

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

20

INVESTIGACION DE UNA PROTEINA PORTADORA
DE T_3 Y T_4 EN PLASMA SEMINAL

317

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARIA GUADALUPE MORENO ARMENTA

México, D. F.

1976



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Tms

1976

Met.

307



QUINUA

Jurado asignado originalmente:

Presidente	Prof. Guadalupe Velez Pratt
Vocal	Prof. Dea Coronado Perdomo
Secretario	Prof. Maria Elena Bustamante calville
1er. Suplente	Prof. Leticia Carrasco
2o. Suplente	Prof. Guillermo Readón

Sitio donde se desarrolló el tema:

Hospital Centro Médico La Raza.

Sustentante:

María Guadalupe Moreno Armenta

Asesor:

Q.F.B. Dea Coronado Perdomo

A MIS PADRES:

ENRIQUE E ISABEL

A MI ESPOSO E HIJO:

ROBERTO Y ROBERTO

A MIS HERMANOS Y

A LA MEMORIA DE

LA SRI TA. CONCEPCION

A MIS MAESTROS

A LA Q.F.B. DE A CORONADO P.

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS

QUE COLABORARON A LA REALI

ZACION DE ESTE TRABAJO.

CONTENIDO

	Pág.
I).- INTRODUCCION	1
II).- GENERALIDADES	3
III).- MATERIAL Y METODOS	13
IV).- RESULTADOS	23
V).- DISCUSION	43
VI).- RESUMEN	47
VII).- CONCLUSIONES	48
VIII).- BIBLIOGRAFIA	49

CAPITULO I INTRODUCCION

Alas proteínas del suero se les atribuye un importante papel en los enlaces, distribución y metabolismo de las hormonas tiroideas: Tiroxina (T_4) y triyodotiro-nina.

El 99% de la tiroxina circulante en los vertebrados está enlazada a las proteínas séricas, se ha encontrado en el suero tiroxina enlazada a alfa-globulina -- (TBG), a prealbúmina y a albúmina, sin embargo la concentración de TBG es la que determina la cantidad de T_4 -- libre disponible para los tejidos. La hormona triyodoti ronina (T_3), se ha visto que es menos exigente en lo referente a su portador pero también es transportada por las proteínas antes mencionadas.

Se han realizado diferentes tipos de estudios enca minados todos ellos a conocer la composición del plasma seminal desde el punto de vista bioquímico. Pero en -- cuanto a composición de las hormonas de la tiroides es muy poco lo que se ha estudiado (por lo que, se tratará de exponer los trabajos realizados por investigadores < sobre plasma seminal en el siguiente capítulo).

La presencia de la hormona tiroidea en el plasma - seminal humano ha sido relacionada con la regulación de funciones metabólicas del espermatozoide, que permite - su adecuada funcionalidad.

Debido a estas investigaciones se dió origen a este trabajo, en el cual se buscará una proteína fijadora y transportadora de las hormonas tiroideas: tiroxina y triyodotironina en plasma seminal humano y con ello ayudar a resolver los problemas de fertilidad, ya que se ha visto una relación directa entre pacientes hipotiroides y la infertilidad de los mismos.

CAPITULO II
GENERALIDADES

En 1961, Raboch realizó estudios de electroforé--
sis en papel del plasma seminal y, reportó seis protea---
teínas las cuales marcó como P1-P6 de acuerdo a su movi
lidad en dirección al ánodo. Fueron comparadas sus pro-
piedades electroforéticas con suero sanguíneo llegando-
a los resultados siguientes: La fracción P2 presentó no
vilidad de gama globulina, P3 de beta globulina, P4 de
alfa 2 globulina, P5 de alfa 1 globulina y P6 con movi-
lidad aproximada de albúmina. Reportó además de donde -
son secretadas estas proteínas así, P5 por la glándula-
prostática; P4 por la vesícula seminal y P1, P2, P3 y -
P6 son formadas por vesícula y próstata.

En 1968, Sidney Shulman y Paul Bronson, realizaron
experimentos en plasma seminal, usando la técnica de --
electroforé^sis en papel filtro a pH 8.6, pero los resul
tados no fueron los deseados y se pensó que la dificul-
tad se encontraba en los cambios que ocurrían en la dis
tribución de las proteínas de las muestras durante el -
almacenamiento, a bajas temperaturas. Por lo que las --
muestras obtenidas de donadores sanos, fueron inmediata
mente centrifugadas, el sobrenadante fué dividido en --
pequeñas porciones. Un grupo de muestras fué congelado-
y el otro fué guardado en el refrigerador a 4°C. A in--
tervalos de dos días las muestras fueron examinadas ---

electroforéticamente, usando como referencia suero sanguíneo humano y reportaron un total de 9 componentes en plasma seminal fresco, que está de acuerdo a su relativa movilidad a este pH.

En octubre de 1970, K.A. Lennert, H.M. Schröder y W. Monderf realizaron un trabajo sobre líquido prostático y, examinaron a un grupo de hombres con edades de -- 23-64 años, que tenían afecciones no prostáticas. La -- anamnesis de estos pacientes revelaba sensaciones molestas no características en la región perineal, derrame o ligero escozor uretral; algunos habían sufrido gonorrea.

El líquido se investigó cualitativamente por inmunoelectroforé^{sis} con un antisuero humano y cuantitativamente por inmunodifusión radial, usando como patrón suero humano estabilizado.

Por inmunoelectroforé^{sis} las siete fracciones encontradas con más frecuencia fueron: albúmina, inmunoglobulina A y M y ceruloplasmina. En algunos casos se revelaron indicios de haptoglobulina, de alfa 2 macroglobulina y lipoproteína. La determinación cuantitativa exacta de inmunoglobulina G en el líquido prostático, -- fué el resultado más interesante en la investigación de los autores, quienes encontraron esta proteína más elevada en las afecciones subagudas y crónicas que en las agudas.

