



300627
15
2ej

UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

INCORPORADA A LA UNAM

ACTIVIDAD DE ARGINASA EN SEMEN HUMANO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

PRESENTA

TESIS CON
FALDA DE ORIGEN

MARTHA PATRICIA HERNANDEZ BRAVO

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JOSE D. MENDEZ F.

México, D. F.

1992.



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.

CAPITULACION

| | Pág. |
|---|------|
| Resumen..... | 2 |
| Objetivos..... | 3 |
| I. INTRODUCCION..... | 4 |
| II. GENERALIDADES..... | 8 |
| 2.1. Arginasa y poliaminas..... | 8 |
| 2.1.1. Características y Propiedades de la Arginasa..... | 8 |
| 2.1.2. Arginasa en el Ciclo de la Urea y en la Bioquímica de Poliaminas..... | 10 |
| 2.1.3. Poliaminas..... | 13 |
| 2.1.4. Catabolismo de Poliaminas..... | 15 |
| 2.2. Arginasa y Poliaminas en la Fisiología y Patología del Aparato Reproductor Masculino..... | 17 |
| 2.2.1. Espermatogénesis..... | 19 |
| 2.2.2. Semen Humano Normal..... | 21 |
| A. Espermatozoide..... | 22 |
| B. Líquido Seminal..... | 25 |
| 2.2.3. Análisis de semen..... | 26 |
| A. Características patológicas..... | 29 |
| 2.2.4. Movilidad Espermática..... | 29 |
| 2.2.5. Cuenta Espermática..... | 36 |
| 2.2.6. Capacitación Espermática..... | 37 |
| III. MATERIAL Y METODOS..... | 39 |
| IV. RESULTADOS..... | 51 |
| V. DISCUSION Y CONCLUSIONES..... | 59 |
| VI. PERSPECTIVAS..... | 63 |
| VII. APENDICES..... | 64 |
| VII. BIBLIOGRAFIA..... | 70 |

RESUMEN

En este trabajo se estudió la actividad de arginasa en el semen humano de pacientes oligoastenospermicos, azoospermicos y teratospermicos; que fueron comparados con un grupo control , a fin de investigar la posible correlación entre la patología de los individuos y la actividad enzimática de la arginasa.

La concentración de proteínas se determinó en el suero de cada individuo y en el plasma seminal una vez efectuada la espermatobioscopia. La actividad de la arginasa se midió en ambos fluidos y en células espermáticas.

Los resultados obtenidos indican que no existe ninguna diferencia entre las actividades del plasma seminal de los cuatro grupos estudiados, sin embargo se aprecia una diferencia notoria entre las actividades de los sueros sanguíneos de los cuatro grupos. Lo que nos lleva a concluir que la patología de cada grupo estudiado no se debe a la alteración enzimática de la actividad de arginasa.

OBJETIVOS

**1.- Determinar la actividad de la enzima arginasa
en suero y en semen humano.**

**2.- Establecer si existe alguna correlación entre
la actividad de esta enzima y los problemas de
fertilidad.**

INTRODUCCION

La arginasa (L-arginina amidinohidrolasa, E.C. 3.5.3.1.) es la enzima que cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea. Su función principal y mejor conocida es la que realiza dentro del ciclo de la urea, mecanismo que tiene lugar en el hígado de organismos ureotéticos.

Además de la función hepática, la actividad de arginasa esta asociada con la regulación de diversos procesos celulares. Esta enzima se encuentra en diferentes tejidos de mamíferos y en otros sistemas vivientes, lo que constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular.

La arginasa es más abundante en el hígado de mamíferos, en donde su actividad es mayor, mientras que cantidades menores y variables se detectan en tejidos no hepáticos.

En ratas se ha detectado actividad de arginasa en el intestino delgado (1,2), pulmón y cerebro (3,4), tiroides (5), bazo, corazón, piel, músculo esquelético y glándula submaxilar (3), páncreas (3,6), riñón (6,7), glándula mamaria lactante (8-10), útero (11), etc.

En ratones la enzima se ha localizado en la epidermis (12), cerebro (13) y otros tejidos. Además, se ha observado que la arginasa es inducida en macrófagos mediante el cultivo de células peritoneales (14,15) y células de bazo de ratón (16).

Otros mamíferos que han sido estudiados son los bovinos (16-21), cabras (22) y conejos (23).

En el humano se ha demostrado actividad de arginasa en el riñón (24), placenta (25,26), corazón (27), sangre (28), eritrocitos (29,36), linfocitos y granulocitos leucémicos (37), en líneas de células tumorales en cultivo (38), en suero, tanto en personas sanas (39,40), como en pacientes con enfermedades hepáticas (41,42) y otros padecimientos diversos (43-46), así como los factores de suero requeridos para la inducción de arginasa en macrófagos (47).

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

En biología de la reproducción ha llamado la atención la participación de la L-arginina en la regulación de algunos procesos reproductivos tales como la pubertad, ovulación y el ciclo estral de la rata, donde se ha observado que una dieta carente de L-arginina provoca un retraso considerable en la aparición de la pubertad y que ésta no puede ser adelantada ni aun quintuplicando las dosis de estrógenos (0.05 a 0.25 ug).

Por otra parte, en 1944, Holt et al., reportaron que una dieta pobre en L-arginina disminuye la espermatogénesis en ratas adultas (74). Posteriormente se demostró que el plasma seminal de pacientes con espermograma patológico contiene menos L-arginina en comparación con el de los pacientes normospermicos (aquellos que presentan movilidad y cuenta espermática normal) (49-50). Estas observaciones condujeron a otros investigadores a tratar problemas de fertilidad con L-arginina.

En 1973, Schachter et al. (51), reportaron que la mayoría de los pacientes con oligospermia (patología referente a baja cuenta espermática) que fueron tratados con L-arginina por vía oral, presentaron un incremento en la concentración y movilidad de células espermáticas.

La L-arginina (0.004 mM) estimula la movilidad de espermatozoides eyaculados humanos (53). También se ha demostrado que en espermatozoides eyaculados de conejo, esta estimulación depende de la concentración, tiempo de incubación y pH, ya que un incremento máximo de 85% en la movilidad se logra después de siete horas de incubación con L-arginina 0.1 mM y un rango de pH entre 7 y 8 (54).

El transporte de L-arginina es activo en un rango de pH de 6.5 a 10.5 con un pH óptimo para el componente de baja afinidad de 7.2-7.6 y un pH óptimo para el componente de alta afinidad de 7.8-8.0. Los experimentos de competencia con análogos de L-arginina y aminoácidos, sugieren que los componentes de baja y alta afinidad pueden reconocer el grupo guanidinio terminal (55).

Más tarde Qian et al (78), con el uso de anticuerpos policlonales demostraron la presencia de ornitina descarboxilasa (ODC, enzima que utiliza ornitina para la biosíntesis de poliaminas) en el citoplasma de células testiculares, en espermatozoides de epidídimo y en células de Sertoli cultivadas, estando altamente concentrada en las vesículas acrosomales de las espermátides y en la región acrosomal de espermatozoides de epidídimo. La actividad de la ODC también fue determinada bioquímicamente por estos autores, quienes la encontraron más alta en las células intersticiales que en otras células de tejidos testiculares pero no detectaron su actividad

en espermatozoides de epidídimo. Recientemente, se ha reportado la actividad de la ODC en espermatozoide humano (57).

La presencia de poliaminas ha sido demostrada en espermatozoides de epidídimo de bovino, y sus perfiles han sido estudiados en testículo de rata, células germinales y células de Sertoli durante la maduración testicular (58). El semen humano contiene altas concentraciones de espermina (5 a 15 mM) (59-60), además de tener espermidina, putrescina y cadaverina.

El propósito de este trabajo fue determinar la actividad de arginasa en semen humano de individuos normales y de pacientes con problemas de fertilidad, con la finalidad de investigar si existe alguna correlación entre la actividad de esta enzima y la patología reproductiva.

GENERALIDADES

2.1. ARGINASA Y POLIAMINAS.

2.1.1. Características y Propiedades de la Arginasa

Desde el año 1894, Richet mencionaba la existencia de la enzima arginasa; posteriormente fue descubierta por Kosel y Dakin en 1904. En principio, la actividad de esta enzima se detectó en hígado de mamíferos, describiéndose como la enzima terminal del ciclo de Urea según H. A. Krebs en 1932 (65).

En 1941 Vincent encontró arginasa en el suero sanguíneo humano (66), hecho que condujo a la medición de la actividad de arginasa en tejidos diferentes al hepático, los cuales contienen tres de las cinco enzimas del ciclo de la urea, pero presentan una menor actividad de arginasa que el hígado.

La naturaleza química de la enzima no se conoce totalmente; su actividad se aumenta o se disminuye en presencia de algunos cationes (cofactores), principalmente Mn^{2+} .

La arginasa tiene un rango de pH óptimo entre 9.3-10. Es una enzima que hidroliza enlaces C-N no peptídicos y con alta afinidad por el sustrato L-arginina, y no así por los isómeros D-arginina y L-homoarginina. La especificidad de la enzima, reconoce sustratos con restos guanidinico-monosustituido que cumplan con las siguientes características:

a) que contengan un radical $-NH_2$ libre en el grupo guanidínico y un carboxilo asociado a un grupo $-NH_2$ u $-OH$ en posición alfa.

b) Que haya una cierta separación entre el primer radical y el segundo. Se ha admitido que la arginasa se combina al resto guanidínico de una parte y otra, y que la orientación de su grupo activo descansa sobre una atracción que el manganeso parece ejercer sobre el grupo carboxilo y amino o hidroxilo del sustrato. El metal se comporta como un agente coordinador entre la enzima y el sustrato por medio de sus últimos grupos funcionales (67).

La arginasa es una enzima oligomérica que consta de cuatro monómeros (tetramero) y con un ión Mn^{2+} íntimamente ligado. La arginasa mejor caracterizada es la del hígado de rata que tiene un peso molecular de 120,000 Daltones (68,69). Esta enzima es resistente a la desnaturalización por ácidos, lo cual se considera un indicativo de la existencia de isoenzimas. Sin embargo, puede lograrse la inactivación por acidez a una temperatura de cero grados centígrados, logrando la disociación de la enzima en subunidades con pesos moleculares de 64,000 y 32,000 Da a pH 4 y 2 respectivamente. La reactivación depende de la temperatura (37°C en amortiguador neutro) y de la concentración de iones Mn^{2+} en el medio (70).

