



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de de Estudios Superiores Cuautitlán

**EFFECTO DE LA HEPARINA EN EL PROCESO DE
CAPACITACION DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JESUS RAFAEL MENDEZ FUENTES
DIRECTOR :
DR. ANTONIO VALENCIA SANCHEZ



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.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	10
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y METODOS	14
RESULTADOS	28
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFIA	55
RESUMEN	62

INTRODUCCION

Uno de los principales objetivos en el campo de la Biología de la Reproducción, es el alcanzar un entendimiento cada vez más profundo del fenómeno de fecundación; para alcanzar ésto un gran número de grupos de investigación de todo el mundo ha venido estudiando los aspectos más importantes de dicho proceso (1), de esta manera se ha alcanzado un considerable grado de conocimientos.

El proceso íntegro de la reproducción sexual está centrado alrededor del fenómeno de fecundación (1), que consiste esencialmente de la fusión de dos células, el gameto masculino denominado espermatozoide y el femenino que es el óvulo; cada una de estas células contribuye con un juego de cromosomas para formación de una célula diploide que es el cigoto. En los animales mamíferos, el espermatozoide es depositado en el aparato reproductor femenino y lleva a cabo una migración hasta el sitio donde se encuentra el óvulo (2,3), durante este viaje el espermatozoide sufre una serie de modificaciones fisiológicas y morfológicas que le habilitan para penetrar en el óvulo, dichos cambios se han agrupado en dos procesos fundamentales denominados capacitación y reacción acrosomal (3).

El fenómeno de capacitación fue descubierto en el espermatozoide de conejo, por la necesidad de esta célula de permanecer un determinado tiempo en el conducto reproductor femenino antes de penetrar en el óvulo (4,5). Los estudios concernientes a este fenómeno han dado la pauta para conceptuarlo como un proceso bioquímico reflejado en modificaciones en la permeabilidad de membranas (6,7), así como incrementos en el consumo de oxígeno (8,9), en la glucólisis (10) y en la motilidad espermática (11); por otra parte las observaciones del espermatozoide capacitado en microscopio de fases y electrónico no han evidenciado cambios estructurales a nivel de membranas (3). El segundo proceso que sufre el espermatozoide antes de penetrar al óvulo, la reacción acrosomal, es un fenómeno de tipo exocitótico que afecta los dos tercios anteriores de la cabeza del espermatozoide (12), ésta se encuentra cubierta por el acrosoma (del griego "cuerpo punteagudo") que es una estructura con el mismo origen y constitución de los lisosomas (12,13,14)

(Figura 1); al llevarse a cabo la reacción acrosomal se fusionan la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, formándose entonces múltiples vesículas cuyo contenido enzimático se libera para formar una abertura a través de las diferentes capas que envuelven al óvulo (2) (Figura 2); de esta forma al llegar el espermatozoide al ooplasma completará el material genético para el cigoto. El análisis del papel del acrosoma para penetrar el óvulo, ha sido facilitado por el desarrollo de un método de aislamiento de acrosomas por medio de extracciones con un detergente catiónico denominado Hyamina 2389 (15), en dichas preparaciones se ha encontrado actividad de diversas enzimas entre las que se encuentran: hialuronidasa (16), proteasas (16), deshidrogenasa láctica (16,17), neuraminidasa (18), fosfatasa ácida (15), fosfolipasa A (15), β -N-acetilhexosaminidasa (15), arilsulfatasa (15), anhidrasa carbónica (16), catalasa (16), y estereasa (19). Se ha encontrado evidencia experimental de que al llevarse a cabo la reacción acrosomal, algunas de estas enzimas podrían ser liberadas, expuestas y/o activadas para digerir los componentes de las capas que envuelven al óvulo y de esta forma abrir un pasaje (2); con las investigaciones encaminadas a encontrar una función específica de algunas de ellas, se ha llegado a establecer que al labilizarse la membrana plasmática del espermatozoide se libera hialuronidasa que digiere el ácido hialurónico entre las células del cumulus oophorus (2); también se ha detectado la presencia de una enzima proteolítica, la acrosina (15,20,21), que se activa pero queda unida al espermatozoide que ha sufrido la reacción acrosomal (15) y al actuar forma una fisura a través de la zona pellucida (2); la forma de detectar esta forma de activación sobre la superficie espermática consiste en separar a las células del medio sobrenadante y en resuspensiones celulares se realizan los ensayos enzimáticos correspondientes.

Desde los inicios en la investigación de la capacitación, varios estudios se han dirigido a eliminar el requerimiento de la estancia del espermatozoide en el tracto reproductor femenino, y así hay repor

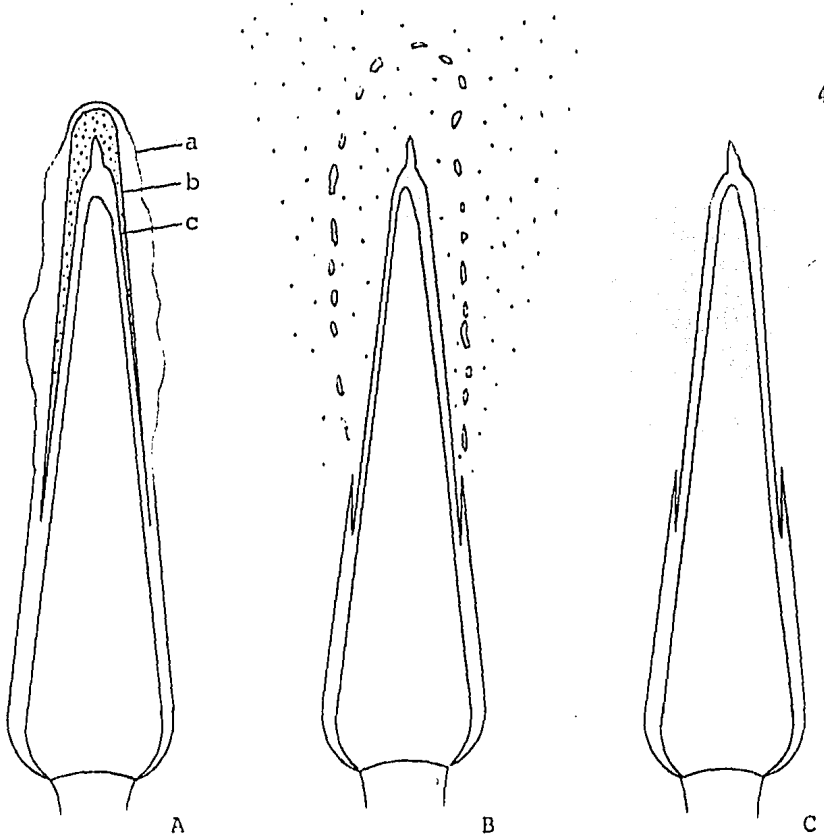


Figura 1.- Serie de cambios estructurales que sufre el espermatozoide durante la reacción acrosomal (2).

A.- Cabeza de un espermatozoide intacto de un mamífero en general.

B.- Se lleva a cabo la reacción acrosomal al fusionarse en múltiples puntos la membrana plasmática (a) y la membrana acrosomal externa (b). De esta forma es como el espermatozoide penetra el cumulus oophorus y llega a la zona pellucida.

C.- Forma en que el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosomal, después de la cual la membrana acrosomal interna (c) permanece intacta, y empieza a atravesar la zona pellucida y de esta forma alcanza el vitelo.

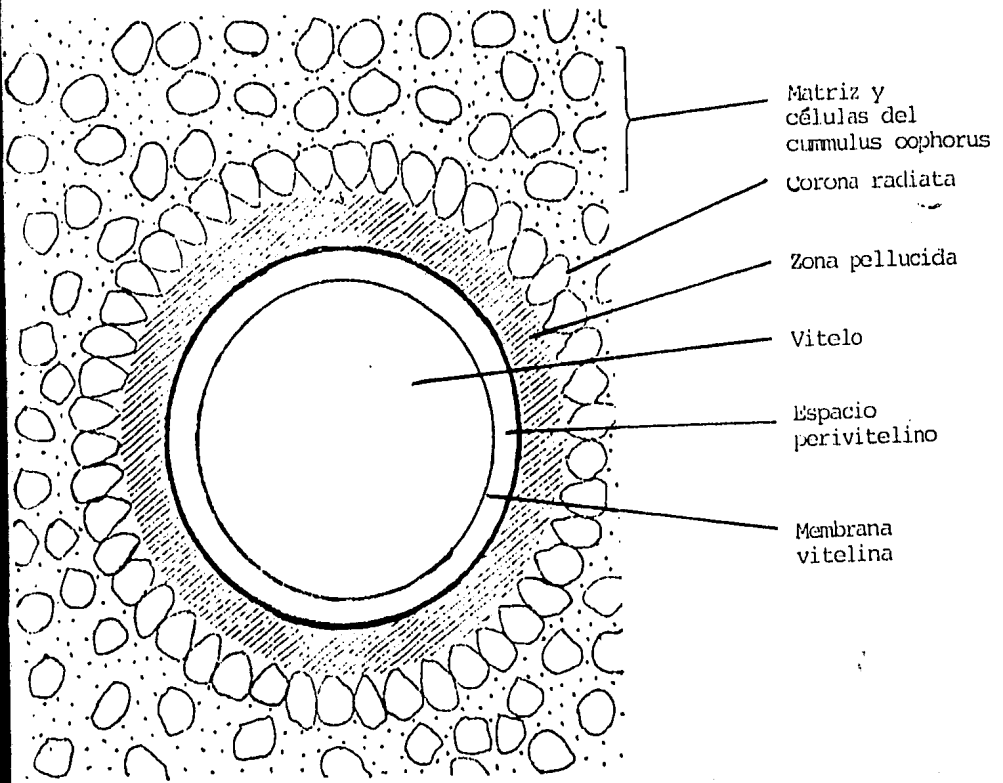


Figura 2.- Disposición de los varios componentes de un óvulo de mamífero, recientemente ovulado (2).

tes de capacitación "in vitro" para espermatozoide de hamster dorado (22), de hamster chino (23), de ratón (24), de coballo (25), de humano (26), de rata (27), y de conejo (28,29); los primeros resultados positivos se lograron con incubación en espermatozoide de hamster y de conejo en fluido folicular isólogo (3,30).

Otra de las técnicas de capacitación "in vitro" consiste en la incubación del espermatozoide en medio isotónico complementado con suero isólogo, con esta técnica se ha logrado la capacitación del espermatozoide de hamster (31), de conejo (21) y humano (32), creyéndose que algún componente del suero causa alteraciones en la composición química de la superficie espermática (32).

Algunos estudios han sugerido que un grupo de compuestos denominados glucosaminoglucanos (heparina, sulfato de dextrán, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán y ácido hialurónico) pudieran tener algún papel importante en el proceso de preparación del espermatozoide para adquirir su capacidad fecundante (33); así tenemos que se ha detectado secreción de estos compuestos por los folículos (34), y su presencia se ha encontrado en fluido folicular y oviductos de mamíferos (35,36).

Como la heparina forma parte del grupo de los compuestos glucosaminoglucanos, es utilizada en el trabajo aquí presentado para probar si su presencia causa algún efecto capacitante en una población de espermatozoides de conejo.

El proceso de capacitación de los espermatozoides puede ser detectado en el laboratorio de dos formas (37):

1.- En forma directa por la fecundación de óvulos maduros con espermatozoides capacitados.

2.- En forma indirecta por la detección de alguna característica fisiológica en espermatozoides capacitados, pero ausente en los no capacitados.

Entre las pruebas indirectas podemos citar la prueba de sobrevivencia, basada en el hecho de que el espermatozoide capacitado tiene un periodo de vida limitado, mucho menor que el de un espermatozoide sin capacitar (38); también tenemos el desplazamiento de tetraciclina de la superficie celular de un espermatozoide capacitado (39); y últimamente, la

liberación de enzimas acrosomales en la capacitación del espermatozoide de conejo (21).

La liberación de enzimas acrosomales en espermatozoide de conejo - capacitado fue observada primeramente por Akruk(21), este autor lleva a cabo la capacitación del espermatozoide de conejo por incubación en medio isotónico complementado con 20% de suero de coneja en ovulación, se paró los espermatozoides del medio sobrenadante y en éste detectó actividad de tres enzimas acrosomales que fueron la hialuronidasa, arilsulfatasa y β -N-acetilhexosaminidasa, las células separadas las usó para comprobar la capacitación de las mismas por experimentos de fertilización "in vitro".

El trabajo experimental aquí presentado utiliza la determinación de la liberación de arilsulfatasa y de β -N-acetilhexosaminidasa como parámetros para medir algún efecto en una población de espermatozoides de conejo por la presencia de la heparina, la hialuronidasa no fue ensada debido a que se ha encontrado la formación de complejos entre la heparina y esta enzima, fenómeno que representaría una variable que puede afectar las determinaciones de esta enzima (40,41).