En 1972, E. Villanueva Cañadas realizó estudios -- sobre la bioquímica del plasma seminal, para identifi--

car manchas de esperma y por ello se han requerido infinidad de métodos para su identificación:

- 1.- Pruebas químicas: Las cuales están basadas en el -- comportamiento del semen frente a diferentes reactivos químicos.
- 2.- Pruebas microquímicas: Se basan en la formación de cristales de espermina y/o colina o ambas.
- 3.- Pruebas histoquímicas y enzimáticas: En estas pruebas se propone el empleo de la actividad fosfatásica del semen como prueba para la identificación de las manchas del semen.
- 4.- Pruebas físicas: basadas en la fluorescencia del -- esperma cuando se ilumina con la luz de Wood.
- 5.- Pruebas cromatográficas: Se basan en el corrimiento de los aminoácidos y aminas existentes en el semen- (esta técnica fué la que empleó Villamueva).

Los resultados fueron que la composición del plasma seminal en aminoácidos y aminas no es constante, tanto en el aspecto cuantitativo como el cualitativo, teniendo la próstata un comportamiento idéntico al plasma seminal, pudiéndose superponer los mapas bidimensionales en los dos. Esto permitió suponer que los aminoácidos y -- aminas que se encontraban en el plasma seminal tenían su procedencia en la glándula prostática. La misión de estos aminoácidos en el plasma seminal no está del todo clara, pero Abraham y Bhargava confirmaron en 1963 que los espermatozoides eran capaces de incorporar aminoáci

dos libres y, que contenían un RNA mensajero capaz de - llevar a cabo la síntesis proteica.

Se realizó también la investigación de compuestos- Dragendoff positivos en el plasma seminal, estos com--- puestos son los que poseen en su molécula un nitrógeno- cuaternario. Encontrándose cuatro compuestos Dragendoff positivos por los métodos empleados, identificando a -- dos como colina libre y espermina y los otros posible--- mente sean precursores de la colina.

El plasma seminal humano posee una serie de com--- puestos bioquímicos que le hacen ser una secreción par- ticular; no solo por contener unos compuestos privati-- vos de él, como la espermina, espermidina y colina, si- no también por presentar compuestos como son los amino- ácidos que aparecen libres en el plasma seminal en con- centraciones superiores a la de otros fluidos orgánicos.

La cromatografía simple en las condiciones usadas- a pH 3.9 no permitió separar una mezcla compleja de ami- noácidos y aminas tal como se encuentran en el plasma - seminal, por este motivo los resultados que se obtuvie- ron no fueron satisfactorios. Sin embargo la cromatogra- fía bidimensional sí separa una mezcla compleja de ami- noácidos y aminas.

En 1973, U. Lavon, P.A. Briggs y J.C. Bournnell -- realizaron estudios encaminados a investigar patrones - de proteínas empleando los métodos de electroforésis de

gel en disco y enfoque isoeléctrico en poliacrilamida.- Esto fué hecho en las fracciones obtenidas por filtración en gel y diálisis del plasma seminal, secreción vesicular y plasma epididimal. Estas secreciones fueron obtenidas respectivamente de: vesículas, eyaculaciones y epidídimos recién extraídos de jabalí. Los fluidos -- fueron separados de los espermatozoides por centrifugación a 10,000 g por 20 minutos a temperatura ambiente y los sobrenadantes fueron guardados a -20°C .

Muestras de plasma seminal y secreciones vesiculares fueron dializados, separando el precipitado del sobrenadante por centrifugación. La separación de las proteínas se realizó en columnas de Sephadex G-200 pH 4.0- $I=0.3$ y con buffer pH 7.0.

El plasma seminal y la secreción vesicular mostró distribución casi idéntica de patrones de proteínas séricas, encontrándose que el plasma seminal de jabalí, - tiene una gran complejidad en sus proteínas A, B y H, - las cuales son un incontable número de proteínas.

En mayo de 1974, fué publicado por L.M. Lewin y R. Beer un trabajo para la separación de proteínas en acetato de celulosa; obteniendo las muestras por masturbación después de cuatro días de abstinencia sexual. La - colección de la eyaculación fué en dos fracciones I y II analizándose su contenido en fructuosa, fosfatasa ácida inositol y pH. El electrodotograma en acetato de celulosa de plasma seminal normal mostró 8 bandas, encontrán-

dose unas con mayor intensidad denominadas PA y PB, las cuales también son intensas en fluido prostático. Como componentes de la banda PB se encontraron espermina y espermidina, las cuales son secretadas por la próstata. Apareció una banda V que es vesicular.

En experimentos anteriores se usó el método de electroforésis en papel de Raboch para el estudio de fluido seminal, dichos estudios dieron una demostración práctica de las bandas de proteínas originadas en secreciones prostáticas y vesiculares, Ya que Raboch separó las proteínas del fluido seminal en 6 bandas (nombradas P1-P6) y por comparaciones entre plasma seminal normal y pacientes que presentaban azoospermia obstructiva u oligospermia, se concluyó que ambas secreciones vesicular y prostática contribuían a las bandas P1, P2, P3 y P6, pero la P4 correspondía a la zona nombrada V, la cual contuvo 2 a 3 bandas. La banda P5 de Raboch probablemente corresponde a la banda PA. Todo lo anterior nos ayuda a ver el mal funcionamiento de las glándulas vesicular y prostática.

En 1975, Tauber y Col., trabajaron con plasma seminal fraccionado, las muestras fueron obtenidas de donadores de 22-34 años de edad por masturbación repartida en tres frascos denominados fracción I, II y III y fueron centrifugadas para la determinación de fructosa. La IgG, IgA, piezas secretorias de IgA, albúmina, transferrina y lactoferrina fueron investigadas por inmunodi

fusión radial (técnica de Mancini).

Lo primero que identificaron en plasma seminal humano fué la lactoferrina que es un enlace proteína-fierro con propiedades bacteriostáticas, se identificó en plasma seminal humano por Masson y Col. en (1966), es importante aclarar que no se encuentra en suero. En pacientes con aplasia congénita en el vaso deferencial y en la vesícula seminal no se encontró fructuosa ni lactoferrina en su semen, esto indicó que la lactoferrina era secretada por glándulas vesiculares y que actuaba como antígeno de superficie del espermatozoide.

Quinlivan en 1968 encontró a la transferrina (enlace proteína-fierro) en suero; este enlace puede tener funciones similares a las de la lactoferrina en el tracto reproductivo y protección frente a infecciones bacterianas.

Se encontró IgG, pero su presencia es extremadamente dudosa.

Una B₁C/B₁A-globulina (componente C'3 del complemento) fué encontrada en plasma seminal por Heremans. Basados en estos hallazgos, se intentó explicar la ocurrencia ocasional de fenómenos inmunológicos en fluido seminal lo cual puede ser la causa de sub o infertilidad.

