

2ej. 11



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

OBTENCION Y CARACTERIZACION  
PARCIAL DEL COMPLEJO  
LIPOPROTEINA-ZINC EN LAS  
MEMBRANAS DEL ESPERMATOZOIDE  
HUMANO Y SU POSIBLE RELACION CON  
EL PROCESO DE LA CAPACITACION

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO**

PRESENTA

**FELIPE LEON OLIVARES**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E.

	pág.
I INTRODUCCION .....	1
II MATERIAL Y METODOS .....	8
II.1 Material biológico .....	9
II.2 Manejo de las muestras biológicas .....	9
II.3 Preparación de los espermatozoides lavados ...	10
III OBTENCION DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC .....	13
III.1 Preincubación .....	13
III.2 Extracción salina .....	13
III.3 Extracción alcalina .....	13
III.4 Purificación del complejo lipoproteína-zinc..	15
IV ANALISIS DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC .....	16
IV.1 Determinación de zinc en el complejo, en los - sobrenadantes de extracción y de purificación.	16
IV.2 Determinación de proteína en el complejo, en - los sobrenadantes de extracción y de purifica- ción. ....	17
V EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES DEL COMPLEJO PURI - FICADO .....	20
V.1 Determinación cuantitativa de fósforo de fosfo- lípidos totales del complejo lipoproteína-zinc.	21
V.2 Determinación cuantitativa de colesterol del - complejo lipoproteína-zinc .....	24
VI IDENTIFICACION DE LIPIDOS DEL COMPLEJO LIPOPRO- TEINA-ZINC POR CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA .....	28
VII ELECTROFORESIS DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC .	32
VIII RESULTADOS .....	38
IX DISCUSION .....	48
X BIBLIOGRAFIA .....	55

I N T R O D U C C I O N .

---

La célula sexual masculina fué descubierta en 1677 por Johan Hamm y es considerada como una de las células - más diferenciadas del organismo. Estas células se encuen - tran suspendidas en un medio flúido llamado " plasma semi - nal " y en conjunto forman el semen.

Los dos componentes del semen difieren tanto en su origen, como en su composición química. El espermatozoide se origina en el testículo durante el transcurso de un pro - ceso de diferenciación celular llamado espermatogénesis, - que comprende el desarrollo de la espermatogonia por divi - sión mitótica en espermatocono de primer orden, el cual - por medio de meiosis forma dos espermatoconos de segundo - orden haplóides, que a su vez formarán cada uno dos esper - máticas haplóides.

La diferenciación de espermática para convertirse en espermatozoide llamada espermiogénesis que comprende va - rias etapas entre las que destacan las siguientes: origen del flagelo, migración de las mitocondrias alrededor del - flagelo y formación del acrosoma a partir del aparato de - Golgi; así la gameta queda constituida por dos grandes re - giones: cabeza y cola. La porción anterior de la cabeza - del espermatozoide está cubierta por el acrosoma y por - ello se le conoce como región acrosomal y a la otra por - ción de la cabeza se le denomina región postacrosomal, la - cual se une a la cola a través del cuello ( fig. 1 ).

Los espermatozoides, una vez formados en los tubos seminíferos del testículo, continúan su trayectoria a tra - vés de los conductos que constituyen la vía rete testis: - estos conductos convergen para formar la vía eferente por - donde los espermatozoides pasan al epidídimo que es un -

conducto largo, delgado y altamente enrollado sobre sí mismo, distinguiéndose en cada epidídimo tres regiones: - que se conocen como cabeza, cuerpo y cola, mismas que son diferentes en estructura celular y en el tipo de secreciones. La cabeza del epidídimo se une al polo superior del testículo y está formado esencialmente por los tubos eferentes. El cuerpo se extiende a lo largo de la cara posterolateral del testículo y está formada esencialmente por el conducto del epidídimo. La cola del epidídimo llega casi al polo inferior del testículo y termina en el conducto deferente ( Ham. W.A, 1975 ).

El espermatozoide de diferentes mamíferos, incluyendo al humano, ha servido como modelo ideal para realizar diferentes investigaciones relacionadas con la Biología Molecular y Fisiología. La célula espermática que posee características muy particulares, en mamíferos permite ser estudiada desde su vida testicular, epididimaria y posteriormente no sólo después de la eyaculación; sino también después de interaccionar con estructuras moleculares presentes en forma natural en las secreciones del tracto genital femenino. De esta manera se ha podido establecer que durante el proceso de transformación de espermática a espermatozoide el zinc es incorporado y fuertemente unido al núcleo ( 2,3 ). Esta incorporación parece tener un papel relevante para el desarrollo del espermatozoide. Por lo tanto, un signo primario relacionado con la deficiencia de zinc es la interrupción de la maduración de la espermática en su transformación a espermatozoide ( 4 ). Sin embargo, el espermatozoide pierde una cierta cantidad de zinc durante el proceso de maduración en su

tránsito por el epidídimo a nivel de la región proximal - de la cabeza de este órgano ( 3,4,5 ); ésta pérdida de - zinc va acompañada de una disminución significativa de lipoproteínas durante este proceso de maduración ( 6,7 ), - como parte de los cambios que necesariamente deben aconte - cer en el espermatozoide durante su tránsito por el órga - no epididimario.

Tomando en cuenta que la concentración de zinc es particularmente alta en la secreción de la próstata y que los espermatozoides y el fluido prostático normalmente - son expulsados conjuntamente durante la fase inicial de - la eyaculación, durante este proceso el espermatozoide - vuelve a reincorporar cantidades importantes de zinc al - entrar en contacto con la secreción de la próstata. Es - por esto que el plasma seminal y el espermatozoide de - ciertos mamíferos incluyendo al humano, contienen una al - ta concentración de zinc comparada con la encontrada en - otras células y fluidos corporales ( 8 ). Mawson y Fisher han reportado que solamente el 0.05 % del zinc presente - en el espermatozoide es atribuido a la anhidrasa carbóni - ca ( 9 ). Por lo tanto, el zinc no parece actuar simple - mente como un grupo prostético en ciertas enzimas, sino - más bien desempeña un papel muy importante en la regula - ción metabólica del espermatozoide.

Altas concentraciones de zinc también han sido re - portadas en espermatozoides de algunas especies de inver - tebrados marinos en los que la mayor parte de zinc parece estar localizada en la pieza media y acrosoma del esperma - tozoide ( 10 ). También es conocido que en estas especies la salida de zinc al ambiente es espontánea o inducida -

por la adición de histidina y otras sustancias quelantes. Esta disminución es correlacionada en algunas especies con la iniciación, grado y duración de la actividad del espermatozoide ( 10 ) y también con la oxidación de fosfolípidos endógenos los cuales aparentemente parte de ellos se encuentran formando complejos lipoproteínas-zinc ( 11 ). Puede sugerirse que la concentración pasiva de zinc no parece ser el factor más importante, sino más bien la liberación activa del metal inducida por la presencia de agentes quelantes naturales específicos que forman parte de la composición de las secreciones intragenitales ( 12 ), que por otra parte, podría correlacionarse con los incrementos significativos en el consumo de oxígeno, en la motilidad espermática y consumo selectivo de fosfolípidos endógenos cuando las células son incubadas in vitro en presencia de histidina, cisteína o EDTA ( 13,14 ).

Estudios relativamente recientes han permitido conocer que en el espermatozoide humano eyaculado, el zinc se encuentra distribuido en dos formas: a) fuertemente unido a estructuras presentes en el núcleo y no extraíble fácilmente por la adición de histidina, cisteína o EDTA, el cual representa del 25-28 % del contenido total presente en el espermatozoide ( 30 ug /  $1 \times 10^{-9}$  células ), b) débilmente unido y fácilmente removido por la presencia de histidina, cisteína o EDTA, el cual representa del 70-75 % ( 8,13 ). En este sentido es importante mencionar que en los estudios de Kinoshita ( 15 ) realizados con espermatozoides de invertebrados, demostraron que el zinc se encuentra exclusivamente combinado con una fracción lipoprotéica no básica. Esta particular afinidad del zinc por lipoprote



inas parece ser una propiedad general de este metal -  
( 15,16 ).

Es probable que las dos categorías de unión del metal con las estructuras de los espermatozoides determinen dos formas específicas de acción del elemento. De esta manera la cantidad ( 70-75 % ) débilmente unida en las membranas plasmática y acrosomal externa, parece ser determinante para los cambios de estructura y funcionalidad de estas membranas relacionadas con el proceso de la capacitación.

Los espermatozoides de mamíferos son capaces de penetrar el óvulo solo después de haber sido sometidos a los cambios morfológicos y bioquímicos durante su maduración en el epidídimo. Esta parcial habilidad fertilizante del espermatozoide adquirida durante su estancia en el epidídimo es acompañada por varios cambios: fisiológicos, tamaño, carga eléctrica, aspecto y pérdida de la gota citoplásmica, propiedades metabólicas y motilidad características ( 17 ).

Durante el proceso de la eyaculación los espermatozoides vuelven a ser sometidos a otros cambios como consecuencia de las interacciones con las secreciones de las glándulas accesorias. Estas secreciones son parcialmente adsorbidas en la membrana plasmática de los espermatozoides, las que posteriormente serán desadsorbidas durante el proceso conocido como capacitación; y que normalmente, ocurre en el tracto reproductor femenino permitiendo la adquisición de la habilidad fertilizante del espermatozoide.

La capacitación representa cambios a nivel molecular dentro de las membranas de los espermatozoides. Pue-

de también involucrar la pérdida del factor discapacitante el cual es producido por el epidídimo o las glándulas sexuales accesorias del macho y unido al espermatozoide - ( 18,19 ). El útero y el oviducto son capaces de capacitar a los espermatozoides independientemente. Sin embargo, las condiciones óptimas del proceso son proporcionadas - por la combinación de ambos sitios.