La variedad de enzimas que son colectivamente denominadas sulfatasas son capaces de hidrolizar ciertos ésteres orgánicos sulfatados, de acuerdo a la parte orgánica de estos ésteres las enzimas pueden ser clasificadas dentro de los siguientes grupos, arilsulfatasas, alquilsulfatasas, glucosulfatasas, sulfatasas esteroides, etc.(42). Sin embargo, solamente dos tipos de un grupo, las arilsulfatasas, se han logrado aislar (43), así tenemos las arilsulfatasas que no son inhibidas por la presencia de sulfato (tipo I) y aquellas que si lo son (tipo II) (43).

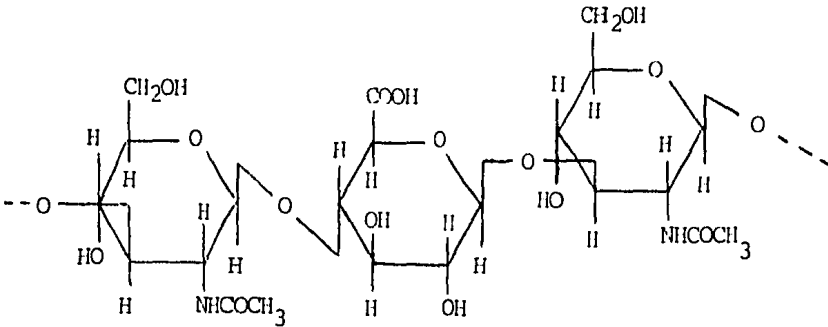
La mayoría de las arilsulfatasas de origen microbiano son del tipo I, su función en microorganismos no es conocida además de tener una ocurrencia esporádica. Las arilsulfatasas del tipo I también se han encontrado en tejidos de mamíferos, donde estas enzimas (sulfatasas C) se localizan en microsomas pero su función se desconoce.

Las arilsulfatasas del tipo II se han encontrado principalmente en tejidos animales (sulfatasas A y B), su función es desconocida y se han aislado de lisosomas.

La arilsulfatasa A es una glucoproteína ácida que difiere de la enzima B que es una glucoproteína levemente básica(44). En extractos de acrosoma de conejo se han aislado los dos tipos de enzima, el A - con un pH óptimo de 4.8 y el B con pH óptimo de 5.6 (45).

La presencia de arilsulfatasa acelera la dispersión del cumulus oophorus causada por la hialuronidasa "in vitro", por lo que se sugiere una acción sinérgica de ambas enzimas para abrir paso al espermatozoide por la capa celular mencionada(44).

La enzima denominada β -N-acetilhexosaminidasa actúa sobre oligosacáridos derivados del ácido hialurónico, removiendo los residuos no reductores terminales N-acetilhexosaminida(46).



En tejidos de mamíferos, esta enzima se encuentra en dos formas moleculares, la A y B; la enzima A parece ser un tetrámero compuesto de dos cadenas polipeptídicas α y dos cadenas β , la enzima B está compuesta de cuatro cadenas β presumiblemente idénticas(47). El epidídimo de jabalí es la fuente más rica conocida de esta enzima(46), sin embargo también se ha aislado de acrosomas de conejo(15,21); como fun

ción de dicha enzima se le ha sugerido necesaria para abrir paso al espermatozoide a través de la zona pellucida que es una capa no celular rica en glucoproteínas y glucoproteínas sulfatadas, y entonces sería necesaria una acción sucesiva de arilsulfatasa, β -N-acetilhexosaminidasa y acrosina que es una proteasa (47).

HIPOTESIS

Al poner en contacto una población de espermatozoides de conejo con la heparina, se espera que exista una respuesta fisiológica, manifestada en la liberación de algunas enzimas acrosomales.

OBJETIVOS

- 1.- Observar si existe liberación de ciertas enzimas acrosomales (Arilsulfatasa y β -N-acetilhexosaminidasa) en espermatozoide de conejo por efecto de la heparina.
- 2.- De existir liberación de enzimas acrosomales por presencia de heparina, desarrollar una comparación con la liberación enzimática causada por el agente capacitante desarrollado por Akruk (21), es decir incubación en medio con suero de coneja en ovulación.
- 3.- Contribuir a la serie de investigaciones tendientes a determinar una posible función de las dos enzimas ensayadas, en el proceso de fertilización; para lo cual se llevarán a cabo determinaciones enzimáticas tanto en medio sobrenadante como en suspensiones de células, después de ser tratadas bajo diferentes condiciones.

MATERIALES Y METODOS

A.- Obtención y manejo de la muestra biológica.

1.- Equipo utilizado.

- a) Vagina artificial.
- b) Filtros de fibra de vidrio.
- c) Microscopio Baush & Lomb.
- d) Campana horizontal de flujo laminar Coper: Filtration Mod. CFLH-120.
- e) Filtro millipore (0.22 micrómetros, $\phi = 0.47$ cm.).
- f) Potenciómetro Coleman.
- g) Cámara de Nuevauer.
- h) Centrífuga clínica Clay Adams Co. Inc.

2.- Reactivos.

a) Medio de Bracket (48) (Cuadro 1).

b) Medio de Akruk (21). Este medio tiene la misma composición que el descrito en el inciso anterior, únicamente que en lugar de albúmina al 0.3 % , contiene suero de coneja al 20 % . Este suero fue obtenido por medio de punción cardiaca en conejas a las cuales se les indujo -- previamente la ovulación por la monta del macho; para la inactivación del complemento presente en el suero de coneja, éste se calentó a 56 °C durante 30 minutos.

c) Colorante de Eosina (49). Se prepara con Eosina al 0.5 % en amortiguador para pH=7.4, éste último es preparado mezclando 100 ml de Na_2HPO_4 150 mM con 25 ml de KH_2PO_4 150 mM.

Los medios utilizados a lo largo de los experimentos aquí presentados, fueron previamente esterilizados por medio de filtración, además - el material usado en las muestras de espermatozoides , desde el momento de su recolección hasta las incubaciones, fue esterilizado en autoclave; así mismo, el manejo de las muestras hasta el momento de su preparación para las incubaciones, fue llevada a cabo en una campana de flujo laminar. Con las medidas anteriores se disminuye la posibilidad de una contaminación microbiana de las muestras.

Componente	g/lt	Concentración molar
NaCl	6.550	0.1120
KCl	0.300	0.0040
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.330	0.0022
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.113	0.0008
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.106	0.0005
NaHCO ₃	3.104	0.0370
Glucosa	2.500	0.0139
Acido pirúvico (Sigma)	0.110	0.0012
Albúmina bovina cristalina (Sigma)	3.000	
Ampicilina	0.031	
pH de 7.8 a 37 °C		

Cuadro 1 .- Composición del medio de Bracket (48).

3.- Metodología.

a) Obtención de las muestras biológicas.

Las muestras de semen utilizadas para el desarrollo del presente trabajo, fueron obtenidas por medio de una vagina artificial, a partir de conejos adultos de la raza Nueva Zelanda con edad promedio de dos años con fertilidad comprobada. Para obtener la muestra, se puso al macho en presencia de la hembra y se permite la monta; una vez que el macho se ha excitado, se coloca la vagina artificial entre los dos animales, de tal forma que la eyaculación se efectúe dentro de la vagina artificial; este aparato está formado por un cilindro de dos paredes (Figura 3), el espacio entre las dos paredes se llenó con agua a una temperatura de 40 °C, siendo la pared interna de hule suave y muy flácido, lo cual evita que el conejo se lastime durante la eyaculación.

b) Espermatozocopia parcial.

Las muestras de semen se dejaron en reposo durante 60 minutos a temperatura ambiente y dentro de una campana de flujo laminar para permitir la total licuefacción de la misma, transcurrido este tiempo se efectuó una espermatozocopia parcial, determinándose volumen, número de espermatozoides, viabilidad y movimiento de los mismos; las técnicas utilizadas se basan en las recomendadas por la OMS (49).

Conteo de espermatozoides.- Para determinar la concentración de estas células, la muestra de semen se diluyó 1:20 en una pipeta para dilución para glóbulos blancos con agua destilada para inmovilizarlos, y se contaron en una cámara de Neuvauer en forma semejante al conteo de eritrocitos; el resultado de esta cuenta corresponde al número de espermatozoides expresado en millones por mililitro de la muestra original.

Movilidad cuantitativa.- Para la valoración de la movilidad de los espermatozoides, se han empleado un sinúmero de métodos, desde la sir-

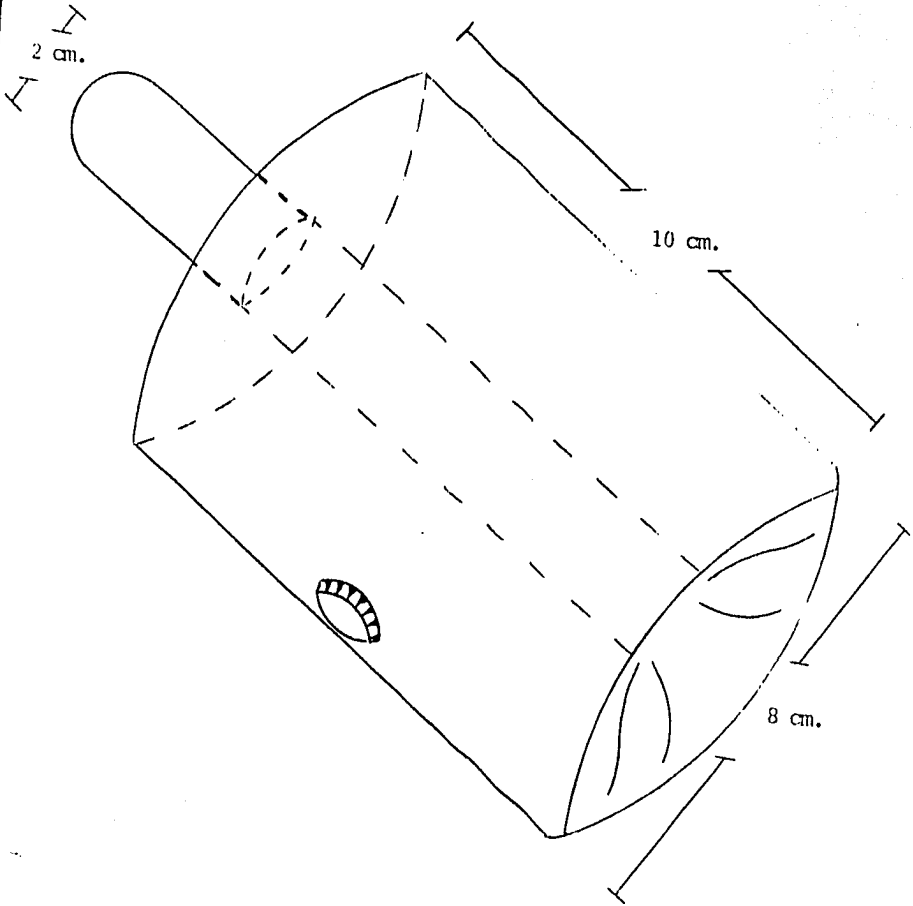


Figura 3.- Vagina artificial para la obtención de semen de conejo.

ple observación microscópica , hasta los sistemas más complicados de tecnología de rayos laser y computación. Para los fines del presente trabajo, la movilidad fue valorada por el método subjetivo, que permite valorar en forma porcentual los diferentes tipos de movilidad que se presentan en una muestra de semen (progresiva, vibratoria e inmóviles). Alícuotas de 10 μ l de la muestra se colocaron entre un porta y cubreobjetos, se contaron los espermatozoides móviles como los inmóviles, en por lo menos 10 campos separados y seleccionados al azar (cuando menos 100 espermatozoides deben contarse).

Viabilidad.- El método más común para evaluar la viabilidad de los espermatozoides es estimando su movilidad, sin embargo esta estimación no permite hacer una diferenciación entre los espermatozoides muertos y los vivos pero inmóviles. La técnica de tinción de colorantes vitales (49), los cuales penetran únicamente en aquellos espermatozoides que presentan algún daño en sus membranas , permite catalogar porcentualmente una muestra de semen: % de espermatozoides sin teñir, % de espermatozoides inmóviles sin teñir (viables), y % de inmóviles teñidos (no viables). La técnica consiste en mezclar volumen a volumen una alícuota de semen y una solución de Eosina en amortiguador de fosfatos, y contar 100 células.

c) Preparación de las muestras seleccionadas.

