



300627
UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA UNAM

20
2ej

EFFECTO DE LAS POLIAMINAS SOBRE LA ACTIVIDAD
DE ARGINASA DE ESPERMATOZOIDE DE
BORREGO

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
IVONNE MARTINEZ CORREA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. JOSE DOMINGO MENDEZ F.

MEXICO, D. F.

HECHO CON
FALLA DE ORIGEN

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE:

| | <i>Página</i> |
|---|---------------|
| INTRODUCCION | 1 |
| POLIAMINAS | 2 |
| <i>Biosíntesis, Interconversión y Degradación</i> | 8 |
| <i>Regulación de la Biosíntesis</i> | 19 |
| <i>Ornitina Descarboxilasa</i> | 19 |
| <i>S-adenosilmetionina descarboxilasa</i> | 20 |
| <i>Espermidina/Espermina N -Acetiltransferasa</i> .. | 20 |
| <i>Espermidina Sintasa y Espermina Sintasa</i> ... | 22 |
| <i>Poliamina Oxidasa</i> | 22 |
| <i>Efectos Biológicos de las Poliaminas</i> | 26 |
| <i>Interacciones entre el ciclo de la urea, biosíntesis de poliaminas y Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos</i> | 29 |
| ARGINASA | 32 |
| ESPERMATOZOIDE | 39 |
| <i>Espermatogénesis</i> | 39 |
| <i>Transporte epididimal</i> | 39 |
| <i>Maduración de los Espermatozoides</i> | 43 |
| <i>Estructura del Espermatozoide</i> | 45 |
| <i>Metabolismo del Espermatozoide</i> | 48 |
| METODO | 50 |
| TECNICAS | 56 |
| RESULTADOS | 61 |
| DISCUSION DE RESULTADOS | 71 |
| CONCLUSIONES | 87 |
| BIBLIOGRAFIA | 88 |

INTRODUCCION

Diversos estudios han demostrado la presencia de poliaminas en multiples sistemas celulares, en bacterias, hongos, levaduras, plantas, células de diversos tejidos de mamíferos; en donde estos compuestos desempeñan funciones específicas.

Se ha demostrado que son factores de crecimiento y que su presencia es esencial para la regulación de múltiples procesos entre los que destacan diferenciación, división y proliferación celular.

También pueden interactuar con ácidos nucleicos, donde estabilizan la estructura secundaria del DNA, lo protegen de la desnaturalización térmica y de la degradación enzimática entre otras funciones; debido a esto se ha despertado un gran interés para estudiar estos compuestos en diversas áreas de la investigación.

De una manera muy especial se ha estudiado el papel que juegan las poliaminas en la reproducción.

Se han realizado estudios tanto en sistemas reproductores femeninos como masculinos; en humanos, conejos, rata, cuyo, entre otras especies.

El metabolismo de las poliaminas ha sido estudiado durante el ciclo menstrual, en sangre, orina, placenta y fluido amniótico durante el embarazo, así como en mujeres con abortos espontáneos y pre eclampsia.

En machos se ha medido el nivel de poliaminas en las diferentes glándulas accesorias, testículo, próstata, semen; se ha estudiado también la correlación que existe entre los niveles de estos compuestos y la motilidad espermática. Así como la función que desempeñan en estados fisiológicos normales y patológicos.

Sin embargo, no se había medido el efecto que tienen estas aminas sobre la actividad de una enzima que regula la fase inicial de la biosíntesis de poliaminas.

De aquí surgió el interés por realizar este trabajo en donde se pretende saber el efecto que tienen las poliaminas sobre la arginasa, enzima que provee el sustrato necesario para la biosíntesis de estos compuestos.

También se busca determinar como varía la actividad de esta enzima conforme el espermatozoide madura.

POLIAMINAS

Las poliaminas son cationes polivalentes presentes tanto en eucariontes como en procariontes. Pueden encontrarse en forma de bases alifáticas libres o conjugadas en carbohidratos, esteroides, fosfolípidos, péptidos o como unidades subestructurales de numerosos alcaloides. (1) La putrescina, espermidina y espermina constituyen el grupo de poliaminas que ha sido más ampliamente estudiado Fig 1, aunque existen otro tipo de poliaminas, las cuales son menos comunes y se encuentran principalmente en plantas y bacterias; como por ejemplo la cadaverina, homoespermidina, noespermina, caldopentamina entre otras. Fig 2.

Actualmente se ha tenido todo un auge con respecto al estudio de las poliaminas, debido a la infinidad de procesos biológicos en que están involucradas; sin embargo estos compuestos no fueron descubiertos recientemente, su presencia se señaló hace más de 300 años.

Así tenemos, que la formación de cristales de espermina en muestras de semen humano fué notada en un principio por Antony van Leeuwenhoek en 1678, posteriormente esta sustancia fué redescubierta en varias ocasiones, es así que en el año de 1791 Nicolas Vaulin demuestra su relativa insolubilidad en agua y etanol, concluyendo que se trata de una sal de un catión inorgánico, probablemente de calcio.

En 1865 los cristales fueron descritos nuevamente por Boettcher, quien supuso que la sustancia de que estaban formados era una proteína, a la que llamó espermatina. Schreiner en 1878 postula que los cristales son sales de fosfato de un compuesto orgánico básico simple, diez años después A. Landenburg y J. Abel dieron el nombre de espermina a ésta base orgánica.

Finalmente en 1926, Otto Rosenheim determinó la estructura química correcta de la espermina, sintetizando después otra base conocida como fosfato de espermidina. Investigaciones posteriores mostraron que la espermidina podría obtenerse a partir de órganos de animales, microorganismos y plantas.

La putrescina fué aislada en 1879 gracias a los trabajos de Brieger y sintetizada 7 años después.

A este investigador también se atribuye el descubrimiento de la cadaverina. (1,2)

Las poliaminas son bases nitrogenadas alifáticas de bajo peso molecular. A pH fisiológico la putrescina, espermidina y espermina tienen 2, 3 y 4 cargas positivas respectivamente.

Las constantes de disociación de los grupos amino en la espermina y espermidina difieren notablemente.

Otras propiedades de estos compuestos se muestran en la tabla 1.

La distribución de las poliaminas en la naturaleza es muy amplia, pueden encontrarse en tejidos animales, vegetales y microorganismos; sin embargo, las concentraciones relativas de estos com-

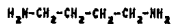
puestos varían notablemente en células diferentes.

En general, los procariontes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y carecen de espermina.

Los eucariontes tienen generalmente bajas concentraciones de putrescina y tienen espermidina y espermina. (1)

La concentración de poliaminas en diferentes materiales biológicos se muestra en la tabla 2.

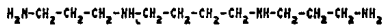
Estas concentraciones también varían en función del ciclo celular. Fig 3.



Putrescina



Espermidina



Espermina

Fig 1. Fórmulas de las poliaminas mas estudiadas.

DIAMINAS:

1-3 Diaminopropano.



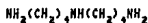
Cadaverina.



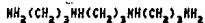
Norespermidina.

TRIAMINAS:

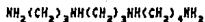
Aminopropilcadaverina.



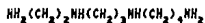
Homoespermidina.



Norespermina.

TETRA-AMINAS:

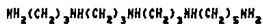
Termoespermina.



Canavalmina.

PENTA-AMINAS:

Caldopentamina.



Homocaldopentamina.

Fig 2. Fórmulas de las poliaminas menos comunes.

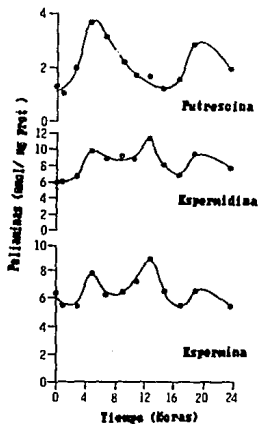


Fig 3. Cambios en el contenido de poliaminas durante el ciclo celular.

**Tabla 1. Algunas propiedades de las poliaminas
comunes. (3)**

| Nombre | Sinónimo | Formula | Mr | Pk _a |
|-------------|--|-------------------|--------|------------------------|
| Putrescina | 1-4 Diamino butano | $C_4H_{12}N_2$ | 88.15 | 8.71 |
| Espermidina | N-(3 aminopropil)-1-4 diaminobutano | $C_7H_{19}N_3$ | 145.25 | 10.96 9.91 8.51 |
| Espermina | N-N'-bis(3-amino-pro- pil)-1,4-diamino bu- tano. | $C_{10}H_{28}N_4$ | 202.34 | 10.86 10.05 8.82 |

Tabla 2. Concentración de poliaminas en diferentes tejidos biológicos.(1)

| Tejido | Putrescina | Espemidina | Espermina |
|-----------------------------------|------------|------------|-----------|
| (moles/g de peso húmedo) | | | |
| Hígado de ratón | 0.01 | 0.61 | 0.02 |
| Lóbulo frontal de cerebro humano. | 0.01 | 0.23 | 0.10 |
| Próstata rata | - | 7.73 | 4.77 |
| Páncreas rata | - | 0.62 | 0.00 |
| Plasma seminal humano. | 0.23 | 0.11 | 3.04 |
| <u>Escherichia coli</u> | 15.00 | 1.50 | - |
| <u>Pseudomona aeruginosa.</u> | 5.60 | - | - |
| <u>Pseudomona sp.</u> | 4.60 | - | - |
| <u>Lactobacillus casei</u> | - | - | 0.10 |
| <u>Shigella sonnei</u> | 14.00 | - | - |
| <u>Acetobacter vinelandii</u> | 13.00 | - | - |
| <u>Bacillus subtilis</u> | 11.00 | - | - |
| <u>Aspergillus niger</u> | 4.00 | - | - |
| <u>Aspergillus nidulans</u> | - | 0.16 | 0.40 |
| <u>S. cerevisiae.</u> | 1.50 | 1.40 | 0.60 |

BIOSINTESIS, INTERCONVERSION Y DEGRADACION.

Para poder explicar la biosíntesis de poliaminas es necesario establecer primero, el sistema biológico que estamos estudiando, ya que aunque en general se sigue la misma ruta en animales, vegetales y microorganismos a partir de la putrescina, los primeros pasos son diferentes.

En los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir de la ornitina, este compuesto se encuentra disponible en el plasma y también puede ser formado dentro de la célula por acción de la enzima arginasa. Se ha sugerido que esta enzima, la cual está más ampliamente distribuida en los tejidos que las otras enzimas del ciclo de la urea, está presente para facilitar la disponibilidad de ornitina durante la biosíntesis. Por esta razón, se ha pensado que la arginasa puede ser una de las enzimas que regulan la etapa inicial en la biosíntesis de poliaminas, debiendo recordarse que su participación fisiológica tradicionalmente estudiada se relaciona con el ciclo de la urea. (1). Fig 4.

En el capítulo siguiente se hablará más ampliamente de esta enzima. Por medio de la ornitina descarboxilasa (ODC) la ornitina se transforma en putrescina. La ODC es una enzima que depende para su actividad de fosfato de piridoxal. Se encuentra en niveles bajos en las células en estados fisiológicos de latencia. Su actividad puede elevarse varias veces, como respuesta a diversos estímulos tróficos, tales como hormonas, drogas, regeneración de tejidos y factores de crecimiento. (4)

Muchos microorganismos y plantas superiores también pueden formar putrescina a partir de agmatina, compuesto que se forma por descarboxilación de la arginina debido a la enzima arginina descarboxilasa, enzima que no está presente en células de mamíferos y eucaerotes bajos, pero está ampliamente distribuida en plantas.

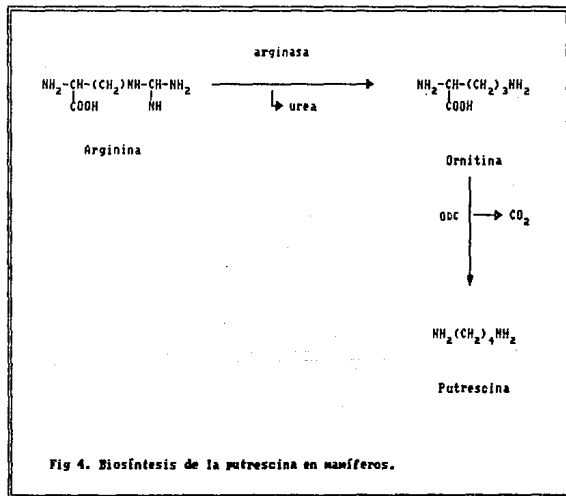
Posteriormente, la agmatina es hidrolizada en putrescina y urea por acción de la agmatinasa. Fig 5. Algunos organismos poseen ambas rutas para la biosíntesis de putrescina, por ejemplo: *Escherichia coli*.

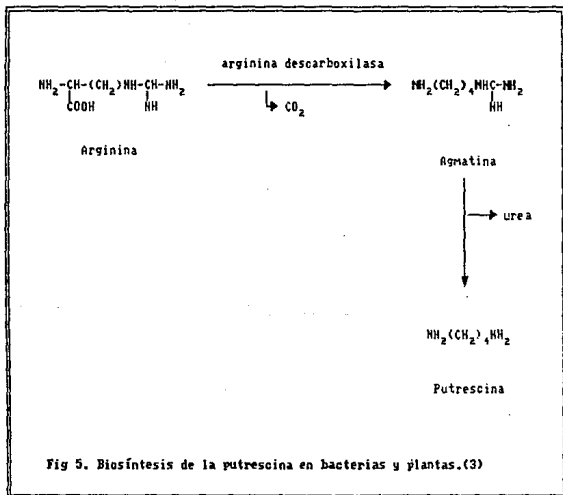
En las plantas existen rutas adicionales para obtener putrescina a partir de agmatina, una de ellas es la vía N-carbamoylputrescina la cual está catalizada por la enzima N-carbamoylputrescina amidohidrolasa, en esta reacción se tiene desprendimiento de dióxido de carbono y amonio. Esta reacción se lleva en plantas como el *Lathyrus sativus*. Fig 6.

A partir de la putrescina se sigue en general la misma ruta metabólica para la obtención de las otras poliaminas (espermidina y espermina), independientemente de que se trate de mamíferos, plantas o microorganismos.

En la Fig 7 se puede observar la ruta para la biosíntesis e interconversión de poliaminas.

Para convertir a la putrescina en espermidina debe adicionarse un grupo propilamina. Este grupo se deriva de la metionina, la





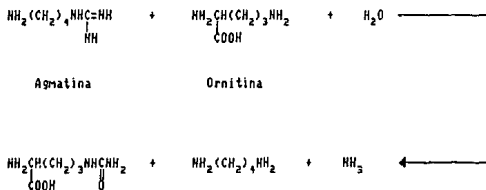


Fig 6. Biosíntesis de la putrescina en el Lathyrus sativus.(3)

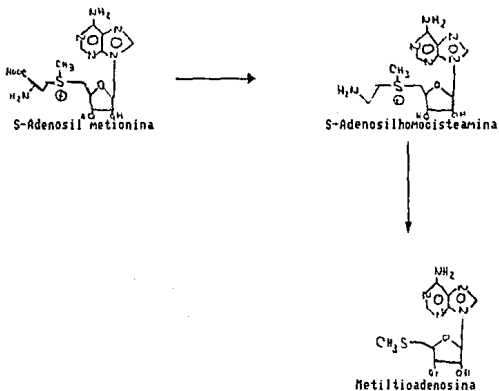


Fig 8. Mecanismos para obtener los grupos propilamina.(3)

BIOSINTESIS E INTERCONVERSION DE POLIAMINAS

figura 7 (3)

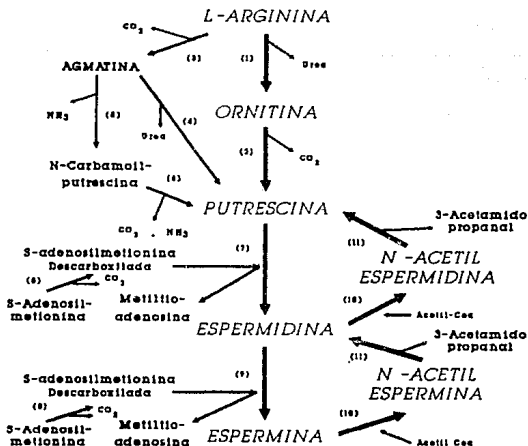


Fig 7. Biosíntesis e Interconversión de las Poliaminas. Las enzimas involucradas son: (1) arginasa, (2) ornitina descarboxilasa, (3) arginina descarboxilasa, (4) agmatinasa, (5) agmatina deaminasa, (6) N-carbamoylputrescinaamidhidrolasa, (7) espermidina sintasa, (8) S-adenosilmetionin Descarboxilasa, (9) espermina sintasa, (10) espermidina/espermina N-acetiltransferasa, (11) poliamina oxidasa.

cual es primero convertida en S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMD). El producto de la descarboxilación, S-adenosilhomocisteína, es utilizado como donador de grupos propilamina para la síntesis de espermidina y espermina. Fig 8. Por lo tanto se ha mencionado que la síntesis de espermidina y espermina es dependiente de la disponibilidad de donadores aminopropilo, de tal manera que la S-adenosilmetionina descarboxilasa constituye también un factor limitante en la biosíntesis de las poliaminas. (3,4)

En cierto número de bacterias y plantas el L-aspartico-semialdehído es el donador de los grupos propilamina en la biosíntesis de espermidina, este camino alternativo ha sido demostrado también en el *Lathyrus sativus*. Fig 9.

