



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE ALGUNOS ESTEROIDES Y NUCLEOTIDOS
SOBRE LA FLUORESCENCIA INTRINSECA DE LA
MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES
HUMANOS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

CLARA DRAGO SERRANO



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.

CLAS. Tesis
ADQ. 1973
FECHA 14.6.86
PROG.

Jurado asignado originalmente según el tema:

PRESIDENTE:	Q.F.B. FERNANDO VELEZ OROZCO
SECRETARIO:	Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO
VOCAL:	Q.F.B. RAMON GUEVARA ESTRADA
1er.SUPLENTE:	Q.F.B. MARIO MIRANDA CASTRO
2do.SUPLENTE:	Q.F.B. ALFREDO GARZON SERRA

Sitio donde se desarrolló el tema:

SECCION BIOQUIMICA DE LA REPRODUCCION, DEPARTAMENTO DE
INVESTIGACION CIENTIFICA, C.M.M., I.M.S.S.

Nombre completo del sustentante: CLARA DRAGO SERRANO

Nombre completo del asesor del tema: DEA CORONADO PERDOMO

Nombre completo del supervisor técnico: Dr. EFRAIN MERCADO P.

LAB _____
ADD _____
FICMA _____
PRIC _____
0 _____



QUINCE

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A GERMAN

Al Dr.EFRAIN MERCADO P.
por la acertada dirección
de este trabajo.

Al Dr.A.ROSADO,Jefe del Depto.
de Bioquímica de la Reproducción
por las facilidades otorgadas
para llevar a cabo este estudio.

A todas las personas que
de alguna manera colabo-
raron en la realización
de esta Tesis.

A la Profa. DEA CORONADO P.
por sus valiosas sugerencias
en la elaboración de esta
Tesis.

A mis familiares y amigos.

C O N T E N I D O

- I INTRODUCCION
- II GENERALIDADES
- III MATERIAL Y METODOS
- IV RESULTADOS
- V RESUMEN
- VI DISCUSION Y CONCLUSIONES
- VII BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION.

La unión de moléculas pequeñas a proteínas ha creado una corriente de investigación de gran interés, pues se piensa que éste fenómeno probablemente está involucrado en eventos de unión de importancia fisiológica. La interacción puede traducirse en alteraciones en la configuración de las proteínas o en cambios en las características de ionización de las macromoléculas.

En este trabajo investigamos la unión de esteroides y nucleótidos no con proteínas puras, sino con la membrana de espermatozoides humanos, con el propósito de ayudar a dilucidar la estructura de la membrana de estas células y observar su comportamiento frente a compuestos con los que se encuentra en contacto en condiciones fisiológicas.

Los resultados obtenidos indican que la membrana de estas células no es una estructura rígida y estática, ya que es capaz de responder a los estímulos químicos del medio ambiente que la rodea a través de cambios en la disposición espacial de sus constituyentes o modificando su carga neta superficial.

Diversos métodos han permitido el estudio de estas interacciones, entre ellos están: la ultracentrifugación, ultrafiltración, diálisis de equilibrio, etc., que por lo general se han aplicado a sistemas relativamente sencillos como son las soluciones de proteínas puras con una gran variedad de moléculas pequeñas,

pero que no han sido de utilidad para el análisis de sistemas más complejos que contienen membranas ó células completas.

Existe información acerca del efecto de esteroides sobre las funciones metabólicas de los espermatozoides de algunas especies de mamíferos¹, y también del metabolismo de hormonas esteroides en semen², sin embargo la unión de moléculas de esteroides a los espermatozoides ha sido poco investigado.

Ericson³, utilizando un método isotópico in vitro e in vivo demostró la unión de algunos esteroides a la membrana de espermatozoides de conejo; recientemente se ha empezado a aplicar una metodología de gran sencillez y sensibilidad que es la fluorometría pero hasta ahora, también casi exclusivamente se ha trabajado con proteínas puras.

Debido a las ventajas que reporta este método, decidimos emplearlo en esta investigación, no obstante la interpretación de los resultados es más problemática que en el caso de trabajar con soluciones protéicas, en vista de que las proteínas que forman parte de la membrana presentan una mayor rigidez en su posición dentro de una membrana que en solución.

Sonenberg⁴ mediante el método fluorométrico de disminución de la fluorescencia encontró que la fluorescencia de las membranas de eritrocitos disminuía por la presencia de la hormona del crecimiento lo cual indicaba una interacción de constituyentes del sistema.

La disminución de la fluorescencia de proteínas o membranas por efecto de algunas sustancias, lo utilizamos como herramienta para observar los cambios conformacionales de la membrana de los espermatozoides que ocurren cuando hay fijación de moléculas pequeñas por la membrana.

Algunos autores^{1, 5, 6}, han reportado la posibilidad de cambios funcionales importantes y también en la estructura membranal de los espermatozoides en el tiempo de residencia en el tracto genital femenino hasta que el óvulo es fertilizado.

Una de las condiciones para que un espermatozoide sea apto, es que requiere pasar por una etapa llamada "capacitación" que ocurre como consecuencia de su estancia en el útero y el oviducto; sin embargo aún no se sabe que es lo que hace posible este cambio, se ha mencionado que la membrana de los espermatozoides es capaz de sufrir modificaciones conformacionales frente a algunos fluidos biológicos, entre ellos el líquido folicular, al cual incluso se le ha designado como agente causal directo de esta capacitación. La capacitación involucra la acción de algunas enzimas sobre el acrosoma, lo cual produce una modificación en la estructura de la membrana o bien desprende moléculas fijas al espermatozoide. No obstante no hay evidencia directa de este fenómeno.

Debido a la falta de información acerca de estos cambios, es que hemos decidido aplicar los métodos fluorométricos, como instrumento para observar el efecto que pudieran tener algu -

nos nucleótidos y esteroides sobre la membrana del espermatozoide humano, que se traducirían en un cambio estructural de sus constituyentes y que probablemente le permitirían llevar a cabo su principal función que es la fecundación.

II GENERALIDADES

Los métodos clásicos empleados para detectar, determinar y estudiar las características de la unión de moléculas pequeñas y proteínas son los siguientes:

- a).- Ultracentrifugación, su fundamento es el hecho de que cuando una solución protéica esta bajo la influencia de un campo de alta centrifugación las proteínas que contiene tienden a sedimentar oponiéndose a la fuerza de difusión que normalmente las mantiene dispersas en la solución.
- b).- Diálisis de equilibrio, este procedimiento permite la separación de una mezcla de moléculas pequeñas y proteínas por medio de una difusión selectiva a través de membranas de permeabilidad apropiada.
- c).- Ultrafiltración, es una variación de la diálisis de equilibrio puesto que es una diálisis bajo presión, en ésta el agua y moléculas pequeñas se forzan a atravesar la membrana semipermeable por la aplicación de presión positiva sobre la solución, succionando o ambos simultáneamente; estos métodos presentan muchas limitaciones, en cuanto se refiere a su sensibilidad que es baja, en relación con la alcanzada por métodos mas recientes y de mayor sensibilidad, uno de ellos es el que mide diferencias en el comportamiento polarográfico del substrato libre y unido, otro, la llamada filtración en gel, en éste se utilizan esferas de polisacáridos que son insolubles en agua pero que se dilatan en gran proporción en presencia de agua.

Las macromoléculas entre ellas las proteínas o complejos proteínicos, por su gran tamaño no pueden penetrar en el interior de la matriz del gel, en cambio las moléculas pequeñas sí; este método da resultados similares a los que se obtienen por las técnicas de diálisis, sin presentar los problemas de unión a las membranas, efecto de Donnan y consideraciones de tiempo, no obstante presentan dificultades, ya que las moléculas pequeñas pueden interaccionar con el gel, resultado de consideraciones de la ley de masas en la disociación del complejo proteínico.

Otra desventaja del uso de la cromatografía de filtración en gel, es que en los pasos de elución, se produce una dilución del sistema unido y posiblemente una disociación significativa del complejo.

El método de partición de solventes se basa en la influencia de la concentración de las proteínas sobre el coeficiente aparente de partición de las moléculas perturbantes. 16-19

Los investigadores que han trabajado con este método, consideran que el solvente orgánico que utilizan, no interacciona significativamente con las proteínas, sin embargo Wishnia, Wetlaufer 20

21
y Lovrien, encontraron que dicha suposición es errónea, ya que en realidad el solvente se une a la proteína modificando algunas de sus propiedades, por ejemplo su levorrotación o su solubilidad; resultados similares obtuvo Alfsen 22 al estudiar la interacción de la albúmina con testosterona y el efecto que tiene el heptano sobre esta unión.

Attalah , sugiere que esta fijación del heptano por la albúmina da lugar a un desdoblamiento de la proteína, en consecuencia los datos obtenidos están falseados.

Una mayor sensibilidad de las técnicas clásicas se ha alcanzado por medio del uso de moléculas marcadas isotópicamente, esto ha permitido estudios in vitro a niveles semejantes a los encontrados in vivo.

Estudios recientes han establecido el valor de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, como un instrumento para la investigación de las interacciones de proteínas con moléculas, han permitido la evaluación del grado con el cual los diferentes grupos funcionales de la molécula participan en la interacción. ^{24,25}

Un método más sofisticado, es aquel que determina la proporción de la disminución de la fluorescencia de las proteínas ocasionada por la interacción con algunas sustancias por ejemplo: ^{22,23} hormonas esteroides

Inicialmente los métodos fluorométricos se utilizaron para el estudio de vitaminas, huellas de metales y fármacos, el avance de éstos se debe en gran parte a los físicos, con el descubrimiento, modificación de procedimientos e instrumentos y también a las investigaciones que han efectuado sobre la fluorescencia en relación con la estructura molecular.

Duysens fué el primero en trabajar sobre instrumentos y técnicas que permitieran aplicar la fluorometría a sistemas más

complicados como son los biológicos.

En la actualidad existe poca duda de que estos métodos espectrofluorométricos constituyen un medio importante para la obtención de información sobre la forma en que algunas drogas interactúan con sistemas biológicos, sin embargo en los aspectos bioquímicos de la Biología, estos conocimientos se han ido generalizando paulatinamente, por la dificultad que implica el trabajo con sistemas más complejos.

Para entender el uso de esta metodología es conveniente conocer los principios físicos que rigen el fenómeno de la fluorescencia.

La fluorescencia es un fenómeno que se presenta en la región espectral de 200-800 nm que corresponde a cambios electrónicos en la molécula.

Cuando la luz interactúa con la materia pueden suceder dos cosas:

- a).- El material deja pasar la luz habiendo una absorción pequeñísima.
- b).- o puede impedir su paso por absorción de la radiación; se ha visto que la absorción de una longitud de onda determinada es característica para el compuesto que se examina. El grado con el cual la luz de determinada longitud de onda es absorbida constituye el espectro de absorción del compuesto. Cuando éste absorbe energía, algunas de sus moléculas se excitan pasando ciertos electrones de

un nivel basal de energía hacia otros de mayor contenido energético.

La representación diagramática de este fenómeno esta dada en la fig.1; los niveles de energía se representan por líneas horizontales y la dirección de la energía de transición por flechas verticales o inclinadas. Se considera que a temperatura ambiente la molécula tiene su menor contenido energético G (estado basal), la absorción de energía promueve un electrón hacia niveles de mayor energía, pasando la molécula a un estado excitado E, la absorción está indicada por la flecha A, el regreso al estado basal G se realiza emitiendo energía en forma de fluorescencia F.

El tiempo que transcurre entre la absorción de energía hasta alcanzar el estado excitado es de 10^{-15} segundos, el estado excitado persiste durante 10^{-8} segundos, el proceso total de absorción y emisión de la fluorescencia tiene lugar en aproximadamente 10^{-8} segundos. En el estado excitado parte de la energía de la molécula se pierde por choques con otras moléculas y por otros medios, por lo cual la energía emitida por la molécula al regresar a su estado basal es menor que la absorbida. La explicación de este fenómeno a nivel molecular esta dada por la ecuación:

h = constante de Planck

$$E = \frac{h c}{\lambda}$$

c = velocidad de la luz

λ = longitud de onda

que relaciona de una manera inversa la energía con la longitud de onda; siendo constantes h y c , la energía emitida como fluorescencia

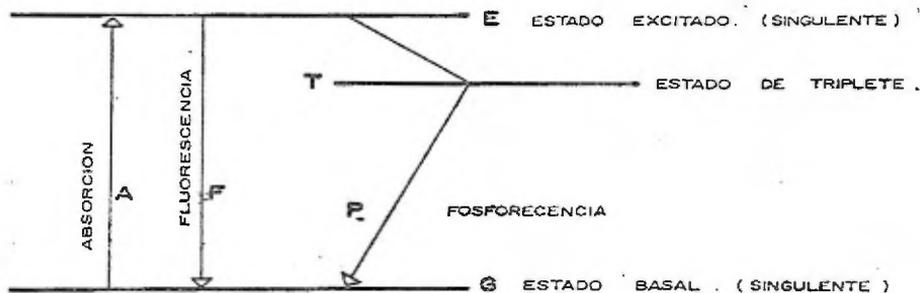


Fig.1.- Diagrama de relación de niveles energéticos de absorción, fluorescencia y fosforescencia.

tiene una longitud de onda mayor que la de la energía absorbida.