Las muestras de semen con una espermatobioscopia normal, fueron mezcladas y diluidas con el medio de Bracket (48) sin albúmina en una proporción de 1:3 y posteriormente filtradas a través de una columna de fibra de vidrio de 3 cm. contenida en una pipeta Pasteur, con la finalidad de mejorar la calidad de la muestra de espermatozoides. Alícuotas de 10 μ l del filtrado fueron colocados al microscopio, para comprobar la eliminación de espermatozoides muertos , detritos y contaminantes presentes en el semen de conejo. El resto del filtrado fue centrifugado a 2 500 RPM durante 10 minutos y el paquete celular se resuspendió en un volumen de 2 ml. del mismo medio, se repitió la centrifugación bajo las condiciones anteriores y resuspendiéndose en un volú-

men tal para obtener una suspensión de espermatozoides de 5×10^8 - células por mililitro en el medio que fuera el indicado, según las condiciones de capacitación a ensayar. Para cada uno de los ensayos de incubación se utilizaron como mínimo 50×10^6 células para contar con muestras suficientes en los análisis enzimáticos.

Con las condiciones de lavado de los espermatozoides se logra separar un 99.6 % de plasma seminal contaminante (15).

El número de células tan alto para cada sistema de incubación, fue debido a las mínimas lecturas espectrofotométricas observadas - para un número de espermatozoides dado.

B.- Ensayos de condiciones de capacitación.

1.- Equipo utilizado.

a) Incubadora National.

2.- Reactivos.

a) Medio de Akruk (21).

b) Medio de Bracket (48).

c) Aceite mineral (Sigma 400-5).

El aceite mineral utilizado para cubrir los sistemas de incubación durante la capacitación espermática, fue previamente lavado con 20 ml. de agua bidestilada para 100 ml. de aceite, saturado con el medio de Bracket y burbujeado durante 15 minutos con CO₂ al 5 % en aire.

En experimentos realizados en la División de Biología Molecular de la Unidad de Investigación del Centro Médico Nacional, se demostró que las muestras de espermatozoides incubadas en medios cuyo sistema amortiguador es $\text{NaHCO}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$ se producen cambios significativos en el pH original. Dichos cambios se han atribuido a la liberación de CO₂, que se presenta durante el metabolismo de los mismos espermatozoides, lo cual puede ser evitado cuando los sistemas se cubren con el aceite mineral tratado.

d) Como fuente de heparina se utilizó una solución estéril LIPO-HEPIN (Riker), con una concentración de 5000 UI por ml; cada 10 UI de heparina equivalen a 1 mg (50).

3.- Metodología.

Los ensayos de capacitación fueron dirigidos, primero a detectar si la heparina lleva a cabo algún efecto liberador de las enzimas

acrosomales ensayadas, y por otro lado comparar esta liberación con la causada por el método capacitante de Akruk (21).

Cada una de las condiciones son detalladas a continuación, utilizándose para cada una de ellas una población de 1×10^8 espermatozoides de conejo ya lavados de plasma seminal y una concentración de 5×10^8 células por ml.

a) Experimentos preliminares con incubaciones a 37°C en medio de Bracket (48) sin albúmina en presencia de 10, 100 y 1000 UI en -- tiempos de 20 horas; con estos experimentos se esperaba detectar si existe algún efecto liberador de enzimas acrosomales, por la presencia de este agente.

b) Se llevaron a cabo incubaciones por 1/4 y 20 horas a 37°C en medio de Bracket; Akruk (21) en sus experimentos demostró que la incubación por 1/4 hora no lleva a cabo la capacitación, dicha condición se usará como control en los experimentos con medio complementado con suero de coneja y con heparina.

c) Experimentos con medio de Akruk con suero de coneja ovulada y con 100 UI de heparina en medio de Bracket sin albúmina; cada uno de ellos con incubaciones a diferentes tiempos (1/4, 5, 10, 15 y 20 horas). En sus experimentos este autor encontró la capacitación del espermatozoide después de 20 horas de incubación a 37°C en el medio por él diseñado, con la subsiguiente liberación enzimática. Las incubaciones de menor tiempo fueron dirigidas para llevar a cabo una comparación con la forma de liberación enzimática causada por ambos agentes, durante esos periodos de tiempo.

d) Por otro lado, se realizaron experimentos complementarios -- variando la concentración de heparina desde 0 UI hasta la concentración de heparina que causó la máxima liberación de enzimas en los experimentos del inciso a), las concentraciones seleccionadas fueron de 30, 60, 90, y 120 UI en medio de Bracket sin albúmina en incubaciones por 1/4 y 20 horas.

e) Determinaciones vitales en presencia de heparina. Se llevaron a cabo determinaciones de viabilidad de espermatozoides después de su incubación con 100 UI de heparina, a diferentes tiempos (0 y 60 minutos).

C.- Análisis enzimático.

1.- Equipo utilizado.

- a) Membrana de diálisis Curtin Sc. Co.
- b) Ultracentrífuga Beckman Mod 12-65B con rotor tipo 50.
- c) Micropipetas Oxford 10-200 μ l.
- d) Espectrofotómetro Beckman Modelo DB-G.
- e) Celdas HELMA, cuarzo, 1 cm.
- f) Potenciómetro M-38.

2.- Reactivos.

- a) Amortiguador de citrato de sodio pH=4.5

Se prepara mezclando 49,5 ml de solución de ácido cítrico 0.1 N con 50.5 ml de citrato de sodio 0.1 N. En la técnica de determinación se usaron 0.2 ml de la solución anteriormente descrita, que equivalen a 10^{-5} moles de citrato de sodio; se usa en la determinación de actividad de β -N-acetilhexosaminidasa.

- b) Amortiguador de citrato de sodio pH=5.2

Para preparar este amortiguador se mezclan 50 mmoles de acetato de sodio con 16.6 mmoles de ácido acético en 50 ml de agua destilada.

Cada 0.1 ml de esta solución corresponde a 100 μ moles de acetato de sodio, que formarán parte del sistema de análisis de la arilsulfatasa en cada muestra enzimática.

- c) Sustrato para β -N-acetilhexosaminidasa.

Se utilizan 2.4 μ moles de p-nitrofenol N-acetil- β -D-glucosaminidasa (Sigma) correspondientes a 821 μ g en un volumen total de 200 μ l para cada una de las determinaciones enzimáticas.

- d) Sustrato para arilsulfatasa.

Se utilizan 2.4 μ moles de sulfato de p-nitrocatecol (Sigma que corresponden a 747.4 μ g en un volumen final de 0.1 ml con agua destilada para cada una de las muestras enzimáticas.

3.- Metodología.

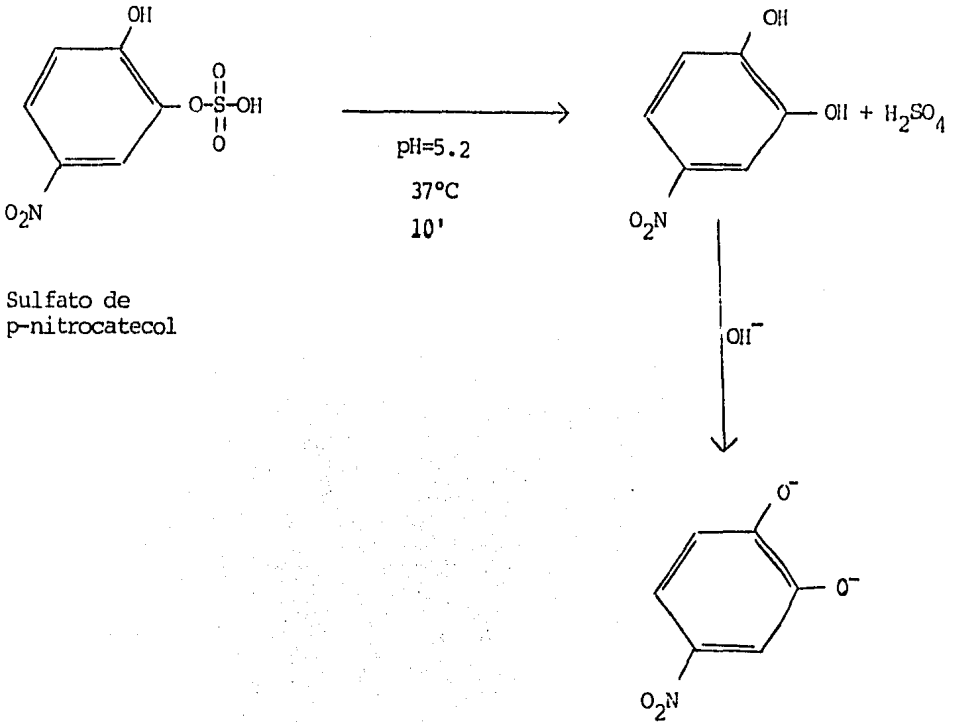
Las enzimas ensayadas fueron la Arilsulfatasa y la β -N-acetilhexosaminidasa, para su determinación se siguió el procedimiento descrito - por Akruk (21), el cual involucra un tratamiento previo ; cada muestra fue dialisada en el tubo en el que previamente había sido incubada, la diálisis se llevó a cabo a través de una membrana con que se selló la - boca de los tubos y se mantuvieron boca abajo con agitación constante - durante 20 horas en un recipiente conteniendo aproximadamente 20 litros de agua destilada, y dentro de un cuarto frío a 4 °C (dado el mínimo vo- lumen de las muestras, se diseñó esta forma de diálisis con la que se e- vitó pérdida de material al evitarse más manejo de las mismas). El obje- to de la diálisis, como ha sido señalado por Allison (15), Norwood (51) y Hook (52), fue la eliminación de iones inhibidores que actúan como in- hibidores enzimáticos; transcurridas las 20 horas las muestras fueron - centrifugadas a 15 000 RPM durante 20 minutos para la separación de se- dimentos y sobrenadantes, una vez separados, ambos se ajustaron a 500 μ l con agua destilada y contando entonces con 1×10^8 células tanto para - el sobrenadante como sedimentos en los 500 μ l, de aquí se evaluó cada enzima por separado; los resultados de β -N-acetilhexosaminidasa se dan en mUnidades Enzimáticas, correspondiendo cada una de ellas a 1 nmol de producto formado en un minuto de actividad.

a) Análisis de Arilsulfatasa (Clasificación enzimática 3.1.6.1.).

Nombre sistemático.- Arilsulfato sulfohidrolasa (53).

El método utilizado para medir la actividad de esta enzima se basó en la cuantificación colorimétrica de la parte orgánica resultante de - la acción enzimática sobre el sulfato de p-nitrocatecol bajo condicio- nes controladas de temperatura y pH en un cierto tiempo.

La reacción se muestra a continuación.



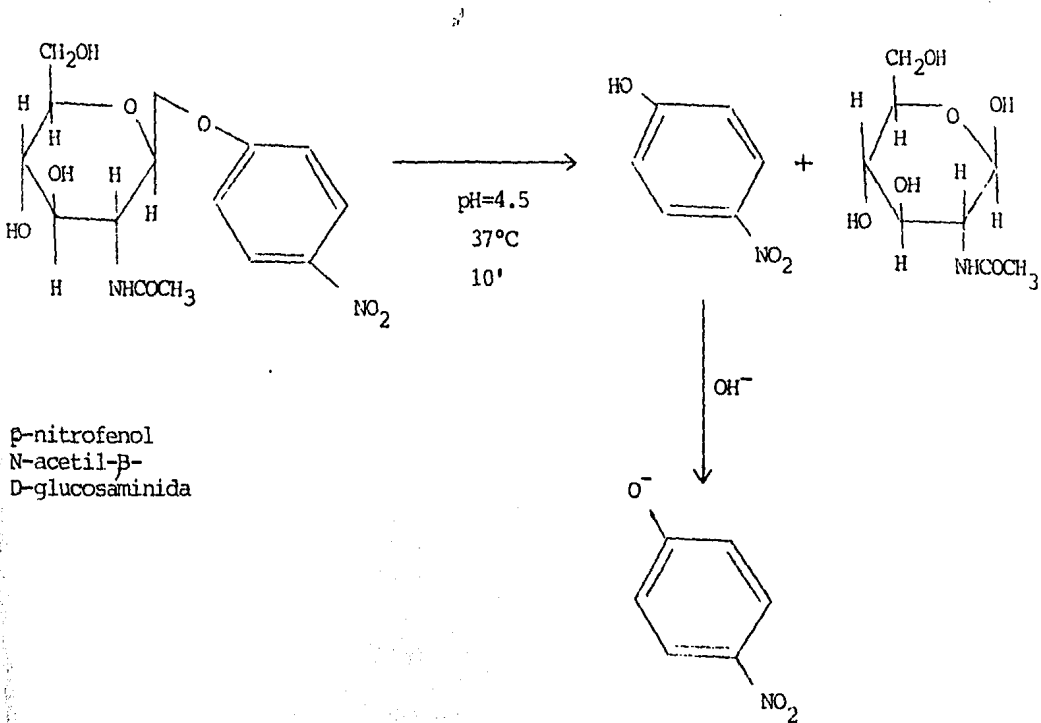
La actividad enzimática en sedimentos y sobrenadantes fue determinada en una solución que contenía 100 μ l de amortiguador de acetato de sodio con pH=5.2, 2.5 μ moles de p-nitrocatecol (100 μ l) y el equivalente a 10×10^6 células (50 μ l) en el caso de los sobrenadantes, y de 50×10^6 espermatozoides con sobrenadantes (250 μ l). Las muestras de sedimentos se igualaron al volumen de los sobrenadantes (450 μ l) con agua destilada. Inmediatamente se procedió a la incubación de las muestras a 37 °C por 10 minutos, y la reacción enzimática fue detenida al cabo de ese tiempo por la adición de 2.5 ml de NaOH 1 N, con lo cual también se desarrolla el color. Las lecturas se realizaron a 510 nm usando como blanco un sistema sin muestra enzimática y sustituyendo el volumen de -

Esta con agua destilada. Desgraciadamente no fue posible contar con el p-nitrocatecol para realizar la curva patrón, por lo que los resultados de esta enzima se reportarán en unidades de absorbencia. Después de adicionar el NaOH 1 N a las muestras de sedimentos, éstas fueron centrifugadas a 2500 RPM para eliminar suspensiones que interfirieran con las determinaciones.

b) Análisis de β -N-acetilhexosaminidasa (Clasificación enzimática 3.2.1.30.).