En la reacción catalizada por SAMD para obtener grupos propilamina se produce metiltioadenosina, que se hidroliza por acción de la enzima metiltioadenosina fosforilasa. La adenina que resulta de esta reacción se recupera como nucleósido. La metil tiotribose-1-fosfato es reconvertida a metionina. Este metabolismo ocurre a través de una serie de reacciones, todavía no bien caracterizadas. Las células de mamífero contienen todas las enzimas para la biosíntesis de poliaminas, pero hay unas líneas de células tumorales que carecen de metiltioadenosina fosforilasa y excretan la metiltioadenosina producida en la biosíntesis de poliaminas. (4)

La enzima que incorpora el grupo propilamina a la putrescina se llama espermidina sintetasa, posteriormente se adiciona otro grupo propilamina a la espermidina para formar espermina por medio de la enzima espermina sintasa. A pesar de la similitud entre estas dos reacciones, cada enzima tiene cierta especificidad por su propio sustrato.

Se ha pensado que son reguladas por la disponibilidad de sus sustratos, particularmente la S-adenosilhomocisteína. Sin embargo, en el caso de la espermidina sintasa se ha observado que también se eleva en respuestas a hormonas, regeneración tisular y factores de crecimiento celulares.

Se ha demostrado que las reacciones catalizadas por las dos sintasas son irreversibles. (1)

Tanto la espermina como la espermidina pueden ser convertidas en putrescina, el primer paso es la acetilación de un grupo propilamino de la espermina por medio de la enzima espermina N¹-acetiltransferasa para obtener de este modo N¹-acetilespermina, posteriormente este compuesto es degradado por la acción de la poliamina oxidasa obteniéndose espermidina y N-acetilpropionaldehído. Fig 10.

La espermidina es acetilada por acción de la espermidina N¹-acetiltransferasa para obtener de este modo N¹-acetilespermidina, la cual es hidrolizada por la poliamina oxidasa para obtener putrescina y acetamidopropanal.

En virtud de que en condiciones fisiológicas los derivados acetilados son metabolizados rápidamente, se ha propuesto que la acetilación es el paso limitante en esta interconversión y se ha demost

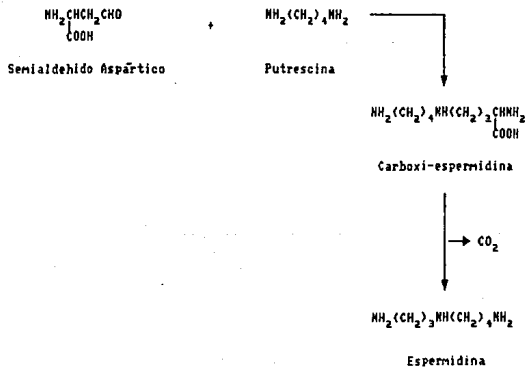
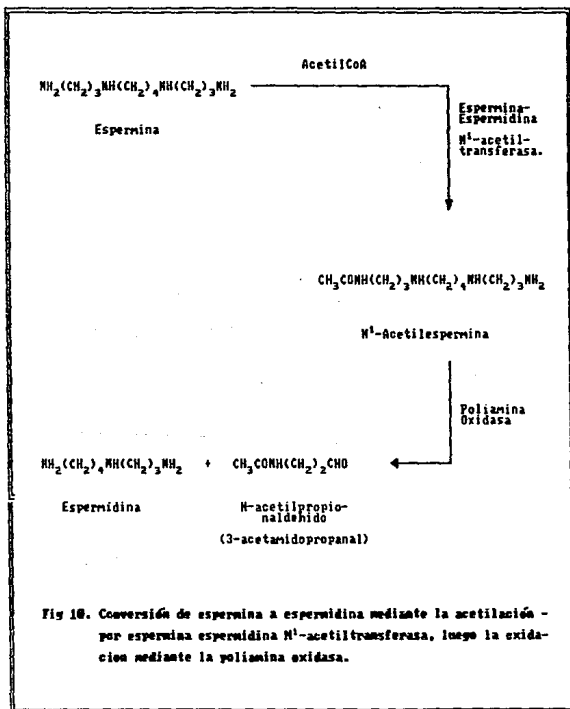


Fig 9. Síntesis de la espermidina en bacterias y plantas. (3)

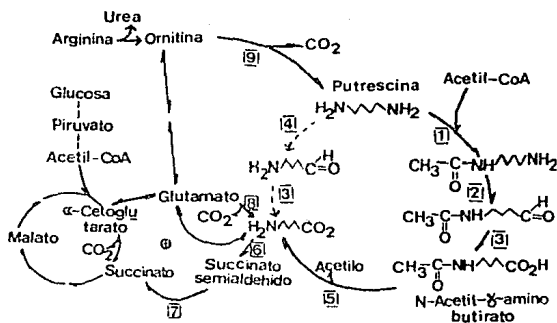


do que la espermidina-N¹-acetiltransferasa es inducida rápidamente y se incrementa marcadamente después de la exposición a agentes tóxicos, que resaltan la conversión de espermidina a putrescina y de espermina en espermidina. (1,4)

La putrescina que se obtiene de estas reacciones puede ser oxidada por la diamina oxidasa para producir β -aminobutiraldehído el cual es posteriormente oxidado a γ -aminobutirato (GABA), o bien para dar origen a compuestos cíclicos (Δ -pirrolina). Pero la putrescina puede también ser acetilada por una enzima microsomal y la monoacetilputrescina ser oxidada por una monoamina oxidasa, para producir GABA lo que podría ocurrir en tejidos como el cerebro, que tienen baja actividad de diamina oxidasa. Fig 11.

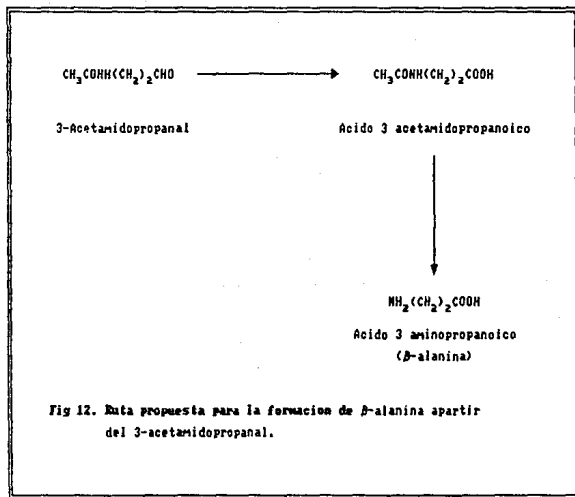
Además de la putrescina también se obtiene un aldehído durante la reacción, el cual sufre una serie de reacciones para convertirse en β -alanina (ácido 3-aminopropiónico). Fig 12.

La acetilación de las poliaminas puede llevarse a cabo también por una enzima nuclear que, con espermidina como sustrato, forma preferentemente N⁸-acetil espermidina. Las poliaminas acetiladas han sido encontradas en sangre y orina, pero en cantidades pequeñas y no es clara la importancia de la acetilación que permite la excreción de las poliaminas.



⊕ Lanzadera del γ -aminobutirato

Fig 11. Catabolismo de putrescina via ácido γ -amino butírico.
 Las enzimas involucradas son: (1) Acetil CoA-1, 4-diaminobutano N-acetiltransferasa, (2) Monoamina oxidasa, (3) Aldehído Deshidrogenasa, (4) diamino oxidasa, (5) Enzima desacetilante de γ -aminobutirato, (6) γ -aminobutirato-2-cetoglutarato aminotransferasa, (7) succinato semialdehído deshidrogenasa, (8) glutamato descarboxilasa, (9) Ornitina descarboxilasa.



REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS.

La regulación de la biosíntesis de poliaminas y la ruta de la interconversión mostrada en la Fig 7, dependen de las siguientes enzimas: arginasa, ornitina descarboxilasa (ODC), S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) y espermina/espermidina N'-acetiltransferasa; las otras enzimas (espermidina sintasa, espermina sintasa y poliamina oxidasa) están gobernadas primariamente por la disponibilidad del sustrato apropiado. (1,3)

Como se mencionó anteriormente la arginasa es de suma importancia en la etapa inicial de la biosíntesis, ya que esta enzima provee la ornitina necesaria que será convertida en putrescina. En el siguiente capítulo se hablará más ampliamente de esta enzima

A continuación se darán las características de las otras enzimas involucradas en la biosíntesis e interconversión.

Ornitina Descarboxilasa.

Esta es la enzima que más ha sido estudiada de todas las del ciclo de las poliaminas, ya que existen inhibidores potentes y específicos que actúan sobre ella y permiten hacer diversos estudios sobre sistemas biológicos en los cuales se bloquea la biosíntesis de poliaminas.

Esta enzima es extremadamente lábil, se encuentra en niveles bajos en las células en estados fisiológicos de latencia, generalmente representa menos del 0.0001 % del total de proteína celular. En riñones de ratones estimulados con andrógenos la ODC representa el 0.05 % de la proteína soluble después de la inducción máxima. De tal modo, tenemos que el riñón de ratón es una excelente fuente para el aislamiento de esta enzima (3).

También ha sido aislada de microorganismos, hígado de rata y ternera.

Esta enzima depende para su actividad de fosfato de piridoxal, tiene una estructura dimerica, se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, pero después de una inducción la mayor actividad se encuentra en el citoplasma. (6)

Existen muchos compuestos que inhiben a la ODC, pero el inhibidor más estudiado es la DL- α -difluorometilornitina (DFMO). Este compuesto es reconocido por la ODC como sustrato y su descarboxilación permite la formación de un intermediario electrofílico en el sitio activo de la enzima para formar de este modo un enlace covalente, quedando así inactivada la enzima de manera reversible. (4)

S-Adenosilmetionina Descarboxilasa (SAMD).

Esta enzima depende del piruvato como cofactor, ha sido aislada a partir de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, del hígado de rata entre otras fuentes. Las propiedades que tiene esta enzima dependen de la fuente de obtención, en la Tabla 3 se muestran algunas propiedades de tres isoenzimas. (3)

Estas son activadas por putrescina e inhibidas por S-adenosilmetionina descarboxilada y por metilglioxal bis-(guanilhidrazona).

Está presente en los tejidos en muy bajas concentraciones equivalentes a 0.015 % de la proteína soluble en próstata ventral y a 0.0007 % en hígado. Su actividad es regulada por muchas hormonas y por otros estímulos que promueven el crecimiento. (1)

Hasta el momento no existen inhibidores irreversibles (tan efectivos como el DFMO para la ODC) para esta enzima que puedan ser usados para influenciar el metabolismo de las poliaminas por bloqueo de esta enzima específicamente. El único nucleósido que ha mostrado una actividad inhibitoria apreciable es el S-metil 5'-tioadenosina [AdoS+ (CH₃)₂], sin embargo este compuesto resulta ser un potente inhibidor de la espermina sintasa.

Como se mencionó anteriormente el metilglioxal bis-(guanilhidrazona) (MGBBG) es también un inhibidor, pero tiene una gran variedad de efectos en la célula: puede causar severos daños en mitocondria interfiere con el transporte de poliaminas, inhibe a las diamino oxidasas e induce a las acetiltransferasas. (4)

Espermidina/Espermina N¹-Acetiltransferasa.

Dos poliamina acetilasas son conocidas. Una es una enzima predominantemente nuclear que actúa principalmente sobre las histonas pero puede acetilar espermidina para formar N⁹-acetil-espermidina, la cual posteriormente es deacetilada dentro de la célula. El objeto de este procedimiento todavía no es muy claro, pero se piensa que este método constituye un medio para remover la espermidina que no se desea en el núcleo.

La segunda enzima es la espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa, la cual es citosólica, se puede diferenciar de la acetilasa nuclear por reacciones con anticuerpos específicos y porque cada enzima responde de manera diferente a ciertos inhibidores. Esta enzima tiene un peso molecular de 115 000 y está constituida por dos subunidades.

Actúa sobre la espermidina para formar exclusivamente N¹-acetil-espermidina. La espermina es acetilada por esta enzima para dar N¹-acetil-espermina la cual puede ser nuevamente acetilada por esta enzima para obtener N¹-N¹¹ diacetil-espermina, aunque este compuesto no ha sido detectado in vivo.

Tabla 3. Propiedades de la SAMD aislada de diferentes fuentes.

| Fuente | Mx | Mx Subunidad No. de Subunidades | Activadores | Km (pH) |
|---------------------|--------|------------------------------------|--|------------|
| E. Coli | 108000 | 17000 (6) | Mg ⁺⁺ , Ca ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ | 60 |
| S. Cerevisiae | 88000 | 41000 (2) | Putrescina | 151 |
| Higado de - rata | 68000 | 32500 (2) | Putrescina | 50 |

Esta enzima es altamente específica y solo acetila sustratos que tienen estructura $R-NH-(CH_2)_3NH_2$; es por esto que no puede formar N-acetilespermidina. (3,4)

Espermidina Sintasa y Espermina Sintasa.

Estas enzimas son mucho más estables que la ODC y SAMD. La espermidina sintasa es un homodímero con una subunidad molecular que tiene una masa de cerca de 36 kDa.

La espermina sintasa consiste de dos subunidades con una masa molecular de 44 kDa.

Las actividades de estas enzimas están reguladas por la disponibilidad de sustrato (5)

A diferencia de las sintetetas las sintetas son enzimas que para realizar su función no requieren de la energía liberada de la hidrólisis de un enlace pirofosfato; mientras que en las primeras es la energía es indispensable para que se realice la síntesis. (95)

Poli-amino Oxidasa.

Estas enzimas están divididas en función del tipo del grupo amino que atacan:

- 1) Amino oxidasas que actúan sobre grupos amino primarios.
- 2) Amino oxidasas que actúan sobre grupos amino secundarios. (Actúan sobre los grupos propilamina de la espermidina y espermina).

La poli-amino oxidasa que proviene del plasma bovino es capaz de actuar sobre la espermidina y espermina para producir respectivamente un aminomonoaldehído (N^1 -(4-aminobutil)-aminopropionaldehído) o un dialdehído (NN^1 -bis(3-propionaldehído)-1,4-diaminobutano), amoniaco y peróxido de hidrógeno. Fig 13.

Esta enzima es una glicoproteína con un Mr cercano a 180 000, está constituida de 2 subunidades unidas de manera no covalente, cada subunidad contiene un puente disulfuro, dos átomos de cobre y un grupo carboxilo.

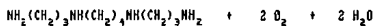
Existe otra poli-amino oxidasa que actúa sobre las poli-aminas pero ésta ha sido aislada de hígado de rata.

Esta enzima es un polipéptido con un Mr de 60 000, tiene como cofactor al FAD y posiblemente hierro, actúa sobre los grupos amino secundarios de la espermina o espermidina con la producción de

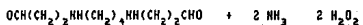
3-aminopropanal. Fig 14.

Esta presente a niveles comparables con los de la espermina y es--
permidina sintasa y excede en gran medida a los de la espermina/es
dina N'-acetiltransferasa. (3)

A)

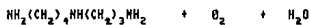


Espermina



H, H¹-bis (3-propanal)-1
4-diaminobutano.

B)



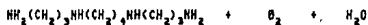
Espermidina



N-(4-aminobutil)3-amino
propanal

Fig 13. Oxidación de la espermina y espermidina por una poliamina oxidasa aislada de plasma bovino. (3)

A)



Espermina



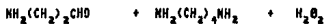
Espermidina

3-aminopropanal

B)



Espermidina



3-Aminopropanal

Putrescina

Fig 14. Oxidación de la espermina y espermidina por una poliamina oxidasa aislada de hígado de rata.(3)

EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS.

Estos compuestos son importantes ya que se ha demostrado que son factores de crecimiento y que su presencia es esencial para la regulación de múltiples procesos entre los que destacan diferenciación, división y proliferación celular.

También pueden interaccionar con ácidos nucleicos, donde estabilizan la estructura secundaria del DNA, lo protegen de la desnaturación térmica y la degradación enzimática.

Además regulan la síntesis de los ácidos nucleicos y de las proteínas.

La función biológica de estos compuestos ha sido estudiada tanto en microorganismos, células animales y vegetales. (1)

En la tabla 4 se muestran algunas de sus funciones.

En reproducción las poliaminas han sido estudiadas tanto en machos como en hembras en condiciones fisiológicas normales y patológicas.

En mujeres, el metabolismo de poliaminas ha sido estudiado durante el ciclo menstrual normal, en sangre, orina, placenta y fluido amniótico de mujeres embarazadas, así como en aquellas con aborto espontáneo y preclampsia.

Se encontró que la excreción urinaria de putrescina, espermidina y espermina es más alta durante la menstruación, presentándose además un pico a mitad del ciclo (tiempo en que se esperaba la ovulación) Por otra lado se observó que la concentración de poliaminas se incrementa en plasma y orina de mujeres embarazadas.

En machos, las poliaminas han sido particularmente estudiadas en semen, testículo y próstata. Recientemente han sido asociadas con la capacitación del espermatozoide (fenómeno por el cual los espermatozoides al estar depositados en el tracto genital femenino en unas cuantas horas desarrollan la capacidad de penetrar la capa de células granulosas que recubre el óvulo en el momento de la ovulación) y proceso de fertilización.

Williams-Ashman et al (85) reportaron que el semen humano con tiene altas concentraciones de espermina (5 a 15 mM) además de tener espermidina, putrescina y cadaverina.