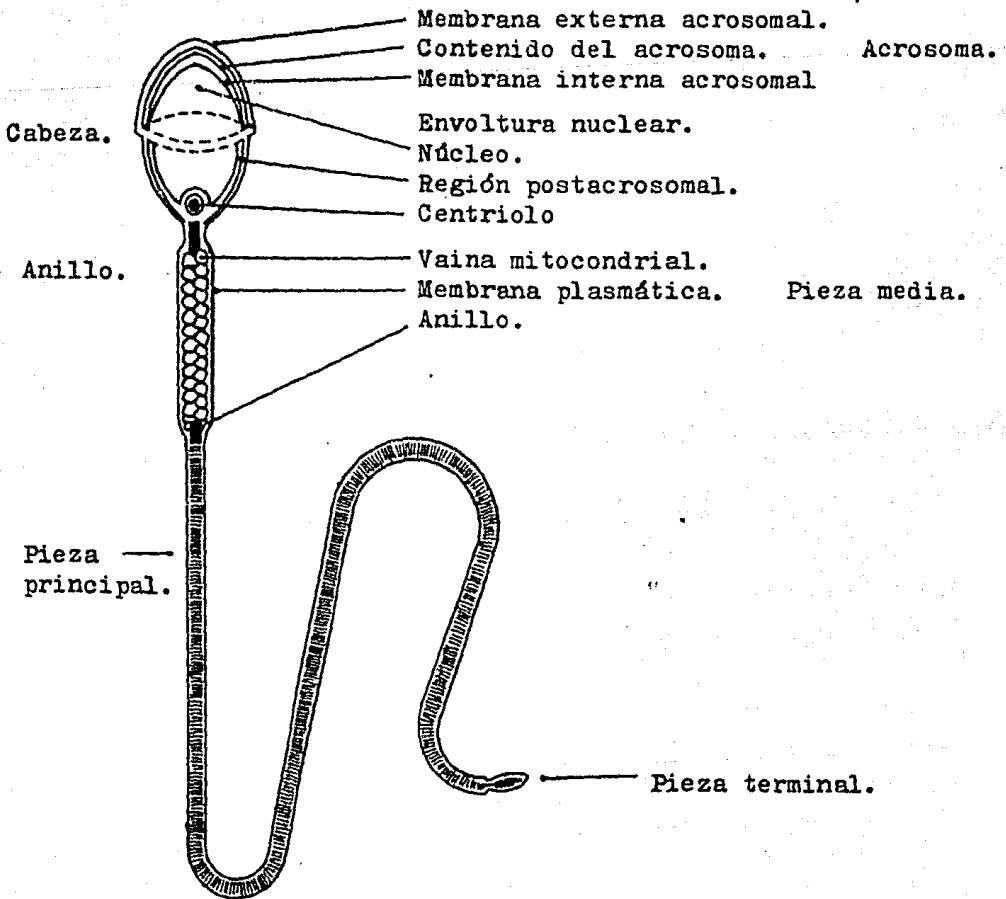
Es muy probable que la presencia del complejo lipoproteína-zinc reportado en espermatozoides de algunos invertebrados marinos ( 11 ) sea una característica común - con los espermatozoides de mamíferos, incluyendo al humano. Las investigaciones realizadas por Lavon y colaboradores, sugieren que las lipoproteínas de la membrana de los espermatozoides de bovino parecen ser los sitios principales de alteración en la composición y comportamiento electroforético de las proteínas de los espermatozoides durante la maduración epididimaria.

Es bien conocido que cuando los espermatozoides - eyaculados de humano son incubados in vitro en presencia de histidina, cisteína o EDTA, se produce una disminución significativa de zinc en forma casi espontánea ( 13 ). Es probable que parte del zinc liberado bajo estas condiciones se encuentre combinado con estructuras lipoprotéicas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide - las cuales, además de estar participando en la estructura membranaral, también podrían contribuir en los cambios bioquímicos que ocurren durante la capacitación ( 20 ).

Debido a que nada se conoce con respecto a la presencia del complejo lipoproteína-zinc en el espermatozoide eyaculado de humano, el objetivo del presente trabajo-

es investigar sobre la posible presencia del complejo en los espermatozoides eyaculados de humano previamente lavados con soluciones fisiológicas. Si existiera dicho complejo, se estudiará su composición química respecto a su contenido en proteína, fosfolípidos, zinc y sus propiedades electroforéticas.

fig.1 Representación esquemática de las partes del espermatozoide humano.



## II MATERIAL Y METODOS .

## NUESTRAS BIOLÓGICAS.

II.1 Material biológico: Para la realización del presente trabajo se emplearon muestras de semen recién eyaculado - por masturbación de sujetos que acudían al Hospital de Ginecología detectados sanos y fértiles clínicamente, cuyas edades fluctuaron entre 20 y 40 años con abstinencia sexual de por lo menos tres días previos a la obtención de la muestra.

Reactivos: Para todas las determinaciones los reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico.

II.2 Manejo de las muestras biológicas: Las muestras fueron recibidas en vasos de teflón limpios y se mantuvieron a temperatura ambiente por treinta minutos para permitir su licuefacción e inmediatamente se efectuaron las espermatobioscopías correspondientes ( 21 ) considerando los siguientes parámetros:

a) Grado de licuefacción: Las muestras que durante los treinta minutos no licuaron perfectamente, no fueron consideradas para el estudio.

b) Volúmen: El volúmen fue siempre mayor o igual a dos mililitros por eyaculado.

c) Movilidad progresiva: Se consideró siempre mayor o igual al 60 %.

d) pH : Las variaciones aceptadas de pH fueron entre 7.3 a 7.6 .

e) Grado de contaminación: Las muestras que presentaron más de 7 células diferentes a los espermatozoides en el campo de observación al microscopio óptico fotográfico ( 500 aumentos ) fueron descartadas de las normales.

f) Número de espermatozoides: El número de espermatozoides de las muestras seleccionadas como normales - fue mayor o igual a 50 millones por mililitro del eyaculado.

II.3 Preparación de los espermatozoides lavados: Durante el desarrollo del presente estudio, por cada experimento fue necesario reunir de 4 a 6 eyaculados de semen con los que se obtuvieron un número aproximado de  $1.2 \times 10^9$  espermatozoides. Las células fueron separadas del plasma seminal por centrifugación durante 20 minutos a 1000 rpm, en tubos cónicos de plástico graduados a 15 ml, en una centrífuga clínica Sorvall GLC-I.

Para lavar los espermatozoides separados del plasma seminal, se utilizó una solución amortiguadora Ringer-Krebs pH= 7.4 libre de Ca y Mg que contiene los siguientes componentes:

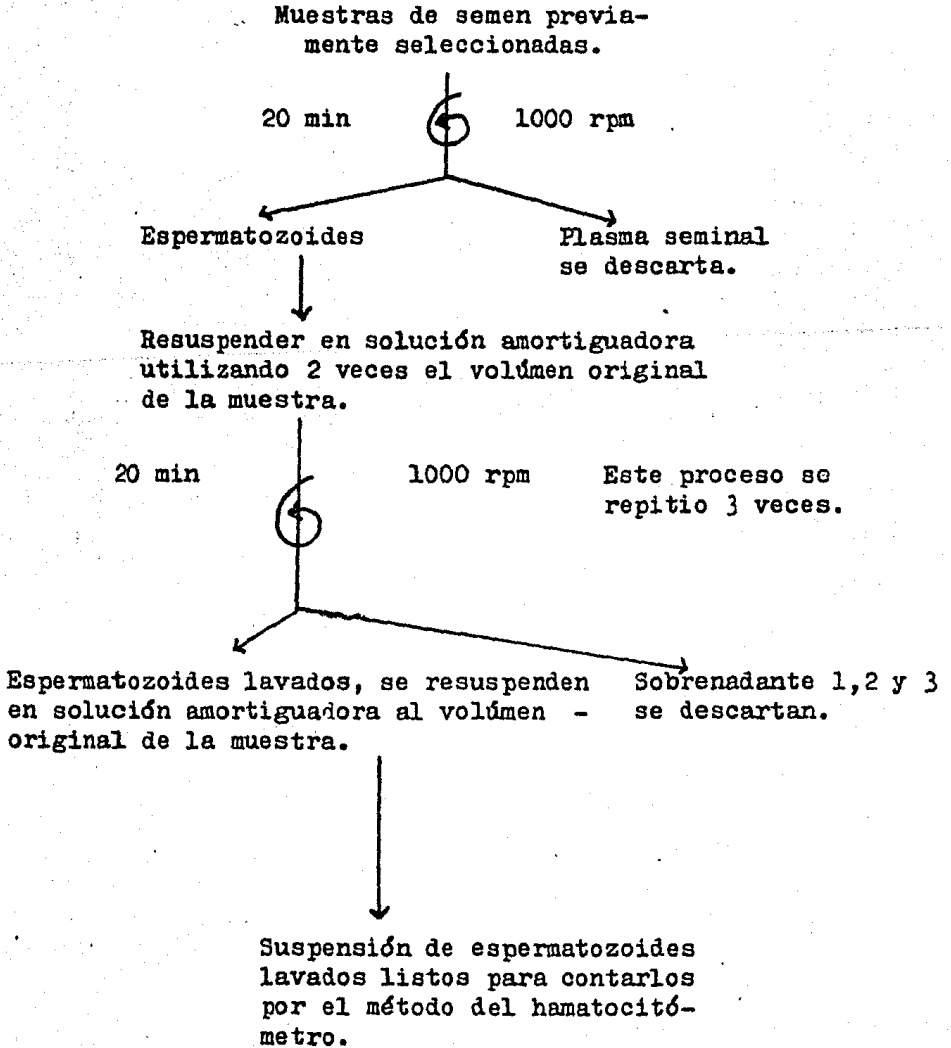
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.154 M
$\text{NaHCO}_3$	0.154 M
KCl	0.154 M
NaCl	0.154 M
Piruvato de sodio	0.2 mM
Lactato de sodio	21.6 mM
pH = 7.4	

Los espermatozoides separados del plasma seminal se resuspendieron en solución amortiguadora Ringer-Krebs ( SARK ) libre de Ca y Mg a pH = 7.4, en proporción del doble del volumen de la muestra, centrifugándose a 1000 rpm, durante 20 minutos. El sobrenadante retirado con pipeta Pasteur y sin resuspender las células; inclinado el tubo se adicionó amortiguador ( SARK ) libre de Ca y Mg -

a pH = 7.4 y se retiró con mucho cuidado utilizando una pipeta Pasteur, este lavado se hizo tres veces con el doble del volúmen de la muestra con el fin de eliminar al máximo restos de plasma seminal y en seguida el precipitado se resuspendió en solución ( SARK ) para contar los espermatozoides. Esquema 1.

El número de espermatozoides se determinó por el método del hematocitómetro ( 21 ). Este método utiliza la cámara de Neubauer y la micropipeta para glóbulos blancos con los que se aspira la suspensión celular hasta la marca de 0.5 y después se llena la micropipeta hasta el aforo de 1.1, con la solución fijadora que contiene formol al 1 % y citrato de sodio al 2.9 %, la pipeta se agita en el vórtex para resuspender adecuadamente los espermatozoides, posteriormente se eliminan las tres primeras gotas - antes de llenar la cámara de Neubauer, se aplica la muestra en la cámara y se deja reposar 5 minutos para permitir la sedimentación celular : posteriormente se coloca la cámara en la platina del microscopio óptico en contraste de fase y se localiza la cuadrícula para glóbulos blancos procediendo a contar los espermatozoides que se encuentran en los cuatro cuadros angulares y en el central de la cuadrícula, el número de células de cada cuadro se suman, el resultado se multiplica por 20 que es el factor de la dilución empleada, por 5 que es la quinta parte de la cuadrícula total para glóbulos blancos y finalmente - por 10 000 para obtener el volúmen de 1 ml de la suspensión celular. De esta manera se obtiene el número de espermatozoides en millones por mililitro de la suspensión de espermatozoides.