Se han comparado datos de cinética, propiedades físicas y químicas de la arginasa en tejido humano adulto y fetal, de hígado, riñón, cerebro y tracto intestinal, encontrando un comportamiento muy similar (66), lo cual denota la presencia de isoenzimas de la arginasa con características afines. Las isoenzimas de la arginasa mostraron el requerimiento de Mn^{2+} ; presentan curvas similares de desnaturalización bifásica a 68°C en ausencia de $MnCl_2$, curvas de desnaturalización exponencial a 81°C en presencia de $MnCl_2$ 20mM y

similar K_m para L-arginina. Sin embargo, estas isoenzimas difirieron en sus movilidades electroforéticas en geles de poliacrilamida a un pH básico (8.6) y a un pH ácido (5.6). En la generalidad de los casos los tejidos examinados diferentes al hepático (riñón, intestino delgado, glándula mamaria en rata), presentan una actividad enzimática menor.

2.1.2. Arginasa: Relación entre Ciclo de la Urea y la Bioquímica de Poliaminas.

El ciclo de la urea ha sido bien identificado en su conjunto y ahora se sabe que consta de cinco pasos regulados enzimáticamente: 1) La conversión de bicarbonato y amonio en carbamoilfosfato; 2) formación de citrulina a partir de ornitina y carbamoilfosfato; 3) conversión de citrulina y aspartato en argininosuccinato; 4) hidrólisis de arginino-succinato para formar L-arginina; 5) degradación de L-arginina para formar urea y ornitina. La ornitina así formada está nuevamente disponible para su reutilización en el paso 2 y la urea se excreta.

Los dos pasos iniciales son catalizados por las enzimas mitocondriales, carbamoilfosfato sintetasa I y ornitina transcarbamilasa, y los tres últimos por las enzimas citoplasmáticas, argininosuccinato sintetasa, argininosuccinasa y arginasa, respectivamente.

Todas estas enzimas están presentes en el hígado, intestino y riñón, pero solamente en el hígado están en niveles suficientes para llevar a cabo la ureogénesis.

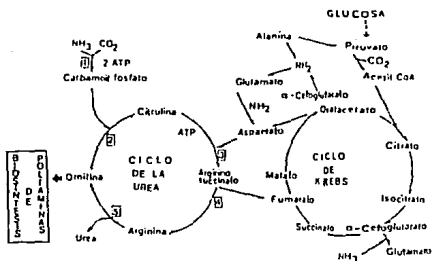


Fig. 1. Ciclo de la urea.

Los componentes del ciclo de la urea funcionan como una unidad, como lo muestra el hecho de que las 5 enzimas del ciclo se incrementan en el hígado de ratas sometidas a dieta alta en proteínas. En estos animales también se incrementan las enzimas relacionadas con el ciclo de la urea, como la alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa. Todo esto comprueba que el ciclo de la urea funciona como una vía metabólica.

A diferencia del hígado, varios tejidos extrahepáticos contienen solamente los últimos tres mecanismos enzimáticos del ciclo de la urea; en el cerebro y músculo, la biosíntesis de urea depende del aporte de citrulina que viene del hígado.

Es posible que esta enzima, ampliamente distribuida en los diferentes tejidos, se encuentre presente en tejidos extrahepáticos para facilitar la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas. Por esta razón, se ha pensado que la arginasa puede ser una de las enzimas que regulan la etapa inicial en la biosíntesis de poliaminas, debiendo recordar que su participación fisiológica tradicionalmente estudiada se relaciona con el ciclo de la urea.

2.1.3. Poliaminas.

En los últimos años se ha mostrado gran interés acerca de la presencia y el metabolismo de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en diferentes tejidos de mamíferos. Se ha observado que su distribución es muy amplia y que su concentración varía de un tejido a otro, lo que conlleva a pensar que estos compuestos tienen diferentes funciones en cada tejido y que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos dentro de la función celular. Aunque la función fisiológica de estas aminas no ha sido bien entendida a nivel molecular, algunos estudios han mostrado que su concentración está regulada, y que el crecimiento celular normal, la multiplicación y la diferenciación requieren poliaminas.

La presencia de poliaminas en materiales biológicos se señaló hace más de 300 años, desde que A. V. Leeuwenhoeck descubrió la cristalización de la espermina en el semen humano; y no fue sino hasta 1926, cuando Otto Rosenheim determinó la estructura química

correcta de la espermina, sintetizando después otra base identificada como fosfato de espermidina.

Tabla 1. Clasificación de poliaminas (73).

| CLASIFICACION | NOMBRE | FORMULA |
|---------------|-------------|--|
| Poliaminas | Espermidina | $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$ |
| | Espermina | $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$ |
| Diaminas | Putrescina | $H_2N-(CH_2)_4-NH_2$ |
| | Cadaverina | $H_2N-(CH_2)_5-NH_2$ |

El descubrimiento de la putrescina y la cadaverina se atribuye al trabajo de Brieger en 1885, quien aisló estas bases como sales dobles de metales pesados del tejido animal.

La putrescina, espermidina y espermina constituyen el grupo de poliaminas que ha sido más estudiado, aunque existen otras aminas que han sido detectadas en varios sistemas biológicos.

Estas aminas, además de encontrarse en forma de bases alifáticas libres, pueden existir conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos, también como unidades subestructurales dentro de numerosas familias de alcaloides. De hecho varias hormonas aumentan la velocidad de la biosíntesis de poliaminas en tejidos específicos, lo cual sugiere que las poliaminas podrían funcionar como mediadores de la actividad hormonal.

Al respecto, se ha investigado que en la glándula mamaria de ratones vírgenes y preñadas puede manipularse hormonalmente obteniendo la proliferación y diferenciación celular, respectivamente. Tanto el desarrollo lóbulo-alveolar como la diferenciación funcional dentro de la glándula mamaria se han asociado con una síntesis aumentada y una acumulación de poliaminas, principalmente de espermidina (71).

2.1.4. Catabolismo de Poliaminas

Parece que las concentraciones de poliaminas en cualquier sistema en crecimiento y diferenciación están determinadas por la actividad de ODC, que en la mayoría de los tejidos es la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de poliaminas (88). Guha y Janne (89), han demostrado que la putrescina, así como la espermidina y la espermina, pueden servir como sustratos para la diamina oxidasa (DAO) uterina, aunque no descartan la posibilidad de que su preparación experimental pudiese haber estado contaminada con otras enzimas capaces de oxidar diferentes aminas. Sin embargo, este hallazgo tiene importante repercusión en la regulación de algunos procesos reproductivos. La putrescina parece ser el mejor sustrato para esta enzima siguiéndole en eficiencia la cadaverina.

En el catabolismo de poliaminas pueden participar otras enzimas (Fig. 3), que permiten transformar parte de estas moléculas en otras de utilidad para la economía celular, ya que el crecimiento y desarrollo de un tejido requiere de energía (80).

La espermidina y la espermina pueden ser también degradadas por DAO para dar putrescina, sustrato que por la acción de la aciltransferasa y de las aminaoxidadas puede transformarse en ácido succínico y éste a su vez entrar al ciclo de Krebs para dar finalmente energía en forma de ATP.

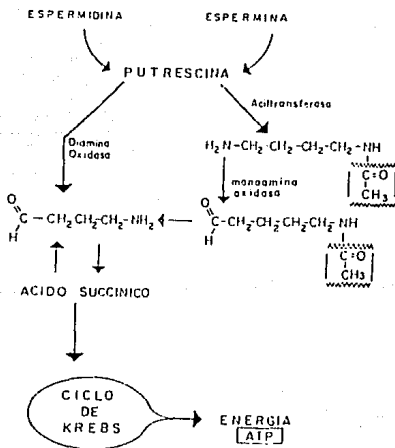


Fig. 3. Catabolismo de poliaminas.

2.2. ARGINASA Y POLIAMINAS EN LA FISILOGIA Y PATOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

La investigación de las funciones fisiológicas de las poliaminas relacionada con el tracto reproductor masculino ha sido tema de numerosos trabajos. En el aparato reproductor humano, la presencia de las estas moléculas ha atraído la atención al estudio del metabolismo de poliaminas particularmente en la próstata, semen y testículo.

Es de especial interés la participación de la enzima arginasa en la formación de poliaminas, moléculas policatiónicas que ya se ha mencionado intervienen en la proliferación y la diferenciación celular (72), dado que esta enzima, por medio de la L-arginina, provee del sustrato (ornitina) a la enzima ODC para la formación de putrescina.

De esta forma, enfocando la atención a la actividad de la enzima arginasa es de notar el gran interés que ha despertado en otros países como Alemania y Estados Unidos, la relación existente entre esta enzima y los procesos reproductivos , dado que su actividad se ha medido en diversos tejidos, encontrándose que los valores más altos corresponden al hígado y entre los siguientes , encontramos que en el epidídimo de ratas adultas existe una actividad de arginasa significativamente alta en comparación con otros tejidos (73), (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de arginasa en tejidos de rata adulta (33).

| TEJIDOS NORMALES | ARGINASA (UNIDADES/g DE TEJIDO) |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Hígado (32)* | 2545.0 ± 356.0 |
| Glándula Submaxilar (12) | 170.0 ± 15.0 |
| Intestino Delgado (18) | 129.0 ± 21.0 |
| Epidídimo (3) | 125.0 ± 11.0 |
| Páncreas (13) | 103.0 ± 9.0 |
| Duodeno (4) | 85.0 ± 20.0 |
| Riñón (18) | 56.5 ± 7.0 |
| Colon (4) | 7.9 ± 5.7 |
| Pulmón (4) | 5.4 ± 1.9 |
| Cerebro (13) | 2.5 ± 0.5 |
| Piel (2) | 2 , 1.6 |
| Timo (1) | 1.9 |
| Bazo (4) | 1.1 ± 0.2 |
| Suprarrenales (1) | 0.7 |
| Corazón (3) | 0.6 ± 0.03 |
| Músculo Esquelético (3) | 0.4 ± 0.3 |

* Número de animales usados.

Dado que el epidídimo es un órgano encargado tanto de la maduración como del almacenamiento de los espermatozoides, resulta interesante conocer el comportamiento de la enzima arginasa, de su sustrato: la L-arginina y de las poliaminas en el semen humano, ya que la actividad de esta enzima se ha medido en el semen de algunos animales (borrego, rata, conejo), sin embargo, son escasos los estudios en semen humano.

La concentración de L-arginina, urea, citrulina, ácido guanidín acético y la actividad de arginasa, han sido determinadas en el suero y en el plasma seminal de pacientes normospermicos, oligospermicos y azospermicos, y se ha propuesto que el bajo contenido de L-arginina en el semen patológico no se debe a la alteración del metabolismo de

sus precursores, sino a la incrementada actividad de arginasa y a la acelerada conversión de L-arginina a ácido guanidín acético (52).

2.2.1. Espermatogénesis.

La espermatogénesis es el desarrollo y producción de células germinales en el hombre, este proceso incluye división celular, diferenciación y reorganización, con la consiguiente reducción del núcleo del estado diploide al haploide; y tiene lugar en los túbulos seminíferos del testículo cuando se ha alcanzado la madurez sexual. La espermatogénesis puede dividirse en tres fases principales: 1) formación de espermatocitos primarios a partir de espermatogonias; 2) división meiótica de espermatocitos, produciéndose espermátides haploides, y 3) diferenciación de espermátides en espermatozoides.