El mecanismo de fosforescencia esta ilustrado en la fig.1, la diferencia entre éstos radica en que el tiempo del estado excitado de la fosforescencia es mucho mayor que el de la fluorescencia. La interpretación a nivel electrónico estas diferencias la dieron Lewis y Kasha, afirman que la molécula excitada puede tener dos estado electrónicos, de singulete o de triplete, normalmente la absorción produce una transición del estado basal G, al estado excitado E, emitiendo fluorescencia en el proceso inverso. La fosforescencia involucra una transición del estado T a estado G. La probabilidad de que un electrón pase del estado G directamente a estado T, es muy baja, se dice que es una transición prohibida, pero puede suceder que la molécula pase de singulete a triplete, en esta caso para

que la molécula pueda regresar a su estado basal, emitiendo la energía como fosforescencia, necesita tomar energía del medio ambiente, si la molécula no dispone de energía para regresar al estado basal (por ejemplo a bajas temperaturas) este estado de transición dura mucho (varios segundos a temperatura ambiente). Como el estado T tiene menor energía que el estado E, al regresar la molécula al estado basal G, la cantidad de energía será menor que la liberada en la fluorescencia y consecuentemente la fosforescencia estará desplazada hacia longitudes de onda mayores que la fluorescencia.

En resumen²⁸, la fosforescencia es la emisión producida por la transición de triplete (electrones desapareados con spins paralelos) a un estado de singulete (electrones apareados con spins antiparalelos). Una diferencia práctica entre estos dos fenómenos es que en la fosforescencia el tiempo de emisión se prolonga a bajas temperaturas.

El mecanismo de la fluorescencia está íntimamente relacionado con la estructura de las moléculas²⁹. Todas las moléculas que contienen electrones delocalizados, o pares electrónicos de no unión, tienden a fluorescer ya que con facilidad pueden sufrir transiciones de energía. En un anillo aromático monosustituido el tipo de sustituyentes va a determinar un aumento o disminución de fluorescencia; los sustituyentes que tienden a contribuir a la dislocación de electrones (directores orto y para) incrementan la fluorescencia, el efecto contrario producen los directores meta, que tienden a disminuir la movilidad de la nube electrónica. La fluo -

rescencia de un anillo aromático con más de un substituyente dependerá del efecto resultante sobre la movilidad de los electrones.

Los compuestos que de por sí son fluorescentes se dice que tienen una fluorescencia nativa, entre estos están algunas proteínas que deben su fluorescencia a los grupos triptofano y tirosina principalmente; las moléculas que no son fluorescentes pero a través de una transformación química adquieren fluorescencia, se afirma tienen una fluorescencia "químicamente inducida", este proceso ha sido de gran utilidad para la detección y cuantificación de sustancias no fluorescentes, de interés biológico como son la histamina³⁰, serotina³¹, etc.

Disminución de la fluorescencia. Como habíamos expresado con anterioridad la luz que interacciona con la materia puede ser absorbida parcial o totalmente, pudiendo en un paso posterior haber una emisión de fluorescencia, sin embargo hay muchas sustancias que absorben energía, no fluorescen, y en otros casos la fluorescencia de un compuesto o sistema biológico determinado es disminuida por la presencia de otro tipo de moléculas llamadas "atenuadores".

El término empleado para describir este fenómeno es el de "disminución de la fluorescencia", que indica que la eficiencia cuántica de la fluorescencia tiende a disminuir.

La disminución de la fluorescencia tiene diferentes causas que son las siguientes:

a) Disminución por efecto de filtro interno³²; puede ser por absorción de la excitación o absorción de la fluorescencia por el "atenuador", estos efectos no son fácilmente distinguibles, se presentan cuando la longitud de onda de absorción de la sustancia que disminuye la fluorescencia está cercana a la luz de excitación del compuesto fluorescente. Otro efecto de filtro interno lo presentan las concentraciones altas por absorción de luz.

b) Disminución por degradación de energía; hay diferentes formas en que la energía se puede degradar: por un cambio del estado excitado de singulete al de triplete. Otra forma de degradación es por transferencia de energía, en éste, la molécula en estado excitado (pero no en el basal) puede donar o aceptar un electrón del "atenuador", este fenómeno solo se observa cuando el contenido energético de él en estado excitado es menor que el de la molécula fluorescente excitada. La transferencia de energía se observa frecuentemente en sistemas biológicos y es de gran importancia. Försters ha establecido que la transferencia puede iniciarse por un proceso de decrecimiento de la energía, donde las moléculas que están originalmente excitadas transmiten la energía de excitación a las moléculas receptoras a través de cierta distancia. La interacción es debida a un acoplamiento dipolo-dipolo.

El mecanismo de transferencia de energía está involucrado en la oxidación de los citocromos, reducción del piridín-nucleótido en la acción de la miosina y en muchos otros sistemas biológicos.

lógicos.

La transferencia de energía puede ocurrir entre moléculas distintas o en diferentes partes de la misma molécula. En las proteínas la transferencia de energía dependerá de las distancias entre los residuos que absorben energía^{33, 34}, del tipo de aminoácidos, de su secuencia, y de su configuración espacial en la proteína nativa. Entre otros casos del efecto de la transferencia de energía es un aumento de fluorescencia. Se considera que el verdadero mecanismo de la fluorescencia es que se efectúa sin un cambio químico neto, como es el que hemos descrito.

c) Disminución por cambio químico. Este se lleva a cabo cuando el estado excitado de singulete lleva a un estado electrónico que dá lugar a la ruptura de la unión química, generalmente el producto final no fluoresce.

EFICIENCIA CUANTICA DE FLUORESCENCIA

El porcentaje de energía absorbida que puede ser remitida como fluorescencia está indicada por el término de eficiencia cuántica de la fluorescencia y designada por:

$$\phi = \frac{\text{No. de quanta emitida.}}{\text{No. de quanta absorbida.}}$$

Quando la fluorescencia emitida es igual a la radiación absorbida, la eficiencia cuántica es igual a uno, en la práctica la eficiencia cuántica de las sustancias es siempre menor de uno, porque la energía siempre se disipa, por cualquiera de los pro

cesos indicados previamente.

DESARROLLO DE LA FLUOROMETRIA Y SU APLICACION EN EL CAMPO DE LA BIOQUIMICA.- Es bien conocido que las proteínas absorben en la región de 270-300 nm, hecho que ha sido usado por enzimólogos para seguir la purificación de enzimas. La absorción en el lejano ultravioleta es debida principalmente a la tirosina y al triptofano por lo cual no es sorprendente que las proteínas fluorescan. Sin embargo hasta 1957 poco se había trabajado sobre esta área.

Shore y Pardee³⁵ en 1956 fueron los primeros en reportar un estudio detallado sobre la fluorescencia nativa de las proteínas no conjugadas, determinaron la eficiencia cuántica de fluorescencia de colorantes de eficiencia cuántica conocida, no obstante los datos reportados por estos investigadores fueron rebatidos por Teale y Weber³⁶, lo cual no quita el mérito a Shore y Pardee³⁵ de reportar que la fluorescencia de las proteínas puras es debida enteramente a aminoácidos aromáticos.

Teale y Weber³⁶ hicieron un elegante estudio sobre las propiedades de fluorescencia de aminoácidos aromáticos libres. Determinaron el espectro de fluorescencia para triptofano, tirosina y fenilalanina en soluciones acuosas neutras y observaron una sola banda en el ultravioleta, con un máximo de 282 nm para la fenilalanina, 303 nm para la tirosina y 348 nm para el triptofano demostraron que el espectro de excitación corresponde a espectro de

absorción y en cada caso probaron que estos aminoácidos poseen una eficiencia cuántica constante en todo su espectro: 4% para la fenilalanina, 21% para la tirosina y 20% para el triptofano, también señalaron que el espectro de excitación, el espectro de fluorescencia y la eficiencia cuántica pueden usarse para caracterizar especies moleculares en solución.

37

Tiempo después Konev, reportó un estudio sobre los "centros responsables de la fluorescencia de las proteínas". La alta intensidad de fluorescencia del triptofano indicó a Konev, una transferencia de energía entre la tirosina y el triptofano dentro de la molécula proteínica, en ese mismo trabajo reportó datos sobre el espectro de excitación de varias proteínas, comparándolos con mezclas de aminoácidos y con proteínas desnaturalizadas.

38

En 1959 Vladimirov, observó una transferencia de energía de excitación de fenilalanina al triptofano en una mezcla de cristales y sugirió que esto podría ocurrir en las proteínas.

39

En 1958 Velick, reportó datos sobre la fluorescencia de dos enzimas purificadas, (deshidrogenasa láctica LDH y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa GPD) y comparó sus datos con hidrolizados alcalinos de las enzimas y con mezclas de aminoácidos.

37

Las observaciones de Konev no concuerdan con las de Velick ya que mientras el primer autor reporta dos picos distintos en el espectro de la proteína, uno a 313 m μ y el otro a 350 nm, Velick, encontró uno solo debido al triptofano.

39

39

Weber y Teale también reportan una falla en la detección de la fluorescencia de la tirosina en proteínas que contienen ámbos aminoácidos aromáticos. Clasificaron las proteínas en dos clases: Clase A: proteínas que contienen fenilalanina y tirosina pero no triptofano, muestran una emisión máxima a 303 nm.

Clase B: las proteínas que contienen los tres residuos aromáticos, en éstas la emisión máxima se debe al triptofano; por otra parte exhiben un desplazamiento en el máximo de emisión de fluorescencia del triptofano libre localizada a 348 nm. El espectro de absorción de esta clase de proteínas está desplazado en su máximo de 295 a 310 nm comparativamente con el máximo de absorción para la tirosina y triptofano libre entre 275 y 280 nm respectivamente.

41

Teale demostró que cuando se irradiaba dichas proteínas con energía de una longitud de onda entre 295 y 310 nm, aumentaba apreciablemente la eficiencia cuántica, la explicación que da a este hecho, es que excitando a las longitudes de onda en ese rango, la tirosina no absorbe energía, por lo que es probable que la energía de excitación de la tirosina no sea transferida al triptofano, sino que quizá la fluorescencia de la tirosina está disminuída por un proceso que resulta de la formación de uniones secundarias entre el grupo fenólico de la tirosina y otros grupos de la proteína.

42

43

Boroff y Fitzgerald y Boroff aplicaron la fluorometría en el estudio de la toxina botulínica, demostrando que el triptofano está cercano al centro de toxicidad de la proteína. Esto lo hicieron

comparando toxicidad y fluorescencia, después de varios procedimientos físicos y químicos de inactivación.

44

Posteriormente otro grupo reinvestigó la fluorescencia de esta toxina, y fueron incapaces de demostrar una relación directa entre la fluorescencia de la proteína y su toxicidad.

45

Recientemente Fasman y colaboradores realizaron estudios sobre la fluorescencia de poli- α -aminoácidos, estos autores reportaron que los grupos carboxilo y amino no ionizados reducen fuertemente la fluorescencia de los residuos de triptofano, señalando que la fluorescencia de este residuo está influida por la estructura de α -hélice de la proteína.

46

En 1967 Kronman postula un modelo para explicar los orígenes moleculares de los desplazamientos espectrales de la lactalbúmina por efecto de variaciones en el pH y temperatura, basándose en la teoría de la formación de complejos por el triptofano cuando se encuentra en estado excitado.

47

Un año después Likhtenshtein y colaboradores llevaron a cabo un estudio sobre la unión de colorantes de clorotriazina a albúmina humana y bovina, en donde calcularon las distancias entre los residuos aromáticos en la proteína y determinaron el grado de cambio en las distancias de estos residuos producidos por alteraciones conformacionales.

Hasta ahora los datos reportados en la literatura se refieren a las propiedades de la fluorescencia de proteínas puras,

esta metodología poco se ha aplicado a la investigación de la estructura de la membrana celular, en nuestro caso, el estudio que llevamos a cabo sobre espermatozoides utilizando la fluorometría como herramienta, ha sido posible en virtud del contenido de aminoácidos aromáticos de las proteínas que forman parte de su membrana.