OBTENCION DE LA SUSPENSION DE ESPERMATOZOIDES  
LAVADOS CON SOLUCION AMORTIGUADORA.



Esquema 1



### III OBTENCION DEL COMPLEJO LIOPROTEINA-ZINC.

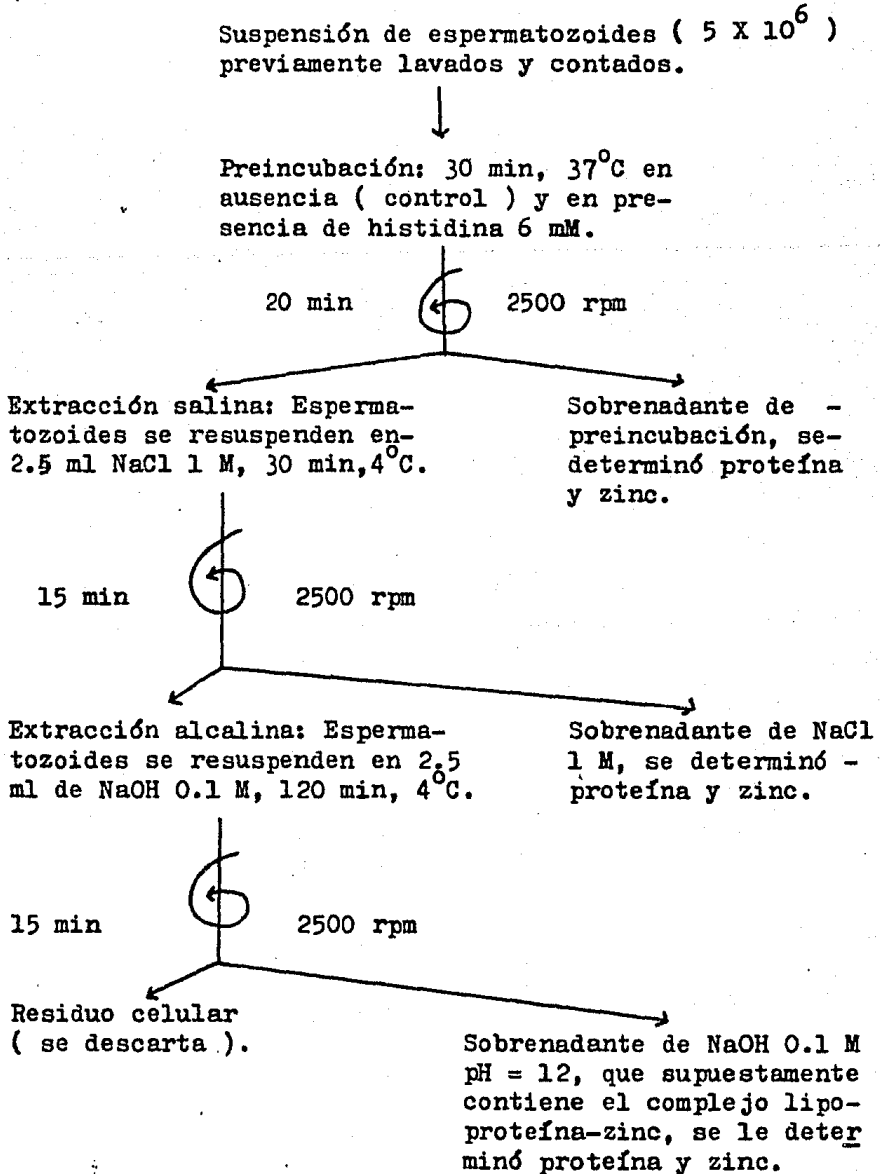
III.1 Preincubación: De la suspensión de espermatozoides previamente lavados como ya se describió se tomaron dos alícuotas correspondientes a  $5 \times 10^8$  células y por separado los volúmenes se ajustaron a 3 ml con solución ( SARK ) y se incubaron 30 minutos a  $37^{\circ}$  C en ausencia ( control ) y en presencia de histidina 6 mM ( 13 ), - terminado el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 2500 rpm durante 15 minutos, los sobrenadantes de ésta preincubación se guardaron en congelación para la determinación de proteína y zinc.

III.2 Extracción salina: Los paquetes celulares de la preincubación se resuspendieron en 2.5 ml de NaCl 1 M y se incubaron a  $4^{\circ}$  C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos . Los sobrenadantes salinos de este tratamiento se guardaron en congelación para determinar posteriormente las cantidades de proteína y zinc.

III.3 Extracción alcalina: Los paquetes celulares del tratamiento salino se resuspendieron en 2.5 ml de NaOH-0.1 M y se incubaron a  $4^{\circ}$  C durante dos horas, con agitación moderada en el vórtex cada treinta minutos a continuación se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes fueron guardados en congelación para determinar posteriormente los contenidos de proteína y zinc ( esquema 2 ).

OBTENCION DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC

DE LOS ESPERMATOSOIDES EYACULADOS DE HUMANO.



Esquema 2

III.4 Purificación del complejo lipoproteína-zinc: A los sobrenadantes de la extracción alcalina pH = 12, se adicionó suficiente cantidad de ácido acético al 5 % hasta obtener un precipitado a pH = 6. En este material supuestamente se encuentra el complejo lipoproteína-zinc ( 7, - 15, 22 ) e inmediatamente los precipitados se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos. Los precipitados fueron resolubilizados adicionando secuencialmente 0.2 ml de NaOH 0.01 M y 10 ml de agua desionizada y se volvió a reprecipitar con ácido acético al 5 % hasta obtener nuevamente el precipitado a pH = 6. Esta etapa de purificación del complejo lipoproteína-zinc se efectuó tres veces más. A todos los sobrenadantes de purificación se les determinó el contenido de proteína y zinc ( esquema 3 ) .

#### IV ANALISIS DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC.

IV.1 Determinación de zinc en el complejo, en los sobrenadantes de extracción y de purificación: El complejo ya purificado se solubilizó con 0.2 ml de NaOH 0.01 M - y se diluyó hasta un volúmen de 1.5 ml con agua desionizada; de aquí se tomó una alícuota de 0.1 ml por duplicado y se diluyó ( 1 : 20 v/v ) con agua desionizada y se determinó la cantidad de zinc en el complejo por Espectrofotometría de Absorción Atómica.

En los sobrenadantes de preincubación con histidina y sin histidina ( control ) se tomaron alícuotas - por duplicado de 0.2 ml y se diluyeron ( 1 : 7 ) con agua desionizada y se determinaron las concentraciones de zinc en ug/ml.

La determinación de zinc de los sobrenadantes de extracción con NaCl 1 M, se hizo directamente sin diluir.

En los sobrenadantes de extracción con NaOH 0.1 M se tomaron alícuotas de 0.2 ml, se diluyeron ( 1 : 7 v/v ) con agua desionizada y se determinaron las concentraciones de zinc en ug/ml.

En los sobrenadantes de purificación del complejo lipoproteína-zinc la determinación del elemento se hizo directamente. Las determinaciones cuantitativas de zinc se hicieron con un Espectrofotómetro de Absorción-Atómica Perkin Elmer modelo 403 utilizando como referencia el estándar correspondiente que contenía 0.5 p.p.m. preparado con zinc metálico con pureza del 99 %.

IV.2 Determinación de proteína en el complejo, en los sobrenadantes de extracción y de purificación.

Reactivos:

1.- Solución estándar de albúmina al 0.05 %.

2.- Solución amortiguadora de carbonatos.

-  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M en 30 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

-  $\text{NaHCO}_3$  0.2 M en 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

Estas dos soluciones se mezclaron y se ajustó el pH a 10.1 .

3.- Solución cupro-alcalina: esta solución se preparó mezclando 50 ml de la solución de carbonatos al 2 % en hidróxido de sodio al 0.1 N con 1 ml de la solución de sulfato de cobre penta hidratado al 0.5 % en tartrato doble de sodio y potasio al 1 %.

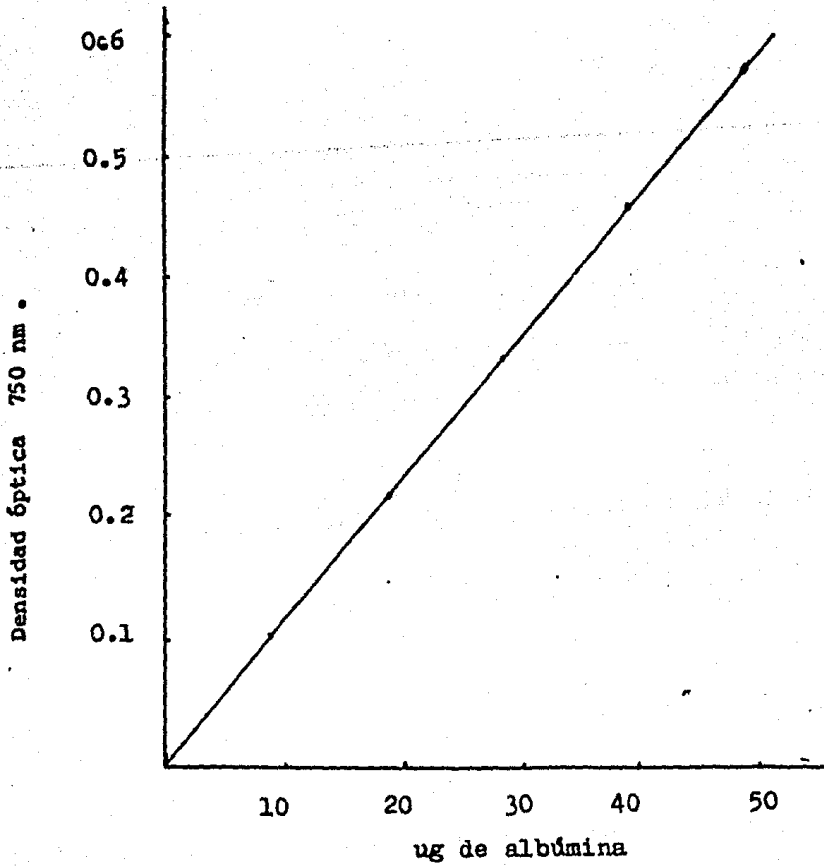
Reactivo de Polín: Este reactivo se diluye ( 1:1 v/v ) con agua destilada.

