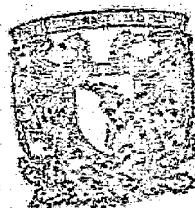


Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

EFFECTO DE ALGUNOS DETERGENTES SOBRE LA MEMBRANA Y FLUORESCENCIA INTRINSECA DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:

GUILLERMINA CASTRO

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.

CONTENIDO

	Pág.
I INTRODUCCION	2
II MATERIAL Y METODOS	7
III RESULTADOS	11
IV DISCUSION Y CONCLUSIONES	18
V BIBLIOGRAFIA	35
VI FIGURAS	39

I. INTRODUCCION

Parece ser que todas las membranas biológicas poseen una estructura molecular básica. El conocimiento de esa estructura se hace necesaria para entender cómo funcionan algunos sistemas celulares, ya que es la membrana plasmática el primer sitio de interacción de la célula con el medio ambiente.

A pesar de haberse propuesto varios modelos de como pueden estar organizados los lípidos y las proteínas en las membranas biológicas, todos ellos se basan en el primer modelo de la membrana sugerido por Danielli y Davson en 1935 (2), en el que consideraba una bicapa de lípidos cubierta en ambos lados de proteínas.

En 1950 Robertson, al observar al microscopio electrónico algunas membranas de células eucarióticas y procarióticas, describió una estructura de tipo trilaminar con una región de baja densidad a los electrones en la parte central y dos capas más densas a sus lados.

El estudio de la estructura de las membranas que procedían de fuentes diferentes, permitieron a Robertson (2) generalizar y formalizar su famoso concepto de "unidad membranal", con el que comprobaba el modelo de Danielli y Davson. Este modelo de Robertson alcanzó su máximo desarrollo al final de 1960, conduciendo a la formulación por otros autores de nuevos

modelos alternativos, los cuales consideraban a las proteínas como constituyentes integrales de la estructura de la membrana, sugiriendo que las membranas están formadas por capas discontinuas de lípidos y proteínas, formando subunidades repetidas de proteínas (2).

En la actualidad, el modelo propuesto por Singer y Nicolson en 1973 es el más aceptable para explicar la estructura de las membranas biológicas, ya que este modelo muestra una interacción entre los lípidos y las proteínas, en donde las proteínas se encuentran dentro o sobre la bicapa de fosfolípidos, resultando un mosaico fluido, que permite libertad de movimiento a las proteínas.

Este tipo de proteínas recibe el nombre de integrales, para diferenciarlas de las proteínas periféricas que están débilmente unidas a la estructura de la membrana. Las proteínas integrales generalmente anfipáticas, se orientan de tal forma que las regiones hidrofóbicas son secuestradas en el interior de la membrana y las regiones hidrofílicas se localizan en la superficie.

Se ha mencionado que el arreglo y la colocación de los fosfolípidos y las proteínas, así como la presencia de colesterol, parecen determinar las características fisiológicas membranales (3).

A pesar de todos esos conocimientos, las interaccio-

nes macromoleculares responsables de mantener la estructura nativa de la membrana, aún están pobremente entendidas (4). Para aclararlo han sido utilizados varios métodos fisicoquímicos que permiten estudiar la estructura membranal, dentro de los que podemos mencionar: la microscopía en el infrarrojo (5), la dispersión óptica rotatoria (6,7), la resonancia magnética del electrón (8) y la espectroscopía de la fluorescencia (9).

La aplicación de métodos fluorométricos, en el estudio de la estructura y función de las proteínas biológicas, se ha efectuado utilizando marcadores fluorescentes, que son denominados señalizadores extrínsecos e intrínsecos.

Los primeros son generalmente iónicos o electrostáticos y por ser moléculas con carga eléctrica, son atraídas por las cargas opuestas localizadas en la superficie membranal, o bien, dada su naturaleza anfipática pueden ser alojadas en regiones membranales de baja polaridad. Debido a que se localizan en la membrana, se pueden producir alteraciones en sus propiedades fluorescentes, como resultado de cambios de la estructura membranal. Tales reactivos son ejemplificados por el 1-anilino-8-naftalen sulfonato (10).

Los llamados señalizadores intrínsecos, son aquellos que forman parte de la membrana y entre estos se identifican los aminoácidos tirosina y triptofano.

La fluorescencia emitida por estos aminoácidos, ha -

permitido estudiar los cambios conforacionales que ocurren, tanto en las proteínas aisladas como en las proteínas membranales (13, 14).

Por lo tanto, el estudio de la modificación en la fluorescencia de los aminoácidos contenidos en las proteínas de las membranas de los espermatozoides, pueden dar luz sobre varios fenómenos en los que participa esta célula tan especializada, dentro de los que podemos mencionar: los procesos que permiten a los espermatozoides alcanzar su maduración en el tracto masculino, así como aquellos que ocurren en el tracto femenino y que le capacitan para fertilizar al óvulo. A pesar de que la membrana del espermatozoide juega un papel muy importante en los procesos antes mencionados (14), se han llevado a cabo pocos estudios para entender a nivel molecular, la participación membranal de la gámeto masculina, por lo que resulta de gran importancia (15,16), el estudio de los cambios que ocurren en la membrana del espermatozoide durante todos los eventos señalados.

Por esto resulta interesante, como paso inicial, cuantificar los aminoácidos del tipo de la tirosina y del triptófano, presentes en las proteínas membranales del espermatozoide humano, e inmediatamente determinar si la fluorescencia intrínseca de estos aminoácidos, contenidos en este tipo de membranas, refleja cambios membranales.

Para ello, estudiaremos los cambios estructurales pro

vocados por la acción de algunos reactivos, que se sabe modifican de manera importante la arquitectura membranal, aún a bajas concentraciones como son: el dodecil sulfato de sodio, bromuro de cetil trimetil amonio, la urea y el clorhidrato de guanidina.

II. MATERIAL Y METODOS

Material biológico. Las muestras de espermatozoides de humano, se obtuvieron por masturbación de pacientes clínicamente sanos y fueron depositados en vasos de polipropileno, dejándose reposar 30 minutos, tiempo suficiente para que la muestra licúe.

Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras fueron seleccionadas por un análisis microscópico que estudia: la movilidad, el número de espermatozoides y su morfología, así como la presencia de leucocitos y eritrocitos.

De aquellas muestras que aprobaron el análisis microscópico, se procedió a separar el plasma seminal de los espermatozoides, centrifugando el semen a 3,000 r.p.m. por minuto, durante 10 minutos. Con el fin de eliminar restos de proteínas contaminantes, el paquete de espermatozoides se lavó 3 veces con una solución de tris (hidroximetilamino metano) 0.050 M pH 7.4 suspendiendo el sedimento y repitiendo la centrifugación a la velocidad y por el tiempo ya indicados. Finalmente el sedimento se resuspendió en la misma solución, ajustando la concentración celular a 10^7 células/ml.

Material de laboratorio:

- a) Tubos de centrifuga de 13 ml de capacidad.
- b) Micropipetas Eppendorf de 5, 10, 20 y 100 ul.
- c) Pipetas volumétricas de 3 ml.

- d) Microscopio (Bausch and Lomb).
- e) Centrifuga (Sofeguard Clay Adams).
- f) Potenciómetro (Beckman Expandomatic SS-2).
- g) Espectrofluorómetro (Carl Zeiss Modelo PMQ II) equipado con una lámpara de Xenón de 250 watts.

Soluciones:

- A) Solución amortiguadora de tris-HCl (Merck-México) 0.50 M, pH 7.4.
- B) Solución 1 mM de triptofano (Sigma Chemical Co.).
- C) Solución 3 mM de tirosina (Sigma Chemical Co.).
- D) Solución 0.1 M de dodecil sulfato de sodio (Sigma Chemical Co.).
- E) Solución 0.1 M de bromuro de cetil trimetil amonio (Eastman Organic Chemicals).
- F) Solución 5 M de urea (Schwarz Bioreserch Inc.).
- G) Solución 5 M de guanidina-HCl (Eastman Organic Chemicals).

Método general. Las mediciones fluorescentes, se hicieron en el espectrofluorómetro Carl Zeiss, usando una abertura de la ventanilla de emisión de 1.4 mm y de 1.5 mm para la ventanilla de excitación. La sensibilidad del registrador (Servogor) se mantuvo fija en 5 mV.

Todas las determinaciones fueron hechas en celdas de cuarzo de 4 ml de capacidad y de un centímetro de vía óptica.

Los espectros de emisión se obtuvieron manteniendo

fijas las longitudes de onda de excitación (275 y 293 nm) y variando la longitud de onda de emisión entre 280 - 500 nm.

Espectro de emisión de la tirosina. En las celdas se colocaron 3 ml del amortiguador tris-HCl (solución A) y 5 ul de la tirosina (solución C). El espectro de emisión se obtuvo excitando a 275 nm.

Espectro de emisión del triptofano. A 3 ml de la solución A se adicionaron 20 ul de la solución de triptofano (solución B). El espectro de emisión fué obtenido excitando a 293 nm.

Espectro de emisión de una mezcla de la tirosina triptofano. En una celda conteniendo 3 ml del amortiguador A se agregaron, con una micropipeta Eppendorf 5 ul de la solución C y 20 ul de la solución B.

La concentración final de la tirosina fué de 5 μM y de 6.7 μM para el triptofano. Para esta mezcla se obtuvieron dos espectros de emisión, uno excitando a 275 nm y el otro utilizando 293 nm para la excitación.

Efecto de detergentes sobre una suspensión de espermatozoides eyaculados.

La titulación de los residuos de tirosina y triptofano, contenidos en una suspensión de 10^{10} espermatozoides en 3 ml de la solución A, fué llevada a cabo por la adición de cantida-

des crecientes de las soluciones de los detergentes. El espectro de la fluorescencia producido por los aminoácidos contenidos en estas células y su modificación por los detergentes, fue realizada inmediatamente después de cada adición del detergente.

III. RESULTADOS

La figura 1, muestra los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos de una solución 5.0 μM de tirosina, cuando fué excitada a 275 nm y el de una solución 6.6 μM de triptofano al ser excitada a 293 nm. Los máximos de fluorescencia se localizan en 305 y 350 nm para la tirosina y el triptofano respectivamente.

En vista de que en una proteína se presentan simultáneamente los residuos de la tirosina y del triptofano, es necesario estudiar la contribución de cada aminoácido en la región de fluorescencia máxima de otro aminoácido.

Con tal objeto, se determinó la contribución de cantidades crecientes de la tirosina (5, 7 y 10 μM), en el espectro de emisión de una solución de triptofano 6.6 μM . En cada concentración de tirosina adicionada, se midió el incremento en el área del espectro del triptofano producido (Fig. 2).

La figura 3, ilustra la correlación entre las nanomolas de tirosina adicionadas y el incremento del área.

También, es necesario contar con una curva, que relacione los incrementos en los espectros diferenciales de aquellas mezclas, en las que se mantiene constante la concentración de la tirosina y se varía la cantidad del triptofano presente (Fig. 4).

La figura 5, muestra el espectro diferencial de una suspensión de espermatozoides, observándose que éstos poseen un espectro de emisión de fluorescencia, semejante al de la mezcla de tirosina y triptofano.

La banda de fluorescencia de la tirosina, en el espermatozoide es muy difícil de observar, ya que la eficiencia cuántica de este aminoácido localizado en las membranas, es muy baja. La contribución de la tirosina a la fluorescencia total, se determinó en este trabajo, por medio de un espectro diferencial, el cual se obtuvo de la siguiente manera: a) Excitando primero a 275 nm y registrando el espectro correspondiente a la fluorescencia, representada por la emisión de los dos tipos de residuos, b) después de una normalización del espectro a 370 nm, se excitaron los residuos de triptofano a 293 nm, c) la diferencia entre las áreas de estos espectros, nos da una idea de la proporción con la que la tirosina contribuye a la fluorescencia total de la membrana. La figura 6 muestra los espectros obtenidos, al aplicar este procedimiento a una mezcla de tirosina - triptofano.

INTERACCION DE LOS ESPERMATOZOIDEOS CON LA UREA, EL CLORHIDRATO DE GUANIDINA, EL PODECIL SULFATO DE SODIO Y EL BROMURO DE CETIL TRIMETIL AMONIO.

Los cambios estructurales en las membranas proteicas, dan lugar a modificaciones en la eficiencia cuántica de emisión;

o a alteraciones en la posición de la banda de emisión máxima de las proteínas que las constituyen.

En este estudio se observó una alteración del espectro de fluorescencia de las células espermáticas, dependiendo del tipo de compuesto empleado.

Efecto de la urea sobre una suspensión de espermatozoides

La acción de la urea a una concentración de 4 M, sobre el espectro de emisión de una suspensión de espermatozoides, se muestra en la figura 7, en la cual se compara con un control sin ninguna adición. Se puede observar una disminución en la intensidad del espectro total de emisión, debido a los dos tipos de aminoácidos presentes en las proteínas de los espermatozoides humanos. Dicho efecto puede atribuirse, de acuerdo con la figura 8, a que la presencia de la urea, expone a un número mayor de tirosinas, lo que se explica fácilmente con el incremento del área del espectro diferencial y a la vez un efecto donde parece no haber variación de los residuos de triptofano; esto se deduce de la disminución en la intensidad del espectro total.

El efecto de la adición de cantidades crecientes de urea (1-5 M), sobre la fluorescencia a 275 nm de una cantidad constante de espermatozoides, se muestra en la figura 9; donde se observa un apaamiento proporcional a la concentración de urea presente en el medio, hasta alcanzar un máximo a una

concentración de 4 M. Un incremento mayor en la concentración de urea, no produce ningún aumento en el apagamiento.

Sin embargo, a la vez que se observa esta disminución de fluorescencia a una longitud de onda definida, el espectro se ensancha, dando por resultado un incremento en el área total. Por lo tanto, lo más notable de este experimento, es que la urea logra exponer un número mayor de residuos aromáticos, al aumentar su concentración y que el 80% de los residuos recién expuestos, corresponden a residuos de tirosinas.

Efecto del clorhidrato de guanidina sobre una suspensión de espermatozoides.

La figura 10, muestra la acción del clorhidrato de guanidina a una concentración 4 M sobre el espectro de emisión de una suspensión de espermatozoides, la que se compara con un control sin ninguna adición (Fig. 10 A).

Se observa que con la guanidina, hay una disminución de un 65% en la intensidad del espectro total de emisión, así como un desplazamiento del máximo de fluorescencia de 10 nm hacia longitudes de onda menores.

Como en el caso de la urea, estos efectos pueden atribuirse primero; a que la presencia del clorhidrato de guanidina expone en forma heterogénea a un número mayor de tirosinas (Fig. 11), la cual se puede explicar observando el incremento

del área del espectro diferencial y en donde, además, presenta una ligera disminución de los residuos del triptofano (12.8%).

El efecto de la adición de cantidades crecientes - del clorhidrato de guanidina (1-5 M), sobre la fluorescencia a 338 nm de una cantidad constante de espermatozoides, se muestra en la figura 12, donde se observa un apagamiento brusco de la intensidad de fluorescencia, al adicionar las dos primeras concentraciones, disminuyendo lentamente hasta llegar a 4 M.

Un incremento mayor en la concentración del clorhidrato de guanidina no muestra un apagamiento mayor. Sin embargo, a la vez que se observa esta disminución en la fluorescencia a una longitud de onda diferente (350 nm), el espectro se ensancha dando por resultado una ligera disminución en el área total.

Efecto del dodecil sulfato de sodio sobre una suspensión de espermatozoides.

La disminución de la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides, producida por su interacción con el dodecil sulfato de sodio (0.32 - 3.1 mM), se muestra en la figura 13, donde se compara con el espectro normal de los espermatozoides.

La figura 14, muestra el apagamiento de la fluorescencia de la suspensión de espermatozoides, en función de la -

concentración del dodecil sulfato de sodio.

