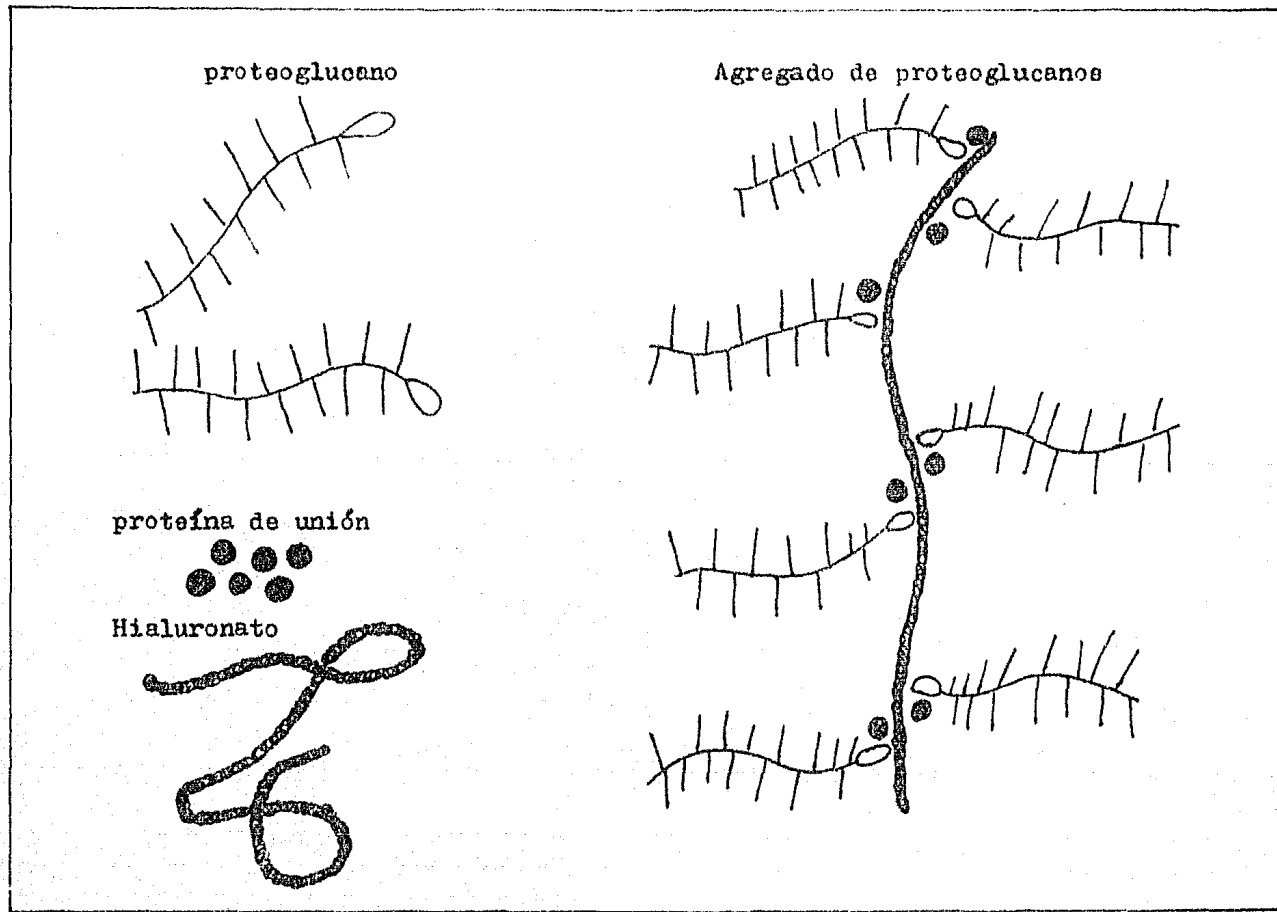


Figura No. 3. Agregación de proteoglicanos.

ción disruptiva, disociativa y secuencial.

Disruptiva: aunque los proteoglucanos pueden estimarse hasta en un 40% del peso seco del cartílago, no son separados fácilmente del tejido en solución a baja fuerza iónica, a menos que la red de colágeno sea sometida a disrupción mecánica por homogenización a alta velocidad. Hasta un 50% de los proteoglucanos pueden ser extraídos, el rendimiento final depende del cartílago y la extensión de la disrupción realizada.

Disociativa: la extracción de proteoglucanos de cartílago nasal de bovino por soluciones salinas de diferente fuerza iónica ha sido examinado sistemáticamente. Se basa en que las soluciones de varios cloruros de metal son efectivas en óptimas concentraciones en la extracción de una gran proporción de los proteoglucanos sin homogenización.

Secuencial: cuando se usa una homogenización leve el cartílago no es fragmentado completamente y por tanto la extracción de proteoglucanos es baja; aumentando la concentración de sal en el extractor, se obtiene un mayor rendimiento. Cuando el cartílago es extraído secuencialmente con soluciones salinas, incrementando su concentración, los proteoglucanos extraídos por cada solución difieren en tamaño molecular y composición. Esto muestra que los proteoglucanos no están unidos de la misma manera al tejido y proporciona un método de fraccionamiento de proteoglucanos durante su extracción(11).

7.- Biología de proteoglucanos. La información acerca de la función biológica de los glucosaminoglucanos y de sus complejos proteicos, es decir proteoglucanos, es pobre (12). Dado el carácter polianiónico de los proteoglucanos estos biopolímeros interaccionan con diferentes moléculas tales como iones inorgánicos, alquilaminas, alcaloides, aminas biogénicas y proteínas (11).

En el campo de la biología de la reproducción los proteoglucanos parecen jugar un papel importante en el proceso de fertilización. Así lo demuestra la secreción de estos compuestos por las células de la granulosa del folículo, de donde pasan a formar parte del líquido folicular y posteriormente, de la secreción tubaria que estará presente al llevarse a cabo la fertilización (18,19).

Recientemente los proteoglucanos también han sido encontrados en el líquido folicular de bovinos y del humano (20), y se ha demostrado que tienen un efecto muy importante, aumentando la reacción acrosomal en espermatozoides de estos mamíferos (21). También se ha comprobado que la producción in vitro de proteoglucanos por las células de la granulosa de bovino ocurre en respuesta a la hormona folículo estimulante (22).

En homogenizados de próstata y de otros órganos sexuales secundarios de algunos mamíferos incluyendo al humano, se han demostrado actividades importantes de UDP-galactosa, gluco-

proteína-galactosil transferasa y de GDP-fucosa, glucoproteína fucosil transferasa, encontrándose la mayor actividad de estas enzimas principalmente en aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y membrana plasmática (23,24). Se ha demostrado recientemente la actividad de sialiltransferasas microsomales y de membrana plasmática, así como su distribución regional en el epidídimo de rata (25,26).

Se sabe que en los espermatozoides ocurren cambios bioquímicos y fisiológicos muy importantes: maduración y capacitación que son esenciales para que se lleve a cabo la fertilización, como consecuencia de la interacción de los diferentes componentes del plasma seminal tanto en el momento como después de la eyaculación (8). La función de los constituyentes más característicos del plasma seminal aun es desconocida e incluso es probable que existan otros componentes de relevancia bioquímica que no se hayan descubierto y que pudieran tener implicaciones directas o alguna relación con los problemas de infertilidad masculina. De ahí la importancia del conocimiento de los diferentes componentes del plasma seminal de los cuales algunos de ellos han sido considerados recientemente para valorar la fertilidad en el varón. Es probable que entre los compuestos responsables de los cambios experimentados en los espermatozoides al contacto con el plasma seminal, se encuentren estructuras del tipo de los proteoglucanos y/o glucosaminoglucanos libres; es



por ello que resulta importante investigar sobre la posible presencia de estos compuestos tanto en el plasma seminal de sujetos normospérmicos como patológicos.

O B J E T I V O S .

### III.- OBJETIVOS.

- Investigar la presencia de proteoglucanos en el plasma seminal de sujetos normospermicos.
  
- Estudiar la presencia de proteoglucanos en el plasma seminal de pacientes con problemas de astenozoospermia, azoospermia y oligozoospermia; para establecer si existen diferencias en las cantidades y composición de estos compuestos en comparación a los encontrados en el plasma seminal de sujetos normospermicos; diferencias que pudieran correlacionarse con los tipos de infertilidad correspondiente.

M E T O D O L O G I A .

#### IV.- METODOLOGIA.

1.- Obtención de muestras biológicas. Para la realización del presente trabajo, se utilizaron muestras de semen recién eyaculado por masturbación de sujetos normales y fértiles, y de pacientes que acuden al Hospital de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social por tener problemas de fertilidad. En todos los casos el tiempo de abstinencia sexual previo a la obtención de las muestras fué de 3 a 5 días.

2.- Clasificación y manipulación de las muestras de semen humano. Los criterios utilizados para la clasificación de las muestras de semen humano (27), fueron los siguientes:  
Normozoospermia: entre 50 y 150 millones de espermatozoides por mililitro y movilidad mayor del 60%.

Oligozoospermia: menos de 20 millones de espermatozoides por mililitro.

Astenozoospermia: entre 50 y 150 millones de espermatozoides por mililitro y movilidad menor del 50%.

Azoospermia: cero espermatozoides.

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 min para permitir su licuefacción e inmediatamente después se hicieron las espermatobioscopías correspondientes para su clasificación, estimando los siguientes parámetros: grado de licuefacción, volumen, pH, grado de contaminación

celular, porcentaje de movilidad y cantidad de espermatozoides.

El grado de contaminación celular se valoró observando en un microscopio óptico Zeiss y contando el número de células diferentes a espermatozoides (leucocitos o células epiteliales de descamación), las muestras que presentaron más de siete células diferentes de espermatozoides fueron descartadas debido a que podrían estar contaminadas por alguna infección. La movilidad de los espermatozoides fué 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 (28). 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%; agitar vigorosamente la pipeta para homogenizar la suspensión y desechar las tres primeras gotas antes de aplicar la suspensión de espermatozoides en la cámara del hematocitómetro. Aplicada la muestra en el hematocitómetro, éste se coloca dentro de una cámara húmeda durante 10 min para permitir la sedimentación de las células. Una vez transcurrido el tiempo de sedimentación, se coloca el hematocitó-

metro en un microscopio óptico de contraste de fases y se procede 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 50000, factor de multiplicación correspondiente a los cuadros considerados, obteniéndose de esta manera el número de espermatozoides expresado en millones por mililitro de la suspensión celular original.

