

31960

2.
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFECTO DE L-ARGININA Y POLIAMINAS
SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMATICA
EN PACIENTES DIABETICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION)

P R E S E N T A:

MARIA ESTHER MORALES MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE DOMINGO MENDEZ F.

LOS REYES IZTACALA, MEXICO.

1999

0273126
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Director:

Dr. José Domingo Méndez Francisco

Revisores:

Dr. Efraín Mercado Pichardo
Dra. Ma. Cristina Revilla Monsalve
Dra. Ma. Eugenia Chavarría Olarte
Dr. Martín Palomar Morales

Les quiero dar gracias :

A Dios, por permitirme vivir y culminar esta meta.

A mis padres, Luis y María por la herencia que me dieron de lucha y esfuerzo ante la vida.

A mis hermanos, Luis, Roberto, Jesús y Socorro por ser una imagen de superación.

A José Luis, por su amor y estímulo.

A mi tutor, Dr. José Domingo Méndez quien me brindó confianza y apoyo.

A mis revisores, Dr. Efraín Mercado, Dra. Ma. Cristina Revilla, Dra. Ma. Eugenia Chavarría y Dr. Martín Palomar, por dedicarme su tiempo y comentarios para mejora de este trabajo.

A Guadalupe Rico, Carmen Alvarez, Catalina Bravo, Rosa Gpe. Ramos, Rosario Tapia, Ma Eugenia Fonseca, Pablo Rivera, José Luis Solis, Alex Hernández y Alicia Ibarra por su amistad y apoyo incondicional.

A todos aquellos que hicieron posible la realización de esta tesis.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	.
Movilidad espermática	2
Poliaminas	6
Testículo	9
Próstata	9
Semen	10
Capacitación	10
Arginasa	13
Arginina	13
Diabetes Mellitus	14
Clasificación	16
Disfunción sexual	17
Parámetros endocrinos	19
Características del semen	20
Insulina y el testículo	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPOTESIS	22
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	37
DISCUSION	61
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	65

RESUMEN

Los pacientes con diabetes mellitus presentan una serie de anomalías en el semen: variación en el volumen, morfología alterada y una disminución en la motilidad espermática. Las poliaminas son moléculas alifáticas, no proteicas, que se encuentran en diversos órganos y han sido implicadas en la regulación de diversos procesos reproductivos entre los cuales se encuentra el amplificar el efecto del AMPc en la motilidad espermática.

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar el efecto *in vitro* de la L-arginina (L-Arg) y las poliaminas putrescina(Pu), espermidina(Spd) y espermina(Spm) sobre la motilidad espermática en individuos sanos, astenozoospermicos y diabéticos tipo I (DM1), así como determinar las concentraciones basales de Pu, Spd y Spm y las concentraciones de L-Arg y proteínas en muestras de semen.

Se estudiaron 13 pacientes DM1 (Servicios de Endocrinología del CMR y CMN SXXI grupo III), 10 pacientes astenozoospermicos (consulta de Andrología del CMN SXXI, grupo II) y 10 testigos voluntarios no diabéticos (Universitarios de la ENEP Iztacala, grupo I), cuyas edades fluctuaron entre los 20 y los 32 años. Se solicitó una muestra de semen después de tres días de abstinencia sexual. Se realizó espermocultivo y análisis de semen. La muestra se centrifugó para separar el plasma seminal (PS) en donde se midieron las concentraciones de L-Arg y proteínas. Una alícuota de 400 µl fue procesada para medir poliaminas por dabsilación y su concentración fue determinada por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Las muestras de espermatozoides se dividieron en cuatro fracciones y a cada fracción se le adicionó RPMI, suero de cordón umbilical y 10% de solución de Earle. A cada fracción se le adicionó L-Arg 0.004M ó Pu 0.1 mM o Spd 0.1mM o Spm 0.1mM, las muestras se incubaron inclinadas a 45° por 45 min, a 37°C, pasado este tiempo se midió la motilidad espermática de acuerdo a los criterios de la OMS.

Todas las muestras de espermocultivo resultaron negativas. El análisis de semen de los tres grupos fue similar en todos sus parámetros con excepción de la viabilidad, la motilidad y la morfología parámetros en los que los pacientes DM I tuvieron una disminución estadísticamente significativa ($p=0.020$, $p=0.001$ y $p=0.009$, respectivamente). Las concentraciones de Pu y Spd en el PS de los pacientes DM1 fueron significativamente menores ($p=0.003$, $p=0.004$) y en el caso de los astenozoospermicos sólo fue menor para Spd ($p=0.009$). El contenido de L-Arg fue normal en los tres grupos. La adición de L-Arg y poliaminas a los espermatozoides de los tres grupos produjo un incremento de la motilidad tipo A siendo mejor el efecto con la L-Arg, la Spd y la Spm, y menor con la Pu.

En este trabajo se concluye que las concentraciones de Spd y Pu fueron bajas en los pacientes DM I, mientras que en los pacientes astenozoospermicos sólo se encontró baja la Spd. Hubo un efecto benéfico en la motilidad de los espermatozoides humanos al incubar éstos con la L-arginina y /o poliaminas.

INTRODUCCION

El sistema reproductivo no escapa a las complicaciones de la diabetes mellitus (DM). Varias anormalidades reproductivas se asocian a esta patología, tanto en el hombre como en la mujer. Las alteraciones sexuales más importantes observadas en el hombre como consecuencia de la DM son: daño del epitelio germinal, daño en los conductos seminíferos, adelgazamiento de la membrana basal, hiperplasia del tejido intersticial, calcificación de los conductos deferentes, y una disminución en la síntesis de andrógenos y gonadotropinas. La disfunción sexual es un factor predominante en la DM, la cual incluye una falla o disminución de la libido, alteraciones en el coito y eyaculación retrógrada.

La DM 1 y la enfermedad inducida experimentalmente con drogas en animales puede alterar la calidad del semen y su capacidad fertilizante. Estudios en eyaculados de pacientes con DM 1 han indicado una disminución en el volumen seminal y en la motilidad espermática y un aumento en el número de espermatozoides con morfología anormal. Sin embargo, la concentración de espermatozoides no difiere de la observada en hombres sanos.

Se han realizado estudios *in vitro* que señalan que la L-arginina y las poliaminas aumentan la motilidad de espermatozoides normales de diferentes especies, sin embargo, no hay reportes sobre el efecto de estas sustancias en espermatozoides de pacientes diabéticos, por lo que este trabajo se diseñó para estudiar el efecto de la L-arginina y las poliaminas sobre la motilidad de espermatozoides de hombres con diabetes tipo 1.

ANTECEDENTES

MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad para fertilizar al óvulo y manifestar la motilidad durante el paso a través del epidídimo. Al mismo tiempo, durante la maduración epididimaria los espermatozoides cambian sus patrones metabólicos, su actividad enzimática,

sus características membranales y sus propiedades electroforéticas, así como su habilidad para unirse a la zona pelúcida (1). El epidídimo es un órgano tubular, que compactado mide de 6 a 7 cm de longitud en el hombre, secreta proteínas específicas y compuestos de bajo peso molecular los cuáles interactúan con el espermatozoide en regiones específicas del epidídimo. Las células epiteliales de diferentes segmentos del epidídimo secretan y absorben proteínas específicas y la secreción de algunas de éstas es dependiente de andrógenos (2).

Las funciones epididimarias son complejas y están todavía sin aclarar, pero básicamente son transporte, maduración, concentración y almacenamiento de los espermatozoides. Los espermatozoides tardan de 9 a 12 días en recorrer la longitud del conducto epididimario y durante este trayecto adquieren tanto la capacidad de moverse, como la capacidad de fertilizar al ovocito homólogo (2a). El transporte de los espermatozoides por el epidídimo es un proceso pasivo, debido principalmente a las secreciones que emergen del testículo, a la actividad ciliar de las células del epitelio epididimario y a la actividad contráctil de las paredes de este túbulo. La velocidad del transporte de los espermatozoides en el epidídimo y por lo tanto su duración están influidas también por la frecuencia de la eyaculación.

A lo largo de este conducto existen diferencias en el fluido epididimario (debidas a procesos de secreción y reabsorción) y se producen modificaciones en la célula espermática inmadura. La parte proximal del epidídimo es la responsable en mayor medida de los fenómenos de maduración espermática, mientras la porción distal cumple principalmente la función de almacenamiento de los espermatozoides. El epidídimo está tapizado por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, en el que se distinguen las células principales y las células basales. En el citoplasma apical hay gran número de vesículas que indican la función absorbente del epitelio epididimario, por ello más del 90% del líquido que sale del testículo es reabsorbido en los conductos eferentes y en el tubo epididimario. La reabsorción del fluido testicular incrementa la concentración de los espermatozoides a este nivel (3).

En el fluido epididimario existe una concentración elevada de moléculas orgánicas como glicerofosforilcolina, carnitina, ácido siálico, inositol y una glucoproteína que reviste los

espermatozoides y que ha sido relacionada con la adquisición de un patrón de motilidad progresiva por estas células (3).

Moore y col. definieron las condiciones para inducir la motilidad en los espermatozoides inmaduros e inmóviles de la cabeza del epidídimo de hámster. Estos cultivos contenían células principales epididimarias, las cuales son las responsables de las propiedades secretoras y absorbentes del epidídimo. Estas células secretan proteínas dependientes de andrógenos y juegan un papel importante en el desarrollo de la motilidad y la habilidad fertilizante (4).

Los estudios realizados para conocer los mecanismos que participan en la regulación de la motilidad del espermatozoide maduro, señalan que este proceso está regulado entre otros factores por el ión calcio, el monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), el nucleósido adenosina y el pH intracelular y que estos factores interactúan unos con otros (4a). La axoquinina es una proteína espermática de 55 kd que también está inmiscuida en la regulación de la motilidad (5).

La participación del ión Ca^{2+} y del AMPC en la regulación de la motilidad espermática ha sido ampliamente estudiada (6,7). Los cambios de motilidad quiscente a vigorosa, así como la amplitud de la onda flagelar son dependientes del ión Ca^{2+} endógeno (7). Por otra parte, si las concentraciones intracelulares del ión Ca^{2+} aumentan se puede inhibir la motilidad (6,7).

El Ca^{2+} tiene influencia en la desfosforilación del axonema, un paso que debe ser dependiente del pH; este ión controla la curvatura flagelar para dirigir el patrón de motilidad producido en un espermatozoide activo. Hoskins y col. reportaron que los cambios en la concentración de calcio citosólico en el espermatozoide de bovino proveniente de la cabeza del epidídimo, regulan la amplitud del batido flagelar (8). Los niveles de Ca^{2+} están regulados por el transporte de membrana, la cual responde a diversas influencias internas y externas (4a, 9).

Las acciones finales de los mensajeros en las proteínas del axonema, y los mensajeros externos que son los responsables de los cambios de motilidad, son las piezas más importantes en el esquema regulador de este evento (9).

Desde 1971 se conoce que el incremento de la concentración intracelular del nucleótido AMPc estimula la motilidad de los espermatozoides de mamíferos (10). Hoskins y col. reportaron que los niveles de AMPc se incrementan en el espermatozoide de bovino durante su paso por el epidídimo, lo cual también se ha reportado en espermatozoides de carnero y de hámster (11). La teofilina aumenta la concentración de AMPc e induce la motilidad en espermatozoides inmóviles de la cabeza del epidídimo de bovino y también incrementa el pH interno.

Aumentos pequeños en la alcalinidad del citoplasma de las células, incluyendo los espermatozoides, inician un proceso de activación. Durante su transporte a través del epidídimo, los espermatozoides de bovino aumentan la alcalinidad de su citoplasma entre 0.4 y 0.5 unidades de pH (12). Este incremento debe coincidir con un aumento en la concentración intracelular de AMPc para que los espermatozoides adquieran la capacidad de moverse.

Otros agentes externos que también están considerados como reguladores de la motilidad incluyen a la espermina, la espermidina, la heparina, la acetilcolina, la tirosina y la triyodotironina (9,13)

Por otra parte, el interés por estudiar los cambios fisiológicos de la capacitación y la reacción acrosomal con relación a los patrones de batido flagelar en el espermatozoide ha sido precisar su asociación con la motilidad de hiperactivación. La hiperactivación se presenta en el aparato reproductor femenino, y algunas veces entre la inseminación y la fertilización, y parece ser característica de la mayoría de los espermatozoides recuperados del sitio de fertilización en el oviducto (14). Esta se define como una amplitud aumentada del batido flagelar, acompañada por una disminución en el movimiento progresivo. Diferentes especies exhiben diferentes patrones de movimiento hiperactivado, pero todos incluyen estos dos patrones. El patrón de nado normal vigoroso del espermatozoide se le llama movimiento activado, lo que

Yanagimachi refirió como motilidad característica del epidídimo o de vaso deferente, cuando están en contacto con el plasma seminal o en solución salina fisiológica (14). La función de la motilidad hiperactivada no está clara, pero el aumento en la amplitud puede jugar un papel importante para alcanzar y fertilizar al huevo (15).

La motilidad del espermatozoide depende del movimiento flagelar el cuál se basa en un activo deslizamiento entre los dobles de los microtúbulos en un flagelo, por las proyecciones de los brazos de dineína de cada microtúbulo hacia un doblete adyacente en el axonema.

La membrana plasmática juega un papel importante en el inicio y regulación de la motilidad, pero los cambios de los patrones de batido finalmente dependen de las modificaciones bioquímicas del axonema flagelar del espermatozoide y/o de las alteraciones del medio ambiente intracelular en el cual funciona el axonema (16).

La fuente inmediata de energía para la motilidad es la hidrólisis de ATP catalizada por la dineína ATPasa, la cuál maneja el deslizamiento de los microtúbulos (17). El ATP es regenerado por la degradación de azúcares a lactato (principalmente glucosa o fructosa) por la ruta glucolítica y la oxidación mitocondrial de substratos a través del ciclo de ácido cítrico (18).

La célula espermática requiere de ATP para muchos propósitos, incluyendo el mantenimiento del medio ambiente intracelular por la presencia de iones, así como modificaciones en la función de la célula durante la maduración, capacitación y fertilización. Cerca del 70% del total de la actividad de ATPasa del espermatozoide se acopla al movimiento de la célula. La motilidad consume más energía que cualquier otro proceso dentro de la célula espermática y su demanda ejercerá una influencia poderosa sobre el control del metabolismo energético (19).

POLIAMINAS

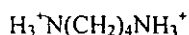
Las poliaminas (PA) son aminas biogénicas completamente protonadas bajo condiciones fisiológicas y se encuentran en todos los organismos vivos (Figura A). Se les localiza en las

bacterias, hongos, en plantas, en los virus, así como en las células de los mamíferos. La distribución de las PA difiere entre las especies, en las células de los mamíferos y entre los tejidos. Por ejemplo, las bacterias contienen importantes cantidades de putrescina y espermidina, mientras en las células de los mamíferos la espermidina y la espermina predominan generalmente. Las PA están involucradas en la síntesis de proteínas, también afectan la actividad biológica de las proteínas, estabilizan conformaciones de los ácidos nucleicos y son muy importantes en muchos otros procesos involucrados en el crecimiento celular y la proliferación. Al parecer están también implicadas en la modulación de la actividad de receptores y canales iónicos (20).

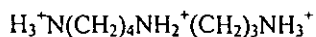
Se ha demostrado que la espermidina y la espermina se encuentran concentradas en el núcleo (21). Las concentraciones de PA intracelulares son reguladas por su consumo y liberación. La tasa de síntesis parece ser suficientemente alta para permitir el control de las reservas intracelulares y para adaptarlas a sus necesidades. El consumo y la liberación de PA son dos sistemas de transporte diferentes ya que las líneas de células mutantes carecen de la habilidad para consumir PA del medio, pero sí las liberan (22).

Figura A.- Estructura de las poliaminas

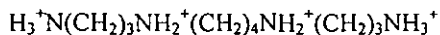
Putrescina



Espermidina



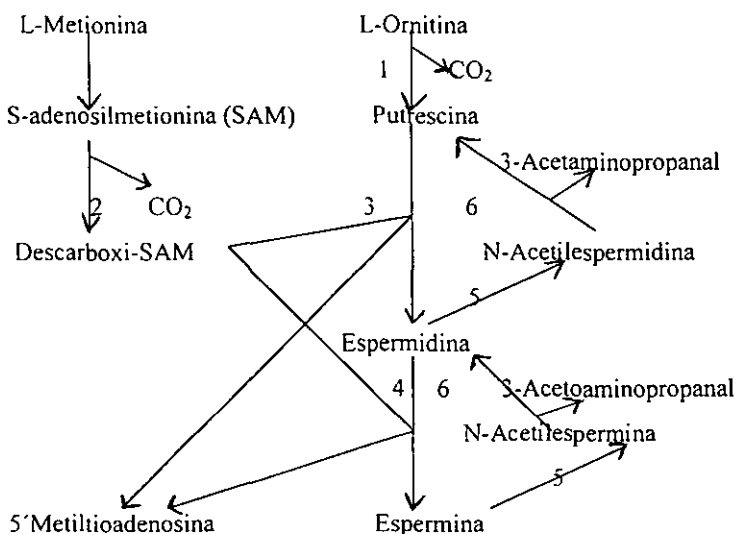
Espermina



En las células de los mamíferos hay tres posibles fuentes de poliaminas: biosíntesis proveniente de aminoácidos, consumo de PA preformadas de la dieta y un suplemento, y PA preformadas de la flora intestinal.

Las PA son sintetizadas *de novo* en las células de mamíferos a partir de dos aminoácidos, la L-ornitina y la L-metionina. En la reacción inicial la L-ornitina es descarboxilada por la ornitina descarboxilasa (ODC) para formar putrescina (Figura B). La metionina reacciona con ATP para producir S-adenosilmetionina (SAM) el cual es un intermediario en la reacción de metilación con la célula. La SAM es entonces activada en una segunda descarboxilación catalizada por S-adenosilmetionina descarboxilasa para formar SAM descarboxilado. Este SAM descarboxilado dona un aminopropilo a la putrescina para producir espermidina (catalizada por la espermidina sintasa) y finalmente una segunda molécula de SAM descarboxilada se combina con la espermidina para formar espermina (catalizada por la espermina sintasa).

Fig B. Ruta biosintética de las poliaminas. 1 ornitina descarboxilasa, 2 S-adenosilmetionina descarboxilasa, 3 espermidina sintasa, 4 espermina sintasa, 5 espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa, 6 poliamino oxidasa.



La conversión de espermidina y espermina a putrescina se lleva a cabo por otra vía diferente a la señalada. La espermina es monoacetilada en una reacción catalizada por la enzima espermidina/espermina N-acetiltransferasa (N-SAT). Esta acetil poliamina es entonces el sustrato para la poliamino oxidasa (PAO) la cuál produce espermidina y 3-acetoaminopropanal. Dos reacciones similares convierten la espermidina a putrescina (22).

Las PA son obtenidas de los alimentos como el queso, vegetales verdes y naranjas (22). Se han encontrado cantidades de poliaminas en la leche humana, por lo que se ha sugerido que las PA pueden jugar un papel importante en la protección del recién nacido.

En la flora intestinal, los microorganismos presentes producen sus propias PA de la ornitina y la lisina, incluyendo la cadaverina (22).

El papel fisiológico de las poliaminas relacionado con el sistema reproductor se ha discutido en varios trabajos. La mayoría de la información ha sido obtenida en experimentos con animales de laboratorio (32,33). En el sistema reproductivo del hombre, la presencia de PA ha llamado la atención de algunos investigadores, quienes han estudiado particularmente el metabolismo de las poliaminas en la próstata, semen y testículo. Las PA, espermidina y espermina son moléculas que han sido implicadas en la iniciación de la motilidad espermática (32, 33, 34). También se les ha asociado con procesos de capacitación y fertilización (23).