Resulta obvio, que el dodecil sulfato de sodio a concentraciones entre 0.32 y 1.60 mM, produce un abatimiento brusco de la fluorescencia, cuando se compara con los experimentos en los cuales se usa el clorhidrato de guanidina. Como se observa, a concentraciones de 1.92 mM, la emisión de la fluorescencia se mantiene constante.

Resulta notable las bajas concentraciones que se requieren de este detergente, para reducir la fluorescencia nativa en 57%, cuando se compara con las concentraciones necesarias, para lograr un efecto similar de los otros compuestos estudiados.

Cuando se cuantificó el contenido de tirosina y triptofano de las preparaciones tratadas con dodecil sulfato de sodio, se observó, que hay una exposición constante de los residuos de tirosina y triptofano hasta alcanzar una concentración de 1.92 mM de dodecil sulfato de sodio, a partir de la cual no hay cambios apreciables. Como es natural los residuos de triptofano disminuyen al aumentar la concentración del dodecil sulfato de sodio, pero desde 0.36 mM no existe ninguna variación (Pl. 15).

Efecto del bromuro de cetil amonio (CTAB) sobre una suspensión de espermatozoides.

Para observar en la figura 16, que a diferencia

de los otros compuestos estudiados, la unión del CTAB provocó un aumento de un 31%, en la intensidad de la fluorescencia de los espermatozoides. El cambio obtenido en el espectro, puede ser comparado con un espectro control de los espermatozoides sin CTAB. Este aumento de la intensidad de la fluorescencia, se produjo desde la concentración más baja adicionada.

El incremento en la concentración del CTAB en el medio, no produjo un aumento mayor en la fluorescencia hasta la concentración de 1.9 mM después de la cual, se presenta solamente un aumento de un 11%. Sin embargo, nunca se obtuvo una intensidad de fluorescencia menor a la del control, por lo que se deduce que no hay correlación entre un aumento o una disminución y la concentración del CTAB como se ilustra en la figura 17.

La figura 18 pone de manifiesto, la contribución de la tirosina a la fluorescencia total, en presencia del CTAB, esta concentración expresada en nanomolas de tirosina, se compara con los valores calculados para el triptofano. Se puede observar que desde 0.32 mM de CTAB, existe un aumento gradual de los residuos de tirosinas expuestas, hasta que a concentraciones de 1.52 o mayores, el contenido de los residuos de tirosina permanece constante; mientras que el número de residuos expuestos del triptofano sufre un cambio rápido, mostrando después de una concentración de 0.32 mM dos mesetas, una de mayor exposición hasta 1.52 mM y una segunda entre 1.92 y 3.12 mM, en donde un número menor de residuos expuestos se presentan.

IV. DISCUSION

Por lo complejo de esas estructuras, se requiere de un método singular, que nos permita estudiar adecuadamente es - tos cambios, el empleo de la fluorescencia producida por los - aminoácidos aromáticos constituyentes naturales de las proteí - nas, parece ser un monitor "sensible y natural", que permite determinar aunque sea en forma indirecta, los cambios conformacionales que ocurran en aquellas proteínas que forman parte de dichas membranas.

A pesar de sus ventajas, la fluorescencia tiene limi - taciones, ya que los perfiles de los espectros obtenidos de las soluciones proteicas, pueden ser afectadas por una gran varie - dad de condiciones.

Se han realizado varios estudios, en los cuales se - intenta dar una explicación lógica, a la diferencia observada - entre los espectros obtenidos de las soluciones de los aminoáci - dos aromáticos libres y cuando estos aminoácidos están incorpo - rados en un péptido o en una proteína. Y se sabe, de ciertas hipótesis que tratan de dar solución a dicho problema.

LEHRER y KERWAR (17), estudiaron la fluorescencia in - trínseca de las formas nativa y fibrosa de la actina (la actina G y la actina F), obteniendo alguna información de las diferen - cias conformacionales y logrado separar las contribuciones de - la fluorescencia de la tirosina y del triptofano dentro de la - fluorescencia nativa total.

WALLACH y COLABORADORES (10) encontraron también que, en las membranas de eritrocito de humano, existe una transferencia significativa de energía de la tirosina al triptofano membranar, cuando utilizaron un señalador fluorescente, el 1-anilino-8-naftalen sulfonato (ANS), que por las características de su espectro fluorescente de información de los cambios estructurales rápidos que ocurren en la membrana y que generalmente se ven acompañados de su actividad biológica.

KRONMAN (18) por ejemplo, indica que en la alfa-lactoalbumina, existen algunos residuos aromáticos expuestos y otros ocultos, observando que la banda de fluorescencia de los grupos expuestos, está próxima la banda de emisión máxima de la fluorescencia del triptofano en solución acuosa (350 nm), por lo que se debe de considerar, una diferencia de polaridad en la vecindad inmediata a los grupos expuestos y a los grupos ocultos.

En la literatura hay poca información de la cantidad de residuos aromáticos en membranas de espermatozoides de humano, por lo que no es posible saber la cantidad de residuos aromáticos expuestos y ocultos presentes en dicha membrana, sin embargo, aplicando la hipótesis de KRONMAN (18), a nuestro sistema de células enteras, podemos calcular la presencia de grupos aromáticos, con diferentes grados de accesibilidad.

En el espectro de fluorescencia de los espermatozoides, no aparece el máximo de emisión correspondiente a la tirosina (305 m μ , Fig. 1), aunque dicho máximo sí se presenta en -

una mezcla de tirosina y triptofano (Fig. 6). Este fenómeno se cree es producido, en parte, por la formación de enlaces entre hidroxilos fenólicos y los carboxilatos adyacentes (19) y además por la pérdida de la energía de excitación de las tirosinas libres, a causa de la formación de dicho enlace (20). A pesar de ello, los resultados en este estudio, indican que hay una contribución importante de la tirosina en la fluorescencia del espermatozoide.

INTERACCION DE LA UREA, CLORHIDRATO DE GUANIDINA, DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) Y EL BROMURO DE CETIL TRIMETIL AMONIO (CTAB) CON LAS MEMBRANAS DEL ESPERMATOZOIDE.

Para estudiar los cambios relacionados con el desdoblamiento y redoblamiento de proteínas purificadas (22,25), se ha requerido del uso de desnaturalizantes en cantidad suficiente, para desestabilizar la conformación nativa y producir el estado totalmente desdoblado.

Los desnaturalizantes más ampliamente usados, ha sido la urea y el clorhidrato de guanidina. La urea fué inicialmente utilizada, pero ha sido sustituida por un desnaturalizante más potente, que es el clorhidrato de guanidina (21). La explicación física exacta de la capacidad desnaturalizante de esos dos reactivos, no queda aún clara, sin embargo los estudios con compuestos modelo, sugieren que los reactivos actúan incrementando la solubilidad en agua de las porciones hidrofóbicas de las pro-

teínas (26,27), mientras mantienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno con los disolventes acuosos figura 19 (28).

El desdoblamiento de las proteínas a bajas concentraciones de esos reactivos, generalmente es poco, pero al alcanzar una concentración crítica, ocurre un desdoblamiento abrupto. A concentraciones superiores a esta, las propiedades físicas de las proteínas cambian poco. Aunque ese desdoblamiento repentino también se observa en el caso de la urea y el clorhidrato de guanidina, con estos últimos reactivos se ha observado un desdoblamiento gradual y continuo.

Tomando en cuenta todos los datos obtenidos, se ha hecho una extrapolación de "concentración cero" del desnaturizante, para tratar de ofrecer una descripción dinámica de una proteína estable bajo condiciones "normales" (23).

Aunque se sabe poco de la interacción de estas sustancias con las proteínas de las membranas espermáticas, se han obtenido algunos resultados, que permiten deducir posibles cambios estructurales en el espermatozoide de humano eyaculado.

De los patrones obtenidos en este estudio, como resultado de las interacciones de la urea, el clorhidrato de guanidina y el dodecil sulfato de sodio con las células espermáticas, se puede concluir lo siguiente: a) Una disminución del espectro total de emisión; b) Un desplazamiento de la máxima emisión de la fluorescencia, hacia longitudes de onda menores

y c) Una exposición aparentemente mayor, de los residuos de tirosina simultáneo a un ocultamiento de los residuos de triptofano.

UREA Y CLORHIDRATO DE GUANIDINA

El mecanismo detallado de la acción de ciertos desnaturizantes como son la urea y el clorhidrato de guanidina (26, 29), es objeto de discusión, pero parece que ambos actúan solvatando en forma homogénea todas las partes del polipéptido desdoblado, aumentando la solubilidad en agua de las partes hidrofóbicas de las proteínas; mientras que mantienen la capacidad de la formación de puentes de hidrógeno de los polipéptidos con el disolvente acuoso (28).

Las interacciones energéticas hidrofóbicas, pueden ser determinadas por una relación empírica ($22 \text{ a } 24 \text{ cal/\AA}^2$), entre el área de la superficie encajada y la energía libre requerida para transferir esa superficie del agua a un disolvente orgánico, cuya constante dieléctrica semeja al interior de la proteína (30, 31). Tal relación es válida, para obtener la energía libre de transferencia de las cadenas laterales de los aminoácidos, del agua en urea 8 M ó clorhidrato de guanidina 6 M (26, 27, 29).

a) UREA. La mayoría de las cadenas laterales de los aminoácidos, muestran en urea 8 M, un comportamiento que sugiere que las interacciones hidrofóbicas, disminuyen su energía en

urea 8 M a valores entre 15 y 17 cal/A². Las cadenas laterales que poseen átomos polares, muestran un comportamiento similar, sugiriendo que la urea 8 M es tan débil como el agua en la formación de uniones de hidrógeno con el agua.

Las relaciones empíricas confirman la explicación dada por varios autores, de como la urea y el clorhidrato de guanidina desdoblán a la proteína. Sin embargo, se debe de mencionar que las interacciones hidrofóbicas en urea 8 M ó en clorhidrato de guanidina 6 M, se reducen aproximadamente a un tercio.

Es probable que las proteínas desdobladas y en esos disolventes, tengan el mismo tipo de interacciones con el disolvente en todas sus conformaciones, por lo que no podrían mostrar completamente la conformación al azar.

Se ha observado que la urea 8 M y el clorhidrato de guanidina 7 M, no rompen la conformación alfa-hélice de los polímeros sintetizados a partir de aminoácidos hidrófobos (32).

Hay también una gran posibilidad de que ocurran - - ciertos tipos de interacciones "específicas", entre los desnaturizantes y las proteínas (33), por lo que es factible que - tales desnaturizantes induzcan conformaciones helicoidales - en los polipéptidos desdoblados (34), por lo tanto, no debe sorprender que las proteínas, presenten conformación en presencia de tales desnaturizantes.

c) CLORHIDRATO DE GUANIDINA. La conformación esteri-

da permite caracterizar la conformación de las proteínas y determinar si a pesar del tratamiento existen regiones estructuradas. Las concentraciones del clorhidrato de guanidina utilizadas, son suficientemente altas para asegurar que la transición del estado desnaturalizado sea completo en las proteínas estudiadas (35).

Sin embargo, ha sido mostrado por AUER y DOTY (32), que algunos polipéptidos sintéticos como la polileucina y la polifenilalanina, conservan regiones estructuradas cuando están disueltas en clorhidrato de guanidina 6 M a temperatura ambiente.

NOSAKI y TANFORD, observaron que en proteínas aisladas o purificadas, el tratamiento con este reactivo produce en las proteínas estudiadas, verdaderos enrollamientos al azar y que ninguna de ellas retiene parte de la conformación nativa original (36). Por ejemplo la ribonucleasa, adquiere la conformación al azar aun cuando los puentes disulfuro permanecen intactos (37).

Ya que las proteínas son muy heterogéneas en su composición de aminoácidos, cuando éstas se comportan en presencia del reactivo como enrolladas al azar, no quiere decir necesariamente que tengan esa conformación; implica que existe flexibilidad entre los monómeros, a lo largo de la cadena polipeptídica. Se puede suponer que algunas regiones de la cadena polipeptídica conservan su estructura rígida, formando una o más zonas semejando esferas (34).

NOSAKI y TANFORD observaron también, que las interacciones electrostáticas intramoleculares, entre los grupos con carga en las moléculas de aminoácidos aromáticos no son afectadas por la presencia de altas concentraciones de este reactivo (37). En los casos observados por TANFORD, se pudo observar que la formación de puentes debido a enlaces disulfuro, afectan la viscosidad ya que restringen las diferentes conformaciones que en un momento dado podría adquirir la proteína.

Está bien demostrado que en las membranas de los espermatozoides, las proteínas exógenas muestran una gran estructuración, que depende de los puentes disulfuro presentes en gran cantidad.

La acción de la urea como del clorhidrato de guanidina sobre una suspensión de espermatozoides, mostró un apagamiento energético de la fluorescencia; lo cual puede atribuirse a la exposición de un número heterogéneo de residuos de tirosina, concomitante a una disminución del número de residuos expuestos del triptofano. Ya que la adición de urea, a una mezcla de tirosina y triptofano, no mostró ningún efecto aún a altas concentraciones sobre el espectro de emisión, consideramos que los efectos observados en las células espermáticas por la adición de urea, están mostrando una interacción real con proteínas del espermatozoide, y que los cambios observados al variar la concentración de los reactivos, va exponiendo a un número cada vez

mayor de residuos aromáticos.

Los patrones de titulación de los espermatozoides con sustancias desnaturizantes, del tipo de la urea y del clorhidrato de guanidina (Figs. 7 -10), indican el apagamiento total en la fluorescencia de los residuos de aminoácidos aromáticos. Podemos observar que la intensidad fluorescente de las membranas espermáticas, desciende en forma proporcional, al adicionar las sustancias desnaturizantes hasta que finalmente, se mantiene sin variación (Figs. 9 y 12).

Partiendo de la hipótesis de KRONMAN (18) y del hecho de que la tirosina y el triptofano de membranas, son fácilmente afectadas cuando interacciones con sustancias desnaturizantes; suponemos que estas sustancias al ponerse en contacto con la membrana del espermatozoide, causan un cambio conformacional, el cual se ve acompañado por un cambio en la disminución en la intensidad de fluorescencia, debido probablemente a una interacción débil de los residuos aromáticos más alejados de la superficie membranal, hasta que a concentraciones mayores del detergente se manifiesta únicamente la fluorescencia de los residuos ocultos.

Las figuras 8 y 11 muestran un aumento de la contribución de tirosinas a la fluorescencia total en membranas del espermatozoide. Probablemente esta contribución de las tirosinas a la fluorescencia total, es debida a una modificación de la estruc

tura espermática, que da lugar a una exposición mayor de los residuos de tirosinas, sin afectar los residuos del triptofano en el caso de la urea, en el caso del efecto del clorhidrato de guanidina, se presenta un ligero ocultamiento de los residuos de triptofano.

DODECIL SULFATO DE SODIO

En los estudios realizados por varios autores, con proteínas purificadas, se sabe que la albúmina del plasma une casi 100 moléculas de SDS (38,39). La unión del SDS a la albúmina, ocurre en tres etapas: la primera que involucra la unión de 12 ligandos, la segunda que alcanza hasta 38 equivalentes y una tercera etapa en la cual otros 38 equivalentes se unen, probablemente por procesos cooperativos (40,41).