Nombre sistemático.- β -2-Acetamido-2-deoxi-D-glucósido acetamido deoxiglucosidrolasa (53).

La actividad de esta enzima fue determinada por su acción sobre un sustrato bajo condiciones controladas de pH y temperatura, llevando a cabo la cuantificación del producto aromático liberado en la reacción, la cual es descrita a continuación.



La determinación se llevó a cabo tanto en sobrenadantes como en sedimentos en muestras equivalentes a 50×10^6 células (250 μ l), además de 10 μ moles de sustrato (200 μ l) y 200 μ l del amortiguador de citrato de sodio. El contenido se lleva inmediatamente a incubación a 37 °C por 10 minutos , pasado este tiempo se adicionan 2.5 ml de NaOH 0.1 N con el fin de parar la reacción enzimática y desarrollar el color; la cantidad de p-nitrofenol liberado fue determinado espectrofotométricamente a 400 nm por la interpolación en una curva estándar realizada paralelamente con las muestras (Gráfica 1), la curva se prepara al volumen final de 650 μ l con agua destilada; como blanco se utilizó un ensayo con un volumen de agua destilada que sustituye la muestra enzimática.

Después de la adición de NaOH 0.1 N , las muestras de sedimentos se centrifugaron por 5 minutos a 2500 RPM con el fin de eliminar suspensiones que interfirieran con las lecturas espectrofotométricas.

RESULTADOS

Se llevaron a cabo experimentos preliminares tendientes a determinar si la heparina tenía algún efecto en la activación y/o liberación de enzimas, los resultados de estos experimentos (tabla 1) no indican aumento con 10 UI de heparina con respecto al control, sin embargo la presencia de 100 y 1000 UI tuvo como resultado que tanto en sobrenadantes como en sedimentos, se detectaran actividades mayores de ambas enzimas con respecto a los controles.

Dejando en contacto las células con la heparina por 20 horas, se pudo notar que los valores registrados son muy similares entre 100 y 1000 UI, por este hecho los estudios tendientes a una comprensión de los efectos de la heparina estuvieron basados en la concentración de 100 UI, dejando para discusión los resultados obtenidos con 1000 UI.

El hecho de haber observado la activación y/o liberación de enzimas por la presencia de la heparina, dió como resultado la necesidad de una comparación con otro método de liberación enzimática ya ponderado.

a) Comparación con otro agente de liberación enzimática.

- Análisis para arilsulfatasa.

Para llevar a cabo esto, los resultados del efecto del sistema con 100 UI de heparina, se comparó con los resultados al poner en contacto a los espermatozoides de conejo con medio de Bracket (48) y con medio de Akruk (21), es decir con suero de coneja al 20 %; se observó además el comportamiento de los sistemas de incubación en periodos de tiempo entre 1/4 y 20 horas.

En la gráfica 2 se muestra una liberación mayor con medio de Akruk y con 100 UI de heparina que con medio de Bracket, estos aumentos son

Arilsulfatasa (Absorbencia/10⁸ espermatozoides)

	Sobrenadante	Sedimento
Control	0.10	0.11
10 UI	0.10 ($\Delta = 0 \%$)	0.12 ($\Delta = 10 \%$)
100 UI	1.19 ($\Delta = 1190 \%$)	0.80 ($\Delta = 727 \%$)
1000 UI	1.10 ($\Delta = 1100 \%$)	0.76 ($\Delta = 691 \%$)

B-N-acetilhexosaminidasa (mUnidades enzimáticas)

	Sobrenadante	Sedimento
Control	4.0	0.8
10 UI	4.1 ($\Delta = 0 \%$)	0.8 ($\Delta = 0 \%$)
100 UI	13.0 ($\Delta = 325 \%$)	46.8 ($\Delta = 585 \%$)
1000 UI	10.0 ($\Delta = 250 \%$)	45.1 ($\Delta = 563 \%$)

Tabla 1.- Resultados de los experimentos preliminares probando la presencia de la heparina en una población de espermatozoides.

336 % y 588 % a 1/4 horas y de 236 % y 222 % a 20 horas. También se nota que para el medio de Bracket y de Akruk se observa aumento en las actividades en sobrenadantes después de pasadas 20 horas, sin embargo se ve que para el medio con 100 UI de heparina existe una leve disminución en la detección enzimática después de pasadas las 20 horas de incubación.

El comportamiento de la arilsulfatasa en sedimentos observado en la gráfica 3, evidencia un notable aumento en la actividad en medio de Akruk y con heparina en comparación con la actividad producida por el medio de Bracket a 1/4 y 20 horas de incubación. Para 1/4 horas, los incrementos con respecto al medio de Bracket son de 504 % para el medio de Akruk, y de 520 % con heparina a 1/4 horas; a las veinte horas los aumentos antes descritos son de 236 y 320 %.

Fijando la atención en la gráfica 4 se aprecia una forma de liberación de arilsulfatasa totalmente opuesta entre el suero y la heparina, - en el caso de ésta se nota un incremento desde el tiempo 1/4 hora que se mantiene más o menos constante hasta las 20 horas, y en el caso del suero hay un incremento aparentemente gradual hasta las 20 horas. La gráfica 5 correspondiente a sedimentos muestra un comportamiento de mantenimiento de la actividad desde 1/4 a 20 horas para ambos agentes.

- Análisis para β -N-acetilhexosaminidasa.

En la gráfica 6 se muestran las lecturas correspondientes a esta -- enzima en sobrenadantes, en ellas se notan actividades mayores con medio de Akruk y con heparina que con medio de Bracket, esto ocurre tanto a -- 1/4 como a 20 horas, dichos incrementos son de 188 % y de 935 %, a 1/4 hora y de 466 % y 910 % a 20 horas. Para el medio de Akruk es claro un -- aumento en la liberación enzimática después de 20 horas; el comportamiento observado con 100 UI de heparina muestra una disminución en la actividad después de 20 horas.

En el caso de sedimentos (gráfica 7) se observan notables aumentos en la actividad tanto a 1/4 como a 20 horas; en comparación con el medio de Bracket, los medios de Akruk y con heparina tienen incrementos de -- 12086 % y 9379 % a 1/4 hora, y a 20 horas los incrementos son de 341 % y 371 %. En este caso la incubación en medio de Bracket por 20 horas dió

lugar a un aumento muy considerable en la actividad , por otro lado el tratamiento con medio de Akruk ocasionó una activación pero con disminución considerable en la actividad después de 20 horas; en presencia de heparina existe también una disminución en la actividad enzimática después de 20 horas de incubación.

En la gráfica 8 se puede notar que en el caso de la heparina se -- presenta el máximo valor a 1/4 hora presentando una leve disminución pasadas las 20 horas, por otro lado en el caso del suero hay una tendencia a incrementar la liberación a medida que pasa el tiempo, llegando a duplicar el registro correspondiente a 1/4 hora. En la gráfica 9, los valores correspondientes a sedimentos evidencian una tendencia a disminuir la detección de la actividad con el tiempo, lo cual se hace más claro en el caso de la presencia de suero al 20 %.

b) Análisis de efectos producidos por la heparina.

Buscando datos adicionales a los efectos producidos en las enzimas al estar en contacto los espermatozoides de conejo con la heparina, se pensó en un experimento consistente en poner a los espermatozoides en presencia de diferentes concentraciones de heparina hasta llegar a la concentración que centró la concentración en los experimentos preliminares; las concentraciones elegidas para tales pruebas son de 30,60,90 y 120 UI de heparina, eligiendo como concentración mínima 30 UI puesto -- que con 10 UI no se había notado ninguna diferencia con respecto al control, para ninguna enzima tanto en sobrenadante como en sedimento.

- Análisis para arilsulfatasa.

En la gráfica 10 se observa que existe aparentemente una relación lineal en las concentraciones de heparina ensayadas y la liberación de esta enzima en el sobrenadante por 1/4 hora de incubación.

En los registros correspondientes a 20 horas se nota un aumento en las lecturas hasta 90 UI en comparación con los correspondientes a 1/4 hora, presentando un incremento lineal hasta 60 UI de heparina.

En la gráfica 11 es observable un aumento de la actividad detecta-

da en sedimentos desde la mínima concentración de heparina a 1/4 hora, la cual se mantiene aparentemente constante hasta el valor de 120 UI, - siendo este incremento muy considerable con respecto al control. En el caso de las lecturas de 20 horas, en presencia de heparina se presenta una activación desde 30 UI no tan marcado como a 1/4 hora.

- Análisis para β -N-acetilhexosaminidasa.

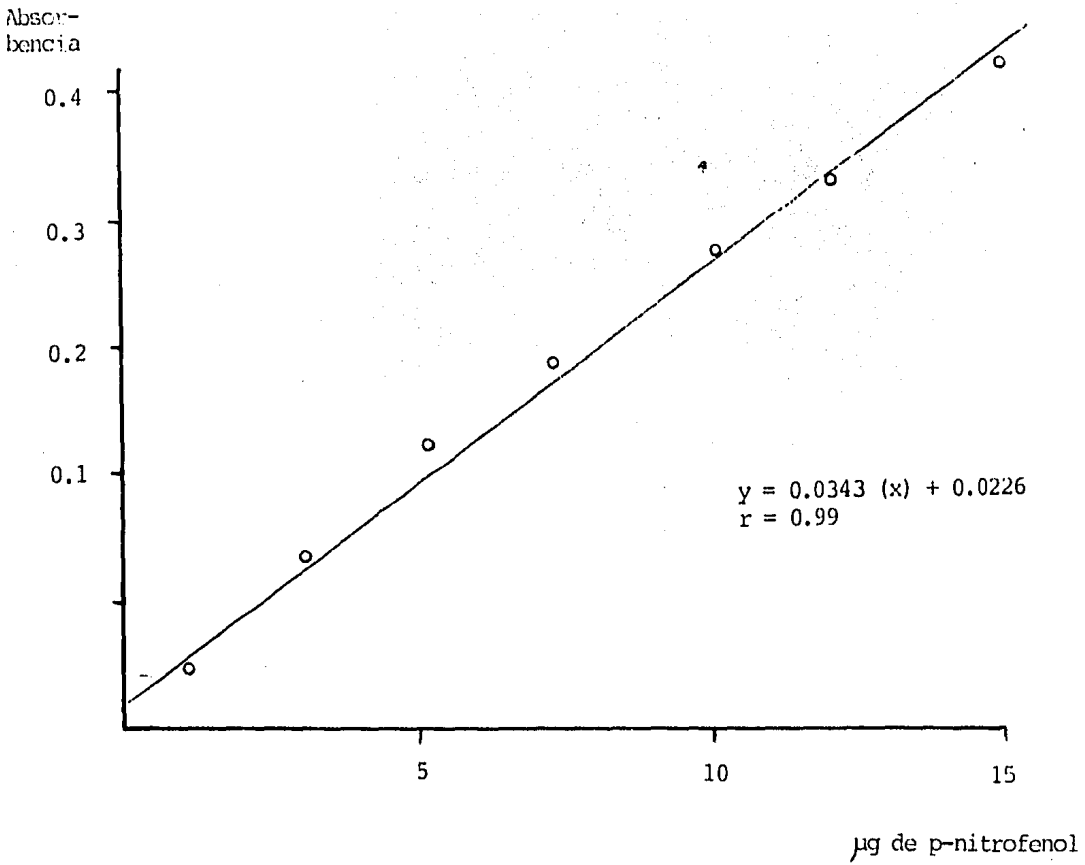
Observando la gráfica 12 se hace evidente que también existe una - correlación entre el número de concentración de heparina y la libera -- ción de enzima; sin embargo, después de pasadas 20 horas se tiene una - disminución en la liberación en todas las concentraciones y manteniéndo se, sin embargo, un aparente aumento lineal después de 60 UI.