La concentración de IgG y IgA en plasma seminal fué más baja que en el suero (cerca de la mitad); esto sugiere que la presencia de inmunoglobulinas en el se-

men es debido a una transudación del suero, que por una producción local.

Las inmunoglobulinas son probablemente una parte del sistema anticuerpo del plasma seminal y puede ser parcialmente responsable de la aglutinación ocasional de espermatozoides en muestras de semen.

La función de la albúmina es proteger la movilidad del espermatozoide y la de lactoferrina y transferrina puede ser que están involucradas en los mecanismos de defensa de microorganismos.

Las grandes cantidades de IgG, IgA, albúmina y en particular transferrina en la porción inicial de la eyaculación comparadas con la porción final, sugiere que ellas pueden estar involucradas en los procesos de licuefacción del coágulo humano.

Se ha probado la existencia de las hormonas tiroideas en el plasma seminal y se les atribuyen funciones relacionadas con la fertilidad. La función de estas hormonas enlazadas a proteínas en el suero sanguíneo no está bien definida, pero se conoce el hecho de que éstas se encuentran alteradas en los casos de hipotiroidismo.

Lo anterior nos revela el hecho de que una alteración de las hormonas en suero sanguíneo tiene como consecuencia hipotiroidismo y que por otro lado otra alteración de las mismas en plasma seminal produce también hipotiroidismo el cual tiene repercusiones en el apar-

to reproductivo, como es la infertilidad.

En suero sanguíneo las proteínas encargadas de enlaces, distribución y metabolismo de las hormonas tiroideas son: albúmina, alfa globulina y prealbúmina, en el plasma seminal no se conoce aún a sus portadores, este trabajo tiene este fin, encontrar la proteína transportadora de las hormonas en plasma seminal. Sin embargo, recientes reportes (Kenneth Sterling y Peter Milch 1975) sobre los enlaces de T_3 y T_4 con proteínas celulares, nos revelan la existencia de una proteína en la fracción de la membrana mitocondrial enlazada a T_3 y T_4 . Lo anterior nos indica que hay otras proteínas que pueden -- estar enlazadas a T_3 y T_4 diferentes de las tradicionales antes mencionadas (albúmina, alfa-globulina y prealbúmina).

Reportes realizados por J.J. Hicks y Col. nos revelan la existencia de hormonas tiroideas en el semen humano; desde 1932 ya había cierta noción de ellas ya que Carter en ese año demostró que las hormonas tiroideas -- prolongaban la vida del espermatozoide de mamífero, aun que no se probara totalmente su existencia.

J.J. Hicks y Col. (1975) investigaron la relación-hormonas tiroideas-espermatozoides y la cuantificación de las mismas relacionandolas con los valores de suero-sanguíneo. Observó que el suero sanguíneo tiene cuatro veces más T_3 que el semen (94.28 ± 8.3 ng% a $24.57 \pm$ --

± 4.8 ng %) y 24 veces más T_4 (10.85 ± 0.63 ng % a 0.44 ± 0.05 ng %).

La activación In Vitro de la adenil ciclasa del esperma de mono por T_3 y T_4 (Casillas 1970) induciendo a un aumento en las concentraciones intracelulares de AMP cíclico, molécula moduladora de algunos de los cambios presentes en la capacitación del espermatozoide de mamífero (Hicks y col. 1972-73), permite sugerir una secuencia de acontecimientos (hormonas tiroideas-receptor adenil ciclasa-AMP cíclico-capacitación) siendo éste el objetivo seguido por Villalpando y Col., para estudiar algunas características de fijación de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) a la membrana del espermatozoide humano.

Se obtuvieron muestras de semen humano, las cuales fueron centrifugadas ($10,000$ g x $10'$ a 4°C) eliminándose el plasma seminal, los espermatozoides fueron resuspendidos en un amortiguador (KH_2PO_4 pH 7.4 0.065 M), se lavaron dos veces y finalmente fueron resuspendidos a una concentración de 140×10^5 espermatozoides por ml. Se incubaron con Triyodotironina I^{125} o en Tiroxina marcada con I^{125} en un baño con agitación constante. Tomándose alícuotas ($100 \mu\text{l}$ a los $0'$, $10'$, $15'$, $45'$ y $60'$) las cuales fueron centrifugadas para determinar radioactividad en el espermatozoide (precipitado) o en el sobrenadante, el óptimo de fijación fué a los 15 minutos para ambas hormonas.

CAPITULO III
MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

1.- Plasma seminal.- Las muestras de semen se obtuvieron de donadores sanos, del Departamento de Hormonas del Centro Médico Nacional, cuyas edades comprendían de 20-50 años, fueron recolectadas en las condiciones de asepsia necesarias para el caso y comprobándose a los pacientes la fertilidad, satisfactoria.

El semen fué inmediatamente centrifugado (10,000 g x 10' a 4°C) para separar las células del líquido seminal, éste último fué congelado para su posterior utilización.

En las 25 muestras de semen obtenidas se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

- a) Electroforésis en gel de poliacrilamida.
- b) Cuantificación de T₄.

2.- Suero sanguíneo.- Suero sanguíneo patrón estabilizado el cual se usó como control. Se le realizaron las mismas pruebas que al plasma seminal.

Material Químico

- a) Triyodotironina marcada con iodo radioactivo I¹²⁵

- b) Piroxina marcada con Iodo radioactivo I¹²⁵
- c) Acrilamida 40g
- d) Bisacrilamida 1.6g
- e) Persulfato de Amonio 0.480g
- f) Tris (Hidroximetil aminometano) 40.04g
- g) Riboflavina 2 mg
- h) Acido clorhídrico 1N 84ml
- i) Temed (Tetrametiletildiamina) 0.34ml
- j) Acido Fosfórico 1M 12.8 ml
- k) Glicina 3.48g
- l) Sacarosa 3.0g

Soluciones:

- A.- Disolver 30 g de Acrilamida y 0.8 g de Bisacrilamida en agua destilada. Aforar a 100 ml.
- B.- Disolver 18.15 g de Tris y 0.24 ml de Temed en 24 ml de HCl 1N. Llevar a un volumen de 100 ml con agua destilada.
- C.- Disolver 0.4g de persulfato de amonio en 100 ml de agua destilada.
- D.- Disolver 10g de Acrilamida y 0.8g de Bisacrilamida en agua destilada. Aforar a 100 ml.
- E.- Disolver 2.23g de Tris y 0.1 ml de Temed en 12.8ml de H₃PO₄ 1 M. Aforar a 100 ml con agua destilada. - pH 6.86.
- F.- Disolver 2 mg de Riboflavina en 100 ml de agua destilada.
- G.- Disolver 80 mg de Persulfato de Amonio, llevar a un

volúmen de 100 ml con agua destilada.