Fundamento y método: La determinación de proteína se efectuó de acuerdo al método de Lowry ( 24 ). La reacción que genera color se debe principalmente a la formación del complejo proteína-cobre, que se forma al tratar la proteína con la solución de cobre, que reduce el reactivo de Polín ( fosmolíbdico-fosotúngstico ) originando se un cromóforo que absorbe a 750 nm cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de proteína. Los valores de la densidad óptica dependen de manera muy importante del pH y del tiempo en que debe hacerse la lectura.

Simultáneamente se trabajó una curva patrón de proteína utilizando valores de concentración entre 10 a 50 -

ug por sistema. Las lecturas se efectuaron a una longi  
tud de 750 nm utilizando un espectrofotómetro Cary -  
118-A. Las densidades ópticas de los correspondientes  
problemas fueron interpoladas en la curva patrón ( -  
gráfica 1 ).

CURVA PATRON DE PROTEINA



gráfica 1

V EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES DEL COMPLEJO PURIFICADO.

Reactivos:

Cloroformo.

metanol.

cloruro de potasio.

columna empacada con fibra de vidrio.

Método: Al complejo lipoproteína-zinc ya purificado y solubilizado con 0.2 ml de NaOH 0.01 M y, llevado a 1.5 ml con agua desionizada, se tomó una alícuota de 1.2 ml y se evaporó casi a sequedad con nitrógeno y a 40° C en un tubo cónico de 15 ml. El complejo se resuspendió en cloroformo:metanol ( 2:1 v/v ). Primero se adicionó 2 ml de metanol y posteriormente 4 ml de cloroformo; el sistema de extracción se dejó a temperatura de 37° C durante dos horas con agitación cada 30 minutos. Posteriormente, para eliminar los residuos, los contenidos se filtraron a través de una columna empacada con fibra de vidrio y previamente lavada con cloroformo:metanol ( 2:1 v/v ). Inmediatamente se adicionó a los extractos lipídicos KCl 0.05 M en proporción de una quinta parte de los volúmenes de los extractos y se dejaron reposar a 4° C durante 14 horas con el objeto de eliminar el fósforo inorgánico que no corresponde a fosfolípidos el cual fue retirado en la fase superior acuosa del extracto ( 25 ). El extracto lipídico se ajustó a un volumen de 7 ml del cual se tomaron alícuotas por duplicado de 1 ml y 2 ml para la determinación cuantitativa de fósforo de -



fosfolípidos y colesterol respectivamente.

La determinación de fósforo de fosfolípidos totales: todo el material de vidrio fue tratado previamente con ácido nítrico 3 N durante 24 horas; posteriormente se enjuagaron: una vez con agua destilada y dos veces con agua desionizada y se secaron en la estufa a 100° C.

V.1 Determinación cuantitativa de fósforo de fosfolípidos-totales del complejo lipoproteína-zinc.

Reactivos:

cloroformo.

metanol.

ácido perclórico al 70 %.

molibdato de amonio 5 %.

ácido sulfúrico 10 N.

Reactivo de Fiske que contiene:

a) ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico 1.5 %.

b) sulfito de sodio anhidro 3.1 %

c) bisulfito de sodio anhidro 95.4 %.

Espectrofotómetro modelo Cary 118.A.

Aparato termoregulador ajustado a 60° y 180°.

Fundamento y método: La determinación de fósforo - de fosfolípidos totales se efectuó utilizando el método de Böttoher ( 26 ), éste se basa en la reacción de óxido-re - ducción entre el ácido fosfomolibdico formando el que indu ce la formación de un cromóforo con el reactivo de Fiske - cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de fosfato inorgánico presente.

En los tubos tratados, como ya se mencionó, se eva

poró 1 ml del extracto de cloroformo:metanol ( 2:1 v/v )- con nitrógeno; se adicionaron 200 ul de agua desionizada- y 200 ul de ácido perclórico al 70 % y se sometió a la hi drólisis ácida durante 45 minutos a 180°C. El fósforo - orgánico se convierte a ortofosfato al calentar el extrac- to que contiene los fosfolípidos en presencia de una mez- cla ácida oxidante. La parte orgánica se oxida y forma - bióxido de carbono que se evapora y el residuo se analiza como fosfato inorgánico.

Concluído el tiempo los tubos se enfriaron en hie lo y se realizaron las siguientes adiciones.

2.1 ml de agua desionizada.

150 ul de ácido sulfúrico 10 N.

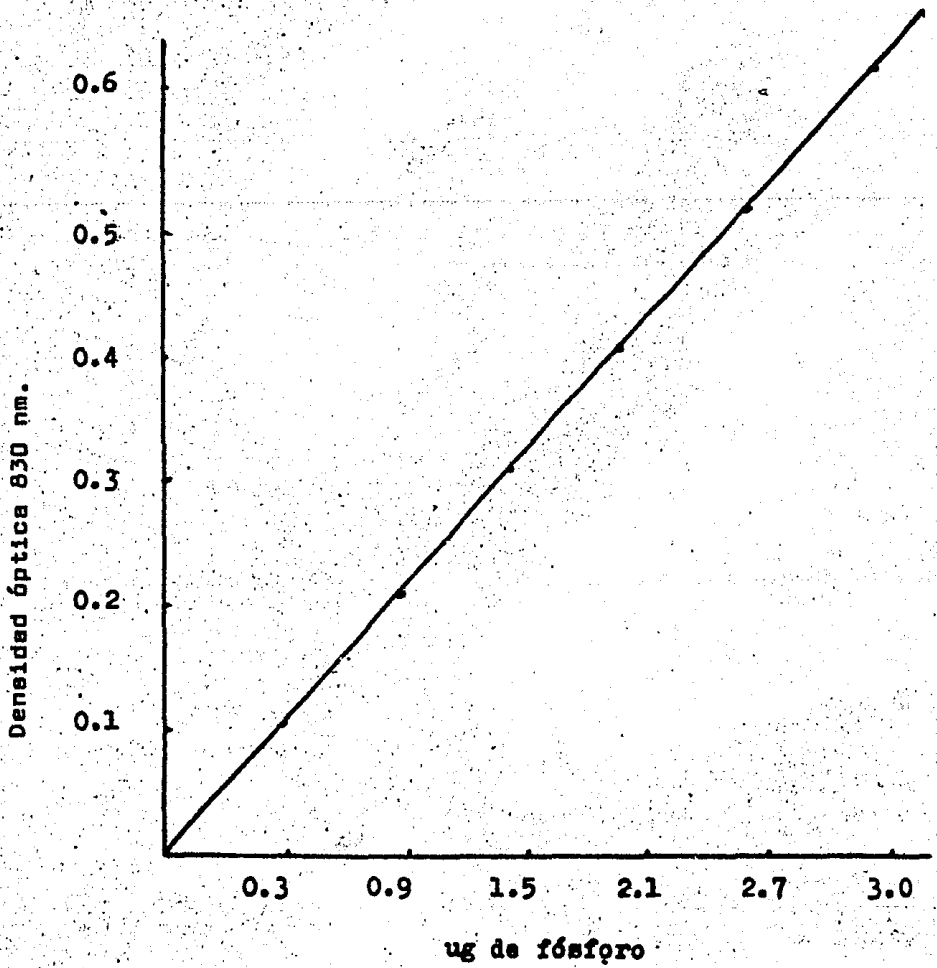
100 ul de molibdato de amonio 5 %.

100 ul de reactivo de Fiske.

Para desarrollar color, los tubos se calentaron - a 60°C durante 5 minutos e inmediatamente enfria- dos en hielo.

Simultáneamente se trabajó una curva estándar de- fósforo utilizando valores de concentración entre 0.3 a - 3.0 ug por sistema. Las lecturas se realizaron a una lon- gitud de onda de 830 nm, utilizando un espectrofotómetro- Cary 118-A, las densidades ópticas de los problemas, fue- ron interpoladas en la curva patrón que se muestra en la grafica 2.

CURVA PATRON DE FOSFORO



gráfica 2

V.2 Determinación cuantitativa de colesterol del complejo lipoproteína-zinc.

Reactivos:

cloroformo.

anhídrido acético.

ácido sulfúrico concentrado.

espectrofotómetro modelo Cary 118-A.

Baño de agua a 37°C.

Fundamento y método: La determinación cuantitativa de colesterol se realizó utilizando el método de Ferro ( 27 ), el cual elimina pasos adicionales como precipitación y saponificación, este método tiene su fundamento en la formación del ácido bis-3-5 colestadieno, el cual por medio de la reacción de Liebermann-Burchard forma el ácido bis-colestadienil monosulfónico el que en presencia de anhídrido acético y en condiciones ácidas, forma un cromóforo de color verde cuya intensidad del color es proporcional a la concentración de colesterol presente.

Para la determinación se utilizaron 2 ml del extracto de lípidos totales y se evaporó a sequedad con nitrógeno inmediatamente después se adicionaron secuencialmente los siguientes reactivos:

200 ul de cloroformo.

160 ul de anhídrido acético.

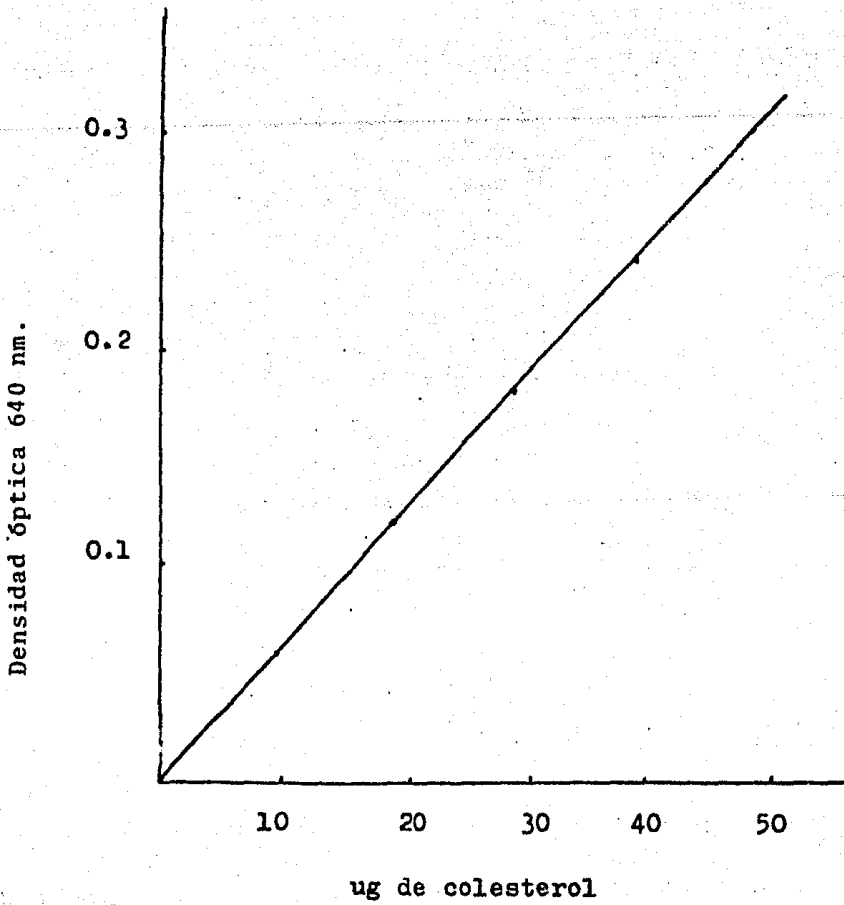
50 ul de ácido sulfúrico.