Analizando la gráfica 13 se ve que al igual que la arilsulfatasa, en el tiempo 1/4 hora se presenta un incremento en la actividad de la - enzima desde 30 UI, presentando en este caso una aparente disminución - en las lecturas a medida que pasó el tiempo. Las lecturas correspondientes a 20 horas presentan una considerable disminución en todas las lec- turas incluyendo las correspondientes a los valores máximos de heparina.

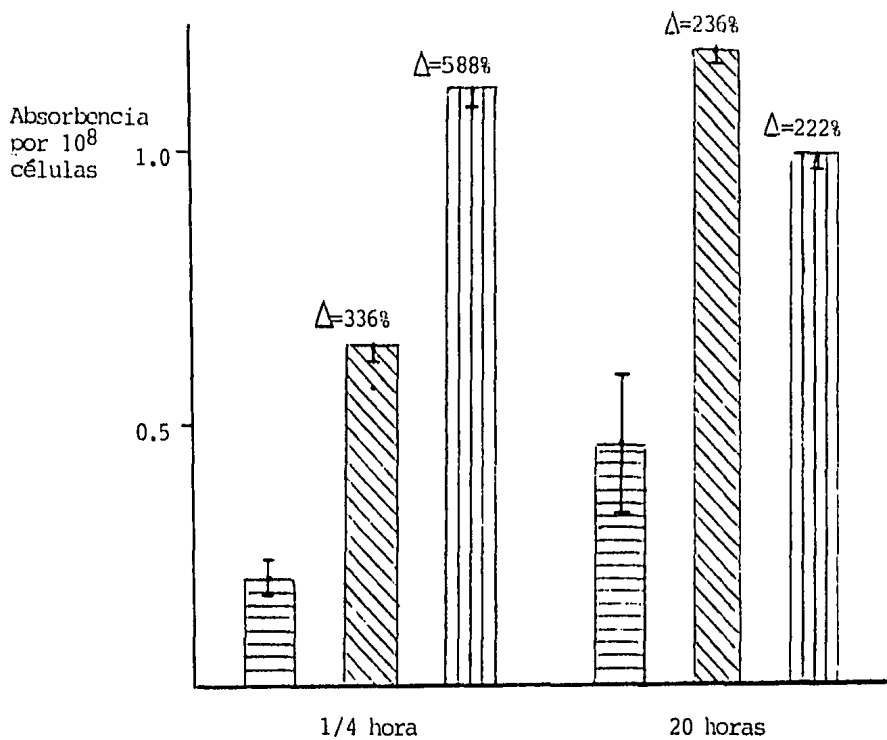
c) Pruebas vitales en presencia de heparina.

Los efectos producidos por las diferentes concentraciones de hepa- rina no fueron estadísticamente diferentes (prueba de hipótesis, $\alpha = 0.5 \%$) (gráfica 14) .

Los resultados de estas pruebas están indicando que la presencia - de la heparina no tiene efecto fisiológico que aparentemente afecte la viabilidad de la célula, eliminando de esta forma la posibilidad de que una muerte celular sea la causa de liberación enzimática.



Gráfica 1.- Curva patrón de p-nitrofenol para determinación de unidades enzimáticas de β -N-acetil hexosaminidasa.



Gráfica 2.- Determinaciones de arilsulfatasa en sobrenadantes después de diferentes condiciones de incubación.

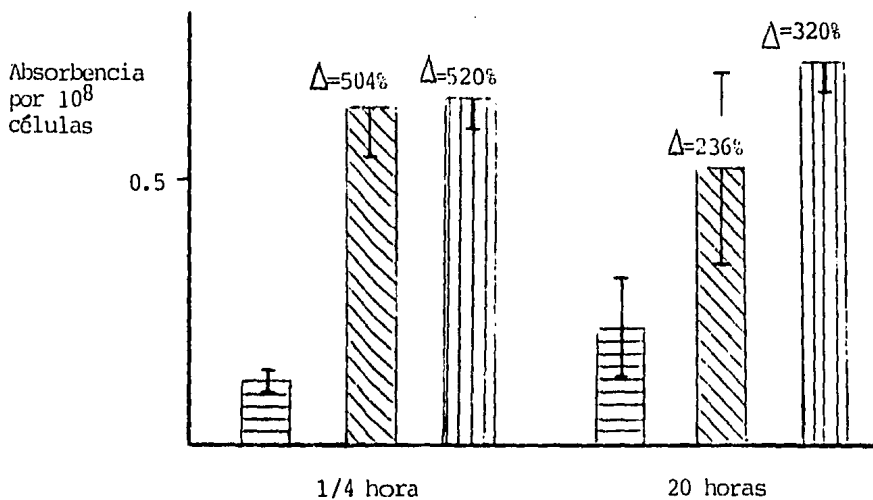
Δ = incrementos con respecto al control

I Desviación estándar de 4 experimentos

▬ Medio de Bracket

▨ Medio de Akruk

▮ 100 UI de heparina



Gráfica 3.- Determinaciones de arilsulfatasa en sedimentos después de diferentes condiciones de incubación.

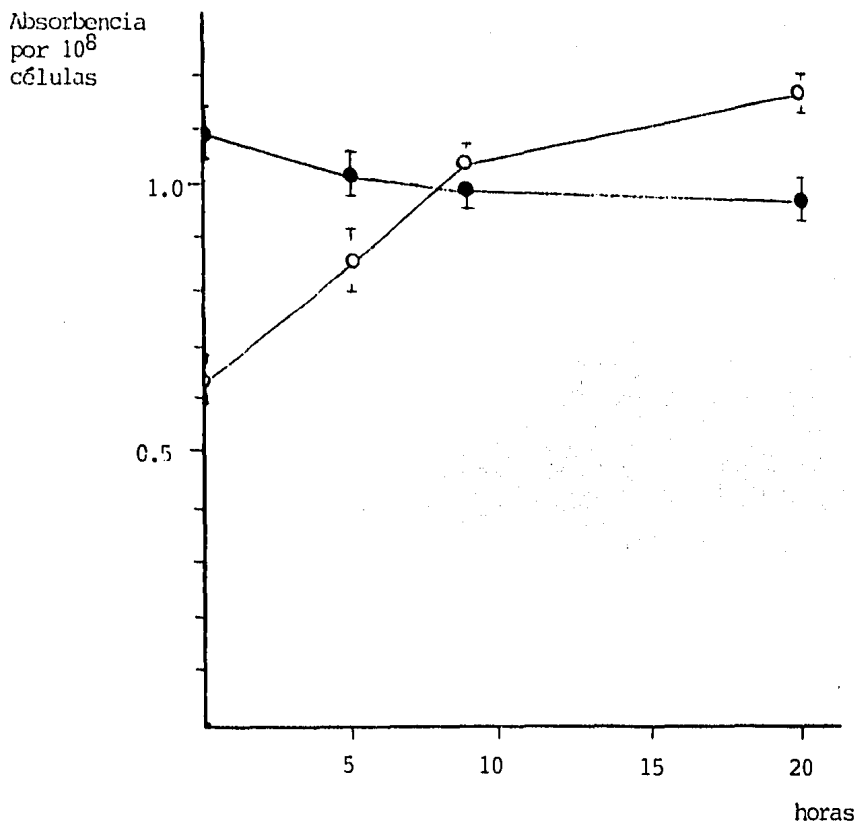
Δ = incrementos con respecto al control

⌊ Desviación estándar de 4 experimentos

▬ Medio de Bracket

▨ Medio de Akruk

▮ 100 UI de heparina



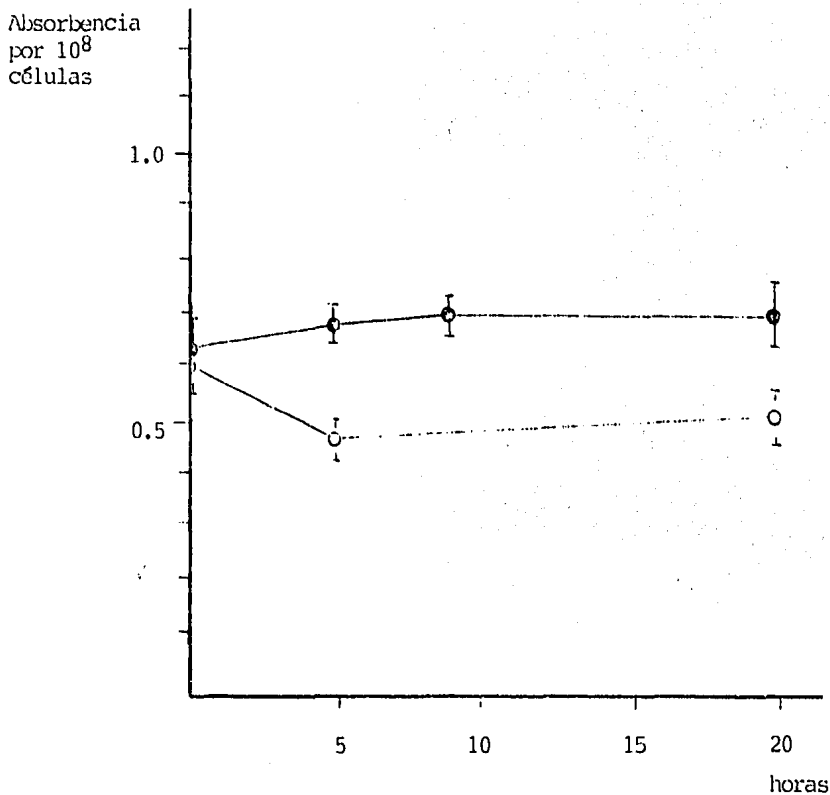
Gráfica 4.- Determinaciones de arilsulfatasa en sobrenadantes a diferentes tiempos en presencia de 100 UI de heparina y de suero al 20%

● heparina

○ Osuelo 20%

┌ Desviación estándar de 3 experimentos

└ Desviación estándar de 3 experimentos

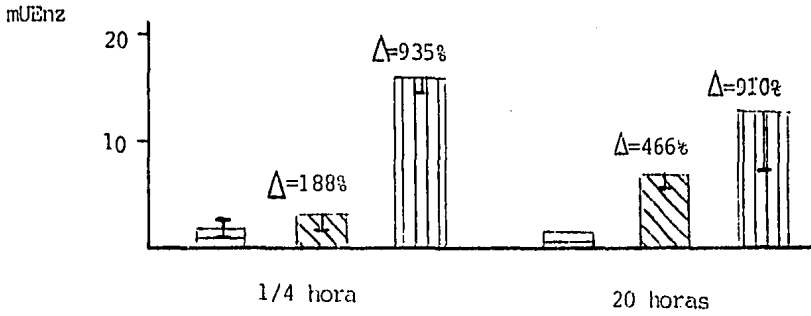


Gráfica 5.- Determinaciones de arilsulfatasa en sedimentos a diferentes tiempos en presencia de 100 UI de heparina y de suero al 20%

●—● heparina

○—○ suero 20%


┌ Desviación estándar de 3 experimentos
└
┌ Desviación estándar de 3 experimentos
└





Gráfica 6.- Determinaciones de β -N-acetilhexosaminidasa en sobrenadantes después de diferentes condiciones de incubación.