- H.- Disolver 5.16g de Tris y 3.48g de Glicina en 1000ml de agua destilada. pH 9.64.
- I.- Disolver 14.5 g de Tris en 60 ml de HCl 1N aforar a 1000 ml con agua destilada, pH 8.84.
- J.- Solución de ácido acético al 7%
- K.- Solución de Azul de Bromofenol
- L.- Solución de Negro de Anido al 2%.

Aparatos

- 1.- Cámara de electroforésis para tubo
- 2.- Gradilla para tubos de electroforésis
- 3.- Espectrómetro Packard modelo 578 autogama por cintilación.
- 4.- Fuente de Poder Beckman Doustat de 110 volts

Material de vidrio

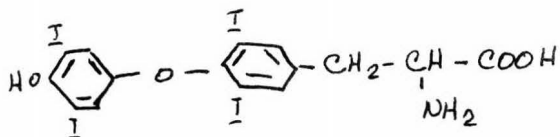
- 1.- 12 tubos de 5 mm de diámetro por 7 cm de largo
- 2.- 12 tapones para los tubos
- 3.- Pipetas semiautomáticas
- 4.- Pipetas Pasteur
- 5.- Pipetas de 5 ó 10 ml
- 6.- Matraces Erlenmeyer
- 7.- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm
- 8.- Jeringa de 10 ml con aguja del No. 23

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Este método permite la cuantificación de enlaces de proteínas esteroides y la determinación de sus enlaces.

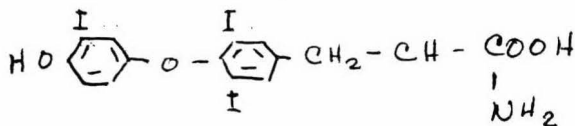
El gel de acrilamida facilita demostrar y cuantificar enlaces de hormonas esteroides radioactivas en suero como: enlaces testosterona-globulina, corticosteroides-globulina, albúmina, enlaces andrógenos testiculares con proteínas.

La estabilidad de la electroforesis puede ser usada para estudiar enlaces de cualquier molécula no cargada, como se presenta en este trabajo, en el cual se trata de la tiroxina y triyodotironina (enlazadas a proteínas), cuyas estructuras nos permiten analizarlas desde el punto de vista anterior:



TIROXINA

(3, 5, 3', 5' tetrayodotironina)



3, 5, 3' triyodotironina

- 6.- Una vez que gelifiquen quitarles los tapones a los tubos y colocarlos en la cámara de electroforésis.

Corrimiento electroforético de las muestras

- 1.- Colocar la solución H en la parte superior de la -- cámara y la solución I en la parte inferior de la -- misma.
- 2.- Agregar a cada muestra lo siguiente:
0.250g de sacarosa, solución de azul de bromofenol- (1 gota) y $10\mu\text{l}$ de material radiactivo T_3I^{125} o T_4I^{125} según sea el caso.
- 3.- Colocar cuidadosamente sobre el gel blando $20\mu\text{l}$ de la muestra preparada.
- 4.- Conectar la cámara a la fuente de poder (110 volts), ajustar el amperaje, por cada gel aplicar 1.5 mA al comenzar el corrimiento, al llegar la muestra al -- gel bajo, duplicar el amperaje. Dejar durante 3 --- horas e hasta que el colorante de arrastre (azul de bromofenol) llegue a 0.5 cm del final del gel.

Análisis de los geles

- 1.- Al concluir la electroforésis sacar los geles de -- los tubos con la ayuda de una jeringa llena de agua a la cual se le adapta una aguja y ésta se mete --- entre el gel y la pared del tubo haciendolo girar - para que se despegue.
- 2.- Procesar los geles de manera diferente: revelar ---

unos con colorante negro de amido al 2% y lavar el exceso con solución de ácido acético al 7%, cambiando periódicamente la solución y, en otros efectuar cortes de 0.5 cm, cada uno se coloca en un tubo de ensaye que se lleva al espectrómetro de rayos gama.

Precauciones importantes de la técnica

- 1.- Cuidar de que la T_3I^{125} o T_4I^{125} al agregarlos a la muestra no vaya a resbalar por las paredes del tubo sino que caigan al fondo.
- 2.- Usar guantes al sacar los geles de los tubos al --- igual que al cortarlos.
- 3.- Al colocar los cortes de gel en cada tubo hay que quitarse los guantes y lavarse las manos, luego con la ayuda de una aguja depositar el corte de gel en el tubo, cuidando de que este no toque las paredes exteriores del mismo, ya que puede dañarse el aparato por la contaminación radioactiva externa.

CUANTIFICACION DE T_4

Todas las hormonas del suero deben ser extraídas con excepción de la T_4 antes del analisis para evitar falsos resultados positivos. Las proteínas endógenas -- que durante el análisis puedan presentar enlaces con la T_4 deben ser removidas o inactivadas. Para la -----

inactivación de los enlaces de las proteínas con T_4 son suficientes 200 μ l del reactivo ácido y las proteínas remanentes inactivadas en la mezcla de reacción, no son capaces ya del enlace con T_4 .

La medición de T_4I^{125} nos refleja la cantidad de T_4 del suero ya que se forma un complejo antígeno-anticuerpo, con la adición de anti T_4 .

El enlace anticuerpo T_4 es separado por precipitación con solución de sulfato de amonio. Posteriormente y la fracción libre de T_4 presente en el líquido sobrenadante se descarta por decantación.

La fracción del enlace anticuerpo es contada por cintilación en el espectrómetro de rayos gama.