3.- Obtención de los proteoglicanos del plasma seminal humano normal y patológico. Inmediatamente después de haber realizado la clasificación de las muestras, el plasma seminal se separó de los espermatozoides por centrifugación durante 15 min a 3500 rpm, en una centrífuga Sorval GLC-1 y se guardó en congelación hasta que se reunió un volumen adecuado de aproximadamente 5 ml por cada categoría estudiada; dicho plasma seminal se obtuvo del semen de distintos sujetos que, de acuerdo a los métodos de clasificación de las muestras (27), pertenecían a la misma categoría. De esta forma se trabajaron, por cada categoría, cuatro muestras de 5 ml de plasma seminal constituyéndose cada una de ellas de tres eyaculados de sujetos infértiles en los casos de patología y de dos eyaculados de sujetos normales en los casos de normospermia. En cada caso a los 5 ml de plasma seminal se le agregaron 20 ml de acetona fría agitando vigorosamente en vor-

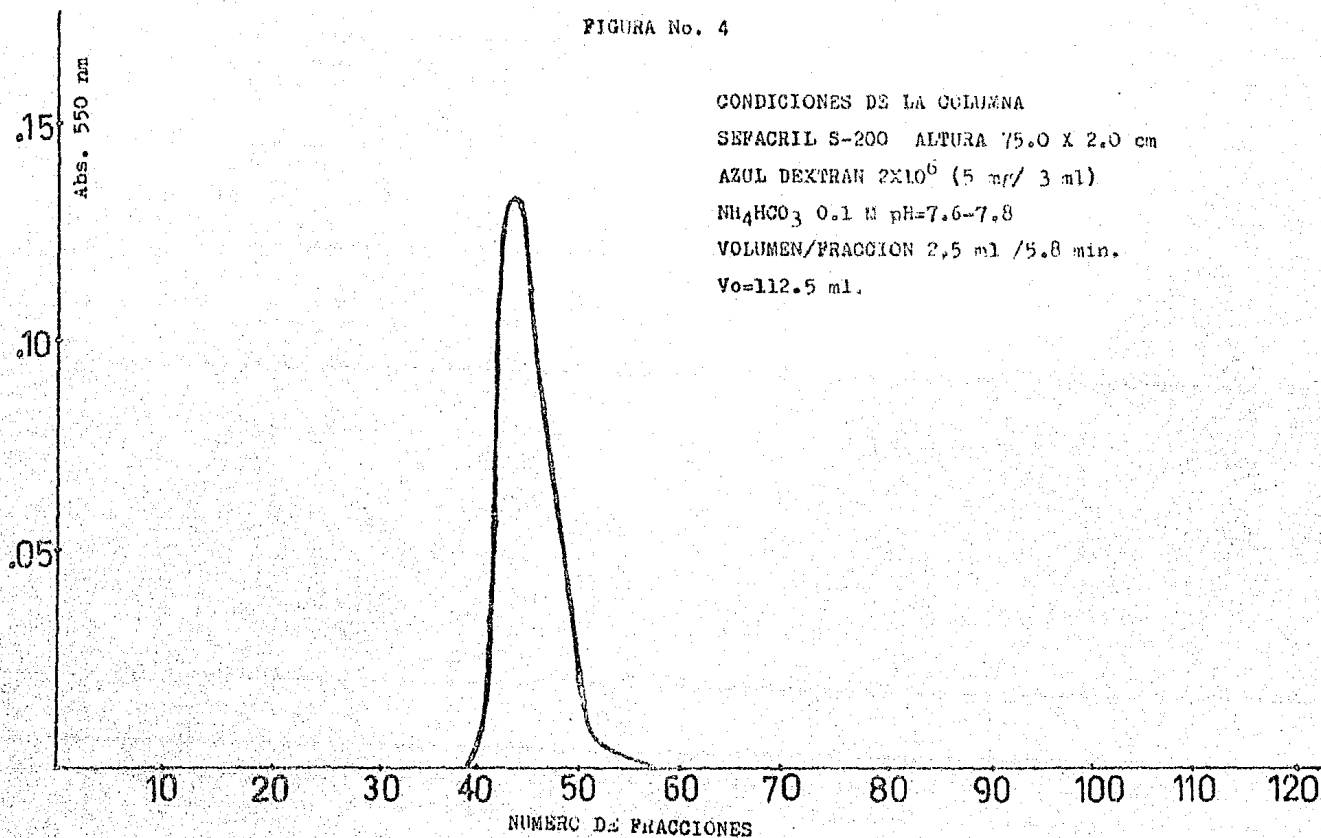
tex para precipitar y extraer los proteoglucanos manteniendo dicha precipitación durante 15 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (29), el precipitado obtenido fue recuperado por centrifugación durante 15 min a 3000 rpm, en una centrifuga clínica internacional, la acetona se decantó y el precipitado se disolvió en agua destilada (2.0 ml de agua por ml de plasma seminal) para liofilizarlo posteriormente (30).

4.- Separación de los proteoglucanos por filtración en columna. Para llevar a cabo la separación de los proteoglucanos por filtración, se utilizó una columna de sefacril S-200 con dimensiones de 75.0 x 2.0 cm, equilibrada con bicarbonato de amonio 0.1 M pH=7.6 a 7.8 y una velocidad de flujo de 1 gota/10 segundos, colectandose fracciones de 2.5 ml. Se determinó el volumen vacío a la columna (3 veces) con 5 mg de azul dextran ( $\text{PM}=2 \times 10^6$ ) disuelto en 3 ml de bicarbonato de amonio pH=7.6-7.8 colectandose las fracciones de 2.5 ml a las cuales se les determinó la absorbancia con un espectrofotómetro de doble haz Cary Varian 118 a una longitud de onda de 550 nm (29), figura No. 4.

Se tomaron 5 mg de cada liofilizado y se disolvieron, por separado, en 1 ml de agua destilada para determinar la cantidad total de proteína mediante el método fotocolorimétrico correspondiente (31) y por interpolación mediante la curva patrón respectiva (gráfica No. 1), posteriormente se separaron los proteoglucanos por filtración utilizando, de ca-



FIGURA No. 4



da uno de los liofilizados obtenidos, cantidades equivalentes a 80 mg de proteína total las cuales fueron disueltas en bicarbonato de amonio 0.1 M pH=7.6-7.8 (de tal manera que en 5.0 ml de bicarbonato quedó disuelto el liofilizado correspondiente a 1.0 ml de plasma seminal), teniendo cuidado de solubilizar completamente el material; inmediatamente se centrifugó a 4500 rpm, en una centrifuga Sorval GLC-1, durante 15 min para su clarificación y el sobrenadante se aplicó a la columna de sefacril S-200 previamente equilibrada con el bicarbonato de amonio 0.1 M pH=7.6-7.8. Utilizando como eluyente la misma solución de bicarbonato, se colectaron fracciones de 2.5 ml a una velocidad de flujo de una gota cada 10 segundos en un colector de fracciones LKB Ultrorac 7000 (30). A las fracciones obtenidas por filtración en columna, inmediatamente se les determinó el contenido de proteína, mediante luz ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm y ácidos urónicos mediante el método fotocolorimétrico correspondiente (32), como criterio para determinar la presencia de proteoglucanos (30). También se determinó el contenido de ácido siálico en las fracciones mediante el método fotocolorimétrico correspondiente (34). Las lecturas de absorbancia fueron graficadas contra el número de fracciones para conocer la distribución de los proteoglucanos en el perfil cromatográfico. Por lo tanto, esas fracciones se juntaron constituyendo un volumen total en cada pico a los cuales

se les determinó nuevamente la cantidad de proteína, ácidos urónicos y ácido siálico además de sulfatos y hexosaminas utilizando los procedimientos fotocolorimétricos correspondientes (31,32,33,34,35) que se describen a continuación:

### Proteínas.

#### Reactivos:

- albúmina de bovino Sigma al 0.05%
- solución cupro-alcalina que se prepara 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 mezclan y se ajusta el pH a 10.1

Método y fundamento. Las proteínas se determinan por el método de Lowry (31), 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 que absorbe a 750 nm y cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de proteínas. La curva patrón se construyó estimando la pendiente de un promedio de 12 repeticiones del siguiente procedimiento:

De una solución de albúmina de bovino al 0.05% se toman alícuotas de 0,20,40,60,80 y 100  $\mu$ l, se colocan en tubos por separado y se agregan respectivamente 200, 180,160,140, 120 y 100  $\mu$ l de amortiguador de carbonatos. Se adiciona a cada alícuota 1 ml de solución cuproalcalina, se agitan y se deja reposar 10 min a temperatura ambiente. Se agregan 100  $\mu$ l de reactivo de Folin y se dejan en reposo 30 min en oscuridad, leer la absorbancia a 750 nm gráfica No. 1.

### Acidos urónicos.

Reactivos:

- glucuronolactona Merck al 0.005%
- tetraborato de sodio 0.05 M en ácido sulfúrico
- carbazol al 0.125% en etanol

Método y fundamento. La determinación de ácidos urónicos se realiza de acuerdo al método de Bitter y Muir modificado (32), cuyo fundamento consiste en que los ácidos hexurónicos al ser tratados con un ácido mineral concentrado forman un producto intermedio 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 curva patrón se construyó estimando la pendiente de un promedio de 12 repeticiones del siguiente procedimiento:

De una solución de glucuronolactona al 0.005% se toman alícuotas de 0,100,200,300,400 y 500  $\mu$ l, se colocan en tubos por separado y se agregan respectivamente 500,400,300,200, 100 y 0  $\mu$ l de agua. Se adiciona a cada alícuota 100  $\mu$ l de carbazol y se colocan en hielo durante 5 min. Se agregan 2.5 ml de ácido sulfúrico y se colocan en baño maría durante 20 min a 92°C. Leer la absorbancia a 530 nm, gráfica No. 2.

### Sulfatos.

#### Reactivos:

-sulfato de sodio Sigma 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 ml.

Estas tres soluciones se mezclan y se aforan a 100 ml con etanol.

-solución de rodizonato de sodio: a una solución de rodizonato de sodio al 0.025% se añaden 50 mg de L-ácido ascórbico, agitando hasta una completa solubilización que se afora a 50 ml con etanol.

Método y fundamento. La determinación del contenido de sulfato se basa en el método de Terho y Hartiala (33), de acuerdo al cual la estimación de sulfato presente en glucosaminoglucanos se realiza mediante una hidrólisis ácida de los com-

puestos a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 15 horas para obtener el sulfato inorgánico, y rodizonato de sodio el cual forma con el ion bario 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 del compuesto colorido, por lo que la disminución de la coloración será inversamente proporcional a la concentración de sulfato. La curva patrón se construyó estimando la pendiente de un promedio de 12 repeticiones del siguiente procedimiento: De una solución de sulfato de sodio al 0.0147% se toman alícuotas de 0,20,40,60,80 y 100  $\mu\text{l}$ , se colocan en tubos por separado y se agrega a cada alícuota 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCl.HNO}_3.\text{H}_2\text{O}$ , se hidrolizan a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 15 horas y se evaporan a sequedad con  $\text{N}_2$ . A cada alícuota hidrolizada y evaporada se le agregan 500  $\mu\text{l}$  de agua, 2 ml de etanol, 1 ml de cloruro de bario, 1.5 ml de rodizonato y se dejan reposar 10 min en oscuridad. Leer absorbancia a 520 nm, gráfica No. 3.