El desarrollo del color se realizó incubando los tubos a 37°C durante 5 minutos.

Simultáneamente se trabajó una curva patrón con -

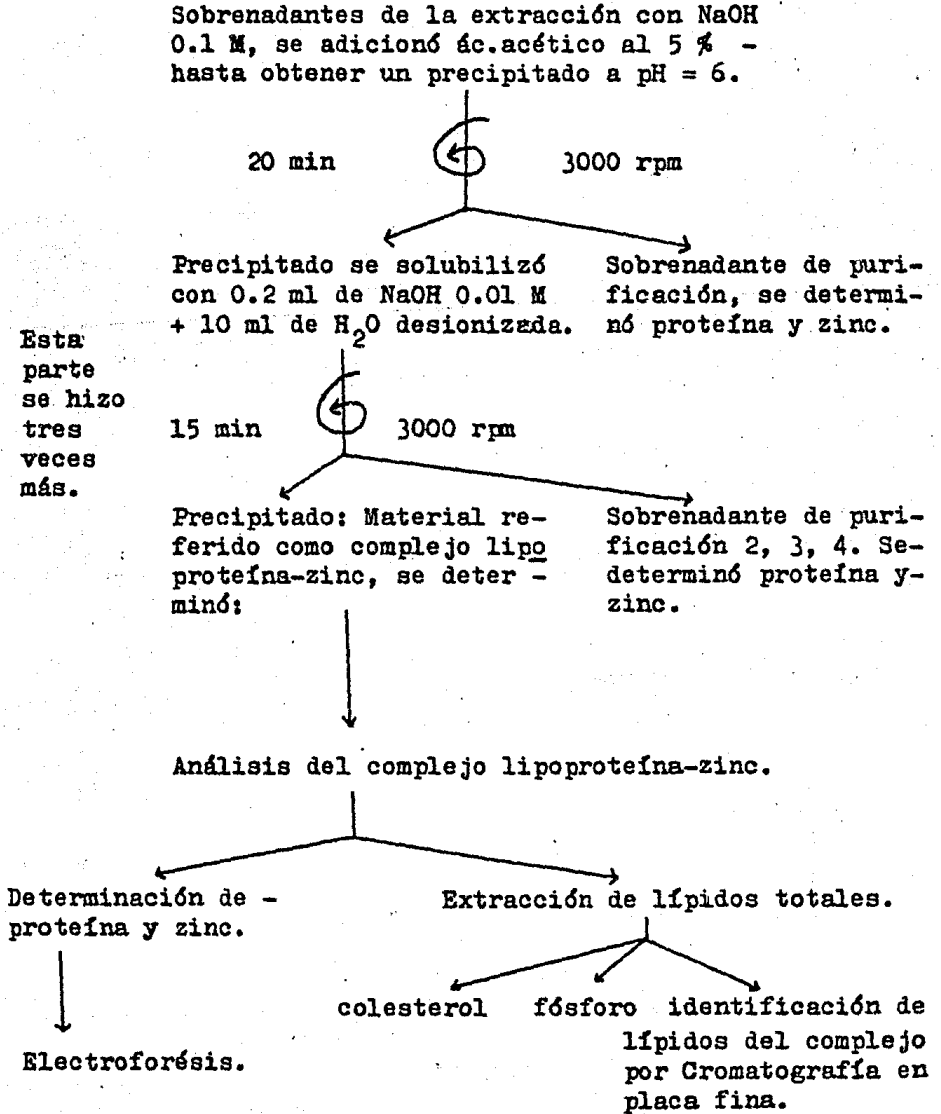
valores de concentración entre 10 a 50 ug por sistema. -  
Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 640-  
nm en un espectrofotómetro Cary 118-A. La curva patrón -  
de dicho método se muestra en la grafica 3.

CURVA PATRON DE COLESTEROL



gráfica 3

PURIFICACION DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC.



Esquema 3

## VI IDENTIFICACION DE LIPIDOS DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA ZINC POR CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA.

La cromatografía en placa fina es el procedimiento que permite la separación e identificación de sustancias que se encuentran formando mezclas en solución y que son movilizadas por el eluyente o fase móvil representado por un solvente o una mezcla de solventes. Para establecer un procedimiento cromatográfico en placa fina que permita una eficiente separación, es necesario seleccionar un solvente o una mezcla de solventes adecuados; para ello, es necesario tomar en cuenta las características del adsorbente y los componentes que se necesiten identificar.

Durante el desarrollo de un cromatograma, los diversos compuestos ascienden por la capa del adsorbente a velocidades diferentes con relación al eluyente y de esta forma se realiza la separación de los componentes de una mezcla. El compuesto que avanza es atraído a zonas polares de la superficie del adsorbente por fuerzas electrostáticas, quedando reversiblemente ligado a la misma. El disolvente interacciona con el adsorbente y el compuesto interacciona con él; esta triple interacción competitiva entre soluto, solvente y adsorbente establece las proporciones relativas en que el frente del eluyente y el soluto asciendan por la capa del adsorbente en la cromatoplaça.

Los compuestos son localizados en la cromatoplaça directamente en el caso de compuestos coloreados o con la ayuda de un indicador como: vapores de yodo, luz ultravioleta o bien carbonizados en presencia de ácido sulfúrico etc.



La identificación de los diferentes compuestos de la mezcla puede determinarse mediante la comparación de las velocidades relativas de movilización de los compuestos a investigar en relación a los correspondientes de compuestos conocidos utilizados como estándares. Esta velocidad de movilización conocida como Rf se obtiene mediante la relación entre la distancia recorrida por el compuesto o por el estándar y la recorrida por el eluyente. El valor de Rf de un compuesto determinado varía ampliamente con los cambios de solventes y adsorbentes.

**Material y reactivos:**

Se utilizaron 2 tanques de vidrio Camag.

Cromatoplacas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> No. 5715  
20 X 20 cm y con espesor de capa de 0.25 mm.

**Solventes:**

cloroformo Merck.

metanol Merck.

ácido acético Merck

eter de petróleo 90°-110° Eastman Organic Chemical.

eter etílico Baker.

hidróxido de amonio 35.05 % técnica química S.A.

Estos solventes fueron previamente purificados antes de ser utilizados.

**Lípidos:**

Todos los lípidos utilizados como estándares fueron obtenidos de fuentes naturales de Sigma (St.-Louis, Mo, U.S.A.).

Esfingomielina.

Posfatidilcolina.

Fosfatidil serina.  
Fisfatidil etanol amina.  
ácido oleico.  
Colesterol.  
Ester de colesterol.  
Trioleina.

Solución reveladora:  
ácido sulfurico 10 %.

Del extracto de lípidos totales obtenidos del complejo lipoproteína-zinc coma ya se describió, se tomó 1 ml que contenía el complejo equivalente a  $50 \times 10^6$  espermatozoides, se evaporó casi a sequedad con corriente de nitrógeno y a  $40^{\circ}\text{C}$ . Este concentrado y los estándares que contenían 2 mg/ml de cloroformo:metanol ( 2:1 v/v ) se aplicaron sobre la placa a 2.0 cm del borde inferior con una microjeringa de 10 ul. Normalmente se aplicaron 3 ul de cada estándar y todo el concentrado de cada uno de los extractos de los complejos lipoproteína-zinc; así como una mezcla de estándares preparada de acuerdo a la composición de los lípidos obtenidos de espermatozoides completos previamente visualizados.

#### Procedimiento:

El estudio de los lípidos por cromatografía en placa fina se hizo utilizando 2 tanques de vidrio Camag cubiertos internamente con papel filtro para saturar el ambiente. En uno de los tanques se utilizó como eluyente-cloroformo:metanol:hidróxido de amonio ( 65:23:4, v/v ) y se dejó saturar durante 4 horas antes de utilizarse. La placa se desarrolló en este sistema de elución hasta al

canzar 15 cm de altura por arriba del origen ( 30 min. ) - se retiró la placa y se secó a temperatura ambiente, después se introdujo en la camara 2, previamente saturada - con éter de petróleo:éter etílico:metanol:ácido acético - ( 90:7:2:1, v/v ), permitiendo el ascenso del eluyente - hasta el borde superior de la placa ( 110 minutos ).

Concluído el tiempo de corrida, se retiró la placa y se dejó secar a temperatura ambiente. Los lípidos - fueron revelados con una solución de ácido sulfúrico al - 10 % y carbonización a 180°C durante 10 minutos ( 28 ).

## VII ELECTROFORESIS DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC.

Uno de los métodos fisicoquímicos más efectivos de separación y caracterización de proteínas es la electroforesis, que consiste en el movimiento de partículas cargadas ( iones ) cuando se aplica un campo eléctrico. Los requerimientos que deben de prevalecer para que este procedimiento de separación sea efectivo, son: que los componentes de la mezcla deben de tener forma iónica o ser convertidos a ella, y que cada componente posea una carga neta distinta.

Dado el carácter anfotérico de los aminoácidos, la migración de éstos ante un campo eléctrico podría variar como una función de diferentes valores de pH, ya que pueden comportarse como aniones o cationes.

Los principios descritos para la movilidad de aminoácidos mediante éstos métodos pueden ser aplicados igualmente para péptidos y proteínas: casos en los que el grado de migración en un campo eléctrico a un valor dado de pH pueden ser determinado por su densidad de carga y peso molecular.

De los diferentes métodos de electroforesis desarrollados, la electroforesis de zona ha sido empleada y modificada. El sistema denominado "electroforesis de disco" en geles de poliacrilamida llamada así por sus iniciadores Ornstein ( 29 ) y Davis ( 30 ), debido a que las estrechas bandas de las proteínas separadas, el cual involucra dos discontinuidades en la matriz de separación: pH y tamaño de poro.

La capacidad de las moléculas para pasar a través

de un tamiz depende evidentemente de la talla y forma de los poros, el tamaño y forma de las moléculas, que estando tamizadas, así como interacciones tales como adsorción e intercambio de iones que pueden ocurrir entre las moléculas y la matriz del gel.

El método utilizado en el presente estudio para la separación de las proteínas es el descrito por Davis - ( 30 ), en donde usa geles discontinuos de poliacrilamida y evita el uso de detergentes.

**Reactivos:**

De acuerdo al método se prepararon las siguientes soluciones para la preparación de los geles de separación y espaciador respectivamente.