Materiales usados

Componentes en TETRA-TAB-RIA

- 1.- Extractante conteniendo HCl 0.025N
- 2.- Reactivo T_4I^{125}
- 3.- Antisuero T_4
- 4.- Precipitante (sulfato de amonio conteniendo suero-- animal)
- 5.- Diluyente T_4 RIA
- 6.- Suero estándar de 1 μ g T_4 /dl; 6 μ g T_4 /dl; 12 μ g T_4 /dl
18 μ g T_4 /dl
- 7.- Pipetas semiautomáticas de 10 μ l, 20 μ l
- 8.- Pipetas volumétricas de 2.0 ml

9.- Centrifuga

10. Espectrómetro por cintilleo de rayos gama

Técnica

- 1.- Colocar $200\mu\text{l}$ del extractante en todos los tubos a utilizar.
- 2.- Añadir $10\mu\text{l}$ de los estándares o muestras.
- 3.- Mezclar vigorosamente de 10-15 segundos.
- 4.- Dejar reposar 2 horas y añadir $400\mu\text{l}$ del reactivo- T_4I^{125} , agitar vigorosamente.
- 5.- Reposar 2 horas y añadir $400\mu\text{l}$ del antisuero T_4 . - agitar vigorosamente.
- 6.- Incubar a temperatura ambiente de 30-60 minutos.
- 7.- Al final del periodo de incubación, añadir 2.0 ml - de precipitante.
- 8.- Tapar y mezclar el contenido por inversión suave 10 veces.
- 9.- Reposar 20 minutos. Centrifugar 10 minutos a 2000--2500 rpm.
10. Decantar, dejando volteados los tubos durante 15 segundos en material absorbente.
11. Contar el sedimento por cintilleo.

Precauciones

- 1.- No pipetear con la boca,
- 2.- No se debe comer ni fumar mientras se trabaja con -

- 3.- Usar guantes al trabajar con material radioactivo -
y lavarse las manos al terminar.
- 4.- Colocar el material usado en lugar especial destina
do a material radioactivo sucio.

CAPITULO IV

RESULTADOS

En el presente trabajo, numerando las proteínas — del cátodo al ánodo se encontró que en la región de la gama globulina, están dos bandas 1 y 2, la 3 en la región de la beta globulina, la 4 en la región de alfa 2-globulina, la 5 en la alfa 1 globulina y la 6 en la región de la albúmina, se encontraron las 6 proteínas reportadas por Raboch (1961) y aparte las 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, las cuales se encuentran hacia el ánodo. — (fotografía 1 y figura C).

En este trabajo las pruebas se realizaron en gel — de poliacrilamida usando plasma seminal humano, a falta de otro material de comparación se ha tomado como patrón el de plasma seminal de jabalí (Lavon 1971) fig. A, en el cual se encontró similitud en cuanto a composición de bandas, con lo anterior no se pretende demostrar que sean las mismas sino simplemente una aproximación de posiciones de ellas. Con nuestro método se encontró además las bandas 10, 13 y 14 que no se encuentran en plasma seminal de jabalí.

Una vez analizadas las bandas se pasará a lo que nos interesa en este trabajo, lo cual es la investigación de una proteína fijadora y transportadora de T_3 y T_4 en plasma seminal.

Como ya fué explicado en el capítulo anterior, ---

los geles son cortados y analizada su radioactividad en el contador de rayos gama y, la más alta radioactividad nos revela el sitio en que se encuentra la T_3 o T_4 marcadas, unidas a una proteína la cual aparentemente debe ser su portadora.

Así, los resultados demuestran en suero sanguíneo que la más alta radioactividad se encuentra alrededor de la región de la albúmina y/o alfa globulina. Comparando la fotografía 2 con los resultados que a continuación se expresan se vé el sitio de la mayor radioactividad. (figura D)

RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DE SUERO SANGUINEO CON-
 T_3I^{125} BADOS POR EL ESPECTROMETRO DE RAYOS GAMA.

TABLA I:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	981
1.0	5.00	1173
1.5	5.00	1070
2.0	5.00	4247
2.5	5.00	2698
3.0	5.00	1026
3.5	5.00	1268
4.0	5.00	792
4.5	5.00	467
5.0	5.00	325
5.5	5.00	628

TABLA 2:

Corte cm.	Tiempo Min.	N. de Cuentas
0.5	5.00	528
1.0	5.00	885
1.5	5.00	3390
2.0	5.00	3103
2.5	5.00	1915
3.0	5.00	1442
3.5	5.00	1538
4.0	5.00	1152
4.5	5.00	921
5.0	5.00	449

TABLA 3:

corde cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	1894
1.0	5.00	2424
1.5	5.00	5336
2.0	5.00	2197
2.5	5.00	1126
3.0	5.00	1065
3.5	5.00	620
4.0	5.00	416
4.5	5.00	1076
5.0	5.00	5

TABLA 4:

corde cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	1700
1.0	5.00	2003
1.5	5.00	6082
2.0	5.00	2592
2.5	5.00	1264
3.0	5.00	1238
3.5	5.00	810
4.0	5.00	493
4.5	5.00	300
5.0	5.00	1101
5.5	5.00	21

RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DE SUERO SANGUINEO CON-

T_4I^{125} DADOS POR EL ESPECTROMETRO DE RAYOS GAMA.

TABLA 1:

Corte cm.	Tiempo min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	1206
1.0	5.00	1292
1.5	5.00	1836
2.0	5.00	5184
• 2.5	5.00	974
3.0	5.00	924
3.5	5.00	406
4.0	5.00	294
4.5	5.00	399
5.0	5.00	668
5.5	5.00	372

TABLA 2:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	202
1.0	5.00	2258
1.5	5.00	21873
2.0	5.00	20251
2.5	5.00	18816
3.0	5.00	15450
3.5	5.00	15650
4.0	5.00	314
4.5	5.00	-
5.0	5.00	197

TABLA 3:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	-
1.0	5.00	35
1.5	5.00	320
2.0	5.00	184
2.5	5.00	96
3.0	5.00	21
3.5	5.00	-
4.0	5.00	15
4.5	5.00	185
5.0	5.00	14
5.5	5.00	27

TABLA 4:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	400
1.0	5.00	627
1.5	5.00	19479
2.0	5.00	77045
2.5	5.00	26813
3.0	5.00	31469
3.5	5.00	41585
4.0	5.00	25795
4.5	5.00	729
5.0	5.00	218
5.5	5.00	233

RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DE PLASMA SEMINAL HUMANO CON T_3I^{125} DADOS POR EL ESPECTROMETRO DE RAYOS GAMA.