El hecho de que la concentración de espermina en el semen humano es mucho más alta que en cualquier otro tejido y fluido del cuerpo permite hacer varias especulaciones de su papel fisiológico.

Evidencias que han sido obtenidas por estudios in vitro muestran que la espermina también aumenta la actividad de maltasa seminal, la cual está involucrada en la degradación de glucógeno, incrementándose la utilización de glucosa y reduciéndose la de fructosa en el espermatozoide.

Adiciones de cantidades fisiológicas de espermina a suspensiones de espermatozoides causan un aumento significativo en los niveles

de AMP cíclico, un nucleótido que induce la capacitación del espermatozoide humano.

Como podemos observar las poliaminas están involucradas en diversos procesos biológicos, es por esto que su estudio se convierte en una línea de investigación muy importante.

Tabla 4. Efectos Biológicos de las Poliaminas.(1)

1) POLIAMINAS COMO FACTORES DE CRECIMIENTO.

En micro-organismos.
En células de mamífero.

2) ESTABILIZACIÓN DE MEMBRANAS CELULARES.

3) ESTABILIZACIÓN DE PARTICULAS SUBCELULARES.

4) ASOCIACIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS.

Estabilización del DNA contra la desnaturalización del DNA.
Asociación con tRNA.
Empacamiento del DNA en bacteriófagos.
Estimulación de la síntesis de RNA.
Modificación de la actividad de ribonucleasas.
Estabilización del RNA recién sintetizado.

5) EFECTOS SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

Fijación de moléculas de tRNA a ribosomas.
Estimulación de metilación de tRNA.
Reemplazamiento de Mg⁺⁺ en la reacción de aminoacil tRNA sintetasa.
Asociación con ribosomas.
Biogénesis de partículas ribosomales.
Iniciación y Fidelidad de la traducción.
Estimulación de la nucleotidiltransferasa de tRNA.

6) EFECTOS SOBRE VARIAS REACCIONES METABÓLICAS.

Estimulación de nucleotido cinasas.
Modificación de las actividades de proteínas cinasas.
Incremento de la ADP-ribosilación de proteínas nucleares.
Activación de fosforilasa b.
Estimulación de lipólisis.
Activación de colina cinasa.
Incremento en la utilización de fructosa en espermatozoides (epidídimo)
Inhibición de ATPasa.
Modificación de la actividad de acetil colina esterasa.
Inhibición de la agregación de plaquetas.
Estimulación del metabolismo de estradiol en microsomas de hígado.

INTERACCIONES ENTRE EL CICLO DE LA UREA, LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS Y EL CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS.

Antes de mencionar la relación existente entre estos 3 procesos se va a describir brevemente el funcionamiento del ciclo de la urea.

Este ciclo ha sido bien identificado en su conjunto y ahora se sabe que consiste de cinco pasos:

- 1) Síntesis de carbamoilfosfato a partir de iones bicarbonato y amonio.
- 2) Formación de citrulina a partir de ornitina y carbamoilfosfato.
- 3) Síntesis de argininosuccinato a partir de citrulina y aspartato
- 4) Hidrólisis de arginino-succinato para formar arginina
- 5) Degradación de arginina para formar urea y ornitina.

La ornitina así formada está nuevamente disponible para su reutilización en el paso 2 o bien se va a la biosíntesis de poliaminas. La urea es excretada. Fig 15.

Los dos pasos iniciales son catalizados por las enzimas mitocondriales: carbamoilfosfato sintetasa I y ornitina transcarbamilasa, y los tres últimos por las enzimas citoplasmáticas: argininosuccinato sintetasa, argininosuccinasa y arginasa respectivamente. Todas estas enzimas están presentes en el hígado, intestino y riñón, pero solamente en el hígado existen niveles suficientes para llevar a cabo la ureogénesis. Varios tejidos extrahepáticos contienen solamente los últimos tres mecanismos enzimáticos del ciclo de la urea; en el cerebro y músculo la biosíntesis de urea depende del aporte de citrulina que viene del hígado.

La función del ciclo de la urea es captar el grupo amino de los aminoácidos, representa un sistema anabólico que requiere energía y permite la formación de esqueletos de carbono, necesarios para el metabolismo oxidativo.(1)

Se ha demostrado que después de una hepatectomía parcial se produce un intenso crecimiento celular, y uno de los primeros hechos que se presenta, es un incremento en los niveles de ODC, la cual alcanza un pico a las 4 horas de la operación.

Brebnor et al midieron la actividad de las enzimas del ciclo de la urea durante las primeras etapas de regeneración en animales sometidos a una dieta normal; encontraron que hay una espectacular disminución en los niveles de las 5 enzimas del ciclo de la urea, alcanzando un nivel máximo 4 horas después de la operación, lo cual coincide exactamente con la elevación de la ODC.

Todo esto sugiere que la actividad de esta vía metabólica puede competir con la ODC por la ornitina y coincide con el incremento de la ornitina hepática y del amonio en plasma, durante este período.

La ornitina es utilizada en la biosíntesis de poliaminas para que se tenga una rápida proliferación celular, posteriormente las enzimas del ciclo de la urea se elevan para poder cumplir con la función de eliminar del organismo los desechos nitrogenados de los aminoácidos. (1)

Como podemos darnos cuenta, dependiendo de los requerimientos que tenga el organismo es la vía metabólica que sigue la ornitina.

El ciclo de Krebs provee al ciclo de la urea del aspartato necesario para que junto con la citrulina se forme argininosuccinato posteriormente este compuesto es hidrolizado y el fumarato que se obtiene por esta reacción se incorpora al ciclo de Krebs, mientras que la arginina sigue el ciclo de la urea para formar ornitina, la cual puede seguir los mecanismos descritos anteriormente. De esta manera quedan relacionados los tres ciclos y el que se siga una ruta u otra depende de las necesidades que tenga la célula en un momento dado.

En la Fig 16 se muestran las interacciones de estos ciclos.

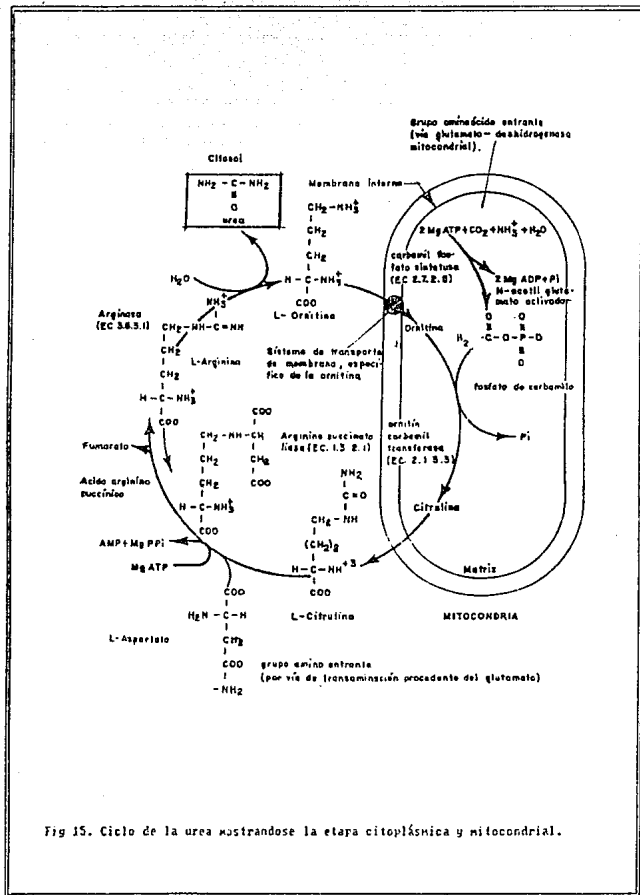


Fig 15. Ciclo de la urea mostrando la etapa citoplásmica y mitocondrial.

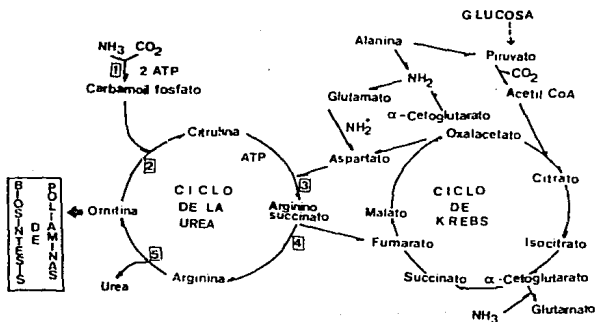


Fig 16. Interacciones entre el ciclo de la urea, el ciclo de Krebs y la biosíntesis de Poliaminas. Las enzimas involucradas en el ciclo de la urea son: (1) carbamoyl fosfato sintetasa, (2) ornitina transcarbamiíasa, (3) arginino succinato sintetasa, (4) arginino succinasa, (5) arginasa. Los asteriscos indican el origen del nitrógeno de la urea.

ARGINASA

La arginasa (L-arginasa aminohidrolasa E.C. 3.5.3.1) es la enzima que cataliza la hidrólisis de la L-arginasa a L-ornitina y urea. Su presencia fué primeramente detectada en el hígado de los mamíferos como la enzima terminal del ciclo de la urea. (9).

De una manera general, la arginasa está ausente en el hígado de organismos uricotélicos; reptiles y aves cuya excreción de nitrógeno amínico esencialmente, se hace en forma semisólida como suspensión de ácido úrico sólido; en los organismos ureotélicos, es decir aquellos que excretan el nitrógeno amínico en forma de urea, su actividad es considerable.

Además de la función hepática, la actividad de arginasa está asociada con la regulación de diversos procesos celulares.

Esta enzima se encuentra presente en diferentes tejidos de mamíferos y en otros sistemas vivientes (granos en germinación, levaduras, ciertos mohos y bacterias) (10), lo que constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de procesos básicos de la función celular.

La actividad extrahepática de la arginasa ha sido reportada en riñón (11,12), intestino delgado (13,14), cerebro (15), tiroides (16), epidermis (17,18), páncreas (19,20), útero (21), glándula submaxilar (19), glándula mamaria lactante (22,23), eritrocitos (24,27), linfocitos y granulocitos leucémicos (25), en líneas de células tumorales en cultivo (26), en suero, tanto en personas sanas (28) y otros padecimientos diversos (29,30,31).

A la arginasa distribuida ampliamente en diferentes tejidos extrahepáticos se le atribuye la función principal de facilitar la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas, prolina y glutamato.

El posible papel de la arginasa extrahepática en la biosíntesis de poliaminas parece especialmente atractivo ya que como se dijo anteriormente estas moléculas policatiónicas tienen un papel clave en el crecimiento de células y tejidos. (32).

La arginasa tiene una estructura oligomérica, siendo un tetramero que consiste en cuatro monómeros, cada uno de los cuales tiene un peso molecular de 30 000 - 40 000 y un ión Mn íntimamente ligado.

Esta enzima hidroliza uniones C-N no peptídicas y tiene afinidad por el sustrato L-arginina y no es así por los isómeros D-arginina y L-homoarginina. Un gran número de sustratos portadores de un resto guanidínico-sustituido han sido ensayados para señalar la especificidad de la arginasa; los derivados monosustituídos, no pueden ser sustratos de la arginasa si no cumplen las siguientes condiciones:

- 1) Tener en el grupo guanidínico un radical NH libre y un carboxilo asociado a un grupo NH_2 u - OH en alfa.
- 2) Que haya una cierta separación entre el primero y el segundo.

Se tiende a admitir que la arginasa se combina al resto guanidico de una parte y otra, la orientación de su grupo activo descansa sobre una atracción que el manganeso parece ejercer sobre el grupo carboxilo, amino o hidroxilo del sustrato. El metal se comportara como un agente coordinador entre la enzima y el sustrato por medio de sus últimos grupos.

Fuera de la arginina la arginasa actúa sobre la canavanina, de forma moderada sobre cupleina y monobenzoil-arginina. No actúa sobre la dibenzoil-arginina, al ester metílico de la arginina, ácido guanidín acético, creatina y creatinina (1).

Para la arginasa se han identificado diversas formas moleculares, es decir isoenzimas, las cuales presentan diferencias en algunas propiedades básicas como por ejemplo: movilidad electroforética, solubilización, sensibilidad al calor.

La caracterización de estas isoenzimas se ha venido realizando a través de los años con el propósito de entender la relación que existe entre las propiedades bioquímicas de la enzima y la función fisiológica de cada forma.

La evidencia indica que las isoenzimas son utilizadas para la dirección de metabolitos a lo largo de rutas metabólicas específicas (33). También pueden tener una determinada función catalítica conferida a una estructura o compartimento celular. Desde su descubrimiento, estas moléculas han sido relacionadas con la diferenciación de tejido. Por otra parte, se puede considerar la posibilidad de que algunas isoenzimas sean proteínas vestigiales, remanentes de la evolución genética.

En la tabla 5 se muestran algunas propiedades de arginasas aisladas de diferentes fuentes.

La arginasa mejor caracterizada es la obtenida de hígado de rata. Esta enzima tiene un peso molecular de 120,000 Daltones y un pH óptimo alrededor de 9.5 (34), tiene la propiedad de no ser desnaturalizada fácilmente por ácido, el tratamiento con ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) ocasiona su inhibición por remoción del Mn^{++} .

La inhibición puede ser completamente reversible con la adición de iones Mn^{+2} en el medio. (35).

El rango de pH óptimo para las isoenzimas de arginasa está entre 9.3 y 10.0.

Se ha encontrado que una variedad de iones metálicos activan y/o estabilizan a las arginasas de diferentes tejidos (36). Entre dichos iones tenemos al Mn^{++} , Co^{+} , Ni^{++} , e inclusive Fe^{++} .

Los iones Cu^{+} , Hg^{++} y Ag^{+} destruyen la actividad de la enzima en parte por precipitación de ésta.

**Tabla 5. Comparación de algunas propiedades
entre diferentes isoenzimas.**

| Animal | Tejido | P.M (Da) | pH Optimo | Km arginina (mM) |
|---------|-----------|----------------------|----------------|---------------------|
| Rata | Hígado | 120 000-142 000 (39) | 10 - 10.6 (39) | 2.4 (39) |
| | | | | 6.8 (45) |
| | | | | 13-45 (41) |
| | | | | 20-40 (50) |
| Rata | Riñón | 120 000 (13) | 7.5 y 9.3 (13) | 10.00 (45) |
| Rata | Intestino | 120 000 (13) | 10 (13) | 19.00 (13) |
| Caballo | Hígado | 130 000 (24) | - | 7.00 (50) |
| Conejo | Hígado | 130 000 (46) | - | 1.40 (46) |
| Oveja | Hígado | - | - | 09-20 (40) |
| Vaca | Hígado | 115 000-120 000 (40) | 9.5 -10.5 (40) | 1.00 (49) |
| | | | | 10.00 (48) |
| Ratón | Epidermis | - | 9.5 (47) | 20-40 (50) |

Estos iones protegen a la arginasa de hígado de rata de la disociación con dodecil sulfato de sodio (DSS), lo cual sugiere que están directamente involucrados en la creación de la forma tetramérica de la enzima (36).

Los estudios de resonancia magnética nuclear del enlace de Mn^{2+} a la arginasa de hígado de rata, muestran que la enzima con una actividad catalítica residual de 50%, no se disocia en subunidades, y contiene dos moles de manganeso por mol de arginasa (37). Esto sugiere que la enzima existe en la forma $E-Mn^{2+}$.

La remoción de estos iones activantes por cualquier medio, produce la inactivación de la enzima debido a la disociación en subunidades.

Hunter et al (38), reportaron que la arginasa de hígado de bovino muestra una actividad reducida en presencia de hidrolizados de proteína y que esta actividad disminuida es debida a la interacción de diferentes aminoácidos con arginasa, lo que conduce a la inhibición de la enzima. Estas combinaciones probablemente causan cambios conformacionales, los cuales deterioran el recambio del complejo enzima-sustrato.

Este estudio mostró que los inhibidores competitivos de arginasa de hígado de bovino fueron ornitina y lisina y los inhibidores no competitivos fueron los aminoácidos isoleucina, valina y cisteína.

Los estudios detallados de las cinéticas de inhibición de arginasa por diferentes aminoácidos, pueden ayudar a explicar el aumento en la actividad de la arginasa hepática reportado en los vertebrados bajo la influencia de ciertos factores como la dieta alta en proteínas (39), inanición (40), hormonas glucocorticoides (41), etc.

Kesevarao et al (42), estudiaron el efecto de 18 L-aminoácidos diferentes en la actividad de arginasa de hígado de oveja. Tabla 6.

Los aminoácidos alanina e histidina mostraron una estimulación ligera en la actividad enzimática.

Además de la prolina, sólo los aminoácidos acíclicos monocarboxílicos con 5 o más átomos de carbono (leucina, valina, lisina y ornitina) inhibieron a la arginasa de hígado de oveja.

La arginina que es el sustrato de la enzima, contiene 6 átomos de carbono.

Probablemente la longitud de la cadena carbonada es crítica en el aminoácido inhibidor para competir efectivamente con el (o los) sitio (s) activo (s).

La ornitina, lisina y prolina mostraron ser inhibidores competitivos. Para la arginasa de hígado de rata la ornitina actúa como inhibidor no competitivo.