TESTICULO

Suzuki y col. determinaron la actividad de la PAO en varios órganos humanos (24), siendo más alta en el hígado que en el testículo. Es probable que la actividad en el testículo pueda estar relacionada con el proceso de la espermatogénesis (25).

PRÓSTATA

En el hombre y algunos otros mamíferos, la espermina seminal es producida en la próstata (26). El análisis de las PA en tejido prostático completo en animales sexualmente maduros, ha revelado que la espermidina y la espermina están presentes en la próstata. Otras observaciones indican que varios lóbulos de la glándula prostática de conejo, ratón, cuyo y perro tienen espermidina y espermina en concentraciones semejantes a las encontradas en otros tejidos no

gonadales. El lóbulo ventral y el dorsolateral de la próstata de la rata son depósitos de grandes cantidades de espermidina y espermina, similares a los encontrados en la próstata humana (27).

SEMEN

El semen humano normal contiene espermina en concentraciones de 5 a 15 mM (26), y menores cantidades de espermidina (28). La relación molar de espermina a espermidina en semen humano es 12 a 1(29). En este fluido también se encuentran la putrescina y el 1,3-diamino propano

Estas dos poliaminas también están presentes en el espermatozoide de epidídimo bovino (30) y en estudios con métodos citoquímicos y ultraestructurales se localizó espermina y espermidina en cabeza (60%), cola (21.5%) y membrana plasmática (9%) y más específicamente en pieza media y el acrosoma de espermatozoides de carnero (31).

La adición de espermina *in vitro* incrementa la motilidad del espermatozoide en varias especies (32,33) y amplifica la respuesta de AMPc al inicio de la motilidad del espermatozoide (34).

La putrescina es el precursor de estas poliaminas. Su formación es catalizada por la ornitina descarboxilasa (35), cuya actividad se demostró en epidídimo de rata (36), espermatozoide y plasma seminal humano (38).

Por otra parte, se ha propuesto que existe correlación entre la concentración de espermina del plasma seminal humano y la cuenta espermática total en las mismas muestras de semen (23), aunque todavía existe controversia al respecto (38).

CAPACITACIÓN

Durante el proceso de la fecundación, aunque el espermatozoide y el ovocito desarrollen funciones distintas, ambos gametos presentan una serie de cambios bioquímicos similares, que en conjunto se conocen como activación (39).

El elemento regulador clave en el proceso de activación es el ión calcio, de tal forma que un aumento masivo en la concentración de calcio libre intracelular (Ca^{2+}), producido mediante factores específicos en ambos gametos, puede iniciar una serie de reacciones bioquímicas en cadena, que conducen a los respectivos efectos biológicos específicos (40). Por otra parte, se ha observado que la activación del espermatozoide es anterior a la del ovocito, que se produce en respuesta a diferentes factores específicos provenientes del gameto femenino (41).

En los mamíferos, incluido el hombre, la activación espermática se traduce en una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos, a nivel de su membrana plasmática y acrosómica, que son necesarios para adquirir la capacidad fecundante y así poder atravesar las envolturas del ovocito, el cumulus ooforus y la zona pelúcida. La fusión de las membranas plasmáticas de ambos gametos va a provocar la activación del ovocito, pudiéndose iniciar el desarrollo embrionario.

El espermatozoide proveniente del eyaculado no puede fecundar al ovocito inmediatamente, sino que requiere de una serie de modificaciones, a nivel extra e intracelular, para alcanzar dicha capacidad. El conjunto de todas estas modificaciones que se realizan en el espermatozoide, es lo que se conoce como el proceso de capacitación (14, 40, 42).

En primer lugar, para que la capacitación pueda realizarse, el espermatozoide debe de estar libre del plasma seminal, lo cual puede llevarse a cabo bien *in vivo* durante su paso a través del tracto genital femenino, o bien *in vitro* mediante procesos de lavado de los espermatozoides (centrifugación-resuspensión, swim up o gradiente de percoll) e incubación en un medio de cultivo apropiado con una suficiente concentración de iones calcio (43).

La capacitación *in vivo*, puede ser un proceso gradual y totalmente diferente ya que el espermatozoide interacciona con diferentes partes del tracto genital femenino y este modelo es difícil de reproducir en el laboratorio.

Durante la capacitación, la membrana plasmática presenta una reorganización molecular que va a permitir el desarrollo de las tres etapas principales para que la fecundación se pueda llevar a cabo:

- adquisición del movimiento llamado hiperactivado, caracterizado por un aumento de desplazamiento lateral de la cabeza, gran amplitud del batido flagelar y altos valores de la velocidad curvilínea, causando un vigoroso y rápido movimiento del espermatozoide
- capacidad de poder unirse específicamente a la zona pelúcida del ovocito y
- fusión de ambos gametos (42).

Hay evidencias de estudios *in vitro* de que la espermina aumenta la actividad de maltasa presente en el plasma seminal, la cual está involucrada en la degradación del glucógeno, y que así mismo incrementa la utilización de glucosa por el espermatozoide (44).

La adición de cantidades fisiológicas de espermina a suspensiones de espermatozoides causa un aumento importante en las concentraciones de AMPc, nucleótido que induce la capacitación en el espermatozoide humano; ésto puede ser explicado por el hecho de que esta poliamina inhibe la actividad de fosfodiesterasa del AMPc y aumenta la actividad de adenil ciclasa (9).

PA EN EL APARATO GENITAL FEMENINO

Se han determinado las concentraciones de PA en el endometrio y el miometrio humano (45). Las concentraciones de PA son mucho más altas en el endometrio (Spm 125.0 pmol/mg de DNA, Spd 94.5 pmol/mg de DNA, Pu 40.2 pmol/mg de DNA) que en el miometrio (Spm 113.2 pmol/mg de DNA, Spd 62.5 pmol/mg de DNA, Pu 10.8 pmol/mg de DNA). En ambos tejidos, las concentraciones de espermina son mucho más altas que la espermidina y la espermidina es mucho más alta que la putrescina.

ARGINASA

La arginasa es una enzima que forma parte del ciclo de la urea, que tiene lugar en el hígado de los organismos ureotélicos. La arginasa cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea en tejidos extrahepáticos. La actividad de esta enzima está asociada también a la regulación de diversos procesos celulares. Se le ha localizado en tejidos del conducto reproductor del carnero y en células espermáticas (46). Dado que se ha probado que la espermina y en general las poliaminas se encuentran relacionadas con la motilidad espermática, es de esperarse que la arginasa se encuentre también relacionada y su actividad varíe dependiendo de las condiciones fisiológicas del semen.

ARGININA

Aún cuando la L-arginina es un aminoácido no esencial, debido a que se sintetiza en el organismo, es indispensable como material para la síntesis celular de proteínas tisulares. Sin embargo, durante los estadios activos del crecimiento, como en la infancia, la cantidad de arginina sintetizada es menor a la demanda, por lo cuál es considerado como semiesencial (9). La L-arginina es un componente básico en las nucleoproteínas (histonas y protaminas) de los espermatozoides en varias especies.

Se ha reportado que los espermatozoides de conejo transportan L-arginina, y que este transporte se lleva a cabo mediante mecanismos específicos, químicamente saturables (9). La adición de L-arginina causa estimulación de la motilidad en espermatozoides de conejo *in vitro* (47), y se ha encontrado que la mayor estimulación se consigue cuando se utiliza L-arginina 0.1M, mientras que estudios realizados en espermatozoides humanos, revelan que la máxima estimulación de la motilidad se logra con una concentración de 0.004M (48).

La especificidad de la acción de la L-arginina se comprueba por la incapacidad de L-homoarginina, L-nitroarginina y L-ornitina de aumentar la motilidad espermática *in vitro* (48). Lo anterior sugiere que el grupo guanidinio terminal así como la longitud de la cadena carbonada son requerimientos esenciales para su función (48).

Se ha reportado que hay una correlación positiva *in vivo* entre la cuenta espermática y la L-arginina unida al espermatozoide, así como entre la motilidad del espermatozoide y la L-arginina libre, presentes en el semen humano (49). Así mismo se ha reportado que la administración oral de L-arginina a pacientes oligozoospermicos, mejoró tanto la cuenta espermática como la motilidad en la mayoría de los individuos tratados (50). Además se ha demostrado que la concentración de L-arginina en el plasma seminal de hombres con cuentas espermáticas normales es mayor que la encontrada en pacientes oligozoospermicos o azoospermicos, y que ésto puede deberse a una alteración en la velocidad de síntesis de los aminoácidos, por lo que es posible que estas diferencias se reflejen en la concentración de arginina en el plasma seminal (48).

DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad multifactorial en la que el sujeto que la padece tiene alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, debido a una deficiencia relativa o absoluta en la secreción de insulina. Cuando la enfermedad se manifiesta, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y en la mayoría de los pacientes con larga evolución, hay complicaciones oculares, renales, neurológicas y cardíacas.

Desde hace muchos años se conocen las diferencias de los distintos tipos de diabetes. Por lo tanto, actualmente se considera que la diabetes no sólo es la elevación de la glucosa en la sangre sino un trastorno que implica varias anormalidades multifactoriales en cuanto a etiología y patogenia genéticas, ambientales e inmunológicas.

En la Tabla 1 se muestra la clasificación etiológica de la diabetes mellitus de acuerdo al Comité de Expertos en Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus (51,52).

DIABETES MELLITUS TIPO I

Se caracteriza por la destrucción de las células beta del páncreas y existen dos subtipos, la mediada por **mecanismos inmunológicos**, en la que se pueden formar anticuerpos

antiinsulina, auto-anticuerpos contra insulina, autoanticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65) y auto-anticuerpos contra tirosinfosfatasas IA-2, IA-2B. Uno o más de estos anticuerpos están presentes en 80 a 90 % de los pacientes. Así mismo es conocida la asociación con antígenos del sistema de histocompatibilidad HLA, DQA, DQB y DRB. Los casos en que no se puedan demostrar estos hallazgos deberán clasificarse como diabetes idiopática tipo 1. La mayor parte de las veces se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina.

DIABETES MELLITUS TIPO 2

Se presenta en individuos que tienen resistencia a la insulina y concomitantemente una deficiencia en su secreción, la que puede ser absoluta o relativa. Se inicia en la edad adulta.

Los individuos con diabetes tipo 2 generalmente no necesitan insulina para sobrevivir, pero la pueden requerir en casos agudos como cirugía, descontrol por infecciones, etc. La mayor parte de los individuos son obesos, lo que contribuye a la resistencia insulínica, que varía de individuo a individuo y de un grupo étnico a otro.

DIABETES GESTACIONAL

Se define como la intolerancia a la glucosa que se detecta por primera vez durante el embarazo. La probabilidad de desarrollar DM entre cinco y diez años después del parto es de 30 a 60% (53).

En México, la DM constituye uno de los problemas más importantes de salud pública con características de epidemia. Anualmente se registran más de 180 mil nuevos casos y es una causa de alrededor de 36 mil defunciones (53).

La frecuencia de diabetes aumenta con la edad y muchos estudios indican que en México la DM 2 afecta como mínimo a uno de cada cuatro sujetos mayores de 55 años en la población general (98 al 99%) (54). La DM 1 es mucho menos común y en México constituye alrededor de 1 a 2% de todos los casos de diabetes. Su incidencia es de 2/100 000 habitantes, una de las más bajas que la bibliografía médica informa. Suele diagnosticarse en la infancia o la adolescencia (54).

CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS.

Tabla 1.

<p>I. Diabetes tipo 1 Destrucción de células β que conduce a una deficiencia absoluta de insulina. A. Mediada por mecanismos inmunológicos B. Idiopática</p>	<p>II Diabetes tipo 2 Existen variaciones que van desde el predominio de la resistencia a la insulina con relativa deficiencia de ésta, hasta el defecto predominante en la secreción con resistencia a la acción de la hormona.</p>
<p>III Otros tipos específicos-</p>	
<p>A. Defectos genéticos de la función de la célula β:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. En cromosoma 12, IINF-1α (MODY 3) 2. En cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2) 3. En cromosoma 20, IINF-4α (MODY 1) 4. En DNA mitocondrial 5. Otros <p>B. Defectos genéticos en la acción de la insulina</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Resistencia a la insulina tipo A 2. Leprechaunismo 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall 4. Diabetes lipotrófica 5. Otros <p>C. Enfermedades del páncreas exocrino</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pancreatitis 2. Traumatismo/pancreatectomía 3. Neoplasia 4. Fibrosis quística 5. Hemocromatosis 6. Pancreatopatía fibrocalculosa 7. Otras <p>D. Endocrinopatías</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acromegalia 2. Síndrome de Cushing 3. Glucagonoma 4. Feocromocitoma 5. Hipertiroidismo 6. Somatostatinaoma 7. Aldosteronoma 8. Otras 	<p>E. Sustancias químicas o drogas capaces de inducir diabetes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pentamidina 2. Ácido nicotínico 3. Glucocorticoides 4. Hormona tiroidea 5. Diazóxido 6. Agonistas β-adrenérgicos 7. Tiazidas 8. Difenhidantoina 9. α-interferón 10. Otras <p>F. Infecciones</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Rubéola congénita 2. Citomegalovirus 3. Otras <p>G. Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Síndrome del hombre rígido 2. Anticuerpos contra el receptor de insulina 3. Otras <p>H. Otros síndromes que algunas veces se asocian con diabetes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Síndrome de Down 2. Síndrome de Klinefelter 3. Síndrome de Turner 4. Síndrome de Wolfram 5. Ataxia de Friedreich 6. Corea de Huntington 7. Síndrome de Lawrence Moon Beidel 8. Distrofia miotónica 9. Porfiria 10. Síndrome de Prader Willi 11. Otras
<p>IV Diabetes mellitus gestacional</p>	

Varias anomalías reproductivas que se asocian a este síndrome han sido descritas tanto en la mujer como en el hombre (55).

DISFUNCIÓN SEXUAL

Implica alteraciones desde la fase del deseo, erección, eyaculación, orgasmo y posorgásmica, las cuales pueden ser de origen orgánico y/o psicógeno. La disfunción eréctil es definida como la incapacidad de alcanzar o mantener una erección suficiente para el desempeño sexual satisfactorio.

La erección y la destumescencia del pene son eventos hemodinámicos regulados respectivamente por la relajación y la contracción de los músculos lisos del cuerpo cavernoso. En estado de flacidez, prevalece la influencia simpática, y los músculos lisos arteriales y del cuerpo cavernoso están tónicamente contraídos. Por consiguiente, la cantidad de sangre que fluye por la arteria cavernosa hacia las cavidades lagunares es mínima. Con el estímulo sexual, la actividad parasimpática aumenta; ésto disminuye la resistencia periférica, en razón de la vasodilatación y por el aumento del flujo sanguíneo en las arterias cavernosas y helicinas (son ramificaciones espiraladas de las arterias cavernosas). La relajación de los músculos lisos trabeculares aumenta el llenado de los espacio lagunares. Al aumentar el volumen sanguíneo y la compresión de los músculos lisos trabeculares relajados contra la túnica albugínea, se reduce el flujo venoso de salida, constituyendo lo que se conoce como mecanismo venoso oclusivo. Ocurre una erección rígida, y cesa el flujo sanguíneo a través de la arteria cavernosa. La destumescencia ocurre cuando la gran actividad simpática aumenta la tonicidad de las arterias helicinas y la contracción de los músculos lisos trabeculares.

La disfunción eréctil puede ser clasificada en: *orgánica*, por causas vasculares, neurológicas, hormonales, o por anomalía o lesión del cuerpo cavernoso; o bien *psicogénica*, por inhibición central del mecanismo de erección sin alteración física. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con disfunción eréctil, está involucrada una combinación de componentes orgánicos y psicogénicos.

La función eréctil se caracteriza por un delicado equilibrio entre los efectos de la vasoconstricción y los factores de relajación vascular, sobre la tonicidad de los músculos lisos del cuerpo cavernoso.

Se requiere un nivel mínimo de relajación de los músculos lisos del cuerpo cavernoso para que el pene flácido y tónicamente contraído se convierta en pene erecto. Si ese nivel mínimo de relajación no ocurre, la resistencia al flujo venoso de salida será incompleta, y eso provocará un amplio espectro de rigidez peneana.

Factores que pueden producir disfunción eréctil:

Padecimientos sistémicos: aterosclerosis, DM, enfermedades cardiovasculares, disfunción renal, disfunción hepática.

Padecimientos neurológicos: enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple.

Padecimientos del pene: enfermedad de Peyronié.

Padecimientos psiquiátricos: depresión, ansiedad durante el acto sexual.

Padecimientos endocrinológicos: hipertiroidismo, hipotiroidismo, hipogonadismo, hiperprolactinemia, etc (56).

Dentro de las alteraciones sexuales más frecuentes ocasionadas por la diabetes se encuentran la disfunción eréctil, la ausencia o disminución de la libido y la eyaculación retrógrada. Actualmente se sabe que la disfunción eréctil se presenta en el 50% de los hombres diabéticos (57); son muchos los factores que pueden explicar esta condición, como son: factores endocrinos, neurológicos, vasculares y psicológicos. Murray y col. realizaron un estudio en 28 hombres diabéticos con disfunción eréctil a los que se les clasificó en base a tumescencia peneana nocturna, y a los que se les practicaron determinaciones endocrinas (58). Los resultados obtenidos sugirieron que la alteración gonadal primaria puede estar relacionada a la disfunción eréctil y pueden mejorar con terapia de sustitución androgénica.

Por otro lado, se ha estudiado el flujo sanguíneo peneano en hombres diabéticos (59) y se ha encontrado que el 87% tuvieron insuficiencia arterial cavernosa (IAC) desde moderada a

severa. Los pacientes de mayor edad y los que tenían más tiempo de evolución de la diabetes presentaron la incidencia más alta de esta insuficiencia; también se encontró que no hay diferencias significativas en la IAC entre la DM 1 y la DM 2, concluyendo que la IAC está muy relacionada a la disfunción eréctil diabética.

El factor neurológico en la disfunción eréctil en el hombre diabético también ha sido estudiado (60); al respecto se han realizado evaluaciones vasculares y neurológicas, encontrándose que en la diabetes la impotencia puede tener un origen neuropático sensorial urogenital.

PARAMETROS ENDOCRINOS EN LA DIABETES

Es importante conocer el medio ambiente endocrino en el hombre diabético, que es fundamental en el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Sin embargo, como se observará en los siguientes estudios hay discrepancia en los resultados obtenidos.

En el paciente diabético, las gonadotropinas séricas no muestran un patrón constante, ya que se han encontrado tanto valores normales de hormona luteinizante (LH) (60) y hormona foliculo estimulante (FSH) (61-63), como valores aumentados de LH y FSH (64). En pacientes diabéticos con impotencia orgánica primaria, se ha observado que los niveles de FSH y LH no presentan elevación significativa (59).

Otros investigadores (65) han encontrado que la concentración de prolactina (PRL) se encuentra elevada en pacientes diabéticos con más tiempo de duración de la enfermedad. La testosterona (T) presenta diferente patrón si se determina como T total o como T libre. La T total se ha reportado muy disminuida en pacientes con DM de larga evolución, mientras que en aquellos con DM entre 6 y 9 años de evolución, los valores fueron elevados (58). Sin embargo, la T libre disminuye en todos los pacientes diabéticos (58), independientemente del tiempo de duración de la enfermedad. La concentración baja de T en suero de pacientes diabéticos es uno de los indicadores de alteración en el metabolismo de andrógenos testiculares. La disminución de T en suero o en tejido testicular puede ser debida a un número también disminuido de células de Leydig, como resultado de un efecto deletéreo de la DM. En relación al grado de

lesión, el epitelio seminífero fue reducido a nivel de espermatida y en la pared se encontró hialinización y fibrosis periférica. La alteración en la función de las células de Sertoli seguida por la alteración de las células epiteliales germinativas, son consecutivas a una síntesis de T disminuida en pacientes diabéticos. Considerando la alteración en la síntesis de andrógenos, la deficiencia en la síntesis de T explicaría la alteración en la espermatogénesis, en la secreción prostática y de las glándulas sexuales accesorias en hombres diabéticos, seguidas por una inadecuada morfología, maduración y motilidad espermática.