### Acido siálico.

#### Reactivos:

- ácido N-acetil neuramínico Sigma al 0.03%
- ácido sulfúrico 0.1 N
- metaperiodato de sodio al 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 ácido siálico se efectúa utilizando el método de Warren (34), el cual se basa en la oxidación del ácido neuramínico por medio de periodato, oxidación que resulta en la formación del ácido 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 presenta a 550 nm. La curva patrón se construyó estimando la pendiente de un promedio de 12 repeticiones del siguiente procedimiento: De una solución de ácido N-acetil neuramínico al 0.03% se toman alícuotas de 0,10,20,30,40 y 50  $\mu$ l, se colocan en tubos por separado y se agregan respectivamente 50,40,30,20, 10 y 0  $\mu$ l de agua. Las alícuotas son tratadas con 100  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  e hidrolizadas a 80°C durante 1 hora, agregar 50  $\mu$ l de  $NaIO_4$ , dejar en reposo 20 min a temperatura ambiente, inmediatamente se agregan 500  $\mu$ l de  $NaASO_4$ , 1500  $\mu$ l de ácido tiobarbitúrico y se colocan a baño maría durante 15 min a 92°C, adicionar 4 ml de ciclohexanona y centrifugar a 2500 rpm durante 10 min. Leer la absorbancia a 550 nm, gráfica No. 4.

Hexosaminas.

**Reactivos:**

- solución 10 mM de N-acetil D-glucosamina Merck
- 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%
- hidrocloruro de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona al 0.25%
- cloruro férrico anhidro al 0.5%.

Método y fundamento. La determinación de hexosaminas se realiza utilizando el método de Smith y Gilkerson (35), el cual se basa en la determinación del cromóforo formado por interacción del hidrocloruro 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 anhidrohexosas formadas, y tiene una longitud de onda de absorción máxima de 650 nm.

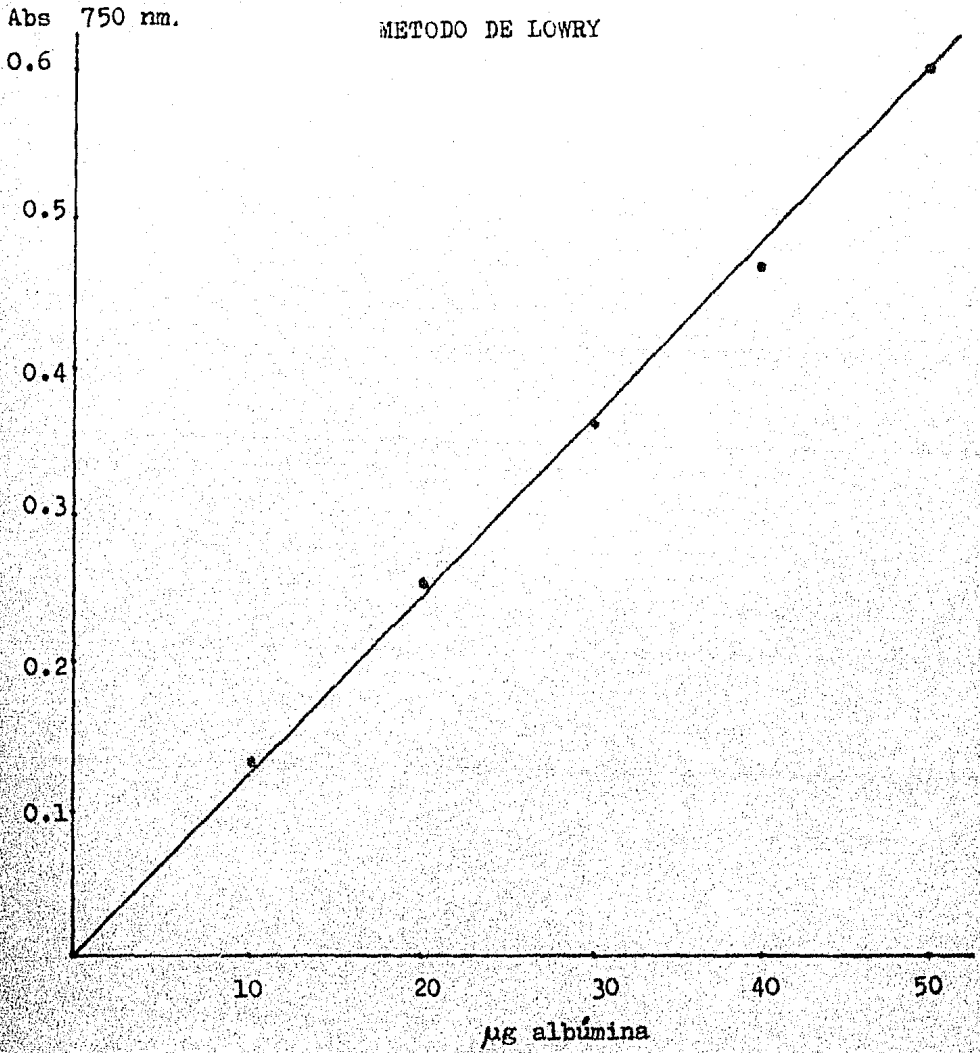
La curva patrón se construyó estimando la pendiente de un promedio de 12 repeticiones del siguiente procedimiento: De una solución de N-acetil D-glucosamina 10 mM se toman alícuotas de 0, 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{l}$ , se colocan en tubos por separado y se agregan respectivamente 50, 40, 30, 20 y 10  $\mu\text{l}$  de agua. Adicionar a cada alícuota 150  $\mu\text{l}$  de HCl e hidrolizar a 110°C durante 2 horas, agregar 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaNO}_2$  y dejar re-



posar a temperatura ambiente 15 min; adicionar 200  $\mu$ l de  $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$  y dejar reposar 15 min a temperatura ambiente, posteriormente agregar 200  $\mu$ l de MBTH y colocar en bañ $\text{o}$  mar $\text{ía}$  durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ , agregar 200  $\mu$ l de  $\text{FeCl}_3$  y colocar en bañ $\text{o}$  mar $\text{ía}$  durante 5 min a  $37^\circ\text{C}$ . Leer absorbancia a 650 nm, gr $\text{á}$ fica No. 5.

Las cantidades de los proteoglucanos y las correspondientes a los diferentes componentes de estos compuestos obtenidos del plasma seminal de pacientes, ser $\text{á}$ n comparadas con las obtenidas de sujetos normales y mediante un an $\text{á}$ lisis de la prueba de "t" de student's no apareada, se determinar $\text{á}$  la significancia estadística de las diferencias que se obtengan en los distintos grupos estudiados.