La unión de este detergente produce variaciones en la levorrotación mostrada por la proteína, a dos longitudes de onda diferentes (233 & 546 nm), durante la primera y tercera etapa, mientras que en la segunda se observa un incremento en la viscosidad específica. HALMAN y NISHIDA (42), han demostrado que la unión de los primeros equivalentes a la proteína, produce una disminución en la intensidad de la fluorescencia (hasta 5 equivalentes), mientras que la adición de un número mayor de equivalentes, aumenta la intensidad y produce una desviación del máximo de fluorescencia hacia longitudes de onda más cortas (340, 350). Aunque otros cromóforos pueden

estar involucrados y causar problemas en la interpretación de los resultados, parece que la absorción del triptofano se ve afectada por la unión de las primeras moléculas; mientras que la absorción de las tirosinas se afecta solamente cuando un gran número de moléculas se unen a la proteína. ESPECTOR y JOHN han descrito que la intensidad de fluorescencia de la albúmina de suero de bovino, se reduce cuando ésta une ácidos grasos (44). TEALE ha informado que la presencia de un exceso de moléculas del detergente, anulan la fluorescencia del triptofano y aumentan la fluorescencia de la tirosina (43). HALFMAN y NISHIDA (42) han sugerido también que las variaciones en las longitudes de onda de emisión de los residuos aromáticos, estén influenciadas por el microambiente acuoso ó polar que las rodea.

Otra posibilidad resulta de la interacción de los ligando de cadena larga, los cuales pueden modificar el estado de ionización de los grupos epsilon-amino, localizados en la vecindad inmediata de los residuos del triptofano (45).

CLARKE, HALFMAN y NISHIDA, estudiando el apagamiento de la fluorescencia producida por el yoduro de potasio, sugirieron que en la albúmina del suero de bovino, aún los triptofanos dentro de las proteínas no son afectados de la misma forma (45), describen también que el efecto de unir un número mayor de 4 equivalentes de acetil sulfato de sodio a la albú

mina, provoca la transferencia de un residuo de triptofano, de un ambiente acuoso a uno no polar; más que producir un aumento en la fluorescencia de un residuo inicialmente localizado en un medio no polar. Esto puede indicar que la unión del detergente, induce cambios estructurales que pueden influir sobre el microambiente del triptofano ó bien, en la exclusión del agua y su reemplazo por las cadenas hidrocarbonadas del ligando. El efecto de este detergente tan enérgico sobre la estructura del espermatozoide, ha sido mostrado previamente por varios autores (48). Quizás lo más importante de esta acción es el efecto tan drástico, incluso a muy bajas concentraciones (μ molar). La acción desnaturalizante destaca obviamente, del mecanismo que se ha sugerido para la urea y el clorhidrato de guanidina, ya que el detergente debe incluirse dentro de las estructuras de las proteínas, rompiendo totalmente la asociación entre los diferentes componentes de las membranas, principalmente de aquellas estructuras localizadas en la porción distal del flagelo.

El apagamiento de la fluorescencia de una suspensión de espermatozoides (Fig. 15), en función de la concentración del dodecil sulfato de sodio, ocurre en forma brusca (0.32-3.1 μ M de SDS), cuando se compara en los experimentos en los cuales se utilizaron la urea y el clorhidrato de guanidina. Por lo que pensamos que este fenómeno puede ser debido a un

proceso cooperativo que causa variaciones en la levorrotación de la proteína, a dos longitudes de onda (233 ó 546 nm), ya que el número de residuos de triptofano y tirosinas expuestas al medio, se ven afectadas por las primeras concentraciones del detergente, dando lugar a una exposición mayor de residuos de tirosina y a una disminución de triptofano, por las alteraciones de la estructura membranal espermática (Fig.16). Otra causa que pudo causar esa alteración, en la formación de las proteínas en las membranas espermáticas, sería la inducción de una nueva estructura alfa-helicoidal, debido a la interacción del dodecil sulfato de sodio, sobre las cadenas laterales, vecinas a las tirosinas sin desdoblar completamente la estructura nativa de la proteína.

BROMURO DE CETIL TRIMETIL AMONIO

Los efectos tóxicos de varios agentes tensioactivos sobre el espermatozoide, pueden ser de dos tipos: a) aquellos que inmovilizan al espermatozoide rápidamente y b) los que desarrollan un efecto después de un tiempo de estar en contacto con el espermatozoide. En presencia del plasma seminal, se requieren concentraciones mayores del detergente para inmovilizar el espermatozoide que cuando se encuentran lavados.

En un estudio realizado previamente (46), la acción de los agentes tensioactivos, conducen a la pérdida irreversible de la movilidad y a daños permanentes en la célula esper

mática. Estos efectos probablemente dependen de la interacción directa, sobre las lipoproteínas contenidas en la capa externa, la cual normalmente protege a la superficie de la célula espermática.

El primer efecto de estos agentes tensioactivos, es un aumento en la permeabilidad celular, permitiendo un escape de los constituyentes intracelulares, incluyendo compuestos moleculares grandes como proteínas y enzimas.

Se ha observado que bajas concentraciones (0.3 - 0.6 mM), del bromuro de cetil trimetil amonio, un potente agente espermicida, son suficientes para reducir la velocidad de fructolisis, mientras que concentraciones mayores (0.8 - 1.2 mM), suprimen completamente ambos fenómenos (47).

Por la acción de aumentar la permeabilidad, resulta la difusión del citocromo c al medio extracelular, también el tratamiento del espermatozoide con un detergente, aumenta la capacidad de oxidar sustratos como el succinato. Estos efectos pueden ser considerados como una manifestación de una desorganización celular.

Los detergentes también han sido utilizados para lograr una solubilización selectiva de las estructuras del espermatozoide humano y de otras especies. El tratamiento con bromuro de cetil trimetil aonio, solubiliza específicamente al

flagelo, después de que el espermatozoide fué expuesto al ditio
treitol (DTT) (48). El uso de un detergente neutro como el -
triton X-100, después de exponer las células al DTT, producen -
la solubilización selectiva del núcleo.

La observar en la (fig. 17), un aumento notable en -
la intensidad de la fluorescencia, de una suspensión de esperma-
tozoides al interaccionar con el bromuro de cetil trimetil amo-
nio, pensamos que la estructura membranar es modificada en ma -
yor grado por este compuesto, ya que el efecto mostró una dismi
nución en la fluorescencia de la tirosina, concomitante a una -
exposición mayor de residuos de triptofanos, probablemente debi
do a una disminución en la accesibilidad de las tirosinas.

El bromuro de cetil trimetil amonio, es considerado
como un potente agente espermicida; cuando se une a la superfi-
cie de la membrana espermática, da lugar a una inmovilización -
de los espermatozoides a concentraciones tan bajas como -
0.3 - 0.6 μ M.

IV. CONCLUSIONES

Aunque este trabajo va dirigido a estudiar el comportamiento de las proteínas, de la membrana del espermatozoide, debemos tomar en cuenta que el efecto de todos los reactivos - adicionados producen la desnaturalización de las proteínas, lo cual probablemente modifique a tal grado la estructura de una proteína que ésta no represente su estructura nativa. Además, es importante aclarar que en este sistema al adicionar los desnaturalizantes, pueden quedar solubles muchas proteínas que no necesariamente deben estar estructuradas en la membrana, con lo cual los resultados podrían mostrar algunos efectos que no sólo representan a las proteínas membranales.

Es importante indicar la diferencia entre la adición de los dos detergentes con carga diferente (SDS y CTAB), ya que uno de ellos produce el apagamiento energético de la fluorescencia de los residuos, mientras que el otro la aumenta fuertemente, debido probablemente a la estructuración de las micelas y a la colocación de las moléculas del detergente, en relación a los residuos de aminoácidos que rodean el sitio donde ancla el detergente y, probablemente en algunos casos se logra la solubilización de muchas proteínas, no necesariamente membranales por diferencias de cargas como es el caso del dodecilsulfato de sodio, en el que la observación al microscopio muestra que este detergente disuelve una buena parte del fla-

celo.

Aparte de esto ha sido demostrado por LONGWCRH, que es importante bloquear los grupos carboxilo y amino de algunos aminoácidos, para evitar su ionización y algunas interferencias, ya que las interacciones tirosina-tirosina afectan cualquier espectro obtenido de la tirosina libre, observando que puede haber cambios en la fracción de absorción, en el rendimiento cuántico y una modificación en los espectros de emisión. Todo esto debido a cambios en el pH alrededor de los residuos (11).

Debemos subrayar que este tipo de estudios, son preliminares y que intentan sacar ventaja de dos cosas: la primera de que el espermatozoide es una célula muy estable y permite su estudio casi individualizado, puesto que no permanece asociada a otras células y en segundo lugar, la posibilidad que algunos investigadores han sugerido de que la fluorescencia de los residuos de tirosina y triptofano, pueden dar idea de las variaciones que ocurren en las proteínas que los contienen. Pensamos que en las proteínas de la membrana se pueden correlacionar estas dos características, lo cual permitiría estudiar los fenómenos que ocurran al espermatozoide, durante los diferentes procesos involucrados en su maduración, capacitación e interacción con el óvulo y que puedan dar luz a una mejor definición del proceso.

VI BIBLIOGRAFIA

- 1.- Singer, S.J. y Nicolson, G.L.: The fluid mosaic of the structure of cell membranes. *Science* 175 (1972) 720-731.
- 2.- Becker, W. M.: Energy and the living cell. An introduction to bioenergetics. J.B. Lippincott Co. Philadelphia (1977) 239-267.
- 3.- Chapman, D. y Wallach, D.F.H.: Recent physical studies of phospholipids and natural membranes. Ed. London, Academic (1968). 125-202.
- 4.- Khandwala, A. S. y Kasper, C.B.: Membrane structure: The re - activity of tryptophan, tyrosine and lysine in proteins of the microsomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 235 (1971) 348-357.
- 5.- Chapman, D., Kamat, V.B. y Levene, R.J.: Infrared spectra and the chain organization of erythrocyte membranes. *Science* 160 (1968). 314-316.
- 6.- Wallach, D. F. y Zahler, P.H.: Protein conformations in cellular membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56 (1966) 1552-1559.
- 7.- Urry, D.W., Mednieks, K. y Bejnarowicz, E.: Optical rotation of mitochondrial membranes.
- 8.- Hubbell, W.L. y McConnell, H.M.: Orientation and motion of amphiphilic spin labels in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 64 (1969) 20-27.
- 9.- Azzi, A., Change, B., Radda, G.K. y Lee, C.P.: A fluorescence probe of energy-dependent structure changes in fragmented membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 62 (1969) 612-619.
- 10.- Wallach, D.F.H., Ferber, E., Selin, D., Weidekamm, E. y Fisher, H.: The study of lipid-protein interaction in membranes by fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* 205 (1970) 67-76.
- 11.- Longworth, J.W.: Excited state interactions in macromolecules *Photochem. Photobiol.* 7 (1968) 587-596.
- 12.- Teale, F.W.J. y Weber, G.: Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acid. *Biochem. J.* 65 (1957) 476-482.
- 13.- Teale, F.W.J.: The ultraviolet fluorescence of protein in neutral solution. *Biochem. J.* 76 (1960) 331-338.
- 14.- Johnson, R.H.: The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization. *J. Reprod. Fert.* 11 (1975) 137-154.

- 15.- Engelman, D.M.: X-ray diffraction studies of phase transitions in the membrane of mycoplasma laidlawii. *J. Mol. Biol.* 47 (1970) 115-117.
- 16.- Mercado, E. y Rosado, A.: Structural properties of the membrane of intact human spermatozoa. A study with fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* 298 (1973) 639-652.
- 17.- Lehrer, S.S. y Kerwar, G.: Intrinsic fluorescent of actin. *Biochemistry* II (1972) 1211-1217.
- 18.- Kronman, M.J.: Fluorescence studies of the molecular conformation of alfa-lactalbumin. *Biochim. Biophys. Acta* 133 (1967) 19-32.
- 19.- Leach, S.J. y Scheraga, H.A.: Ultraviolet difference spectra and the internal structure of proteins. *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 2827-2829.
- 20.- Cowill, R.W.: Fluorescence and the structure of proteins VII. Hydrogen-bonded phenols as fluorescence sinks. *Biochim. Biophys. Acta* 112 (1966) 550-558.
- 21.- Creighton, T.E.: Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea, *J. Mol.* 129 (1979) 235-264.
- 22.- Tanford, C.: Protein denaturation. *Advan. Protein.Chem.* 23 (1968) 121-282.
- 23.- Tanford, C.: Protein denaturation. Part. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advan. Protein.Chem.* 24 (1970) 1-95.
- 24.- Baldwin, R.L.: Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding. *Ann. Rev. Biochem.* 44 (1975) 453-475.
- 25.- Creighton, T.E.: Experimental studies of protein folding and unfolding. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 33 (1978) 231-298.
- 26.- Nosaki, Y y Tanford, C.: The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 4074-4081.
- 27.- Wetlaufer, D.B., Malik, S.K., Stoller, L. y Coffin, R.L.: Nonpolar group participation in the denaturation of proteins by urea and guanidine salts. Model compound studies. *J. Amer. Chem. Soc.* 86 (1964) 503-514.
- 28.- Roseman, H. y Jencks, W.P.: Interactions of urea and other polar compounds in water. *J. Amer. Chem. Soc.* 97 (1975) 631-640.

- 29.- Nosaki, Y. y Tanford, C.: The solubility of amino acids, diglycine, and tryglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions, *J. Biol. Chem* 245 (1970) 1648-1652.
- 30.- Chothi, C.: Insulin/proinsulin, a new crystalline complex, *Nature* 248 (339-340).
- 31.- Richards, F.M.: Areas, volumes, packing, and protein structure. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 6 (1977) 151-176.
- 32.- Auer, H.E. y Doty, P.: The conformational stability of alpha-helicoidal nonpolar polypeptides in solutions. *Biochemistry* 5 (1966) 1716-1725.
- 33.- Schelleman, J.A.: Solvent denaturation. *Biopolymers* 17 (1978) 1305-1322.
- 34.- Tiffany, M.L. y Krim, S.: Extended conformations of polypeptides and proteins in urea and guanidine hydrochloride. *Biopolimers* 12 (1973) 575-587.
- 35.- Tanford, C., Kawahara, K., y Lapange, S.: Proteins as random coils. I. Intrinsic viscosities and sedimentation coefficients in concentrated guanidine hydrochloride. *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 729-735.
- 36.- Nosaki, Y. y Tanford, C.: Acid base titrations in concentrated guanidinium ion and of some amino acids. *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 736-742.
- 37.- Nosaki, Y y Tanford, C.: Protein as random coils. II. Hydrogen ion titration curve of ribonuclease in 6M guanidine hydrochloride. *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 742-749.
- 38.- Putnam, F.W. y Neurath, H.: Interaction between proteins and synthetic detergents. II. Electrophoretic analysis of serum albumin-sodium dodecyl sulfate mixtures. *J. Biol. Chem.* 159 (1945) 195-209.
- 39.- Aoki, K.: Interactions of horse serum albumin with anionic and cationic detergent. *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 4904-4909.
- 40.- Foster, J.F. y Aoki, K.: Further of the isomerization of bovine plasma albumin. The effect of detergent ions at low pH and preliminary observations at high pH. *Amerc. Chem. Soc.* 80 (1958) 5215-5219.
- 41.- Pallanson, H.J. y Briggs, D.R.: A study of the interaction of dodecyl sulfate with bovine serum albumin. *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 1396-1403.

- 42.- Halman, C. J. y Nishida, T.: Nature of the alteration of the fluorescence spectrum of bovine serum albumin produced by the binding of dodecyl sulfate. *Biochem. Biophys. Acta* 243 (1971) 294-303.
- 43.- Teale, F.W.J.: Structural dependence of proteins ultraviolet fluorescence. *Biochem. J.* 80 (1961) p. 14.
- 44.- Spector, A.A. y Joann, K.R.: Effects of free fatty acid on the fluorescence of bovine serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 127 (1968) 65-71.
- 45.- Halman, C.J. y Nishida, T.: Influence of pH and electrolyte of the fluorescence of bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 243 (1971) 284-293.
- 46.- Ham, T.: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. (Ketnuen & Co. Ltd. London, 1964) 386-387.
- 47.- Koefoed-Johnsen, H.H. y Mann, T.: Studies on the metabolism of semen. 9. Effect of surface active agents with special reference to the oxidation of succinate by spermatozoa. *Biochem. J.* 57 (1954) 406-410.
- 48.- Hernández, M.H., Iglesias, G. y Mújica, A.: Selective solubilization of mammalian spermatozoa structure. *Exptl. Cell. Res.* 78 (1973) 437-440.