CARACTERISTICAS DEL SEMEN

El análisis del semen proporciona información detallada sobre la concentración, motilidad, y morfología de los espermatozoides y es el parámetro más importante para verificar la fisiología de las gónadas y glándulas accesorias. En el caso de los estudios en pacientes diabéticos, se han encontrado diferencias en los resultados debidos al uso de diferentes métodos de análisis, evaluación de los parámetros de forma individual, evolución y severidad de la enfermedad, complicaciones y edades de los pacientes. Se han realizado varios estudios para analizar la calidad del semen en hombres diabéticos (66-69) encontrándose mala calidad en el eyaculado: morfología alterada (bajo porcentaje de células normales) (70,71), disminución en la motilidad de los espermatozoides hasta de un 50% (66,70), aumento en la cuenta espermática por disminución en el volumen seminal (69,72) y una disminución en el volumen seminal hasta del 39% (en pacientes con neuropatía diabética) (73).

INSULINA Y EL TESTICULO

La insulina es la hormona secretada por las células β del páncreas, que tiene entre otras funciones facilitar el transporte de la glucosa en los tejidos dependientes de insulina. La insulina estimula la incorporación de glucosa por parte de las células musculares y del tejido adiposo. Si se administra insulina, en aproximadamente 15 min el transporte pasivo de glucosa pasa al interior de estas células aumentando su concentración de unas 6 a 12 veces, al disminuir la concentración de insulina, las condiciones de captación de glucosa vuelven a estados basales (74).

Se ha observado que hay un efecto metabólico directo de la insulina sobre la patogénesis de las alteraciones testiculares, lo cuál fue demostrado en un estudio realizado en ratones diabéticos no obesos (a un grupo de animales diabéticos no obesos se les trató con insulina, y de acuerdo al momento de inicio del tratamiento mostraron cambios en la espermatogénesis, desde presencia anormal de espermatozoides inmaduros hasta la presencia de un mínimo de espermatozoides normales, mientras que los sujetos que no recibieron tratamiento con insulina, presentaron interrupción en la espermatogénesis) (75).

El daño que produce la diabetes en el testículo humano se desconoce, sin embargo, se ha sugerido que la insulina mantiene la función de las células de Leydig y de Sertoli (64). En cultivo de células de Sertoli de rata, la insulina promueve la secreción de la proteína transportadora de andrógenos y la transferrina (76). Se ha demostrado la presencia de receptores específicos para insulina en células de Leydig y una disminución de estos receptores en animales diabéticos (78). Estudios en rata han revelado un efecto estimulador de la insulina sobre la síntesis de T en células testiculares (77).

La acción de la insulina sobre la motilidad del espermatozoide humano y su metabolismo no ha sido muy estudiada. Las concentraciones de insulina seminal son 2.4 veces más altas que en la sangre (67,69,74). No hay diferencias importantes en los niveles de insulina sanguínea y en plasma seminal entre hombres normospermicos, oligozoospermicos (79) y azoospermicos (69), por lo tanto la determinación de la hormona en este líquido biológico no puede ser utilizada como marcador de la calidad del semen. No obstante esto último, las evidencias presentadas anteriormente indican que la insulina juega un papel importante en la regulación de la fertilidad masculina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen varios factores que afectan la calidad del semen en hombres diabéticos, entre estos se encuentran la morfología alterada, aumento en la concentración espermática, baja en el volumen seminal y disminución de la motilidad del espermatozoide hasta de un 50%. Todos estos factores afectan la capacidad fertilizante. En este trabajo nosotros proponemos estudiar el efecto *in vitro* de algunas aminos para mejorar la motilidad espermática en este tipo de pacientes.

HIPOTESIS

La administración *in vitro* de L-arginina ó poliaminas a muestras de semen de pacientes diabéticos con alteraciones en la motilidad espermática mejorará esta función.

OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto *in vitro* de L-arginina y poliaminas (putrescina,espermidina y espermina) sobre la motilidad espermática en los pacientes diabéticos
2. Determinar la actividad de arginasa en las muestras de semen
3. Determinar la concentración de arginina en las muestras de semen
4. Determinar las concentraciones de putrescina, espermina y espermidina en las muestras de semen.

MATERIAL Y METODOS

Previamente se hizo un estudio estadístico para estimar el tamaño de la muestra con la Prueba de la t para comparar medias de variables continuas (80), en la que se concluyó que 10 pacientes por grupo eran suficientes para obtener valores estadísticamente significativos.

Se estudiaron muestras de semen de sujetos agrupados de la siguiente forma:

- GRUPO I 10 testigos no diabéticos “normales”, normozoospermicos, entre 20-32 años de edad, voluntarios, que asistían a la ENEP- Iztacala.
- GRUPO II 10 testigos astenozoospermicos, no diabéticos, entre 20-32 años de edad, que asistían a la consulta de Andrología (Centro Médico Nacional S XXI, IMSS).
- GRUPO III 13 individuos diabéticos tipo I, entre 20-32 años de edad, clasificados en base a estudios clínicos y de laboratorio y que asistían a la consulta de Endocrinología del Hospital de Especialidades (Centro Médico la Raza, IMSS) y Hospital de Especialidades (Centro Médico Nacional S XXI, IMSS).

Todos estos pacientes firmaron una carta de consentimiento.

CRITERIOS DE SELECCION

Criterios de inclusión

Pacientes diabéticos

Pacientes con diagnóstico de DM 1 de menos de 10 años de evolución, sin importar si estaban o no controlados metabólicamente

Con o sin hijos

Pacientes astenozoospermicos

Pacientes que en análisis previos de semen hubieran presentado una motilidad espermática menor del 50% (tipo A+B)

Sin importar si estaban o no controlados metabólicamente

Pacientes sin diagnóstico de DM I u otra enfermedad

Sin antecedentes de problemas endocrinológicos

Con o sin hijos

Grupo sanos

Sujetos aparentemente sanos, sin diagnóstico de enfermedad

Sin antecedentes de problemas andrológicos

Con buen control metabólico

Con o sin hijos

Criterios de no inclusión

Padecimientos Crónicos: hipertensión arterial, neoplasias, cirrosis hepática, nefropatía, angiopatía, aterosclerosis, neuropatía y problemas autoinmunes

Padecimientos Agudos: infecciones (de cualquier tipo), cetoacidosis

Pacientes con ingesta crónica de alcohol

Uso de medicamentos que afectan la motilidad espermática (Tabla 2.)

Criterios de exclusión

Pacientes a los que se detectó cualquiera de las enfermedades mencionadas

Azoospermia

Falta de colaboración

Tabla 2. Compuestos químicos que modifican la motilidad espermática (62).

INHIBIDORES
Alcohol
Nicotina y cigarros
Mariguana
Anestésicos: lidocaína, propanolol, lignocaína, procaina.
Antimicrobianos: sulfasalacina, nitrofurantoina
Antineoplásicos: ciclofosfamida, mecloretamina, vinblastina, procarbacin, prednisona, anisidida
Otros medicamentos: ciproterona, dietilstilbestrol, fenitoina, clorpromacina, y ac. aspártico y L-ornitina
ESTIMULADORES
Medicamentos antiinfertilidad: citrato de clomifeno, tamoxifen
Otras sustancias: metilxantinas: cafeína, pentoxifilina, kalicreina, Vitamina B12, sulfato de fenelcina (Nardil), arginina

METODOLOGIA

Con el objeto de conocer si los pacientes que proporcionaron su muestra de semen estaban controlados metabólicamente, se les indicó presentarse a las 7 a.m. en ayunas y se les tomaron 10 ml de sangre en un tubo sin anticoagulante, se separó el suero y se les practicaron los siguientes estudios:

GLUCOSA

Se realizó en un equipo automatizado Hitachi 717. El reactivo para glucosa del sistema Synchron CX se utilizó en su determinación cuantitativa en suero. El equipo determina la concentración de glucosa, empleando un electrodo de oxígeno Beckman (82). Se determina el consumo de oxígeno, que es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Se consideraron como valores normales de *76-110 mg/dl*.

UREA

Se realizó en un equipo automatizado Synchron CX-3, mediante el estuche de BUN (nitrógeno ureico sanguíneo) de este sistema. Este estuche de reactivos determina la concentración de urea por el método enzimático de conductividad cinética (83-84). La hidrólisis de urea a carbonato de amonio, catalizada por la ureasa, se monitorea mediante un electrodo de conductividad. Se determina el aumento de la conductividad, que es directamente proporcional a la concentración de BUN en la muestra. Se consideraron valores de referencia *10-50 mg/dl*.

CREATININA

Se realizó en un equipo automatizado Synchron CX-3. El estuche reactivo de creatinina, junto con los calibradores, se emplearon en la determinación cuantitativa de creatinina en el suero. La creatinina en la muestra se determinó por el método cinético de Jaffe (85). Cuando la muestra se mezcla con el reactivo de picrato alcalino, la creatinina del suero forma un complejo de color rojo. La formación del complejo se monitorea a 520 y 560 nm. La formación del complejo obtenido es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. Se consideraron valores de referencia de *0.5-1.2 mg/dl*.

HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

Es un parámetro utilizado para evaluar la hiperglucemia del paciente diabético en las seis semanas previas a la toma de la muestra de sangre.

Para la determinación de la hemoglobina glucosilada, se realizó una electroforesis en el equipo Appraise Densitomer System-Beckman, con un estuche Paragón Diatrac HbA1c que permite la separación electroforética de la HbA1c en un gel de agarosa en una solución amortiguadora ácida. Se consideraron valores normales de *3-6 %*.

TRIACILGLICEROLES

Se realizó en un equipo automatizado Hitachi 717. Se determinaron con el método modificado por Wahlefeld (86), basado en la hidrólisis enzimática de los triacilglicéridos por la lipasa y la determinación enzimática subsecuente del glicerol formado por medio de las enzimas glicerol-cinasa, fosfoglicerol-oxidasa y peroxidasa. Se forma un complejo colorido cuya absorbancia se midió a 620 nm, siendo directamente proporcional a la concentración de triacilgliceroleos en la muestra. Se consideraron valores normales de *50-200 mg/100 ml.*

COLESTEROL TOTAL

Se realizó en un equipo automatizado Hitachi 717. Se cuantificó por el método de Siedel y Katterman (87,88), que consiste en una reacción colorimétrica que se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los ésteres de colesterol por la colesterol esterasa y la oxidación del colesterol libre por la colesterol oxidasa. La concentración de colesterol es directamente proporcional a la absorbancia que da el complejo a 540 nm. Valores de referencia *50-220 mg/dl.*

HDL-COLESTEROL

Se realizó en un equipo automatizado Hitachi 717. Se determinó por el método de López-Virella (89), que se fundamenta en la adición de ácido fosfotúngstico más iones magnesio a la muestra, provocando la precipitación de los quilomicrones, VLDL y LDL. El sobrenadante de la centrifugación contiene las HDL, cuya concentración de colesterol es determinada enzimáticamente. Se consideraron valores normales de *35-55 mg/dl.*

LDL-COLESTEROL

Se realizó de manera manual.

Se cuantificó el contenido de colesterol de las LDL por medio de la fórmula de Friedewald (90,91) que involucra la medición de colesterol total, triacilgliceroleos y HDL.

$$LDL = CT - TG/5 - HDL$$

Se consideraron valores normales de *100-190 mg/dl*

DETERMINACIONES HORMONALES

Para conocer el estado fisiológico completo de todos los individuos que participaron en el estudio, se realizaron determinaciones de FSH, LH, T y PRL, en un equipo automatizado Immulite, DPC. El método empleado es un análisis inmunoenzimático de quimioluminiscencia.

FSH

Se basa en un análisis quimioluminimétrico de dos posiciones (sandwich), usa cantidades constantes de dos anticuerpos que tienen especificidad para la molécula intacta de FSH. El primer anticuerpo, es un anticuerpo policlonal anti FSH de oveja, marcado con éster de acridina (AE). El segundo anticuerpo o fase sólida es un anticuerpo monoclonal de ratón anti oveja, unido covalentemente a partículas magnéticas.

Existe una relación directa entre FSH en la muestra y las unidades relativas de luz detectadas por el aparato. Las concentraciones normales de FSH en hombres de 13-70 años son de 0.7 a 11 mIU/ml.

LH

Se analizó por un método quimioluminimétrico de dos posiciones (sandwich). El primer anticuerpo, es un anticuerpo policlonal anti LH de oveja, marcado con éster de acridina (AE). El segundo anticuerpo o fase sólida es un anticuerpo monoclonal de ratón anti oveja, enlazado covalentemente a partículas magnéticas.

Existe una relación directa entre la LH en la muestra y las unidades de luz relativas detectadas por el aparato. Las concentraciones normales de LH en hombres de 20-70 años son de 1.4-7.7 mUI/ml.

T

El análisis se realizó por el método quimioluminiscente competitivo. La T en las muestras del paciente compite con la T marcada con el éster de acridina (AE) para unirse con el anticuerpo policlonal anti T de conejo sobre la fase sólida. El anticuerpo policlonal de conejo anti T está unido al anticuerpo monoclonal de ratón anti conejo, el cual está acoplado a partículas

magnéticas (fase sólida). Este análisis requiere del uso previo de un agente liberador de T, para liberar la T unida a las proteínas endógenas en la muestra.

Hay una relación inversa entre la cantidad de T presente en la muestra del paciente y la cantidad de unidades luz relativas detectada por el aparato. Las concentraciones normales de T en hombres son de 3-10 ng/ml.

PRL

El análisis de PRL se realizó por método quimioluminimétrico de dos posiciones (sandwich). El primer anticuerpo, es un anticuerpo policlonal anti prolactina de oveja, marcado con éster de acridina (AE). El segundo anticuerpo, que es un anticuerpo monoclonal de ratón anti oveja está unido covalentemente a partículas magnéticas.

Existe una relación directa entre la PRL en la muestra y las unidades de luz relativas. Las concentraciones normales de PRL en hombres son de 1-20 ng/ml.

A todos los pacientes se les pidió que proporcionaran dos muestra de semen en frascos estériles para su análisis, notificándoles que deberían tener un periodo de abstinencia sexual de 3-5 días previamente a la obtención de cada una de las muestras.

ANALISIS DE SEMEN

Los siguientes estudios se realizaron en base al Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (92).

CULTIVO DE SEMEN

Las muestras de semen que se cultivaron se colectaron con precauciones específicas para evitar su contaminación, posteriormente éstas se enviaron al laboratorio de Microbiología, del HE-CMN SXXI.

Una vez que se reportaban las muestras de semen negativas a cualquier microorganismo, se citaba por segunda ocasión a los pacientes y se les pedía dar una segunda muestra de semen para su análisis seminológico.

ASPECTO

La muestra de semen se evaluó primero con una inspección simple a temperatura ambiente. La muestra normal presenta un aspecto opalescente gris, es homogénea y se licúa entre los 30 y 60 min a temperatura ambiente.

VOLUMEN

El eyaculado se pasó con una pipeta Pasteur a un tubo graduado para medir el volumen de éste. Valor de referencia ≥ 2 ml.

CONSISTENCIA

Se analizó tomando la muestra con una pipeta Pasteur con un diámetro interno de 0.8 mm y se observó la longitud del filamento. Las muestras normales salen de la pipeta en forma de gotas, en tanto que en los casos de consistencia anormal el líquido seminal tiene una consistencia filamentosas, en ocasiones de más de 2 cm de longitud.

pH

Se extendió con uniformidad una gota de semen sobre el papel sensible al pH (pH 6.4 a 8). A los 30 segundos el color de la zona impregnada fue uniforme y se le comparó con la tira de calibración para lectura de pH.

El pH se midió antes de que transcurriera una hora de la eyaculación y el valor normal de este parámetro es de 8.

VIABILIDAD

Se utilizó una tinción supravital, la cuál tiene el principio de que los espermatozoides muertos, cuyas membranas están dañadas, permitirán el paso del colorante.

Para ello se realizó una mezcla del semen con algún colorante vital como eosina Y al 0.5% en solución salina, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos o muertos.

Valor de referencia: $\geq 75\%$ de espermatozoides vivos (incoloros).

MOTILIDAD

En un portaobjetos se colocaron 10 μ l de semen, se cubrió con un portaobjetos y se contaron 100 espermatozoides en 4-6 campos y se clasificaron en grupos de motilidad. Las categorías que se emplearon para clasificar la motilidad de los espermatozoides se designaron A, B, C, D y se definieron de la siguiente manera:

A si el espermatozoide tiene una *motilidad progresiva rápida y lineal*.

B si tiene un *movimiento progresivo lento*.

C si tiene una *motilidad no progresiva (in situ)*

D si el espermatozoide es *inmóvil*

Valores de referencia:

$\geq 50\%$ de espermatozoides con *progresión lineal (A+B)*

$\geq 25\%$ de espermatozoides con *progresión lineal rápida (A)*

Cuando estos valores están disminuidos se le denomina *astenozoospermia*, la cuál puede clasificarse en:

Astenozoospermia leve: 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva

Astenozoospermia moderada: 20-40% de espermatozoides con motilidad progresiva

Astenozoospermia severa: menos del 20% de espermatozoides con motilidad progresiva

CONCENTRACION

La concentración de espermatozoides se determinó con el método del hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se preparó una dilución 1:20 [50 μ l de semen + 950 μ l de diluyente (50g de NaHCO₃, 10 ml de formalina al 35% v/v y agua destilada en cantidad suficiente para obtener un volumen final de 1000 ml)].

El hemocitómetro se cubrió con el cubreobjetos, la muestra diluida se mezcló muy bien y luego se colocó una gota por capilaridad. Se dejó reposar unos 5 minutos, en cámara húmeda, y se contaron los espermatozoides en microscopio óptico con objetivo 40x.

El procedimiento para contar los espermatozoides en la cámara del hemocitómetro fue el siguiente: el cuadrado central de la rejilla del hemocitómetro de Neubauer contiene 25 cuadrados grandes, cada uno de los cuáles contiene 16 cuadrados más pequeños; para las

muestras que contenían menos de 10 espermatozoides por cuadrado se contó toda la rejilla, es decir 25 cuadrados. Pero si tenían más de 10 espermatozoides, se contaron los 4 cuadros extremos de los 25 cuadros y el cuadro central. El número de espermatozoides contados se divide entre el factor de corrección de acuerdo a la dilución realizada y al número de cuadros contados.

Factores de corrección para el hemocitómetro:

Dilución (semen+diluyente)	<u>Número de cuadros contados</u>		
	25	10	5
1+9	10	4	2
1+19	5	2	1
1+49	2	0.8	0.4

Valores de referencia:

$\geq 20 \times 10^6$ esp/ml

La disminución de esta cuenta se denomina **oligozoospermia**, la cuál se clasifica en:

Oligozoospermia leve	$10-20 \times 10^6$ esp/ml
Oligozoospermia moderada	$5-10 \times 10^6$ esp/ml
Oligozoospermia severa	$< 5 \times 10^6$ esp/ml y
Azoospermia	si no hay espermatozoides en el eyaculado

MORFOLOGIA ESPERMATICA

Se valoró la normalidad estructural de los espermatozoides considerando sus elementos visibles como son la cabeza, la pieza media y la cola; para ello se realizó un frotis por extensión y se tiñó con la tinción de Papanicolau. Con esta tinción el acrosoma se tiñe de azul claro y de azul oscuro la región post-acrosomal. La pieza media puede teñirse de rojo pálido y la cola se tiñe de azul. Las gotas citoplasmáticas, usualmente ubicadas detrás de la cabeza en la pieza media se tiñen de verde.