TABLA 1:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	3150
1.0	5.00	1456
1.5	5.00	3447
2.0	5.00	4811
2.5	5.00	4480
3.0	5.00	3921
3.5	5.00	4061
4.0	5.00	18910
4.5	5.00	196029
5.0	5.00	3014

TABLA 2:

corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	63
1.0	5.00	84
1.5	5.00	78
2.0	5.00	111
2.5	5.00	66
3.0	5.00	64
3.5	5.00	17
4.0	5.00	837
4.5	5.00	68
5.0	5.00	481

TABLA 3:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	832
1.0	5.00	947
1.5	5.00	1083
2.0	5.00	1028
2.5	5.00	839
3.0	5.00	927
3.5	5.00	1004
4.0	5.00	905
4.5	5.00	1257
5.0	5.00	2819
5.5	5.00	45

TABLA 4:

Corte Cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	158
1.0	5.00	1550
1.5	5.00	2314
2.0	5.00	1451
2.5	5.00	1325
3.0	5.00	1559
3.5	5.00	1387
4.0	5.00	1842
4.5	5.00	2014
5.0	5.00	509
5.5	5.00	55

TABLA 5:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	755
1.0	5.00	624
1.5	5.00	670
2.0	5.00	972
2.5	5.00	1142
3.0	5.00	725
3.5	5.00	979
4.0	5.00	57386
4.5	5.00	71589
5.0	5.00	593

TABLA 6:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	5933
1.0	5.00	4146
1.5	5.00	4684
2.0	5.00	3882
2.5	5.00	5692
3.0	5.00	3742
3.5	5.00	4671
4.0	5.00	54040
4.5	5.00	115375
5.0	5.00	3736
5.5	5.00	4559

RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DE PLASMA SEMINAL CON--

T₄I¹²⁵ DADOS POR EL ESPECTROMETRO DE RAYOS GAMA.

TABLA 1:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	271
1.0	5.00	3125
1.5	5.00	1293
2.0	5.00	883
2.5	5.00	765
3.0	5.00	965
3.5	5.00	4036
4.0	5.00	3975
4.5	5.00	679
5.0	5.00	905

TABLA 2:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	1733
1.0	5.00	1375
1.5	5.00	1810
2.0	5.00	2119
2.5	5.00	1711
3.0	5.00	1466
3.5	5.00	1662
4.0	5.00	2208
4.5	5.00	4894
5.0	5.00	736
5.5	5.00	4

TABLA 3:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de cuentas
0.5	5.00	187
1.0	5.00	127
1.5	5.00	156
2.0	5.00	305
2.5	5.00	236
3.0	5.00	357
3.5	5.00	111
4.0	5.00	96
4.5	5.00	1626
5.0	5.00	465
5.5	5.00	70

TABLA 4:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	1076
1.0	5.00	1169
1.5	5.00	1584
2.0	5.00	1385
2.5	5.00	1294
3.0	5.00	1073
3.5	5.00	932
4.0	5.00	1188
4.5	5.00	2961
5.0	5.00	773
5.5	5.00	21

TABLA 5:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	138
1.0	5.00	233
1.5	5.00	228
2.0	5.00	131
2.5	5.00	137
3.0	5.00	3085
3.5	5.00	2520
4.0	5.00	79
4.5	5.00	108
5.0	5.00	102

TABLA 6:

Corte cm.	Tie mpo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	7
1.0	5.00	123
1.5	5.00	114
2.0	5.00	77
2.5	5.00	55
3.0	5.00	103
3.5	5.00	1674
4.0	5.00	2107
4.5	5.00	-
5.0	5.00	49

RESULTADOS DE ELECTROFORESIS DE T_3I^{125}

TABLA 1:

Corte cm.	Tiempo Min.	No, de cuentas
0.5	5.00	1853
1.0	5.00	1752
1.5	5.00	1401
2.0	5.00	7745
2.5	5.00	4134
3.0	5.00	50611
3.5	5.00	398543
4.0	5.00	1836
4.5	5.00	18513

TABLA 2:

Corte cm..	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	1715
1.0	5.00	655
1.5	5.00	567
2.0	5.00	2794
2.5	5.00	2422
3.0	5.00	1243
3.5	5.00	22757
4.0	5.00	301354
4.5	5.00	789
5.0	5.00	4213

TABLA 3:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	41
1.0	5.00	46
1.5	5.00	2490
2.0	5.00	278
2.5	5.00	73
3.0	5.00	68
3.5	5.00	48
4.0	5.00	88
4.5	5.00	102
5.0	5.00	1392
5.5	5.00	228

RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS CON T_4I^{125} DADOS POR --
 EL ESPECTROMETRO DE RAYOS GAMA.

TABLA 1:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	284
1.0	5.00	174
1.5	5.00	146
2.0	5.00	129
2.5	5.00	191
3.0	5.00	251
3.5	5.00	2591
4.0	5.00	-
4.5	5.00	-
5.0	5.00	-
5.5	5.00	-

TABLA 2:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	329
1.0	5.00	209
1.5	5.00	204
2.0	5.00	279
2.5	5.00	403
3.0	5.00	3864
3.5	5.00	59
4.0	5.00	-
4.5	5.00	76
5.0	5.00	-

TABLA 3:

Corte cm.	Tiempo Min.	No. de Cuentas
0.5	5.00	112
1.0	5.00	126
1.5	5.00	40
2.0	5.00	111
2.5	5.00	108
3.0	5.00	197
3.5	5.00	2463
4.0	5.00	1708
4.5	5.00	84
5.0	5.00	480

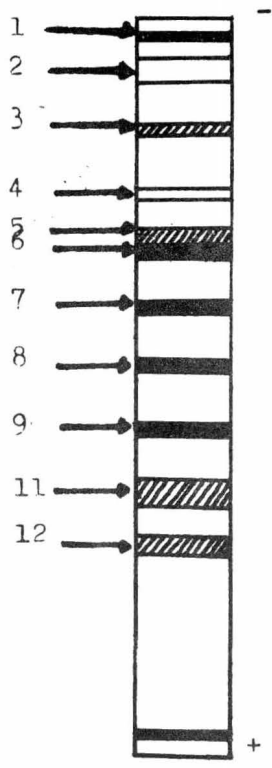


Fig. A. Separación de proteínas por electroforesis en disco de gel pH 4.5 en plasma seminal de Jabalí.