Durante la primera fase, las espermatogonias sufren división mitótica para dar origen a dos grupos de células. Una representa reserva de espermatogonias, la otra continúa dividiéndose, y la última generación de células se transforma en espermatocitos primarios. Cada espermatocito primario produce por división meiótica dos células llamadas espermatocitos secundarios; cada uno contiene una serie de doble hilera de cromosomas. Cada uno de éstos, a su vez, sufre una segunda división meiótica, formando dos espermátides, cada una de las cuales contiene una sola serie de cromosomas. Así, se originan cuatro espermátides haploides de cada espermatocito primario.

Las espermátides gradualmente se transforman en espermatozoides, en este lapso permanecen unidas a las células de Sertoli, que

probablemente proporcionan nutrientes y otras sustancias necesarias para producir la diferenciación de espermátides en espermatozoides.

Aproximadamente se requieren 10 a 11 semanas para la formación de espermatozoides muy especializados a partir de espermatogonias primitivas.

Los espermatozoides liberados de las células de Sertoli en los túbulos seminíferos son aún inmaduros desde el punto de vista funcional; esto es, son inmóviles e incapaces de fertilizar. Adquieren estas capacidades durante su paso (unas dos semanas) através del epidídimo, en un proceso llamado maduración. La fase final de la maduración, llamada capacitación es un período de acondicionamiento en el que se cree hay activación de enzimas acrosómicas (76).

Se ha descrito la espermatogénesis como un proceso fisiológico, sin embargo aún es escaso el estudio de los compuestos bioquímicos que intervienen en este aspecto de la reproducción.

Ya desde 1944, Holt et al, reportaron que una dieta pobre en L-arginina disminuye la espermatogénesis en ratas adultas (74).

También se ha encontrado en estudios realizados por Shubhada et al. (58); que los niveles celulares de poliaminas en testículos de ratas, células germinales y células de Sertoli cultivadas, así como la cantidad de poliaminas liberadas por las células de Sertoli, son dependientes de la edad durante la primera etapa de la espermatogénesis. Se presume que las células germinales utilizan o consumen putrescina liberada por las células de Sertoli para la síntesis de espermidina y espermina.

Es posible que las poliaminas además de su función reguladora en el crecimiento del epidídimo, puedan estabilizar a los espermatozoides metabólicamente inactivos durante los procesos de maduración y almacenamiento.

También se han realizado mediciones de la incorporación de aminoácidos en células de Sertoli, espermatogonias, espermatoцитos primarios y espermátides mediante la acción de la hormona folículo estimulante (FSH) en ratones sin ningún tratamiento; encontrándose que la FSH tiene un efecto generalizado en las células intratubulares estimulando la incorporación de lisina y L-arginina, en el núcleo de las células de Sertoli y en todos los tipos de células germinales (77).

Qian Z. et al (78) han confirmado la presencia de la ODC en las células intersticiales testiculares y el ensayo enzimático ha demostrado que la actividad de esta enzima sólo es funcional en las fracciones solubles de las células intersticiales aisladas y de las células germinales.

Las poliaminas testiculares podrían tener un papel muy importante en la espermatogénesis de mamíferos y anfibios, sin embargo no se conoce aun su función fisiológica precisa.

2.2.2. Semen Humano Normal.

El semen es la descarga completa del macho durante una eyaculación normal. Consta de dos componentes primordiales, los espermatozoides o elementos celulares y el plasma seminal o la porción líquida. El esperma se produce en los túbulos seminíferos de

los testículos, los cuales están controlados por hormonas de la glándula pituitaria anterior. La hormona luteinizante (HL) estimula el crecimiento de las células intersticiales o de Leydig para la secreción de testosterona. Esta última es responsable de estimular los túbulos seminíferos y del crecimiento normal, desarrollo y función de las glándulas accesorias las cuales producen el plasma seminal. Aparentemente, la FSH tiene alguna función en la espermatogénesis, pero aun no se define su papel específico.

A. Espermatozoide

Las funciones básicas fisiológicas y bioquímicas del espermatozoide son la fertilización del ovario y la movilidad. El espermatozoide está diseñado para llevar a cabo estas funciones con la ayuda de dos partes principales, la cabeza y la cola .

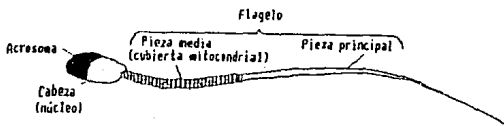


Fig. 4. Representación esquemática del espermatozoide (59,83).

La cabeza tiene un núcleo el cual actúa como transmisor del material genético en forma de desoxirribonucleoproteína y un acrosoma con factores líticos que permiten la penetración al huevo.

El núcleo se encuentra rodeado por una membrana gruesa, que anteriormente se encuentra cubierta por una membrana acrosomal y posteriormente por una membrana citoplasmática, la región postacrosomal (capa postnuclear). La composición química del núcleo consiste primordialmente en cromatina densamente empacada formada de DNA conjugado con proteínas nucleares básicas con carácter de histona o protamina.

El acrosoma es una estructura que cubre las dos terceras partes anteriores del núcleo y se combina con la membrana plasmática para formar la capa de la cabeza. Surge a partir del aparato de Golgi de la espermátide. El acrosoma se ha convertido en una parte muy importante de la fisiología reproductiva, ya que se asocia con la penetración del huevo. Varios factores líticos se han descrito, la hialuronidasa se libera del acrosoma para preparar el camino a los espermatozoides através del cúmulo celular. Existe una enzima que dispersa las células de la corona radiada y se ha aislado una enzima lipoglicoproteica (del tipo tripsina), que disuelve la zona pelúcida.

La cola es un flagelo largo que consiste en cuatro regiones, el cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza final, las cuales contienen los componentes celulares y enzimas necesarias para la actividad metabólica y la movilidad. El espermatozoide del hombre varía en longitud de 55 a 65 u.

El cuello une la cola con la cabeza. De la parte posterior del cuello, se originan filamentos discretos internos en forma axial y

corren a todo lo largo de la cola. Los filamentos se encuentran arreglados en forma de un par central, rodeado por un anillo concéntrico de nueve pares de filamentos tubulares.

La pieza media es la región gruesa anterior de la cola que se extiende desde el cuello hasta la parte principal. En esta sección se encuentran presentes a parte de los nueve filamentos y los dos internos, una capa adicional de nueve fibras mucho más densas y largas que están rodeadas por una cubierta mitocondrial que consiste en mitocondrias individuales alargadas, envolviendo las fibras longitudinales de una forma helicoidal.

Las mitocondrias contienen el sistema enzimático oxidativo para producir adenosín trifosfato (ATP), el cual provee de energía para la movilidad y la iniciación de la glicólisis. Así, la mayor parte de la actividad metabólica del espermatozoide se lleva a cabo en la pieza media.

La pieza principal es la parte más larga de la cola. No contiene mitocondrias y los filamentos axiales están rodeados por una cubierta proteica fibrosa la cual contiene fibras densas orientadas circunferencialmente. La pieza principal termina abruptamente a corta distancia del final de la cola.

La cola termina con una pieza final la cual no contiene los nueve filamentos externos y los filamentos axiales internos están envueltos por una membrana plasmática que rodea al espermatozoide completo.

Existe una notable ausencia de glucógeno o azúcares reductores en el espermatozoide. El plasmalógeno localizado en la pieza media contiene un ácido graso que puede ser hidrolizado y luego oxidado via

el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, dando una fuente endógena de energía cuando las fuentes exógenas no se encuentran disponibles.

B. Líquido Seminal

El plasma seminal provee de nutrientes, de una capacidad amortiguadora y actúa como un vehículo fluido para transportar al espermatozoide del hombre al tracto genital femenino. Es una mezcla compuesta de secreciones de los órganos accesorios masculinos de reproducción .

Dentro de su composición, encontramos como sustratos metabólicos principales la fructosa y el ácido láctico; el sorbitol, los fosfolípidos, los aminoácidos y los ácidos grasos pueden catabolizarse hasta un cierto límite. La concentración de hidrógeno del plasma seminal se encuentra regulada a un pH de 7.0 por el bicarbonato, el ácido cítrico, proteínas y aminoácidos. Los principales electrolitos del plasma seminal son el sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro, que además es iso-osmótico con el plasma sanguíneo. Sin embargo, mucha de esta actividad osmótica se crea por constituyentes orgánicos de bajo peso molecular, resultando una proporción baja de electrolitos a la de no-electrolitos comparada con la del plasma sanguíneo.

Las enzimas del plasma seminal incluyen enzimas proteolíticas, varias fosfatasas, glicosidasas, colinesterasas, diamino oxidasas y deshidrogenasa láctica. Dentro de las hormonas en el plasma seminal, se encuentran epinefrina, norepinefrina, andrógenos y estrógenos.

Entre las vitaminas presentes en el plasma seminal, se encuentran el ácido ascórbico, el inositol y la riboflavina. Un compuesto más interesante, la glicerilfosforilcolina (GPC), se encuentra en altas concentraciones en el plasma seminal, sin embargo, el espermatozoide no puede utilizar GPC directamente del plasma seminal, es necesaria una diesterasa del tracto genital femenino, para romperlo y proveer de glicerol fosfato como una fuente de energía.

El semen humano normal contiene espermina en concentraciones de 5-15 mM (59, 60) y pequeñas cantidades de espermidina, cadaverina (60), putrescina y 1,3 diaminopropano. La relación molar espermina a espermidina en semen humano es mayor de 12 (81). El hecho de que la concentración de espermina en el semen humano sea mucho más alta que en otros tejidos y fluidos corporales, ha conducido a realizar una serie de investigaciones sobre la función de estas sustancias en el semen, analizando principalmente el efecto "in vivo" de la espermina y otras poliaminas sobre el espermatozoide.

2.2.3. Análisis de semen.

El análisis de semen puede proporcionar información sobre los antecedentes testiculares del espermatozoide, las propiedades funcionales de éste y de la función secretoria de las glándulas accesorias genitales. Por lo tanto, el análisis de semen puede ser de interés no sólo para aquellos que tratan con problemas de infertilidad, sino también para los interesados en la regulación de la fertilidad y los posibles efectos de enfermedades, drogas, químicos y factores ambientales en el sistema reproductor masculino.

El semen debe colectarse por masturbación después de 3 a 5 días de abstinencia, períodos más cortos o largos de abstinencia podrían influenciar diferentes variables (volumen, cuenta o movilidad). Los exámenes iniciales de semen (dentro de 30-60 min), incluyen viscosidad, licuefacción, color y volumen. Una muestra normal de semen debe estar completamente licuada dentro de los 30 a 60 min siguientes a la eyaculación; la presencia de material no líquido 60 min después de la eyaculación, indica una disfunción prostática (en algunos casos raros alguna disfunción de las vesículas seminales). El color normal debe ser blanco nacarado o grisáceo. El volumen se mide mediante un tubo graduado y en los casos normales fluctúa entre 2 y 5 ml.