GRAFICA No. 1  
CURVA PATRON DE PROTEINAS  
METODO DE LOWRY

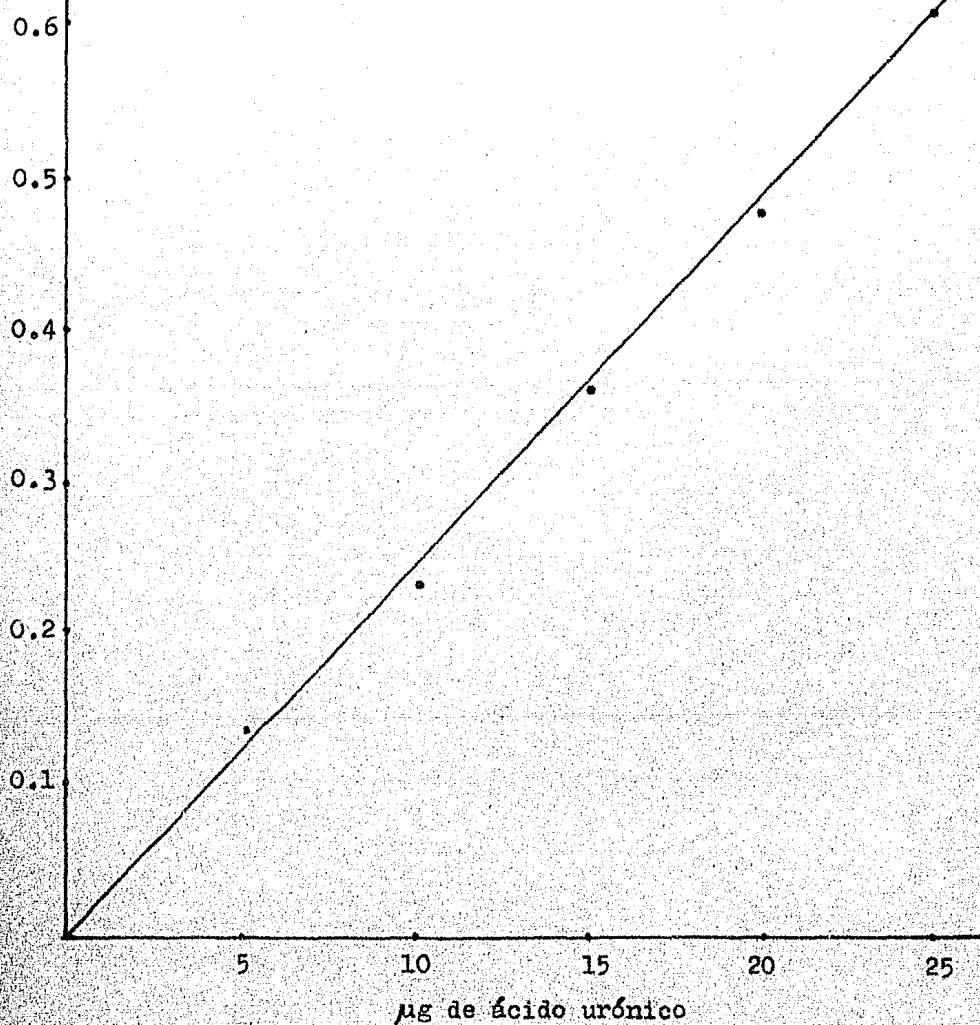


## GRAFICA No. 2

## CURVA PATRON DE ACIDOS URONICOS

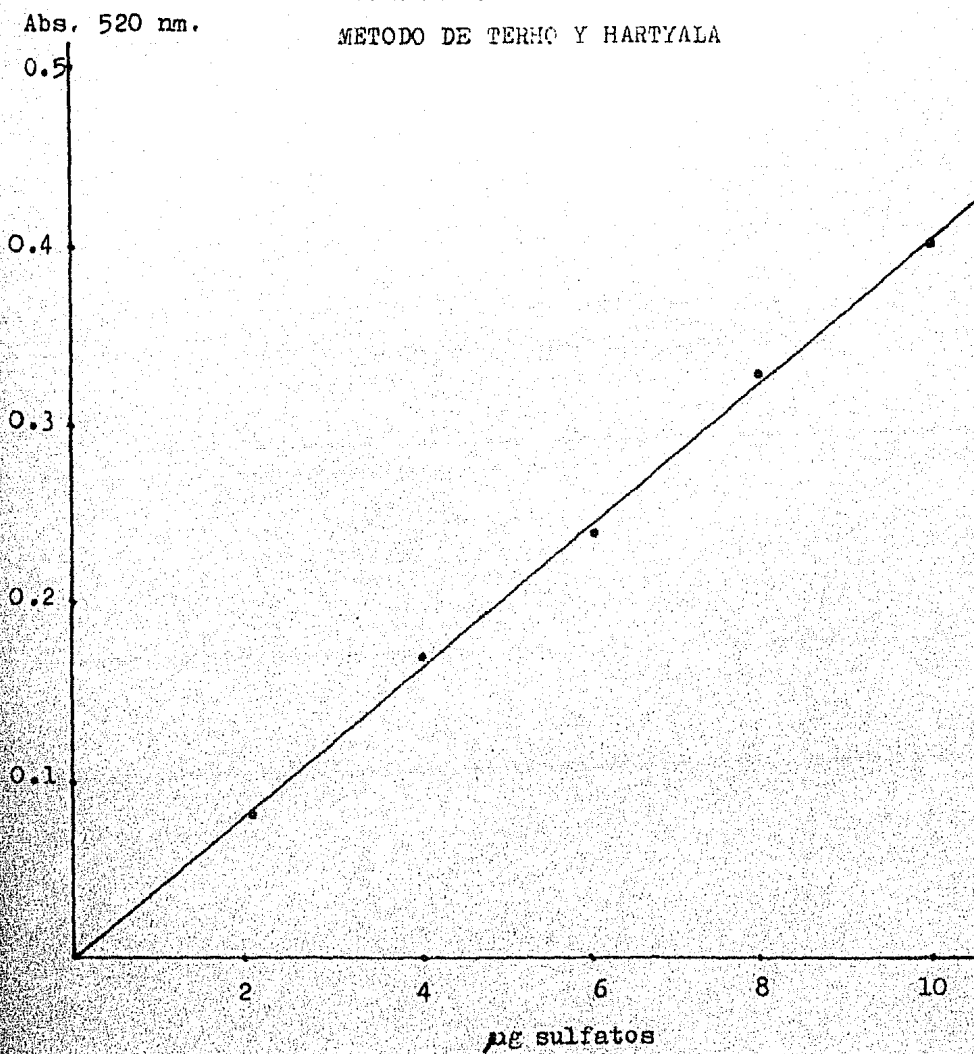
## METODO DE BITTER Y MUIR

Abs. 530 nm.

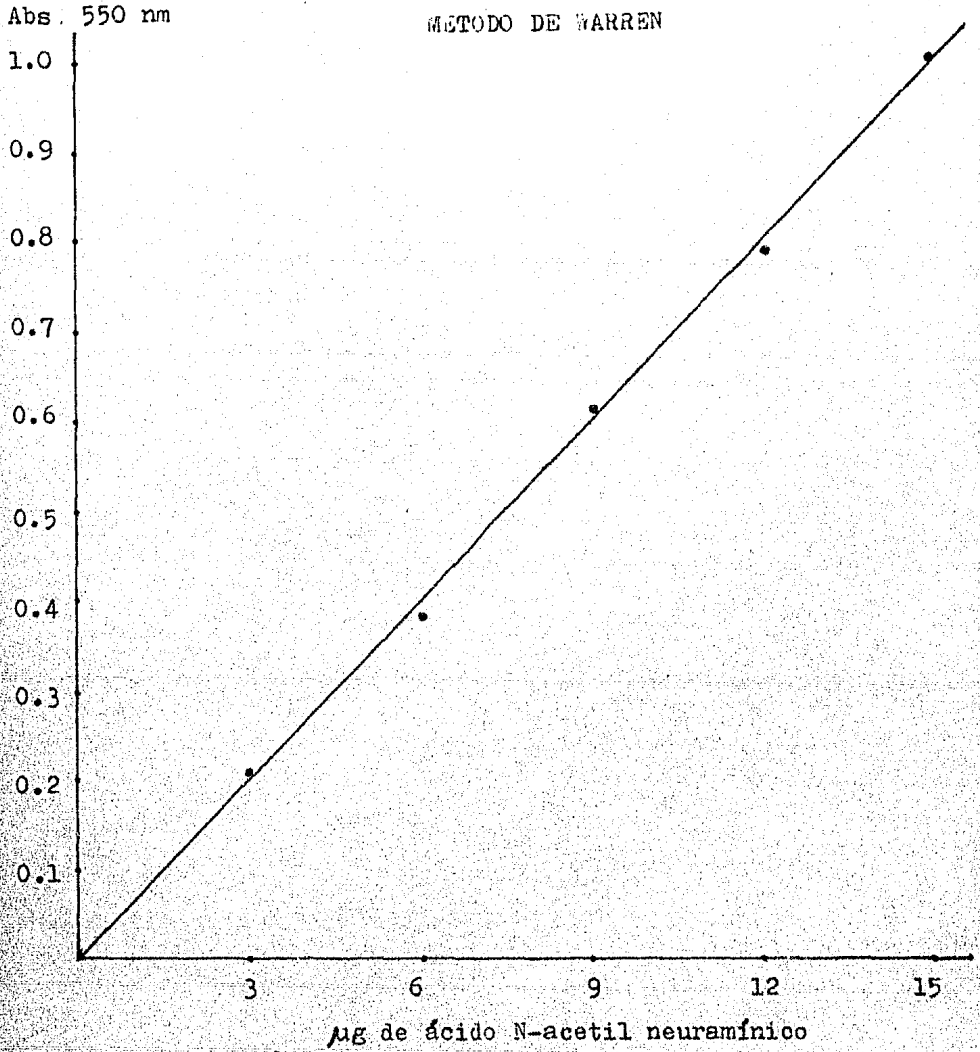


## GRAFICA No. 3

CURVA PATRON DE SULFATOS  
METODO DE TERHO Y HARTYALA



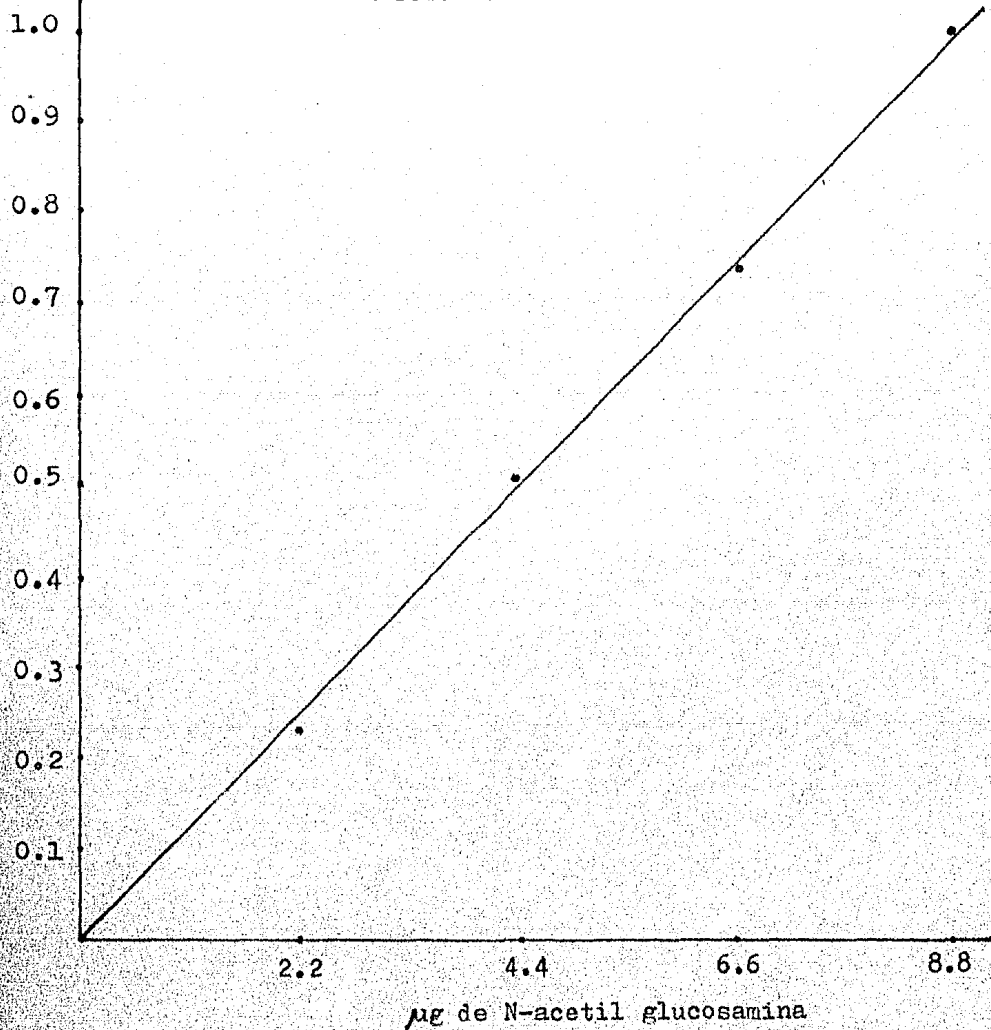
GRAFICA No. 4  
CURVA PATRON DE ACIDO SIALICO  
METODO DE WARREN



## GRAFICA No. 5

CURVA PATRON DE HEXOSAMINAS  
METODO DE SMITH Y GILKERSON

Abs. 650 nm.



RESULTADOS.