III. MATERIAL Y METODOS.

Material Biológico.- El material biológico constituido por muestras de semen, fue proporcionado por donadores "clínicamente sanos". Las muestras se recibieron en un vaso de precipitado, dejándose licuar a 37° en "baño maría" (la fluidificación generalmente se completaba en 15 minutos), esto facilita la eliminación de coágulos macro y microscópicos de proteína, dándonos oportunidad de tener control sobre la muestra ya que la presencia de proteínas interferiría nuestras determinaciones.

La selección de muestras se hizo a través de un análisis microscópico, se escogieron aquellas cuyos espermatozoides presentaron movilidad y que además estaban libres de leucocitos, eritrocitos o que contenían cantidades mínimas de alguna de estas células.

Una vez licuado el semen se procedió a la separación del líquido seminal por centrifugación a 3,500 rpm durante 15 minutos, el paquete de espermatozoides formado se lavó tres veces por centrifugación con un amortiguador de TEA 20 mM pH 7.4, con el objeto de eliminar restos de proteína contaminantes, después se resuspendieron en el mismo soporte, se contaron con la ayuda de un hemocitómetro y finalmente se ajustó el volumen para obtener una suspensión de 2×10^8 células por mililitro.

1).- Material de Laboratorio.

a) Tubos de centrifuga de 13 ml. de capacidad.

b) Micropipetas Eppendorf de 10, 20 y 50 ul.

- c) Pipetas volumétricas de 3 ml.
- d) Microscopio (Bausch and Lomb).
- e) Centrífuga (Clay Adams Inc.).
- f) Baño de agua a 37°
- g) Potenciómetro (Metrhom Herisau modelo Composter E 338).
- h) Espectrofluorómetro (Carl Zeiss modelo PMQII) Fig. 2,
cuyo arreglo óptico es en ángulo recto.

2).- Reactivos.

- a) Amortiguador de TEA 20 mM pH 7.4.

Cloruro de trietanolamina (TEA, Eatsman) 1,856 g.

Disolver en agua destilada.

Ajustar el pH con una solución de NaOH IN.

Aforar a 500 ml.

- b) Amortiguador de TRIS-HCl 50 mM pH 7.4.

Hidroximetil-amino-metano (TRIS, Merck) 2,724 g.

Disolver en agua destilada.

Ajustar el pH con una solución de HCl IN.

Aforar a 500 ml.

- c) Solución de triptofano 4.9. mM.

Pesar 10 mg de triptofano (Sigma) disolver en agua destilada y llevar a 10 ml.

- d) Solución de Tirosina 2.7 mM.

Disolver 5 mg de tirosina (Sigma) en agua destilada y llevar a 10 ml.

e) Solución de testosterona 3 mM.

Disolver 13.8 mg de testosterona (Sigma) en etanol llevar a 10 ml.

f) Solución de Estrona 3 mM.

Disolver 8.1 mg de Estrona (Sigma) en etanol y llevar a 10 ml.

g) Solución de Progesterona 4 mM.

Disolver 9.4 mg de Progesterona (Sigma) en etanol y aforar a 10 ml.

h) Solución de 17- β -Estradiol 3mM.

Pesar 8.1 de 17- β -Estradiol (Sigma), disolver en etanol y aforar a 10 ml.

i) Solución de ATP 5 mM.

Pesar 5.87 mg de Adenosin-5'-trifosfato (ATP Sigma), disolver en 2 ml del reactivo b).

j) Solución de ADP 5 mM.

Pesar 5.07 mg de Adenosin-5'difosfato (ADP, Sigma), disolver en 2 ml del reactivo b).

k) Solución de AMP 5 mM.

Pesar 4.05 mg de Adenosin-5'-monofosfato (AMP, Sigma), disolver en 2 ml del reactivo b).

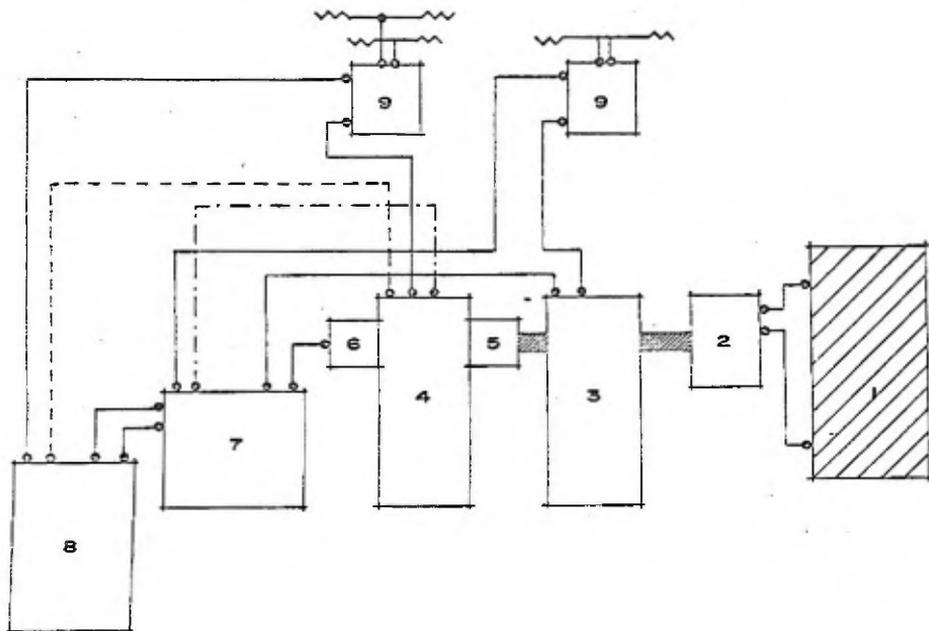
l) Solución de AMP cíclico 5 mM.

Pesar 5.89 mg de 3'5'-dibutiril-Adenosin-monofosfato cíclico (AMP cíclico Sigma) disolver en 2 ml del reactivo b).

Fig. 2.- Diagrama de un Espectrofluorómetro Carl-Zeiss
(PMQ II)

- 1.- Estabilizador de la lámpara de Xenón
- 2.- Lámpara de Xenón
- 3.- Monocromador de excitación
- 4.- Monocromador de emisión
- 5.- Compartimiento de las celdas
- 6.- Detector
- 7.- Amplificador
- 8.- Registrador automático
- 9.- Transformadores

Celdas de cuarzo de 4 ml de capacidad



Técnica general.- Los espectros de emisión y excitación así como las determinaciones de disminución de fluorescencia se hicieron con una abertura de ventana de emisión de 2.0 mm y de excitación de 1.9 mm con una sensibilidad de 10 mv.

La longitud de onda de excitación empleada para obtener el espectro de emisión fue de 275 nm en caso contrario se señalará la longitud de onda utilizada.

Los espectros de excitación se obtuvieron manteniendo fija la longitud de onda de emisión en 338 nm y variando las longitudes de onda de excitación de 250 a 315 nm.

Todas las determinaciones fueron hechas en celdas de cuarzo de 4 ml de capacidad, de 1 cm de paso de luz.

Espectro de emisión de fluorescencia de la Tirosina.- En las celdas de cuarzo se depositaron 3 ml de amortiguador de TEA mM pH 7.4 se adicionaron 5 ul de la solución de Triptofano y se obtuvo su espectro de emisión entre 290 y 500 nm excitando a una longitud de onda de 293 nm.

Emisión de fluorescencia de una mezcla de Triptofano y Tirosina.- En la celda con 3 ml del amortiguador soporte se adicionó con una micropipeta Eppendorf 5 ul de una solución 4.9 mM de Triptofano y 30 ul de la solución 2.7 mM de Tirosina, la concentración final del Triptofano fue de 8.09 uM y de Tirosina 27.7 uM.

De esta mezcla se obtuvieron dos espectros de emisión - uno excitando a una longitud de onda de 275 nm y el otro a 293 nm.

En estas determinaciones la rendija de emisión y excitación fueron de 1.4 y 1.5 nm respectivamente, en estas mismas condiciones se determinó el espectro de 10×10^6 espermatozoides.

DISMINUCION DE LA FLUORESCENCIA.

Efecto de esteroides.- Una suspensión de espermatozoides se tituló con una solución etanólica de cada uno de los esteroides.

La titulación consistió en hacer adiciones de la solución del esteroide (30 nMolas en cada ocasión), a una suspensión de 10×10^6 espermatozoides en un soporte de 3 ml de amortiguador de TEA, midiendo la fluorescencia después de cada adición. La longitud de onda de excitación fue de 275 nm.

Para corregir el error por dilución después de cada adición se hizo un blanco de titulación, en el cual el agente titulante era etanol absoluto (Merck); de los resultados obtenidos se observó que en ningún caso el blanco de titulación nos dió datos de fluorescencia diferentes de los esperados por efecto de dilución (una pequeña disminución de la fluorescencia), indicando que en estas condiciones el etanol no interfiere en la fluorescencia de las células estudiadas.

La dilución de nuestro sistema nunca fue mayor del 8% (V/V) por lo que los efectos de dilución pueden considerarse nulos.

Si graficamos la emisión de fluorescencia contra la concentración del titulante (agente "Atenuador") obtenemos unas gráficas, si extrapolamos las porciones lineales de cada una de las gráficas de

titulación experimental obtenemos el punto estequiométrico (punto donde el complejo formado por los residuos de triptofano y tirosina de la membrana del espermatozoide y el esteroide adicionado está en equilibrio con las membranas libres y el esteroide libre), - en este punto podemos determinar el número de moles de "atenuador" unido a los espermatozoides contenidos en el sistema, y calcular - la constante aparente de formación (K_f) de los complejos formados con cada uno de los esteroides o nucleótidos; estos cálculos se hacen pensando en una equivalencia e independencia de los sitios de interacción en la membrana.

Por los problemas que presentan los esteroides para di - solverse en soluciones acuosas, no fue posible observar el efecto de la presencia de etanol en las interacciones de la membrana con los esteroides, en relación a esto Attalah²³ reportó que el etanol no tiene ningún efecto significativo en estas determinaciones.

Al mismo tiempo se obtenía el espectro de emisión de - - fluorescencia se registraba el espectro de excitación.

EFECTO DE NUCLEOTIDOS.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente se estudió el efecto de los nucleótidos sobre la membrana del espermatozoide, solo que en este caso el soporte utilizado fue un amortiguador de TRIS-HCl 50 mM pH 7.4 y los agentes titulantes fueron las soluciones 5 mM de cada uno de los nucleótidos.

Se adicionaron 25 nMolas del titulante a la suspensión -

de 10×10^6 espermatozoides en 3 ml de amortiguador. El blanco de titulación para observar el efecto por dilución indicó que la disminución de la fluorescencia por dilución es sumamente pequeña.

IV RESULTADOS

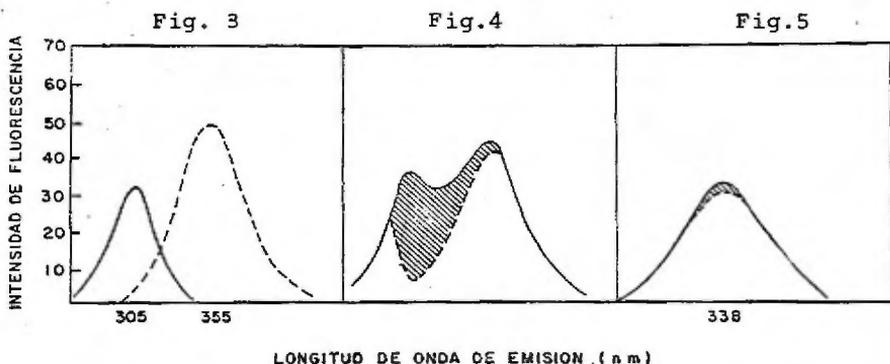
La emisión de fluorescencia de la membrana de los espermatozoides, se debe a la presencia de los residuos triptofanil y tirosil de sus proteínas.

El espectro de fluorescencia de la fig.3, indica una longitud de onda de máxima emisión para la tirosina a 305 nm, y para el triptofano a 355 nm.

En la mezcla de ámbos aminoácidos, sus espectros de emisión de fluorescencia se suman, fig.4, el espectro de la fluorescencia de los dos residuos aromáticos se obtiene al excitar a una longitud de onda de 275 nm, a 293 nm la tirosina no es excitada por lo que la emisión registrada se debe al triptofano.

Los espermatozoides poseen un espectro de emisión de fluorescencia semejante al del triptofano fig.5, sin embargo su emisión máxima se efectúa a 338 nm, que es una longitud de onda localizada entre la longitud de máxima emisión de los dos aminoácidos.