La movilidad del espermatozoide se mide generalmente mediante métodos subjetivos, y se reporta como % de espermatozoides móviles. La movilidad es muy alta en los momentos siguientes a la eyaculación y decrece con el tiempo. El porcentaje de espermatozoides móviles puede ser medido con mucha precisión contando los espermatozoides móviles y no-móviles en campos seleccionados al azar. Se considera una movilidad normal cuando se tiene mas del 50 % de espermatozoides móviles en la primera hora después de la emisión.

A la cuenta espermática se le ha dado demasiada atención desde el punto de vista clínico, se realiza cuando la muestra se encuentra completamente licuada y se hace una dilución conocida para efectuar un conteo en una cámara de Neubauer. Se considera como valor normal,

cuando el número contado es mayor de 30 millones de espermatozoides por mililitro de semen.

El semen humano contiene no sólo espermatozoides sino también otros elementos celulares como espermatocitos, espermátides, leucocitos, eritocitos, macrófagos, células epiteliales y bacterias, en algunas ocasiones hongos y tricomonas. El número de elementos celulares diferentes del espermatozoide pueden reportarse contando el número de un tipo dado de célula por cada 100 espermatozoides en la tinción. Se considera que en una muestra de semen normal debe haber un porcentaje inferior al 25% de formas anormales.

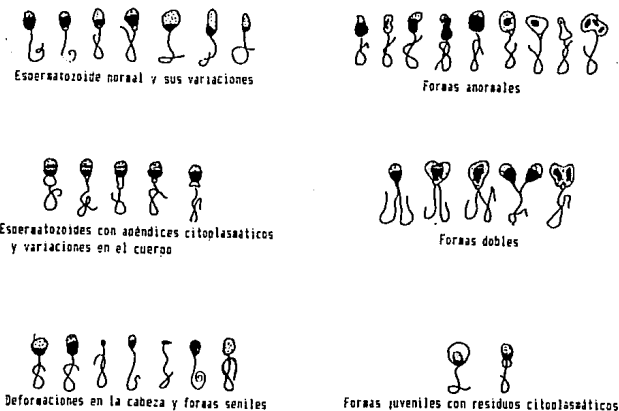


Fig. 5. Morfología del espermatozoide.
(Modificado de Vasterling, H.W.: Praktische Spermatologic, Stuttgart, 1960, Georg Thieme Verlag).

A. Características patológicas

Se consideran resultados anormales cuando el número es menor de 30 millones de espermatozoides / ml y se clasifican en azoospermia la ausencia total o casi total (menos de 1000/ml) de espermatozoides en una eyaculación de volumen normal. Se le denomina oligospermia a un número de espermatozoides por ml insuficientes, la oligospermia es moderada para 20-30 millones, media para 10-20 millones y grave para menos de 10 millones de espermatozoides por ml.

Cuando existe disminución por debajo de los valores normales de la movilidad, se le denomina astenospermia y cuando el porcentaje de formas anormales es superior al 25%, se conoce como teratospermia.

En la oligoastenospermia se reúnen estas anomalías con menos de 10-20 millones de espermatozoides por ml y solamente 30-40% de formas móviles y cuyas causas son múltiples: psíquicas (angustia, ansiedad) que podrían agravar un estado ya deficiente; metabólicas (diabetes, gota, obesidad, etc.).

2.2.4. Movilidad Espermática

Los mecanismos responsables de la movilidad del espermatozoide son una serie de eventos bioquímicos complejos que incluyen elementos proteicos contráctiles y de transferencia y producción de energía que han sido intensamente estudiados pero aún no han sido claramente entendidos. La movilidad es importante para el encuentro

espermatozoide-óvulo y se correlaciona con la capacidad fertilizante del espermatozoide.

Investigaciones recientes demostraron que el aparato motor (flagelo) del espermatozoide maduro es una unidad que requiere de Mg-ATP (Magnesio-Adenosín trifosfato) para producir movilidad. El AMPc (3'-5' monofosfato cíclico de adenosina) parece activar cinasas dependientes de AMPc (cinasa_a), cuya función es la fosforilación de proteínas específicas requeridas para la movilidad espermática.

Se ha considerado que una serie de agentes externos regulan el control de la movilidad bajo condiciones fisiológicas, (Tabla 3).

Tabla 3. Factores que participan en el control de la movilidad espermática (83).

| AGENTE | FUENTE | FUNCION |
|---|-----------------------------------|--|
| Espermina y Espermidina | Fluido Seminal | Activa Adenil Ciclasa |
| Factor "de reposo" de bajo peso molecular | Fluido Epididimario. | Induce el reposo e inhibe la reacción acrosomal |
| Heparina | Células mastoides y otras fuentes | Induce la capacitación y el consumo de Ca ²⁺ |
| Acetilcolina y adenosina | Nervio y músculo | Se une a receptores específicos presentes en el espermatozoide |
| Factor estimulante de la movilidad de bajo peso molecular | Plasma Seminal | Estimula actividad de adenil ciclasa y la movilidad |
| AMPc | Tracto reproductivo femenino | Fosforila proteínas de membrana externa |
| Tirosina y triyodotirosina | Glandula Tiroide | Activa adenil ciclasa |

En la Fig. 7, se resumen las interacciones más probables basadas en las evidencias experimentales para la regulación de la movilidad espermática. Como se puede observar, en este esquema regulador dos fenómenos esenciales no aparecen claros.

El primero es el agente externo que controla la movilidad bajo condiciones fisiológicas. Aunque se ha propuesto que la espermidina y la espermina tienen una participación importante en este proceso, esto es todavía motivo de estudio (ver Tabla 3). El segundo factor desconocido es el mecanismo molecular que activa y desactiva el axonema (Fig. 6).

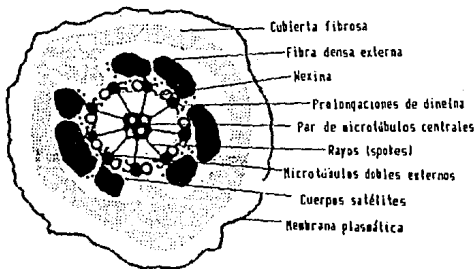


Fig. 6. Diagrama que presenta un corte transversal del flagelo del espermatozoide (axonema). (83)

Los mensajeros internos principalmente involucrados son el AMPc y el Ca^{2+} , pero no se conoce aun como se activa y desactiva el mecanismo de deslizamiento tubular. Descubrimientos recientes indican que tanto los cambios en la entrada de Ca^{2+} como los del pH interno, juegan un papel central para la respuesta de quietud, activación o hiperactivación del aparato motor.

El diagrama que se muestra en la Fig. 7 es un resumen de las influencias reguladoras que se han establecido o sugerido mediante evidencia experimental. Los signos de interrogación indican pasos tentativos y donde el mecanismo de acción aún no ha sido bien elucidado. Las dos interacciones funcionales conocidas en el axonema se muestran esquemáticamente. Una o ambas pueden ser el blanco final para la fosforilación cíclica nucleótido-dependiente. No se ha determinado aun el papel del intermediario citoplasmático, la axoquinina. La reacción de fosforilación depende de la activación de la cinasa_a, la cual a su vez es dependiente de la producción y degradación de APMc o de guanosín-3'5'monofosfato cíclico (GMPc). El Ca^{2+} juega un papel complicado ya que debe estimular tanto la fosfodiesterasa como la adenil ciclasa. El Ca^{2+} tiene influencia en la desfosforilación del axonema, un paso que debe ser dependiente del pH, también el Ca^{2+} controla la curvatura flagelar para dirigir el patrón de movilidad producido en un espermatozoide activo. Los niveles de Ca^{2+} están regulados por el transporte de membrana, la cual responde a diversas influencias internas y externas.

Las acciones finales de los mensajeros en las proteínas del axonema, y los mensajeros externos que son los responsables de los

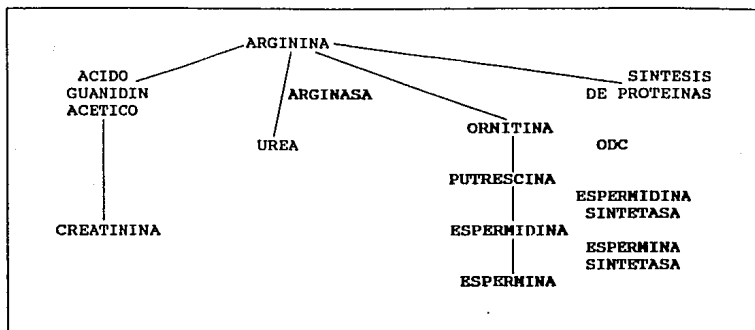
Se ha demostrado que la alta movilidad está relacionada con la prontitud en el tiempo de fertilización y viceversa (82). También se ha reportado que el plasma seminal aislado de semen con alta movilidad espermática, estimula los espermatozoides que muestran baja movilidad, mientras que el plasma seminal que muestra baja movilidad, disminuye la movilidad de espermatozoides altamente móviles.

La adición de diferentes sustancias al semen se ha probado para inducir y mejorar la calidad de éste.

Se ha probado también la adición de L-arginina para la estimulación de la movilidad de espermatozoide de conejo in vitro (54), encontrando que existe un mayor grado de estimulación cuando se utiliza L-arginina 0.1 mM, mientras que estudios en espermatozoide humano revelan que la máxima estimulación de movilidad, se logró a concentraciones de 0.004 mM (53). Se ha reportado que el espermatozoide de conejo transporta L-arginina y que este transporte procede por mecanismos específicos, químicamente saturables. Los análisis cinéticos de las velocidades iniciales de transporte en concentraciones de sustrato de 0.001 a 1.0 mM indican la presencia de dos transportadores saturables. Uno de baja afinidad (K_m 0.64 mM) y otro de alta afinidad (0.004 mM).

Esto sugiere que la estimulación por L-arginina podría ser una función del metabolismo endógeno del espermatozoide. El hecho de que la L-arginina estimule la movilidad espermática, da lugar a algunas preguntas interesantes acerca del mecanismo de acción; sin embargo, se ha propuesto que dentro del espermatozoide este sustrato puede tener diferentes destinos metabólicos (Tabla 4).

Tabla 4. Posibles vías metabólicas de la L-arginina en la célula espermática.



Dado que se ha comprobado que la espermina y en general las poliaminas se encuentran relacionadas con la movilidad espermática (81-84), es de esperarse que la enzima arginasa se encuentre también relacionada, y su actividad varíe dependiendo de las condiciones fisiológicas del semen.

La especificidad de la acción de la L-arginina se comprueba por la incapacidad de D-arginina, L-homoarginina, L-nitroarginina y L-ornitina de aumentar la movilidad espermática in vitro. Lo anterior sugiere que el grupo guanidinio terminal así como la cadena carbonada son requerimientos esenciales para la función que ejerce la L-arginina.