FIGURAS

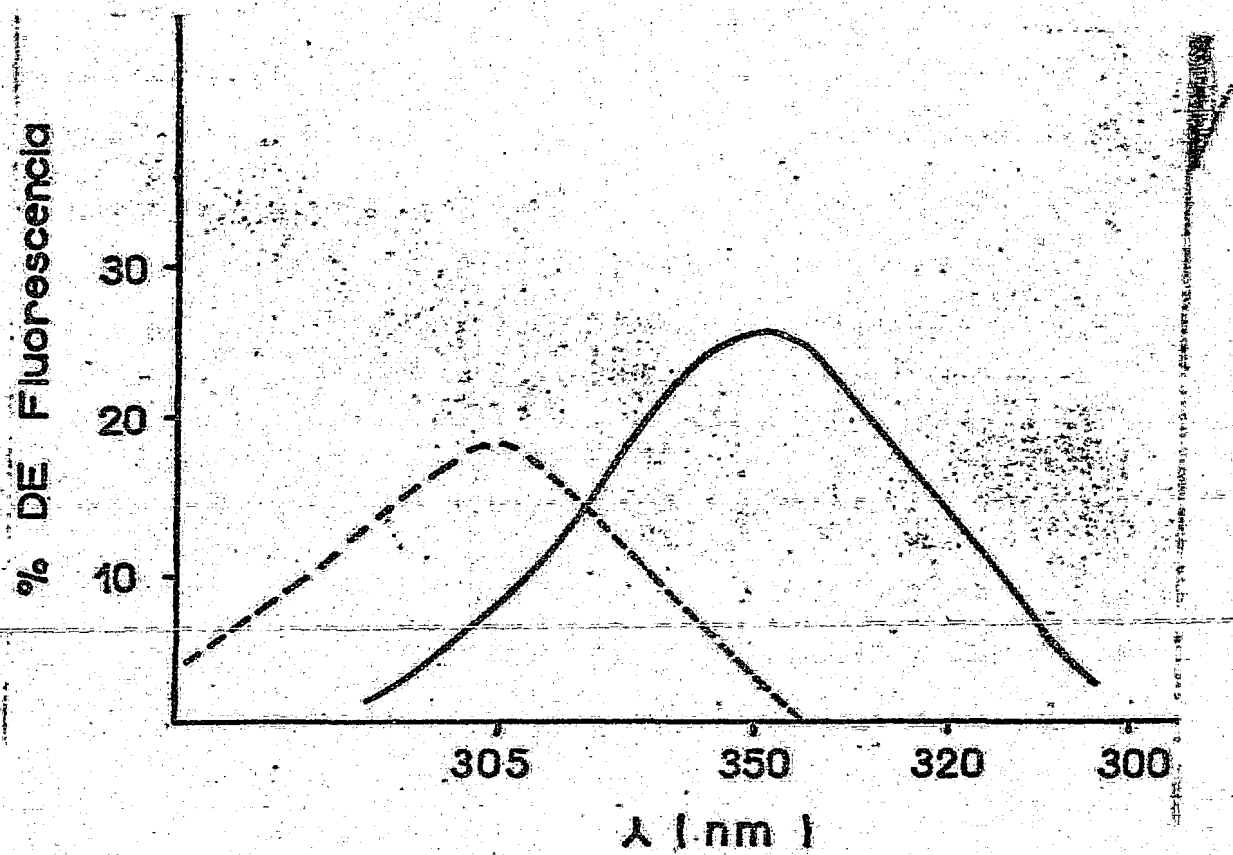


FIGURA 1 Espectro de la emisión de fluorescencia en Tris-HCl 0.050 M a temperatura ambiente. Tirosina 5.1 μ M (---), triptofano 6.6 μ M (—).

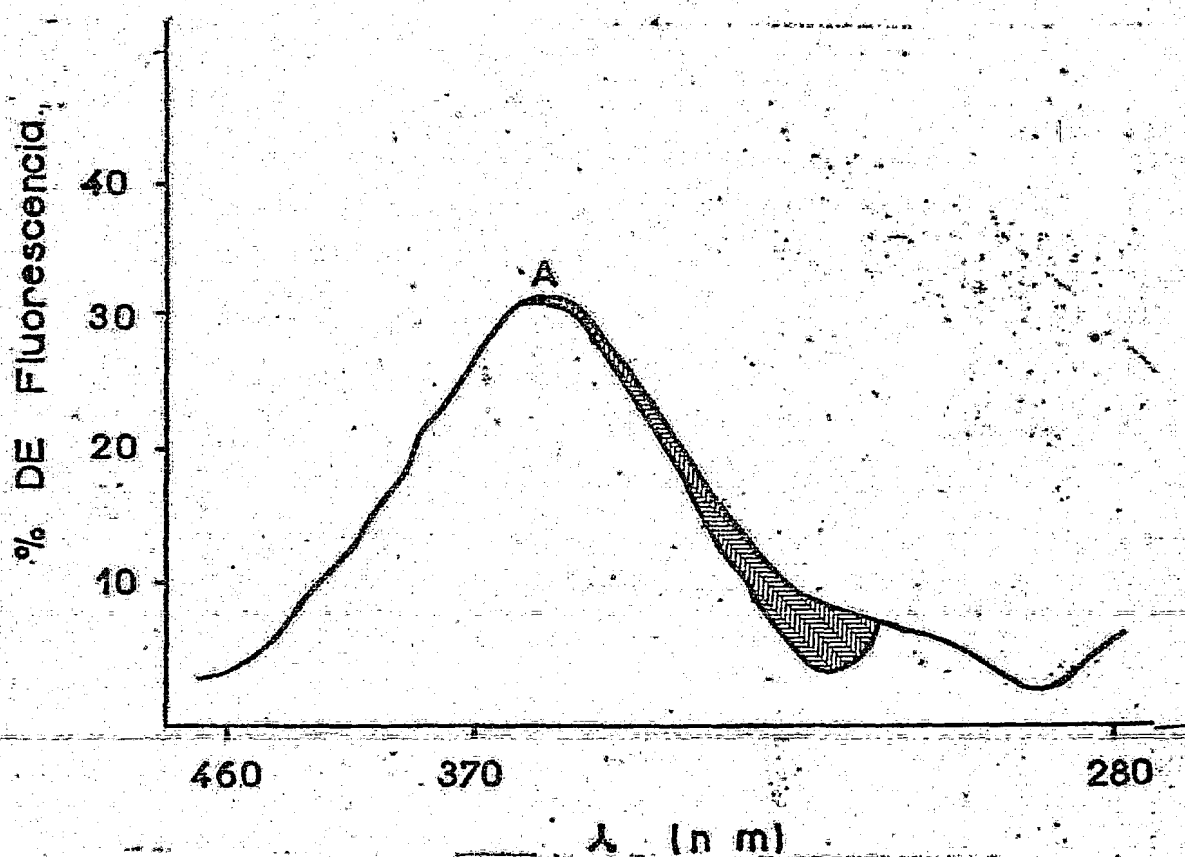
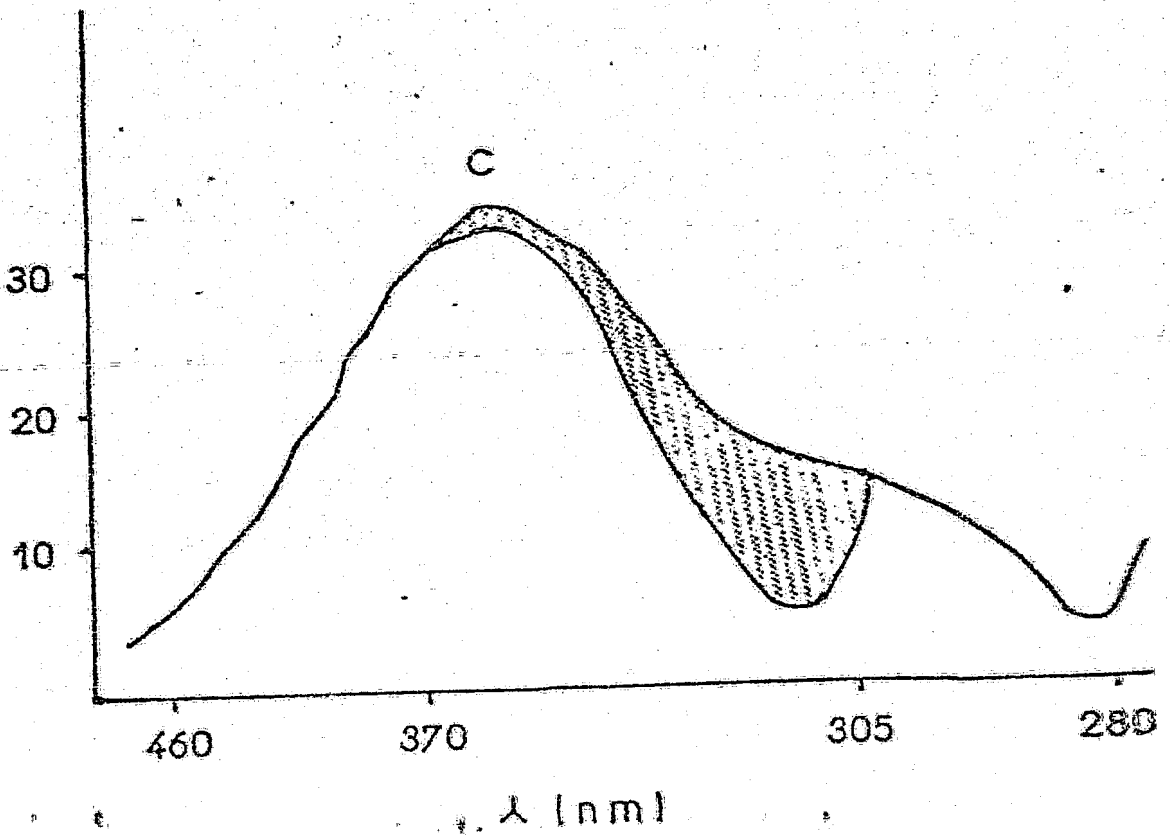
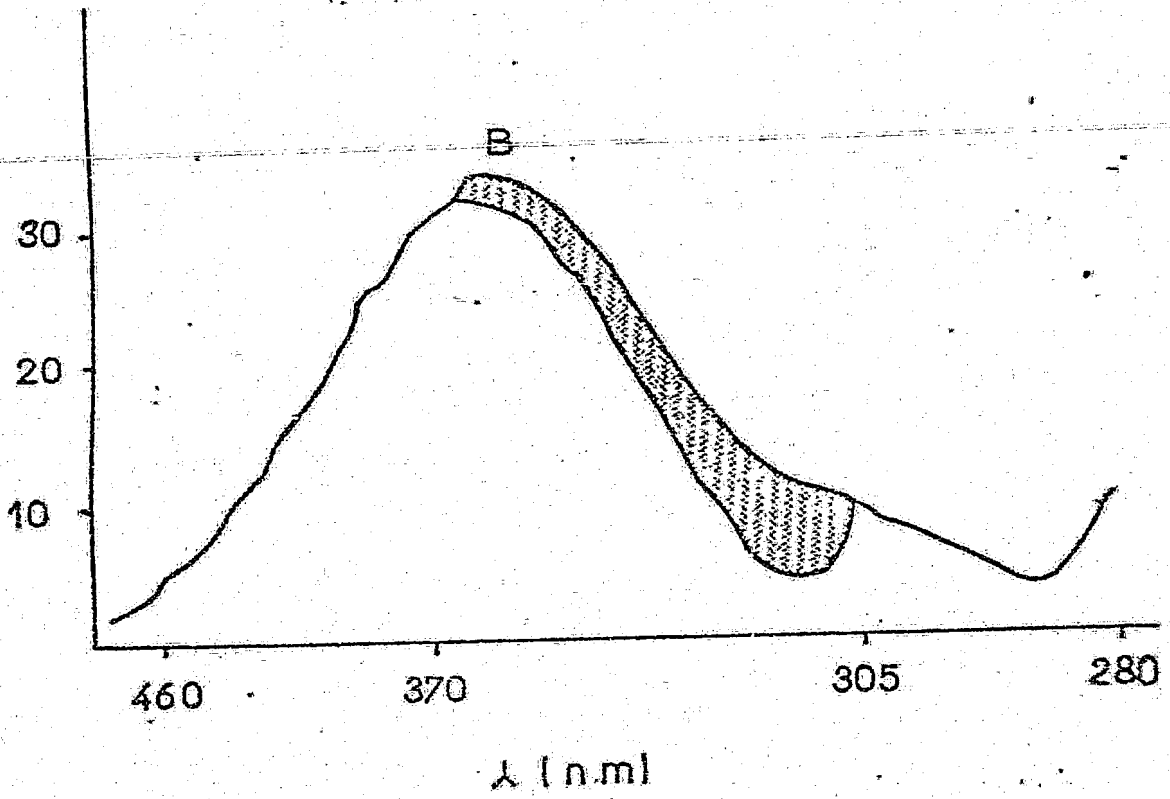


FIGURA 2 Incremento producido en el espectro de la fluorescencia del triptofano por la adición de cantidades crecientes de tirosina:

- A 15 nmolas
- B 19 nmolas
- C 30 nmolas



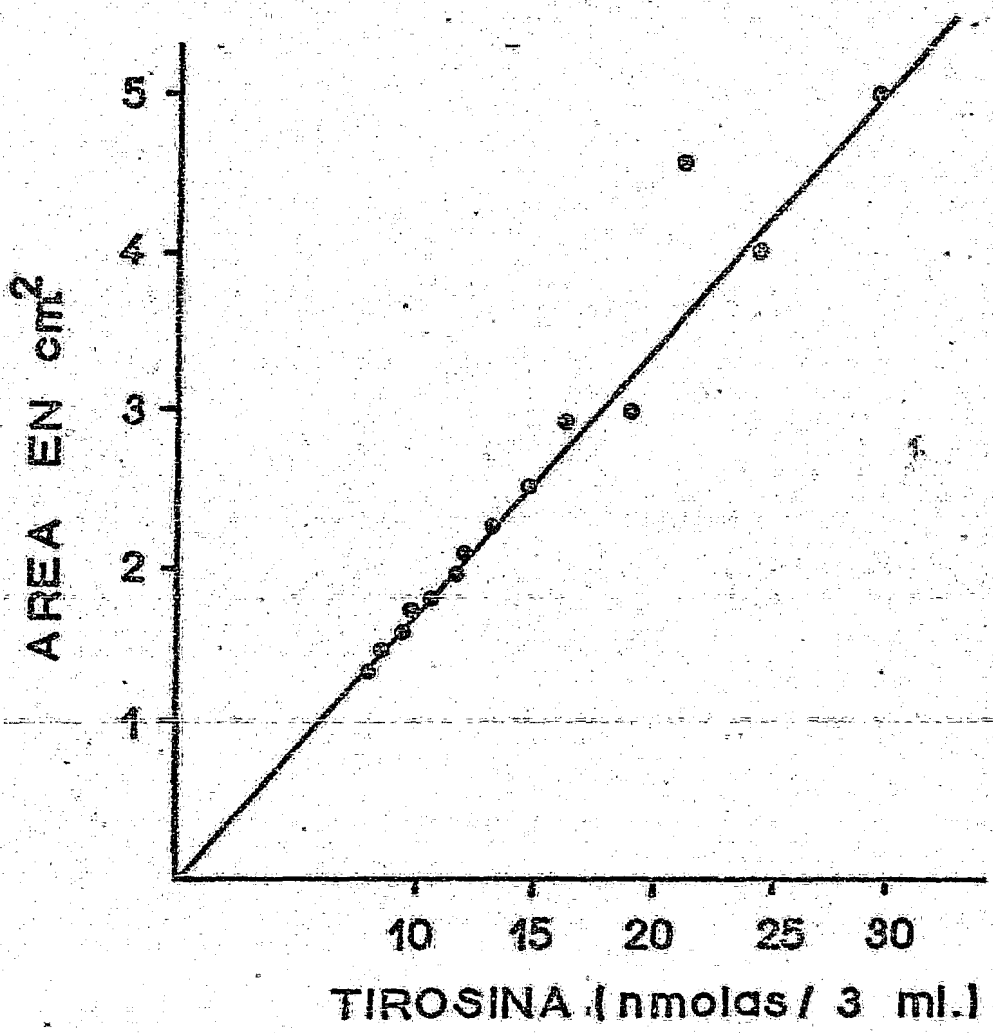


FIGURA 3 Correlación de las nmolas de tirosina adicionadas y el incremento del área en el espectro de fluorescencia del triptofano.