La banda de fluorescencia de la tirosina, excitando a 275 nm es muy difícil de observar, ya que la eficiencia cuántica de este aminoácido en la membrana es muy baja. En algunas proteínas se ha reportado un pico a 305 nm. En este trabajo la contribución de la tirosina a la fluorescencia total, se determinó excitando primero a 275 nm, registrando el espectro correspondiente a la fluorescencia emitida por ámbos residuos, después se excitó el triptofano a 293 nm, la diferencia entre las áreas de estos dos espectros,



Espectros de emisión de fluorescencia en TEA 20 mM pH 7.4, a temperatura ambiente. Fig. 3.- Triptofano, excitando a 293 nm (---). Tirosina, excitando a 275 nm (____). Fig. 4.- Mezcla de triptofano y tirosina, excitando a 275 nm, espectro del triptofano excitando a 293 nm (----), ////, contribución de la tirosina a la fluorescencia total. Fig. 5.- Espermatozoides humanos lavados, excitando a 275 nm, (----), ////, contribución de la tirosina a la fluorescencia total.

nos dá idea de la proporción con que contribuye la tirosina a la fluorescencia total de la membrana, que como podemos ver es muy baja.

INTERACCION DE ESPERMATZOIDES CON ESTEROIDES Y NUCLEOTIDOS.-

Los cambio estructurales en las membranas protéicas dan lugar a modificaciones en la eficiencia cuántica de emisión de las proteínas que las constituyen y/o a alteraciones en la posición de la banda de máxima emisión. La eficiencia cuántica de las proteínas puede aumentar o disminuir, en el presente caso hubo una disminución.

En este estudio se observó que el espectro de fluorescencia

cia de las células examinadas fué alterada en mayor o menor grado por la presencia de esteroides y nucleótidos en el sistema.

Las figs. 6-9 y 14-17, muestran que el abatimiento de la intensidad de fluorescencia a concentraciones bajas de todos los compuestos probados es mas acentuada, que a concentraciones altas de los distintos "atenuadores" probados, observándose que la fluorescencia disminuye muy poco en adiciones posteriores, hasta que finalmente se mantiene casi constante.

De los esteroides analizados el estradiol presentó un comportamiento muy particular fig.9, uno de los problemas que se presentó al estudiar la fluorescencia de las células en presencia de este efector, fué el hecho de que el estradiol presenta una banda de máxima emisión a 312 nm que está cercana a la región de máxima fluorescencia de los espermatozoides fig.9B, el espectro de emisión de fluorescencia de una mezcla de ambos fig.9C, indica que no hay adición de los espectros respectivos, si esto ocurriera debía dar lugar a un espectro como el de la fig.9D, a diferencia de éste lo que se observó fué que cuando la concentración del estradiol era baja, solo se manifestaba la fluorescencia de los espermatozoides desapareciendo la del estradiol; otro cambio importante en la banda de emisión de los espermatozoides fué que en presencia de estradiol hubo un corrimiento en la longitud de onda de máxima emisión a 319 nm.

La disminución de la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides producida por la incorporación de diferentes este-

Fig. 6

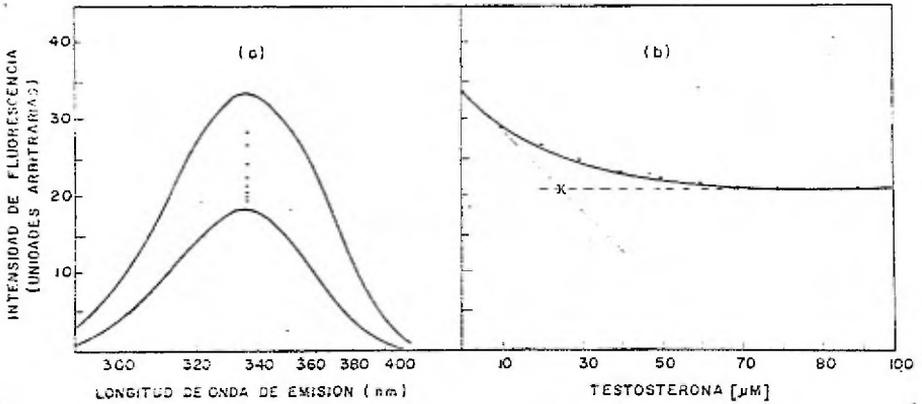
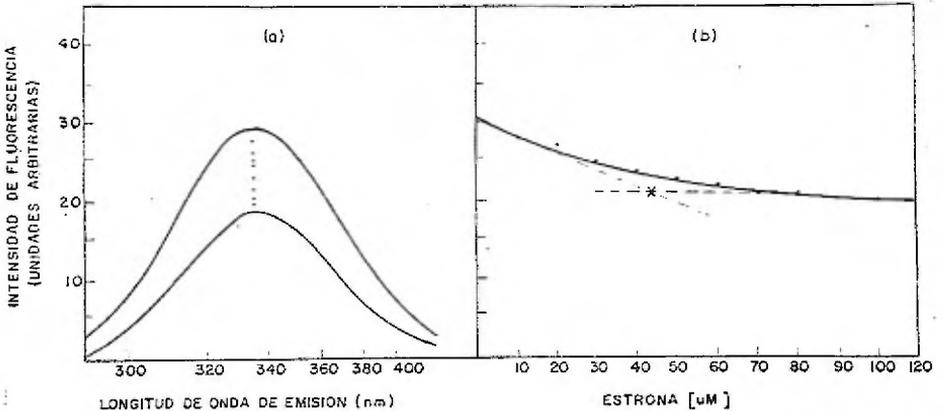
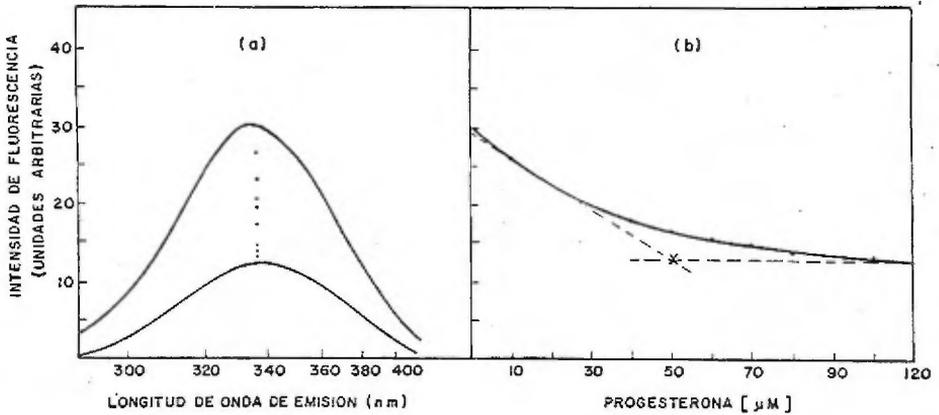


Fig. 7



Disminución de la fluorescencia de espermatozoides por adiciones sucesivas de 30 nMoles de Testosterona (fig.6) y Estrona (fig.7) en solución alcohólica. Se titularon 10^7 células en 3 ml de TEA 20 mM pH 7.4, hasta llegar a una concentración final del esteroide 100 μM . Patrones de titulación y punto estequiométrico, figs. 6b y 7b. Excitando 275 nm.

Fig.8

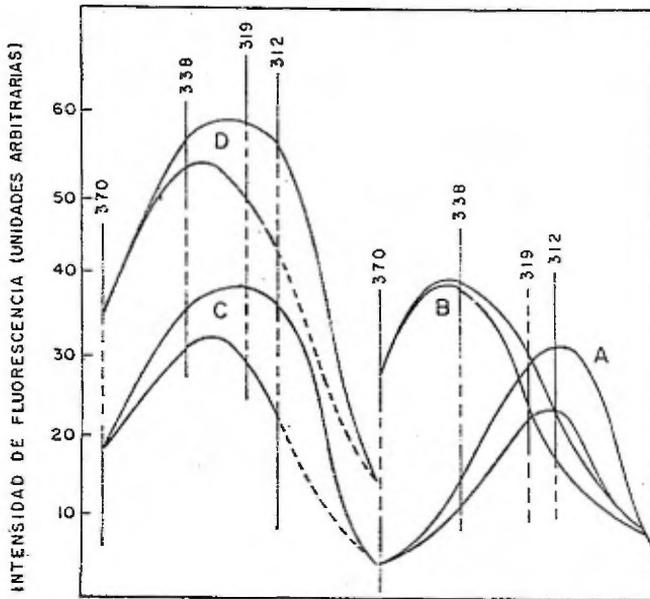


Disminución de la fluorescencia de espermatozoides por adiciones sucesivas de 30 nMoles de Progesterona en solución alcohólica, a una suspensión de 10^7 espermatozoides en 3ml de TEA 20 mM pH 7.4, hasta alcanzar una concentración final 100 μ M. Para mayor claridad únicamente aparece la fluorescencia de las células cuando la concentración del esteroide es nula y cuando llega a 100 μ M. Patrón de titulación y punto estequiométrico fig.8b. Excitando a 275 nm.

-roides está resumida en la tabla I. Es manifiesto que la testosterona a concentraciones mayores de 50 μ M, da lugar a muy pequeñas disminuciones en la fluorescencia; un comportamiento semejante exhiben la progesterona a partir de una concentración 50 μ M y la estrona desde concentraciones 60 μ M en adelante.

En la tabla III, se presentan las disminuciones relativas ocasionadas por la interacción de los esteroideos y membranas, la progesterona produjo la máxima disminución, reduciendo un 57 % la fluorescencia nativa de los espermatozoides, así mismo esta fluore-

Fig. 9

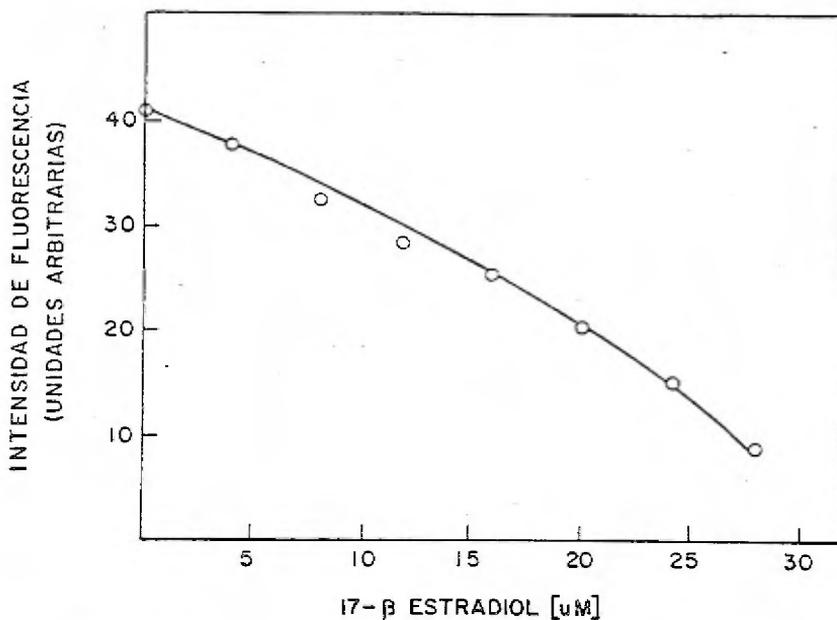


Efecto del 17- β - Estradiol sobre espermatozoides humanos lavados, 9A).-espectro de fluorescencia del esteroide, 9B).-fluorescencia de los espermatozoides solos. 9C).- fluorescencia de los espermatozoides en presencia de estradiol. 9D).- Adición teórica de los espectros de fluorescencia de los espermatozoides y del esteroide en TEA 20 mM pH 7.4. Excitando a 275 nm.

-sencia fue atenuada en un 39 % por la testosterona y en un 33% por la estrona. Es notorio el hecho de que la disminución no es lineal respecto a la concentración del efector ya que tiende a mantenerse casi invariable a concentraciones altas.

La disminución de la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides por efecto de los nucleótidos está resumido en la

Fig.10



Patrón de titulación de espermatozoides lavados, obtenido por adiciones sucesivas de 12 nMoles de 17 - β -Estradiol en solución alcohólica a una suspensión de 10 células en TEA 20 mM pH 7.4.

tabla II. El AMP-cíclico abatió intensamente la fluorescencia del sistema ya que al final de la titulación solo se registró un 10% de la fluorescencia original de los espermatozoides, en presencia de ATP la fluorescencia de las células fue de un 34%, en cambio el ADP y el AMP permiten que los espermatozoides emitan un 40 y un 43% respectivamente de la emisión nativa, figs. 16 y 17.

En la tabla IV es evidente que el AMP-cíclico decrece la eficiencia cuántica del sistema hasta un 90%, el ATP la disminuye un 66%, el ADP un 60% y el AMP un 57%.