El glutamato y metionina que contiene solo 5 átomos de carbono uno, no inhiben a la enzima. La presencia de un segundo grupo carboxilo en el glutamato y un átomo de azufre en la metionina, quizá disminuya su eficacia en la competencia por el sustrato.

Tabla 6. Efecto de los L-aminoácidos sobre arginasa de hígado de oveja.(42)

| Aminoácido (50mM) | Actividad de Arginasa (n de urea/h/mg prot) | Porcentaje de Cambio |
|----------------------|--|----------------------|
| Control | 147.3 | - |
| Alanina | 162.8 | +10.5 |
| Serina | 156.4 | + 6.2 |
| Treonina | 142.9 | - 3.0 |
| Aspartato | 148.4 | - 4.7 |
| Glutamato | 135.7 | - 7.9 |
| Cistina | 135.5 | - 8.2 |
| Metionina | 148.6 | - 4.6 |
| Valina | 32.7 | -77.8 |
| Leucina | 53.5 | -63.6 |
| Lisina | 46.2 | -68.6 |
| Ornitina | 27.6 | -81.3 |
| Tirosina | 155.7 | + 5.7 |
| Fenilalanina | 138.4 | - 6.0 |
| Triptofano | 138.4 | - 6.0 |
| Histidina | 175.1 | +18.9 |
| Prolina | 98.4 | -33.3 |

Hunter et al (39), reportaron inhibición de la arginasa de hígado de bovino por algunos aminoácidos no comunes como norvalina, norleucina y ácido aminobutírico.

La arginasa de cerebro de oveja es inhibida significativamente por la leucina, valina, lisina u ornitina; sin embargo la inhibición provocada por prolina no es muy significativa (tal como ocurrió para la arginasa de hígado de oveja). Esto puede ser debido a la posibilidad de que la arginasa este involucrada en la síntesis de prolina en el cerebro (43).

En adición a los aminoácidos arriba mencionados los siguientes compuestos inhiben a la arginasa: ácido clorogénico y sus derivados, colorantes de trifenil metano, ácido fosfórico y sulfonil urea.

Algunas investigaciones de interés particular son las que reportan inhibidores competitivos y no competitivos de arginasa, de bajos pesos moleculares, solubles y estables a 100°C. Estos inhibidores no se han purificado suficientemente como para permitir su identificación, pero sus propiedades sugieren que éstos son purinas y pirimidinas.

Así los productos del metabolismo de los ácidos nucleicos pueden influenciar el ciclo de la urea "in vivo". Algunos inhibidores de arginasa de estructura conocida (44), aparentemente se asemejan a la arginasa sin poseer un grupo guanidino.

Rosenfeld et al (44), han reportado que varias purinas son inhibidores competitivos de la arginasa de hígado de bovino, y que las pirimidinas son inhibidores no competitivos. De las purinas, el inhibidor competitivo más potente fué el ácido úrico.

La inosina es la que presenta una unión más débil para la L-arginina; el valor de Km encontrado fué de 300 a 400 mM. / Tabla 7.

Tabla 7 . Inhibidores (purinas y pirimidinas) de la arginasa de hígado de bovino.(44)

| Inhibidor | Ki (moles) |
|-------------------------|------------|
| <u>Competitivos:</u> | |
| Adenosina | 30 |
| Inosina | 40 |
| Adenina | 14 |
| Acido Úrico | 9 |
| <u>No Competitivos:</u> | |
| Citidina | 5 |
| Citosina | 0.9 |

ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides son las células sexuales masculinas que contienen la mitad de la información requerida para dar o rigen a un nuevo ser, dicha información se complementa cuando esta célula se une al óvulo.

Estas células se forman dentro de los tubos seminíferos de los testículos, el epitelio que recubre estos túbulos está formado por dos tipos de células básicas: las células de Sertoli de sostén y las células germinales en desarrollo. Las células germinales que descansan adyacentes al fondo o límite externo del túbulo, se llaman espermatogonias.

Estas células se dividen varias veces para producir las células especializadas que forman los espermatozoides.

Esta división celular, que reduce el contenido de DNA de las células a la mitad de las células somáticas, se conoce como espermato-génesis. (51)

A continuación se da una explicación más amplia de este proceso.

Espermatogénesis.

Como su nombre lo indica, este proceso significa la génesis de los espermatozoides. El proceso se inicia a partir de las espermatogonias, en realidad existen distintos tipos de estas células, las cuales sólo pueden diferenciarse por el aspecto de su núcleo. La espermatogonia tipo A de núcleo liso, luego de varias divisiones da lugar a células de núcleo costroso, denominadas espermatogonias de tipo B. La última mitosis de estas espermatogonias da lugar a los espermatocitos primarios, siendo éstos las células que sufren la división meiótica, es decir la mitosis en la que cada una de las células hijas conservan sólo la mitad de los cromosomas de la célula madre.

Esta reducción cromosómica permite la sobrevivencia de la especie, dado que al fusionarse el espermatozoide con el óvulo, que también ha sufrido una reducción similar, permiten nuevamente restablecer la cantidad cromosómica inicial.

Después de la primera división mitótica, las dos células hijas toman el nombre de espermatocitos secundarios, cuya vida es muy efímera, dura apenas unas horas, dividiéndose dos veces y dando lugar en la última de ellas a las espermátides. Estas células, finalmente, sin división alguna, pero sí a través de modificaciones y transformaciones morfológicas, dan lugar a los espermatozoides. Este paso se conoce con el nombre de espermiogénesis. Fig 17.

Se ha determinado que el lapso de tiempo transcurrido desde la primer división de los espermatocitos primarios, hasta la liberación de los espermatozoides es de aproximadamente 29 días en el carnero y la espermiogénesis es de 14 a 18 días (52).

Para poder determinar estos tiempos se han usado isótopos radiactivos para marcar el DNA, los más usados son el H y el P.

Las hormonas hipofisarias son las encargadas de actuar sobre el testículo a efecto de iniciar y mantener la espermatogénesis. La hormona luteinizante estimula las células de Leyding para que secreten testosterona, este compuesto estimula a los túbulos seminíferos y a las glándulas accesorias, para que produzcan el plasma seminal.

La hormona foliculo estimulante (FSH) estimula a las células de Sertoli; sin este estímulo no ocurre la conversión de espermátides en espermatozoides. Las células de Sertoli también secretan una proteína fijadora de andrógenos, que fija tanto testosterona como andrógenos y los pone a disposición del espermatozoide en maduración.

De este modo tenemos que la espermatogénesis es la consecuencia de la acción sinérgica de las hormonas arriba mencionadas (52, 53).

Transporte Epididimal.

Los espermatozoides testiculares se transportan de los testículos a través de un conducto convolutado conocido como epididimo. El cual, no sólo transporta a los espermatozoides distalmente de los testículos hasta el vaso deferente sino que durante dicho tránsito los espermatozoides sufren un proceso de maduración en el cual obtienen la capacidad para sostener la motilidad y se vuelven fértiles. Además funciona como un almacén para estas células. (51)

El paso de los espermatozoides a través del epididimo depende de las contracciones realizadas en la pared del conducto. Este tiempo de tránsito puede reducirse de 10 a 20 % mediante un aumento en la frecuencia de la evacuación o bien con el uso de agentes farmacológicos. (54)

El tiempo de tránsito esta en función de la especie, por ejemplo en el conejo es de 1 día, de 6 a 8 días en la rata, 11 días en el toro y 13 días en el carnero. (56,51)

Las propiedades funcionales de las diferentes células epiteliales que recubren el epididimo se mantienen mediante los andrógenos testiculares.

Estas células secretan un líquido nutriente especial que contiene hormonas (tanto testosterona como estrógenos), enzimas, glicerofosfolina, carnitina, calcio, fósforo y diferentes proteínas; to dos estos nutrientes pueden tener importancia, o incluso ser esenciales, para la maduración de los espermatozoides; sin embargo actualmente no se conocen exactamente los mecanismos en que están involucrados. (55)

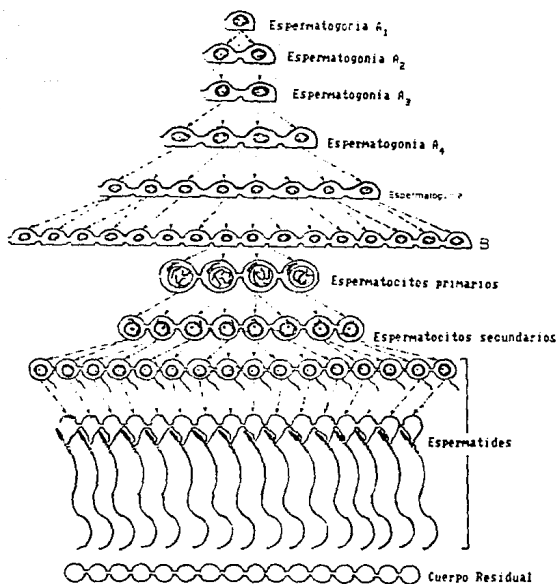


Fig 17. Diagrama de la espermatogénesis del borrego.

Anatómicamente el epididimo se encuentra dividido en tres zonas: cabeza, cuerpo y cola. Fig 18.

Los espermatozoides inmaduros que provienen de los túbulos seminíferos suben por los vasos eferentes (red testicular) a la cabeza del epididimo, para su maduración atraviesan el cuerpo hasta que llegan a la cola, en esta zona se tienen a los espermatozoides móviles y fértiles, los cuales junto con la secreción epididimal pasan a los vasos deferentes, aquí se mezclan con las secreciones de las glándulas accesorias (vesícula seminal, bulbouretrales, próstata), para de esta manera formar el semen, el cual es eyaculado durante el acto sexual.

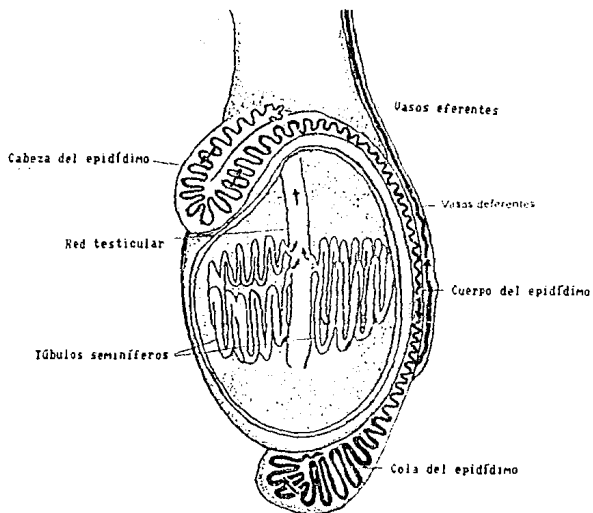


Fig 18. Representación del Epidídimo.

Maduración de los Espermatozoides.

Se cree que este proceso de maduración, en el cual los espermatozoides epididimales desarrollan la capacidad para una motilidad progresiva, involucra varios cambios progresivos en los patrones de movimiento de sus flagelos, la progresión rápida hacia adelante sólo ocurre con la reducción del arco y la flexibilidad de los movimientos de la cola.

La alteración en las propiedades estructurales de los elementos de la cola se apoya en los datos que indican que la formación de los puentes disulfuro ocurre durante el tránsito epididimal.

Los resultados de incubaciones in vitro apoyan la idea de que los enlaces disulfuro dentro del núcleo y la cola del espermatozoide también pueden ocurrir independientemente del ambiente epididimario, probablemente por oxidación de los grupos -SH de las proteínas a disulfuros. (56)

Las proteínas de la cromatina de espermatozoides de mamíferos contienen altas concentraciones de residuos de cistina entrecruzadas, esto sugiere que el desarrollo y los cambios en la cromatina involucra diferencias en el grado de enlaces disulfuro.

Los resultados indican que la mayor estabilidad de la cromatina nuclear de los espermatozoides de mamíferos ocurre después de la espermiación por formación de puentes disulfuro durante las etapas finales de maduración en el epididimo.

El tránsito a través del epididimo se asocia con cambios importantes de la cromatina de los núcleos del esperma. Este complejo proteico de DNA, del que una vez se pensó era relativamente inerte después de seguir su condensación durante las últimas fases de la espermiogénesis, sufre una reducción durante este tránsito. (55)

El nivel del nucleótido cíclico, específicamente el AMP cíclico (adenosinmonofostato), aumenta dos veces en el espermatozoide de bovino durante el paso a través del epididimo.

La actividad metabólica de los espermatozoides que se encuentran en el epididimo es baja, esto se debe principalmente a la baja presión parcial de oxígeno, también puede deberse en parte a la alta concentración de bicarbonato, potasio y sodio (los cuales actúan como inhibidores metabólicos) y a la deficiencia que se tiene de azúcar glicosilable.

Conforme aumenta la capacidad para la motilidad progresiva los espermatozoides sufren una pérdida progresiva de agua y un aumento correspondiente en la gravedad específica. La mayoría de las células contienen de 10 a 20 % de sólidos, sin embargo los espermatozoides contienen de 34 a 45 %.

Durante el tránsito epididimal ocurren cambios morfológicos en la posición de la gota citoplásmica y en la forma del acrosoma. La gota migra de la región de la cabeza del espermatozoide hacia una posición cercana al anulus, hasta que finalmente desaparece.

La presencia de la gota en un gran número de espermatozoides eyaculados es signo de inmadurez debido a que en la mayoría de las especies, la gota se separa del espermatozoide antes de que ocurra la eyaculación.

En este proceso de maduración los espermatozoides también desarrollan su habilidad para fecundar al óvulo. Esta capacidad de fecundar se considera potencial ya que muchos deben sufrir capacitación en el aparato femenino antes de poder penetrar al óvulo. La obtención del potencial de fecundación durante el tránsito epididimal parece ser un fenómeno progresivo. Por ejemplo, la fertilidad sólo se obtiene en los espermatozoides eliminados de la mitad distal del cuerpo del epidídimo, pero la tasa de fecundación es menor que la que se obtiene con espermatozoides eliminados de la cola del epidídimo o del vaso deferente.

El desarrollo de la capacidad para fecundar se asocia con cambios de varios aspectos de la integridad funcional del espermatozoide. (51)

Estudios ultraestructurales han mostrado que la apariencia y configuración topográfica de la membrana plasmática del esperma está alterada durante la maduración epididimaria. La membrana sufre marcadas modificaciones con respecto a las propiedades antigénicas glicoproteínas, receptores de lectinas, actividad de ATPasa, fosfo proteínas, grupos tiol, actividad de fosfatasa.

Durante este tránsito epididimario existe una disminución en el contenido lipídico total del espermatozoide, este decremento se atribuye a que probablemente estas moléculas son utilizadas como fuente de energía.

Este fenómeno ha sido reportado en toros, carneros, rata y jabali. La alteración en la composición lipídica durante la maduración podría ser debido a que es necesaria esta alteración de la estructura de la membrana para permitir la expresión de la motilidad y fertilidad. ()

Estructura del Espermatozoide.

Ya se mencionó como y donde se forman los espermatozoides, así como el proceso de maduración que deben de sufrir antes de ser eyaculados. Ahora se describirá brevemente la estructura de estas células.

Desde el punto de vista morfológico, el espermatozoide de mamíferos se divide en dos partes: cabeza y cola: ésta última a su vez dividida para su estudio en otras cuatro fracciones: cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal. Fig 19

Cabeza:

Esta porción está constituida principalmente por dos partes: el núcleo y el acrosoma.

El núcleo es oval y aplanado, contiene cromatina altamente compactada, que está protegida por una membrana esencial no porosa, se compone casi totalmente de ácido desoxirribonucleico (DNA) completándose con proteínas nucleares específicas llamadas histonas.

El número de cromosomas de estas células es la mitad del de las células somáticas de la misma especie.

Las dos terceras partes de la cabeza, están cubiertas por un capuchón llamado acrosoma. Esta estructura contiene un número de células hidrolíticas tales como hidrolasas ácidas, lipoglicoproteínas y hialuronidasas, las cuales están íntimamente relacionadas con el proceso de fecundación, ya que ayudan a disolver la zona pelúcida del óvulo.

Cola:

La cola es el elemento locomotriz por excelencia, sin descartar por ello que pudiese también estar afectada a tareas enzimáticas.

El cuello, de 1 micra de largo, contiene el centriolo proximal, que aparentemente sería el centro cinético del espermatozoide. En su unión con la cabeza, se originan 20 minúsculas fibras (filamento axial) que se agrupan formando dos anillos concéntricos de 9 fibras cada uno, que envuelven a su vez otras dos fibras centrales y que prolongándose hasta la pieza final, dan estructura y forman el verdadero esqueleto de la cola. Las dos fibras centrales incluso se prolongan aún más terminando en la pieza final.

El relajamiento y contracción de estas fibras son las que producen en la cola el característico movimiento de látigo que permite el avance de la célula.

La pieza media tiene 8 a 10 micras de largo y está constituida por el filamento axial, teniendo cerca de su unión con la pieza principal el centriolo terminal, al que se le atribuye la función de coordinar la secuencia de contracciones de sus fibrillas.

El filamento axial en su recorrido a través de la pieza media está envuelto por una banda espiral doble, que bien pudiera significar la fuente de energía para la movilidad de las fibras.

En la pieza media se encuentran las mitocondrias, las cuales contienen el sistema enzimático oxidativo necesario para producir adenosin trifosfato (ATP) que es utilizado para obtener energía para la movilidad y para la iniciación de la glicólisis.