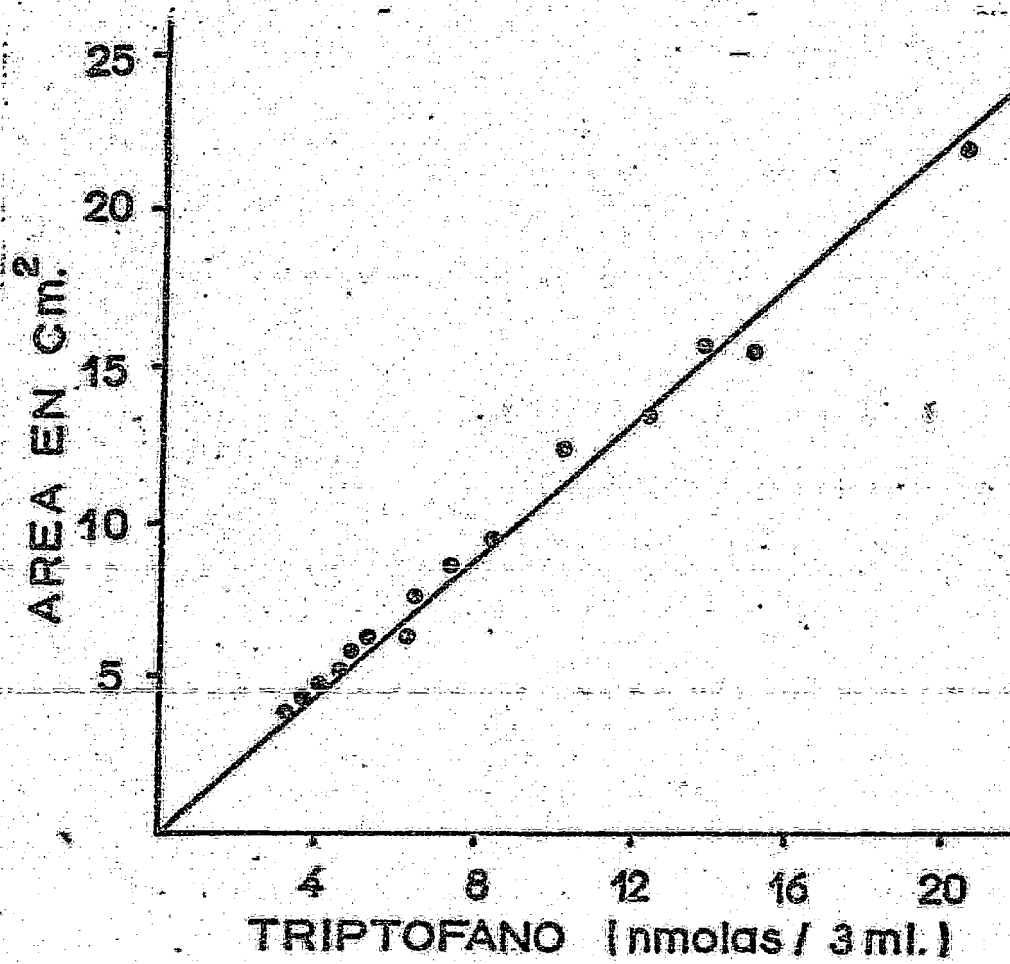


FIGURA 4 Efecto de la adición de cantidades crecientes de triptofano a una solución 5.1 μM de tirosina.

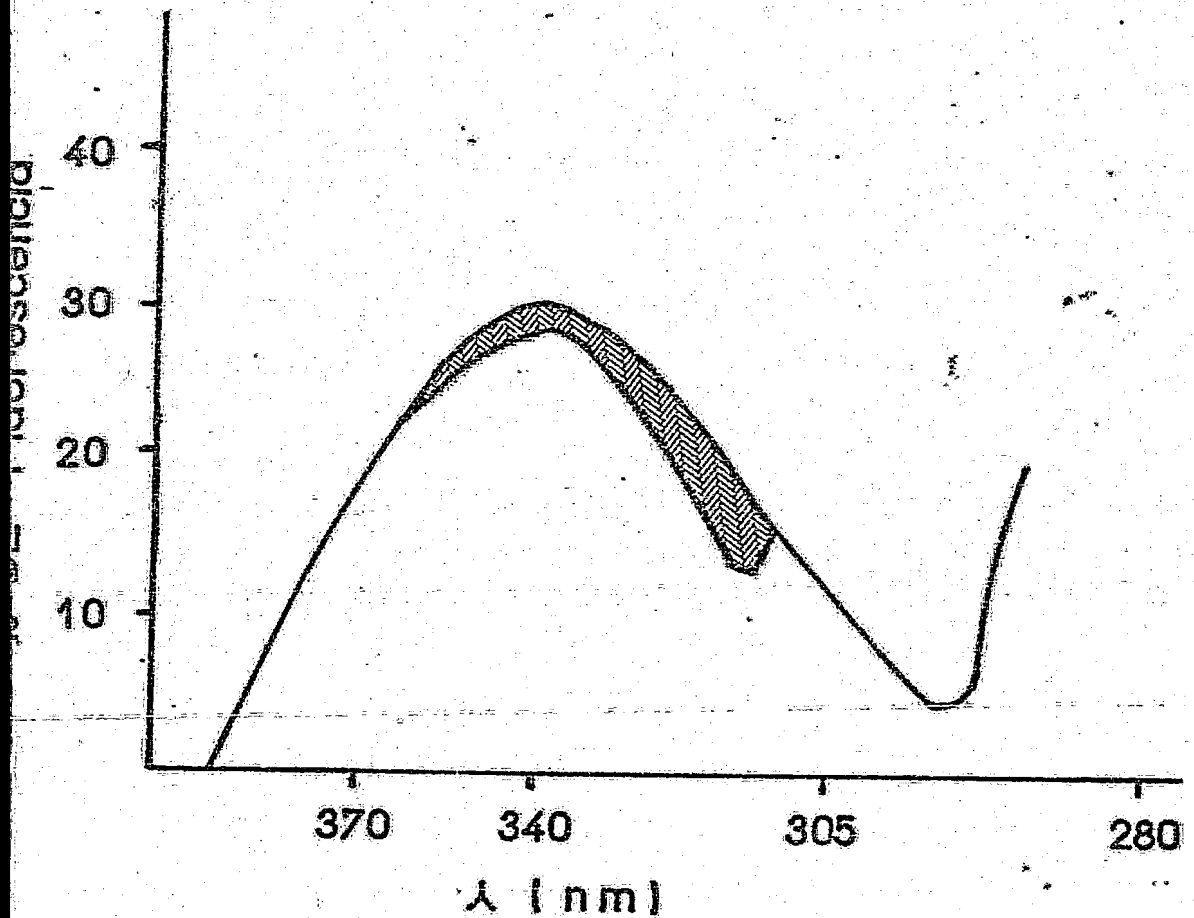


FIGURA 5 Espectro de emisión diferencial de los espermatozooides humanos lavados. 10^7 células en 3 ml de buffer de tris-HCl 0.050 M, pH 7.4, excitando a 275 nm. La contribución de la tirosina a la fluorescencia total se muestra en el área sombreada.

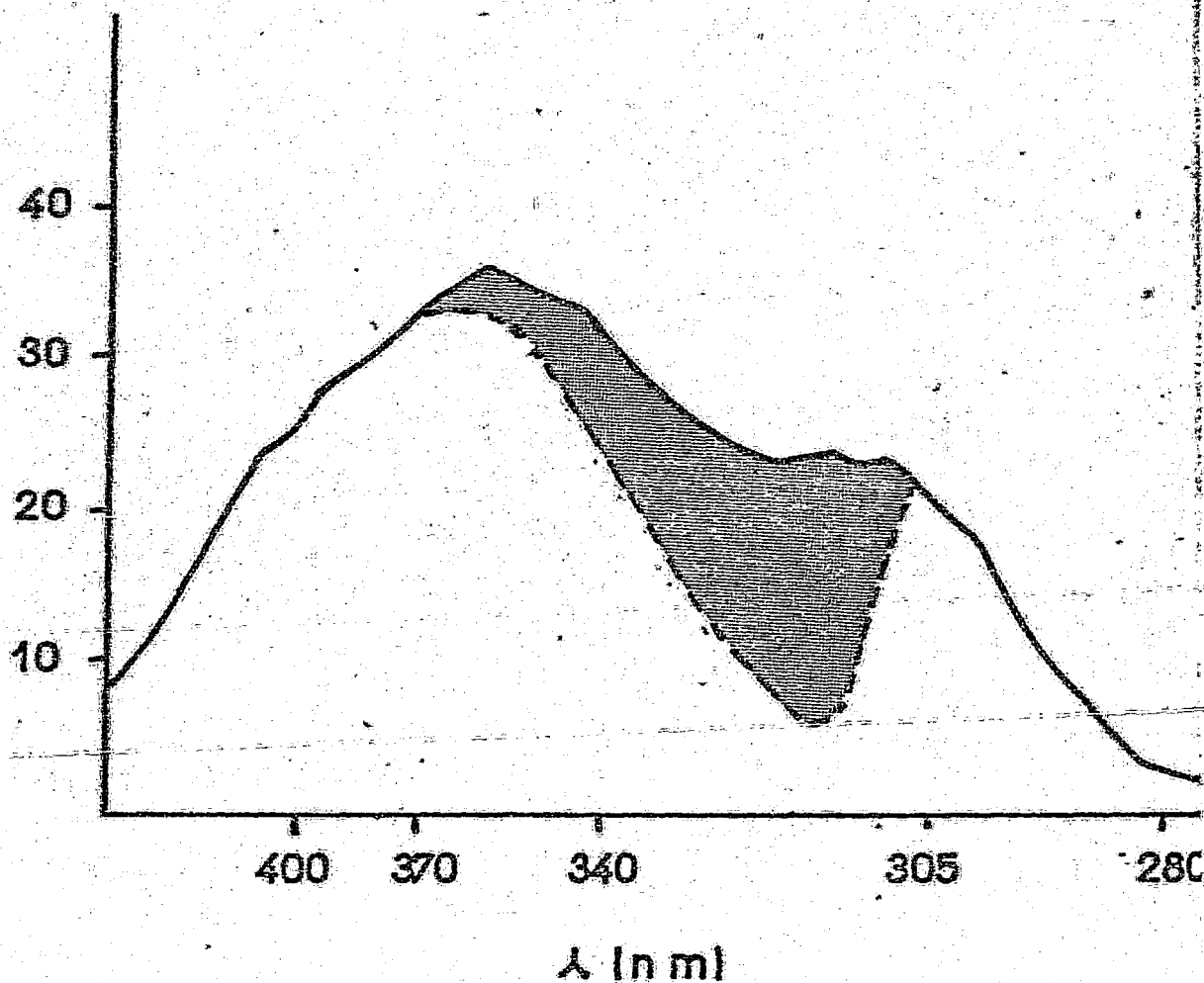


FIGURA 6 Espectro diferencial de la fluorescencia de una mezcla de soluciones de tirosina 16.6 μ M y triptofano 6.6 μ M. Espectro de la mezcla de tirosina y triptofano excitando a 275 nm (—). Espectro del triptofano excitando a 293 nm (---). La contribución de la tirosina a la fluorescencia total se muestra en el área sombreada.

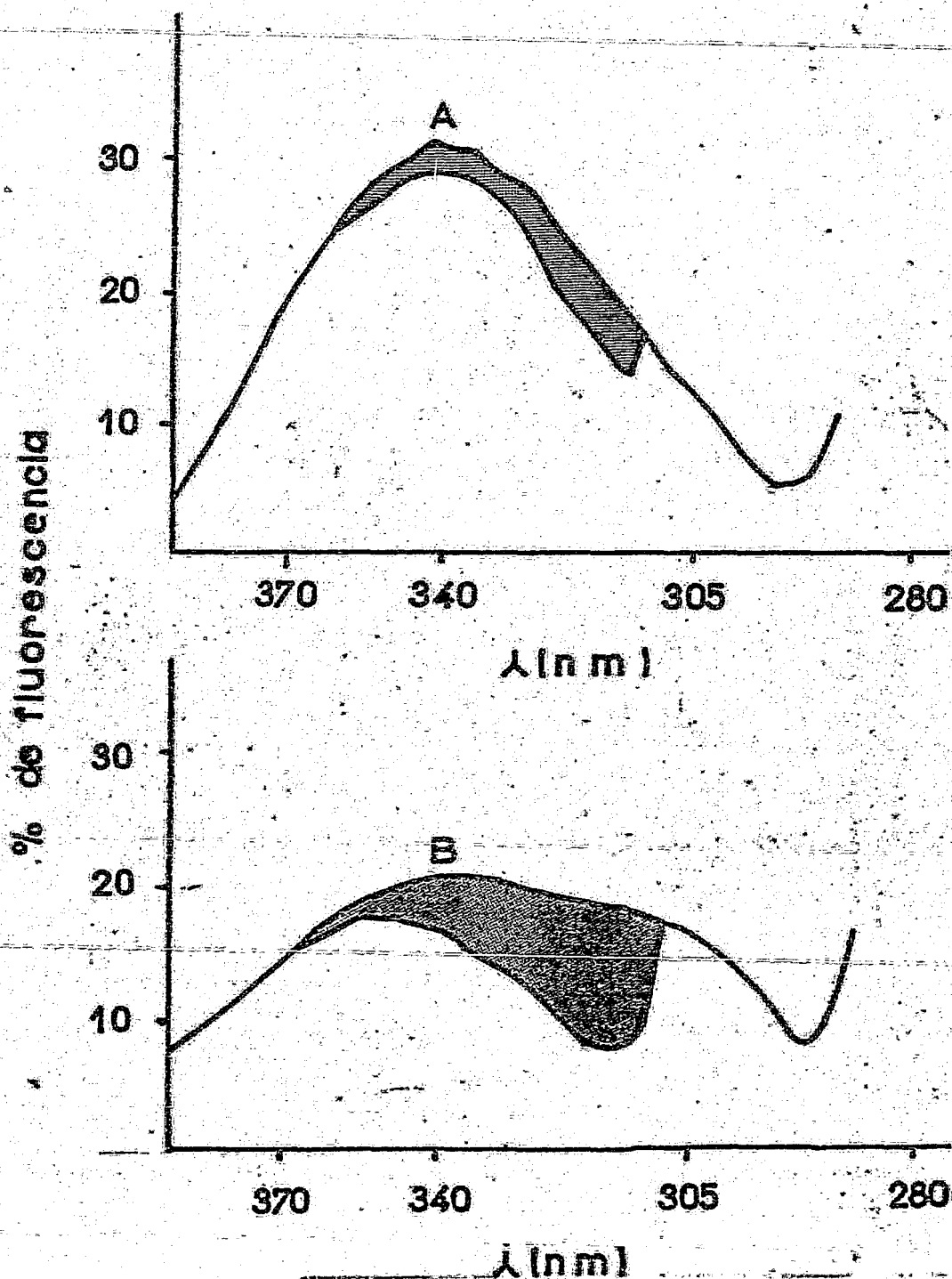


FIGURA 7 Efecto de la adición de urea sobre el espectro de emisión de una suspensión de espermatozoides humanos.
 A) Espectro de emisión normal de una suspensión de espermatozoides en ausencia de urea.
 B) Espectro de emisión de la fluorescencia después de la adición de urea.