Fig.14

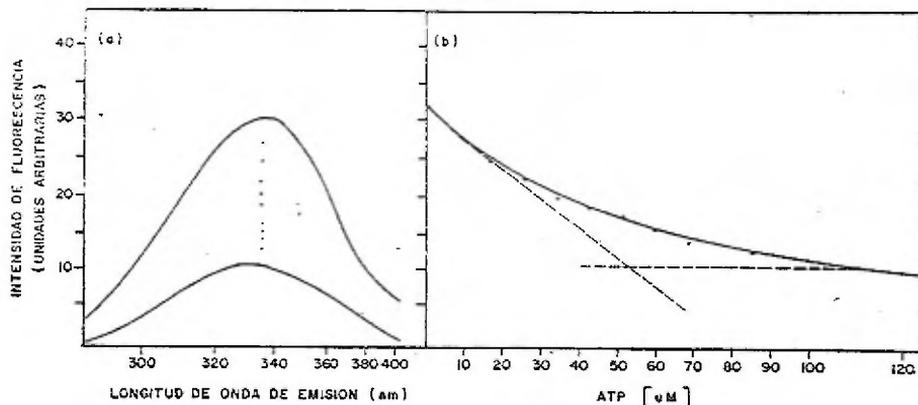
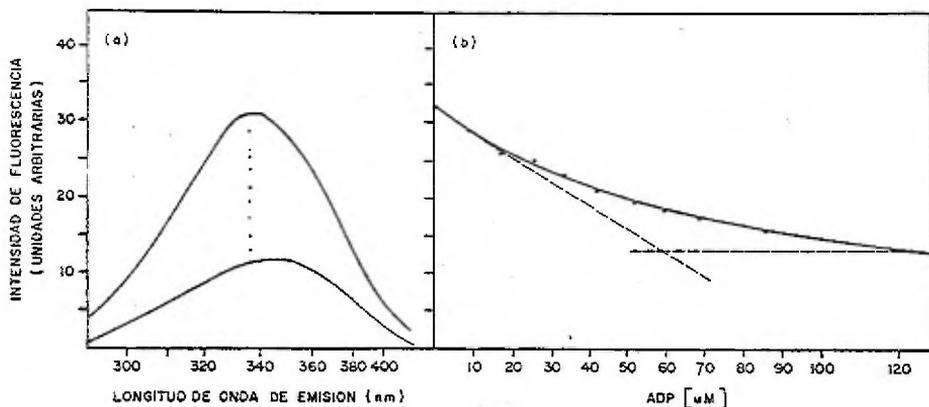


Fig.15



Disminución de la fluorescencia de espermatozoides por adiciones sucesivas, de 25 nMoles de ATP (fig.14) y ADP (fig.15), a una suspensión de 10^7 espermatozoides en 3ml de TRIS-HCl 50mM pH 7.4, hasta alcanzar una concentración final del nucleótido 120 μ M. Para una mayor claridad únicamente aparece la fluorescencia inicial de las células y cuando la concentración del nucleótido es 120 μ M. Patrones de titulación y punto estequiométrico, figs.14b y 15b. Excitando a 275 nm.

Fig. 16

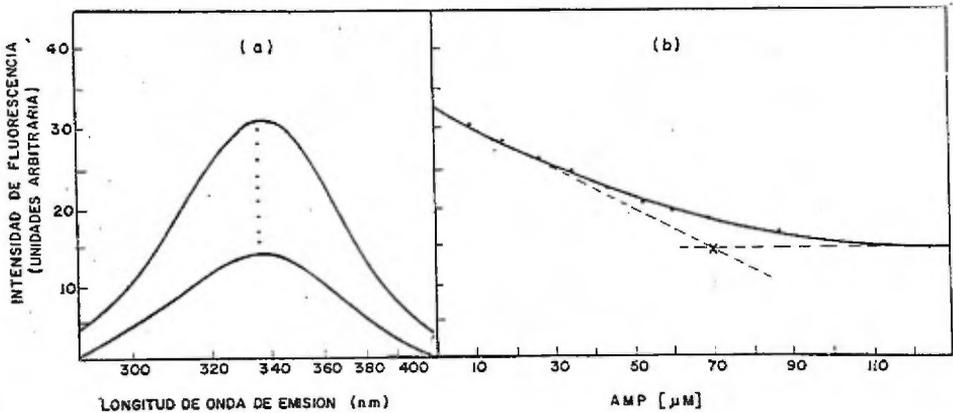
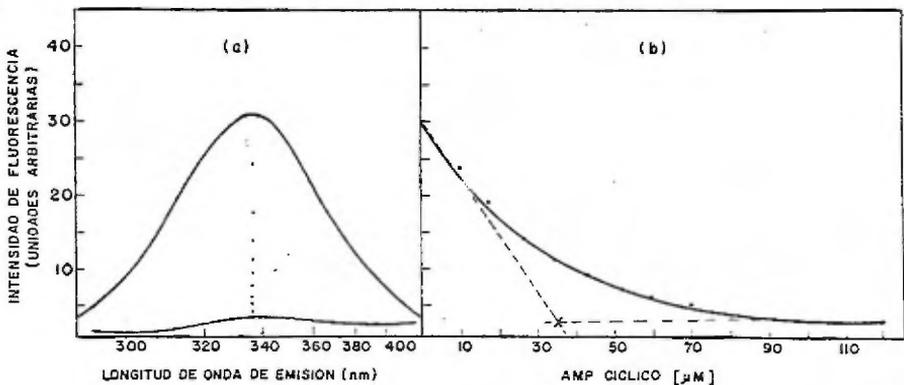


Fig. 17



Disminución de la fluorescencia de espermatozoides por adiciones sucesivas de 25 nmoles de AMP (Fig. 16) y AMP-c (Fig. 17), a una suspensión de 10^7 espermatozoides en 3ml de TRIS - HCl 50 mM pH 7.4, hasta alcanzar una concentración del nucleótido final de 120 μM . Para una mayor claridad únicamente aparece la fluorescencia inicial de los espermatozoides y cuando la concentración del nucleótido es 120 μM . Patrones de titulación y punto estequiométrico, Figs. 16.b y 17.b. Excitando a 275 nm.

DESPLAZAMIENTO DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA EMISIÓN.-

La longitud de onda de máxima emisión de los espermatozoides no es afectada por la incorporación de esteroides al medio, figs.6-9, la excepción es el estradiol que desplaza la banda de máxima emisión de 312 a 319 nm, fig.9D.

Respecto a los nucleótidos, el ATP induce un pequeño corrimiento de 3nm hacia longitudes de onda menores en la banda de máxima emisión, fig.14a. El ADP induce un desplazamiento de 4 nm hacia longitudes de onda mayores, fig.15a. La unión de AMP y AMP-cíclico a los espermatozoides no hizo variar la posición de la longitud de onda de máxima emisión, fig.16 y 17.

La diferencia entre las áreas de los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos al excitar a 275 y 293 nm, indicó que la contribución de la tirosina a la fluorescencia de los espermatozoides no es alterada por la interacción con los efectores probados.

CALCULO DE LAS CONSTANTES APARENTES DE FORMACION (K_f).-

Los patrones de disminución de fluorescencia están presentados en las figuras 6-8b y 14-18b, éstos se obtienen graficando la intensidad de fluorescencia determinada después de cada adición del "atenuador" al medio, contra la concentración del "atenuador" en el sistema bajo análisis.

La gráfica de titulación con estradiol, fig.10, muestra características muy especiales, ya que a concentraciones altas del esteroide la disminución de la fluorescencia es mayor, de tal manera

que al terminar la titulación, la fluorescencia de los espermatozoides casi se anula, la extrapolación de esta gráfica indica que a concentraciones elevadas del estradiol, solo se registra la fluorescencia de éste, que a su vez también va disminuyendo, tabla VI.

El intercepto de la regiones lineales de las gráficas 6-9b y 14-17b, nos da el punto estequiométrico, en este punto la unión de cualquier "atenuador" (D) y el interactuante (I) en este caso espermatozoides, puede representarse por:

$$I + nD = DnI \quad (1)$$

donde n es la relación (en el punto estequiométrico) de la concentración molar del "atenuador" D y el número de millones de espermatozoides contenidos en el sistema. La constante aparente estadística de formación (K_f) está dada por la siguiente ecuación:

$$K_f = \frac{[DnI]}{[Dn][I]} \quad (2)$$

donde DnI es la concentración del complejo formado, Dn es la concentración del "atenuador" libre, I concentración del interactuante libre.

Se asume que el interactuante I posee una sola especie molecular cuyos sitios de unión con el "atenuador" se consideran equivalentes, por lo tanto el complejo formado entre el "atenuador" y los residuos aromáticos se considera tiene una constante aparente de formación K_f .

Sea C la concentración total del interactuante (en este

estudio , el cálculo de n se hizo sobre número de millones de espermatozoides). La fracción del "atenuador" unida a los espermatozoides del sistema denotada por Q_f , está definida como la razón de disminución en un punto sobre la curva cercano o sobre el punto estequiométrico (Q_e) y la máxima disminución (Q_m) por lo tanto:

$$\text{Si } Q_f = \frac{Q_e}{Q_m} \quad (3) \text{ y siendo } Q_e = 1 - \frac{F_e}{F_o} \quad (4)$$

$$\text{y } Q_m = 1 - \frac{F_m}{F_o} \quad (5)$$

donde F_e se refiere a la fluorescencia observada en el punto estequiométrico o en un punto cercano al mismo, F_m es la fluorescencia mas baja observada.

Substituyendo la ecuación (4) y (5) en la ecuación (3) resulta:

$$Q_f = \frac{1 - \frac{F_e}{F_o}}{1 - \frac{F_m}{F_o}} \quad (6)$$

$$\text{por lo tanto } Q_f = \frac{F_o - F_e}{F_o - F_m} \quad (7)$$

La concentración del complejo esta dada por :

$$D_n = Q_f C \quad (8)$$

la formación del complejo dependerá de la fracción del "atenuador" unido a los espermatozoides.

La concentración del interactuante I y del "atenuador" D libre es: $I = C - CQ_f$ (9)

donde C es el número total de espermatozoides en el sistema, factorizando la ecuación (9), resulta la siguiente ecuación:

$$[I] = C (1 - Q_f) \quad (10)$$

$$[D] = D_t - n Q_f C \quad (11)$$

D_t es la concentración molar total del "atenuador", $n Q_f C$ es la fracción molar del "atenuador" unido. Combinando las ecuaciones (10) y (11) con la ecuación (2), nos da la siguiente ecuación de la constante aparente de formación:

$$K_f = \frac{Q_f}{(1 - Q_f)(D_t - n Q_f C)} \quad (12)$$

Todas las constantes para los compuestos analizados fueron calculadas por medio de esta ecuación.

En la tabla V, se indica que la fracción del esteroide unida a los espermatozoides de valor mas alto corresponde a la progesterona con una Q_f de 0.81, este esteroide reduce la fluorescencia de las células un 44% en el punto estequiométrico y un 54% en la mas alta concentración del esteroide; la testosterona a pesar de poseer la menor K_f y Q_f produjo un descenso en la emisión de fluorescencia mayor que la estrona, aunque menor que el causado por la progesterona.

Los valores de las constantes aparentes de formación son de $2.6 \times 10^4 (M^{-1})$ para la testosterona, de $3.18 \times 10^4 (M^{-1})$ para la estrona y de $6.46 \times 10^4 (M^{-1})$ para la progesterona.

Las tablas II y IV indican que los nucleótidos no abaten

la fluorescencia de los espermatozoides tan efectivamente como los esteroides, aparentemente los espermatozoides exhiben una menor facilidad para formar complejos con el AMP-c (tabla V), sin embargo es notorio que este nucleótido es el que modifica más intensamente la estructura de la membrana.

El resto de los nucleótidos forman complejos más efectivamente con la estructura membranal, no obstante ésta no parece ser muy alterada en su estructura por la presencia de estos efectos.

EFFECTO SOBRE EL MAXIMO DE EXCITACION.- Teóricamente el espectro de excitación debe ser igual al espectro de absorción, sin embargo en la práctica se presentan algunas diferencias como consecuencia de artefactos instrumentales, una diferencia es que el máximo de excitación está desplazado hacia longitudes de onda mayores. Las alteraciones en el máximo de excitación de una substancia determinada en diversas condiciones podría ser resultado de modificaciones en la conformación de la molécula, es por eso que decidimos observar los espectros de excitación.

EFFECTO DE ESTEROIDES.- Las figs. 11-13, constituyen los espectros de excitación de espermatozoides con diferentes esteroides; en ningún caso se corrió la longitud de onda de la banda de máxima excitación, que se observó a 288 nm.

EFFECTO DE NUCLEOTIDOS.- El espectro de excitación de los espermatozoides en presencia de ATP, fig.19, muestra un desplazamiento de

2 nm hacia la región azul del espectro, el efecto del ADP es contrario ya que su unión a los espermatozoides dió lugar a un corrimiento en el máximo de excitación de 288 a 293 nm, a bajas concentraciones del nucleótido, fig.20. Los espermatozoides en presencia de AMP presentan una excitación máxima a 291 nm, fig.21, el AMP-c produce un desplazamiento de 7 nm en el máximo de excitación de los espermatozoides, fig.22.