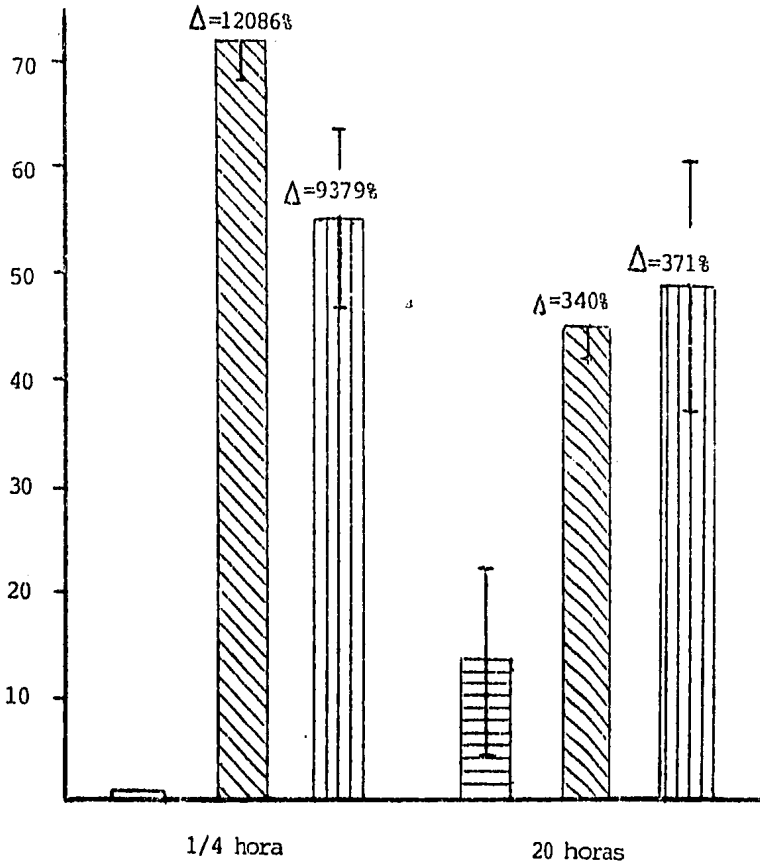
Δ = incrementos con respecto al control

I Desviación estándar de 4 experimentos

 Medio de Bracket

 Medio de Akruk

 100 UI de heparina



Gráfica 7.- Determinaciones de β-N-acetilhexo-saminidasa en sedimentos después de diferentes condiciones de incubación.

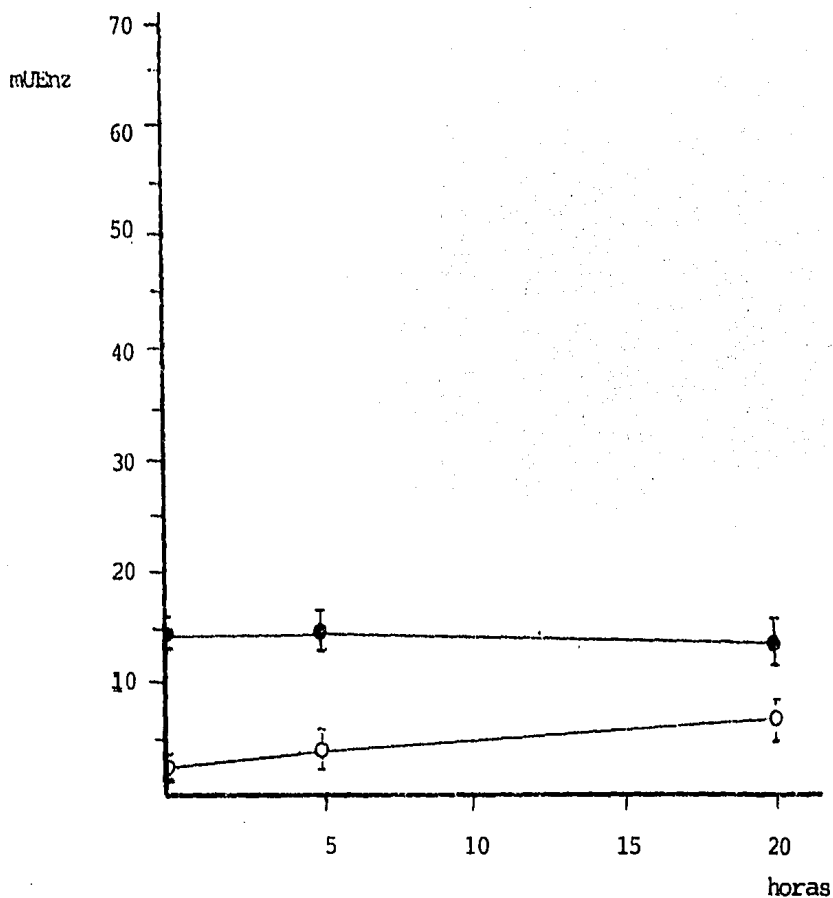
Δ = incrementos con respecto al control

I Desviación estándar de 4 experimentos

▨ Medio de Bracket

▧ Medio de Akruk

▩ 100 UI de heparina

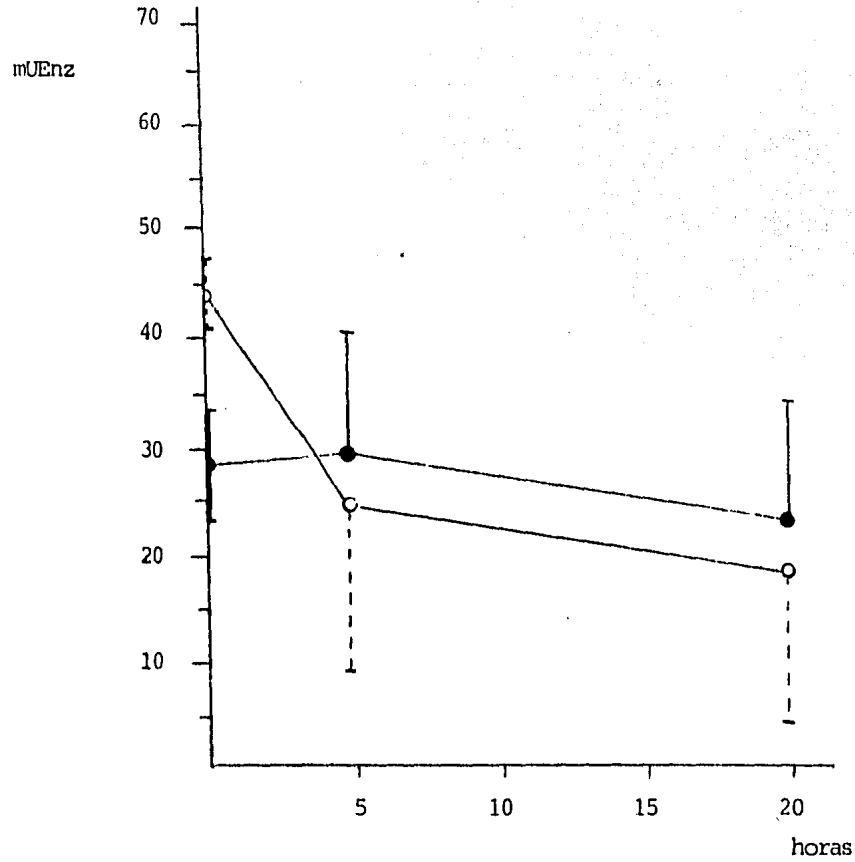


Gráfica 8.- Determinaciones de β -N-acetilhexosaminidasa en sobrenadantes a diferentes tiempos en presencia de 100 UI de heparina y de suero al 20%

●—● heparina

○—○ suero 20%

⌋ Desviación estándar de 3 experimentos
 ⌋
 ⌋ Desviación estándar de 3 experimentos
 ⌋



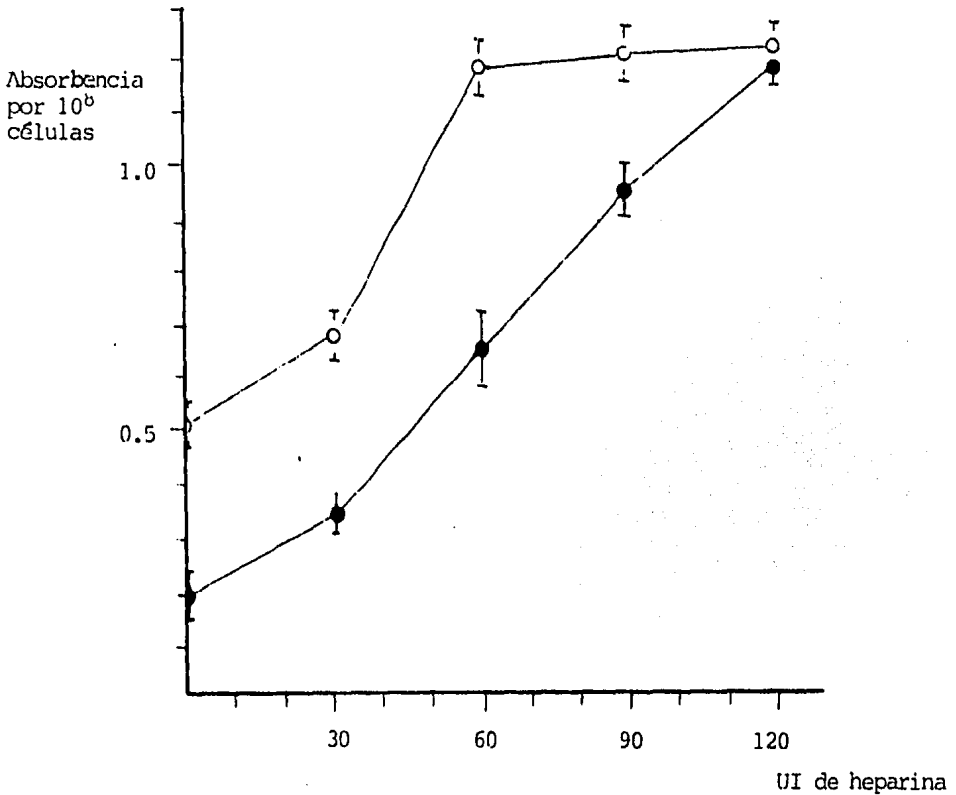
Gráfica 9.- Determinaciones de β -N-acetilhexosaminidasa en sedimentos a diferentes tiempos en presencia de 100 UI de heparina y suero al 20%

● — ● heparina

○ — ○ suero 20%

Desviación estándar de 3 experimentos

Desviación estándar de 3 experimentos

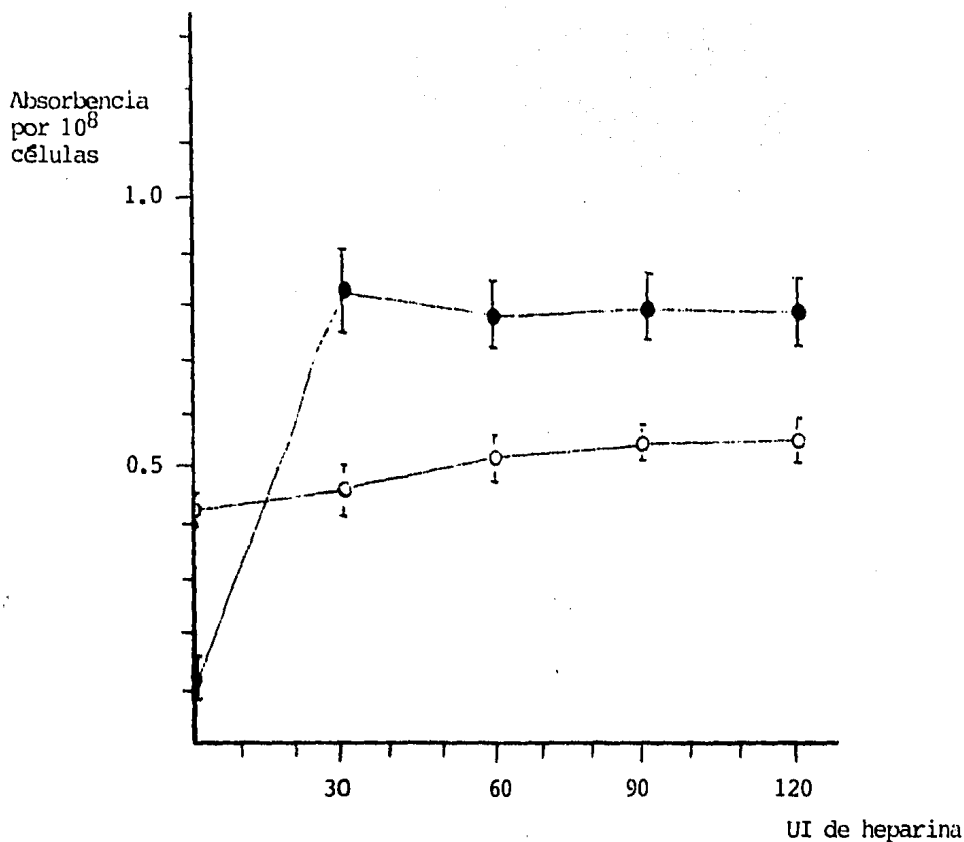


Gráfica 10.- Determinaciones de arilsulfatasa en sobrenadantes en la presencia de diferentes concentraciones de heparina.