La pieza principal está formada por las 20 fibras del filamento axial (cada vez más finas) y rodeada a partir del centriolo terminal por una triple banda espiral. Todo el filamento axial, desde el cuello hasta la pieza terminal, está encerrado en una vaina de naturaleza lipoproteica.

La pieza terminal está integrada solamente por las fibras sin banda espiral y vaina. (52,56)

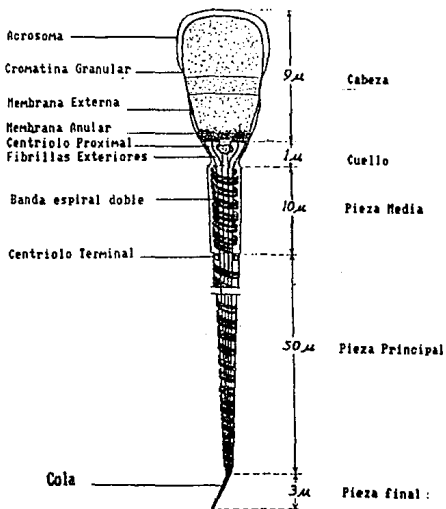


Fig 19. Representación Esquemática de un Espermatozoide.

Metabolismo del Espermatozoide.

Los espermatozoides son células metabólicamente activas debido a que poseen las enzimas necesarias para llevar a cabo las reacciones bioquímicas, la glucólisis (vía de Embden-Meyerhof), el ciclo tricarboxílico, la oxidación de los ácidos grasos, el transporte de electrones y posiblemente de la vía de hexosa monofosfato.

Bajo condiciones anaeróbicas los espermatozoides desintegran la glucosa, fructosa o manosa para convertirlas en ácido láctico. Esta actividad glucolítica, o más correctamente actividad fructolítica debido a que la fructosa es la principal azúcar seminal, permite a los espermatozoides sobrevivir bajo condiciones anaeróbicas de almacenamiento en caso de la inseminación artificial. Las enzimas que permiten este metabolismo glucolítico aparentemente se distribuyen a lo largo de la cola.

En presencia de oxígeno los espermatozoides utilizan una gran variedad de sustratos: azúcares glicosilables, lactato, acetato, L-aminoácidos, propionato, oxalacetato, glicerol, sorbitol, entre otros, los cuales son degradados para obtener energía.

Esta vía oxidativa que aparentemente se localiza en las mitocondrias, se considera más eficiente en la producción de energía que la fructólisis.

Se ha observado que la respiración del espermatozoide puede ser tanto endógena (cuando oxida sustratos intracelulares) y exógena (cuando oxida sustratos extracelulares). La respiración endógena del plasmátido intracelular puede proporcionar energía a corto plazo cuando se agotan los sustratos exógenos; sin embargo la utilización de esta reserva de energía aparentemente es perjudicial para el espermatozoide.

La mayoría de la energía obtenida es utilizada para los procesos de motilidad, otra parte se utiliza para mantener la integridad de las membranas de los espermatozoides que protegen a las células de la pérdida de sus componentes vitales.

Los espermatozoides pueden cubrir sus requerimientos de lípidos mediante la utilización de carbohidratos por medio de la síntesis de fosfolípidos y diglicéridos.

Existen por lo menos dos tipos de enzimas involucradas en el metabolismo de L-aminoácidos en el espermatozoide; la L-aminoácido oxidasa la cual es responsable de la deaminación oxidativa de la L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptofano, así como muchas transaminasas tales como la transaminasa glutámico-oxaloacética y la transaminasa glutámica-pirúvica.

Cabe mencionarse que durante la desaminación oxidativa se forma peróxido de hidrógeno, el cual es un agente tóxico ya que esta célula no contiene el sistema enzimático para destruirlo. (56)

En la Fig 20 se muestran las rutas metabólicas del espermatozoide.

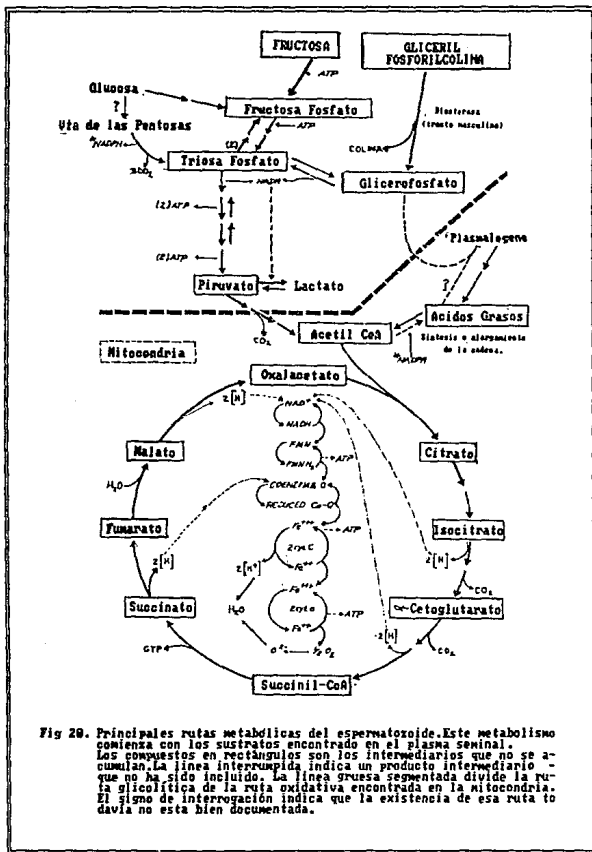


Fig 20. Principales rutas metabólicas del espermatocitoide. Este metabolismo comienza con los sustratos encontrados en el plasma seminal. Los compuestos en rectángulos son los intermediarios que no se acumulan. La línea interrumpida indica un producto intermediario que no ha sido incluido. La línea gruesa segmentada divide la vía glicolítica de la ruta oxidativa encontrada en la mitocondria. El signo de interrogación indica que la existencia de esa ruta todavía no está bien documentada.

METODO

El desarrollo experimental de esta tesis fué dividido en dos partes:

1) Determinación de diferentes parámetros bioquímicos en espermatozoides de borrego, se trabajaron cuatro grupos, los cuales son citados a continuación:

- 1) Espermatozoides eyaculados. (n=10)
- 2) Espermatozoides que provienen de la cabeza del epididimo. (n=10)
- 3) Espermatozoides que provienen del cuerpo del epididimo. (n=10)
- 4) Espermatozoides que provienen de la cola del epididimo. (n=10)

Las muestras de semen fueron de borregos sementales de las razas Sulffolk, Dorset y Finish del rancho C.O.P.E.A de la UNAM ubicado en Topilejo D.F., éstas fueron procesadas aproximadamente después de 40 min.

Se realizaron diluciones 1:1000 para realizar el conteo de células (Cámara de Neubauer).

Posteriormente las muestras fueron lavadas con buffer de fosfatos para separar el plasma seminal. Las células se resuspendieron en buffer y de aquí se tomaron alícuotas. Fig 22.

También se trabajó con testículos de borrego obtenidos del rastro de Ferrería, las muestras fueron procesadas aproximadamente 30 minutos después de la castración, durante todo este tiempo se mantuvieron en hielo.

Se extrajo el epididimo y se seccionó en tres fracciones: cabeza, cuerpo y cola. Cada fracción se maceró con buffer de fosfatos y posteriormente se filtró, la suspensión así obtenida fué analizada con el microscopio para verificar que no estuviera contaminada con otras células que no fueran espermatozoides.

Se realizó el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer, en este caso la dilución usada fué de 1:200. De esta suspensión se tomaron las alícuotas para la pruebas bioquímicas. Fig 23.

Las pruebas bioquímicas que se efectuaron fueron:

- 1) Actividad de arginasa.
- 2) Determinación de DNA.
- 3) Determinación de Proteínas.
- 4) Determinación de Materia Orgánica.

II) Efecto de las Poliaminas sobre la Actividad de Arginasa.

La enzima fué parcialmente purificada a partir de espermatozoides de borrego por medio de la técnica de Schimke (58). Fig 24.

La arginasa así obtenida fué tratada con las siguientes poliaminas.

| Compuesto | Concentración | |
|-------------|---------------|---------|
| Putrescina | 0.01 M | 0.05 mM |
| Espermidina | 0.01 M | 0.05 mM |
| Espermina | 0.01 M | 0.05 mM |

La enzima se incubó con estas poliaminas durante 1 hora a 55°C, posteriormente se siguió la técnica usual para determinar la actividad de arginasa. Para tener un punto de comparación se realizó también el aislamiento de la arginasa de hígado de rata probándose las mismas concentraciones de poliaminas. La técnica de aislamiento utilizada fué la misma que para el semen de borrego.

Desarrollo Experimental

Determinación de Diferentes
Parámetros Bioquímicos en
Espermatozoide

Efecto de las Poliaminas
sobre la Actividad de
Arginasa.

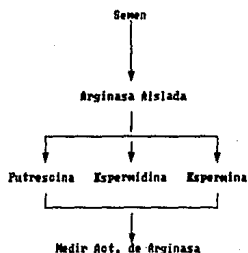
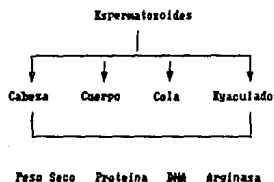


Fig 21. Diagrama del Desarrollo Experimental.

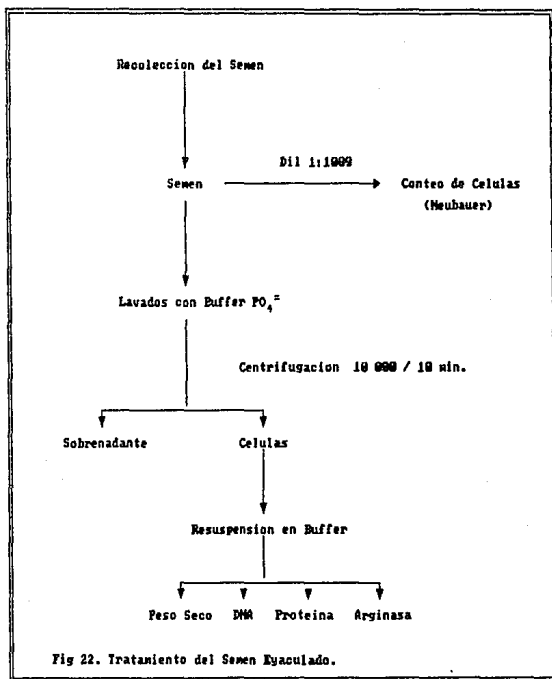
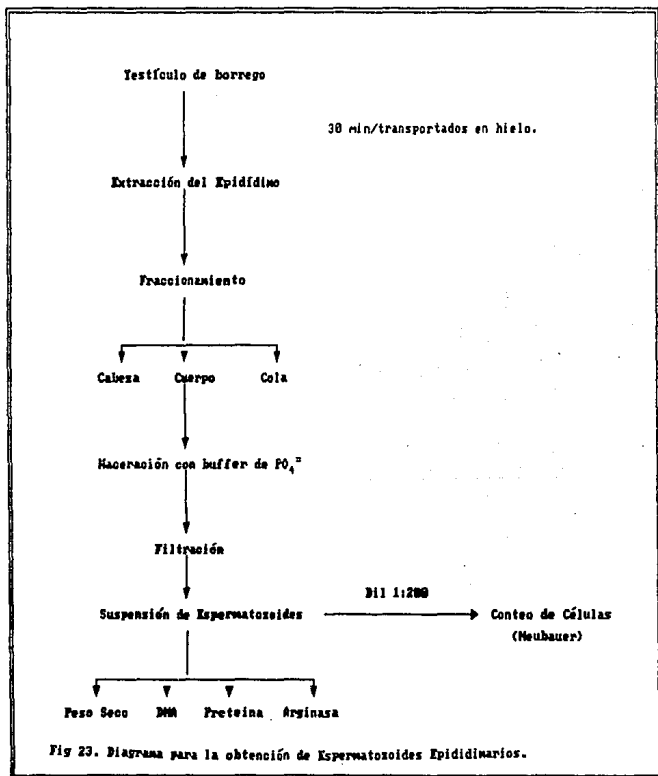


Fig 22. Tratamiento del Semen Eyaculado.



Aislamiento de la Arginasa de Espermatoxoides()

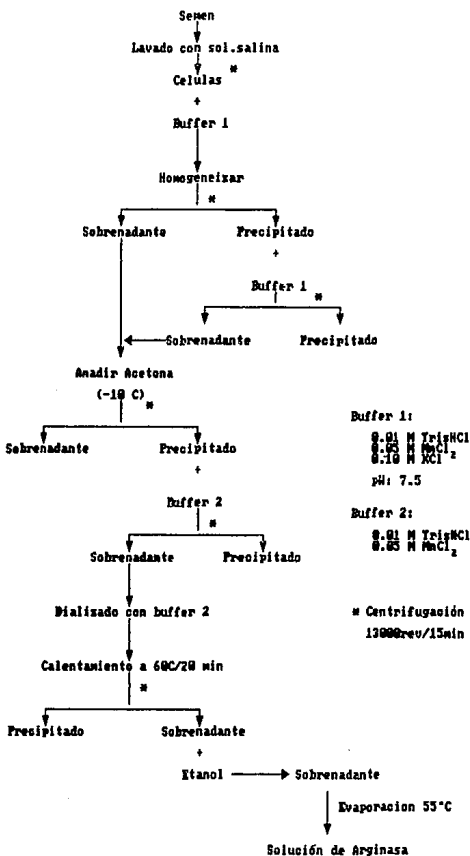


Fig 24. Aislamiento de la arginasa de Espermatoxoides.

TECNICAS

Las técnicas empleadas fueron las siguientes:

- Actividad de arginasa: La actividad de arginasa se determinó por el método de Kung et al, en el cual se mide la concentración de urea. Fig 25. (59)
- Determinación de DNA: La concentración se determinó por el método de Giles y Myers, basado en la reacción de la difenilamina con la desoxirribosa. Fig 26. (60)
- Determinación de Proteínas: Se utilizó el método de Lowry. Fig 27 (61)
- Determinación de Materia Orgánica (peso seco): Se empleó el método colorimétrico de Bernal et al, el cual se basa en la oxidación completa de la materia orgánica. Fig 28. (62)

DETERMINACION DE ARGINASA.

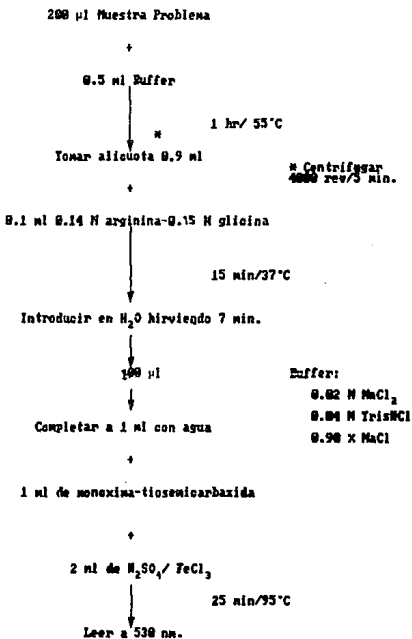


Fig 25.

DETERMINACION DEL DNA -

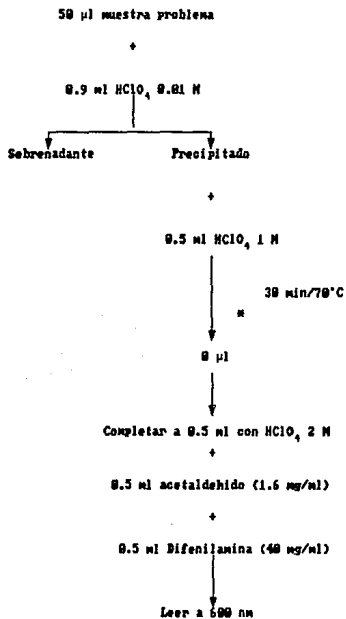


Fig 26.

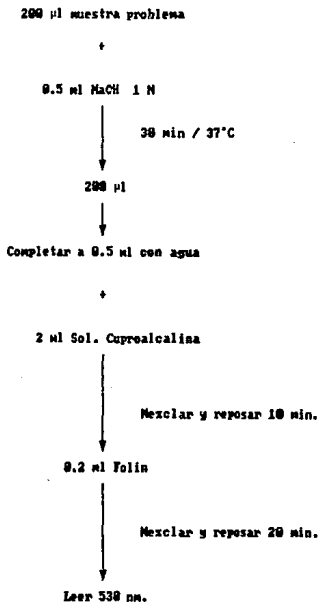
DETERMINACION DE PROTEINAS .

Fig 27.

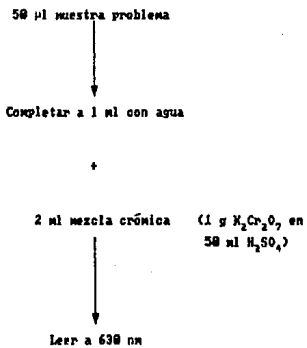
DETERMINACION DE PESO SECO.

Fig 28.

RESULTADOS

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros bioquímicos medidos en espermatozoides epididimarios obtenidos de diferentes fracciones y para espermatozoides eyaculados

La gráfica 1 corresponde a los resultados obtenidos para el DNA.

La gráfica 2 representa el contenido de proteína.

La gráfica 3 nos muestra la variación en la actividad de arginasa.