La valoración se llevó a cabo al contar 100 espermatozoides, clasificándolos de acuerdo a los criterios estrictos de Kruger (93) que son los siguientes:

Una cabeza normal debe ser ovalada con una longitud entre 4-5.5 μm y un ancho de 2.5-3.5 μm .

La región acrosomal debe de estar bien definida y ocupar entre el 40-70% del área total de la cabeza

No tener defecto en cuello, pieza media y cola

Todos aquellos espermatozoides con defectos mínimos son considerados anormales

Todas las formas dudosas se consideran anormales

Se deben tomar en cuenta las siguientes categorías de defectos:

Defectos de tamaño/forma de la cabeza: puede ser grande, pequeña, acintada, piriforme, amorfa, con vacuolas mayores del 20% de área ocupada y toda combinación entre éstos.

Defectos del cuello y pieza media: ausencia de cola, cola mal insertada o doblada, pieza media distendida, irregular o doblada, pieza media anormalmente fina y toda combinación entre éstos.

Defectos de cola: corta, rota, irregular y toda combinación entre éstos

Las gotas citoplasmáticas mayores que un tercio de la superficie de la cabeza normal

Valor de referencia según los criterios estrictos de Kruger: Normal \geq 14% de espermatozoides con formas normales

Un número menor de espermatozoides con formas normales ya sea por criterios estrictos de Kruger o por criterios de la OMS es denominado **teratozoospermia**.

VALORACION DE MOTILIDAD ESPERMATICA DESPUES DE LA ADICION DE L-ARGININA Y POLIAMINAS.

Se centrifugó la muestra de semen a 1500 rpm por 15 min, se tomó el plasma seminal para determinar la concentración de proteínas, la actividad de arginasa, la concentración de arginina y poliaminas.

Los espermatozoides se resuspendieron en 1 ml de medio* (RPMI 1640, suero de cordón umbilical y 10% de solución de Earle), este ml se dividió en 4 tubos: uno que contenía 750 μl

de medio* con arginina 0.004M (48), otro que contenía 750 μ l de medio* con putrescina 0.1 mM (101), otro con 750 μ l de medio* con espermidina 0.1mM (101) y otro con 750 μ l de medio* con espermina 0.1 mM (101). Estos tubos se incubaron por 45 min. a 37°C en un ángulo de 45°. Después de este tiempo se separó el sobrenadante donde se encontraron los espermatozoides móviles y se valoró la motilidad como ya se mencionó.

ACTIVIDAD DE ARGINASA

Método de Kung (94)

Después de la licuefacción el plasma seminal se centrifugó a alta velocidad (10 000g) a 0°C por 15 min. para obtener plasma completamente libre de células, las cuales podrían interferir con el procedimiento experimental.

L-arginina $\xrightarrow{\text{arginasa}}$ ornitina + urea [se cuantifica colorimétricamente]

Reactivos: 1. Diacetil monoxima 415.5 mg/100 ml

2. Tiosemicarbazida 5.0 mg

3. Reactivo colorido: 350 μ l del reactivo 1 con 5 mg del reactivo 2, aforando todo a 25 ml con agua destilada

4. Cloruro férrico 0.12 M en H₃PO₄ 56.7%

5. H₂SO₄ 20%

6. Reactivo ácido: 25 μ l del reactivo 4 con 25 ml del reactivo 5

7. Solución estándar de urea 0.0150 mg/ml

8. Solución amortiguadora (MnCl₂ 0.002 M en Tris-HCl 40 mM y solución salina 0.9% a pH 7.5)

9. Preparación de 5 ml de arginina 0.4 M

10. Preparación de 5 ml de glicina 0.15 M

Se tomó 50 μ l del plasma seminal y se agregó 450 μ l de amortiguador 8. Se incubó a 55°C durante 1h y se tomó del sobrenadante una alicuota de 400 μ l y se le agregó 100 μ l de una

solución de arginina 0.4 M + glicina 0.15M. Se incubó a 37°C por 15 min. e inmediatamente se puso en baño de agua hirviendo 7 min.

Se tomaron alícuotas de 300 µl y se aforó a 1000 µl con agua; se adicionó 1ml del reactivo colorido y 2000 µl del reactivo ácido. Posteriormente se mezclaron y se cerraron los tubos, para calentarlos a 92°C durante 20 min. y se dejaron enfriar para después leer la absorbancia a 530 nm. La actividad de arginasa se reporta como µg de urea/µg de proteína/min. Las proteínas totales fueron determinadas de acuerdo a Lowry y col. (95).

DETERMINACION DE ARGININA

Se usaron los mismos reactivos que para la determinación de arginasa, adicionando una cantidad conocida de arginasa, y no se adiciona arginina.

Del plasma seminal previamente centrifugado se tomaron 50 µl y se adicionaron 400 µl de amortiguador, y 50 µl de arginasa (2 mg/ml), se incubó a 55°C durante 1 hr, se tomó una alícuota de 400 µl del sobrenadante y se adicionó 50 µl de glicina 0.15M. Se incubó a 37°C por 15 min. e inmediatamente se colocó en baño de agua hirviendo por 7 min. A partir de aquí se siguieron los mismos pasos que para la actividad de arginasa.

Se tomaron alícuotas de 300 µl y se aforó hasta 1000 µl del reactivo colorido y 2000 µl del reactivo ácido. Posteriormente se mezcló y se cerraron los tubos calentándolos a 92°C durante 20 min. y se dejó enfriar para leer la absorbancia a 530 nm. La concentración de arginina se reportó en nmol/ml.

CUANTIFICACION DE POLIAMINAS

Se cuantificaron por el método de Koski y col. (98).

Este método está basado en la derivación de las poliaminas con el cloruro de dabsilo (DABS-Cl: dimetilamino bencensulfonilo) para su posterior análisis y cuantificación en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), siendo su detección en la región visible. El DABS-Cl fue recristalizado en acetona, después se preparó a una concentración de 1.3 mg/ml (4 mM) . El estándar de poliaminas fue disuelto en agua para dar una concentración de

0.51 mM, y 4 μ l de esta solución fueron adicionados a 40 μ l del reactivo de dabsilación y 20 μ l de buffer bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9. La mezcla se incubó a 70°C por 10 min. y luego se diluyó a 1000 μ l con etanol 75% (w/v). Finalmente se centrifugó a 8000g por 4 min. a 8°C, se filtró con membranas de 0.22 μ m. Del filtrado se tomaron 50 μ l y se inyectaron al cromatógrafo para su análisis y cuantificación.

El sistema de cromatografía consistió de un equipo HPLC Beckman, con un detector 168 para operar a 436 nm, bomba 126, una columna de fase reversa ultrasphere C-18 DABS, de 25 cm de longitud y diámetro interno de 4.6 mm. La separación analítica de DABS-poliaminas fue realizada por elución con un gradiente lineal de buffer acetato de sodio 30%, pH 4.13 /60% de acetonitrilo a 100% acetonitrilo en 20 min, y la elución se continuó con 100% de acetonitrilo por 5 min. La velocidad de flujo fue de 1.0 ml/min. Las poliaminas se cuantificaron en base a la altura del pico.

ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó un análisis descriptivo univariado por grupo y por variable.

Para saber si los datos presentaban una distribución normal se realizó la prueba de normalidad de Anderson-Darling, con la que se concluyó que los datos no presentaron una distribución normal. Se hizo una comparación de dos grupos I y II, I y III con la U de Mann Whitney, para todas las variables analizadas. Para la variable de la motilidad tipo A de espermatozoides incubados con poliaminas y L-arginina también se realizó la comparación entre el grupo II y el grupo III con la U de Mann Whitney.

RESULTADOS

A todas las muestras de semen se les realizó espermocultivo, el cuál resultó negativo.

La Tabla 3 muestra los valores de la química sanguínea (Figuras 1 y 2), el perfil de lípidos (Figuras 3 y 4) y la hemoglobina glucosilada (Figuras 5) de los tres grupos de sujetos estudiados, y se presenta el promedio y la desviación estándar de cada grupo. No hubo significancia estadística entre el grupo control y el grupo astenozoospermico con respecto de estos parámetros, sin embargo en el grupo de diabéticos la glucosa y la hemoglobina glucosilada tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.030$ y $p=0.050$, respectivamente). La Tabla 3 muestra además los resultados de las lipoproteínas de alta y baja densidad, las cuales se determinaron sólo en 4 controles. La concentración de colesterol total fue normal, y por lo tanto es de esperarse que las lipoproteínas se encuentren también normales.

En la Tabla 4 se presenta el resultado del análisis hormonal de cada individuo así como el promedio y desviación estándar de cada grupo. Como se observa, los valores de testosterona en los tres grupos no muestran diferencias significativas. En el grupo I el paciente ZJL tuvo un valor bajo de FSH, mientras que el control CF presentó aumento de LH y ligera hiperprolactinemia. En el grupo II, el paciente GGG presentó elevadas las gonadotropinas. En el grupo III el paciente OLG presentó baja de FSH y el paciente ESG tuvo elevada la LH.

La Tabla 5 muestra los promedios y las desviaciones estándar de las concentraciones de proteínas (Figura 6), actividad de arginasa (Figura 7) y las concentraciones de L-arginina (Figura 8). En los pacientes diabéticos tipo 1, se observó un aumento importante de la concentración de proteínas ($p=0.021$) y una tendencia a disminuir en la actividad de arginasa ($p=0.056$). Mientras que en las concentraciones de L-arginina no hubo diferencias significativas.

Tabla 3. Determinaciones de glucosa, urea, creatinina, triglicéridos, hemoglobina glucosilada (HbA1c), colesterol, HDL y LDL, en suero de hombres sanos, astenozoospermicos y diabéticos insulino dependientes.

GRUPO V.R.*	NOMBRE	EDAD	GLUCOSA 76-110 mg/dl	UREA 10-50mg/dl	CREATININA 0.5-1.2 mg/dl	TRIGLICERIDOS 50-200mg/dl	HbA1 3-6%	COLESTEROL 50-220 mg/dl	HDL 35-55mg/dl	LDL 100-190 mg/dl
I	HCM	20	94	28	1	62	4.7	134	ND	ND
	TGF	24	91	33	1.2	147	4.9	188	ND	ND
	GGD	20	94	38	1	226	4.9	143	ND	ND
	RTR	27	86	29	1	133	5	195	ND	ND
	JE	21	82	24	1.1	80	6.8	194	52	126
	ZJL	21	97	35	1.1	63	5.1	125	ND	ND
	CF	28	87	32	1.1	97	4.4	211	52	140
	SAA	28	92	21	0.9	302	5.4	196	ND	ND
	BJ	26	102	25	0.9	58	4.5	127	29	86
	SEJA	32	82	29	1.2	185	5.4	195	39	119
\bar{x}		25	91	29.4	1.1	135.3	5.1	171	43	117.8
D.E.		3.9	6.2	5	0.1	77.3	0.68	33.99	11.2	22.89
II	GGG	26	73	45	1.3	83	5.7	174	44	113
	CVJ	32	91	28	0.8	386	5.5	306	27	202
	MCA	29	96	32	1.1	129	5.3	272	51	195
	JRA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	VBA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	SO	29	89	26	1.0	167	6.9	268	51	184
	RJ	30	84	27	1.0	263	7.6	203	27	123
	CS	29	85	34	0.9	164	4.1	163	36	94.2
	RFJT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	CF	29	91	32	0.9	293	5.4	172	ND	ND
\bar{x}		29.14	87	32	1	212	5.78	222.6	39.3	152
D.E.		1.64	6.82	6.82	0.15	106	1.14	58.2	11.04	47.07
III	MZJ	20	181	25	0.8	69	13.7	135	56	65
	TOE	22	154	30	1	66	9.9	180	39	135
	YHJ	18	210	44	1.0	269	16.1	251	ND	ND
	ESG	18	58	34	1.0	81	10.2	128	42	70
	DLC	20	81	32	0.8	119	16.1	153	50	79
	MOG	23	68	36	1.0	90	8.8	162	40	100
	OLG	27	109	33	1.2	107	10.2	193	ND	ND
	SVA	20	233	30	1.0	223	11.4	233	39	149
	HRA	28	391	42	1.0	128	13.0	244	87	131
	VRC	23	121	33	0.9	114	16.0	187	58	106
	BRV	19	177	27	0.8	140	17.7	164	58	78
	ORD	28	154	31	1.0	186	12.6	305	61	207
	LAO	24	145	25	0.9	394	9.9	203	28	96
\bar{x}		22.31	160.15	32.46	0.95	152.77	12.7	195.23	50.73	110.55
D.E.		3.59	87.3	5.74	0.11	94.38	2.96	51.1	15.93	42.33

Los valores representan el promedio +/- DE. *VR valores de referencia. ND. No determinado
GRUPOS: I Sanos, II Astenozoospermicos, III Diabéticos insulino dependientes.

GLUCOSA

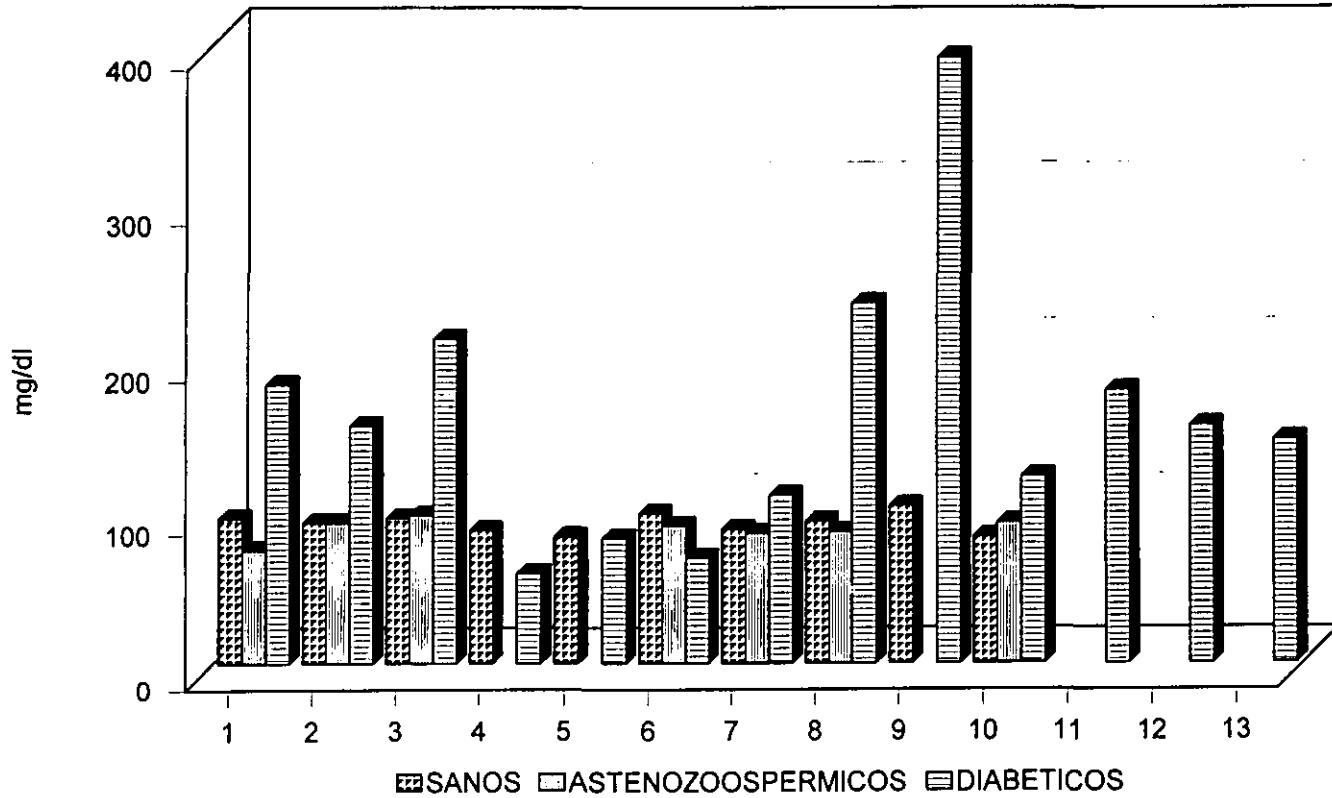


Fig 1. -Determinaciones individuales de glucosa en suero de tres grupos: I sanos (n=10), II astenozoospermicos (n=7), III diabéticos tipo I (n=13).

UREA

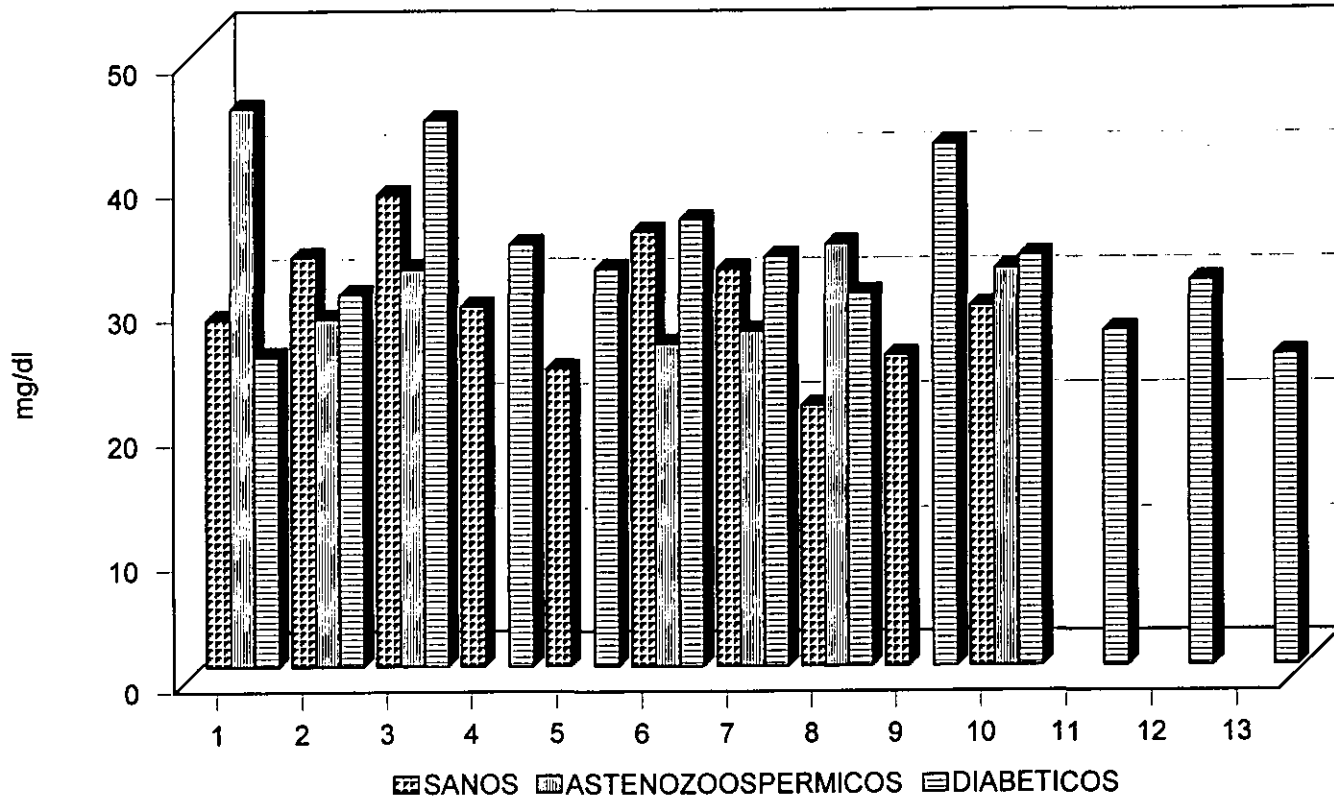


Fig 2.- Determinaciones individuales de urea en suero de tres grupos: I sanos (n=10), II astenozoospermicos (n=7) y III diabeticos tipo I (n=13).