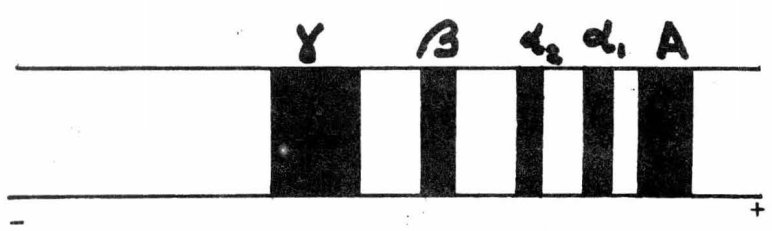
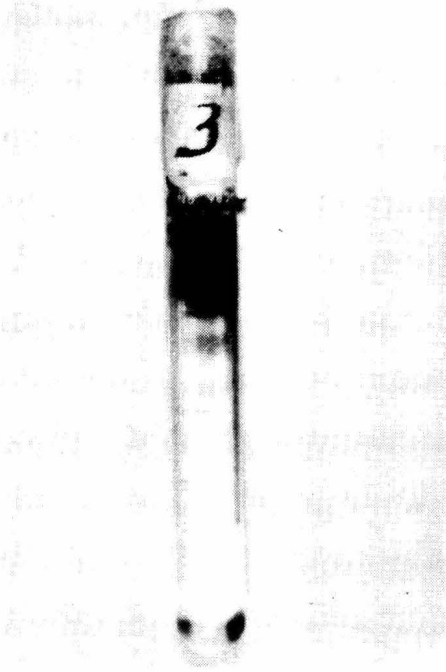


Fig. B. Diagrama de la distribución de las proteínas de suero sanguíneo normal.



Fotografía 1: electroforésis en gel de poliacrilamida a pH 7,02 en suero sanguíneo humano con 10^{-3} M de Ca^{2+} . Se observan 11 bandas (tinción con negro de amido).



Fotografía 2: electroforésis en gel de poliacrilamida a pH 7,02 en suero sanguíneo humano. Se observan 8 bandas. (tinción con negro de amido).

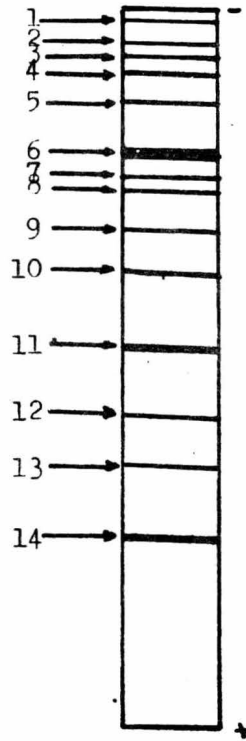


Figura C: Esquema de la fotografía 1, electroforésis de plasma seminal humano se observan 14 bandas.

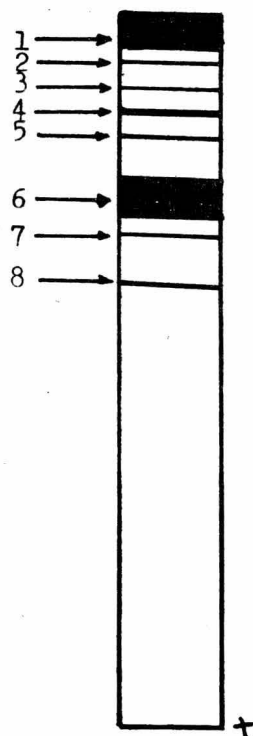


Figura D: Esquema de la fotografía 2. Electroforésis de suero sanguíneo humano. Se observan 8 bandas.

Los resultados del suero sanguíneo mostraron una elevación de cuentas en el sitio aproximado de la albúmina y/o alfa 1 globulina, las cuales se sabe que sí son portadoras de T_3 y T_4 aunque después de esto se aprecia también otra ligera elevación de cuentas, esto quizá se deba a la prealbúmina.

En cambio los resultados obtenidos en plasma seminal revelaron que aparte de la elevación en cuentas en la región de la albúmina y/o alfa 1 globulina, se ven cuentas mucho más altas hacia el final del gel o sea al lado del ánodo que viene correspondiendo a cualquiera de las bandas nombradas 12, 13 y 14.

El gran descontrol encontrado en este trabajo se observó al obtener los resultados de T_3 y T_4 solos y separados en gel, ya que como se observan los resultados, donde se ven cuentas altas en los mismos sitios que en suero y plasma seminal. Aunque son más reproducibles los de plasma seminal.

CAPITULO V

DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo sobre la investigación de una proteína portadora y transportadora de T_3 y T_4 , encontramos que comparativamente a Lavon (1971), quién realizó estudios en plasma seminal de jabalí, encontré 11 bandas (fig. A), nosotros encontramos 14 bandas de diferentes proteínas, enumerándolas del cátodo al ánodo encontramos que en la región hacia el final del ánodo (proteínas 12, 13 y 14) se aprecia la radioactividad más alta y podemos decir que es la proteína que transporta T_3 y T_4 la cual, comparativamente con los resultados obtenidos en suero sanguíneo humano, sí difiere la región de enlace proteico de estas proteínas, puesto que, en él encontramos en la región comprendida entre alfa-globulina y prealbúmina el enlace de proteínas con T_3 y T_4 .

Como controles para rectificar o ratificar lo anterior se efectuaron las siguientes pruebas:

- 1.- Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida usando solamente T_3I^{125} y T_4I^{125} , lo cual nos reportó el resultado de una banda o sea que T_3I^{125} y T_4I^{125} se revelaron con el negro de amido. (fotografías 3 y 4)
- 2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con plasma seminal humano, sin la adición de T_3I^{125} y T_4I^{125} .

De esto obtenemos las 14 bandas indicadas anteriormente. (fotografía 5)

3.- Cuantificación de T_4 , la cual nos dá valores más bajos que 1 ng%, lo cual se considera despreciable como para que nos dé una banda.