2.2.5. Cuenta Espermática

Desde 1967, Tanimura (50) reportó una correlación positiva in vivo entre la cuenta espermática y la L-arginina unida relacionada al espermatozoide.

Aún cuando la L-arginina es un aminoácido no esencial debido a que se sintetiza en el organismo, esta substancia es indispensable como material para la síntesis celular y la proteína tisular. Sin embargo, durante los estadios activos del crecimiento, como en la infancia, la cantidad de L-arginina sintetizada es menor a la demanda.

La L-arginina toma parte en la formación espermática; se ha encontrado que es el componente básico en las nucleoproteínas (histonas y protaminas) del espermatozoide en varias especies.

También en 1973, Schachter et al (51) reportaron que la administración oral de L-arginina a pacientes oligospermicos, mejoró tanto la cuenta espermática como la movilidad en la mayoría de los individuos tratados; atribuyendo este éxito terapéutico a la administración de altas concentraciones de L-arginina por vía oral. Sin embargo, el estudio hecho por Adnan Mroueh (61), no confirmó la mejoría en la cuenta espermática de pacientes oligospermicos después de un tratamiento utilizando concentraciones más bajas de L-arginina por vía oral.

Se ha demostrado que la concentración de L-arginina en el plasma seminal de hombres con cuentas espermáticas normales, es mayor que la medida en pacientes oligospermicos o azospermicos (53), y que esto puede deberse a diferencias en la capacidad de absorción intestinal

y de la velocidad alterada de síntesis del aminoácido, por lo que es posible que estas diferencias se reflejen en la concentración de L-arginina en el plasma seminal.

Se han hecho algunos intentos para elucidar una función fisiológica o patológica tanto de la espermina como de las enzimas involucradas en su metabolismo en el plasma seminal humano correlacionando sus concentraciones con la cuenta espermática, al respecto se encontró una correlación significativa entre la concentración de espermina del plasma seminal humano y la cuenta espermática total en las mismas muestras de semen (85), sin embargo, esta correlación no se confirmó en estudios posteriores (86).

2.2.6. Capacitación Espermática

Hay evidencia de estudios in vitro de que la espermina resalta la actividad de maltasa presente en el plasma seminal que está involucrada en la degradación del glucógeno y que incrementa la utilización de glucosa por el espermatozoide, al mismo tiempo que reduce la utilización de fructosa (84).

La adición de cantidades fisiológicas de espermina a suspensiones de espermatozoides causa un aumento importante en los niveles de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), nucleótido que induce la capacitación en el espermatozoide humano.

El efecto de la espermina sobre los niveles de AMPC puede ser explicado por el hecho de que esta poliamina inhibe la actividad de

fosfodiesterasa del AMPc y aumenta la actividad de adenil ciclasa (62).

También se ha observado que el efecto de la espermina sobre los niveles de AMPc pueden ser resaltados por prostaglandina E_2 (PgE_2), y se ha demostrado que la PgE_2 produce estimulación de la actividad de la ODC (63).

Existe la posibilidad de que la espermina normalmente presente en el semen humano, pueda ser oxidada por enzimas a productos aldehídicos tóxicos para algunas células eucarióticas, pero que pueden ser importantes para la supervivencia y para la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide eyaculado. Estudios recientes han indicado que las poliaminas estimulan la reacción acrosomal en el espermatozoide de cuyo (87).

III. MATERIAL Y METODOS

Se obtuvieron muestras de semen y sangre de 9 varones sanos (fértils) y de 12 pacientes con antecedentes de por lo menos 1 año de infertilidad. Las características observadas para la recolección de las muestras se resumen a continuación, tanto para los individuos sanos como para los infértiles:

- a) La edad varió entre 24 a 46 años.
- b) Ninguno de los pacientes se encontraba bajo algún tipo de medicación al momento de la recolección de la muestra, ni aún dos días antes de la recolección de la misma.
- c) Únicamente se consideraron pacientes ideopáticos (aquellos que no tuvieran antecedentes clínicos, es decir, sin previa medicación).
- d) Las muestras fueron obtenidas por masturbación con un período de abstinencia entre 3-5 días .
- e) Las muestras de sangre fueron obtenidas en completo ayuno.

Las muestras de los individuos normales se obtuvieron del servicio de Planificación Familiar de la Clínica No. 9 del IMSS; mientras que las muestras de los individuos infértiles fueron proporcionadas por el Servicio de Andrología a través del Laboratorio de Hormonas del Hospital de Gineco-obstetricia No. 4 del IMSS. El total de muestras recolectado en ambos lugares fue de 30 pacientes, sin embargo, únicamente se utilizaron 21 (9 normales, 6 oligoastenospermicos, 4 azospermicos y 2 teratospermicos), por ser aquellos que cumplían con los requerimientos del diseño experimental.

Para seleccionar y eliminar aquellas muestras que no cumplían con las características requeridas, específicamente se tomaron en cuenta los siguientes criterios de exclusión:

1) Cuando no fue posible agruparlos dentro de las patologías incluidas en este estudio, por tratarse de casos aislados de oligospermia o astenospermia, dado que el grupo analizado fue de pacientes oligoastenospermicos.

2) Cuando se encontró una licuefacción incompleta (muestra viscosa aún después de 60 min. de la eyaculación); dado que esto impedía una eficiente separación de las células.

3) Cuando la muestra de semen observada al microscopio presentaba un porcentaje mayor al 10 % de formas celulares diferentes al espermatozoide. Ej. Células epiteliales, leucocitos, bacterias, etc.

4) Cuando la actitud del paciente impidió la colección de la muestra.

El primer análisis realizado a la muestra de semen fue la espermatobioscopia, de la cual se obtuvo el conteo celular y las características generales de la muestra, estos datos fueron útiles para la clasificación posterior de las diferentes patologías, según se muestran en las Tablas I y II.

Los criterios considerados como parámetros normales son los establecidos por la O.M.S. (1987) para la espermatobioscopia, sin embargo, en este estudio se utilizaron parámetros más estrictos, dado que limitan más el rango de clasificación, (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla comparativa de parámetros normales para espermatobioscopia.

| P A R A M E T R O | VALOR NORMAL O.M.S. 1987 | VALOR UTILIZADO |
|--|-----------------------------|----------------------|
| VOLUMEN (ml) | >= 1.0 | 2 - 5 |
| CONCENTRACION ESPERMATICA (millones / ml) | >= 20.0 | >= 30.0 |
| CUENTA ESPERMATICA TOTAL (millones / eyaculado) | >= 40.0 | 60 - 150 |
| MOVILIDAD (%) | >= 50.0 | >= 50.0 |
| MORFOLOGIA NORMAL (%) | >= 50.0 | >= 75.0 |
| LICUEFACION | COMPLETA (60 min) | COMPLETA (30 min) |

Para la espermatobioscopia se consideraron los valores de la tabla 6 (75):

Tabla 6. Clasificación de las distintas patologías según su análisis espermatobioscópico.

| PARAMETRO | PATOLOGIA | VALORES ANORMALES |
|-----------------------------|--------------------|--|
| NUMERO | AZOOSPERMIA | Menor a 1000 / ml |
| | OLIGOSPERMIA | a) Moderada 20-30 millones / ml |
| | | b) Media 10-20 millones / ml |
| c) Grave < 10 millones / ml | | |
| MOVILIDAD | ASTENOSPERMIA | Movilidad menor del 50 %. |
| | OLIGOASTENOSPERMIA | De 10 - 20 millones / ml con movilidad menor del 50 %. |
| MORFOLOGIA | TERATOSPERMIA | Formas anormales mayores al 25 %. |

De las muestras de sangre se separó el suero por centrifugación, el cual fue dividido para la cuantificación posterior de proteínas y actividad de arginasa.

Una vez obtenida la muestra de semen, se procedió a cuantificar la movilidad espermática (en el mismo lugar de recolección), para evitar variaciones en los resultados durante el transporte al Laboratorio donde se le analizaría por completo posteriormente.

El transporte de la muestra se realizó a temperatura ambiente y ya en el Laboratorio se terminó el análisis espermatozobioscópico.

Las muestras de semen fueron sometidas al análisis de los siguientes parámetros:

- a) Espermatozobioscopia (Fig. 8).
- b) Cuantificación de proteínas en líquido seminal.
- c) Cuantificación de actividad de arginasa en líquido seminal.
- d) Cuantificación de actividad de arginasa en espermatozoide.

1.- Análisis de semen

a) Espermatozobioscopia

El análisis espermatozobioscópico se hizo con base en los lineamientos propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La espermatozobioscopia se realizó de 30-40 min después de su recolección, tiempo necesario para su completa licuefacción.

1.- Apariencia: Se consideraron normales aquellas muestras que presentaron color blanco-grisáceo opalescente.

2.- Volumen: Se midió en tubo de centrifuga graduado y se clasificó como normal si estaba entre 1-6 ml.

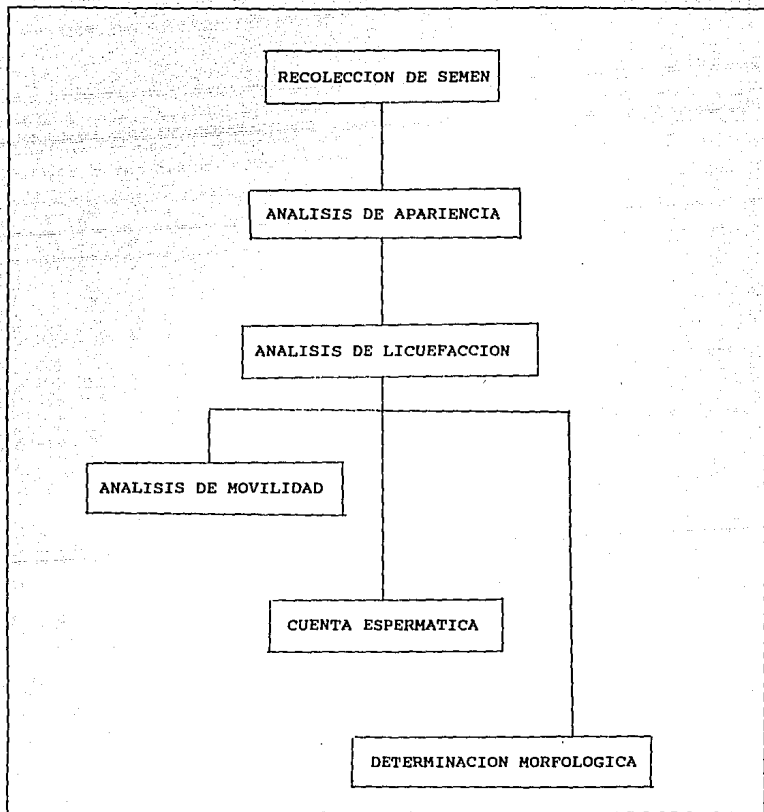


Fig. 8. Diagrama de flujo del procedimiento para la espermatobioscopia.