● — ● 0 horas

○ — ○ 20 horas

|
 | Desviación estándar de 3 experimentos
 |
 |
 | Desviación estándar de 3 experimentos
 |

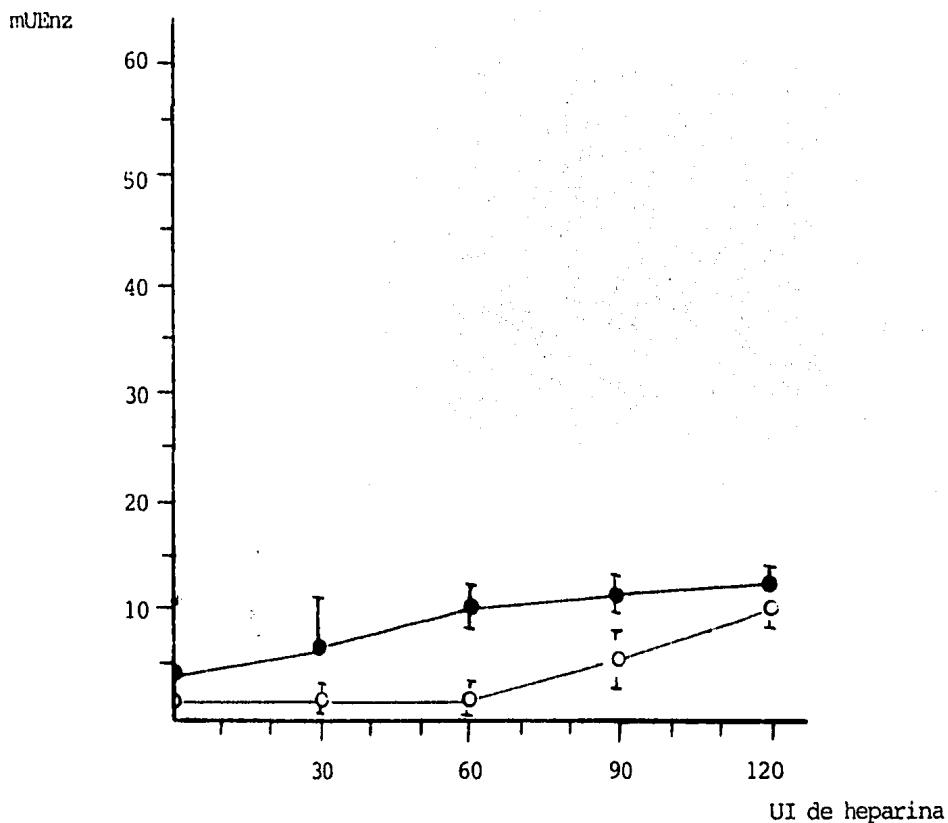


Gráfica 11.- Determinaciones de arilsulfatasa en sedimentos en la presencia de diferentes concentraciones de heparina

●—● 0 horas

○—○ 20 horas

┌ Desviación estándar de 3 experimentos
├
└ Desviación estándar de 3 experimentos
└

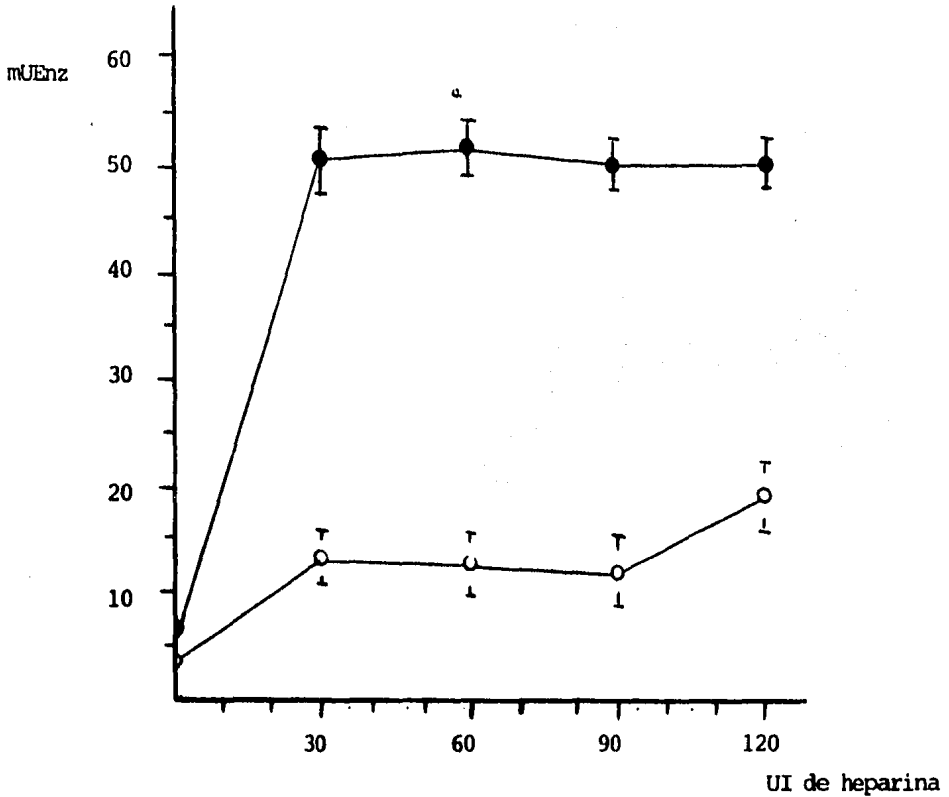


Gráfica 12.- Determinaciones de β -N-acetilhexosaminidasa en sobrenadantes en la presencia de diferentes concentraciones de heparina

●—● 0 horas

○—○ 20 horas

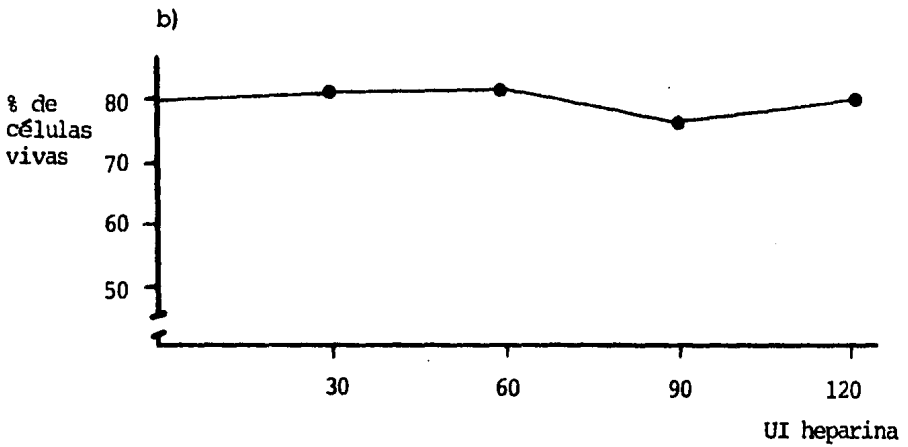
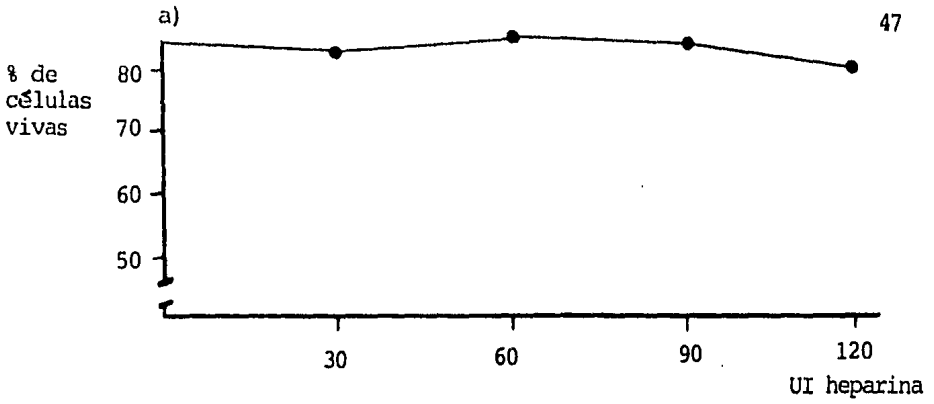
⌋ Desviación estándar de 3 experimentos
 ⌋ Desviación estándar de 3 experimentos
 ↓



Gráfica 13.- Determinaciones de β -N-acetilhexosaminidasa en sedimentos en la presencia de diferentes concentraciones de heparina

● — ● 0 horas
 ○ — ○ 20 horas

┌ Desviación estándar de 3 experimentos
 └
 ┌ Desviación estándar de 3 experimentos
 └



Gráfica 14.- Pruebas de vitalidad de espermatozoides en presencia de 100 UI de heparina

a) 0 minutos

b) 60 minutos

DISCUSION

La capacitación se ha propuesto como una preparación del espermatozoide para sufrir la reacción acrosomal, dichos eventos han sido señalados por varios autores como dos eventos completamente separados (3), siendo el primero un proceso meramente bioquímico y el segundo involucrando cambios estructurales en el acrosoma del espermatozoide; sin embargo, al darse el concepto de capacitación como una labilización o desestabilización de las membranas acrosomales (2,54) Akruk lo toma para explicar los resultados de sus experimentos; este autor explica sus observaciones como una afectación de membranas en la capacitación a tal grado, que un porcentaje de la población de los espermatozoides sufrió la reacción acrosomal, pero por otra parte quedaron algunos espermatozoides que no sufrieron la reacción acrosomal, los cuales fueron los causantes de las observaciones de fertilizaciones "in vitro".

Los experimentos utilizando el medio de Bracket por 1/4 de hora -- probaron producir una liberación enzimática equivalente a la producida por solución salina fisiológica (48), además de no producir la capacitación (21). Este medio es tomado por Akruk como referencia para evaluar los medios conteniendo el suero de coneja; en el trabajo aquí reportado también se le usa para comparar los resultados con suero de coneja y con heparina.

a) Análisis de los efectos producidos por heparina.

Es de esperarse que un método de capacitación ya evaluado en cuanto a su efecto liberador de enzimas y a su efecto capacitante, sirva como marco de comparación para el efecto que produce la heparina en la liberación de enzimas acrosomales.

Akruk (21) en sus experimentos encontró que la liberación de ambas enzimas, por contacto durante 20 horas con medio que contenía suero de coneja estimulada, correspondía a un 51 % de espermatozoides que sufrieron la reacción acrosomal; en el caso de los resultados del reporte aquí presentado, se describen aumentos en la liberación al sobrenadante de enzimas con respecto a los resultados con medio de Bracket por 1/4 de hora (control), cercanos a los reportados por Akruk en sus experimentos; así tenemos que para la arilsulfatasa este autor ve aumentos de

1000 % y en este trabajo se encontraron de 700 %; con respecto a la B-N-acetilhexosaminidasa, sus experimentos mostraron aumentos de 500 % y los aquí reportados son de 466 % . Por otra parte se encontró un aumento a medida que pasaba el tiempo, lo cual podría apoyar la argumentación de Akruk respecto al efecto labilizador del suero en las membranas a lo largo de las 20 horas.

Pasando al estudio de los efectos de la heparina, se puede notar que este agente al estar en contacto con el espermatozoide de conejo, provocó una liberación de enzimas que en el caso de la arilsulfatasa son equivalentes con la liberación producida por el suero, y en el caso de la B-N-acetilhexosaminidasa esa liberación es mucho mayor que la producida por el suero (gráficas 2 y 5); por otra parte las determinaciones en células sedimentadas tratadas también mostraron efectos por la presencia de heparina, es decir que este agente ocasionó una activación y/o exposición en la superficie celular; es importante hacer notar que los efectos mencionados se presentaron desde 1/4 hr de incubación, existiendo además una correlación lineal directa de las dos enzimas con el aumento en las concentraciones de heparina hasta 120 UI, aunque este efecto lineal no se hizo evidente en el caso de las células sedimentadas resuspendidas.

Un hecho importante se muestra desde el punto de vista de máxima liberación, pues en el caso de la heparina, este punto se alcanza a 1/4 hr, observación radicalmente diferente en comparación con el efecto del suero.

El hecho de que la heparina produzca la liberación de enzimas en forma diferente a la producida por el medio de Akruk (21), abre la posibilidad de un mecanismo de acción también diferente a una labilización gradual de membranas para el caso de la heparina.

Delgado (55) en sus experimentos encontró la presencia de receptores para heparina en espermatozoides de humano, alcanzando una máxima captación de heparina aproximadamente a los 30 minutos; la posible existencia de dichos receptores en espermatozoide de conejo puede correlacionarse con las observaciones de la rápida liberación de enzimas y el aumento en la liberación de enzimas en relación lineal

con la concentración de heparina. Sin embargo se comprende la necesidad de estudios tendientes a probar la existencia de dichos receptores y su posible papel en el complejo proceso de capacitación y reacción acrosomal.