Solución A pH = 8.9

HCl 1.0 N	48 ml	Merck.
tris	36.6 g	Sigma.Chem.Co.
temed	0.23 ml	( East.Org.Chem. )
H <sub>2</sub> O se afora a	100 ml	

Solución B pH = 8.3

HCl 1.0 N	48 ml	Merck.
tris	5.98 g	Sigma.Chem.Co.
temed	0.46 ml	Merck.
H <sub>2</sub> O se afora a	100 ml	

Solución C

acrilamida	28 g	Merck.
bisacrilamida	0.73 g	Merck.
H <sub>2</sub> O se afora a	100 ml	

Solución D

acrilamida 10 g Merck.  
bisacrilamida 2.5 g Merck.  
H<sub>2</sub>O se afora a 100 ml

Solución E

Riboflavina 4 mg Merck.  
H<sub>2</sub>O se afora a 100 ml

Solución F

sacarosa 40 g Merck.  
H<sub>2</sub>O se afora a 100 ml

Solución de Persulfato de amonio.

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 0.14 g Merck.  
H<sub>2</sub>O se afora a 100 ml

Solución Fijadora.

ác. tricloroacético 12.5 g Merck.  
H<sub>2</sub>O se afora a 100 ml

Solución Colorante.

Azul brillante de Coomassie R-250 0.25g Bio.Rad.Lab.  
ácido acético 5 ml Merck.  
H<sub>2</sub>O se afora a 100 ml

Solución Indicadora.

azul de bromofenol 1 mg Merck.  
H<sub>2</sub>O se afora a 100 ml

Solución Decolorante.

ácido acético 5 ml Merck.  
H<sub>2</sub>O dest. se afora a 100 ml

Solución de Silicón.

silicón                      1 g Merck. \*  
H<sub>2</sub>O se afora a              100 ml

Solución amortiguadora de corrida.

tris-base                    0.6 g Sigma.Chem.Co.  
glicina                      2.8 g Merck.  
pH = 8.9  
H<sub>2</sub>O se afora a              1000 ml

Las soluciones A,B,C,D,E,F se filtraron con papel Whatman # 42 antes de usarse, la solución de persulfato de amonio, se preparó al momento de usarse. Preparación de los geles discontinuos depoliacrilamida para electroforesis.

Gel de poro pequeño:

Solución A                    1 volúmen.  
Solución C                    2 volúmenes.  
H<sub>2</sub>O                              1 volúmen.  
solución ( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 4 volúmenes.

Gel de poro grande:

Solución B                    1 volúmen.  
Solución D                    2 volúmenes.  
solución E                    1 volúmen.  
solución F                    4 volúmenes.

Preparación de los geles:

1.- Sellar con parafilm un extremo de los tubos - de 10 cm x 75 mm.

- 2.- Llenar el tubo con 2 ml de la solución de poro pequeño.
- 3.- Estratificar con agua bidestilada con ayuda de una micropipeta.
- 4.- Polimerizar 45 minutos.
- 5.- Eliminar el agua de cada uno de los tubos.
- 7.- Agregar solución 0.2 ml de poro grande y estratificar.
- 8.- Polimerizar 30 minutos.
- 9.- Escurrir el agua y lavar con solución de poro grande.
- 10.- Poner la muestra de 100 ug de proteína.
- 11.- Agregar 0.2 ml de solución de poro grande a los tubos.
- 12.- Estratificar el menisco con agua, con la ayuda de una micropipeta.
- 13.- Polimerizar 30 minutos.

#### Electroforésis:

- 14.- Colocar los geles en la cámara, con la muestra hacia arriba.
- 15.- Poner una o dos gotas de amortiguador sobre la solución de poro grande que está sobre la muestra, evitando la formación de burbujas que se opongan al paso de la corriente.
- 16.- Repartir la solución amortiguadora tris-glicina en los compartimientos de la cámara electroforética.
- 17.- Poner 2 ml de la solución de azul de bromofe-



nol al 0.001 % en el compartimiento superior.

- 18.- Colocar la tapa de la cámara y conectar en los -  
electrodos correspondientes, nivelar y conectar-  
la fuente de poder; se aplica un voltaje inicial  
de 2 mA por tubo de gel durante 2 minutos y des-  
pués se aumenta a 5 mA por tubo.
- 19.- Detener el paso de la corriente cuando el disco-  
de bromofenol ( frente de referencia ), llegue -  
a una distancia de 1 cm del extremo inferior del  
gel.

#### Fijación de proteínas:

- 20.- Colocar los geles en ácido tricloroacético al -  
12.5 %.

#### Tinción:

- 21.- Poner los geles en 20 ml de solución colorante -  
de ( azul brillante de Coomassie 0.25 % : metanol  
50 % : ácido acético 10 % ).

#### Decoloración:

- 22.- Pasar los geles por agua y colocarlos por sepa -  
rado en 20 ml de ácido acético al 5 % durante -  
48 horas.

#### Montaje de geles:

- 23.- Pasar los geles momentáneamente en formol al 2 %  
y montar en tubos de vidrios de 10 cm x 9 mm.
- 24.- Sellar los extremos del tubo con parafilm, cui -  
dando que no queden burbujas de aire y conservar  
los geles en la obscuridad.

Los geles se prepararon el día que se utilizaron.

## VIII RESULTADOS.

---

Contenido de zinc y proteína en los sobrenadantes de incubación de los espermatozoides. Siempre se observó la presencia de zinc y proteínas en los sobrenadantes de las diferentes incubaciones, particularmente el zinc en los sobrenadantes de preincubación en presencia de histidina-6 mM (  $11.9 \pm 1.9$  ug ), en comparación a los controles -- (  $4.87 \pm 1.71$  ug ). El mismo comportamiento, aunque en menor proporción, fue observado en los sobrenadantes de extracción con NaOH 0.1 M (  $6.36 \pm 0.14$  ug ) para el problema y (  $4.04 \pm 0.12$  ug ) para el control. Finalmente en los sobrenadantes de la extracción NaCl 1 M en el control (  $1.06 \pm 0.26$  ug ) y el problema (  $1.07 \pm 0.28$  ug ). Tabla 1. Cantidades importantes de proteína también fueron encontradas en los diferentes sobrenadantes de incubación; sin embargo, no fueron observadas diferencias significativas en los valores de los problemas respecto a los controles. Tabla 1.

Contenido de zinc y proteína en los sobrenadantes de purificación del complejo lipoproteína-zinc. En los dos primeros sobrenadantes de purificación de los complejos lipoproteína-zinc se encontraron cantidades mayores de zinc en los sobrenadantes correspondientes a los controles -- respecto a los encontrados en los sobrenadantes de los problemas. No se observaron diferencias en las cantidades de proteína presente en los sobrenadantes de purificación. Tabla 2.

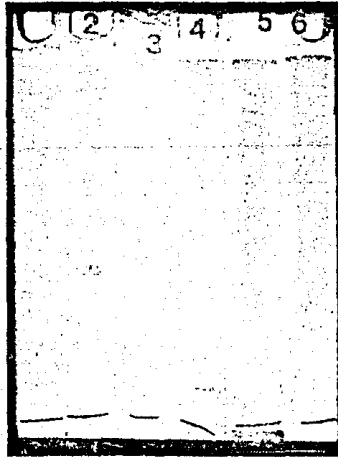
Electroforésis. Los experimentos de las electroforésis con los sobrenadantes de preincubación obtenidos después-

de los 30 minutos en ausencia ( control ) y en presencia- ( problema ) de histidina 6 mM mostraron, en el control - la presencia de material con fuerte tinción positiva para proteínas aunque sin resolución en bandas, en presencia - de histidina sí mostró además del material con tinción - observado en el control, la presencia de por lo menos - tres bandas bien definidas y con movilidad muy diferente. Los sobrenadantes de incubación en presencia de NaCl 1 M- mostraron bandas bien definidas con tinción muy discreta- para proteínas las que desaparecieron después de los tra- tamientos para desteñir los geles. En cambio los sobrena- dantes de extracción con NaOH 0.1 M revelaron la presen - cia de material con tinción para proteína altamente posi- tiva pero difusa y sin resolución en bandas tanto en los- problemas como en los controles, figura 2. Los complejos- lipoproteína-zinc ya purificados al ser estudiados por - electroforésis, mostraron una banda de proteína moderada- mente difusa pero intensamente teñida con diferente movi- lidad electroforética, figura 3. Los sobrenadantes de la- primera purificación con el ácido acético al 5 %, revela- ron tres bandas débilmente teñidas de las cuales sólo una de ellas permaneció visible en el gel al final de los tra- tamientos para quitar el exceso del colorante de los ge - les. Los demás sobrenadantes de los siguientes pasos de - purificación ya no mostraron ésta banda de alta movilidad electroforética, figura 3.

Identificación de los lípidos del complejo lipoproteína - zinc purificado. La identificación de los lípidos se hizo mediante cromatografía en placa fina como ya se describió.

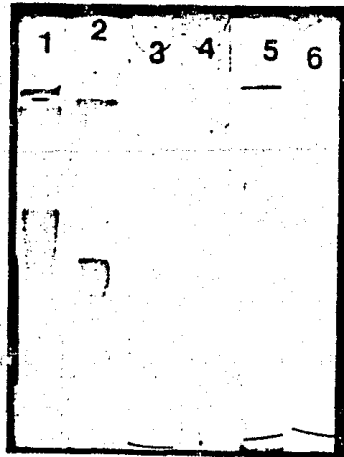
Esta experimentación nos permitió observar claramente la presencia de 6 lípidos diferentes, tanto en los casos de las lipoproteínas de los controles, como en las de los problemas. De estos lípidos 2 de ellos son fosfolípidos y aparentemente de acuerdo a la movilidad de los estándares, corresponden a esfingomielina y a fosfatidil serina. Los otros cuatro lípidos presentes en las lipoproteínas fueron identificados de acuerdo a los estándares correspondientes como : ácido graso libre, colesterol total, ester de colesterol y triglicérido. La mezcla de lípidos definió claramente la separación de los diferentes lípidos utilizados como estándares. Respecto a los lípidos presentes en los extractos obtenidos de espermatozoides completos ( lavados ), se observaron diferencias muy claras en relación a los lípidos de las lipoproteínas, estas no contienen fosfatidil etanolamina y fosfatidil colina, figura 4.

Figura 2. Electroforésis discontinua en geles de poliacrilamida al 3 y 6 % de las proteínas presentes en los sobrenadantes de las diferentes incubaciones.