En forma similar con los esteroides las adiciones sucesivas de nucleótidos dan lugar a un descenso en la emisión de fluorescencia.

T A B L A I

DISMINUCION DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE
ESPERMATOZOIDES POR ESTEROIDES

Concentración final uM del esteroide	Emisión de fluorescencia (%)		
	Testosterona	Estrona	Progesterona
0	100	100	100
10	85	93	86
20	79	90	76
30	73	83	70
40	69	80	60
50	66	76	56
60	64	73	53
70	63	70	50
80	61	70	46
100	61	67	43

Una suspensión de 10^7 espermatozoides en TEA 20mM pH 7.4, se hicieron adiciones de 30 nMolas de cada uno de los esterooides hasta alcanzar una concentración 100 uM. La titulación se hizo a temperatura ambiente. Longitud de onda de excitación y de emisión, 275 y 338 nm, respectivamente.

T A B L A II

REDUCCION DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE
ESPERMATOZOIDES POR NUCLEOTIDOS

Concentración final μM del nucleótido	Emisión de fluorescencia (%)			
	A M P	A D E	A T P	A M P - c
0	100	100	100	100
8.6	93	90	87	80
17.2	87	81	78	60
25.8	81	78	71	46
34.4	75	71	62	37
43.0	68	65	59	30
51.6	62	59	56	23
60.2	59	56	50	20
68.0	56	53	43	17
86.0	50	46	40	10
124.4	43	40	34	10

Una suspensión de 10^7 espermatozoides en TRIS - HCl 50mM pH 7.4, fué titulada a temperatura ambiente por adiciones sucesivas de 25 nMoles de cada nucleótido, hasta llegar a una concentración final 124.4 μM . Longitud de onda de excitación y de emisión 275 y 338 nm, respectivamente.

T A B L A III

REDUCCION DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE
ESPERMATOZOIDES POR ESTEROIDES

Concentración final uM del esteroide	Emisión de fluorescencia (%)		
	Testosterona	Estrona	Progesterona
0	0	0	0
10	15	7	14
20	21	10	24
30	27	17	30
40	31	20	40
50	34	23	44
60	36	27	47
70	37	30	50
80	39	30	54
100	39	33	57

7

A una suspensión de 10 espermatozoides, en TEA 20 mM pH 7.4, se hicieron adiciones de 30 nMoles de cada uno de los esteroides, hasta llegar a una concentración 100 uM. La titulación se realizó a temperatura ambiente. Longitud de onda de excitación y de emisión, 275 y 338nm respectivamente.

T A B L A IV

REDUCCION DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA
DE ESPERMATOZOIDES POR NUCLEOTIDOS.

Concentración final μM del nucleótido.	Disminución de la fluorescencia (%)			
	A M P	A D P	A T P	A M P - c
0	0	0	0	0
8.6	7	10	13	20
17.2	13	19	22	40
25.8	19	22	29	54
34.4	25	29	38	63
43.0	32	35	41	70
51.6	38	41	44	77
60.2	41	44	50	80
68.8	44	47	57	83
86.0	50	54	60	90
124.4	57	60	66	90

Se tituló una suspensión de 10^7 espermatozoides en TRIS - HCl 50 mM, con cada uno de los nucleótidos, haciendo adiciones de 25 nMoles de cada uno de ellos, hasta alcanzar una concentración final 124.4 μM . Longitud de onda de excitación y de emisión, de 275 y 338 nm respectivamente.

T A B L A V

EFFECTO DE ESTEROIDES Y NUCLEOTIDOS SOBRE LA FLUORESCENCIA DE ESPERMATOZOIDES

Compuesto	n	Q_e (%)	Q_{max} (%)	Q_f	$K_f \times 10^4$ (M^{-1})
Testosterona	2.5	27	39	0.69	2.76
Estrona	4.5	24	34	0.70	3.18
Progesterona	5.0	44	54.9	0.81	6.46
A M P-c	3.4	64	90	0.71	2.5
A T P	5.2	47	66	0.71	2.95
A D i P	6.0	44	60	0.73	3.6
A M P	7.0	44	57	0.77	5.06

n = Compuesto μM /No de millones de espermatozoides

Q_e = Disminución de la fluorescencia en el punto estequiométrico.

Q_{max} = máxima disminución de la fluorescencia observada.

Q_f = Fracción del "atenuador" unido.

K_f = Constante aparente de formación.

T A B L A VI

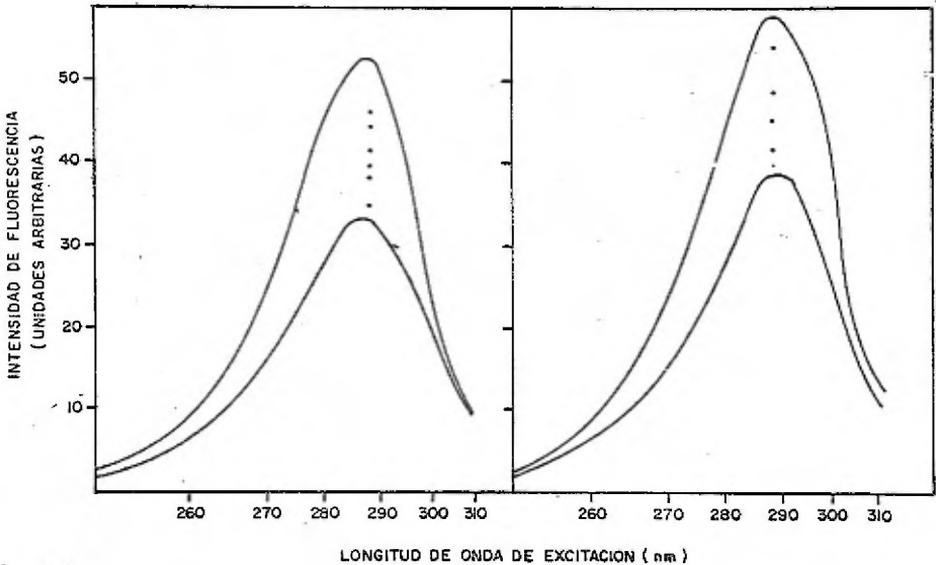
EFFECTO DEL 17- β - ESTRADIOL SOBRE LA FLUORESCENCIA DE
ESPERMATOZOIDES

Concentración final μ M del 17- β -Estradiol	Emisión de fluorescencia (%)	Disminución de la fluorescencia (%)
0	100	0
4	90	10
8	80	20
12	70	30
16	61	39
20	51	49
24	39	61
28	22	78

Una suspensión de 10^7 espermatozoides, en TEA 20 mM, pH 7.4, fué titulada a temperatura ambiente, con una solución etanólica de 17- β - Estradiol, adicionando 20 μ L (12 nMolas) hasta alcanzar una concentración final 28 μ M. Longitud de onda de excitación 275 nm.

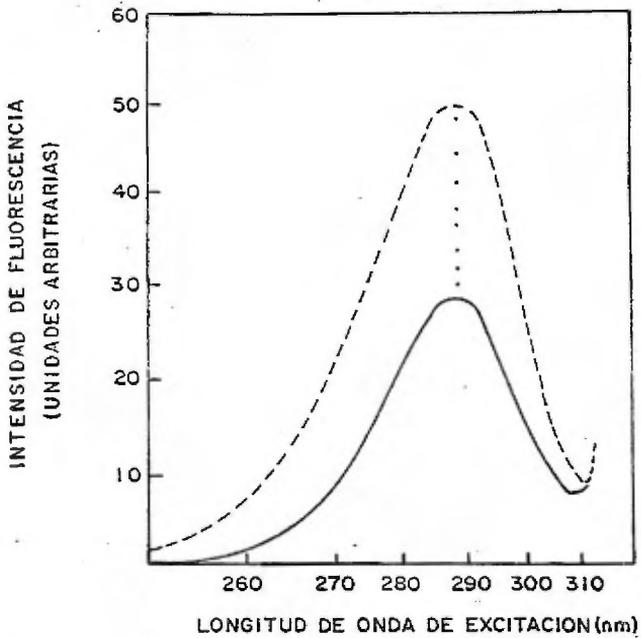
Fig. 11

Fig.12



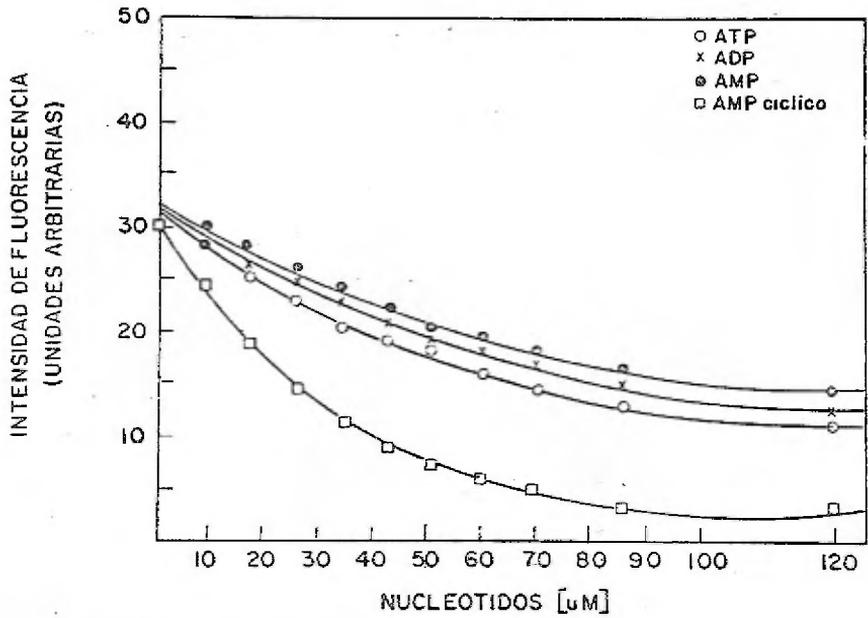
Efecto de Estrona (fig.11) y Testosterona (fig.12), sobre el máximo de excitación de espermatozoides humanos lavados. Para mayor claridad, únicamente se indican los espectros de excitación de los espermatozoides en el soporte de TEA 20 mM pH 7.4 y en presencia de una solución 100uM del esteroide. Longitud de onda de emisión a 338 nm.

Fig.13



Efecto de la Progesterona sobre el máximo de excitación de espermatozoides humanos lavados. Para mayor claridad únicamente se indican los espectros de excitación de los espermatozoides en el soporte de TEA 20 mM pH 7.4 y en presencia de una solución 100 μM del esteroide. Longitud de onda de emisión a 338 nm.

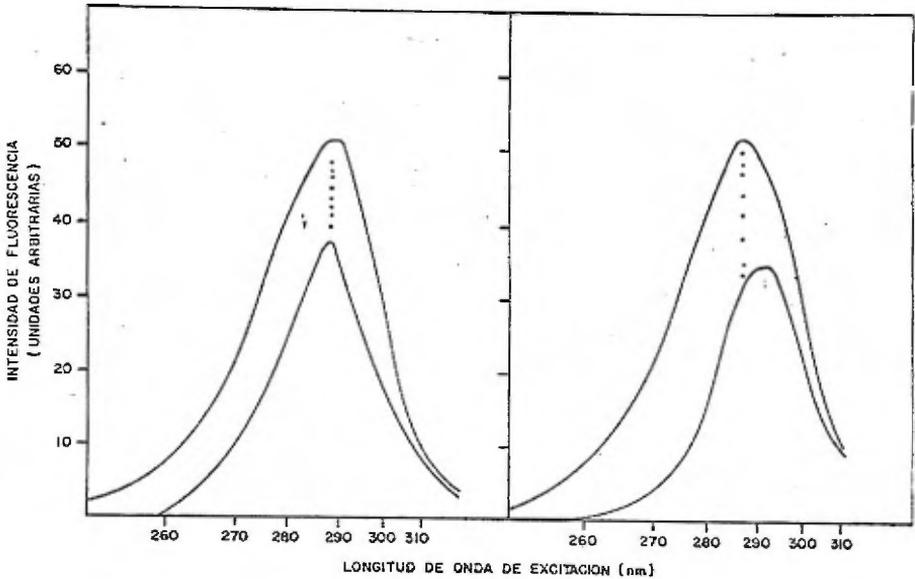
Fig. 18



Patrones de titulación de espermatozoides con distintos nucleótidos, en TRIS-HCl 50 mM pH 7.4 .