La discusión de los resultados observados con 1000 UI de heparina se ve imposibilitada por la falta de antecedentes y de experimentos complementarios.

b) Propiedades y función de las enzimas.

Prestando atención a los resultados de β -N-acetilhexosaminidasa se nota que las lecturas correspondientes a sedimentos con suero y heparina (gráficas 7 y 9) presentan una disminución en las lecturas después de pasadas 20 horas de incubación, sería esto indicio de una liberación paulatina de enzima activa del espermatozoide al sobrenadante; sería difícil confirmarlo, más aún si se observan lecturas de sobrenadantes con heparina (gráfica 6), en este caso se ve el mismo comportamiento de disminución con el tiempo; esta última observación pone en evidencia que la detección de la enzima sufrió una disminución con el tiempo, lo cual podría explicar los comportamientos en sedimentos antes descritos.

En los resultados se refleja que los efectos del suero y la heparina también se encuentran en los sedimentos para ambas enzimas; sin embargo son de especial significancia los valores para β -N-acetilhexosaminidasa; los valores para esta enzima en sedimentos son por mucho superiores a los detectados en sobrenadantes; esta diferencia, ya observada por Mack (32) en espermatozoide de humano con capacitación con suero -- isólogo, está indicando una especial tendencia de una considerable proporción de la enzima para activarse, pero manteniéndose unida al espermatozoide.

Farroqui (44,47) en sus estudios de aislamiento y caracterización de estas enzimas, discute la posible función de éstas en el complejo proceso de fertilización; este autor describe la zona pellucida como una capa no celular conteniendo glucoproteínas, glucoproteínas sulfatadas y glucosaminoglucanos sulfatados, siendo necesaria una acción sucesiva de la arilsulfatasa, β -N-acetilhexosaminidasa y por último la acrosina para que el espermatozoide atraviese esta capa.

Las observaciones microscópicas indican que al momento de estar en contacto con la zona pellucida, el espermatozoide ya ha perdido el acrosoma, con esto las enzimas que sirven para atravesar este investimiento necesitarían actuar unidas a la membrana acrosomal interna, tal sería el caso de la β -N-acetilhexosaminidasa y de la acrosina, en los experimentos aquí reportados la arilsulfatasa no sólo se activó sobre espermatozoides, sino que también se presentó considerablemente en sobrenadantes, este hecho podría explicarse si se supone que esta enzima no sólo actúe sobre los grupos sulfato de la zona pellucida sino en otras capas más externas, de hecho se ha observado (44) una acción sinérgica de la arilsulfatasa con la hialuronidasa para dispersar el cumulus oophorus.

CONCLUSIONES

- 1.- Al poner en contacto una población de espermatozoides de conejo con heparina, se observó una liberación de las enzimas acrosomales Arilsulfatasa y β -N-acetilhexosaminidasa; el efecto de la heparina también se manifestó en un aumento en la detección de estas enzimas en el sedimento celular separado de los medios de incubación sobrenadantes.
- 2.- La presencia de la heparina ocasionó una liberación de estas -- dos enzimas acrosomales que, fue similar a la causada por el agente capacitante desarrollado por Akruk (21), es decir incubación en medio complementado con suero de coneja en ovulación. Esto da la pauta para sugerir a la heparina como un compuesto que podría jugar un papel importante en el proceso de capacitación del espermatozoide de conejo.
- 3.- Los experimentos desarrollados mostraron comportamientos de las enzimas ensayadas, acordes con las funciones atribuidas a las mismas por algunos autores (44,47), en el momento de la fertilización.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ROGERS B.J., "Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro: A critique of methodology" *Gamete Research* 1: 165-223 (1978).
- 2.- BEDFORD J.M., "Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals" *Biology of Reproduction* 28 108-120 (1983).
- 3.- FAROQUY A., "Biochemistry of sperm capacitation" *Int.J. Biochem.* 15 No. 4 463-468 (1983).
- 4.- AUSTIN C.R., "The capacitation of the mammalian sperm" *Nature* 170: 326 (1952).
- 5.- CHANG M.C., "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube" *Nature* 168: 697-698 (1951).
- 6.- SUMMERS R.G., "Ionophore A23187 induces acrosome reactions in sea urchin and guinea pig spermatozoa" *J. Expl. Zool.* 196: 381-385 (1976).
- 7.- MURDOCH R.N., "The metabolism of labeled glucose by rabbit spermatozoa after incubation in utero" *J. Reprod.Fert.* 14: 213-223 (1967).
- 8.- HAMNER C.E., "Effect of the female reproductive tract on sperm metabolism in the rabbit and fowl" *J. Reprod. Fert.* 5: 143-150 (1963).
- 9.- IRITARI A., "The effect of whole, dialyzed and heated female genital tract fluids on respiration of rabbit and ram spermatozoa" *Biol. Reprod* 1: 77-82 (1969).
- 10.- MOUNIB M.S., "Effect of utero incubation on the metabolism of rabbit spermatozoa" *Nature* 201: 943,944 (1964).

- 11.- BARROS C., "Capacitation in vitro of quinea pig spermatozoa in a saline solution" *J. Reprod. Fert.* 34: 547-549 (1973).
- 12.- SRIVASTAVA P., "Sequential release of acrosomal membranes and acrosomal enzymes of ram spermatozoa" *J. Reprod. Fert.* 36: 363-372 (1974).
- 13.- BITTAR E. The Biological Basis of Medicine Vol. I Academ, Press 1968 Great Britain Cap. 6 The Lysosomes
- 14.- STAMBAUGH R., "Enzymatic and morphological events in mammalian fertilization" *Gamete Research* 1: 65-85 (1978).
- 15.- ALLISON A.C., "Lysosomal enzymes in the acrosomes and their possible role in fertilization" *J. Reprod. Fert.* 21: 501-515 (1970).
- 16.- SRIVASTAVA P., "Enzymatic action of acrosomal preparation on the rabbit ovum in vitro" *J. Reprod. Fert.* 10: 61 (1965).
- 17.- SRIVASTAVA P., "Removal of acrosomes of ram and rabbit spermatozoa" *J. Reprod Fert.* 33: 323 (1973).
- 18.- SRIVASTAVA P., "Mammalian sperm acrosomal neuraminidase" *Biochem. -- Biophys. Res. Commun.* 39: 575 (1970).
- 19.- BRYAN J.H., "Cytochemical localization of non-specific esterase and acid phosphatase in the spermatozoa in the mouse" *Histochemie* 33: -- 169-180 (1973).
- 20.- POLAKOSKI K.L., "Purification of a proteolytic enzyme from rabbit acrosomes" *Biol. Reprod.* 6: 23-29 (1972).

- 21.- AKRUK S.R., "Release of acrosomal enzymes following in vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa" *Gamete Research* 2: 1-13 -- (1979).
- 22.- YANAHIMACHI R., "Fertilization of hamter eggs in vitro" *Nature* 200: 281,282 (1963).
- 23.- PICKWORT S., "Fertilization of chinese hamster in vitro" *J. Reprod.-Fert.* 19: 371-374 (1969).
- 24.- OLIPHANT G., "Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible decapacitation with epididymal extracts" *Fert. Ster.* 24: 948-955 (1973).
- 25.- YANAHIMACHI R., "Fertilization of guinea pig eggs in vitro" *Anat. Rec.* 174: 9-20 (1972).
- 26.- SOUPART P., "Ultrastructural observations on human oocytes fertilized in vitro" *Fert. Ster.* 25: 11-44 (1973).
- 27.- TOYODA Y., "Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with a high K/Na ratio and cAMP for the fertilization of rat eggs in vitro" *J. Reprod. Fert.* 36: 125-134 (1974).
- 28.- BRACKET B.G. "Preliminary efforts to capacitate rabbit sperm in vitro" *Int. J. Fert.* 17: 86-92 (1972).
- 29.- OGAWA S., "In vitro culture of rabbit ova fertilized by epididymal - sperms in chemically defined medium" *Nature* 238: 270,271 (1972).
- 30.- YANAHIMACHI R., "In vitro capacitation of hamter spermatozoa by follicular fluid" *J. Reprod. Fert.* 18: 275-286 (1969).
- 31.- YANAHIMACHI R., "In vitro fertilization of golden hamster ova" *J. Exp. Zool.* 156: 361-376 (1964).

- 32.- MACK S., "Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation" *Biology of Reproduction* 28: 1032-1042 (1983).
- 33.- HAWDROW R.R., "Structural comparison among glycosaminoglycans to promote an acrosomal reaction in bovine spermatozoa" *Biochem and Biophys. Comm.* 107: 1326-1332 (1982).
- 34.- BEBAUER H., "Synthesis of heparin-like glycosaminoglycans in rat ovarian slices" *Biol. Reprod.* 18: 350-358 (1978).
- 35.- MCGAUGHEY R.W., "A comparison of the fluids from small and large ovarian follicles of the pig" *Biol. Reprod.* 13: 147-153 (1975).
- 36.- WINCEK R., "An uterine glycosaminoglycan stimulates the conversion of sperm proacrosine to acrosine" *Science* 203: 553-579 (1979).
- 37.- DUKELOW W.R., "Bioassay techniques related to sperm capacitation" - *Acta Endocrinologica* 66: 503-514 (1971).
- 38.- SOUPART P., "Studies on the hormonal control of rabbit sperm capacitation" *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2: 49-64 (1967).
- 39.- VAIDYA R., "Evaluation of the removal of tetracycline fluorescence - from spermatozoa as a test for capacitation in the rabbit" *J. Reprod. Fert.* 19: 483-489 (1969).
- 40.- CHOL H.Y., "Isolation and properties of hyaluronidase from sperm acrosomes of lamb" *J. Reprod. Fert.* 37: 17-25 (1974).
- 41.- CONN W.W., "Some side effects of heparin, heparinoids and their antagonists" *Clin.Pharm.Theraps.* 7 No. 3 379-398 (1966).

- 42.- FROMAGEOT C. Methods in Enzymology Vol. II Academ. Press N.Y. 1955
pp 324-329
- 43.- BOYER P.D. The Enzymes Vol. V Academ. Press N.Y. 1971 pp 1-19 --
- 44.- FAROQUI A.A., "Isolation, characterization and the role of rabbit testicular arylsulphatase A in fertilization" Biochem. Journal 181: 331-337 (1979).
- 45.- McRORIE R.A., "Biochemistry of mammalian fertilization" Annu. Rev. Biochem. 43: 777-803 (1974).
- 46.- LEVY G.A. Methods in Enzymology Vol. VII Academ. Press N.Y. 1966
pp 827-834
- 47.- FAROQUI A.A., "Isolation of B-N-acetylhexosaminidase from semen and its role in fertilization" Biochem. Journal 191: 827-834 -- (1980).
- 48.- BRACKET B.G., "Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro" Biol. Reprod. 12: 260-274 (1975).
- 49.- Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction Press Concern Signapore 1980 World Health Organization pp 9-13
- 50.- Remington's Pharmaceutical Sciences 14 ed Mack Publishing Co. U.S.A.
p 834
- 51.- NORWOOD M., "Problems associated with the assay of arylsulphatase A and B of rat tissue" Biochem. Journal 134: 183-190 (1973).
- 52.- HOOK E.R., "Relative distribution of arylsulphatases A and B in rat liver parenchymal and other cells" Biochem. Journal 134: 191-195 (1973).

- 53.- Enzyme Nomenclature Int.Union of Biochemistry,Elsevier Publishing Co.
1965
- 54.- OLIPHANT G., "Immunological assessment of surface change of rabbit sperm undergoing capacitation" Biol. Reprod. 9: 404-414 (1973).
- 55.- DELGADO N.M., "Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane" Archives of Andrology 8: 87-95 (1982).

RESUMEN

En este trabajo experimental se llevó a cabo una serie de experimentos en los que se probó que la heparina causa la liberación de algunas enzimas acrosomales (Arilsulfatasa y β -N-acetilhexosaminidasa) en espermatozoide de conejo, la cual resultó ser semejante a la causada por el método capacitante desarrollado por Akruk (21).

Así mismo, se realizaron experimentos con el fin de contar con datos para discutir alguna forma en que la heparina está actuando en la célula espermática para liberar las enzimas, dichos experimentos consistieron, por un lado en la variación de las concentraciones de heparina que se pusieron en contacto con una población de espermatozoides, y por otro en la variación del tiempo en que estas células estuvieron en contacto con la heparina; de esta discusión se sugiere que la heparina causa la liberación enzimática por un mecanismo diferente al producido por el método capacitante probado.

Los resultados observados en los experimentos coinciden con algunas suposiciones (44,47), sobre la función de las enzimas ensayadas en el proceso de fertilización.