COLESTEROL

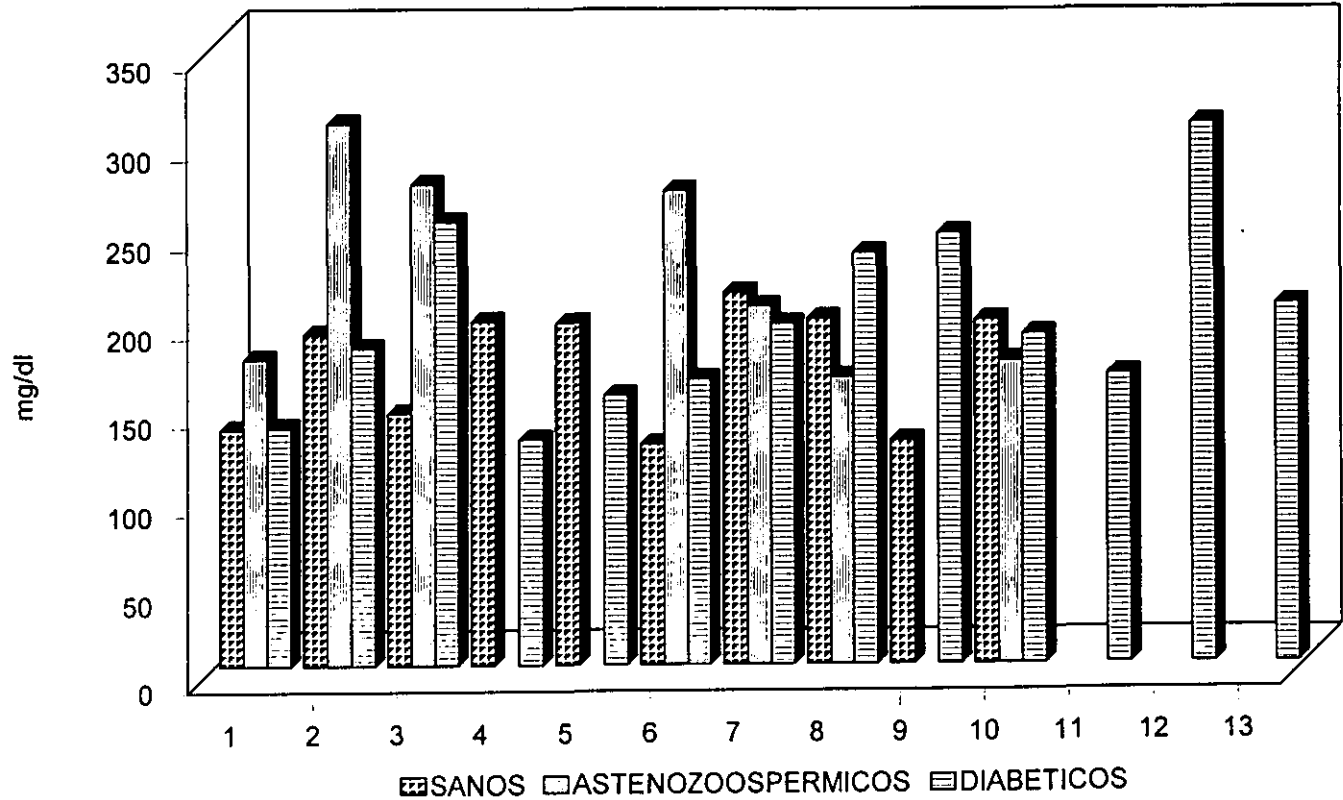


Fig 3.- Determinaciones individuales de colesterol en suero de tres grupos: I sanos (n=10), II astenozoospermicos (n= 10), III diabeticos tipol (n=13).

TRIGLICERIDOS

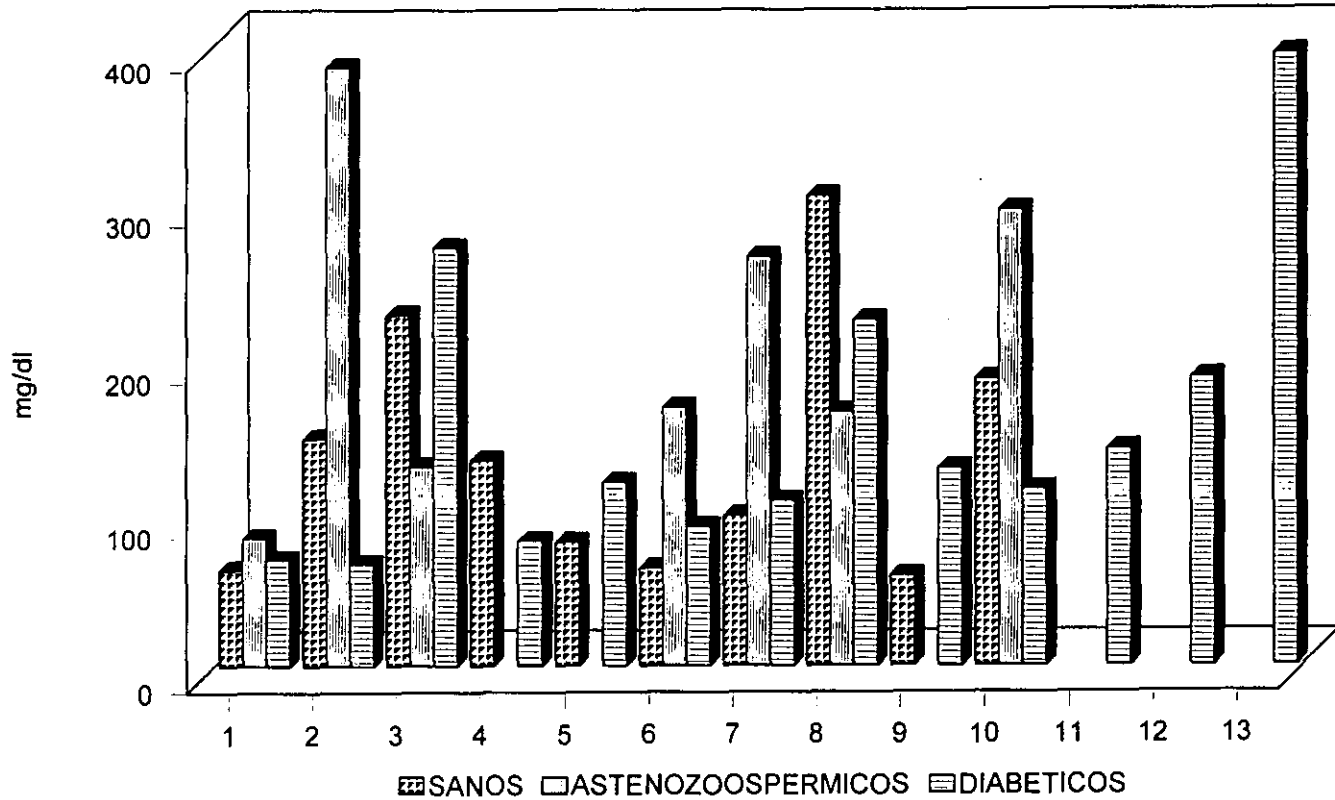


Fig 4.- Determinaciones individuales de triglicéridos en suero de tres grupos: I sanos (n=10), II astenozoospermicos (n=7) y III diabéticos tipo I (n=13).

HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

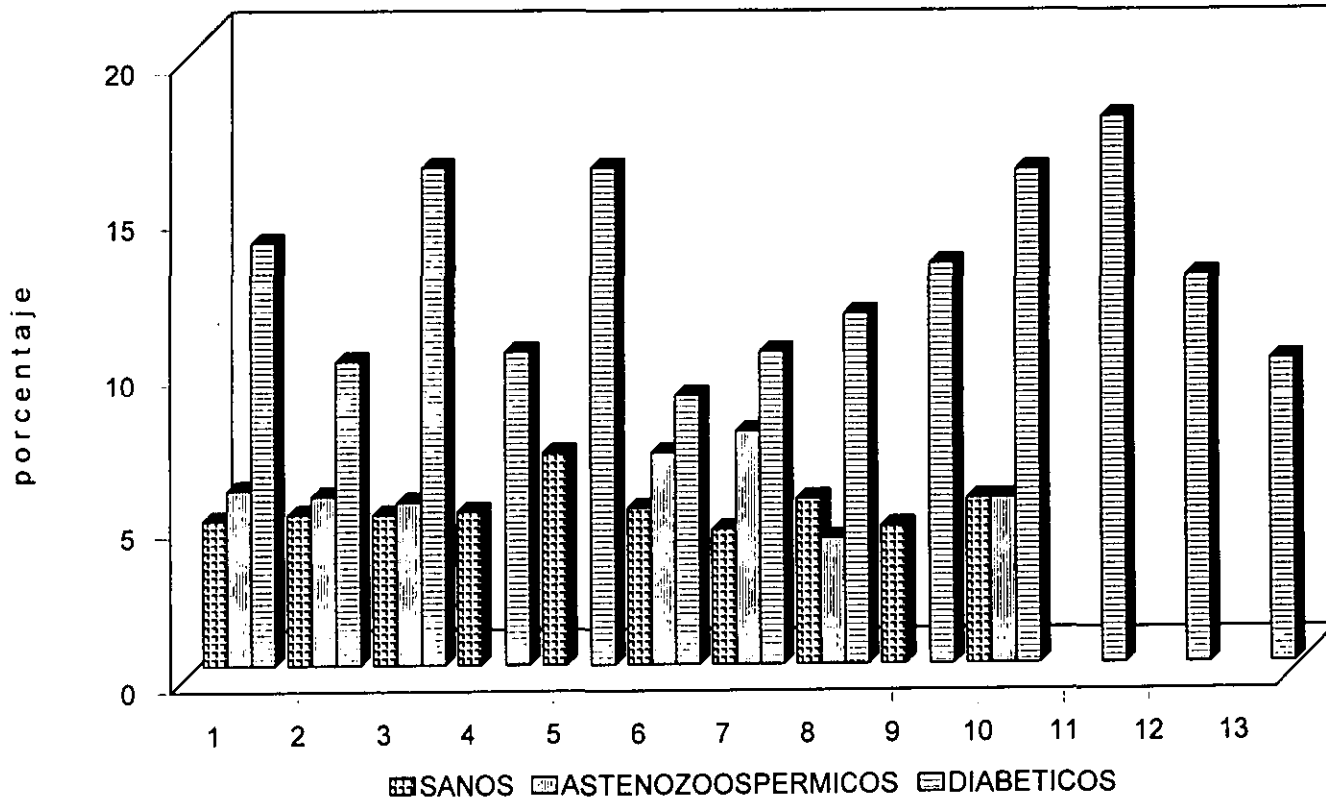


Fig 5.- Determinaciones individuales de hemoglobina glucosilada en 3 grupos:
 I sanos (n=10), II astenozoospermicos (n = 10) y diabéticos : tipo I
 (n=13)

Tabla 4. Determinaciones de testosterona, hormona foliculo estimulante, hormona luteinizante y prolactina en suero de sujetos sanos, astenozoospermicos y diabéticos tipo 1.

GRUPO V.R.*	NOMBRE	TESTOSTERONA 3-10 ng/ml	HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE 0.7- 11mIU/ml	HORMONA LUTEINIZANTE 1.4-7.7 mIU/ml	PROLACTINA 1-20 ng/ml
I	HCM	10	4	7	13
	TGF	3.6	2	3	13
	GGD	3.8	0.92	<3	9
	RTR	3.6	3	1.9	6
	JE	7.7	2.2	6	8
	ZJL	5.7	0.56	1.47	15
	CF	7.5	1.1	12	29
	SAA	2.6	1.1	<3	11
	BJ	7.7	7	8	14
	SEJA	6.1	2.3	8	8
	\bar{x} (n)	5.8 (10)	2.4	5.0 (7)	13.1 (9)
	DE	2.4	1.92	2.8	6.7
II	GGG	5.4	26	25	8
	CVJ	3.2	6	3	10
	MCA	3.5	5	7	7
	JRA	ND	ND	ND	ND
	VBA	ND	ND	ND	ND
	SO	4.8	2.3	7	16
	RJ	4.8	1.4	3	20
	CS	3.4	2.4	<3	10
	RFJT	ND	ND	ND	ND
	CF	4.6	1.3	<3	9
	\bar{x} (n)	4.2 (7)	3.1 (6)	5 (4)	12 (6)
	DS	0.86	1.96	2.3	4.9
III	MZJ	5.3	2.9	5	7
	TOE	5.4	2.9	8	19
	YHJ	8.7	1	4	6
	ESG	3.5	6	13	9
	DLC	5.6	3.8	<3	14
	MOG	5.8	2.5	4	8
	OLG	8.5	0.4	5	7
	SVA	6.1	4	6	7
	HRA	3.2	5	5	4
	VRC	3.8	2.1	3	8
	BRV	3.7	6	7	6
	ORD	4.3	4	1	6
	LAO	4.2	4	7	6
	\bar{x} (n)	5.2 (13)	3.68 (11)	5 (12)	7.3 (12)
	DE	1.76	1.51	2	2.46

Los valores representan el promedio +/- DE. En paréntesis se indica número de muestras estudiadas.

*VR. valores de referencia en hombres. ND.No determinado. GRUPOS: I Sanos, II Astenozoospermicos, III Diabéticos insulino dependientes.

Tabla 5. Concentración de proteínas, actividad de arginasa y contenido de L-arginina en plasma seminal de sujetos sanos, astenozoospermicos y diabéticos insulino dependientes.

GRUPO	PROTEINA mg/ml	ACTIVIDAD DE ARGINASA nmol urea/mg de proteína/min	L-ARGININA nmol/ml
I (10)	58.99 +/- 9.96	3.29 +/-1.4	36.49 +/- 14.99
II (10)	73.24 +/-20.73 (p=0.104)	2.29 +/-0.62 (p=0.131)	34.45 +/- 45 (p=0.650)
III (12)	73.33 +/- 16.15 (p=0.021)*	2.16 +/-0.4 (p=0.056)	32.19 +/- 9.12 (p=0.468)

Los datos representan el promedio +/- D.E. En paréntesis se indica número de muestras estudiadas. GRUPO : I sanos, II astenozoospermicos, III diabéticos insulino dependientes. * significancia estadística comparando con el control

En las Figuras 9,10,11 se muestran cromatogramas de tres controles dabsilados de las tres poliaminas que se estudiaron obtenidos por HPLC. Se pueden observar con claridad los tiempos de retención (TR) para cada una de ellas: putrescina TR= 14.11 min, espermidina TR= 19.97 min. y espermina TR=21.01 min, se observan algunas impurezas en cada cromatograma que corresponden a los estándares, así como al cloruro de dabsilo pero no interfieren con la valoración de estas aminas.

En la Tabla 6 se comparan las concentraciones de poliaminas expresadas en mmol/L de los 3 grupos estudiados. La putrescina, y la espermidina fueron detectadas como compuestos dabsilados, sin embargo, los valores de espermina son bajos con respecto a las concentraciones normales. En estas determinaciones se observó que las concentraciones de putrescina (Figura 12) y la espermidina (Figura 13) son menores en el grupo de pacientes diabéticos (p=0.003 y p=0.004, respectivamente). En el grupo de pacientes astenozoospermicos también se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de espermidina (p=0.009). En la Figura 14 se grafica el promedio y la desviación estándar de las concentraciones de espermina, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos estudiados.

PROTEINAS

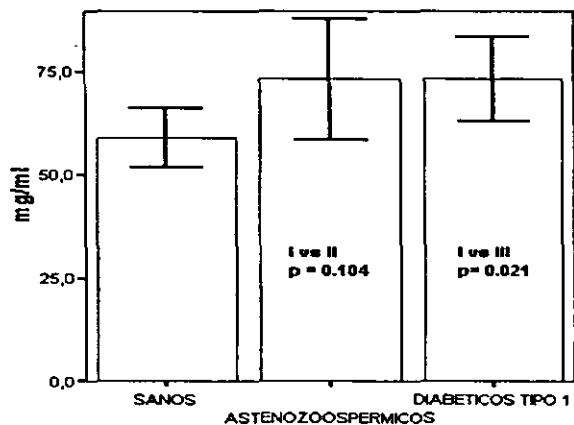


Fig 6. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar de las concentraciones de proteínas de los tres grupos: sanos (I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).

ARGINASA

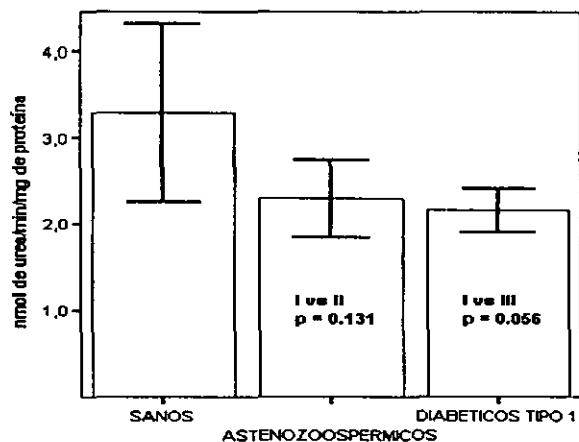


Fig 7. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar de la actividad de arginasa de los tres grupos: sanos (I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).