## V.- RESULTADOS

El volumen vacío de la columna de sefacril S-200 con las características experimentales ya descritas, fue de 112.5 ml (figura 4). La distribución de proteínas definió el perfil de filtración que se muestra en la figura 5, el cual se obtuvo determinando inmediatamente los valores de absorbancia registrados a una longitud de onda de 280 nm de cada una de las fracciones colectadas. La distribución de ácidos urónicos y ácido siálico en el perfil de filtración cromatográfica de cada una de las fracciones colectadas se muestra en las figuras 6 y 7 respectivamente. Estos valores fueron graficados junto con el perfil de filtración de proteínas con el objeto de determinar la distribución de los proteoglucanos en cada uno de los casos estudiados tomando como base la presencia de ácido urónico (figuras 8 a la 11). Todas las fracciones que dieron reacción positiva al ácido urónico, eluyeron en tres regiones (A, B y C) diferentes en los perfiles de filtración. Los casos de normozoospermia y oligozoospermia se caracterizaron por presentar en su perfil de filtración, solamente las regiones A y C (figuras 8 y 9), en cambio los pacientes con astenozoospermia y azoospermia presentaron las tres regiones de elución del ácido urónico (figuras 10 y 11 respectivamente). Las fracciones que definieron las tres regiones de elución, se juntaron formando tres volúmenes distintos a los cuales se les de-



terminó la cantidad de: proteínas, ácidos urónicos, sulfatos, ácido siálico y hexosaminas. Los resultados de estas determinaciones se muestran en las tablas de la 3 a la 7 y los valores totales de cada uno de los componentes de los proteoglucanos de cada uno de los grupos de pacientes estudiados, se muestran en la tabla 8.

FIGURA No. 5

DISTRIBUCION DE PROTEINAS EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA FILTRACION CROMATOGRAFICA.

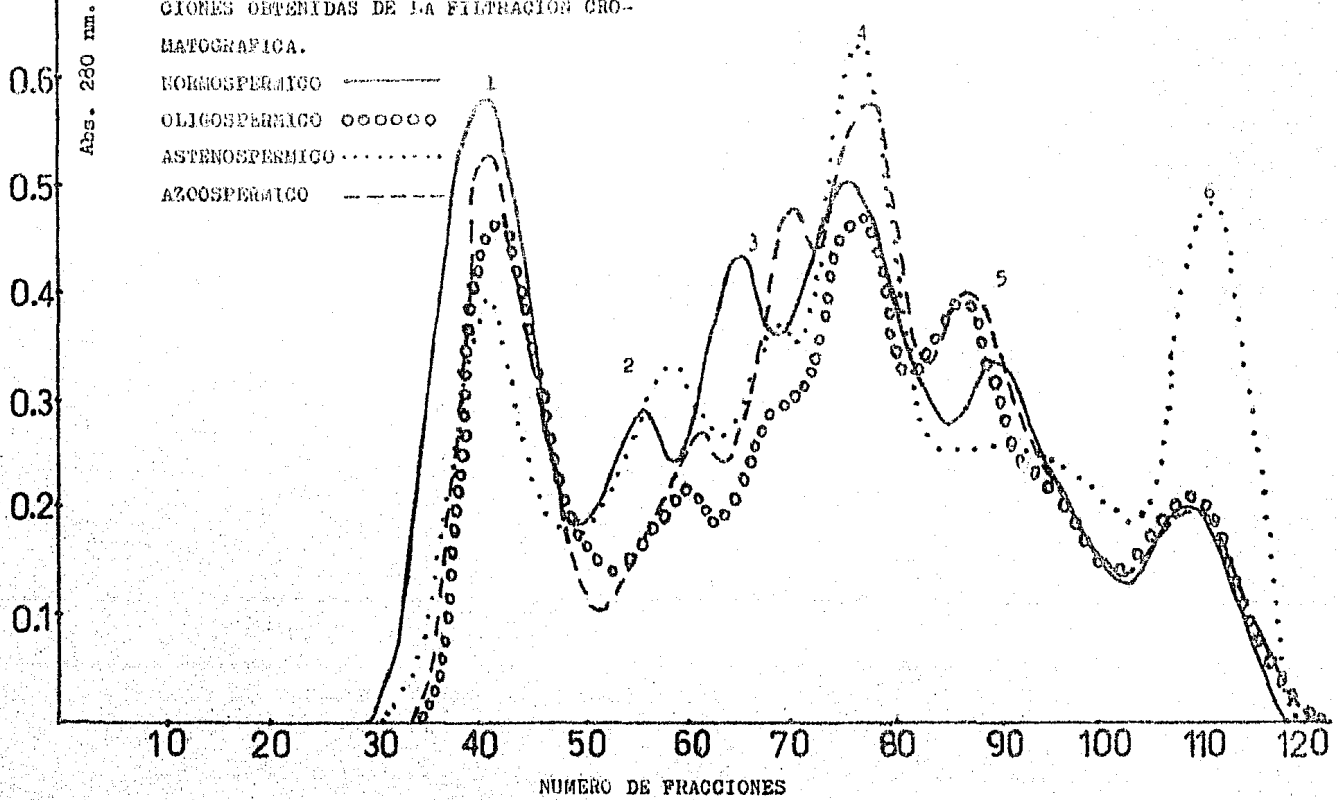
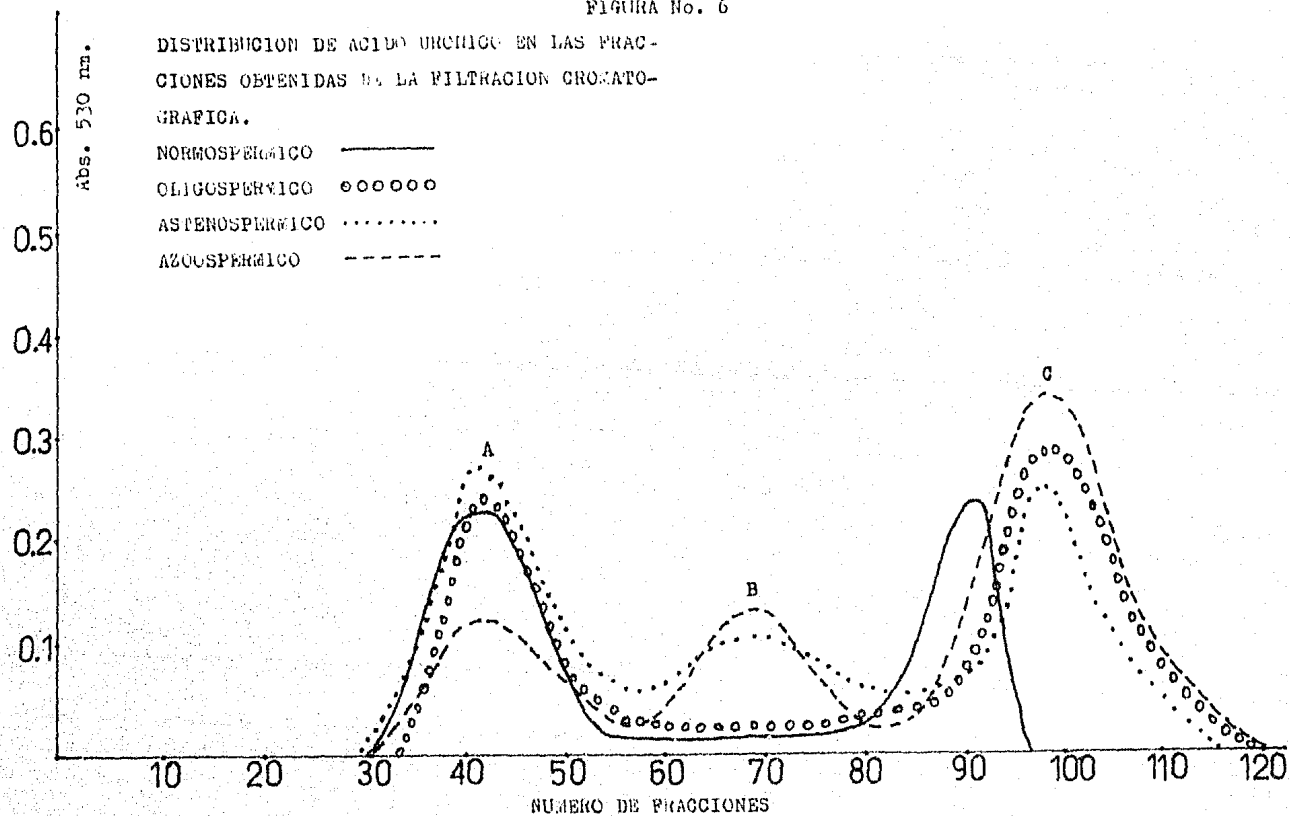