Fig.19

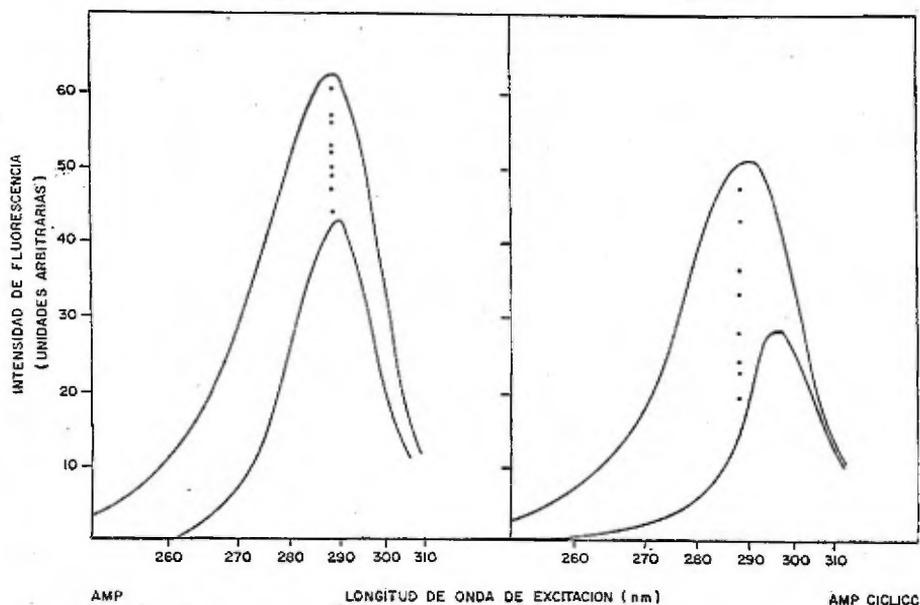
Fig.20



Efecto del ATP (fig.19) y ADP (fig.20) sobre el máximo de excitación de espermatozoides humanos lavados, en soporte de TRIS-HCl 50 mM, pH 7.4 y en presencia de una solución 120 μ M del nucleótido. Longitud de onda de emisión a 338 nm.

Fig.21

Fig.22



Efecto del AMP (fig.21) y AMP-cíclico (fig.22) sobre el máximo de excitación de espermatozoides humanos lavados en TRIS-HCl 50 mM, pH 7.4. Para una mayor claridad únicamente se indican los espectros de excitación de los espermatozoides en el soporte y en presencia de una solución 120 μ M del nucleótido. Longitud de onda de emisión a 338 nm.

V. RESUMEN.

1.- El objeto de la tesis es la aplicación de la fluorescencia como método de alta sensibilidad para, la detección de cambios conformacionales de la membrana del espermatozoide, inducidos por compuestos de bajo peso molecular.

2.- Se describe de un modo somero los métodos utilizados hasta ahora en la investigación de las alteraciones de proteínas y membranas con moléculas pequeñas como pueden ser: algunos medicamentos, esteroides, hormonas como la tiroxina, etc., señalando las principales características fisicoquímicas del fenómeno de la fluorescencia y su relación con la estructura molecular.

3.- Se hizo un breve resumen del desarrollo de la fluorometría, como una metodología que en la actualidad ha permitido profundizar acerca de la mecanística de la interacción membranar con moléculas presentes en el medio ambiente que le rodea.

4.- Se menciona la metodología seguida para el estudio de las interacciones de los espermatozoides con esteroides y nucleótidos, señalándose los reactivos y aparatos usados en este estudio.

5.- Se describen los resultados que se presentan en forma de tablas, gráficas, como espectros de emisión de fluorescencia y de excitación. Indicándose la obtención de la ecuación para el cálculo de las constantes aparentes de formación de complejos entre la membrana del espermatozoide y los diferentes efectores probados.

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

La fluorescencia de los aminoácidos aromáticos constituye un monitor natural sumamente sensitivo para la detección de cambios conformacionales de las proteínas. El uso de la fluorescencia para definir tales alteraciones en términos de un proceso molecular específico, ha estado limitado por el hecho de que las características espectrales de las proteínas y membranas tienen una gran variedad de orígenes. De todos los aminoácidos aromáticos el que es particularmente afectado en su fluorescencia es el triptofano.

Se han realizado numerosos estudios en los cuales se intenta dar una explicación satisfactoria de la diferencia de los espectros de aminoácidos aromáticos libres y cuando están incorporados en un péptido o en proteínas, así mismo se han postulado diversas hipótesis que tratan de dar una solución a dicho problema.

Una de esas hipótesis es la de Kronman⁴⁶ quien postula que en la lactalbúmina existen dos tipos de residuos aromáticos: unos expuestos y otros ocultos. Afirma que la banda de fluorescencia de los grupos expuestos está próxima a la banda de emisión de fluorescencia máxima del triptofano en solución acuosa (350 nm), y que la emisión de los grupos ocultos es semejante a la del triptofano en solventes no polares (300 nm), por analogía puede pensarse que hay una diferencia en las polaridades de la vecindad de los grupos expuestos y ocultos, por lo que es de esperarse que algunos

residuos aromáticos se localicen en regiones polares y otros en ambientes hidrofóbicos proporcionados por las cadenas laterales leucil, isoleucil, valil, fenilalanil y posiblemente alanina de las proteínas⁴⁸; en la membrana quizá se localicen en estos sitios las cadenas apolares de los lípidos.

En la literatura hay poca información acerca de la cuantificación de residuos aromáticos de la membrana del espermatozoide humano o de otros mamíferos, por los que en el momento actual no es posible determinar la proporción de residuos aromáticos ocultos y expuestos presentes en la membrana del espermatozoide; sin embargo si aplicamos la hipótesis de Kronman⁴⁶ a nuestro sistema de células enteras, podemos admitir la existencia de grupos aromáticos con diferentes grados de accesibilidad, se ha sugerido⁴⁸ que el desplazamiento de la fluorescencia del triptofano membranar hacia longitudes de onda más cortas, es debido al ambiente hidrofóbico que rodea los residuos aromáticos. Fig. 5.

En la Fig. 5 podemos observar que no aparece el pico de emisión característico de la tirosina, cuya banda a 305 nm si se presenta en el espectro de fluorescencia de una mezcla de triptofano y tirosina, Fig. 4, este fenómeno también ha sido observado en proteínas que contienen ambos aminoácidos aromáticos⁴¹, este fenómeno se cree es producido por la formación de enlaces entre hidroxilos fenólicos y carboxilatos adyacentes⁴⁹ y por la pérdida de energía de excitación de las tirosinas libres a causa de la forma-

ción de dicho enlace⁵⁰.

No obstante la contribución de la tirosina a la fluorescencia de los espermatozoides o de otros sistemas, puede determinarse por el método de diferencias de espectros mencionado en el capítulo III; los resultados indican que la tirosina aunque en pequeña proporción si contribuye a la fluorescencia total de los espermatozoides. Fig. 5.

EFEECTO DE ESTEROIDES.- Los requerimientos estructurales de los esteroides para la interacción con proteínas ya han sido investigados⁵¹, se ha establecido que la polaridad de la molécula, la planaridad del anillo y la configuración de sus grupos funcionales^{52, 53} son factores que pueden favorecer la interacción. En contraste, poco se sabe acerca de los requerimientos estructurales de las proteínas que facilitan dicha interacción, no obstante se tiene conocimiento de la participación de los residuos aromáticos en los fenómenos de unión de esteroides y proteínas (albúmina, globulinas) con algunos esteroides y otros sistemas hormonales^{54, 55}.

Los patrones de titulación de espermatozoides con esteroides Figs. 6-9, indican que la fluorescencia de los espermatozoides desciende con las primeras adiciones del esteroide en una forma más o menos brusca y que a concentraciones altas del esteroide tiende a disminuir hasta que finalmente se mantiene sin variaciones; partiendo de la hipótesis de Kronman⁴⁶ y del hecho de que el triptofano principalmente y la tirosina en menor grado forman com-

plejos con los esteroides, pensamos que el esteroide al ponerse en contacto con la membrana del espermatozoide forma complejos rápidamente con los residuos aromáticos más accesibles; una vez saturados todos los grupos expuestos la fluorescencia disminuye ligeramente, quizá a causa de una interacción más débil con residuos aromáticos más alejados de la superficie membranal, hasta que finalmente cesa la fijación del esteroide, manifestándose únicamente la fluorescencia de los triptofanos ocultos.

Las variaciones en el efecto de reducción de la fluorescencia de los espermatozoides por la formación de complejos con los esteroides, probablemente indican características distintas de los sitios de fijación de cada uno de los esteroides.

Es importante el hecho de que ocurra fijación de esteroides y nucleótidos en la membrana del espermatozoide, ya que existen evidencias de que estos compuestos ejercen una influencia directa o indirecta sobre el mecanismo regulador de la actividad metabólica de los espermatozoides durante su estancia en el tracto genital masculino y posteriormente en el tracto genital femenino.

Se ha reportado que la testosterona está presente en los fluidos de los ductos eferentes de varias especies de mamíferos incluso en el hombre⁴³, por lo tanto está en contacto directo con el gameto masculino; el 17- β -Estradiol principalmente y la estrona son constituyentes del líquido folicular; la progesterona es un esteroide que se encuentra en pequeñísima proporción en el tejido tes

ticular, y actualmente se le ha dado uso como anticonceptivo, se ha sugerido que este esteroide aparece en el endometrio de con -
jas tratadas sistemáticamente con progestágenos³⁶.

En la actualidad se desconoce el mecanismo y sitio de ac -
ción de estos efectores, sin embargo se piensa que posiblemente
uno de estos sitios es la membrana del espermatozoide, esto lo pu -
dimos confirmar con nuestros resultados tablas I, II, los cuales
nos indican que la membrana es alterada en su estructura, aunque
no de una manera drástica al ponerse en contacto con los esteroi
des, traduciéndose esto en una disminución de la fluorescencia -
nativa de la membrana.

En estudios⁵⁷ realizados con espermatozoides de diver -
sas especies, se ha reportado que la testosterona a concentracio
nes bajas (25 ug/ml) tiene un efecto inhibitorio sobre el consumo
de oxígeno en semen total, en contraste la progesterona a concen
traciones de 100 ug/ml inhibe efectivamente esta función en esper -
matozoides bovinos lavados. A diferencia de los esteroides ante
riores el 17- β -estradiol incrementa el consumo de oxígeno en se -
men total y en espermatozoides lavados. El efecto estimulante pa -
ra este esteroide está limitado a un rango de 10-25 ug/ml, a con
centraciones más bajas de 10 ug/ml no tiene efecto y a concentra
ciones más altas o no inhibe o su efecto es ligero; así mismo se
ha reportado² que los espermatozoides de algunos mamíferos trans
forman la testosterona en androstendiona, el estradiol en estrona

y la progesterona en un producto que probablemente es la 20- β -hidroxi-pre-4-en-3-ona.

Otra de las funciones del espermatozoide alterada por esteroide es la movilidad, que decrece en presencia de testosterona y progesterona, incrementándose por el 17- β -estradiol.

Los hallazgos sobre consumo de oxígeno, movilidad y alteraciones estructurales, probablemente están relacionadas con alguna forma en el proceso biológico de la etapa final de la maduración del espermatozoide que se efectúa en el tracto genital femenino y es llamada capacitación.

Se cree que durante la capacitación, se eleva la actividad respiratoria del espermatozoide¹, aumentando⁵⁶ también su movilidad, disminuyendo el tiempo de supervivencia y procediéndose un desprendimiento de moléculas posiblemente de naturaleza glicosídica o bien glicoprotéica perteneciente a la membrana del espermatozoide.

Los datos obtenidos en este estudio no nos permiten establecer si hay correlación entre la afinidad del espermatozoide por el esteroide y el efecto de éstos sobre la función respiratoria, o la movilidad de dichas células, no obstante hay que hacer notar que la unión de los efectores utilizados en este trabajo, modifican la estructura membranal e inducen cambios metabólicos por lo que se sugiere la posibilidad de que la acción reguladora ejercida por los esteroides sobre el metabolismo de los espermatozoides es iniciada en la membrana, facilitando o reprimiendo la capacitación.

Yanagimachi⁵⁸ propone que la capacitación va acompañada

de un aumento en la permeabilidad de la membrana del espermatozoi de, por lo cual nosotros pensamos que durante el tiempo que el espermatozoide permanece en el tracto genital masculino en contacto con la testosterona y pequeñas cantidades de progesterona, su membrana es menos permeable, lo cual dificulta el paso de substratos exógenos necesarios para la obtención de energía, en consecuencia se produce una reducción de la movilidad y función respiratoria. La baja constante de formación para la testosterona, podría deberse a que la hormona se encuentra a una concentración relativamente alta en el medio ambiente en que se encuentra el espermatozoi de, aumentando la probabilidad de un choque entre la membrana y las moléculas del esteroide; la mayor constante de formación obtenida para el complejo progesterona-espermatozoide, podría atribuirse al hecho de la baja concentración de esta hormona en el tejido testicular y en el endometrio, Tabla IV, entonces una forma de evitar un gasto de energía innecesario por consumo de substratos endógenos, sería aumentando la fuerza de la interacción con esas moléculas escasas en el medio del espermatozoide.