ARGININA

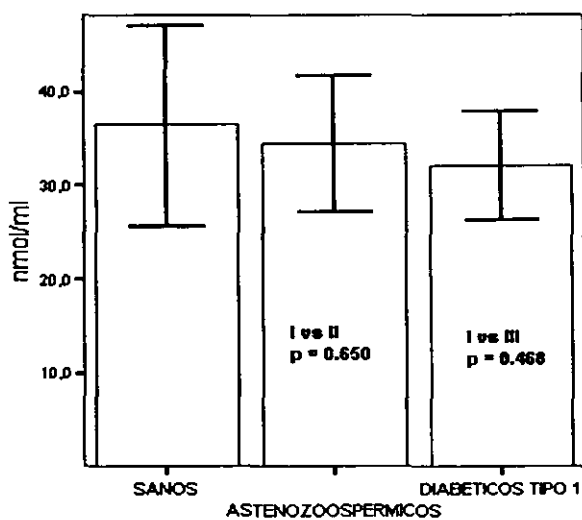
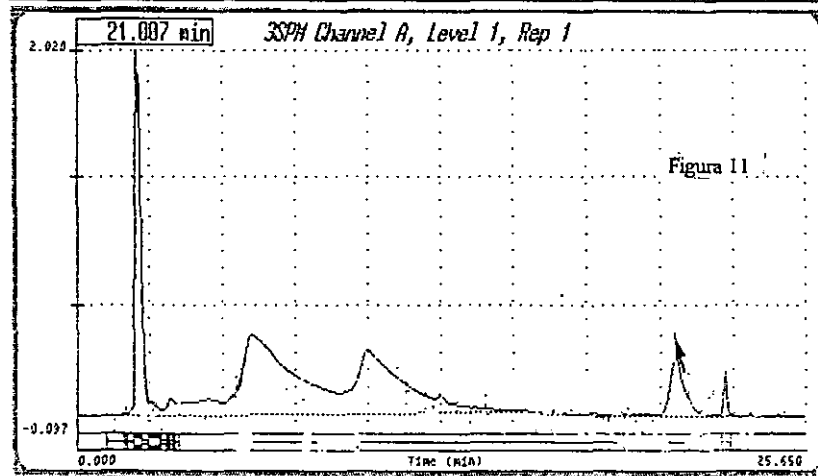
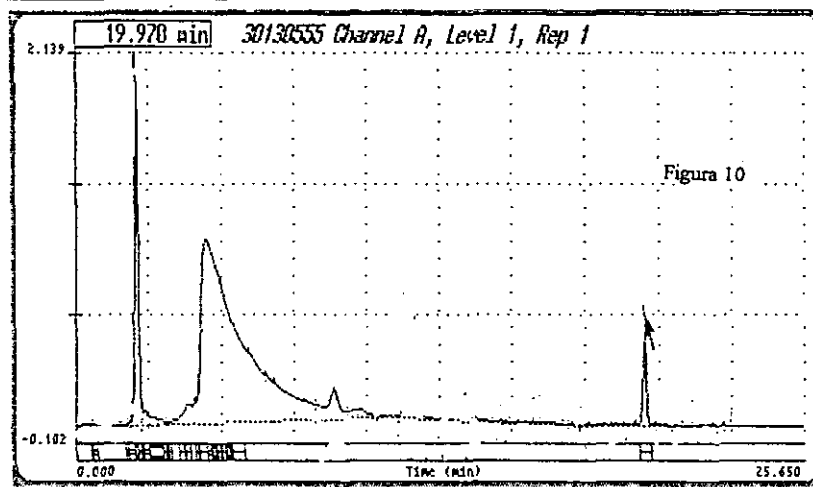
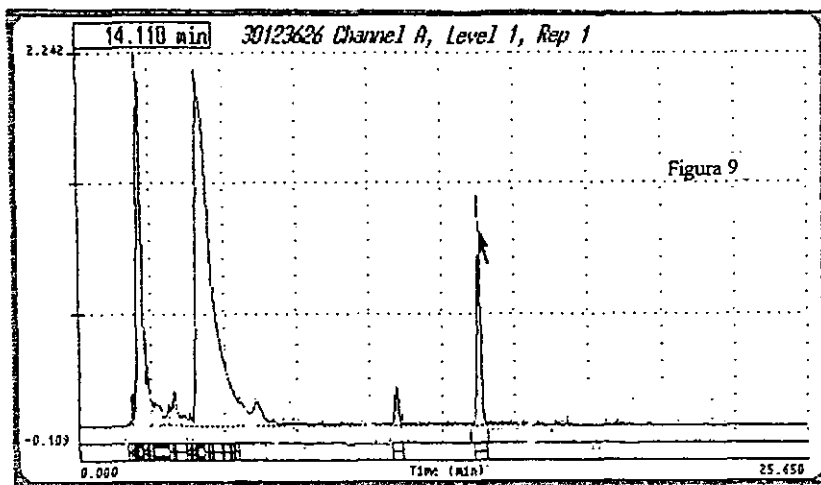


Fig 8. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar de las concentraciones de arginina de los tres grupos: sanos (I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).



Figuras 9-11 Cromatogramas obtenidos por HPLC de soluciones estándar de putrescina, espermidina y espermina. En el extremo superior izquierdo de cada figura se dan los tiempos de retención de cada poliamina.

Tabla 6. Concentraciones de putrescina, espermidina y espermina en plasma seminal humano.

GRUPO	PUTRESCINA mmol/L	ESPERMIDINA mmol/L	ESPERMINA mmol/L
I (9)	0.044 +/- 0.029	0.143 +/- 0.048	0.266 +/- 0.072
II (9)	0.011 +/- 0.033 (p=0.112)	0.097 +/- 0.018 (p=0.009) *	0.253 +/- 0.095 (p=0.757)
III (11)	0.18 +/- 0.007 (p=0.003) *	0.73 +/- 0.04 (p=0.004) *	0.252 +/- 0.115 (p=0.569)

Los datos representan el promedio +/- D.E. En paréntesis se indica número de muestras estudiadas. GRUPO : I sanos, II astenozoospermicos, III diabéticos insulino dependientes. * significancia estadística comparando con el control.

En la Tabla 7 se reportan los resultados del análisis de semen de los tres grupos: I sanos, II astenozoospermicos, III diabéticos tipo 1. Se observa que tres parámetros están alterados: la motilidad, la viabilidad y la morfología en los grupos II y III, mientras los otros parámetros se encuentran normales. En la motilidad, el grupo de pacientes astenozoospermicos presentó una astenozoospermia moderada ($p=0.005$) mientras que en el grupo de diabéticos el 85% también presentó esta alteración; en este grupo el paciente VRC no presentó motilidad y tuvo un 17% de viabilidad con un pH 6 y con aspecto anormal. En la Fig 15 se presenta el promedio y desviación estándar del % de motilidad A+B, tanto para el grupo astenozoospermico como para el diabético; hubo diferencias significativas ($p < 0.001$ y $p=0.001$, respectivamente). En la Fig 16 se presenta el porcentaje de viabilidad en el que sólo el grupo diabético presentó diferencia significativa con respecto al sano ($p=0.020$). En la Fig 17 está graficado el porcentaje promedio de la morfología de los tres grupos estudiados; hubo diferencias significativas en el grupo astenozoospermico y el diabético ($p=0.001$ y $p=0.009$, respectivamente) con relación al grupo sano.

La Tabla 8 muestra los resultados de la motilidad basal de los espermatozoides de los grupos estudiados, la motilidad A+B de espermatozoides incubados con putrescina, espermidina, espermina y L-arginina de cada grupo así como la media y desviación estándar, observándose para estas moléculas un efecto positivo en la movilidad. En las Figuras 18, 19 y 20 se graficó el porcentaje de motilidad tipo A de espermatozoides al adicionarse putrescina, espermidina, espermina o L-arginina en los individuos sanos, astenozoospermicos y diabéticos tipo 1. En el caso de la motilidad A basal los controles sanos presentaron diferencias significativas, con respecto a los grupos II y III. Al adicionarse la putrescina, espermina, espermidina y L-arginina

PUTRESCINA

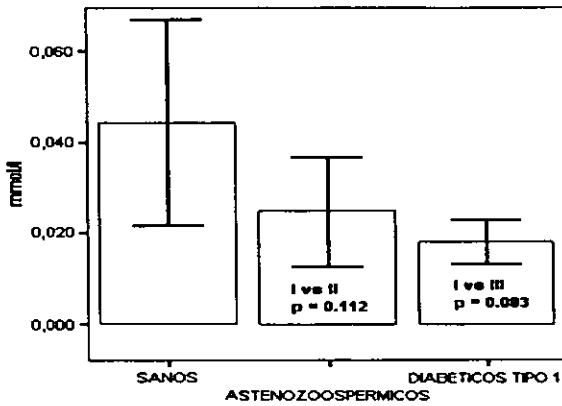


Fig 12. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar de las concentraciones de putrescina de los tres grupos: sanos(I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).

ESPERMIDINA

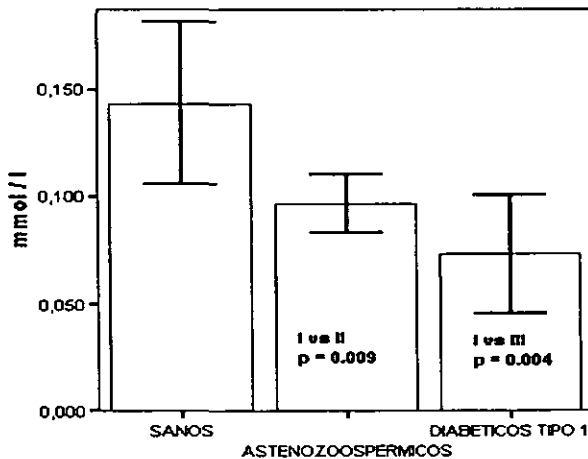


Fig 13. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar de las concentraciones de espermidina de los tres grupos: sanos(I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).

ESPERMINA

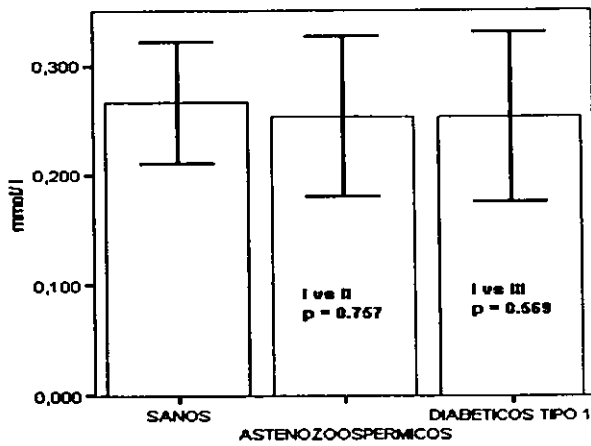


Fig 14. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar de las concentraciones de espermina de los tres grupos: sanos(I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).

Tabla 7 . Resultados del análisis de semen de hombres sanos, astenozoospermicos y diabéticos insulino dependientes.

ESPERMATOBIOSCOPIA

PARAMETROS	VALORES NORMALES WHO 1992 (73)	SANOS	x+/-D.E.	ASTENOZOOSPERMICOS	x+/-D.E.	DIABETICOS TIPO I	x+/-D.E.	
		EDAD	20 24 20 27 21 21 28 28 26 32	24.7+/-4.1	26 32 29 26 36 29 30 29 29 29	29.5+/-1.7	20 22 18 18 20 23 27 19 28 23 19 28 24	22.2+/-3.6
VOLUMEN	≥2.0	4.1 2.2 2.5 2.0 2.0 5.9 3.7 3.0 1.5 2.5	2.9+/-1.3	2.5 2.1 0.5 5.7 5.0 2.1 4.9 2.3 1.5 2.0	2.86+/-1.7	4.0 1.6 3.2 3.4 1.5 2.7 2.5 2.5 2.9 0.5 1.1 1.8 2.5	2.3+/-0.98	
CONCENTRACION	≥20X10 ⁶	106 121 94 125 125 101 175 243 87 73	125+/-50	162 33 221 43 25 214 99 104 45 101	104.7+/-73	180 208 91 149 240 184 132 138 113 156	136+/-61	
ASPECTO*	1	1 1 1 1 1 1 2 1 1 1		1 1 2 1 1 1 1 1 1 1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1		
LICUEFACCION *	1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		
VISCOSIDAD *	1	1 1 1 2 1 1 1 1 1 1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2		
pH	8	8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	8.0	8 8 8 8 8 8 8 8 8 8	8.0	8 8 8 8 8 8 8 8 8 6 8.5 8 8	7.9+/-0.58	
VIABILIDAD	≥75%	77 78 81 83 75 77 82 86 78 81	79.8+/-3.3	76 79 84 86 53 78 76 75 80 77	76.4+/-8.4	70 74 88 69 82 76 70 68 72 17 74 84 74	70.6+/-17	
MOVILIDAD (%)	A+B≥50%	59 63 67 63 60 53 72 80 65 65	64.7+/-7.4	34 40 17 42 28 17 28 35 30 29	30+/-8.4	39 36 72 44 29 22 34 14 34 0 26 49 56	37.9+/-16	
MORFOLOGIA	CRITERIOS ERICTOS DE KRUGER (74) ≥14%	34 26 40 77 55 25 51 58 17 34	41.7+/-18	33 9 4 2 20 6 23 32 11 11	15.1+/-11.2	1 32 24 20 9 42 22 13 17 24 13 26 53	22.8+/-14	

* 1. Normal 2. Anormal.

% MOTILIDAD A + B (BASAL)

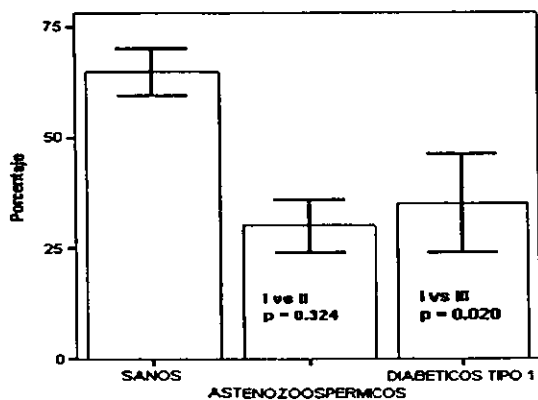


Fig 15. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar del porcentaje de motilidad A + B de los tres grupos: sanos (I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).

VIABILIDAD (BASAL)

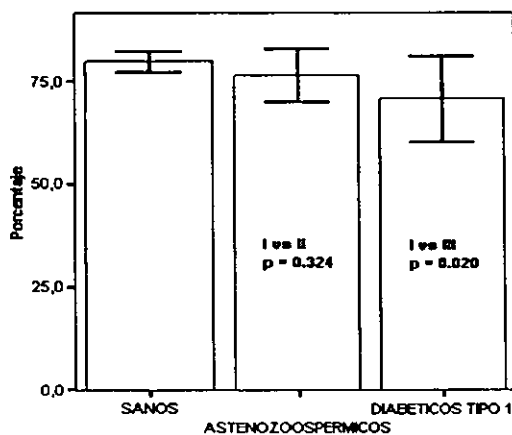


Fig 16. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar del porcentaje de viabilidad basal de los tres grupos: sanos(I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).

MORFOLOGIA (BASAL)

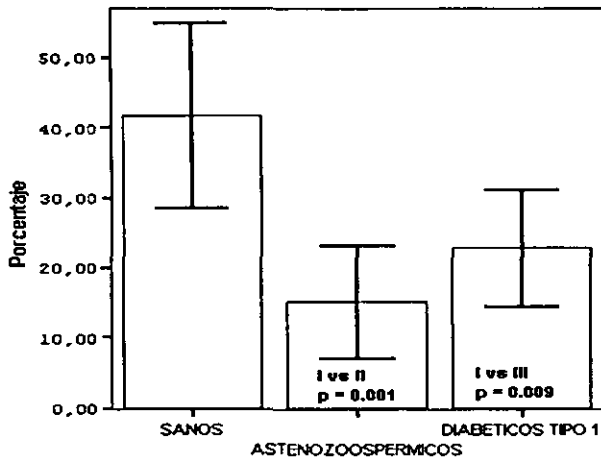


Fig 17. Las barras representan los valores del promedio y desviación estándar del porcentaje de morfología basal de los tres grupos: sanos (I), astenozoospermicos (II) y diabéticos tipo I (III).

Tabla 8. Motilidad de espermatozoides incubados con putrescina, espermidina, espermina y L-arginina en los 3 grupos de individuos estudiados

% MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS CON POLIAMINAS Y L-ARGININA								
GRUPO	IDENTIFICACION	EDAD (AÑOS)	EVOLUCIO N DMI (AÑO, MES)	MOTILIDAD A+B+C+D BASAL	MOTILIDAD A+B PUTRESCINA	MOTILIDAD A+B ESPERMIDINA	MOTILIDAD A+B ESPERMINA	MOTILIDAD A+B L-ARGININA
I	HCM	20		1+58+5+36	84+16	92+8	64+36	69+31
	TGF	24		0+63+12+23	25+75	NR	0+100	9+91
	GGD	20		16+51+3+28	98+2	96+4	95+5	91+9
	RTR	27		47+13+2+38	67+33	85+15	72+28	95+5
	JE	21		25+34+6+35	31+49	31+69	66+34	91+9
	ZJL	21		0+53+11+36	29+71	14+86	54+46	85+15
	CF	28		0+72+5+23	0+100	78+22	87+13	71+29
	SAA	28		1+79+6+14	62+38	94+6	99+1	95+5
	BJ	26		0+65+11+36	59+41	72+28	45+55	69+31
	SEJA	32		2+63+10+25	65+35	90+10	16+84	68+32
	GGG	26		0+34+7+59	9+91	44+56	63+37	71+29
	CVJ	32		3+37+15+45	82+18	84+16	67+33	69+31
	MCA	29		0+17+18+65	NR	NR	NR	NR
II	JRA	26		1+41+8+50	37+43	18+82	14+86	76+24
	VBA	32		0+28+11+61	8+92	29+71	16+84	53+47
	SO	29		0+17+51+32	18+82	NR	75+25	80+20
	RJ	30		0+28+29+43	5+95	NR	5+95	24+76
	CS	29		0+35+18+47	67+33	80+20	56+44	89+11
	RFJT			0+30+16+54	75+25	70+30	70+30	79+21
	CF	29		0+29+17+54	NR	NR	NR	NR
	MZJ	20	1 a	0+39+9+52	12+88	8+92	15+85	35+65
	TOE	22	7 a	0+36+20+44	35+65	7+93	23+77	73+28
	YHJ	18	10 a	0+72+7+21	86+14	98+2	86+14	83+18
III	ESG	18	1 a 6m	0+44+25+31	NR	60+40	54+46	70+30
	DLC	20	9 a	0+29+12+39	28+72	85+15	77+23	58+42
	MOG	23	8 a	0+25+31+44	72+28	40+60	96+40	54+46
	OLO	27	10 a	0+34+14+52	28+72	82+18	63+37	73+27
	SVA	20	9 a	0+14+35+51	0+100	50+50	50+50	50+50
	HRA	28	1 a	0+34+18+48	0+100	84+16	27+73	83+17
	VRC	23	2 a	0+0+16+84	NR	NR	NR	NR
	BRV	19	3 a	0+26+37+37	1+99	2+98	0+100	19+81
	ORD	28	6 a	0+49+8+43	65+35	98+12	94+6	93+7
	LAO	24	4 m	6+50+11+33	57+43	75+35	28+72	98+2

GRUPO: I Sanos, II Astenozoospermicos, III Diabéticos insulino dependientes. NR no hubo reacción.

MOTILIDAD TIPO A DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS CON POLIAMINAS Y
L-ARGININA
S A N O S

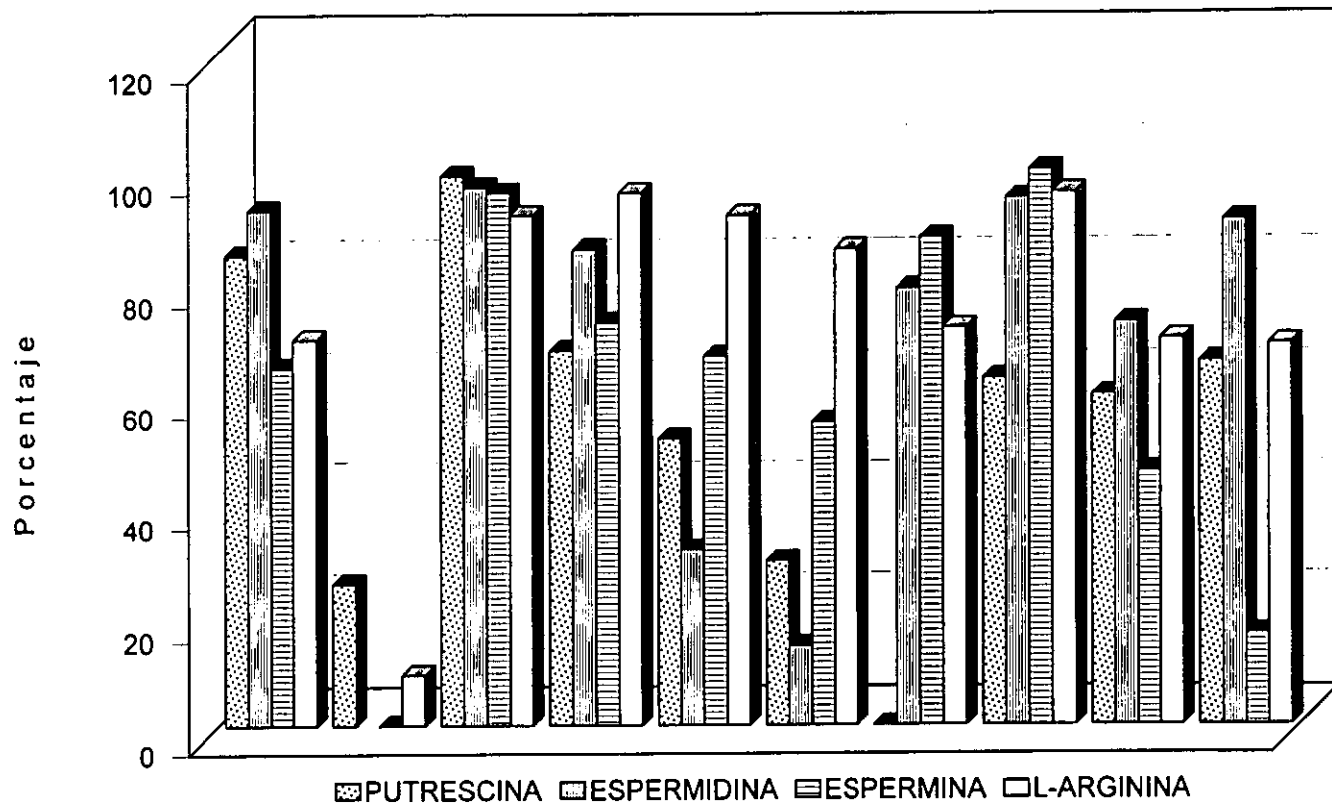


Fig 18.- Cada grupo corresponde a una muestra de espermatozoides de sujetos sanos, en el que se midió la motilidad tipo A, al adicionar putrescina, espermidina, espermina o L-arginina (n=10).