3.- Licuefacción: Se consideró normal cuando la muestra goteaba al caer de una pipeta Pasteur, de lo contrario se reportaba como licuefacción incompleta. Es importante hacer notar que las muestras que no presentaron licuefacción completa no fueron utilizadas para las determinaciones de proteínas y actividad de arginasa; en consecuencia, no se presentaron en los resultados finales.

4.- Movilidad: Se reportó como por ciento de espermatozoides móviles, mediante la evaluación de un frotis fresco de semen una vez completada la licuefacción. Este frotis se dejó estabilizar por 1 minuto dentro de una caja de Petri en ambiente húmedo antes de evaluarlo al microscopio de contraste de fases. Una vez transcurrido este tiempo se usó un aumento de 40x a temperatura ambiente para realizar el conteo de 100 células dentro del campo visible, entre las que se contaron tanto las células móviles como las inmóviles. La prueba anterior se realizó por duplicado analizando diferentes campos del frotis.

5.- Cuenta espermática: El valor de la cuenta espermática es en realidad un dato de concentración, ya que el resultado obtenido se reportó en "número de espermatozoides / ml de semen". Para obtener este dato, se utilizaron diluciones del semen 1:10 y 1:20 en formol al 3%, según se apreciara la concentración de espermatozoides en el frotis utilizado inicialmente para medir la movilidad en cada muestra de semen. Si se apreció una alta concentración de células, se utilizó una pipeta cuenta glóbulos rojos cuya dilución es 1:20 ; mientras que cuando se registró una baja concentración de células en el frotis

inicial, se utilizó una pipeta cuenta glóbulos blancos cuya dilución es 1:10.

Una vez hecha la dilución apropiada, se llenaron ambos lados de una cámara de Neubauer (por cada muestra) y se dejó estabilizar 3 minutos en ambiente húmedo. Se realizó por duplicado el conteo utilizando un microscopio de luz directa con un aumento de 40x.

Una cámara de Neubauer presenta una cuadrícula como la que se ilustra a continuación:

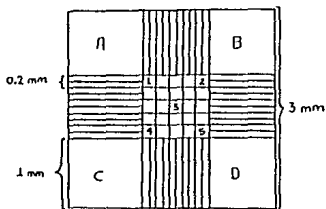


Fig. 9. Cuadrículado de la cámara de Neubauer.

Se contaron únicamente los espermatozoides que se encontraban en los cuadros marcados como A, B, C, D, y E; siempre en la misma secuencia. En la cuenta de cada cuadrante se incluyeron los espermatozoides cuya cabeza se encontraba dentro del mismo aún cuando el flagelo estuviera fuera y se desecharon los espermatozoides que se encontraron sobre la línea divisoria entre cada cuadrante.

Es importante mencionar, que las muestras de semen que presentaban más de dos células diferentes al espermatozoide, es decir, células epiteliales, leucocitos, bacterias, eritrocitos u otro

tipo; fueron desechados como muestras idóneas dado que la cuantificación de la actividad enzimática se vería alterada por la presencia de este tipo de células contaminantes.

6.- Morfología celular: La morfología del espermatozoide se reportó como el por ciento de células anormales, considerándose como éstas los espermatozoides con alguna deformidad en cuanto al tamaño de la cabeza o del flagelo, anomalía de la cabeza, espermatozoides bicéfalos o biflagelados, etc.

Para el conteo de este tipo de células, fue necesario hacer una fijación con alcohol, seguida de una tinción con Eosina al 0.5 %.

Una vez concluida la espermatobioscopia, se procedió a centrifugar el semen para separar a los espermatozoides del líquido seminal a 3,000 rpm durante 10 minutos. Una vez separado el líquido seminal, éste se recentrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, con la finalidad de eliminar la contaminación por detritus celulares. El líquido seminal recentrifugado se dividió en alícuotas para las determinaciones de proteínas y actividad de arginasa.

b) Cuantificación de proteínas en líquido seminal.

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Lowry (64), cuyo fundamento se basa en los enlaces en forma de

complejo que forma el cobre con cuatro residuos de aminoácido pertenecientes a una proteína en medio alcalino.

c) Cuantificación de actividad de arginasa en líquido seminal.

La actividad de arginasa se determinó por el método de Kung et al (12, 19), en el que se mide la concentración de urea.

d) Cuantificación de actividad de arginasa en espermatozoide.

Después de haber separado los espermatozoides del líquido seminal se efectuaron tres lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M a pH 7.4.

2. Análisis del suero.

a) Cuantificación de proteínas en suero.

Se llevó a cabo mediante el método de Lowry, utilizando una alícuota inicial distinta a la requerida para líquido seminal.

b) Cuantificación de actividad de arginasa en suero.

Se determinó por el método de Kung et al (12, 19) únicamente variando la alícuota inicial en comparación a la utilizada para líquido seminal.

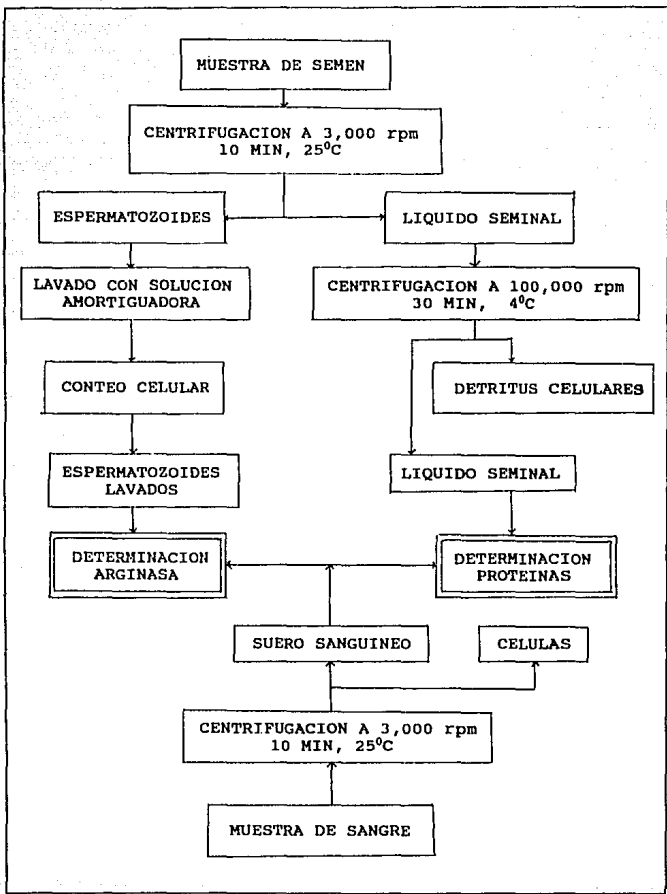


Fig. 10. Diagrama de flujo del procesamiento de las muestras.

IV. RESULTADOS.

Es importante hacer notar que la clasificación de los pacientes dentro de las diferentes patologías incluidas en este trabajo, fueron previamente comprobadas por los respectivos centros de salud de donde fueron obtenidas.

Los resultados de las espermatobioscopías se muestran en las tablas I y II. Los valores de actividad de arginasa en suero, líquido seminal y espermatozoides de los cuatro grupos analizados se presentan en la Tabla III.

Los valores de actividad de arginasa fueron evaluados estadísticamente, con la finalidad de determinar si existía diferencia significativa entre los grupos presentados como a continuación se expresa:

| GRUPO | PATOLOGIA |
|-------|----------------------|
| I | NORMOSPERMICOS |
| II | OLIGOASTEMOSPERMICOS |
| III | AZOOSPERMICOS |
| IV | TERATOSPERMICOS |

TABLA I

| ESPERMATOBIOSCOPIA | | | | | | | | | | | | |
|--|--------------------------|---------------------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|
| PARAMETRO | VALOR NORMAL O.N.S. 1987 | INDIVIDUOS NORMALES | | | | | | | | | | |
| | | EDAD | 24 | 26 | 28 | 28 | 30 | 38 | 40 | 45 | 46 | $\bar{x} \pm SD$ |
| | | MUESTRA | 12 | 11 | 25 | 29 | 26 | 17 | 24 | 28 | 27 | |
| VOLUMEN (ml) | ≥ 1.0 | | 2.7 | 2.2 | 3.3 | 1.8 | 3.3 | 2.2 | 2.8 | 3.0 | 2.4 | 2.6 0.5 |
| CONCENTRACION ESPERMATICA (millones / ml) | ≥ 20.0 | | 21.6 | 49.0 | 17.5 | 20.5 | 12.4 | 42.6 | 18.0 | 21.8 | 22.1 | 25.1 11.5 |
| CUENTA ESPERMATICA TOTAL (millones / eyaculado) | ≥ 40.0 | | 58.3 | 107.8 | 57.8 | 36.9 | 40.9 | 93.6 | 50.4 | 65.4 | 53.0 | 62.7 22.2 |
| MOVILIDAD (%) | ≥ 50.0 | | 50.2 | 51.0 | 60.3 | 56.7 | 56.5 | 49.5 | 50.4 | 52.7 | 53.7 | 53.4 3.5 |
| MORFOLOGIA NORMAL % (*) | ≥ 50.0 | | 94.6 | 91.4 | 87.3 | 86.0 | 81.3 | 97.0 | 80.0 | 81.9 | 92.5 | 88.0 5.8 |
| LICUEFACION | COMPLETA | | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |

(*) Evaluación Subjetiva
+ Licuefacción Completa

TABLA II

| ESPERMATOBIOSCOPIA | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------------------|------|------|------------------|------|------|
| PARAMETRO | VALOR NORMAL O.H.S. 1987 | OLIGOASTHENOSPERMICOS | | | | | | | TERATOSPERMICOS | | | | | |
| | | EDAD | 25 | 28 | 30 | 32 | 33 | 38 | | 33 | 30 | | | |
| | | MUESTRA | 22 | 6 | 2 | 23 | 21 | 18 | $\bar{x} \pm SD$ | 4 | 13 | $\bar{x} \pm SD$ | | |
| VOLUMEN (ml) | >= 1.0 | | 3.3 | 3.4 | 4.0 | 3.7 | 5.0 | 4.0 | 3.9 | 0.6 | 4.5 | 1.5 | 3.0 | 1.5 |
| CONCENTRACION ESPERMATICA (millones / ml) | >= 20.0 | | 4.6 | 2.5 | 1.4 | 7.3 | 10.5 | 9.5 | 6.0 | 3.4 | 15.0 | 78.0 | 46.5 | 31.5 |
| CUENTA ESPERMATICA TOTAL (millones / eyaculado) | >= 40.0 | | 15.0 | 8.5 | 5.6 | 27.1 | 52.5 | 38.0 | 24.5 | 16.7 | 67.5 | 117.0 | 92.3 | 24.8 |
| MOVILIDAD (%) | >= 50.0 | | 16.5 | 9.3 | 23.0 | 20.1 | 16.2 | 32.8 | 19.7 | 7.2 | 60.0 | 28.9 | 44.5 | 15.5 |
| MORFOLOGIA NORMAL % (*) | >= 50.0 | | 89.1 | 85.0 | 92.0 | 80.0 | 76.0 | 85.0 | 84.5 | 5.3 | 56.0 | 49.0 | 52.5 | 3.5 |
| LICUEFACION | COMPLETA | | + | + | - | - | - | - | | | + | + | | |