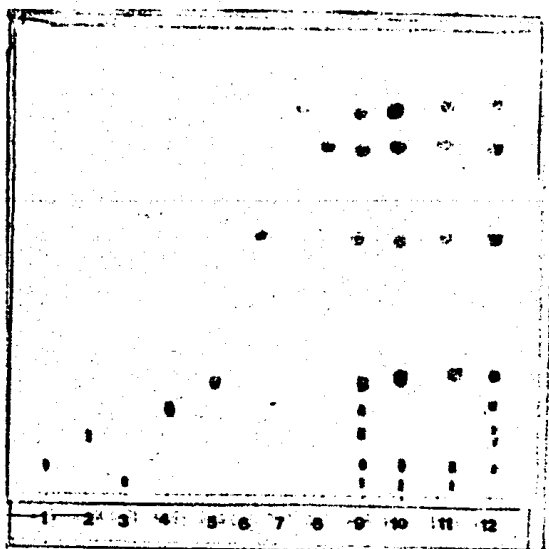
- 1.- Preincubación 30 min en ausencia de histidina (control).
- 2.- Preincubación 30 min en presencia de histidina (problema).
- 3.- Incubación 30 min con NaCl 1 M ( control ).
- 4.- Incubación 30 min con NaCl 1 M ( problema ).
- 5.- Incubación 120 min NaOH 0.1 M ( control ).
- 6.- Incubación 120 min NaOH 0.1 M ( problema ).

Figura 3. Electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida al 3 y 6 % del complejo lipoproteína-zinc y de las proteínas presentes en los sobrenadantes de purificación.



- 1.- Complejo lipoproteína-zinc de espermatozoides preincubados sin histidina ( control ).
- 2.- Complejo lipoproteína-zinc de espermatozoides preincubados con histidina 6 m M ( problema ).
- 3.- Primer sobrenadante de purificación ( control ).
- 4.- Primer sobrenadante de purificación ( problema ).
- 5.- Segundo sobrenadante de purificación ( control ).
- 6.- Segundo sobrenadante de purificación ( problema ).

Figura 4. Cromatografía en placa fina de los lípidos obtenidos de los complejos lipoproteína-zinc y de - espermatozoides completos.



- 1.- Esfingomiélinea.
- 2.- Fosfatidil colina.
- 3.- Fosfatidil serina.
- 4.- Fosfatidil etanol amina.
- 5.- Acido oléico.
- 6.- Colesterol.
- 7.- Colesterol esterificado.
- 8.- Trioleína.
- 9.- Mezcla.
- 10.- Lipoproteína-zinc ( control ).
- 11.- Lipoproteína-zinc ( problema ).
- 12.- Espermatozoides completos.



T A B L A 1

MODIFICACIONES EN LA ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE DE HUMANO  
INDUCIDAS POR DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Sobrenadantes de los diferentes tratamientos.	Zinc (ug)		Proteína ( mg )	
	Control ( -Histidina)	Problema ( Histidina )	Control ( -Histidina)	Problema ( Histidina )
Preincubación (30 min. 37°C)	4.87 ± 1.71 ( 6 )	11.9 ± 1.90 ( 7 )	0.96 ± 0.12 ( 6 )	1.11 ± 0.25 ( 7 )
1a. Extracción NaCl 1 M (30 min 4°)	1.06 ± 0.26 ( 6 )	1.07 ± 0.28 ( 7 )	0.50 ± 0.10 ( 6 )	0.60 ± 0.09 ( 7 )
2da. Extracción NaOH 0.1 M (120 min. 4°C)	4.04 ± 0.12 ( 6 )	6.36 ± 0.14 ( 7 )	2.24 ± 0.12 ( 6 )	2.30 ± 0.11 ( 7 )

Las cantidades expresan el valor promedio ± las desviaciones estándar de los microgramos y miligramos de zinc y proteína liberados al medio de incubación correspondientes. Los valores están calculados para 10<sup>9</sup> espermatozoides. El número de casos está indicado en paréntesis.

T A B L A 2

CONCENTRACION DE ZINC Y PROTEINA EN LOS SOBRENADANTES DE PURIFICACION DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC, OBTENIDO DE ESPERAMATOZOIDES PREINCIBADOS SIN HISTIDINA (CONTROL) Y CON HISTIDINA 6 mM.

Sobrenadantes de purificación	ZINC		PROTEINA	
	sin histidina (control)	con histidina (6 mM)	sin histidina (control)	con histidina (6 mM)
( 1 )	0.92 ± 0.34	0.55 ± 0.24	0.69 ± 0.12	0.61 ± 0.08
( 2 )	0.57 ± 0.19	0.38 ± 0.17	0.20 ± 0.06	0.16 ± 0.01
( 3 )	0.12 ± 0.04	0.18 ± 0.08	0.08 ± 0.02	0.10 ± 0.01
( 4 )	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.07	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01

Las cantidades expresan los valores promedio ± las desviaciones estándar de los microgramos de ZINC, o miligramos de PROTEINA liberados en los sobrenadantes de purificación.

Los valores fueron ajustados para el material lipoproteico obtenido de  $1 \times 10^9$  espermatozoides.

En todo los casos el número de experimentos fue igual a 7

T A B L A 3

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DEL COMPLEJO LIPOPROTEINA-ZINC RESPECTO A LOS MISMOS  
PARAMETROS ESTUDIADOS EN ESPERMATOZOIDES COMPLETOS

	ZINC ( ug )	PROTEINA ( mg )	COLESTEROL ( ug )	FOSFORO ( ug at.)
+ Control ( -histidina )	5.00 ± 0.3 ( 6 )	0.97 ± 0.01 ( 7 )	120 ± 6.3 ( 7 )	6.07 ± 0.50 ( 7 )
+ Tratado (+histidina )	3.06 ± 0.5 ( 7 )	0.84 ± 0.02 ( 7 )	71 ± 8.3 ( 6 )	3.60 ± 0.50 ( 7 )
++Espermatozoides completos (lavados)	25.60 ± 2.5 ( 12 )	5.20 ± 0.4 ( 6 )	285 ± 22 ( 8 )	54.00 ± 12 ( 8 )

Los números expresan valores promedio ± las desviaciones estándar.

El Número de experimentos se indica en los paréntesis.

+ Los valores representan parte de la composición de la Lipoprotefna que se ubtuvo y ajustó a  $1 \times 10^9$  espermatozoides.

++ Las cantidades de los párametros estudiados están calculados para  $1 \times 10^9$  espermatozoides.

IX DISCUSSION.

La composición y estructura de las membranas biológicas varían ampliamente según la proporción relativa y categoría de sus lípidos, proteínas y carbohidratos. Esto es importante porque determina las características de funcionalidad específica de antigenicidad, actividad enzimática, transporte, reacciones receptoras y funcionalidad metabólica.

La composición de las membranas de los espermatozoides de los diferentes mamíferos se caracteriza por su alto contenido en lípidos, de los cuales en la especie humana los fosfolípidos representan el 66 % destacando entre ellos la esfingomielina 21.4 %, fosfatidil colina 28 % y la fosfatidil etanol amina 21 % y en menor proporción fosfatidil serina 5 % y plasmalógeno de fosfatidil etanol amina 9.5 % ( 31 ). Otras investigaciones han demostrado que la cantidad de colesterol varía dependiendo de la especie, por ejemplo: los espermatozoides de carneiro y de toro contienen menor cantidad de colesterol que la encontrada en los espermatozoides de conejo y de humano. Estas diferencias determinan valores diferentes en las relaciones de colesterol/fosfolípidos, siendo aproximadamente igual a uno en el espermatozoide humano ( 32 ).

Recientes conocimientos han establecido que la capacitación del espermatozoide es un proceso en el que participan diferentes componentes que involucran cambios en los glucoconjugados en la superficie de los espermatozoides, en los antígenos, en los lípidos, en las partículas membranales, en la fluidez membranal, en la permeabilidad a iones y moléculas pequeñas y en el metabolismo intermedio ( 33, 34, 35 ).

El zinc parece actuar de manera muy trascendente en los mecanismos moleculares que suceden durante la capacitación, ya que en los experimentos de fertilización " in vitro " la adición de zinc al medio Krebs-Ringer Bicarbonato inhibió la fertilización ( 36 ); en cambio, cuando las pruebas de fertilización se hicieron con espermatozoides previamente capacitados, la fertilización ocurrió normalmente aun con la adición de zinc al medio ( 37 ).

La presencia de zinc en cantidades mucho mayores-observadas en los sobrenadantes de preincubación en presencia de la histidina indica claramente que el aminoácido indujo una importante disminución del elemento en los espermatozoides completos. Tabla 1. Esta pérdida del elemento podría ser considerada como un requerimiento necesario para el inicio de los cambios en composición, estructura y permeabilidad membranal relacionados con la capacitación. Probablemente parte de la cantidad de zinc liberada a los medios de preincubación provenga del complejo lipoproteína-zinc obtenido de los espermatozoides preincubados en presencia de histidina. Tabla 2. Este mismo comportamiento fue claramente observado en el contenido de zinc en la lipoproteína obtenida de los espermatozoides preincubados con histidina. Tabla 3.

Se ha descrito que uno de los primeros eventos que ocurren durante la capacitación es la liberación de un glucoconjugado de la superficie del espermatozoide, el cual puede inhibir la fijación del espermatozoide a la zona pelucida cuando el elemento se adiciona a los ensayos de fertilización " in vitro ". Este factor descapacitante puede ser liberado por la acción de fuerza iónica-

( 38 ) o por la digestión con la B-N-acetil hexosaminidasa ( 39 ). Estos y otros resultados sugieren que el glucoconjugado adsorbido en la superficie del espermatozoide y que es liberado como parte de la capacitación que pudiera estar relacionado con la proteína presente solamente en los sobrenadantes de preincubación en presencia de la histidina 6 mM, observaciones no publicadas. Figura 2. - Respecto a la diferencia en mayor movilidad electroforética del complejo lipoproteína-zinc de los problemas, pudiera deberse a la disminución en la cantidad de lípidos la cual puede repercutir en cambios de viscosidad y de tamaño molecular. Figura 3.

Por otra parte, la menor intensidad de las manchas observadas en la cromatografía en placa fina, correspondiente al colesterol esterificado y triglicéridos indican claramente una menor cantidad de estos compuestos en los complejos lipoproteína-zinc de los problemas. Estas diferencias inducidas por la presencia de la histidina durante las preincubaciones, confirman las cantidades menores de zinc, colesterol y fosfolípidos determinadas cuantitativamente en los complejos lipoproteína-zinc. Tabla 3.

Probablemente estos cambios bioquímicos observados "in vitro" corresponden a lo que sucede "in vivo", facilitándose de esta manera el siguiente evento conocido como reacción acrosomal, ya que se ha demostrado que el colesterol, ácidos grasos y plasma seminal ( 40 ) producen efectos inhibitorios de la reacción acrosomal. Por el contrario, estos efectos son facilitados por la adición de liposomas de la lecitina y/o de albúmina sérica bovina.