MOTILIDAD TIPO A DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS CON POLIAMINAS Y L-ARGININA

ASTENOZOOSPERMICOS

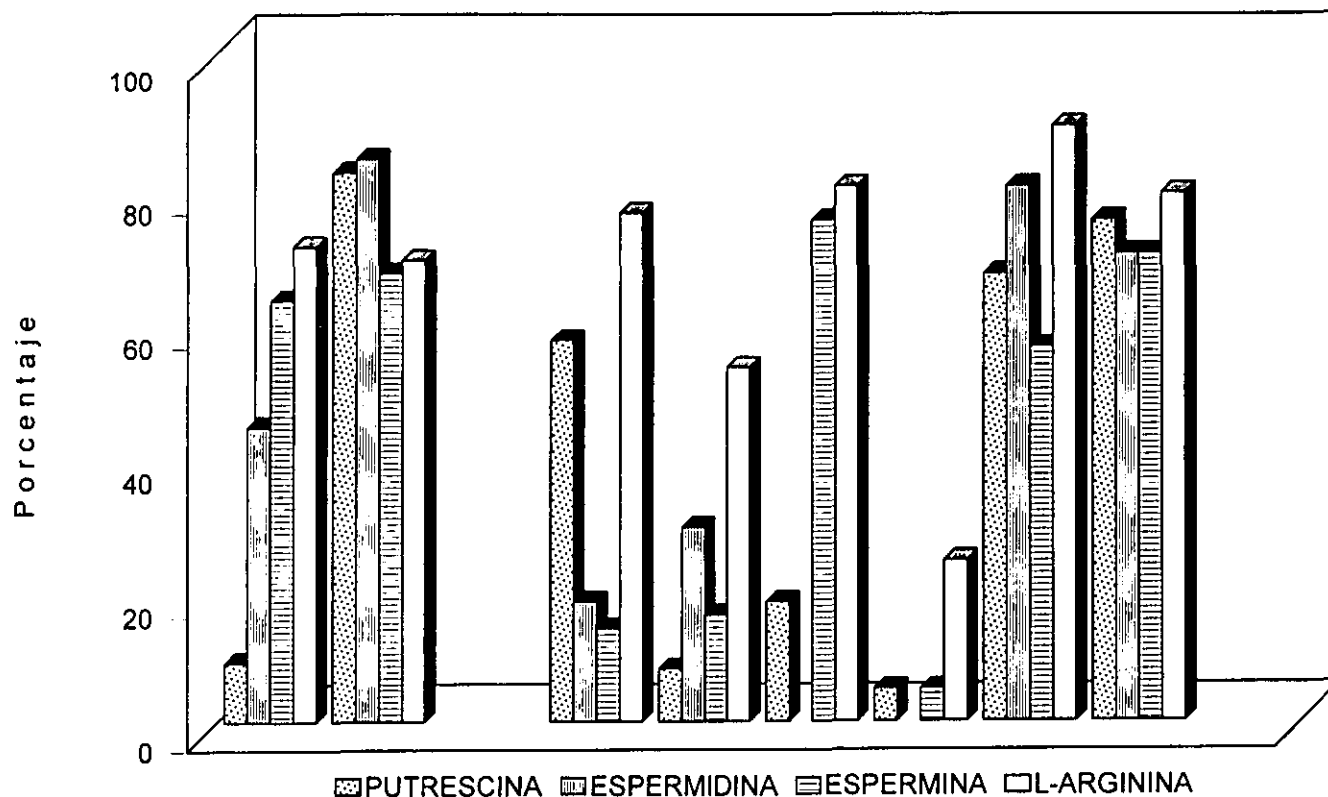
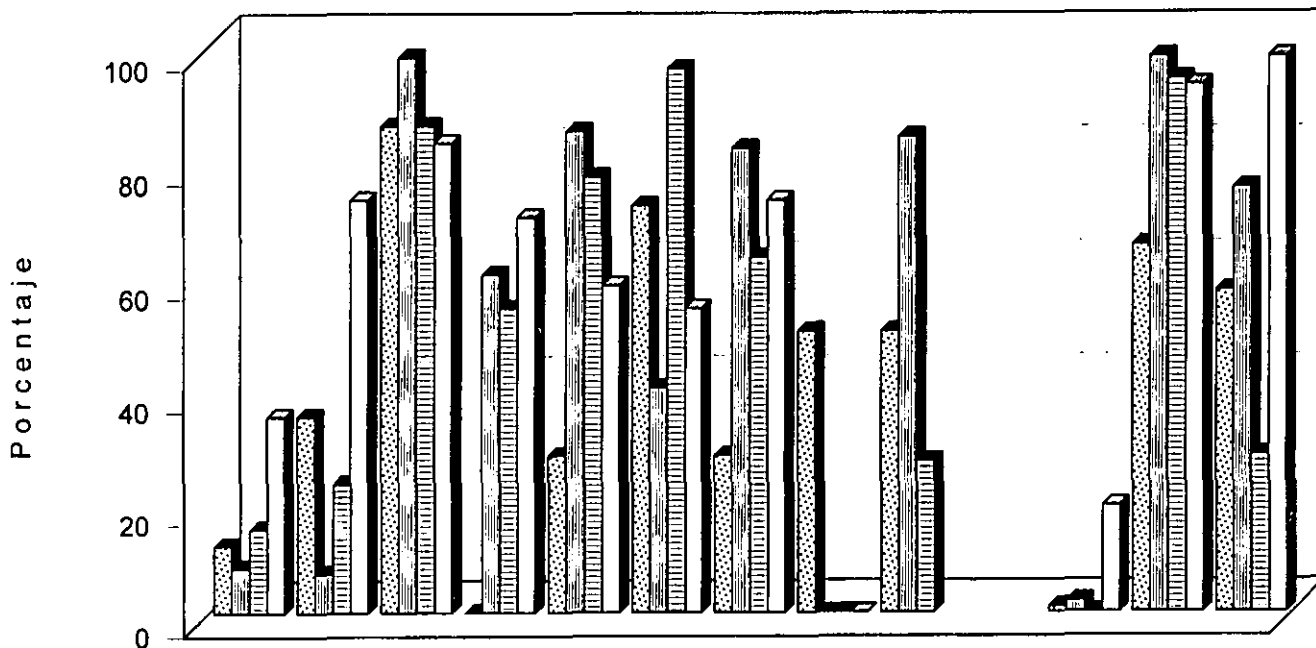


Fig 19.- Cada grupo corresponde a una muestra de espermatozoides astenozoospermicos, en el que se midió la motilidad tipo A, al adicionarse putrescina, espermidina, espermina o L-arginina (n=10).

MOTILIDAD TIPO A DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS CON POLIAMINAS Y L-ARGININA

DIABETICOS



■ PUTRESCINA ■ ESPERMIDINA ■ ESPERMINA □ L-ARGININA

Fig 20.- Cada grupo corresponde a una muestra de espermatozoides de pacientes diabéticos tipo I, en el que se midió la motilidad tipo A, al adicionarse putrescina, espermidina, espermina o L-arginina (n=13).

hubo un incremento favorable en los tres grupos. Desafortunadamente no fue posible comparar estos resultados con los de un grupo control en el que se hubiese evaluado el efecto del medio de incubación sobre la motilidad tipo A de los espermatozoides.

En la Tabla 9 se indica el porcentaje promedio de la motilidad tipo A (Figura 21) en presencia de poliaminas o L-arginina en orden descendente. Las moléculas que más favorecieron el aumento de la motilidad espermática tipo A fueron la L-arginina, seguida por la espermidina y la espermina y en menor medida la putrescina

El análisis estadístico realizado en los resultados obtenidos en la motilidad tipo A cuando se adicionó la L-arginina y/o poliaminas a espermatozoides de individuos sanos, astenozoospermicos y de pacientes diabéticos tipo 1, indicó que no hay diferencias significativas entre los grupos de sujetos sanos y los pacientes astenozoospermicos, ni entre los sujetos sanos y los diabéticos tipo 1. Un hallazgo importante fue el resultado que se obtuvo cuando al adicionar la L-Arginina y/o poliaminas al medio enriquecido provocó un aumento (I x = 65%, II x = 52%, III x = 50%) en la motiliada tipo A en espermatozoides a los que previamente se les retiró el plasma seminal, en el cual su motilidad tipo A fue baja (I x = 9%, II x = 0.4%, III = 0.46%).

Tabla 9 .- Eficacia de la L-Arginina y de las poliaminas sobre la inducción de la motilidad espermática tipo A .

% X M O T I L I D A D T I P O A		
SANOS		ASTENOZOOSPERMICOS
L-Arg 74.3%		L-Arg 67.62%
Spd 72.44%		Spd 54.17%
Spm 59.8%		Spm 45.75%
Pu 54.0% * (p= 0.0376)		Pu 40.12%
		DIABETICOS TIPO I
		L-Arg 59.64%
		Spd 53.25%
		Spm 46.9%
		Pu 40.33% * (p=0.016)

L-Arg.- L-arginina, Spd.- espermidina, Spm.-espermina, Pu.-putrescina.Los valores expresan el porcentaje medio de la motilidad tipo A.

*Hubo significancia estadística al comparar con la L-arginina.

MOTILIDAD TIPO A DE ESPERMATOZOIDES INCUBADOS CON POLIAMINAS Y L-ARGININA

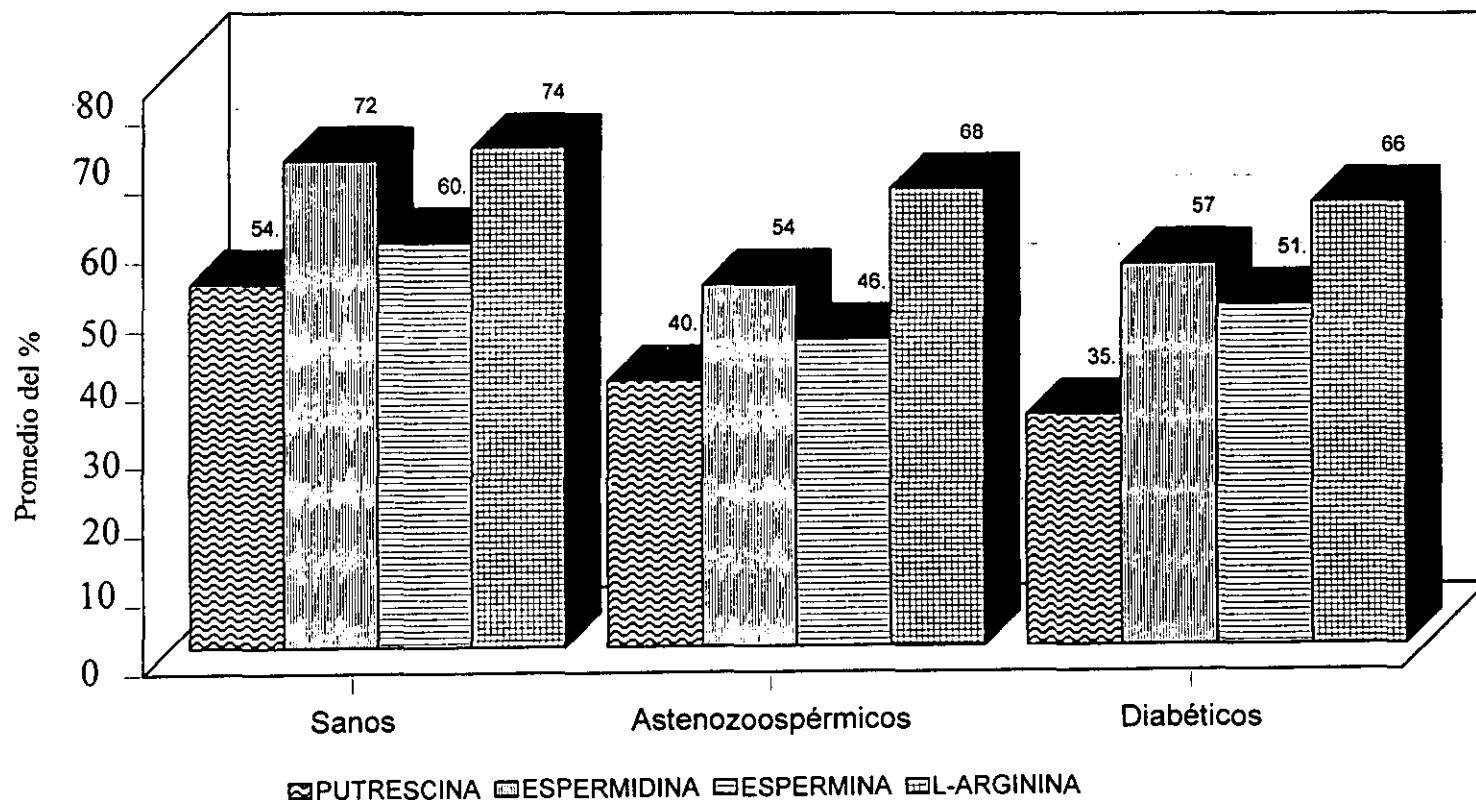


Fig 21.- Los histogramas representan valores promedio por grupo: I sanos (n=10), astenozoospermicos II (n=10), III diabéticos tipo 1(n=13). No se encontraron diferencias significativas al comparar los resultados de los tres grupos.

DISCUSION

En México la diabetes mellitus constituye uno de los problemas más importantes de salud pública con características de epidemia. Se registran anualmente más de 180 mil casos nuevos y la DM 1 es causa de alrededor de 36 mil defunciones. En México la DM 1 constituye alrededor del 1 a 2% de todos los casos de diabetes y suele diagnosticarse en la infancia o la adolescencia (54). En este trabajo se entrevistaron a 25 pacientes, sin embargo al considerar los criterios de inclusión: edad, tiempo de evolución, falla eyaculatoria, la población se redujo a 13 pacientes.

Analizando la química sanguínea y el perfil de lípidos, el 69% de los pacientes con DM 1 presentaron niveles de glucosa por arriba de 126 mg/dl. La medición de la HbA1c es un marcador confiable que nos permite analizar el control metabólico hasta en los dos meses previos al estudio. Los valores obtenidos en este parámetro estuvieron por arriba del 8%, a pesar de que asistían a la consulta cada mes. El 70% presentó concentraciones de colesterol y triglicéridos normales. En el 30% restante se observó buena correlación entre los niveles de lípidos altos y de más de 200 mg/dl de glucosa.

Los niveles hormonales en los pacientes con DM 1 fueron normales como otros investigadores reportan (58,61,69), sin embargo, de los cuatro pacientes con glucosa normal sólo dos de ellos presentaron ligera alteración en los niveles de LH y FSH. Con estos resultados está claro que no se encontró una correlación en los cambios entre la concentración de glucosa, HbA1c, triglicéridos, colesterol y niveles hormonales.

Se observó que el estado de hiperglucemia no alteró el volumen de semen y la concentración espermática, como ha sido reportado por otros autores (64,66,72,73,79) pero sí encontramos cambios en su viabilidad, motilidad y morfología lo que concuerda con reportes previos (66,70,71).

No se observó correlación alguna entre motilidad vs evolución de la diabetes, ni entre motilidad y HbA1c, así como tampoco entre motilidad y concentración de testosterona. Estos mismos resultados han sido encontrados en reportes de otros autores (99).

Cuatro pacientes con DM I presentaron teratozoospermia que sugiere un defecto en la espermatogénesis (100) y dos de ellos con hipospermia posiblemente debida a disminución en la actividad de glándulas accesorias. Todos ellos presentaron elevada la HbA1c y el tiempo de evolución fue variable (1, 3, 9 años, respectivamente), por lo que las anomalías en su función testicular pueden ser atribuibles al importante papel de la insulina en el mantenimiento de la función de las células de Leydig y de Sertoli, implicadas ambas directa e indirectamente en la regulación del eje hipotálamo-hipofisis-gónadas. Aunque la testosterona circulante con frecuencia es normal en pacientes con DM I bajo control metabólico, las concentraciones de T son bajas en hombres diabéticos con inestabilidad metabólica, en pacientes con diagnóstico reciente o jóvenes a los que se retira la insulina.

Las concentraciones de proteínas en plasma seminal en hombres normales han sido reportadas de 21-66 mg/ml (96) y 35-55 mg/ml (97). En este estudio se encontraron concentraciones de 49-69 mg/ml; al ser comparados estos valores con el grupo de pacientes astenozoospermicos no se encontró diferencias significativas, pero este valor resultó menor comparado con el grupo de pacientes diabéticos ($p=0.021$).

La arginasa además de su participación en el ciclo de la urea en el hígado, se asocia con la biosíntesis de poliaminas en tejidos extrahepáticos (99) donde facilita la disponibilidad de ornitina. Si la actividad de arginasa está disminuida en los pacientes con DM I y la concentración de arginina es normal es probable que no haya una adecuada producción de poliaminas y por lo tanto se espera que la concentración de poliaminas sea baja. En el caso de los pacientes astenozoospermicos la actividad de la arginasa fue normal, lo que concuerda con la presencia de una concentración normal de putrescina, mientras que la concentración de espermidina fue baja. Esto puede ser explicado en función de que cada poliamina es metabolizada de manera diferente.

Para la cuantificación de poliaminas se usó el método de Koski y col. (98) con el cuál la putrescina y la espermidina fueron identificadas a concentraciones de 0.015-0.073 y 0.095-0.191 mmol/l, respectivamente. Las concentraciones obtenidas para putrescina y espermidina fueron similares a los reportados en la literatura (101,102). Para la espermina hubo que aumentar diez veces su concentración para establecer bien su tiempo de retención, así como su sensibilidad, sin embargo los resultados no pudieron ser comparados con los de otros investigadores.

Las poliaminas están presentes en el semen en concentraciones relativamente altas, y se ha encontrado que ejercen un efecto positivo sobre la motilidad de los espermatozoides (32) por lo que se les ha implicado en su metabolismo. En este estudio, conociendo que los pacientes diabéticos presentan alteraciones en la motilidad espermática, se decidió cuantificar las concentraciones de L-arginina y las poliaminas, encontrándose que los pacientes DM 1 presentaron disminuidas las concentraciones de Pu y Spd, lo que podría explicar la astenozoospermia presente en el 85% de estos pacientes (2 con astenozoospermia leve, 7 con astenozoospermia moderada y 2 con astenozoospermia severa). La respuesta *in vitro* de los espermatozoides de estos pacientes DM 1 a la L-arginina y/o poliaminas no tuvo diferencias significativas al comparar con el grupo de individuos sanos, sin embargo podemos decir que fue buena en todos, con excepción de un paciente con astenozoospermia severa el en que no hubo respuesta con ninguna PA, esto posiblemente sea debido a que presentó una baja viabilidad (17%).