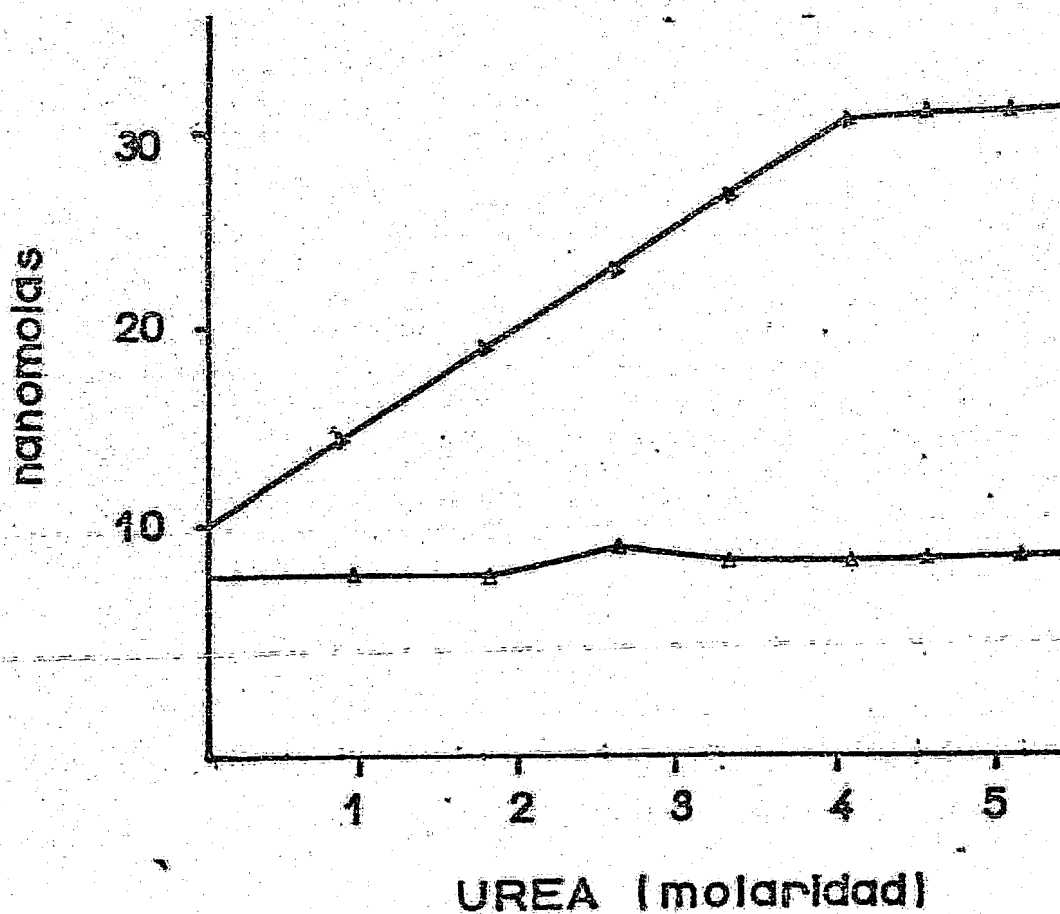


FIGURA 3. Cuantificación del contenido de la tirosina más el triptófano (▲▲▲) y del triptófano únicamente (△△△), en las membranas espermáticas, por la adición de cantidades crecientes de urea a una suspensión de 10^7 espermatozoides en 3 ml de tris-HCl 0.050 M, pH 7.4.

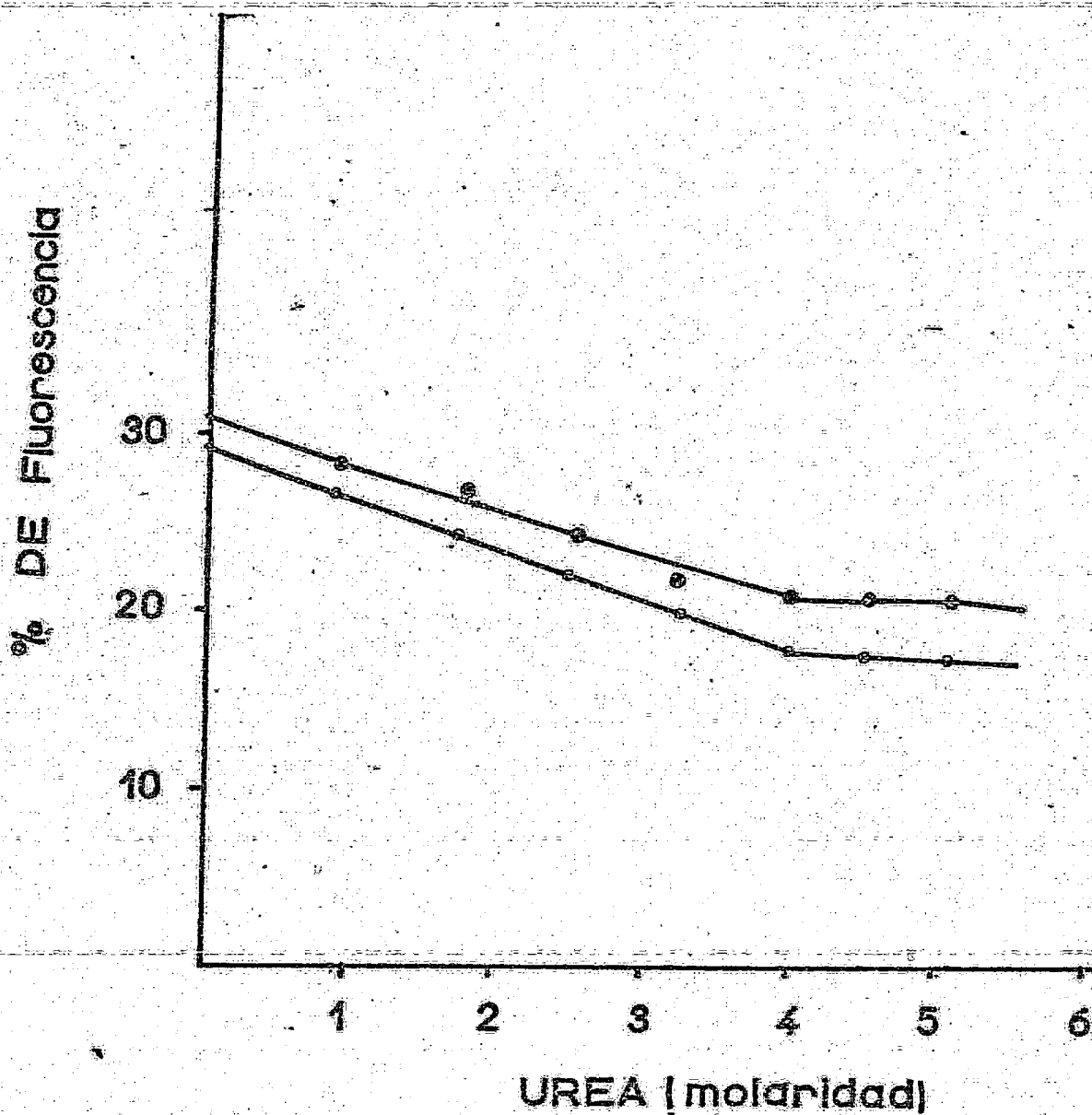


FIGURA 9 Cinética del apagamiento de la fluorescencia nativa de - la tirosina más la del triptófano (●●●) y del triptófano únicamente (○●○) contenidos en una suspensión de 10^7 espermatozoides de humano, debido a la adición de cantidades crecientes de urea. Esta interacción se llevó a cabo a temperatura ambiente - ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). La excitación se realizó a 275 y 273 nm con emisión a 338 nm.

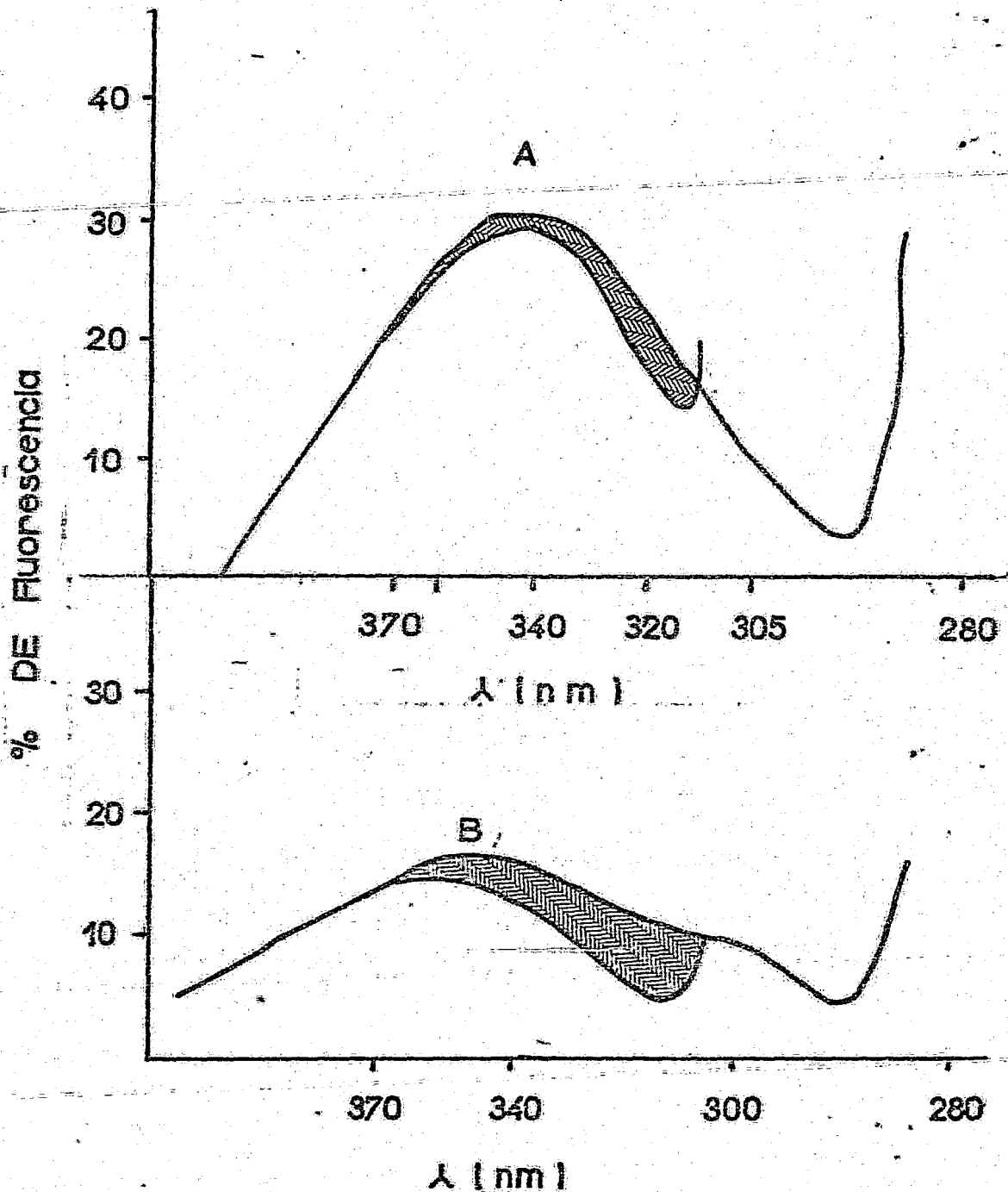


FIGURA 10 efecto de la adición del clorhidrato de guanidina sobre el espectro de emisión de una suspensión de 10^7 espermatozoides humanos.

A) Espectro de emisión normal de una suspensión de espermatozoides en ausencia del clorhidrato de guanidina.

B) Espectro de emisión de la fluorescencia después de la adición del clorhidrato de guanidina.

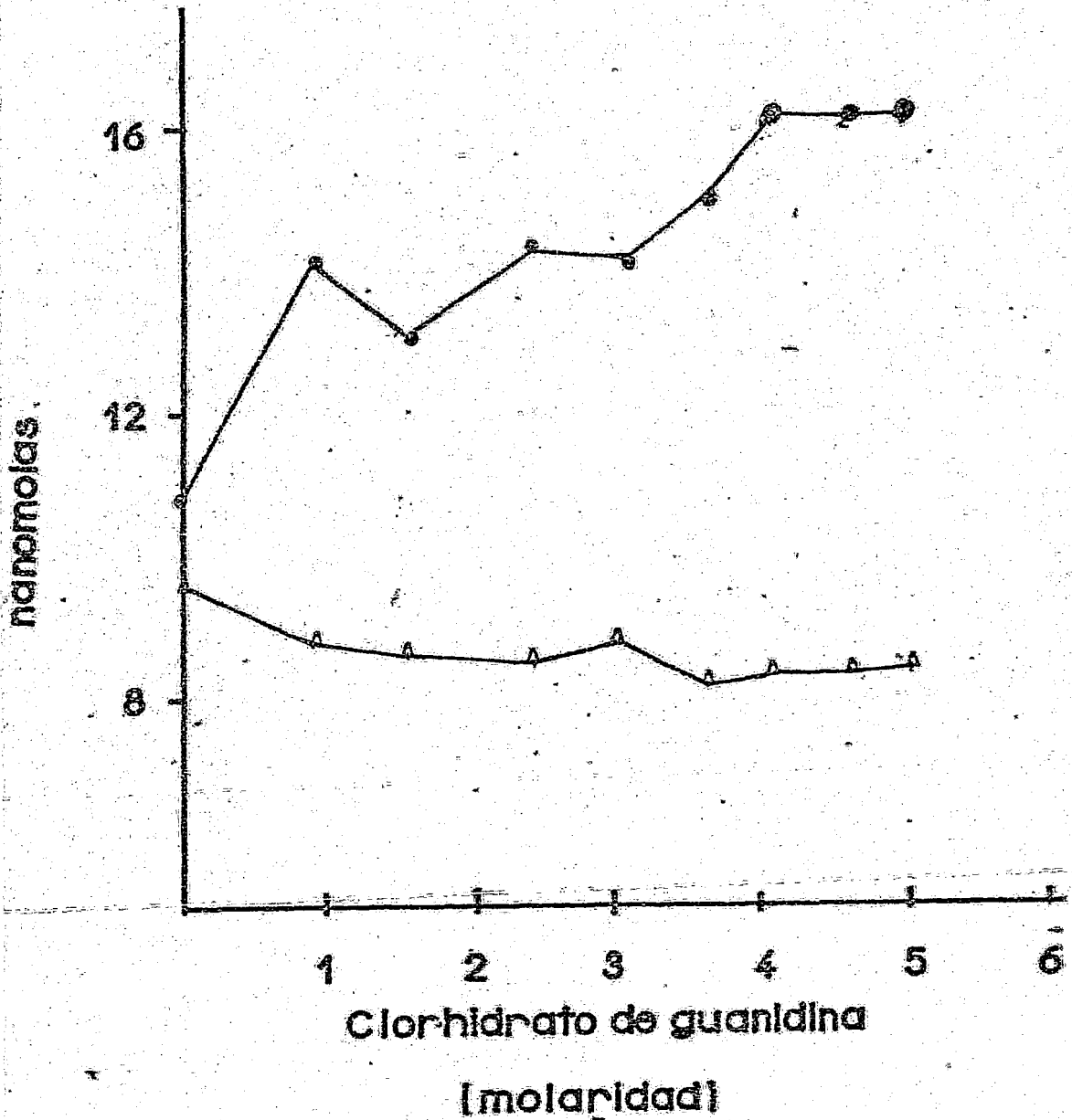


FIGURA 11 Cuantificación del contenido de la tirosina + el triptofano (●●●) y del triptofano únicamente (△△△) en las membranas espermáticas, por la adición de cantidades crecientes del clorhidrato de guanidina a una suspensión de 10^7 espermatozoides en 3 ml de tris-HCl 0.050 M, pH 7.4.