Por las pruebas mencionadas anteriormente llegamos a lo siguiente:

Que en el plasma seminal aparecen 14 bandas que corresponden a 14 proteínas, lo cual descarta el que una de ellas sea T_3 o T_4 y que éstas debido al pH del soporte lograron migrar, lo cual está revelado por la mayor radioactividad encontrada, fuera de los puntos esperados.

La técnica usada para la separación de las proteínas (gel de poliacrilamida), en los dos líquidos, es muy sensible y diferencia las bandas proteicas.

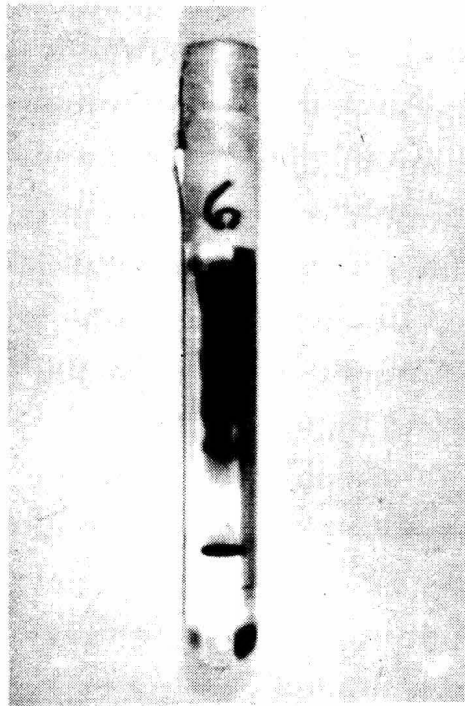
Según lo reportado por Sidney Shulman, el cual especifica que no fueron claras las bandas por las bajas temperaturas en las que se encontraban las muestras, no estamos de acuerdo con ello, ya que el plasma seminal empleado en este trabajo también estaba a bajas temperaturas y aparecieron 14 bandas (fotografía 1), las cuales están en número mayor a las reportadas (3 más), comparadas con las encontradas por Lavon, las cuales son: 10, 13 y 14.



Fotografía 3: Electroforesis en gel
de poliacrilamida pH 7,00 con
 ^{125}I se muestra la banda --
obtenida de T_4I^{125} . (tinción -
con negro de azul).



Fotografía 4: Electroforesis en gel
de poliacrilamida pH 7,00 con
 ^{125}I se muestra la banda --
obtenida de T_3 radiactivo. -
(tinción con negro de azul).



FOTOGRAFIA 5: Electroforesis en gel de poliacrilamida de plasma serinal humano sin ^{125}I ni ^{131}I . Se muestran las 14 bandas (tinción con negro de acido).

CAPITULO VI

RESUMEN

- 1.- En el presente estudio se llevó a cabo una revisión sobre electroforésis en líquido seminal, desafortunadamente hay pocos trabajos enfocados en este tema y, solo nos esconcentramos con 2 artículos donde mencionan la posible relación existente de las hormonas con las proteínas portadoras, relacionadas con la fertilidad.

- 2.- Se describen las técnicas en gel de poliacrilamida y cuantificación de T_4 en 25 muestras de suero patrón y 25 muestras de plasma seminal humano que constituyeron nuestro estudio.

- 3.- Se reportan los resultados obtenidos, en los cuales de acuerdo al número en donde es fijada la T_3 y T_4 se hace una breve discusión sobre los mismos y las técnicas empleadas.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en el estudio realizado podemos mencionar ya la existencia de estas proteínas portadoras de T_3 y T_4 en plasma seminal, aunque, -- sin conocer la proteína exacta que las transporta.

Esperamos que estos datos tengan utilidad en futuros trabajos y que pueda probarse la utilidad que tienen, para correlacionar la existencia de ellas en los problemas de infertilidad por hipotiroidismo, que es en realidad la incógnita a despejar.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

Baxter S. J.

Immunological identification of human semen. *Medicine, Science and the Law* 13: 155, 1973

Donnell Turner

Endocrinología general. Ed. Interamericana 187, 1967

Lavon U.; Briggs, P.A. y Boursnell

Electrophoresis of protein fractions from boar seminal plasma, vesicular secretions and epididymal plasma. *J. Reprod. Fert.* 33: 39, 1973

Lennert, K.A.; Schröder, H.M. y Mondorf

Sobre la inmunología del líquido prostático. *Minerva -- Med.* 61: 125, 1961

Lewin, L.M.; Beer, R. y Glezerman

Electrophoresis separation of proteins on cellulose --- acetate: a technique for study of prostatic and vesicular contributions in human seminal fluid. *Fert. and --- steril.* 25: 416, 1974

Mroueh Adnan M.

The excretion of radioiodine in human semen. Fert. and Sterl. 22: 61, 1971

Pedersen K.O.

A systematic study of variables affecting protein binding of thyroxine and triiodothyronine in serum. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 34: 247, 1974

Raboch J.

Electrophoresis of seminal plasma proteins. Int. J. -- Fert. 6: 125, 1961

Refetoff, Samuel; Fang, Victor y James

Studies on human thyroxine-binding globulin (TBG)

IX. Some physical, chemical and biological properties of radioiodinated TBG and partially desisylated TBG.-

J. Clin. Inv. 56: 177, 1975

Ritzen, Martin; Frenech, Frank y Samuel C.

Steroid binding in polyacrylamide gels. J. Biol. chem. 249: 6597, 1974

Shuman, Sidney y Bronson Paul

Immunochemical studies on human seminal plasma I. Changes in composition during storage, as demonstrated by -- electrophoresis. Fertil. and Steril. 19: 549, 1968

Sterling, K. y Peter O. Milch

Thyroid hormone binding by component of mitochondrial - membrane. Proc. Nat. Acad. of sci. 72: 3225, 1975

Sutherland, R.J. y Brandon

The thyroxine-binding properties of rat and rabbit serum proteins. Endocri. 98: 1976

Tauber, P.F. ; Zaneveld, L.J.D. y G.F.B. Schumacher

Components of human split ejaculates

I. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, -- lactoferrin, transferrin and other plasma proteins. J. Reprod. Fert. 43: 219, 1975

Tietz, Norbert

Química clínica moderna. Ed. Interamericana 491

Villanueva Cañada E.

Estudio bioquímico del plasma seminal y su aplicación - a la investigación médico legal de las manchas de esper_{ma}. Lab. XXVII, 401, 1972