FIGURA No. 6



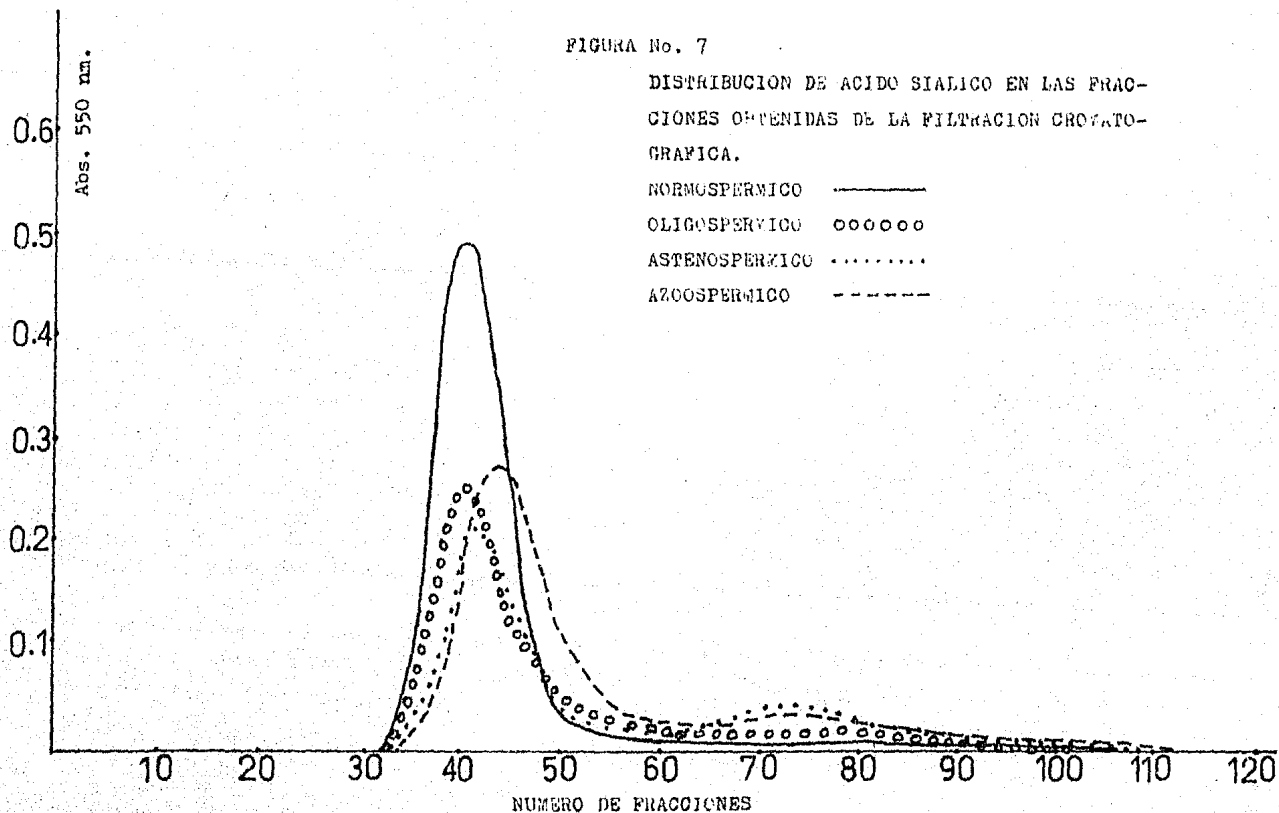


FIGURA No. 8

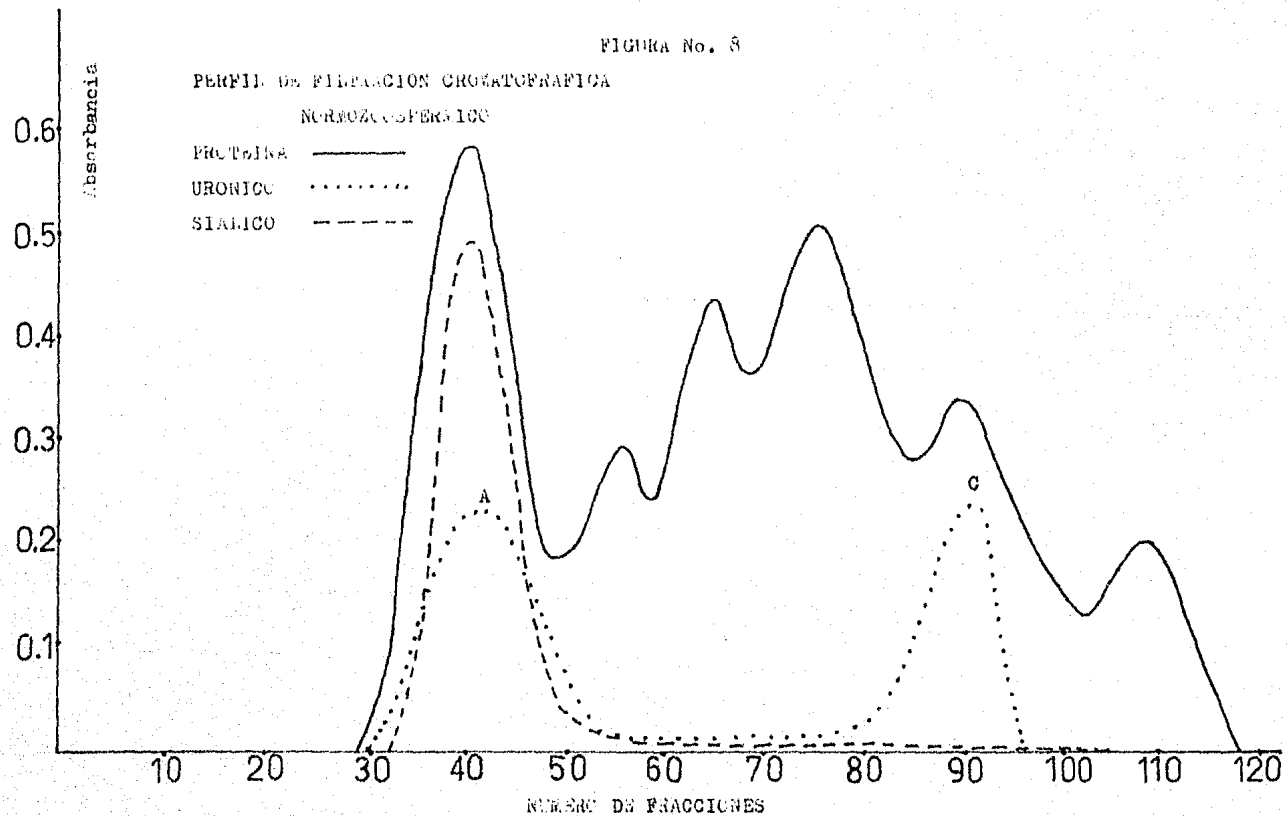


FIGURA No. 9

PERFIL DE FILTRACION CROMATOGRAPICA

OLIGOZOOSPERMICO

PROTEINA ———  
URONICO .....  
SIALICO - - - -

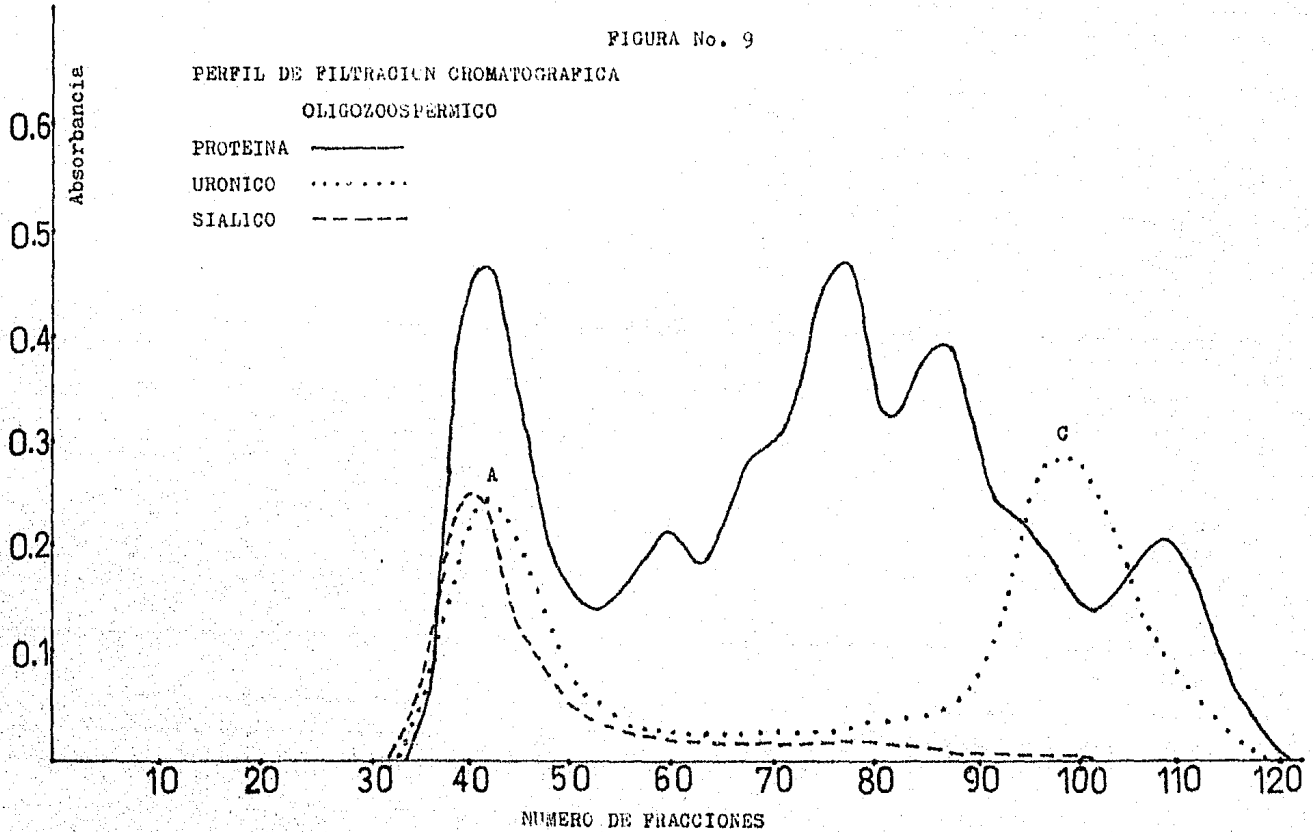


FIGURA No. 10

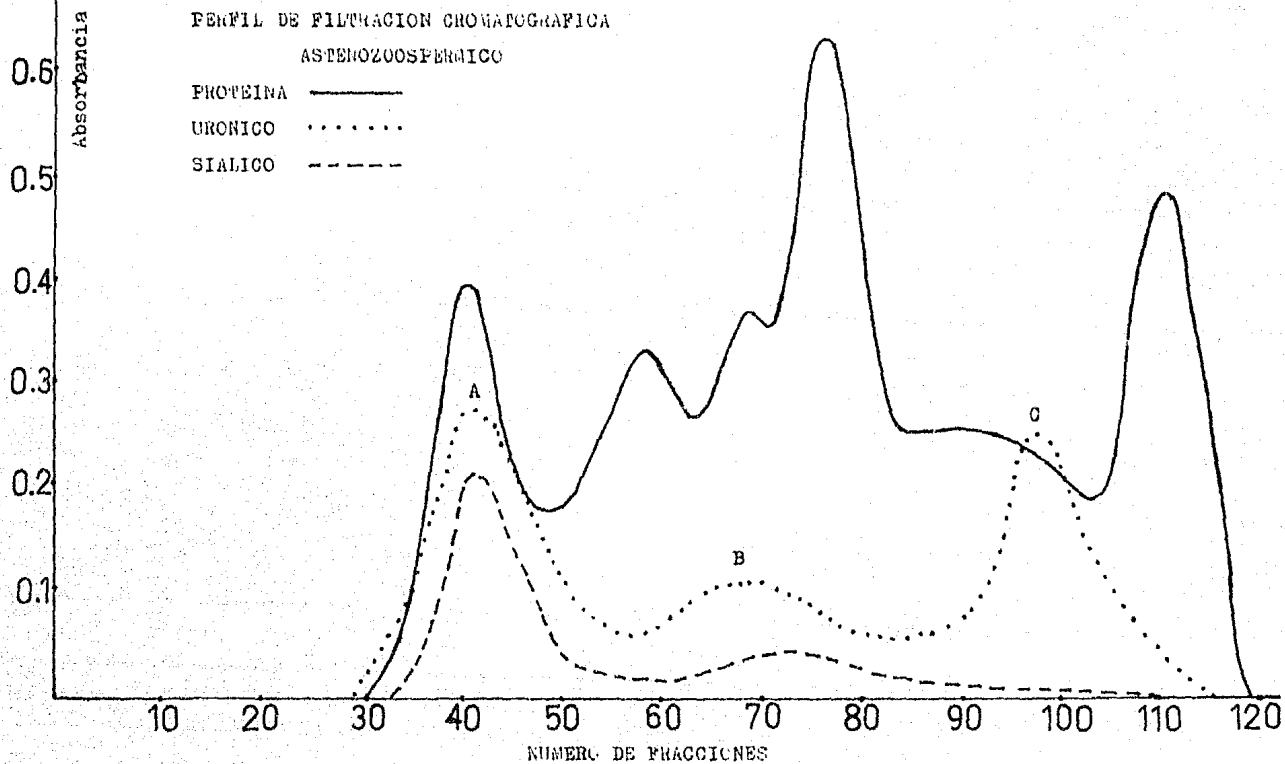
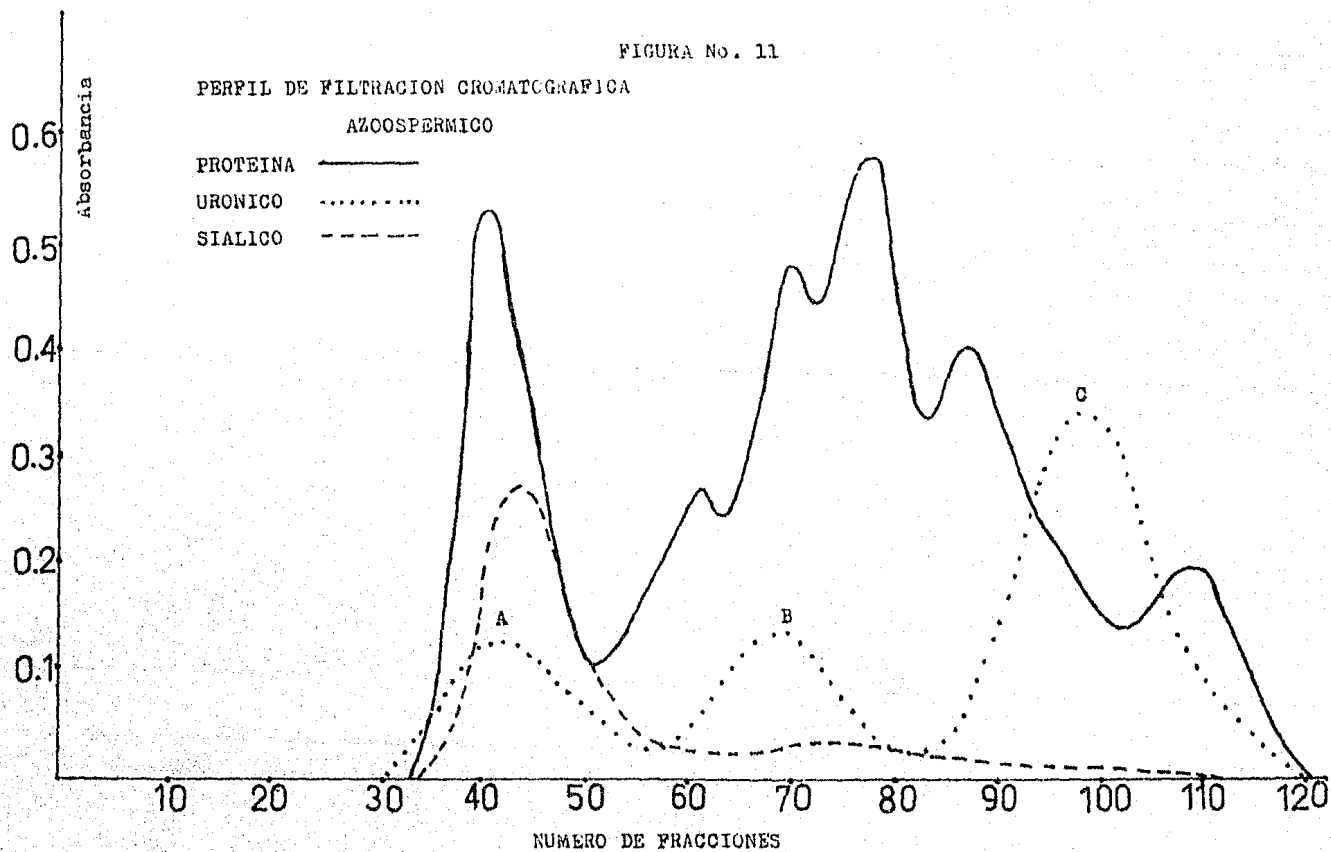


FIGURA No. 11





COMPOSICION QUIMICA DE LOS DIFERENTES  
 PROTEOGLUCANOS OBTENIDOS POR  
 FILTRACION EN COLUMNA.

Tabla No. 3.

PROTEINA  
 PROTEOGLUCANOS

DIFERENTES CASOS ESTUDIADOS	A	B	C
NORMOZOOSPERMICO	11.13 ±1.22		12.71 ±0.17
OLIGOZOOSPERMICO	7.23* ±0.86		18.81 ±5.70
ASTENOZOOSPERMICO	4.97* ±1.02	13.46 ±0.78	13.29 ±1.25
AZOOSPERMICO	9.20* ±0.53	11.68 ±1.08	5.55* ±0.97

Tabla No. 4.

URONICO

NORMOZOOSPERMICO	0.38 ±0.03		0.34 ±0.07
OLIGOZOOSPERMICO	0.40 ±0.05		0.57* ±0.09
ASTENOZOOSPERMICO	0.47 ±0.12	0.20 ±0.03	0.44 ±0.08
AZOOSPERMICO	0.27* ±0.02	0.34 ±0.07	0.58* ±0.05

Las cantidades están en mg/ml de Plasma Seminal y representan los valores promedio ± las desviaciones estándar de cuatro determinaciones.

\*P < 0.05 con respecto al normal.

COMPOSICION QUIMICA DE LOS DIFERENTES  
PROTEOGLUCANOS OBTENIDOS POR  
FILTRACION EN COLUMNA.

49

Tabla No. 5.

S U L F A T O S

P R O T E O G L U C A N O S

DIFERENTES CASOS ESTUDIADOS	A	B	C
NORMOZOOSPERMICO	0.34 $\pm 0.04$		0.27 $\pm 0.03$
OLIGOZOOSPERMICO	0.22 * $\pm 0.08$		0.40 $\pm 0.02$
ASTENOZOOSPERMICO	0.17 * $\pm 0.02$	0.35 $\pm 0.01$	0.45 * $\pm 0.01$
AZOOSPERMICO	0.089 * $\pm 0.02$	0.15 $\pm 0.02$	0.19 * $\pm 0.03$

Tabla No. 6.

S I A L I C O

NORMOZOOSPERMICO	1.82 $\pm 0.12$		0.04 $\pm 0.03$
OLIGOZOOSPERMICO	0.97 * $\pm 0.06$		0.03 $\pm 0.02$
ASTENOZOOSPERMICO	0.74 * $\pm 0.09$	0.21 $\pm 0.11$	0.03 $\pm 0.01$
AZOOSPERMICO	0.95 * $\pm 0.09$	0.18 $\pm 0.08$	0.02 $\pm 0.01$

Las cantidades expresan mg/ml de plasma seminal y representan valores promedio  $\pm$  la desviación estándar de cuatro determinaciones.

\*  $P < 0.05$  con respecto al normal.

COMPOSICION QUIMICA DE LOS DIFERENTES  
PROTEOGLUCANOS OBTENIDOS POR  
FILTRACION EN COLUMNA.

50

Tabla No. 7.

DIFERENTES CASOS ESTUDIADOS	HEXOSAMINAS		
	A	B	C
NORMOZOOSPERMICO	1.57 $\pm 0.11$		1.00 $\pm 0.13$
OLIGZOOSPERMICO	1.73 $\pm 0.56$		1.46* $\pm 0.13$
ASTENOZOOSPERMICO	1.55 $\pm 0.07$	0.74 $\pm 0.15$	1.83* $\pm 0.06$