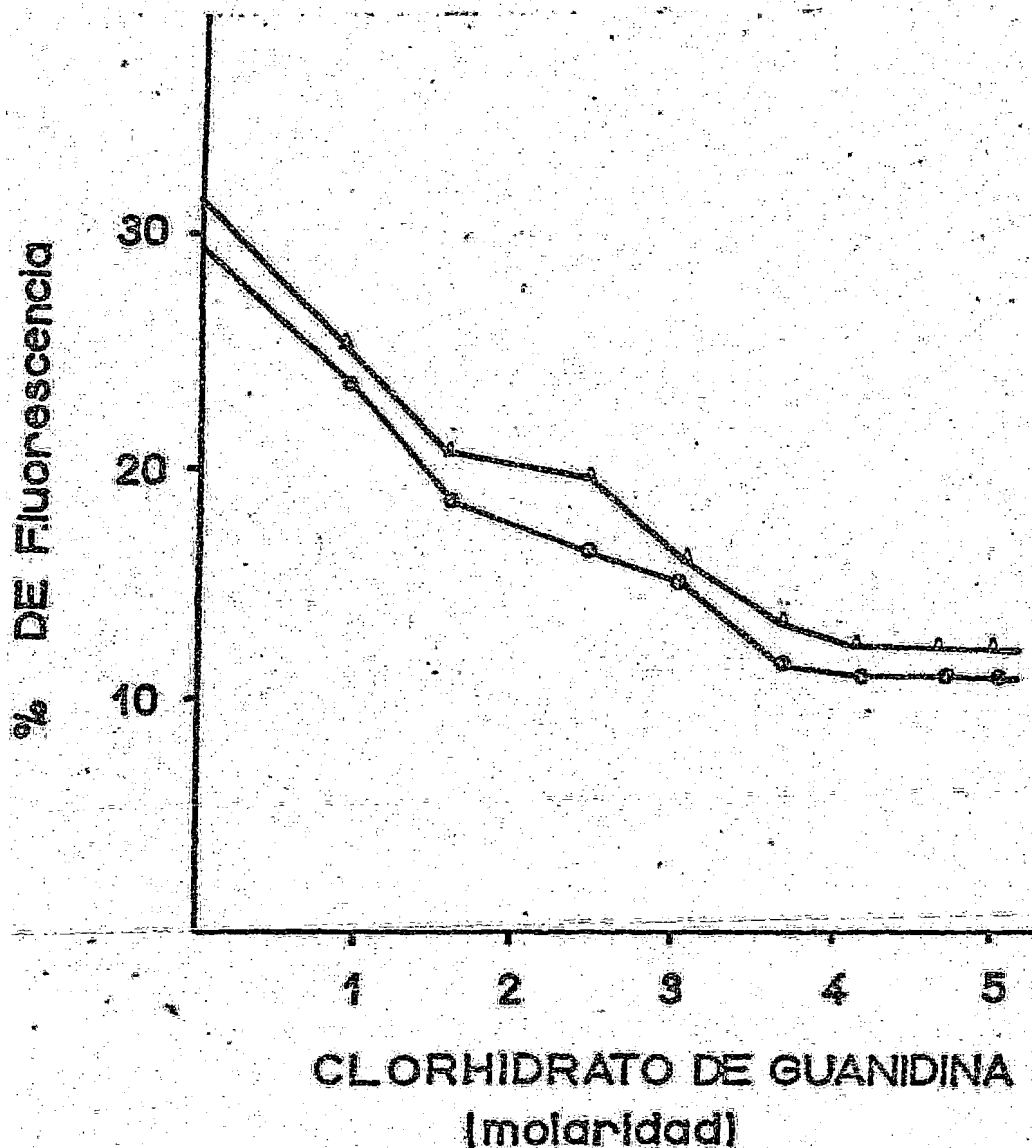


Fig. 12 Cinética de apagamiento de la fluorescencia nativa de la tirosina más la del triptofano (▲▲▲) y del triptofano únicamente (●●●), contenidos en una suspensión de 10^7 espermatozoides de humano, debido a la adición de cantidades crecientes del clorhidrato de guanidina.

Esta interacción se llevó a cabo a temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). La excitación se realizó a 275 y 293 nm con emisión a 330 m.

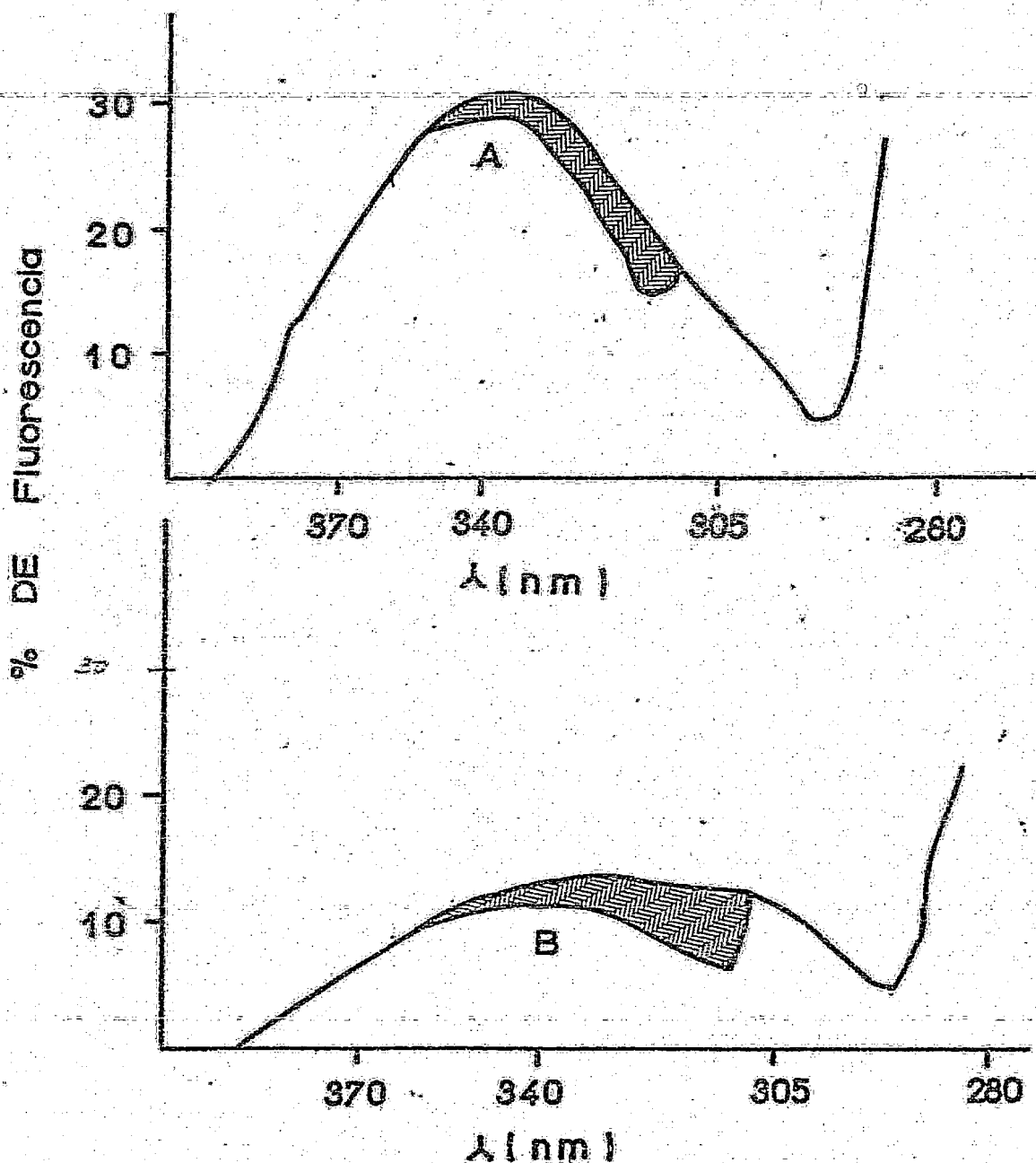


FIGURA 13 Efecto de la adición del dodecil sulfato de sodio sobre el espectro de emisión de una suspensión de 10^7 espermatozoides humanos.

A) Espectro de emisión normal de una suspensión de espermatozoides en ausencia de dodecil sulfato de sodio.

B) Espectro de la emisión de la fluorescencia después de la adición del dodecil sulfato de sodio.

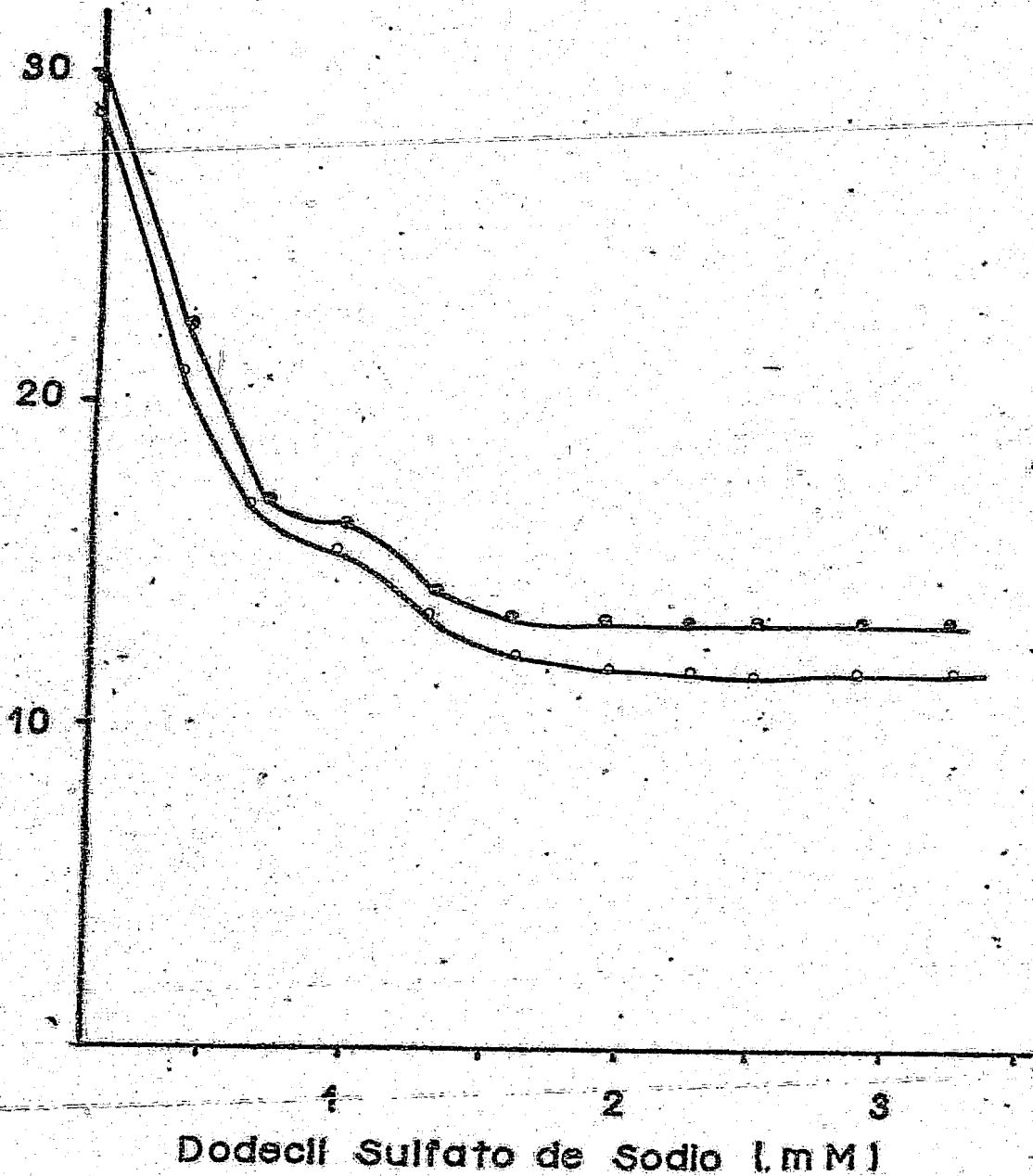
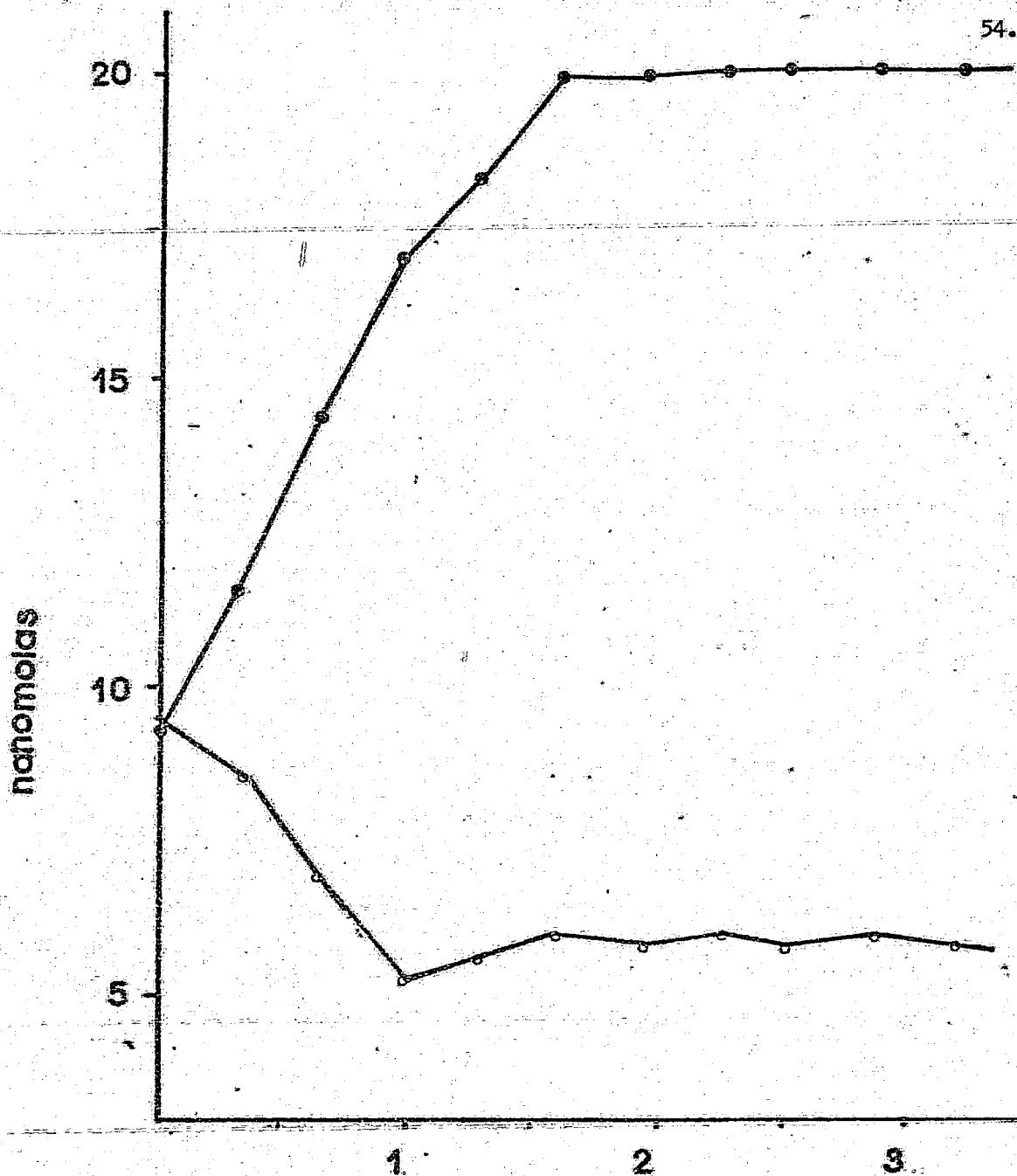


FIGURA 14 Cinética de apagamiento de la fluorescencia nativa de la tirosina mas la del triptofano (○○○) y del triptofano únicamente (●●●) contenidos en una suspensión de 10^7 espermatozooides, debido a la adición de cantidades crecientes de dodecil sulfato de sodio. Esta interacción se llevó a cabo a temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ \text{C}$). La excitación se realizó a 275 y 273 nm con emisión a 330 nm.