La gráfica 4 corresponde a los valores encontrados para la materia orgánica.

Sobre estos datos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con el modelo de un factor en el diseño completamente aleatorio. Para determinar cuáles eran los pares de medias diferentes se utilizó el prueba de la diferencia significativa mínima de Fisher. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 9.

En la tabla 10 se muestra el contenido de DNA que se obtuvo en espermatozoides eyaculados de diferentes razas de borrego. (Dorset, Finnish y Suffolk). Cada grupo trabajado tuvo una $n=4$.

En la tabla 11 se tienen los resultados obtenidos durante el aislamiento y purificación parcial de la arginasa de semen de borrego.

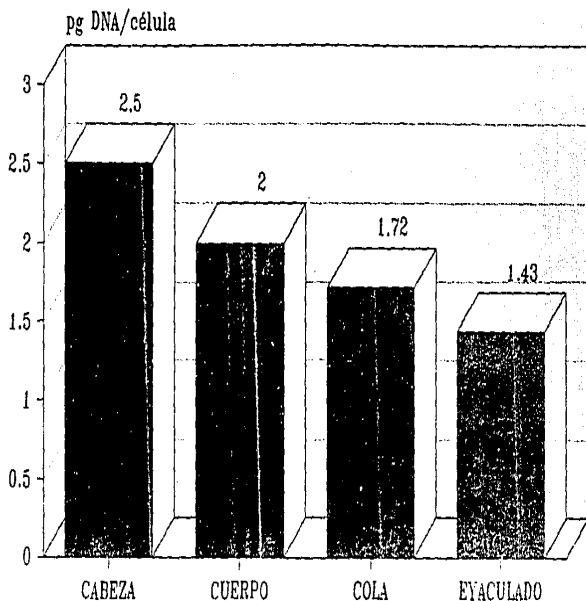
En la tabla 12 se tienen los resultados encontrados para el efecto que tienen las poliaminas a concentraciones de 0.01 M y 0.05 mM sobre la actividad de arginasa espermática de borrego y de higa de rata.

Tabla 8. Parámetros bioquímicos para espermatozoides epididimarios y eyaculados

| Determinación | Cabeza | Cuerpo | Cola | Eyaculado |
|---------------|-------------|------------|------------|--------------|
| Peso Seco | 14.13 ± 1.3 | 12.82 ± 3 | 14.20 ± 2 | 21.45 ± 1.98 |
| DNA | 2.58 ± 1.8 | 2.88 ± 0.6 | 1.72 ± 0.7 | 1.43 ± 0.78 |
| Act. Arginasa | 0.58 ± 0.2 | 0.46 ± 0.2 | 0.48 ± 0.1 | 0.25 ± 0.85 |
| Proteína | 3.95 ± 1.8 | 2.88 ± 0.6 | 1.44 ± 0.3 | 2.17 ± 0.68 |

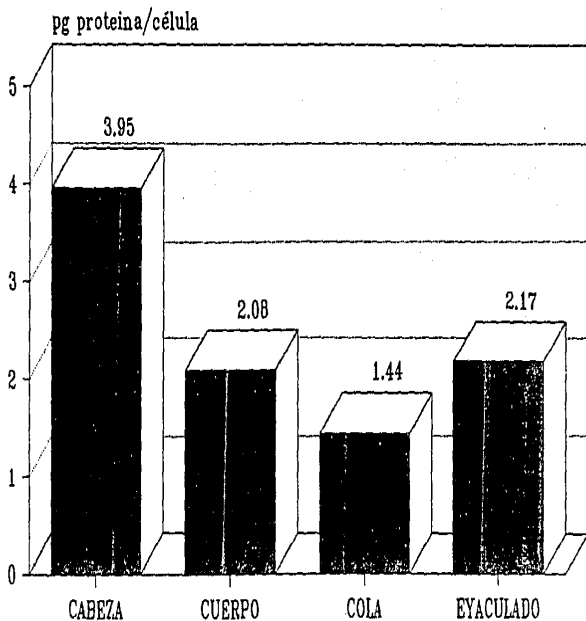
Los valores son el promedio de 18 experimentos ± Desv. Stand. Los resultados están dados en pg/célula. La actividad de arginasa está dada en nmol de urea/mg proteína/min.

CONTENIDO DE DNA EN ESPERMATOZOIDE DE DIFERENTES FRACCIONES DE EPIDIDIMO Y EN EYACULADO



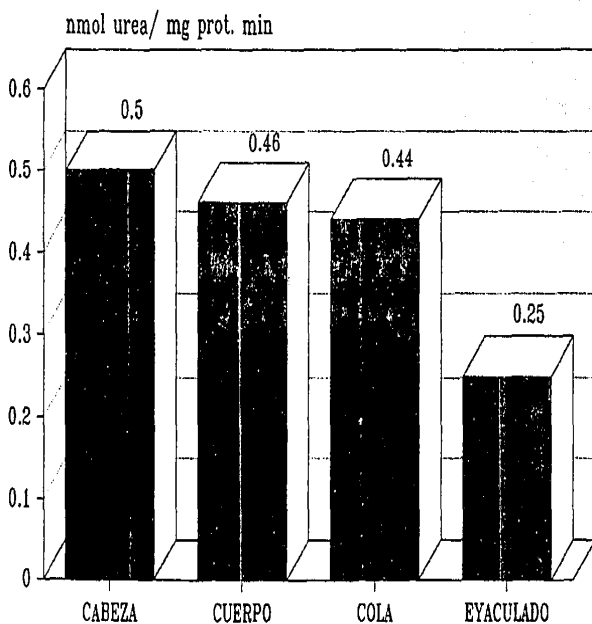
GRAFICA 1

CONTENIDO DE PROTEINA EN ESPERMATOZOIDE DE DIFERENTES FRACCIONES DE EPIDIDIMO Y EN EYACULADO



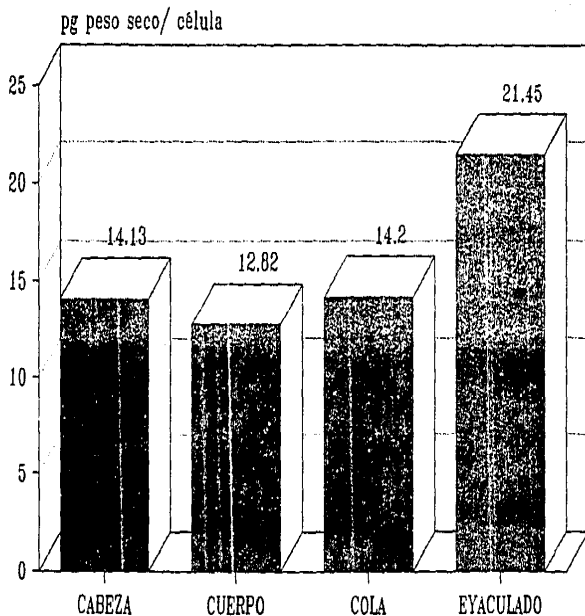
GRAFICA 2

ACTIVIDAD DE ARGINASA EN ESPERMATOZOIDE DE DIFERENTES FRACCIONES DE EPIDIDIMO Y EN EYACULADO



GRAFICA 3

CONTENIDO DE PESO SECO EN ESPERMATOZOIDE DE DIFERENTES FRACCIONES DE EPIDIDIMO Y EN EYACULADO



GRAFICA 4

Tabla 9. Resultados del análisis estadístico.

| Determinación | Diferencia al 5% de Significación | Grupos que la presenta |
|-----------------------|-----------------------------------|---|
| Actividad de Arginasa | SI | $G_1 - G_3$ $G_2 - G_3$ $G_3 - G_4$ |
| Peso Seco | SI | $G_1 - G_4$ $G_2 - G_4$ $G_3 - G_4$ |
| Proteína | SI | $G_2 - G_1$ $G_3 - G_1$ $G_4 - G_1$ |
| DNA | SI | $G_3 - G_1$ $G_4 - G_1$ |

Nota: G_1 = espermatozoides de cabeza, G_2 = espermatozoides de cuerpo, G_3 = espermatozoides de cola, G_4 = espermatozoides eyaculados .

Tabla 18. Contenido de DNA en espermatozoides de diferentes razas de borrego.

| RAZA | CONTENIDO DE DNA (pg / célula) |
|---------|-----------------------------------|
| SUFFOCK | 1.46+ 0.4 |
| DORSET | 1.44+ 0.3 |
| FINNISH | 1.43+ 0.5 |

NOTA: Estos datos son para espermatozoide eyaculado. n=4

Tabla 11. Purificación de la arginasa de semen de borrego.

| Paso | Act.Total | Prot.Total (mg) | Act.Especifica unidades/mg | Produccion X | Purificación veces |
|--|-----------|--------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1) Homogeneizado. | 0.3592 | 0.5925 | 0.6061 | 190.00 | 1.00 |
| 2) Sobrenadante del homogeneizado. | 0.2969 | 0.3428 | 0.8661 | 82.66 | 1.43 |
| 3) Precipitado redi suelto. | 0.6132 | 0.2699 | 2.2719 | 170.71 | 3.75 |
| 4) Sobrenadante an tes diálisis. | 2.0775 | 0.8192 | 100.2031 | 570.37 | 70.50 |
| 5) Sobrenadante des pues de diálisis | 4.4444 | 0.0074 | 600.5945 | 1237.30 | 90.75 |
| 6) Sobrenadante des pues calentamiento. | 4.0925 | 0.0052 | 904.8653 | 1362.00 | 92.60 |
| 7) Sobrenadante des pues de añadir etanol. | 5.9003 | 0.0029 | 2034.5062 | 1642.62 | 56.30 |

Tabla 12. Efecto de las poliaminas sobre la actividad de arginasa espermática de borrego y de hígado de rata.

| | Control | Putrescina | | Espermidina | | Espermina | |
|----|----------------------------------|------------|----------|---------------------------|----------|-----------|----------|
| | | <u>A</u> | <u>B</u> | <u>A</u> | <u>B</u> | <u>A</u> | <u>B</u> |
| 1) | 2.97±0.6 | 3.07±0.6 | 3.22±0.7 | 2.98±0.7 | 2.91±0.8 | 3.03±0.5 | 2.99±0.5 |
| 2) | 4.73±1.3 | 4.52±1.0 | 4.81±1.4 | 4.25±1.2 | 4.51±0.7 | 4.36±1.4 | 4.36±1.4 |
| 1) | Arginasa Espermática de borrego. | | | A) Concentración 0.01 M. | | n= 10 | |
| 2) | Arginasa de Hígado de Rata. | | | B) Concentración 0.95 mM. | | n= 10 | |

DISCUSION DE RESULTADOS

Uno de los métodos para evaluar la concentración de DNA en el espermatozoide ha sido la tinción de Feulgen.

Esta reacción requiere de un medio ácido para llevarse a cabo en estas condiciones se provoca la hidrólisis de las uniones purina--desoxirribosa de la molécula de DNA, de modo que se obtienen grupos aldehídos libres que reaccionan con el reactivo de Schiff produciéndose un compuesto colorido que absorbe a 560 nm. (63)

Los resultados obtenidos por este método han sido comparados con el método de absorción U.V encontrándose diferencia significativa entre ambos. (64)

En este trabajo se utilizó el método colorimétrico de Giles y Myers para determinar cuantitativamente el DNA. (60)

Como podemos observar en la gráfica 1, el contenido de DNA en espermatozoide de borrego disminuye de una manera significativa conforme la célula madura en el epidídimo; encontrándose el valor más bajo en los espermatozoides eyaculados.

Estos resultados coinciden con los reportes realizados por Bouters et al (63), Gledhill (64) y Moore et al (67); en los cuales se reporta una disminución en la tinción de Feulgen del complejo de desoxirribonucleoproteína (DNA + Proteínas Nucleares Básicas) durante el tránsito epididimario.

Un fenómeno similar del decremento de la tinción de Feulgen ha sido reportado por Salisbury et al (65), Hanada et al (66) durante el almacenamiento de espermatozoides in vitro.

Estas observaciones han sugerido fuertemente que un efecto de envejecimiento in vivo es responsable de la disminución en la tinción de Feulgen.

Si el decremento en dicha tinción fuera provocado por el envejecimiento, se esperaría encontrar en el primer eyaculado a las células más viejas y por lo tanto el valor más bajo de Feulgen-DNA.

Sin embargo estos resultados no fueron confirmados, ya que se analizaron eyaculados consecutivos de conejos y no se encontró diferencia significativa en los valores de Feulgen-DNA. (66)

También se ha demostrado que durante el paso epididimario las células espermáticas jóvenes y viejas se mezclan (68).

El uso de técnicas de microespectrofotometría UV han permitido demostrar que el envejecimiento no influye sobre la absorción del DNA espermático en la región UV.

También se pensó que la disminución en la tinción de Feulgen-DNA puede ser debido a una despurinización parcial; sin embargo es la hipótesis de que durante el almacenamiento las uniones purina--desoxirribosa podrían llegar a ser más sensibles a la hidrólisis quedó invalidada por la observación de que las curvas de hidrólisis para espermatozoides con valores altos y bajos en la tinción del DNA mostraron el mismo patrón.

La explicación más aceptable para la disminución en el material positivo a la tinción Feulgen que ocurre en el espermatozoide durante su paso a lo largo del tracto genital masculino y también en el método colorimétrico empleado en este proyecto, es que esta disminución resulta de cambios en la estructura del DNA, ya que se sabe que durante la maduración del espermatozoide se tiene un fuerte empaquetamiento de la cromatina y cambios en las proteínas nucleares, de histonas a proteínas más básicas ricas en arginasa (Protaminas). (69)

Gledhill et al (70) también reportaron una disminución similar en la reacción de Feulgen para el DNA espermático alargadas de toros durante su transformación a espermatozoides y subsecuentemente en el paso por el epidídimo. Ellos atribuyen esta disminución a cambios en las nucleoproteínas del espermatozoide. Fig. . Además se sabe que la naturaleza de la proteína puede afectar la estequiometría de la reacción. (63)

Aunque mucho se conoce acerca de la estructura de la cromatina en los núcleos somáticos, se conoce relativamente poco acerca de la estructura de la cromatina en el esperma.

Lo que sí se sabe es que las protaminas suministran las cargas necesarias para neutralizar los grupos fosfatos de la cadena de DNA. Con esto se hace evidente que el DNA en espermatozoides de mamíferos no se empaqueta de manera similar a como lo hace en las células somáticas.

Las protaminas en la cromatina espermática no constituyen un núcleo alrededor del cual el DNA se enrolla; sino que son utilizadas para neutralizar completamente las cargas del esqueleto fosfodiéster de la molécula del DNA, al neutralizarse se minimiza la repulsión entre los segmentos vecinos o moléculas de DNA y se permite su condensación, para formar una partícula de información genética bioquímicamente inactiva. (70)

Como podemos observar en los resultados el contenido de DNA en espermatozoide eyaculado no varía en función de la raza del animal.

El espermatozoide de borrego contiene 1.43 ± 0.7 pg DNA/célula, valor que concuerda con el de otras especies. Tabla . Existen algunos trabajos que reportan que ciertas cepas de ratones difieren en el contenido de DNA por más del 10%; sin embargo estudios realizados por Gilbert et al demostraron que los espermatozoides epididimarios aislados de varias cepas de ratón no difieren significativamente en su contenido de DNA. (71)

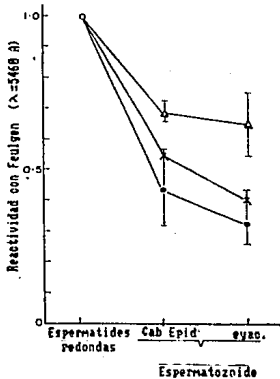


Fig 29. Reactividad promedio de Feulgen para 5 toros con baja fertilidad por causa desconocida (Δ), un toro con degeneración testicular (x) y 3 toros con fertilidad normal (\bullet). Una marcada reducción en la reacción de feulgen se observa conforme el espermatozoide pasa por el epididimo, lo cual sugiere que ocurre un rearrreglo molecular en la cromatina.

**Tabla 13. Contenido de DNA en espermatozoides
de algunas especies de vertebrados**

| ESPECIE | NO. DE CROMOSOMAS | CONTENIDO DE DNA. |
|---------|-------------------|-------------------|
| Raton | 40 | 3.30 (71) |
| Pavo | MC | 2.03 - 2.30 (91) |
| Gallina | 78 | 1.10 - 1.26 (91) |
| Borrego | 54 | 1.43 + 0.70 |

NOTA: MC= dato no encontrado. Los numeros entre parentesis son las referencias.

Con respecto al contenido de proteína se encontró que el mayor valor correspondía a los espermatozoides obtenidos de la cabeza del epidídimo, mientras que no hubo diferencia significativa entre los valores de las otras células del epidídimo y el eyaculado. Gráfica 2.

Esta disminución en el valor de las proteínas se explica debido a que durante el tránsito epididimario se tienen cambios en la membrana plasmática del espermatozoide, entre los cuales se observan desaparición de algunos compuestos proteínicos.

Por ejemplo, estudios de Dacheux et al (72) realizados en jabalí, demostraron que la maduración epididimaria se acompaña por una desaparición progresiva de la mayoría de los compuestos de la superficie testicular, los cuales son renovados o enmascarados por polipéptidos de bajo peso molecular permanentes o transitorios sobre la superficie de la membrana plasmática.