En la fase final del recorrido del espermatozoide en la búsqueda del óvulo, que permanece en la trompa de falopio hasta el momento de la fertilización, el gameto masculino entra en contacto con un ambiente rico en $17-\beta$ -estradiol contenido en el líquido folicular, recientemente se ha indicado que este esteroide es uno -

de los factores necesarios para inducir un aumento en la permeabilidad membranar, acelerándose así el paso de substratos, de cuya combustión el espermatozoide produce la energía necesaria para el aumento en su motilidad, lo cual podría ser considerado como parte de la capacitación, que requiere el espermatozoide para llevar a cabo la fecundación del óvulo.

EFEECTO DE NUCLEOTIDOS.- Los resultados obtenidos con los nucleótidos claramente indican una interacción importante con las membranas de los espermatozoides. Es interesante ver como el ATP y el AMP-cíclico afectan de una forma indiscutible la fluorescencia. El efecto del ATP quizá está relacionado en gran medida con la presencia de sitios específicos de unión favorecidos por la ATP-asa membranar, cuya presencia ha sido recientemente reportada. Se ha postulado que el ATP, que se encuentra en alta concentración en el plasma seminal, no pasa a través de la membrana celular, por lo tanto es dudoso que éste sea utilizado por el espermatozoide internamente, en consecuencia se ha sugerido que el ATP puede ser usado en el transporte de metabolitos del plasma seminal al interior de las células espermáticas⁵⁹.

El hecho de que el ATP sea hidrolizado por la ATP-asa membranar, implica una interacción entre la membrana y el nucleótido, cuyo reflejo sería la reducción del número de sitios polares, esto probablemente facilitaría el transporte de substratos al interior de la célula, este cambio en la permeabilidad podría traducir

se en una disminución de la fluorescencia nativa del espermatozoide.

Otro posible mecanismo de acción importante ha sido propuesto en trabajos realizados recientemente, en los que se usa tetraciclina como monitor, que tiene la propiedad de señalar regiones polares en la membrana. Estos estudios se han realizado también en espermatozoides, los resultados demuestran que este antibiótico es liberado del complejo por la presencia de ATP y AMP-c, el desprendimiento de tetraciclina es favorecido probablemente por una disminución en la polaridad de la superficie membranaral.

Se tiene conocimiento de que el AMP-c, actúa como un segundo mensajero, sirviendo como mediador común para la acción de un buen número de hormonas en diferentes tejidos animales.

En estudios realizados con hormonas tales como, el glucagon y catecolaminas, se ha encontrado que dichas hormonas estimulan la actividad de la adenilciclase en membranas de células hepáticas, dando lugar a un incremento en la concentración del AMP-c, este aumento podría ser responsable de la activación de algunas enzimas clave en varios caminos metabólicos, en el sistema examinado en el presente estudio podría tener un papel de inductor específico en la capacitación. Este nucleótido como se ha mencionado previamente, facilita el desprendimiento de la tetraciclina fija en el espermatozoide, este hecho se puede considerar como una prueba indirecta de la capacitación.

La observación de la gráfica de la fig.22, indica que la adición de AMP-c a una suspensión de espermatozoides provocó una notable disminución de la fluorescencia. Nuestros resultados muestran que la estructura membranal es modificada con mayor intensidad por el AMP-c principalmente y por el ATP que por los otros nucleótidos.

El uso de esta metodología para el estudio de fenómenos de interacción de membranas con moléculas de bajo peso molecular, nos da oportunidad a abordar estudios bajo diferentes condiciones experimentales, que nos permitirán profundizar más sobre la mecánica de acción de éstos y otros compuestos que se sabe tienen influencia importante en células tan especializadas como lo son los espermatozoides, así como también en otros sistemas biológicos.

CONCLUSIONES

1.- El cálculo del porcentaje de disminución de la fluorescencia de los espermatozoides por efecto de cada uno de los compuestos probados dió los siguientes resultados: la Progesterona redujo la fluorescencia nativa un 57%, la testosterona un 39% y la estrona un 33%. Los nucleótidos AMP, ADP y ATP, redujeron la fluorescencia en un rango de 57-66%, el AMP-cíclico disminuyó la fluorescencia hasta un 90%.

2.- El cálculo de las constantes aparentes de formación (K_f) por medio de la ecuación (12) nos dió los siguientes valores para la testosterona de 2.76×10^4 (M^{-1}), para la Estrona de 3.18×10^4 (M^{-1}), y de 6.46×10^4 (M^{-1}) para la progesterona. Las constantes aparentes de formación encontradas para los nucleótidos fue-

ron los siguientes: 2.5×10^4 (M^{-1}) para el AMP-cíclico 2.95×10^4 - (M^{-1}) para el ATP, 3.60×10^4 (M^{-1}) para el ADP y de 5.06×10^4 (M^{-1}).

3.- Es manifiesta la importancia biológica de los fenómenos de fijación de moléculas pequeñas en la membrana del espermatozoide, pensando en la iniciación de un posible mecanismo de regulación hormonal del metabolismo de este gameto a través de la membrana.

4.- Se sugiere que el AMP-cíclico podría actuar como un inductor específico de la capacitación.

5.- Se hace patente la utilidad de la fluorometría para el estudio de la mecánica de la interacción de la membrana del gameto masculino con moléculas pequeñas, ya que los datos obtenidos son susceptibles de tratamiento matemático.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Mounib, M.S.: *Acta Endocrinológica*, 45, (1964) 631-640.
- 2.- Seamark, R.F., and White, I.G.: *J. Endocrin.*, 30, (1964) 307-321.
- 3.- Ericsson, R.J., Cornette, J.C., and Buthala, D.A.: *Acta Endocrin.*, 56, (1967) 424.
- 4.- Sonenberg, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68, (1971) 1051.
- 5.- Pedrón, N., Hicks, J.J., Lara-Ricalde, R., and Rosado, A.: - *Contraception*, 7, (1973) 213-226.
- 6.- Mercado, E., and Rosado, A.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 298, - (1973) 639.
- 7.- Golstein, A.: *Pharmacol. Rev.*, 1, (1949) 102.
- 8.- Edsall, J.T., and Wyman, J.: "Biophysical Chemistry", Academic Press Inc., New York. N.Y., (1958), Cap. II, p.p., 591-660.
- 9.- Scholtan, W.: *Antibiot. Chemotherapia.*, 12, (1964) 103.
- 10.- Markus, G., and Baumberger, J.P.: *J. Biol. Chem.*, 206, (1965) 59.
- 11.- Porath, J., and Flodin, P.J.: *Nature*, 183, (1959) 1657.
- 12.- Flodin, P.J.: *Chromatog.*, 5, (1961) 103.
- 13.- Laurent, T.C., and Killander, J.: *Chromatog.*,
- 14.- Gelotte, B.J.: *Chromatog.*, 3, (1960) 330.
- 15.- Hummel, J.P., and Dreyer, W.J.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 63, (1962) 530.
- 16.- Lumry, R., and Samuels, L. Tl: *Arch. Biochem. Biophys.*, 76 - (1954) 2808.
- 17.- Levedhal, B.H., and Berstin.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 52, - (1954) 353.
- 18.- Levedhal, B.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 59, (1955) 300.

- 19.- Levedhal, B.H., and Perlmutter, R.: Arch. Biochem. Biophys., 61, (1956) 442.
- 20.- Wishnia, A.: Proc. Natl. Acad.Sci. U.S., 48, (1962) 2200.
- 21.- Wetlaufer, P.B., and Lovrien, R.: J. Biol. Chem., 239, (1964) 596.
- 22.- Alfsen, A.: Comp. Rend. Trav. Lab. Calsberg., 33, (1962)2200.
- 23.- Attalah, N.A., and Lata, F.G.: Biochem. Biophys. Acta., 168, (1968) 321.
- 24.- Jardetzky, O., and Wado Jardetzky, N.G.: Mol. Pharmacol., 1, (1965) 214.
- 25.- Fisher, J.J., and Jardetzky, O.: J. Am. Chem. Soc., 87, (1965) 3237.
- 26.- Duysens, L.M., and Ames, J.: Biochem. Biophys. Acta., 24, - (1957) 19.
- 27.- Lewis, G.H., and Kasha, M.: J.Am. Chem. Soc., 66, (1949) 2100.
- 28.- Underfriend, S.: "Fluorescence Assay in Biology and Medicine", Academic Press, New York., N.Y. (1962).
- 29.- Williams, R.T., and Bridges, J.W.: J. Clin. Path., 17, (1964) 371.
- 30.- Shore, P.A., Burkhalter, and Cohn, V.H.: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 127, (1959) 182.
- 31.- Bogdanski, D.F., Pletscher, A., Brodie, B.B., and Underfriend, S.: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 117, (1956) 82.
- 32.- Hercules, D.M.: "Fluorescence and Phosphorescence Analysis, Principles and Applications", Interscience Publishers, New York., N.Y., (1966)
- 33.- Weber, G.: Biochem. J.: 75, (1960) 335.
- 34.- Weber, G.: Biochem. J., 75, (1960) 345.
- 35.- Shore, V.G., and Pardee, A.B.: Arch. Biochem., 60, (1956) 100.

- 36.- Teale, F.W., and Weber, G.: *Biochem. J.*, 65, (1957) 476.
- 37.- Konev, S.V.: *Doklady Akad Nauk SSSR.*, 116, (1957) 594.
- 38.- Vladimirov, Y.A.: *Doklady Akad Nauk SSSR.*, 116, (1957) 780.
- 39.- Velick, S.F.: *J.Biol. Chem.*, 233, (1958) 1455.
- 40.- Teale, F.W., and Weber, G.: *Biochemical J.*, 72, (1959) 15.
- 41.- Teale, F.W.; *Biochem.J.*, 76, (1960) 381.
- 42.- Boroff, D.A., and Fitzgerald, J.E.: *Nature*, 181, (1960) 751.
- 43.- Boroff, D.A.: *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 15, (1959) 74.
- 44.- Schantz, E.J., Stefanye, D., and Spero, L.J.: *Biol.Chem.*, 235, (1960) 3489.
- 45.- Fasman, G.D., Bodenheimer, E., and Pesce, A.: *J. Biol. Chem.*, 241, (1966) 916.
- 46.- Kronman, M.J., *Biochem. Biophys. Acta.*, 133, (1967) 19.
- 47.- Linkhtenshtein, G.F., Pivovarov, A.P., and Smolina, N.B.: - *Molekulyarnaya Biologiya.*, 2, (1968) 291-302.
- 48.- Yanary, S., and Bovey, F.A.: *J. Biol. Chem.*, 235, (1960) 2818.
- 49.- Leach, S.J., and Scheraga, A.H.: *J. Biol. Chem.*, 235, (1960) 2827.
- 50.- Cowgill, R.W.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 112, (1966) 550.
- 51.- Westphal, U., C.A., Ville, and Engel, L.L.: "Mechanism of action Steroid Hormones", Pergamon Press, New York., N.Y., (1961) pp.33.
- 52.- Westphal, U., and Ashley, B.D.: *J. Biol. Chem.* 234, (1959) 2847.
- 53.- Westphal, U., and Ashley, B.D.: *J. Biol. Chem.*, 237, (1962) 2763.
- 54.- Oyakawa, E.K., and Levedhal, B.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 74, (1958) 17.

- 55.- Abelson, D., Depatie, C., and Craddock, V.: Arch. Biochem. Biophys., 91, (1960) 71.
- 56.- Bedford, J.M.: Sperm transport, capacitation and fertilization. In Reproductive Biology, Balin, H., and Glasser, S., Eds. Excerpta Medica Amsterdam, (1972) p.p. 338.
- 57.- Hataway, R.R., and Chamberlain, R.M.: Biol. of Reprod., 21, (1970) 164-71. --
- 58.- Yanagimachi, R.: J. Reprod. Fert., 18, (1969) 275-286.
- 59.- Chaundry, I.H., and Gould, M.K.: Biochem. Biophys. Acta., 196, (1970) 327-335.
- 60.- Sutherland, E.W. Øye, I., and Butcher, R.W., Recent. Prog. Hormone. Res., 21, (1965) 623.
- 61.- Murad, F., Chi, Y.M., Rall, T.W., and Sutherland, E.W.: J. Biol. Chem., 237, (1962) 2333.
- 62.- Vaidya, R.A., Bedford, J.M., Glass, R.H., and Morris, J.Mcl.: J. Reprod. Fertil., 19, (1969) 483.