(*) Evaluación Subjetiva

(**) Licuefacción + Completa - Incompleta

TABLA III

| GRUPO | MUESTRA | NOMBRE | EDAD | ACTIVIDAD DE ARGINASA (**) | | |
|-------|---------|--------|------|----------------------------|--------------|---------------------|
| | | | | PLASMA SEMINAL | SUERO | CELULAS(*) |
| I | 12 | J.M.S. | 24 | 1.25 | ND | 3.70 |
| | 11 | F.A.M. | 26 | 1.80 | ND | 1.34 |
| | 25 | A.C.G. | 28 | 4.25 | 5.96 | 8.70 |
| | 29 | J.S.G. | 28 | 2.53 | 6.26 | 6.37 |
| | 26 | F.R.G. | 30 | 4.25 | 5.03 | 2.99 |
| | 17 | M.V.R. | 38 | 1.74 | 5.24 | 2.23 |
| | 24 | J.R.M. | 40 | 2.46 | 5.93 | ND |
| | 28 | J.M.R. | 45 | 2.90 | 7.75 | 1.15 |
| | 27 | E.L.C. | 46 | 2.65 | 5.57 | 1.36 |
| | | | | - x SD | 2.65 1.05 | 5.96 0.90 |
| II | 22 | E.A.S. | 25 | 2.29 | 4.79 | 2.04 |
| | 6 | J.A.L. | 28 | 2.37 | 2.14 | 6.10 |
| | 2 | H.L.L. | 30 | 1.49 | 0.74 | ND |
| | 23 | C.H.A. | 32 | 1.37 | 4.08 | ND |
| | 21 | J.S.Y. | 33 | 2.55 | 3.41 | ND |
| | 18 | A.Q.Z. | 38 | 2.92 | 3.90 | ND |
| | | | | - x SD | 2.37 0.78 | 3.41 1.49 (+) |
| III | 15 | R.G.N. | 28 | 2.54 | 6.99 | ND |
| | 3 | R.M.L. | 29 | 1.33 | 7.90 | ND |
| | 16 | C.M.P. | 30 | 3.19 | 4.24 | ND |
| | 14 | I.P.V. | 31 | 2.39 | 10.93 | ND |
| | | | | - x SD | 2.36 0.77 | 7.52 2.76 |
| IV | 4 | J.O.R. | 33 | 1.75 | 2.82 | ND |
| | 13 | F.C.D. | 30 | 2.17 | 1.34 | 1.19 |
| | | | | - x SD | 1.96 0.29 | 2.08 1.05 (+) |

GRUPOS: I NORMOSPERMICOS II OLIGOASTENOSPERMICOS III AZOOSPERMICOS
IV TERATOSPERMICOS

(*) (nmoles Urea / millón de células) x 10

(**) nmoles Urea / mg Prot / min

(+) Diferencia significativa con en control, P < 0.05

ND No determinado

Se utilizó la prueba de Diferencia Significativa Mínima de Fisher (DSM) y t de student, para muestras apareadas y para muestras globales, respectivamente; comprobándose lo siguiente en ambas:

a) No existe diferencia significativa en la actividad de arginasa del líquido seminal entre los cuatro grupos.

b) Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) en la actividad de arginasa entre las siguientes muestras de suero sanguíneo:

| | | |
|-----------|---|-----------|
| Grupo I | y | Grupo II |
| Grupo I | y | Grupo IV |
| Grupo II | y | Grupo III |
| Grupo III | y | Grupo IV |

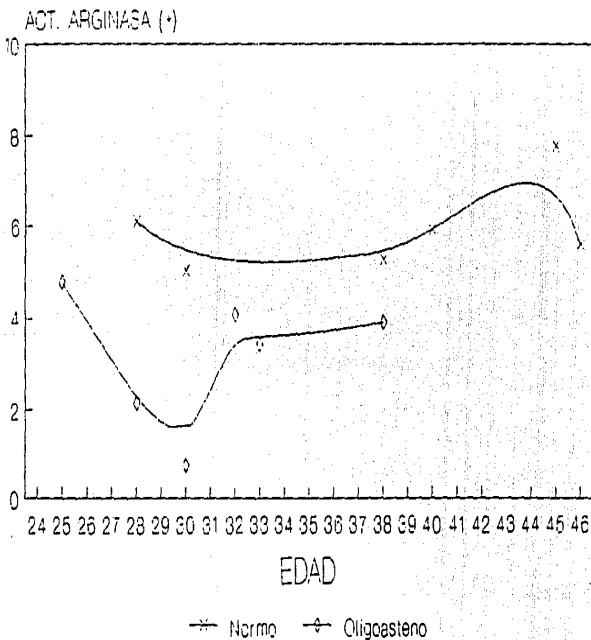
c) No se encontró diferencia significativa en la actividad de arginasa entre las siguientes muestras de suero sanguíneo:

| | | |
|----------|---|-----------|
| Grupo I | y | Grupo III |
| Grupo II | y | Grupo IV |

En las figuras 17-19 se presentan gráficamente los valores obtenidos en las diferentes determinaciones realizadas en los grupos analizados.

ACTIVIDAD DE ARGINASA

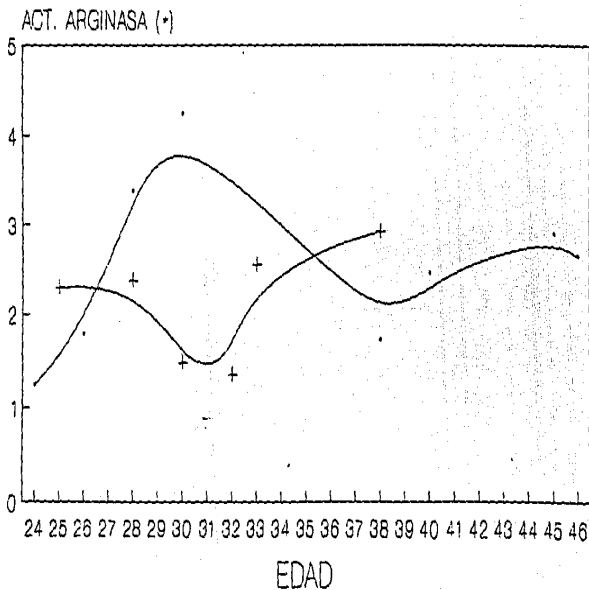
Suero



(•) nmoles Urea /mg Prot /min

ACTIVIDAD DE ARGINASA

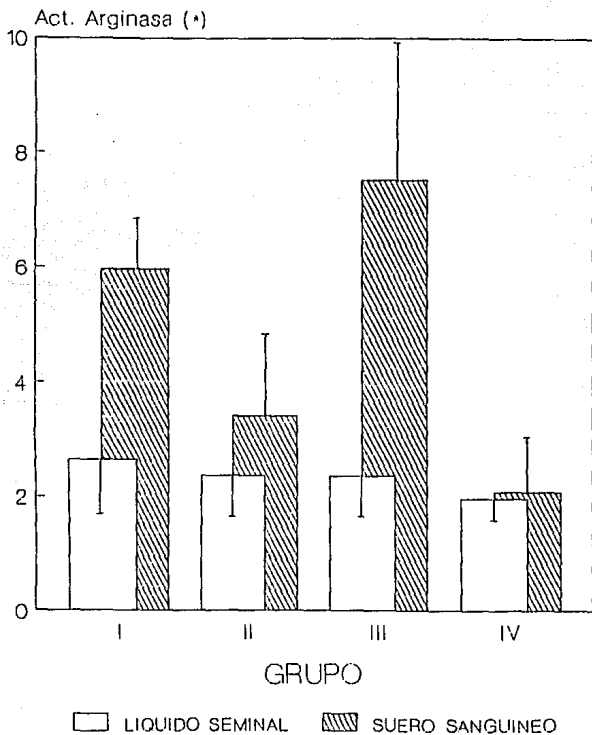
Plasma Seminal



— Normo + Oligo

(•) nmoles Urea /mg Prot /min

ACTIVIDAD DE ARGINASA



(*) nmoles Urea / mg Prot / min

Fig. 19.

V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La elección de los varones cuyas muestras serían analizadas, fue diseñada para formar tres grupos principales (normospermicos, azoospermicos y oligoastenospermicos) ya que son las patologías más comunes; sin embargo, el principal problema que se tuvo al formar los grupos fue que no se encontraron casos suficientes (10 al menos) en cada grupo, dado que existen varios factores que determinan que la muestra no sea útil experimentalmente, como se establece según los criterios de exclusión. De la misma manera, se incluyeron en el estudio, dos pacientes cuya patología es poco frecuente, como el caso de la teratospermia.

En el análisis espermatozoides practicado a cada muestra de semen, se siguieron lineamientos más estrictos para los valores normales, ya que los límites propuestos por la O.M.S. (1987), consideran un rango muy amplio, lo cual haría parecer algunos valores normales en teoría, mientras que en la práctica, la clasificación de un paciente pseudonormal, no concuerda con su esterilidad aparente. Este es el caso de los pacientes con cuentas espermáticas cuyos valores caen dentro de los límites inferiores propuestos por la O.M.S..

Este criterio fue utilizado ya que la espermatozoides es un análisis que podría clasificarse como subjetivo, ya que una misma muestra de semen, analizada dos o más veces por la misma persona, daría resultados con dispersiones demasiado grandes, como se observa en las tablas I y II.

Después de la espermatobioscopia, la muestra se dividió en líquido seminal y células, éstas últimas, se lavaron con un amortiguador de fosfatos, con el objeto de eliminar la mayor parte del líquido seminal, y así asegurar que la determinación de actividad de arginasa, se debiera únicamente a la aportada por la célula. Esto se logró con tres lavados en solución amortiguadora.

En el caso de la actividad de arginasa, es importante mencionar que se adaptó la técnica según la cantidad de muestra necesaria, para el líquido seminal y lavados de células se utilizaron alícuotas de 10.28 ul y para suero una alícuota de 1.8 ul. Para la determinación de proteínas, del líquido seminal se utilizó una alícuota de 1.66 ul y del suero sanguíneo una alícuota de 1 ul, en el caso de individuos con alguna patología; mientras que para los individuos normales, las alícuotas tomadas, fueron la mitad en ambos casos, es decir, se utilizó 0.8 ul de líquido seminal y 0.5 ul de suero.