DODECIL SULFATO DE SODIO (nM)

FIGURA 15 Cuantificación del contenido de la tirosina + el triptofano (●●●) y del triptofano únicamente (○○○) en las membranas espermáticas, por la adición de cantidades crecientes del dodecil sulfato de sodio a una suspensión de 10^7 espermatozoides en 3 ml de tris-HCl 0.050 M, pH 7.4.

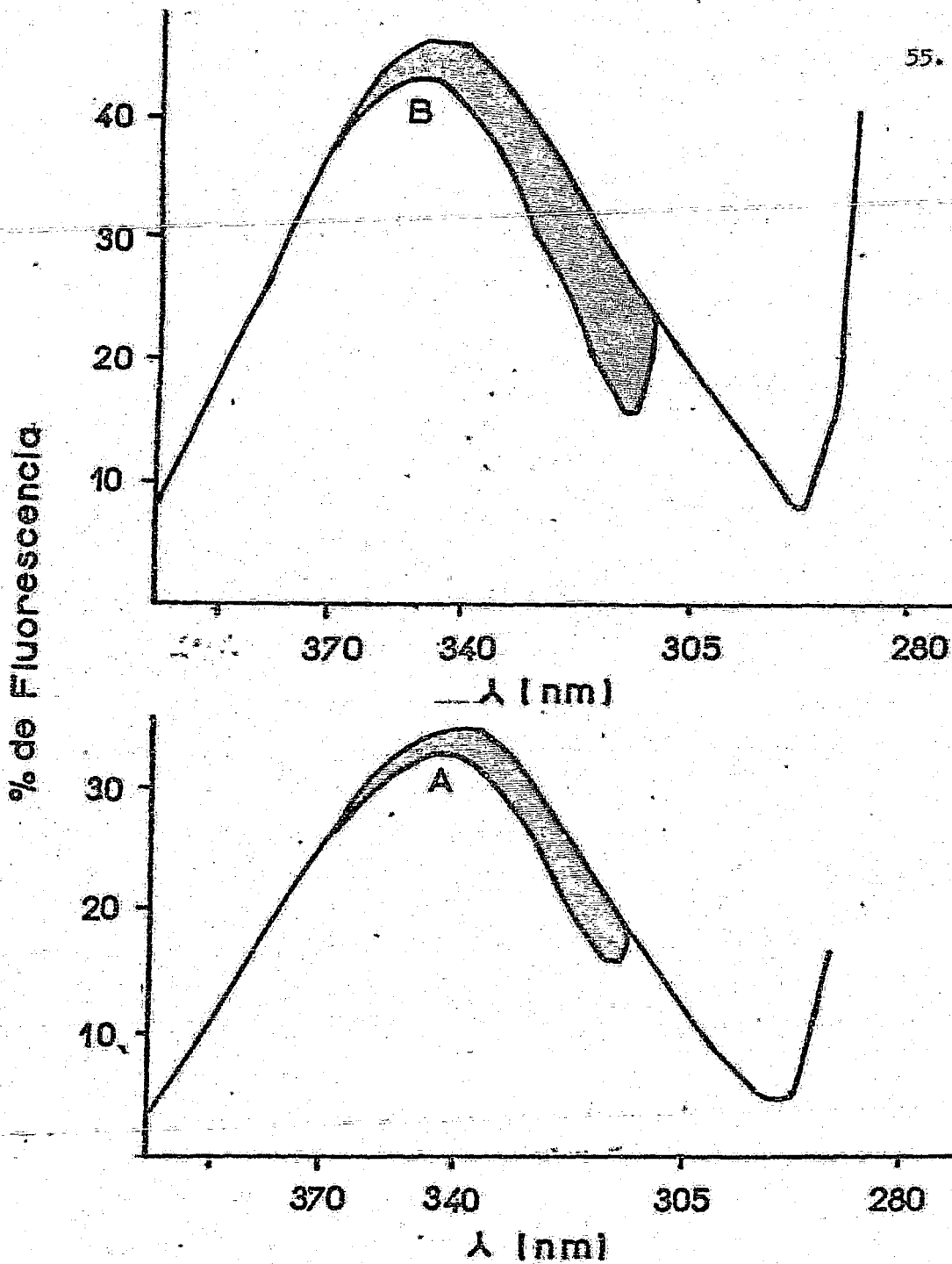


FIGURA 16 Efecto de la adición del bromuro de cetil trimetil amonio sobre el espectro de emisión de una suspensión de 10⁷ espermatozoides murinos.
 A) Espectro de emisión normal de una suspensión de espermatozoides en ausencia del bromuro de cetil trimetil amonio.
 B) Espectro de emisión de la fluorescencia después de la adición del bromuro de cetil trimetil amonio.

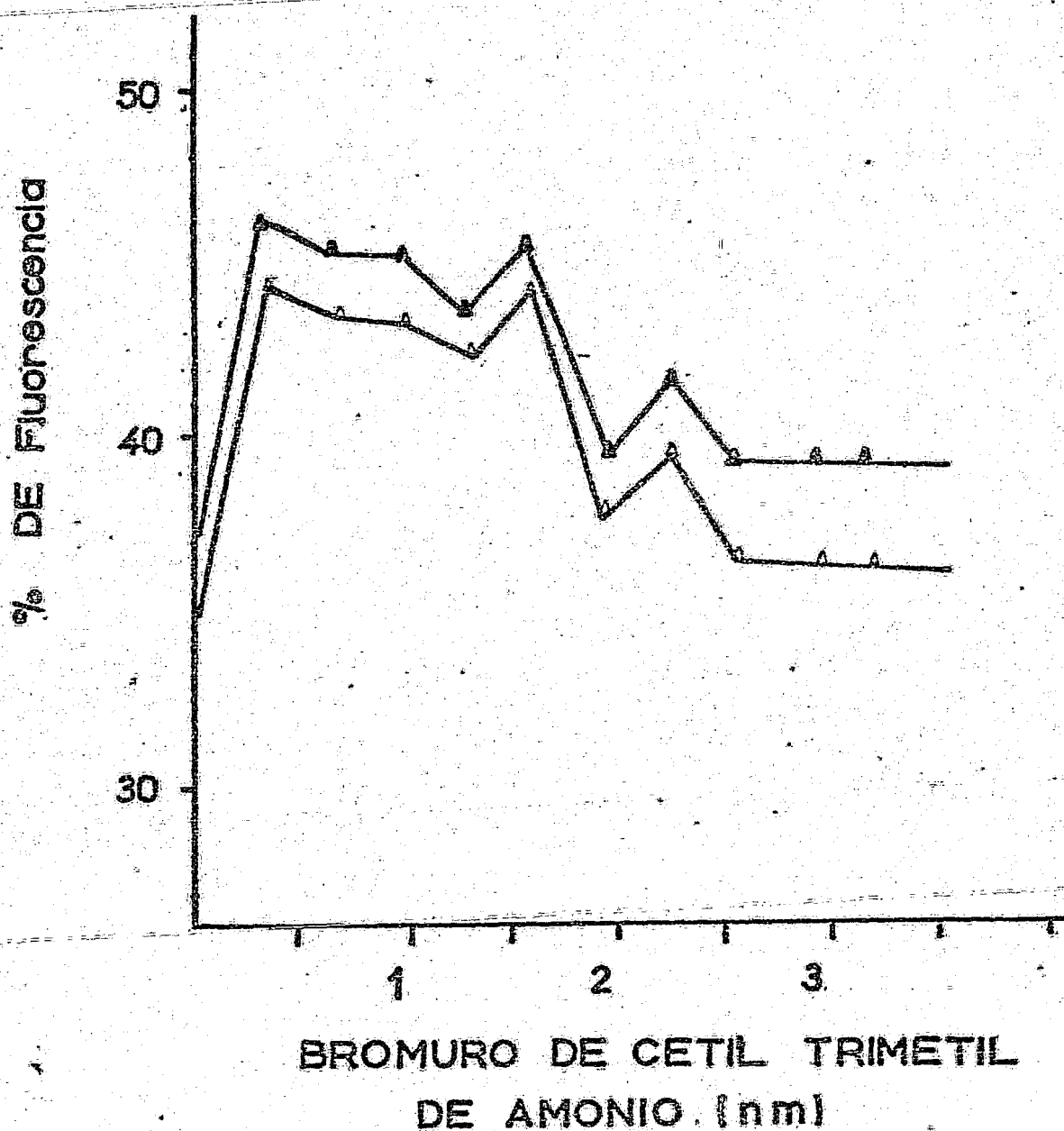


Figura 1: incremento de la fluorescencia de la tirosina + triptofano (▲▲▲) y del triptofano únicamente (■), contenidos en una suspensión de 10^7 espermatozoides, por la adición de cantidades crecientes del bromuro de cetil trimetil amonio. Las longitudes de excitación fueron de 275 y 293 nm con emisión a

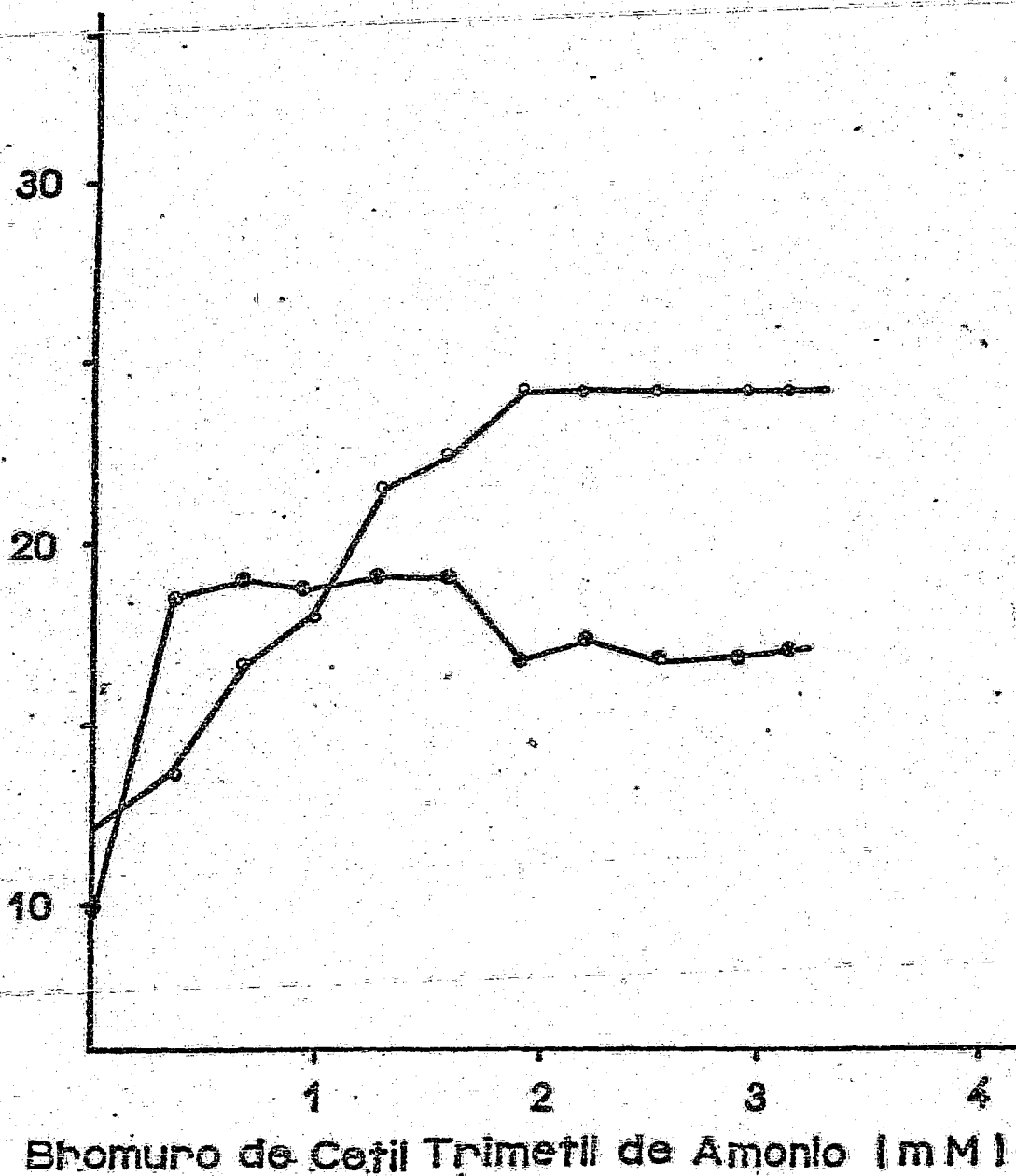


FIGURA 1b Cuantificación del contenido de la tirosina + el triptofano (●●●) y del triptofano únicamente (○○○), en las membranas espermáticas, por la adición de cantidades crecientes del bromuro de cetil trimetil amonio a una suspensión de 10^7 espermatozoides en 3 ml de tris-HCl 0.050 N, pH 7.4.

A

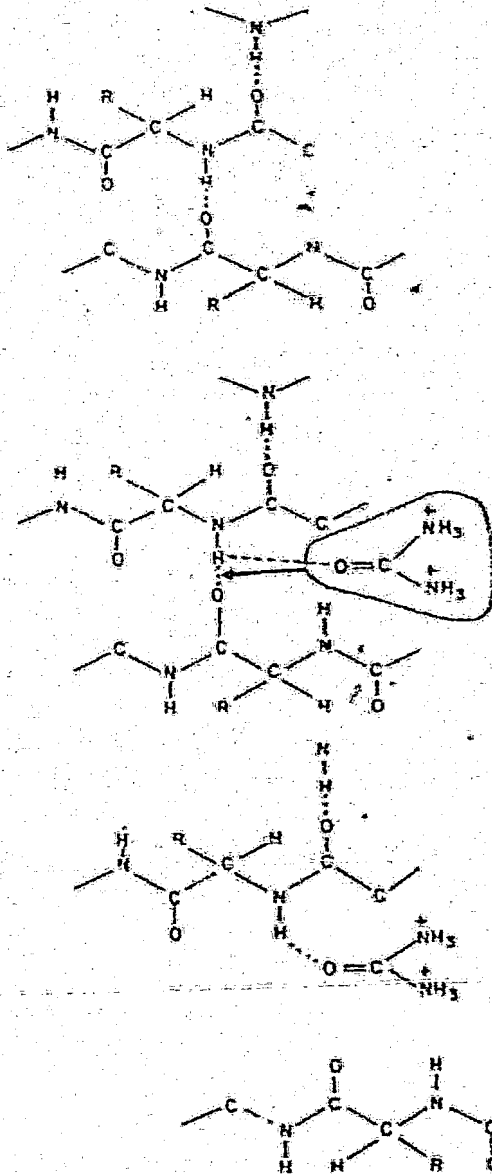


FIGURA 19 Interacción de las sustancias desnaturizantes con proteínas:

A Urea

B Cloruro de guanidina