En este estudio se mostró claramente que la mayoría de las proteínas de la membrana de espermatozoides testiculares desaparecen conforme pasan los espermatozoides por el epidídimo, su desaparición es gradual; por ejemplo: La glicoproteína del jabalí de 105-115 KDA desaparece de la superficie espermática en la cola del epidídimo. Sin embargo, algunas proteínas de 75-96 KDa desaparecen rápidamente.

Al respecto, Colin et al (73) sugieren que hay una considerable re construcción de las glicoproteínas de la membrana del espermatozoide durante su maduración en el epidídimo y algunos de esos cambios son causados por una interacción directa entre el espermatozoide y las proteínas secretorias epididimarias. Estas glicoproteínas son sintetizadas en diferentes regiones y su función está asociada con la capacidad fertilizante del espermatozoide.

Estos autores encontraron que las proteínas de la membrana del espermatozoide de rata que desaparecen durante el tránsito epididimario tienen pesos moleculares de 110 000, 47 000 y 32 000 Daltones. Cuando el espermatozoide entra en la cola del epidídimo se observa la aparición de una proteína de 37 000 Da, la cual se piensa proviene de las secreciones epididimarias.

Se cree que las glicosil transferasas (las cuales han sido reportadas en fluidos testiculares y epididimarios (74,75) podrían actuar de una manera concertada con las glicosidasas para modificar los componentes de la membrana preexistente.

Todos los estudios en donde se ha investigado el tipo de proteínas que aparecen o desaparecen han sido realizados utilizando la técnica de marcaje con galactosa oxidasa/ NaB ^{3}H . Sin embargo se han reportado algunas limitaciones de esta técnica para el marcaje en membranas celulares, ya que se ha encontrado que las glicoproteínas de la membrana que no contienen D-galactosa o N-acetil D-galactosamina accesibles no se marcan. (73)

El origen de estos cambios en la superficie no se conocen a ciencia cierta, sin embargo se han propuesto diversos mecanismos.

- 1) Actividades enzimáticas, ya sea intra o extracelulares como: proteinasas, glicosidasas y galactosiltransferasas.
- 2) Asociación a la membrana de compuestos exógenos que son capaces de enmascarar algunos otros polipéptidos de la superficie.

También se han realizados estudios en espermatozoides de borrego (72,80) y se ha encontrado que los polipéptidos de la membrana espermática de 78-88 KDa desaparecen durante el tránsito epididimario.

En esta especie se ha observado que la desaparición de dos compuestos de la superficie de espermatozoides testiculares, los cuales tienen 97 KDa, está asociada con la aparición de un polipéptido más glicosilado que tiene también 97 KDa.

Por otro lado, se han encontrado nuevos compuestos en la superficie de la membrana del espermatozoide durante el proceso de maduración; estos compuestos nuevos se caracterizan por tener un peso molecular bajo y una alta glicosilación. (72,77)

Este fenómeno ha sido descrito tanto para espermatozoide de borrego (77) como en espermatozoides de-rata (76), chimpancé (78) y humano (79).

Estas evidencias confirman los resultados obtenidos en este trabajo para el contenido de proteína en espermatozoides epididimarios y de espermatozoides eyaculados en los cuales no existe una diferencia significativa, ya que si bien es cierto que se tiene la aparición de nuevos compuestos proteínicos, estos son de bajo peso molecular y no representan un aumento significativo al compararse con la cantidad de proteínas que desaparecen a lo largo de la maduración.

Es probable también que el mayor contenido de proteína que se observa en el espermatozoide de la cabeza del epidídimo se debe en parte al tipo de proteínas que se encuentran unidas al DNA en las primeras etapas de la maduración.

Es posible que aunque ocurre un remplazamiento de histonas de tipo somático por histonas de tipo espermático, todavía existan proteínas con grupos aromáticos que son posteriormente reemplazados por otro tipo de proteínas más básicas; las protaminas, las cuales tienen una menor cantidad de grupos aromáticos, teniéndose de este modo una menor capacidad de formación de complejos coloridos.

Las histonas ayudan al empaquetamiento del DNA confiriéndole protección contra la desnaturalización térmica y la acción enzimática Fig 30.

La relación entre los cambios en la superficie del espermatozoides y la composición proteínica del fluido epididimario con la capacidad fertilizante del espermatozoides no se conoce con precisión.

Sin embargo, las transformaciones secuenciales del espermatozoides que ocurren en la parte anterior del epidídimo induce cambios en la actividad espermática que llegan a ser totalmente expresados en el cuerpo del epidídimo. Por ejemplo: El incremento en el porcentaje de la motilidad espermática o su habilidad para aglutinarse o unirse al óvulo.

En la región posterior, los nuevos glicopéptidos en la superficie del espermatozoides aparecen simultáneamente con la iniciación de la motilidad progresiva de los gametos y de su capacidad fertilizante.

(72)

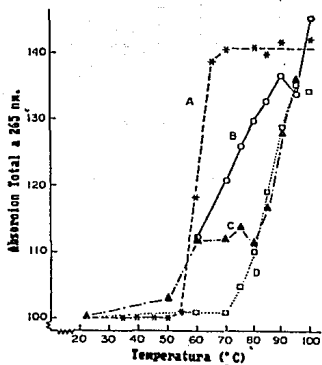


Fig 38. Patrón de absorción a 265 nm de DNA de diferentes fuentes expuestas a diferentes temperaturas.
 DNA extraído de timo de vaca (A), de espermátides de toro (B), de núcleos de eritrocitos de gallina (C) y de espermatozoides esculados de toro (D).

Como se puede observar en la gráfica 3, la actividad de arginasa disminuye conforme el espermatozoide madura, lo cual confirma nuestra hipótesis.

Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por Bamberg et al (81) en espermatozoide de borrego, quienes observaron una disminución marcada en el contenido de putrescina, espermidina y espermina. Tabla 14

Como se mencionó anteriormente, para iniciar la biosíntesis de poliaminas se requiere de ornitina, la cual es descarboxilasa por acción de la enzima ODC para formar putrescina, precursores de espermidina y espermina. Por lo tanto al no producirse la misma cantidad de poliaminas, la cantidad de ornitina que se necesita también es menor y dado que la arginasa es la enzima que produce ornitina y urea a partir de la arginina, ésta debe disminuir su actividad regulándose así la biosíntesis de las poliaminas.

La presencia de actividad de arginasa demuestra que en la célula espermática se presenta completo el sistema de síntesis de poliaminas, puesto que la presencia de la ODC ha sido descrita en el espermatozoide y plasma seminal humano (82,83)

De este modo se confirma que la arginasa es una de las enzimas que junto con la ODC regula la biosíntesis de poliaminas en la célula espermática.

Se cree que la función de las poliaminas en el espermatozoide está relacionada con el empaquetamiento del DNA, ya que tienen propiedades similares a las de las histonas y protaminas debido a su naturaleza catiónica.

La presencia y función de las poliaminas en el sistema reproductivo del macho ha sido descrita en detalle por Méndez. (57)

Estos compuestos han sido particularmente estudiados en semen, testículo y próstata. Recientemente han sido asociadas con la capacitación y proceso de fertilización.

Susuki et al (84) determinaron la actividad de poliamina oxidasa en varios órganos humanos. Esta actividad es muy alta en el hígado seguido por el testículo (339 + 80 nmol/g peso/30 min).

Esta elevada actividad en el testículo está relacionada con proceso de espermatogénesis.

Por otro lado, se ha demostrado que la espermina y espermidina están presentes en la próstata en grandes cantidades.

De la próstata de rata se han aislado y purificado las siguientes enzimas: ODC, SAMD y espermina sintasa.

De la próstata humana se ha aislado particularmente SAMD.

Williams-Ashann et al (85) reportaron que el semen humano contiene altas concentraciones de espermina (5 a 15 mM) además de tener espermidina, putrescina y cadaverina.

El hecho de que la concentración de espermina en el semen humano es mucho más alta que en cualquier otro tejido y fluido del cuerpo permite hacer varias especulaciones de su papel fisiológico.

Evidencias que han sido obtenidas por estudios in vitro muestran que la espermina también aumenta la actividad de maltasa seminal,

**Tabla 14. Contenido de poliaminas en
espermatozoides de borrego(81).**

| Amina | Cabeza (proximal) | Cabeza (distal) | Cuerpo | Cola |
|-------------|----------------------|--------------------|---------------|---------------|
| Putrescina | 111.7 + 72.4 (6) | 8.5 + 4.2 (5) | 7.9 + 2.1 (5) | 2.5 + 2.1 (6) |
| Espermidina | 38.4 + 27.2 (5) | 4.5 + 2.3 (5) | 9.8 + 4.7 (5) | 1.2 + 0.6 (5) |
| Espermina | 58.2 + 63.2 (4) | 1.6 + 1.2 (3) | 7.9 + 0.6 (3) | 1.9 + 0.1 (5) |

Los valores son la media + la desviación estandar. Los numeros entre parentesis son las determinaciones. Los valores estan dados en nmol/ 10⁸ celulas.

la cual está involucrada en la degradación de glucógeno, incrementa la utilización de glucosa y reduce la de fructosa.

Adiciones de cantidades fisiológicas de espermina a suspensiones de espermatozoides causan un aumento significativo en los niveles de AMP cíclico, un nucleótido que induce la capacitación del espermatozoide humano.

La presencia de poliaminas ha sido demostrada en espermatozoides de epidídimo de bovino y sus perfiles han sido estudiados en testículos de rata, células germinales y células de sertoli durante la maduración testicular. (86)

Por medio de técnicas histoquímicas también fué posible demostrar la presencia de la ODC en células de sertoli, intersticiales y germinales. (87)

Con respecto al peso seco podemos decir que durante todo el tránsito epididimario no se tienen modificaciones significativas, lo cual concuerda con los reportado por Gledhill (64) en donde se informa que no existen cambios en la masa seca de la cabeza del espermatozoide durante este período.

Sin embargo, se observa un aumento significativo en los valores para peso seco de los espermatozoides eyaculados, esto podría ser explicado debido a que durante el tránsito epididimario la membrana espermática sufre modificaciones ya que las proteínas se glicosilan.

Estudios realizados por Magargee et al en la membrana espermática de borrego apoyan estas observaciones, ya que el uso de lectinas permite detectar las modificaciones en la membrana.

Las lectinas son proteínas con alta especificidad para unirse a determinados tipos de carbohidratos.

Las lectinas utilizadas en este estudio se muestran en la tabla 15.

Con la Con A no se encontró una diferencia muy grande en los valores obtenidos durante la maduración, lo cual indica que durante el tránsito epididimal y subsecuente eyaculación el número de residuos de manosa de la superficie del espermatozoide de borrego no es muy variable.

Con la SBA se encontró que durante la maduración de las células se tiene una disminución en la cantidad de lectina unida, sin embargo el grado de unión aumenta considerablemente en los espermatozoides eyaculados. De este modo que el número de residuos de N-acetilgalactosamina se reduce durante la maduración epididimaria o bien en esta etapa se fijan nuevos compuestos, los cuales los enmascaran y no permiten la unión con la lectina.

Con las lectinas RCA, PNA y ECA los autores observaron una disminución progresiva, de tal manera que el valor más bajo se obtuvo para los espermatozoides eyaculados; estos resultados sugieren que hay una disminución en los residuos de galactosa, estos residuos pueden ser modificados por enzimas presentes en suspensión espermática. (88)

Con la WGA se encontró que las uniones con esta lectina se incrementan conforme el espermatozoide madura. Este comportamiento puede ser debido a:

- 1) Adición de residuos de N-acetilglucosamina. Vía galactosiltransferasa. (75). Lo que ha sido confirmado ya que se realizaron estudios que demostraron que la unión de esta lectina puede ser bloqueada cuando el WGA se añade a los espermatozoides en presencia de N-acetilglucosamina como inhibidor competitivo.
- 2) Adición de residuos de ácido siálico. Vía sialil-transferasas. (89)

Esto ha sido reportado para espermatozoides de rata, ratón, hamster y carnero.

En este trabajo se utilizó una técnica colorimétrica para determinar la concentración de materia orgánica total, este método ofrece la ventaja de oxidar todos los compuestos orgánicos siendo especialmente sensible para los carbohidratos. Por otro lado, se ha reportado que la membrana de espermatozoides al estar interactuando con el plasma seminal adquiere nuevos compuestos del tipo de los CHOS; es por esto que en espermatozoides e yaculados se encuentra un valor más alto en el contenido de peso seco con respecto a los espermatozoides epididimarios.

**Tabla 15. Fijación específica de lectinas a
residuos de carbohidratos. (88,90)**

| LECTINA | NOMBRE | RESIDUO AL QUE SE UNEN |
|---------|-------------------------------|--|
| Con A | Concanavalina A | Manosa |
| SBA | Aglutinina de soya | N-acetilgalactosamina |
| RCA | Aglutinina communis ricinus | Galactosa |
| TNA | Aglutinina de chicharo | Galactosa |
| ECA | Lectina Erythrina cristagalli | Galactosa |
| MCA | Aglutinina de germen de trigo | Acido sialico . Dímeros de N-acetilglucosamina. |

Para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de poliaminas (0.01M y 0.05 mM) sobre la actividad de arginasa se requirió del aislamiento y purificación parcial de la arginasa de semen de borrego.

La enzima obtenida de las células espermáticas fué purificada 56.3 veces.

También se hizo el aislamiento y purificación parcial de la arginasa de hígado de rata.

Como se puede observar en la tabla 12, la actividad de estas enzimas no fué modificada significativamente por las dos concentraciones de poliaminas probadas.

En un principio sería fácil suponer que se obtuvieron estos resultados debido a que la concentración del inhibidor no fué la adecuada, se pensaría que al ser 4.5 veces mayor la concentración de sustrato con respecto al inhibidor (poliaminas), la disminución en la actividad no sería significativa; sin embargo en estudios realizados por Rosenfeld et al (44) en arginasa de hígado de toro se encontró que había inhibición significativa de la enzima aún al usar concentraciones de sustrato 10 y 20 veces mayores que la concentración de los inhibidores (purinas y pirimidinas)

En los trabajos realizados por Hunter et al (38) se reportó que usando concentraciones 2,4 y 8 veces mayores de sustrato con respecto al inhibidor estudiado se tiene inhibición significativa de la enzima. En la tabla 16 se muestra la inhibición por ornitina de varias concentraciones de arginina.

Por otra parte se ha observado que otras enzimas con concentraciones de sustrato 5 veces más grandes que las del inhibidor se activan; tal es el caso de la G-6-Fosfatasa, que con concentraciones de putrescina 0.001 M y de G-6-Fosfato 0.005 M presenta una actividad. (92)

La explicación de porque las poliaminas no presentaron efecto inhibitorio sobre la actividad de arginasa se puede deber a los siguientes:

- Para que un compuesto sea sustrato de la arginasa es necesario - que contenga un grupo guanidínico, un grupo NH_2 libre y un carbono asociado a un grupo NH_2 u $-\text{OH}$ en posición alfa.
- Que exista cierta separación entre el primero y el segundo.

Por lo tanto al no cumplir las poliaminas con estas dos características no es posible que actúen como sustrato para la arginasa

Al ser la arginasa una enzima tetramérica que necesita de iones Mn^{++} para preservar su actividad se pensó que las poliaminas al ser moléculas policatiónicas podrían tener alguna interacción electrostática con la enzima, favoreciéndose de este modo un impedi-

mento estérico por las poliaminas, de tal manera que la enzima tuviera más dificultades para unirse al sustrato obteniéndose así una disminución en la actividad de la enzima.

Sin embargo los resultados obtenidos a estas dos concentraciones han invalidado la hipótesis inicialmente planteada, de que las poliaminas disminuyen la actividad de arginasa.

**Tabla 16. INHIBICION DE LA ARGINASA EN FUNCION
DE LA CONCENTRACION DE ORNITINA (38)**

| CONCENTRACION DE ARGININA (M) | CONCENTRACION DE ORNITINA (M) | ACTIVIDAD DE ARGINASA (unidades/ml) |
|------------------------------------|------------------------------------|--|
| 0.0297 | 0.0297 | 5.2 |
| | 0.0149 | 7.9 |
| | C | 15.7 |
| 0.0445 | 0.0445 | 4.5 |
| | 0.0223 | 6.8 |
| | 0.0111 | 9.4 |
| | C | 14.8 |
| 0.0667 | 0.0667 | 5.1 |
| | 0.0334 | 8.1 |
| | C | 17.6 |
| 0.089 | 0.089 | 3.9 |
| | 0.0445 | 6.8 |
| | 0.0223 | 8.8 |
| | 0.0111 | 10.8 |
| | C | 13.5 |

NOTA: C= Experimento control sin inhibidor.