Estos resultados corroboran el punto de vista en-

el sentido de que cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides influyen significativamente en la capacidad fertilizante de los espermatozoides de mamíferos.

La característica que el zinc tiene como estabilizante de macromoléculas y de membranas ( 41,42 ) parecer relevante en cuanto a la estabilización del complejo lipoproteína-zinc pues, parece claro la disminución del elemento del complejo lipoproteína-zinc inducida por la histidina y de las correspondientes consecuencias bioquímicas ( disminución de colesterol y fosfolípidos ) observadas en el presente trabajo, pudieran ser en parte la causa de los incrementos previamente descritos respecto a la motilidad y consumo de oxígeno ( 13 ) y de fosfolípidos endógenos de los espermatozoides ( 14 ). Conjuntamente a estos cambios es posible asociar otros procesos a nivel de membrana como, por ejemplo, en los mecanismos iniciales de tipo fisiogénico entre las membranas plasmática y acrosomal externa mediante la participación de enzimas-membranales del tipo de fosfolipasas ( 43,44 ) constituyéndose así, las modificaciones del complejo lipoproteína-zinc como un requerimiento necesario de la capacitación para inducir eficientemente la reacción acrosomal la que es necesaria para que se lleve a cabo la penetración del espermatozoide al óvulo, es decir : la fertilización.

Finalmente resulta interesante el hallazgo relacionado con la presencia de fosfatidil colina y de fosfatidil etanol amina solamente en los lípidos obtenidos de espermatozoides completos los cuales no se encontraron en los lípidos obtenidos de las lipoproteínas; Este hecho pa



rece indicar que lo referido como complejo lipoproteína-zinc no se trata de fragmentos de membrana.

X BIBLIOGRAFIA.

---

- 1.- Ham.W.A. Tratado de Histología.  
Séptima edición. Edit.Interamericana.  
México. 1975 ( 838-866 ).
- 2.- B.Wetterdal. Experimental studies on radioactive zinc  
in the male reproductive organs of the rat. Acta. Ra-  
diol. Suppl. 3: 156 ( 1953 ).
- 3.- J.M. Bedford. Maturation, transport, and fate of sper-  
matozoa in the epididymis. In: Handbook of Physiology,  
section 7. Endocrinology, vol V: Male reproductive -  
system ( eds. D.W. Hamilton and R.O.Greep ) pp. 308 -  
317. Washington D.C. 1975 .
- 4.- G.H. Barney, M.P.Orgebin - Crist and M.P. Macapinlac.  
Genesis of esophageal parakeratosis and histologic -  
changes in the testis of the zinc deficient rat and -  
their reversal by zinc depletion . J.Nutr. 95 : 526 -  
534 ( 1975 ).
- 5.- S.A.Gunn and T.C. Gould. Cadmium and other mineral -  
elements In: The testis Vol: III ( eds A.D. Jhonson,-  
W.R. Gomes and N.L. Vanmark ) pp. 337-481. Academic -  
Press New York ( 1970 ).
- 6.- N.Levine and H.Kelly. Measurement of pH in the rat -  
epididymis in vivo. J.Reprod.Fertil. 52: 333-335 -  
( 1978 ).
- 7.- U.Lavon, R.Volcani and D.Danon. The protein of bovine  
spermatozoa from the caput and cauda epididymis. J. -  
Reprod.Fertil. 24: 219-232 ( 1971 ).
- 8.- A. Rosado, L.Huacuja, N.M.Delgado, H.Merchant and -  
R.Ma. Pancardo. Elemental composition of subcellular-  
structures of human spermatozoa. A study by energy -

- dispersive analysis of X-ray- Lif.Sci. 20: 647- 656 ( 1977 ).
- 9.- C.A. Mawson and M.I. Fisher. Zinc and carbonic anhydrase in human semen. Biochem. J. 55: 696-700 ( - - 1953 ).
- 10.- M.Morizawa and H. Mohri. Heavy metals and spermatozoa motility. Exp.Cell.Res. 70: 311-316 ( 1972 ).
- 11.- T.Mitzuno. Relation between zinc and sperm motility in some marine forms. J.Fac.Sci.Tokyo.Univ. -- vol. IV-7: 477-487 ( 1956 ).
- 12.- A.Velazquez, A.Reyes, J.Chargoy and A.Rosado. Amino acid and protein concentration of human follicular fluid. Fertil. Steril 28: 96-100 ( 1977 ).
- 13.- L.Huacuja, A.Sosa, N.M.Delgado and A.Rosado. A Kinetic study of the participation of zinc in human-spermatozoa metabolism. Life Science. 13: 1383 - - 1394 ( 1973 ).
- 14.- N.M.Delgado, L.Huacuja, R.Ma.Pancardo and A.Rosado Selective utilization of endogenous phospholipids - by zinc-depleted human spermatozoa. Excerpta Medica International Congress Series No. 370. Nov.11-14 - 325-328 ( 1974 ).
- 15.- S. Kinoshita. A zinc containing lipoprotein obtained from the star fish spermatozoa Asterina pectinifera. J. Fac. Sci. Tokyo. Univ. IV-7: 497 - 503- ( 1956 ).
- 16.- A.S.Prasad and O.rberleas. Binding of amino acid - and serum proteins. J.Lab.Clin.Med. 76:416-425 - ( 1975 ).
- 17.- Bracket. B.G, Hall. J.L, OH. Y.K. In vitro fertili

- zation ability of testicular, epididymal and ejaculated rabbit sperm. *Fertil.Steril.* 29: 571-582 ( 1978 ).
- 18.- C.Barros and A.Caravagno. Capacitation of hamster spermatozoa with blood sera. *J. Reprod.Fertil.* 22 : 381-396 ( 1970 ).
- 19.- C.Barros and C.R. Austin. In vitro fertilization and sperm acrosome reaction on the hamster. *J. Exp.-Zool.* 166: 317-323 ( 1967 ).
- 20.- M.G. O'Rand. Annals of the New York Academy of sciences In; Modification on the sperm membrane during capacitation. vol. 383: 393-400 ( eds. C. Wagne Bordin and Richards J.Sherine ) 1982.
- 21.- M.A. Belsey, R. Eliasson, A. Gallegos, K. Moghiss, C. Paulsen and M.R. Prasad. Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Press. conser. Singapore ( 1980 ).
- 22.- R.D. Duncan and Ll.E. Thomas. Chemical studies on mammalian on sperm. *Biochim.Biophys. Acta.* 11: 79-83 ( 1953 ).
- 23.- Folch, J.Lees. M. Sloans and G.H.A. Stanley. A simple method for isolation and purification of total lipids from a animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226: 497-504 ( 1956 ).
- 24.- OH. Lowry, N.O. Rosebrough, A.L. Farr and Randal.R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. - *J.Biol.Chem.* 193: 265-275 ( 1951 ).
- 25.- B.G.Bligh and W.S. Dyer. A rapid method of total lipid extration and purification. *Canad.J.Biochem. - Physiol.* 37: 911-916 ( 1959 ).

- 26.- C.J.F. Böttcher, Van-Gent, C. Pries. A rapid and sensitive sub-microphosphorous determination. *Anal.Chim. Acta.* 24: 203-204 ( 1961 ).
- 27.- P.V. Ferro and A.B. Ham. Rapid determination of total and free cholesterol in serum. *Am. J. Clin. Pathol.* - 33: 545-553 ( 1960 ).
- 28.- E.Hedegaard and B.Jensen. Nano-scale densitometric - quantitation of phospholipids. *J. of. Chromatography.* 225: 450-454 ( 1981 ).
- 29.- Ornstein. *Annals of the New York Academy of sciences-Disc. Electrophoresis. Part. I. Method and application to human serum proteins.* 121: 321-349 ( 1964 ).
- 30.- B.J. Davis. *Annals of the New York Academy of science. Disc electrophoresis part.II. Method and application - to human serum proteins.* 121: 404-427 ( 1964 ).
- 31.- I.G. White, Darin-Bennet A., Poulos A. Lipids of human semen. In human semen and fertility regulation in man. Ed.E.SE. Hafez, C.V. Mosby Co, Saint Louis. - pp.141-152 ( 1976 ).
- 32.- A. Poulos and I.G. White. The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *J.Reprod.Fert.* 35: 265-272 ( 1973 ).
- 33.- G. Oliphant and B.G. Bracket. Immunological assesment of surface changes of rabbit sperm endergoing capacitation. *Biol.Reprod.* 9: 404-414 ( 1973 ).
- 34.- B.K. Davis. Timing of fertilization in mammals sperm cholesterol/phospholipids ratio as a determination of the capacitation interval. *Proc.Natt.Acad.Sci.* 78: - 7560-7564 ( 1981 ).

- 35.- E.A. Kinsey and U.K. Kohler. Cell surface changes - associated with in vitro capacitation of hamster - sperm. J.Ultrastr.Res. 64 : 1-13 ( 1978 ).
- 36.- S.Anouma, M. Okabe and M.Kawagudchi. The effect of - ions on fertilization of mouse ova "in vitro" . J. - Reprod.Fert. 53 : 179-183 ( 1978 ).
- 37.- S.Anouma, M.Okabe, M.Kawagudchi and Y.Kishi. Zinc - effect on mouse spermatozoa and in vitro fertiliza - tion. J.Reprod. 63 : 463-466 ( 1981 ).
- 38.- G. Oliphant and B.G. Bracket. Capacitation of mouse - spermatozoa in media with elevated strenght and re - versible decapacitation with epididymal extracts. - Fert.Steril. 24 : 948 - 955 ( 1973 ).
- 39.- Gwatkm.R.B and O.F. Anderson. Effects of glicosidase - inhibition on the capacitation of hamster spermato - zoa by cumulus cells In vitro. J. Reprod.Fert. 35 :- 565-567 ( 1973 ).
- 40.- B.K.Davis. Interaction of lipids with the plasma - membrane of sperm cells I. The antifertilization - action of cholesterol. Arch.of.Androl. 5 : 255-261 - ( 1980 ).
- 41.- Moshe T. On the role of  $Zn^{++}$  and N in ribosome struc - ture. Biochem.Biophys.Acta. 169 : 564-565 ( 1968 ).
42. M. Chvapil. New aspects in the biological role of - zinc: a atabilizer of macromoleculs in biological - membranes. Life.Sci. 13 : 1041-1049 ( 1973 ).
- 43.- Thakkar. E.J. and Franson R.C. Modulation of phospho - lipase  $A_2$  activity associated with human sperm mem - branes by divalent cations and calcium antagonists.

Biology of Reprod. 30: 679-686 ( 1984 ).

- 44.- S. Meizel and K.O. Turner. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction by cis-unsaturated fatty acids . FEBS ( Fed. Eur. - Biochem. Soc. ) Lett. 161: 315-318 ( 1983 ).