AZOOSPERMICO	1.27* $\pm 0.05$	0.97 $\pm 0.14$	1.00 $\pm 0.18$

Las cantidades expresan  $\mu\text{g/ml}$  de plasma seminal y representan valores promedio  $\pm$  la desviación estándar de cuatro determinaciones.

\* $P < 0.05$  con respecto al normal.

CANTIDADES TOTALES DE CADA UNO DE LOS COMPONENTES  
DE LOS PROTEOGLUCANOS OBTENIDOS POR  
FILTRACION CROMATOGRAFICA.

Tabla No. 8

## GRUPOS ESTUDIADOS

COMPONENTES CUANTIADOS	NORMOZOOS PERMICO	OLIGOZOOS PERMICO	ASTENOZOOS PERMICO	AZOOS PERMICO
PROTEINAS	23.83 ± 1.39	26.04 ± 6.56	31.72 * ± 3.06	26.42 ± 2.59
ACIDO URONICO	0.72 ± 0.10	0.97 * ± 0.14	1.24 * ± 0.26	1.06 * ± 0.10
SULFATOS	0.60 ± 0.07	0.63 ± 0.26	0.96 * ± 0.04	0.44 * ± 0.06
ACIDO SIALICO	1.86 ± 0.24	1.00 * ± 0.08	0.98 * ± 0.22	1.14 * ± 0.10
HEXOSAMINAS	2.56 ± 0.25	3.20 ± 0.69	4.11 * ± 0.15	3.23 * ± 0.37
TOTALES	29.58 ± 2.00	31.92 ± 7.73	39.76 * ± 3.73	32.29 ± 3.23
<u>URONICO</u> <u>SIALICO</u>	0.38	0.97	1.26	0.92

Los valores están expresados en mg/ml de plasma seminal y representan cantidades promedio ± la desviación estándar de cuatro determinaciones.

\*P < 0.05 con respecto al normal.

DISCUSION.  
Y  
CONCLUSIONES.

## VI.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Analizando los patrones de filtración cromatográfica de las proteínas de las diferentes clases de plasma seminal estudiadas se observa que fueron muy semejantes y se caracterizaron por la elución de seis diferentes tipos de proteínas (picos 1,2,3,4,5,6 figura 5). Sin embargo se observó una tendencia a la disminución de la proteína del pico 1 en las tres patologías respecto al normozoospermico, esta tendencia fue mayor en los casos de astenozoospermia; aunque en este mismo caso hubo un aumento muy notable de la proteína del pico 6 (figura 5).

La distribución de ácido urónico se muestra en la figura 6 y tomando como criterio la presencia de ácido urónico para determinar la presencia de proteoglucanos (30), se encontraron tres categorías o tipos de proteoglucanos (A,B y C) de mayor a menor peso molecular. Las categorías A y C se encontraron solamente en normozoospermicos y oligozoospermicos figuras 8 y 9 mientras que el plasma seminal de pacientes con astenozoospermia y azoospermia presento las tres categorías A,B y C figuras 10 y 11 respectivamente.