CONCLUSIONES

- 1) Se encontró actividad de arginasa en el espermatozoide de borrego.
- 2) La actividad de arginasa disminuye conforme el espermatozoide - madura.
- 3) Esta actividad no es modificada de manera significativa por las concentraciones de poliaminas usadas en este estudio. (0.01 M y 0.05 mM).
- 4) El contenido de DNA no varía conforme la célula madura, los resultados obtenidos son debido al fuerte empaquetamiento que sufre la cromatina.
- 5) El contenido de materia orgánica es mayor en espermatozoides eyaculados.
- 6) El contenido de proteína total es mayor para células espermáticas de la cabeza del epidídimo comparado con el de espermatozoides eyaculados.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Méndez, J.D.: Foliaminas. en: Bioquímica e Inmunología. Hicks, J. J. y Zagoya, J.C. (Eds), Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. 1984, Vol 2, pp 366-385.
- 2) Mann, T. and Lutwak, C.: Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. in: Male Reproductive Functions and Semen. Mann, T. (Ed), John Wiley & Sons, New York, USA, 1981, pp 1-11.
- 3) Morgan, L.M.D.: Polyamines. Essays in Biochemistry. 23:83-113, 1987.
- 4) Pegg, E.A.: Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. Biochem. J. 334:249-262, 1986.
- 5) Heby, O., Persson, L.: Molecular genetics of polyaminic synthesis in eukaryotic cells. TIBS. 15:153-158, 1990.
- 6) Morris, R.D.A.: New perspective on ornithine decarboxylase regulation: Prevention of polyamine toxicity is the overriding theme. J. Cell. Biochem. 46:102-105, 1991.
- 7) Sheth, R.A., Moodbidri, B.S.: Significance of polyamines in reproduction. Adv. Sex. Horm. Res. 3:51-74, 1977.
- 8) Lehninger, A.L.: Biochemistry. Worth, New York, 1970.
- 9) Spector, B.E., Rice, S.C.H., Moedjono, S., Bernard, B. and Cederbaum, D.: Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. Biochem. Med. 28:165-175, 1982.
- 10) Méndez, J.D. and Hicks, J.J.: Metabolismo de poliaminas en microorganismos. Rev. Soc. Quim. Mex. 31(1,2,3):4, 1987.
- 11) Zamecka, E., Poremska, Z.: Five forms of arginase in human tissues. Biochem. Med. Met. Biol. 39:258-266, 1988.
- 12) Kaysen, G.A and Strecker, A.J.: Purification and properties of arginase of rat kidney. Biochem. J. 133:779-788, 1973.
- 13) Fujimoto, M., Kameji, T. and Kanaya, A.: Purification and properties of rat small intestinal arginase. J. Biochem. 79:441-449, 1976.

- 14) Harri, M. and Hartiala, K.: Arginase activity in rat small intestinal mucosa. *Acta. Physiol. Scand.* 89:126-128, 1973.
- 15) Sadasivudu, B., and Indira, H.R.: Distribution of the rat enzymes involved in the disposal of arginine and ornithine in different regions of rat brain. *Brain. Res.* 79:326-329, 1974.
- 16) Matsuzaki, S., Suzuki, M. and Hamana, K.: A possible role of arginase in the regulation of polyamine biosynthesis in the rat thyroid. *Acta. Endocrinológica.* 98:57-61, 1981.
- 17) Brown, V.K.H. and Box, V.L.: The influence of some alicyclic hydrocarbons on the arginase activity of guinea pig skin. *Br. J. Derm.* 85:432-436, 1971.
- 18) Cotton, D.W.K. and Mier, P.D.: Role of arginase in the epidermis. *Nature (London)* 252:616, 1974.
- 19) Herzfeld, A. and Raper, S.: The heterogeneity of arginase in rat tissues. *Biochem. J.* 153:469-478, 1976.
- 20) Glass, R. and Knox, E.: Arginase isozymes of rat mammary gland, liver and other tissues. *J. Biol. Chem.* 248: 5785-5789, 1973.
- 21) Carvajal, N., Martínez, J. and Fernández, M.: Immobilized monomers of human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.* 481:177-183, 1977.
- 22) Baldwin, R.L. and Milligan, L.P.: Enzymatic changes associated with the initiation and maintenance of lactation in the rat. *J. Biol. Chem.* 241:2058-2065, 1966.
- 23) Folley, S.J. and Greenbaum A.L.: Changes in the arginase and alkaline phosphatase contents of the mammary gland and liver of the rat during pregnancy, lactation and mammary involution. *Biochem. J.* 41:261-268, 1947.
- 24) Cabello, J., Basilio, C. and Prajoux, V.: Kinetic properties of erythrocyte and liver arginase. *Biochim. Biophys. Acta.* 48: 148-152, 1961
- 25) Klein, D. and Morris, D.R.: Increased arginase activity during lymphocyte mitogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 81:199-204, 1978.
- 26) Alhonen-Hongisto, L., Seppanen, P., Holtta, T. and Janne, J.: Replacement of natural polyamines by cadaverine and its amino-propyl derivatives in Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 106:291-297, 1982.

- 27) Beruter, J., Colombo, J. and Bachmann, C.: Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem. J.* 175:449-454, 1978.
- 28) Ugarte, G., Pino, M.D., Peirano, P. and Marusi, F.: Serum arginase activity in subjects with hepato cellular damage. *J. Lab. Clin. Med.* 55:522-528, 1960.
- 29) Noonan, N.E., PhD and Dennis, J.M.: Use of plasma arginase and γ -glutamyl transpeptidase as specific indicators of hepatocellular or hepatobiliary disease in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 140(7):942-947, 1979.
- 30) Rodríguez, C.A., Núñez, C.J., Peláez, R.J y Conde, R.L: Actividad arginásica en enfermedades cardiopulmonares. *Rev. Clin.Esp* 124:369-374, 1972.
- 31) Rodríguez, C.A., Mora, L.R.J., Morata, F.G. y Peláez, R.J.: Accidentes vasculares del encéfalo. Valor de la arginasa sérica en el diagnóstico diferencial. *Rev. Clin. Esp.* 124:369-374, 1972.
- 32) Stewart, J. and Caron, H.: Arginases of mouse brain and liver. *J. Neurochem.* 29:657-663, 1977.
- 33) Farron, F.: Arginase isoenzymes and their detections by catalytic staining in starch gel. *Anal. Biochem.* 53:264-268, 1973.
- 34) Tarrab, R., Rodríguez, J., Buitrón, C., Palacios, R. and Soberrón, G.: Molecular forms of rat liver arginase. Isolation and characterization. *Eur. J. Biochem.* 457-458, 1974.
- 35) Carvajal, N., Venegas, A., Oestreicher, G. and Plaza, M.: Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Bioch. Biophys. Acta.* 250:437-442, 1971.
- 36) Middelhouen, W.J.: The ferrous ion as the cofactor of arginase metallo-complexes of known composition and of native arginase. *Biochim. Acta.* 191:110-121, 1969.
- 37) Hirsch-Kolb, H., Kolb, H.J. and Greenberg, D.M.: Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. *Anal. Biochem.* 246:395-401, 1971.
- 38) Hunter, A. and Downs, C.K.: The inhibition of arginase by amino acids. *J. Biol. Chem.* 157:427-446, 1945.
- 39) Schinke, R.T.: Differential effects of fastening and protein free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver.

- J. Biol. Chem. 237:1921-1924, 1962.
- 40) Cedervaum, S.D. and Moedjono, S.J.: Threatment of hyperargininemia due to arginase deficiency with a chemically defined diet. *J. Inher. Metab. Dis.* 5:95-99, 1982.
 - 41) Mclean, P. and Gurney, M.W.: Effeckt of adrenalectomy and growth hormone on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver. *Biochem. J.* 87:96-104. 1963.
 - 42) Kesavarao, K.V., Ragliupathi, R.R. and Swami, K.: The inhibition of sheep liver arginase by some L-aminoacids. *Int. J. Biochem.* 4:62-70, 1973.
 - 43) Reddy, P.U.M. and Ramana Rao, J.V.: Inhibition of arginase in sheep brain homogenates by some L-amino acids. *Experientia.* 37:814, 1980.
 - 44) Rosenfeld, J.L., Dutta, S.P., Chheda, G.B. and Tritsch, G.L.: Purine and Pyrimidine inhibitors of arginase. *Biochim. Biophys Acta.* 410:164-66, 1975.
 - 45) Kaysen, G.A. and Strecker, H.J.: Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem. J.* 133:779-788, 1973.
 - 46) Ville-Breitburd, F. and Orth, G.: Rabbit liver arginase. *J. Biol. Chem.*, 247:1227-1235, 1972.
 - 47) Verma, A. and Boutwell, B.: Characterization of arginase activity from mouse epidermis and its relation to ornithine decarboxylase induction by the tumor-promoting agent, 12-o-tetradecanoylphormol-13-acetate. *Biochim. Biophys. Acta.* 677:184-189, 1981.
 - 48) Harell, D. and Sokolovsky, M.: Beef-liver arginase. Isolation and molecular properties. *Eur. J. Biochem.* 25:102-108, 1972.
 - 49) Pace, C.N., Buonanno, A. and Simmons-Hansen, J.: Steady-state kinetic studies of arginase with an improved direct spectrophotometric assay. *Anal. Biochem.* 109:261-265, 1980.
 - 50) Mora, J., Martuscelli, J., Ortiz-Pinada, J. and Soberon, G.: The regulation of urea-biosynthesis enzymes in vertebrates. *Biochem. J.* 96:28-35, 1965.
 - 51) Garner, D.L. and Hafez, E.S.E.: Espermatozoide. en: Reproducción e Inseminación Artificial. Hafez, E.S.E. (Ed), Editorial Interamericana, México, D.F, 1987, pp 160-180.

- 52) Bonnadonna, T.: Anatomía y fisiología de la reproducción. en: Fisiopatología de la Reproducción y Fecundación Artificial Ganadera. Bonnadonna, T. (Ed), Editorial Salvat, España, 1962, pp 23-33.
- 53) Satchell, B.F.: The functions of the testis and epididymis in rams, in: Reproduction in Sheep. Lindsay, D.R. and Pearce, D.T (Eds), Cambridge University Press, Cambridge, 1982. pp 62-69.
- 54) Hochereau-de Reviers, M.T., Blanc, M.R. and Pelletier, J.: Parameters of male fertility and their genetic variation in sheep. in: Genetics of Reproduction. Land, R.B. and Robinson, D.W. (Eds). Betterworths, England, 1980, pp 301-314.
- 55) Hamner, C.E.: The semen. in: Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animal. Hafez, E.S.E. (Ed). Lea & Febige, Philadelphia, USA, 1970, pp 56-73.
- 56) Calvin, H.I., Bedford, J.M.: Formation of disulphide Bonds in the nucleus and accessory structures of Mammalian Spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod. Fect., Suppl. 13:65-75, 1971.
- 57) Méndez, J.D.: Polyamines and human reproduction. in: The physiology of polyamines, Bachrach, U. and Heimer Y. (Eds), CRC Press, Inc., Florida, USA., 1989. Vol I, pp 24-36.
- 58) Schimke, R.J.: Determination of arginine in plasme and urine using arginase. Clin. Chem. Acta. 106: 333-337, 1960.
- 59) Kung, J.T., Brooks, S.B., Jackwoy, J.P., Leonard, L.L. and Tarmalge, D.W.: Suppresion of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. J. Exptl. Med. 146:665-672, 1977.
- 60) Giles, K.W. and Myers A.: Improved diphenylamine Method for the estimation of deoxy-ribonucleic acid. Nature. 206:93, 1965
- 61) Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J.: Protein neasurement with the folin phenolreagent., J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
- 62) Bernal, A., Méndez, J.D. y Rosado, A.: Determinación rápida del peso seco por colorimetría. Arch. Invest. Méd. (Méx). 12: 83, 1981.
- 63) Bouters, R., Esnault, C., Salisbury, G.W. and Ortavant, R.: Discrepancies in analyses of deoxyribonucleic acid in rabbit spermatozoa, involving feulgen staining (Feulgen-DNA) and ul -

- traviolet light absorption (UV-DNA) Measurements. *J. Reprod. Fert.* 14:355-363, 1967.
- 64) Gledhill, B.L.: Changes in desoxyribonucleoprotein in relation to spermateliosis and the epididymal maturation of spermatozoa. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 13:77-88, 1971.
- 65) Salisbury, G.W., Birge, W.J., De la Torre, L. and Lodge, J.R.: Decrease in nuclear Feulgen-positive material (DNA) upon aging in vitro storage of bovine spermatozoa. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10:353, 1961.
- 66) Hanada, A., Hiroe, K. and Tomizuka, T.: DNA content in bull spermatozoa during storage in yolk citrate diluent at 4 C. *Jap. J. Anim. Reprod.* 10:103, 1965.
- 67) Moore, G.F.M. and Beatty R.A.: The DNA content of spermatozoa from different strains of mice. *J. Reprod. Fert.* 38:473-476.
- 68) Orgebin-Crist, M.C.: Passage of spermatozoa labelled with Thymidine 3H through the ductus epididymis of the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 10:241, 1965.
- 69) Monesi, V.: Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. RNA and protein. *Expl cell Res.* 39:197, 1965.
- 70) Gledhill, L., Gledhill, M.D., Rigler, R. and Ringertz, N.R.: Changes in desoxyribonucleo-protein during spermiogenesis in the bull. *Expl Cell Res.* 41:652, 1966.
- 71) Pogany, G.C., Corzett, M., Weston, S. and Balhom, R.: DNA and protein content of mouse sperm. *Expl. Cell. Res.* 136:127-136, 1981.
- 72) Dacheux, J.L., Dacheux, F. and Pagnon, M.: Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol. Reprod.* 40:635-651, 1989.
- 73) Colin, R.B., Karoly, I.G. and Roy, J.: Changes in plasma membrane glycoproteins of rat spermatozoa during maturation in the epididymis.
- 74) Bernal, A., Torres, J., Reyes, A. and Rosado, A.: Presence and regional distribution of sialyl transferase in the epididymis of the rat. *Biol. Reprod.* 23:290-293, 1980.
- 75) Hamilton, D.W.: UDP-galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in fluids from rat rete testis and epididymis. *Biol. Reprod.* 23:377-385, 1980.

- 76) Jones, R., Ficolpramool, C., Setchel, B.P., Erow, C.R.: Labeling of membrane glycoproteins on rat spermatozoa collected from different regions of the epididymis. *Biochem. J.* 200:457-460, 1981.
- 77) Voglmayr, J.K., Sawyer, R.F., Dacheux, J.L.: Glycoproteins a variable factor in the surface transformation of ram spermatozoa during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 33:165-176, 1985.
- 78) Gould, K.G., Young, L.G., Hinton, B.T.: Alteration in surface charge on chimpanzee sperm during epididymal transit and at ejaculation. *Arch. Androl.* 6:20-24, 1984.
- 79) Dacheux, J.L., Cheuvier, C., Lanson, Y.: Motility and surface transformations of human spermatozoa during epididymal transit. In: Orgebrin-Crist MC, Danzo BJ (Eds). *Cell Biology of the testis and epididymis*. New York: Ann NY Acad Sci, pp 560-563.
- 80) Hammerstedt, R.H., Hay, S.R. and Amann, R.P.: Modification of Ram sperm membranes during epididymal transit. *Biol. Reprod.* 27:745-754, 1982.
- 81) Bamberg, E., Weiser, M and Desse, H.: Polyamines in bovine epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 45:363-365, 1975.
- 82) Thakur, A.N., Sheth, A.R., and Rao, S.S.: Polyamines in human semen: presence of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase. *Clin. Chim. Acta.* 55:377, 1974.
- 83) Polakoski, K.L., Syner, F.N. and Zaneveld, L.J.D.: Biochemistry of human seminal plasma. in: *Human Semen and Fertility Regulation in Men*. Hafez, E.S.E. (Ed). The C.V. Mosby Company, USA, 1976, pp 133-143.
- 84) Suzuki, O., Matsumoto, T., and Kasumata, Y.: Determination of polyamine oxidase activities in human tissue. *Experientia.* 40: 838, 1984.
- 85) Williams-Ashman, Ph.D. and Lockwood M.D.: Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. in: *Metabolism and Biological Functions of Polyamines*. Herbst, E. and Bachrach, V. (Eds), Ann. N.Y. Acad. Sci, USA, 1970, Vol 171, pp 882-894.
- 86) Shubhada, S., Lin, S-N., Quian, Z-y, Steinberg, A. and Tasi, Y. M.: Polyamine profiles in rat testis germ cells and Sertoli cells during testicular maturation. *Androl.* 10(2):145-151, 1989

- 87) Quian, Z.U., Tasi, Y.M., Steinberg, A., Lu, M., Greenfield, A. R.L. and Haddox, M.K.: Localization of ornithine descarboxylase in rat, testicular and epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod* 33:1189-1195, 1985.
- 88) Magargee, S.F., Kunze, E. and Hammerstedt, R.H.: Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biol. Reprod.* 38:667--685, 1988.
- 89) Bernal, E., Mercado, E., Calzada, L. and Hicks, J.J.: Microsomal and plasma membrane sialyltransferase activity in rat epididymis. *Arch. Androl.* 11:33-38, 1984.
- 90) Kumar, P.G., Laloraya, M., Agrawal, P. and Laloraya, M.: The involvement of surface sugar of mammalian spermatozoa in epididymal maturation and in vitro sperm-zona recognition. *Androl.* 22(2):184-194, 1990.
- 91) Lamosová, D., Baumgarther, F.: DNA Content of spermatozoa in different genetic lines of turkeys. *Gamete. Res.* 19(4):417-421 1988.
- 92) Dodds, R.A., Dunham, J., Bitensky, L. and Chayen, J.: Putrescine may be a natural stimulator of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS.* 201(1):105-108, 1986.
- 93) Friedman, P.D.: Enzymes. in: *Biochemistry. The Little, Brown - Medical Review Series, Third Printing, Little, Brown and Company (Inc), USA, 1977, pp 34.*