En el caso de los pacientes astenozoospermicos la espermidina también se encontró disminuida por lo que se puede decir que en ambos grupos su concentración fue baja y que ésto podría explicar su motilidad disminuida, afectando así la respuesta metabólica del espermatozoide.

Con los resultados obtenidos se puede señalar que el efecto *in vitro* de la L-arginina y las poliaminas sobre la motilidad espermática en pacientes astenozoospermicos (idiopáticos o con DM 1) fue bueno y que por ser compuestos biológicos que se encuentran en concentraciones bajas en el Aparato genital femenino (45) podrían ser una opción para procedimientos en

Reproducción Asistida ya que además tendrían la ventaja de no ser tóxicos en el Aparato reproductor femenino.

CONCLUSIONES

1. En los pacientes con DM I hubo un porcentaje alto de espermatozoides inmóviles, espermatozoides no viables y espermatozoides con morfología alterada.
2. El plasma seminal de los pacientes diabéticos tipo I, las concentraciones de proteínas se encontraron elevadas, la concentración de la L-arginina fue normal y la actividad de arginasa estuvo disminuida, comparadas con los sujetos sanos, lo que puede explicar la presencia de bajas concentraciones de Pu y Spd y que esto también se refleje en la astenozoospermia observada.
3. La adición de la L-arginina y/o las poliaminas a las muestras de semen de los tres grupos estudiados produjo un efecto estimulante de la motilidad en el espermatozoide.
4. En las condiciones de este estudio el efecto *in vitro* de las sustancias estudiadas fue positivo para las células espermáticas de los tres grupos estudiados.
5. Es conveniente la realización de otros estudios relacionados con Reproducción Asistida de tal manera que esto pueda tener aplicación clínica.

Reproducción Asistida ya que además tendrían la ventaja de no ser tóxicos en el Aparato reproductor femenino.

CONCLUSIONES

1. En los pacientes con DM 1 hubo un porcentaje alto de espermatozoides inmóviles, espermatozoides no viables y espermatozoides con morfología alterada.
2. El plasma seminal de los pacientes diabéticos tipo 1, las concentraciones de proteínas se encontraron elevadas, la concentración de la L-arginina fue normal y la actividad de arginasa estuvo disminuida, comparadas con los sujetos sanos, lo que puede explicar la presencia de bajas concentraciones de Pu y Spd y que esto también se refleje en la astenozoospermia observada.
3. La adición de la L-arginina y/o las poliaminas a las muestras de semen de los tres grupos estudiados produjo un efecto estimulante de la motilidad en el espermatozoide.
4. En las condiciones de este estudio el efecto *in vitro* de las sustancias estudiadas fue positivo para las células espermáticas de los tres grupos estudiados.
5. Es conveniente la realización de otros estudios relacionados con Reproducción Asistida de tal manera que esto pueda tener aplicación clínica.

REFERENCIAS

1. **Brooks DE** (1983). Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 36:205-210
2. **Hoskins DD, Vijayaraghavan S** (1990). A new theory on the acquisition of sperm motility during epididymal transit. En: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Gagnon CI (Ed) CRC Press. Inc, Florida pp 53-62
- 2a. **Harper MJK** (1988). Gamete and zygote transport. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neil J (eds.), Raven Press, New York, pp 103-134
3. **Arrondo JL, Pomerol JN** (1994). Recuerdo anatomofisiológico del testículo y vía seminal. En: *Práctica andrológica*. Pomerol JA (Eds) Masson- Salvat pp10-11
4. **Moore HDM, Hartman TD, Smith CA** (1986). *In vitro* culture of hamster epididymal epithelium and induction of sperm motility. *J Reprod Fertil* 78:327-330
- 4a. **Chavarría ME, Mercado E, Rosado A, Reyes A** (1996). Simultaneous determinations of Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} , and H^{+} in human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Molec Androl* 8:153-169
5. **Tash JS, Hidaka H, Means AR**. (1986). Axonin phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase is sufficient for activation of sperm flagellar motility *J Cell Biol* 1103:649-660
6. **Tash JS Means RL** (1987). Calcium regulation of sperm axonemal motility *Methods Enzymol* 139:808-815
7. **Tash JS, Means AR** (1973). Cyclic adenosine 3'5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* 28:75-80
8. **Stephens DT, Hoskins DD** (1988). Computerized flagellar analysis of the effects of the intracellular Ca-binding compounds Fura2, QUIN 2 and BAPTA on sperm flagellar waveform *Biol Reprod* 38:89-95
9. **Méndez JD, Hernández MP** (1993). Efecto de L-arginina y poliaminas sobre la movilidad espermática. *Ginec Obstet Mex* 61:229-234
10. **Garbers DL, Lust WD, First NL, Lardy HA** (1971). Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry* 10: 1825-1830
11. **Hoskins DD, Hall ML, Munsterman RD** (1975). Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. *Biol Reprod* 13: 168-175
12. **Goltz JS, Gardner TK, Kanus KK, Lindermann CB**. (1988). The interaction of pH and cyclic adenosine 3'5' monophosphate on activation of motility in Triton X-100 extracted bull sperm. *Biol Reprod* 39: 1129-1135

13. **Suarez SS, Pollard JW** (1990). Capacitation, the acrosome reaction and motility in mammalian sperm. En: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Gagnon CI (Ed) CRC Press. Inc, Florida pp 77-91
14. **Yanagimachi R** (1988). Mammalian fertilization En *Physiology of Reproduction*. Knobil E, et al. Eds Raven Press. New York, 135-160
15. **Fraser LR, Quinn PJ** (1981). A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil* 61:25-40
16. **Sumio I, Hideo M** (1990). Beating patterns of mammalian spermatozoa. En: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Gagnon CI (Ed) CRC Press. Inc, Florida pp 29-42
17. **Mann T, Lutwak-Mann C** (1981). Male Reproductive Function and Semen. Ed Springer-Verlag Berlin
18. **Salisbury GW, Lodge JR** (1962). Metabolism of spermatozoa. *Adv Enzymol* 24:35-104
19. **Bohnensack R, Halangk W** (1986). Control of respiration and motility in ejaculated bull spermatozoa. *Biochem Biophys Acta* 850:72-80
20. **Seiler N, Delcros JG, Moulinox JP** (1996). Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J. Biochem* 28(8): 843-861
21. **Mc Cormick F** (1978). Polyamine metabolism in enucleated mouse L-cells. *J Cell Phys* 93: 285-292.
22. **Wallace HM** (1996). Polyamines in human health. *Proc Nutr Soc* 55(1B):419-431
23. **Méndez JD** (1989). Polyamines and human reproduction. En: *The Physiology of Polyamines*. Vol I. Bachrach U and Heimer Y (Eds.) CRC Press, Inc. Florida USA Vol 1 pp. 23-38
24. **Suzuki O, Matsumoto T, Katsumata Y** (1984). Determination of polyamine oxidase activities in human tissues. *Experientia* 40 (8):838-839
25. **McIndoe JH, Turkington RW** (1973). Hormonal regulation of spermidine formation during spermatogenesis in the rat. *Endocrinology* 92(2):595-605
26. **Mann T** (1964). *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*, John Wiley & Sons, New York pp 193
27. **Rhodes JB, Williams-Ashman HG** (1964). Observations on polyamines in male accessory glands of reproduction. *Med Exp* 10:281-285
28. **Huggins C** (1945). The physiology of the prostate gland. *Physiol Rev* 25:281-287
29. **Williams-Ashman HG, Lockwood DH** (1970). Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. *Ann N Y Acad Sci* 171: 882-894

30. Bamberg E, Weiser M, Desser H (1975). Polyamines in bovine epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil* 45: 363-365
31. Rubinstein S, Breitbart H (1994). Cellular localization of polyamines: Cytochemical and ultrastructural methods providing new clues to polyamine function in ram spermatozoa. *Biol Cell* 81:177-183
32. Tabor CW, Rosenthal SM (1956). Pharmacology of spermine and spermidine: some effects on animals and bacteria. *J Pharmacol Exp Ther* 116: 139-155
33. White IG (1954). The effect of some seminal constituents and related substances on diluted mammalian spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 7:739-755
34. Morton B, Fraser C, Sagadraca R (1979). Initiation of hamster sperm motility from quiescence: Effect of conditions upon flagellation and respiration. *Fertil Steril* 32:222-225
35. Tabor CW, Tabor H (1984). Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:759-790
36. Qian Z-U, Tsai YM, Steinberg A, Lu M, Greenfield ARL, Haddox MK (1985). Localization of ornithine decarboxylase in rat, testicular cell and epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 33:1189-1195
37. Fair WR, Clark RB, Wehner N (1973). A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human. *Fertil Steril*.23(1):38-42
38. Janne J, Holtta E, Haaranen P, Elfving K (1973). Polyamines and polyaminic-metabolizing enzyme activities in human semen. *Clin Chim Acta* 48(4):393-401.
39. Bedford JM (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals *Biol Reprod Suppl*.2:128-158
40. Chang MC, Hunter RHF (1977). Capacitation of mammalian sperm: biological and experimental aspects En *Handbook of Physiology* Section 7 Vol.5 Greep RO. Eds American Physiological Society Washington DC:339
41. Shur BD, Hall NG (1982). Sperm surface galactosyltransferase activities during *in vitro* capacitation. *J Cell Biol* 95: 567-576
42. Mendoza C (1997). La reacción acrosómica en el espermatozoide humano. En: *Reproducción Humana*. Remohi J. Mc Graw Hill/Interamericana de España, SA pp.120-121
43. Fraser LR (1982). Ca^{2+} is required for mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *J Androl* 3: 412-419
44. Sheth AR, Moodbidri SB (1977). Significance of polyamines in reproduction. *Adv Sex Horm Res* 3:51-74
45. Romano M, Cecco L, Santacrose MA, Cerra M, Pagnano AM, Paladini A (1984). Polyamine levels and ODC activity in the normal human endometrium and myometrium, in the myoma and the endometrial carcinoma.

- En: *Advances in polyamines in Biomedical Sciences*. Caldarera CM, Bachrach U. Eds. CLUEB, Bologna, Italy 145-150.
46. **Mendez JD, Martinez I** (1995). Arginase activity in ram epididymal and ejaculated spermatozoa. *ARTA* 7:131-136
 47. **Radany EW, Atherton RW** (1981). Arginine induced stimulation of rabbit sperm motility. *Arch Androl* 7:351-355
 48. **Keller DW, Polakoski KL** (1975). L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro. *Biol Reprod* 13:154-157
 49. **Tanimura J** (1967). Studies on arginine in human semen. *Bull Osaka Med Sch.* 13:76-83.
 50. **Schachter A, Friedman S, Goldman JA, Eckerling B** (1973). Treatment of oligospermia with the amino acid arginine. *Int J Gynaec Obstet* 11(5):206-209
 51. **The Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association** (1997). *Diabetes Care* 20 (7): 1183-1194.
 52. **Islas Andrade SI, Revilla M MC, González V C, Méndez J D, Sánchez de la Peña S** (1997). Diabetes mellitus, ventajas de la nueva clasificación. *Rev Med IMSS (Mex)* 35(4):321-325
 53. **Guía Técnica de Prevención y Control de la Diabetes Mellitus.**(1998) IMSS. Dirección de Prestaciones Médicas. Coordinación de Salud Comunitaria.
 54. **Lerman GI** (1998). Atención Integral del Paciente Diabético. McGraw-Hill Interamericana 2ª ed. pp.3-5
 55. **Spector IP, Leiblum SR, Carey MP** (1993). Diabetes and female sexual function: A critical review. *Ann Behav Med* 15: 257-264
 56. **Valdés la Vallina F** (1999). Disfunción eréctil masculina y coit. En: *Medicina Reproductiva en México*. Vázquez Benitez E, (Eds) JGH pp 195-198
 57. **Mc Culloch DK, Cambell IW, Wu FC, Prescott RJ, Clarke BE** (1980). The prevalence of diabetic impotence. *Diabetologia* 18(4):279-283
 58. **Murray FT, Wyss HU, Thomas RG, Spevack M, Glaros AG** (1987). Gonadal dysfunction in diabetic men with organic impotence. *J Clin Endocrinol Metab.* 65(1):127-135
 59. **Wang CJ, Shen SY, Wu CC, Huang CH, Chiang CP** (1993). Penile blood flow study in diabetic impotence. *Urol Int* 50(4):209-212
 60. **Bemelmans BL, Meuleman EJ, Doesburg WH, Notermans SL, Debruyne FM** (1994). Erectile dysfunction in diabetic men: The neurological factor revisited. *J Urol* 151(4):884-889

61. Distiller LA, Sagel J, Morley JE, Jottel HC (1975). Pituitary responsiveness LH-RH in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 24:378-384
62. Ando S, Rubens R, Rottiers R (1984). Androgen plasma levels in male diabetics. *J Endocrin Invest* 7:24-34
63. Calvo JC, Baranao JLS, Tesone M, Charreau EH (1984). Hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis in the streptozotocin-induced diabetic male rat. *J Steroid Biochem* 20:769-772
64. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Yue DK, Turtle JR (1985). Testicular function and glycemic control in diabetic men: A controlled study. *Andrologia* 17:488-496
65. Dinulovic D, Radonjic G (1990). Diabetes mellitus/male infertility. *Archiv Androl* 25:277-293
66. Barták V, Josifko M, Horackova M (1975). Juvenile diabetes and human sperm quality. *Int J Fertil* 20:30-32
67. Paz G, Homonnai D, Cordova T, Kraicer PF (1977). Immunoreactive insulin in serum and seminal plasma of diabetic and nondiabetic men and its role in the regulation of spermatozoal activity. *Fertil Steril* 28(8): 836-840
68. Barták (1979). Sperm quality in adult diabetic men. *Int J Fertil* 24(4):226-232
69. Garcia-Diez LC, Corrales Hernández JJ, Hernández Diaz J, Pedraz M Miralles JM (1991). Semen characteristics and diabetes mellitus: Significance of insulin in male infertility. *Arch Androl* 26: 119-127
70. Koslov GI, Kamalov KG (1989). Sperm characterization in patients with diabetes mellitus suffering from sexual disorders. *Probl Endokrino Mosk* 35(2):6-9
71. Vignon F, Le Faou A, Montagnon D, Pradignac A, Cranz C, Winiszewsky P, Pinget M (1991). Comparative study of semen in diabetic and healthy men. *Diabetes Metab* 17(3):350-354
72. Klebanow D, MacLeon J (1960). Semen quality and certain disturbances of reproduction in diabetic men. *Fertil Steril* 11:255-259
73. Ali ST, Shaikh RN, Siddiqi NA, Siddiqi PQR (1993). Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy. *Arch Androl* 30:47-54
74. Voet D, Voet J (1992). Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona pp 529
75. Gondos B, Bevier W (1995). Effect of insulin on testicular alterations in the nonobese diabetic mouse. *Ann Clin Lab Sci* 25(3):272-277
76. Karl AF, Grisworld MD (1980). Actions of insulin and vitamin A on Sertoli cells. *Biochem J* 186:1001-1003

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

77. Adashi EY, Fabrics E, Hsueh AJW (1982). Insulin augmentation of testosterone production in a primary culture of rat testicular cells. *Biol Reprod* 26:270-280
78. Lin T, Haskell J, Vison N, Terracio L (1986). Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: A comparative study. *Endocrinology* 119:1641-1647
79. Spellacy WN, Cantor B, Snyder F, Buhi WC, Birk SA (1979). Carbohydrate, metabolism and the semen profile: Glucose, insulin, and sperm studies. *Fertil Steril* 32(5):562-564
80. Halley SB, Cummings (1993). Tamaño de la muestra requerido por grupo cuando se usa la prueba de la t para comparar medias de variables continuas. En: *Diseño de investigación clínica. Un enfoque epidemiológico*. Ed. Dogma, pp.142-165
81. Fisher-Fischbein J (1990). The effects of pharmaceuticals, environmental, and occupational agents on sperm motility. En: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Gagnon Cl (Ed) CRC Press. Inc, Florida pp 349-366
82. Kadish AH, Sternberg (1969). Determination of glucose by measurement of rate of oxygen consumption. *Diabetes* 18(7):467-470
83. Rey A, Hanss M (1971). Microdosage rapide de l'urée sanguine par conductimétrie. *Ann Biol Clin* 29:323-328
84. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1992). Routine urinalysis and collection. transportation and preservation of urine specimens. Tentative guidelines. NCCLS publication GP-16-T Villanova
85. *Procedures for Collection of Diagnostic Blood Specimen Venipuncture* (1984). (second edition: Approved Standard) Vol 4 NCCLS Publication H3-A2, Villanova, PA
86. Wahlefeld AW. En: HU Bergmeyer (1974). *Methoden der enzymatischen analyse*. 3a ed. tomo II, Verlag Chemie, Weinheim. pp 1878
87. Siedel J, Hägele EO, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW (1983). Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* 29:1075-1080
88. Katterman R, Jaworek D, Moller G, Assman G, Bjorkhem I, Svensson L, Borner K, Boerma G, Leijnse B, Desager JP (1984). Multicentre study of a new enzymatic method of cholesterol determination *J Clin Chem Clin Biochem* 22(3):245-251

89. Lopez-Virella MF, Stone S, Ellis, Coldwell JA (1977). Cholesterol determination in high density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 23:882-884.
90. Friedewald WT, Levy FI, Fredrickson DS (1972). Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502
91. Warnick GR, Knopp RH, Branson L (1990). Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of Nationally Recommended Cutpoints. *Clin Chem* 36(1):15-19
92. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction (1992). Third edition. Published on behalf of the World Health Organization for Cambridge University Press 1992
93. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KS, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA (1987). A quick reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl* 18:275-277
94. Kung TJ, Books SB, Jackway JP, Leonard LL, Tamalge DW (1977). Suppression of *in vitro* cytotoxic response by macrophages due to induced arginase *J Exp Med* 146 :665-672
95. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent *J Biol Chem* 193:265-275
96. Nun S, Musacchio I, Epstein JA (1972). Variations in seminal plasma constituents from fertile, subfertile and vasectomized azoospermic men. *Fertil Steril* 23(5): 357-360
97. Mawhinney MG, Tarry WF (1989). Male accessory sex organs and androgen action. En: Infertility in the male. Stuarts Howard (Ed.) Mosby Year Book Lipshultz 1989: pp 130-154
98. Koski, Ilkka M Helander, Matti Sarvas Matti Vaara (1987). Analysis of polyamines as their dabsyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 164:261-266
99. Niven MJ, Hitman GA, Badenoch DF (1995). A study of spermatozoal motility in type I diabetes mellitus. *Diabet Med* 12 (10): 921-924
100. Shrivastav P, Swann J, Jeremy JY, Thompson C, Shaw RW, Dandona P (1989). Sperm function and structure and seminal plasma prostanoid concentrations in men with IDDM. *Diabetes Care* 12(10): 742-744
101. Singer R, Sagiv H, Levinsky H, Maayan R, Segenreich E, Allalouf D (1989). The influence of seminal plasma and polyaminic substances on the motility of isolated human sperm *Int J Fertil* 34(3): 224-230

102. Oefner PJ, Wongyai S, Bonn G (1992). High-performance liquid chromatographic determination of free polyamines in human seminal plasma
Clin Chim Acta 205:11-18