Fue muy interesante observar que el ácido siálico se encontró fundamentalmente en el pico 1 del perfil de filtración de proteínas (figuras 7 a la 11), siendo mucho más abundante en el caso de normozoospermia en comparación con los casos de patología (figura 7).

La determinación cuantitativa de los diferentes componentes

de los proteoglucanos mostró que las concentraciones de proteína, sulfato y ácido siálico fueron mayores en los proteoglucanos del tipo A en los normozoospermicos en relación a los patológicos (tablas 3, 5 y 6 respectivamente).

Analizando los valores totales de cada uno de los componentes de los proteoglucanos de los diferentes grupos de pacientes estudiados tabla 8, se observa claramente que en general los grupos de pacientes astenozoospermicos y azoospermicos presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los normozoospermicos, en este sentido fue muy importante observar que los ácidos urónicos y el ácido siálico tuvieron un comportamiento inverso en sus cantidades totales, es decir, que mientras que el ácido urónico siempre fue menor en los normozoospermicos el ácido siálico siempre fue mayor. En consecuencia las relaciones de urónico/siálico fueron marcadamente diferentes en el plasma seminal de pacientes en relación a los sujetos normozoospermicos tabla 8. Este hallazgo en el presente estudio permite proponer la valoración de esta relación urónico/siálico como una prueba de valor clínico muy practica para determinar problemas de fertilidad en el varón tomando en consideración que invariablemente todas las patologías estudiadas tuvieron concentraciones mayores de ácido urónico y menores de ácido siálico estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a los normales (tabla 8).

Actualmente se esta experimentando para valorar más esta proposición en relación a la presencia de ácido siálico fundamentalmente en los proteoglucanos del tipo A. Es bien conocido que los carbohidratos presentes en plasma seminal de mamíferos se encuentran unidos principalmente a proteínas (36,37), en este sentido resulta necesario considerar la posibilidad de que alguna sialoglucoproteína se encuentre en asociación, tal vez por interacciones de tipo electrostático, con proteoglucanos lo cual explicaría la cantidad de ácido siálico detectado fundamentalmente en los proteoglucanos del tipo A.

Debido a la presencia de ácido urónico en este mismo pico permite proponer la posibilidad de la presencia de proteoglucanos conteniendo glucosaminoglucanos del tipo del Keratan sulfato ya que es el único mucopolisacárido que contiene ácido siálico (11). Este planteamiento se aclarará cuando se tengan los resultados de cromatografía en columna del material responsable de proteoglucanos del tipo A con el objeto de separar la sialoglucoproteína de los proteoglucanos (30).

Al someter a hidrólisis enzimática con papaína a los proteoglucanos de plasma seminal de sujetos normales y de oligo y astenozoospermicos para extraer los glucosaminoglucanos, se observó una mayor concentración de éstos en sujetos normales en comparación a los patológicos 53 mg/100 ml y 17 mg/100 ml



respectivamente (29). El significado biológico de estas diferencias pudiera ser una mayor estabilidad de la membrana de los espermatozoides de sujetos normales en comparación con los oligozoospermicos en los cuales se ha demostrado una mayor actividad glicolítica como consecuencia de mayor permeabilidad de la membrana en comparación con la glicólisis de espermatozoides de sujetos normozoospermicos (38), este hecho se apoya en lo que recientemente se ha descrito en cuanto a las pruebas in vitro de reacción acrosomal en espermatozoides de bovino, la cual no sucede en presencia de plasma seminal, debido a la presencia de cantidades importantes de glucosaminoglucanos en el plasma seminal de éstos mamíferos (39). Estos resultados apoyan la idea de que el plasma seminal además de funcionar como el medio natural de transporte de los espermatozoides, por sus características bioquímicas y fisicoquímicas; juega un papel determinante en la movilidad y sobrevivencia de los espermatozoides (6,7,8,10).

En el presente estudio se demostró la presencia de proteoglucanos en el plasma seminal humano obtenido de sujetos normales y de pacientes con problemas de fertilidad demostrados clínicamente. Una prueba de ello fue la reacción positiva al ácido urónico de algunas fracciones de la cromatografía (30), encontrándose diferencias en cuanto a la distribución de los proteoglucanos entre los casos de patolo-

gías estudiadas con respecto al normozoospermico.

Los resultados obtenidos en esta fase inicial del estudio, son 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 proteoglucanos presentes en el plasma seminal, en las cantidades y variaciones en su composición de alguna manera, al menos parcialmente, están participando en las características de fertilidad de los casos estudiados.

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

BIBLIOGRAFIA.

## VII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Knorr, K., Beller, F.K., Lauritzen, CH., Ahnefeld, F.W., Knorr, H., Roemer, H., Schuhmann, R., (1975). Manual de Ginecología. Ed. Científico-Médica, pp. 184-194. Barcelona España.
- 2.- Polakosky, K.L., Siner, F.N., Zaneveld, L.J., (1977). Biochemistry of human seminal plasma. In: Human semen and fertility regulation in men. Ed. E.S.E. Hafez, pp. 113,143, Saint Louis.
- 3.- 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.
- 4.- Zaneveld, L. (1975). The human ejaculate and its potential for fertility control. In: Control of male fertility. Ed. Sciarra, J., Markland, C., Speidel, J., pp. 41-53. University of Minnesota.
- 5.- Hafez, E.S.E. (1980). The semen. In: Human reproduction, Hafez, E.S.E. Ed. Harper & Row Pubs., Hagerstown, Maryland. U.S.A.
- 6.- Lindholmer, Ch. (1974). The importance of seminal plasma for human sperm motility. Biol. Reprod. 10: 533-545.
- 7.- Paz, G., Sofer, A., Homonnai, Z., and Kraicer, P., (1977). Human semen analysis: seminal plasma and prostatic fluid composition and interrelations with sperm quality. Int. J. Fertil. 22: 140-147.

- 8.- Corteel, J.M., (1979). Effects du plasma seminal sur la survie et la fertilité des espermatozoides conservés in vitro. *Reprod. Nutrit. Develop.* 76: 1111-1123.
- 9.- Huacuja, L., Sosa, A., Delgado, N.M., and Rosado, A. (1973). A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. *Life Sci.* 13: 1383-1394.
- 10.- Overstreet, J.W., (1980). The importance of seminal plasma for sperm penetration of human cervical mucus. *Fertil. Steril.* 34: 569-572.
- 11.- Muir, H., Hardingham, T.E. (1975). Structure of proteoglycans. In: *MTP International Review of Science, Biochemistry series on, Biochemistry of carbohydrates*. Ed. Whelan, W. H., pp.153-222. Baltimore, University Park U.S.A.
- 12.- Meyer, K. (1969). Biochemistry and biology of mucopolysaccharides. *Am. J. Med.* 47: 664-672.
- 13.- Muir, H. (1969). The structure and metabolism of mucopolysaccharides and the problem of the mucopolysaccharidoses. *Am. J. Med.* 47: 673-690.
- 14.- 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.
- 15.- Toledo, O., Dietrich, C.P. (1977). Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 498: 114-122.
- 16.- Lesson, C.R., Lesson, T.S. (1977). *Histología Ed. Interamericana México.*

- 17.- Muir, H. (1982). Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. pp. 613-622. University of Oxford, Oxford, U.K.
- 18.- Yanagishita, M., Rosbord, D., and Hascall, V.C.(1979). Isolation and Characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. J. Biol. Chem. 254: 911-920.
- 19.- Ax, R.L., Ryan, R.J. (1979). The porcine ovarian follicle. IV. Mucopolysaccharides at different stages of development. Biol. Reprod. 20: 1123-1132.
- 20.- Delgado, N.M., Huacuja, L.D., Reyes, R., Carranco, A., Reyes, A., Rosado, A. Datos no publicados.
- 21.- Lenz, R.W., Ax, R.L., Grimek, H.J., and First, N.L., (1982). Proteoglycans from bovine follicular fluid enhance an acrosome reaction in bovine spermatozoa. Biochem. Biophys. Res. Comm. 106: 1092-1098.
- 22.- Bellin, M.E., (1983). Proteoglycans production by bovine granulosa cells in vitro occurs in response to FSH. Mol Cell. Endocr. 29: 51-65.
- 23.- Delgado, N.M., Huacuja, L., Merchant, H., Reyes, R., and Rosado, A. (1980). Species specific descondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. Arch. Androl 4:305-313.
- 24.- Delgado, N.M., Reyes, R., Huacuja, L. (1982). Descondensation of human sperm nuclei glycosaminoglycans-sulfate from sea urchin egg. J. Exp. Zool. 224: 457-460.
- 25.- Bernal, A., Mercado, E., Calzada, L., and Hicks, J.J. (1983), Microsomal and plasma membrane Sialyltransferasa ac-

- tivity in rat epididymus. Archives of Andrology 11: 33-38
- 26.- Bernal, A., Torres, J., Reyes, A., and Rosado, A., (1980). Presence and regional distribution of sialyltransferase in the epididymus of the rat. Biology of Reproduction 23: 290-293.
- 27.- Zeneveld, L., (1979). Proposed clinical nomenclature. Amer. Soc. of Andrology. March 13-16. Houston, Texas.
- 28.- Belsey, M.A. (1980). Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Press Concern Singapore. World Health Organization, Switzerland, pp. 11-12.
- 29.- Huacuja, L. Datos no publicados.
- 30.- Grimek, H.J., Ax, R.L. (1982). Chromatographic comparison of chondroitin containing proteoglycans from small and large bovine ovarian follicles. Bioch. and Bioph. 104: 1401-1406.
- 31.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, N.L., and Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol Chem. 193: 265-275.
- 32.- Bitter, T., Muir, H. (1962). A method for the determination of uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4: 330-334.
- 33.- Terho, T., Hartiala, K. (1971). Method for determination of sulfate content of glycosaminoglycans. Anal. Biochem. 41: 471-476.
- 34.- Warren, L. (1963). Thiobarbituric acid assay of sialic acids. Meth. Enzimol. 6: 463-465.

- 35.- Smith, L., Gilkerson, E. (1979). Quantitation of glycosaminoglycans hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. Anal. Biochem. 98: 465-478.
- 36.- Man, T., and Lutwak, C.M. (1981). Male Reproductive and semen In: Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids: Application to Andrological problems. pp. 269-336. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York.
- 37.- Karagiannidis, A. (1972). Observations on the state of sialic acid in human and bovine seminal plasma. J. Reprod. Fertil. 28: 121-123.
- 38.- Pedron, N., Giner, J., Hicks, J.J., and Rosado, A. (1975). Glycolitic metabolism of sperm from normal, asthenospermic and oligoasthenospermic men. Fertil. Steril. 26: 309-314.
- 39.- Lee, H.CH., Handrow, R.R., Lenz, W.R., and Ax, L.R. (1985). Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. Gamete Research. 12: 345-355.