Estos datos nos hacen pensar que los individuos normales contienen mayor cantidad de proteínas tanto en líquido seminal como en suero sanguíneo.

a) No fue posible determinar si existe diferencia significativa entre las muestrás de líquido seminal para la actividad de arginasa entre los cuatro grupos, lo cual sugiere que dentro de las patologías reproductivas analizadas, no existe alteración enzimática en la secreción manifestada como líquido seminal.

b) Si existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la actividad de arginasa de las muestras de suero sanguíneo de los grupos II y IV tendiendo a ser menor en estos grupos, comparados con el grupo normal. Es posible que esta diferencia de actividades de arginasa entre el líquido seminal y el suero sanguíneo, pueda implicar que la alimentación es un parámetro que influye, aun cuando en este trabajo no se tomó en cuenta.

c) Si existe actividad de arginasa en el espermatozoide, sin embargo; éste no contiene las enzimas completas del ciclo de la urea, por lo cual no lo lleva a cabo. Por lo tanto, la única vía posible en la que se implica la arginasa es en la síntesis de poliaminas, a partir de ornitina.

d) Es posible que al administrar el sustrato de la arginasa (L-arginina) tanto in vitro como vía oral en cantidades fisiológicas, aumente la movilidad y capacitación del espermatozoide. Esto posiblemente implique la participación de poliaminas.

De acuerdo a las evidencias obtenidas en este trabajo, se puede concluir que dentro de las patologías estudiadas a nivel enzimático, la arginasa no participa activamente en la definición del transtorno reproductivo, esto es, su actividad fue detectada en líquido seminal y células espermáticas no encontrando variación, sin embargo, se conoce que su activación mediante la adición de su sustrato (L-arginina) tiene efectos positivos sobre la movilidad y la cuenta espermática, de tal forma se presume que la actividad de arginasa en

semen humano sigue una ruta bioquímica que es continuada por la ODC para la formación de poliaminas.

Lo anterior sigue una secuencia lógica dado que es ya bien conocido que el semen contiene putrescina, espermidina y espermina en cantidades elevadas, de hecho se atribuye a estas moléculas poliamínicas el olor característico del semen.

En mamíferos, las poliaminas antes mencionadas provienen de la glándula prostática, por lo que se atribuye la actividad de arginasa encontrada en líquido seminal a alguna isoenzima de esta última, de la misma forma que en suero sanguíneo y en otras secreciones glandulares (saliva) se ha medido actividad de arginasa (79).

Al finalizar este trabajo se cumplieron los dos objetivos previamente fijados, en primer lugar se logró determinar la actividad de arginasa en semen humano tanto en líquido seminal como en espermatozoides y en segundo lugar, se comprobó que no existe correlación entre la actividad de esta enzima y los problemas de fertilidad.

La capacidad de fertilizar de una muestra de semen, generalmente se evalúa con base a la concentración de espermatozoides, su movilidad y su morfología. Sin embargo, existen muestras que se clasifican como infértiles, aun cuando tienen espermogramas normales. Debido a lo anterior, parece ser que el criterio clásico para determinar fertilidad es insuficiente y podría ser complementado con algún otro criterio biológico.

Un perfil enzimático podría constituir un buen reflejo de su actividad funcional y metabólica, ya que sólo se conocen datos

publicados en relación a algunas enzimas de las vías glucolítica y oxidativa, por lo que resulta interesante relacionar la capacidad fertilizante con la actividad enzimática.

VI. PERSPECTIVAS.

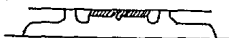
Es posible que la L-arginina se requiera en grandes cantidades en tejidos con un metabolismo acelerado. La capacidad de L-arginina para aumentar la baja movilidad del espermatozoide, ha sido practicada tanto in vitro como in vivo.

Existe la posibilidad de que la adición de L-arginina a un medio de criopreservación pueda mantener la movilidad después de la descongelación del semen para realizar inseminaciones artificiales.

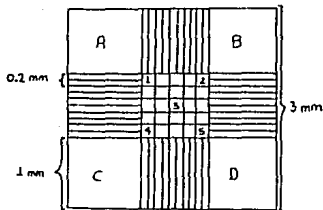
Se ha propuesto también la utilización clínica de L-arginina para aumentar la movilidad de células espermáticas con movilidad baja durante la inseminación artificial.

APENDICE I

Cálculos efectuados en la espermatobioscopia:



Altura entre el cristal superior y la parte superior de la placa forma (0.1 mm).



Cálculo efectuado en el recuento celular:

$$\text{Células/mm}^3 = \left(\begin{array}{c} \text{No. células} \\ \text{contadas} \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \text{Corrección por} \\ \text{volumen} \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \text{Corrección por} \\ \text{dilución} \end{array} \right)$$

1) Conteo celular.

a) No. de células contadas = A + B + C + D (en caso de células escasas)

b) No. de células contadas = 1 + 2 + 3 + 4 + 5 (en caso de células abundantes)

2) Corrección por volúmen.

a) Volúmen en (A + B + C + D) = 4 (1 mm²) (0.1 mm) = 0.4 mm³

Factor de corrección para volúmen en (A + B + C + D) = 2.5

b) Volúmen en (1 + 2 + 3 + 4 + 5) = (0.2 mm) (0.2 mm) (0.1 mm)
= 0.02 mm³

Factor de corrección para volúmen en (1 + 2 + 3 + 4 + 5) = 50

3) Corrección por dilución.

a) En el caso de haber encontrado células escasas, se usó pipeta cuenta glóbulos blancos, la dilución usada es 1:10, por lo que el factor de dilución es 10.

b) En el caso de haber encontrado células abundantes, se usó pipeta cuenta glóbulos rojos, la dilución usada es 1:20, por lo que el factor de dilución es 20.

APENDICE II

1. Cálculos para diluciones en tratamiento previo a actividad de arginasa en espermatozoides.

$$\begin{aligned} \frac{\text{No. Total de células}}{900 \text{ ul Tot}} + 100 \text{ ul} &= \frac{\text{No. Total de células}}{1000 \text{ ul Tot}} \times 200 \text{ ul Tot} \\ &= 0.2 (\text{No. Total de células}) \end{aligned}$$

2. Cálculos para diluciones en tratamiento previo a actividad de arginasa en suero sanguíneo.

$$\frac{10 \text{ ul suero}}{1000 \text{ ul Tot}} = \frac{0.01 \text{ ul suero}}{\text{ul Tot}} \times 900 \text{ ul Tot} = 9 \text{ ul suero}$$

$$\begin{aligned} \frac{9 \text{ ul suero}}{1000 \text{ ul Tot}} &= \frac{0.009 \text{ ul suero}}{\text{ul Tot}} \times 200 \text{ ul Tot} = 1.8 \text{ ul suero} \\ \frac{9 \text{ ul suero}}{1000 \text{ ul Tot}} &= \frac{0.009 \text{ ul suero}}{\text{ul Tot}} \times 400 \text{ ul Tot} = 3.6 \text{ ul suero} \end{aligned}$$

3. Cálculos para diluciones en tratamiento previo a actividad de arginasa en homogeneizado.

$$\frac{200 \text{ ul hom}}{700 \text{ ul Tot}} = \frac{0.2857 \text{ ul hom}}{\text{ul Tot}} \times 100 \text{ ul Tot} = 28.57 \text{ ul hom}$$

$$\frac{28.57 \text{ ul hom}}{1000 \text{ ul Tot}} = \frac{0.02857 \text{ ul hom}}{\text{ul Tot}} \times 900 \text{ u. Tot} = 25.71 \text{ ul hom}$$

$$\frac{25.71 \text{ ul hom}}{1000 \text{ ul Tot}} = \frac{0.02571 \text{ ul hom}}{\text{ul Tot}} \times 200 \text{ ul Tot} = 5.1428 \text{ ul hom}$$

$$1000 \text{ ul Tot} \times 400 \text{ ul Tot} = 10.28 \text{ ul hom}$$

$$\times 100 \text{ ul Tot} = 2.5714 \text{ ul hom}$$

4. Cálculos para diluciones en tratamiento previo a determinación de proteínas en suero sanguíneo

$$\frac{100 \text{ ul suero}}{1000 \text{ ul Tot}} = \frac{0.1 \text{ ul suero}}{\text{ul Tot}} \times 10 \text{ ul Tot} = 1 \text{ ul suero}$$

4. Cálculos para diluciones en tratamiento previo a determinación de proteínas en homogeneizado.

$$\frac{100 \text{ ul hom}}{600 \text{ ul Tot}} = \frac{0.166 \text{ ul hom}}{\text{ul tot}} \times 100 \text{ ul Tot} = 16.66 \text{ ul hom}$$

$$\frac{16.66 \text{ ul hom}}{1000 \text{ ul Tot}} = \frac{0.0166 \text{ ul hom}}{\text{ul Tot}} \times 100 \text{ ul Tot} = 1.666 \text{ ul hom}$$

APENDICE III

1. Cuantificación de proteínas en líquido seminal.

Reactivos :

a) Solución preparada en agua destilada de Na_2CO_3 al 2 %, tartrato doble de sodio y potasio 0.02 % y NaOH 0.4 %.

b) Solución al 0.5 % de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada.

c) Se mezcla la solución a) con la b) en una proporción 50 : 1.

Aparatos :

Vórtex

Colorímetro

Baño a 37°C

Centrífuga

Se tomaron 0.1 ml del líquido seminal recentrifugado y se le añadió 0.5 ml de NaOH 1N, posteriormente se colocó a 37°C durante 30 min. con la finalidad de obtener las proteínas solubles en la muestra. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó y se desechó el precipitado; por otra parte se diluyó 1:50 el sobrenadante el cual fue utilizado para la prueba colorimétrica.

A 0.5 ml del sobrenadante anterior se le añadieron 2 ml de tartrato de sodio al 2% : sulfato de cobre al 0.5% y reposó 10

minutos para después agregar 0.2 ml del reactivo de Folin Ciocalteu diluido 1:1. Reposó 20 minutos y después se obtuvo la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm. La lectura obtenida se comparó con una curva estándar realizada con los mismos reactivos y utilizando albúmina bovina como proteína estándar.

Una vez obtenido el valor de concentración de proteína como "ug de proteína / ul", se relaciona con el dato de tratamiento previo de la muestra para expresarlo finalmente de la siguiente manera:

mg proteína / ml de homogeneizado

2. Cuantificación de actividad de arginasa en líquido seminal.

Reactivos :

a) Reactivo colorido: Extracto acuoso de una solución que contiene tiosemicarbazida 2.4 mM y 2,3 butadiona monoxima 4.1 mM.

b) Reactivo ácido: 0.1 ml de cloruro de fierro III 0.12 M en ácido fosfórico al 56.7 % y 100 ml de ácido sulfúrico al 20 %.

c) Solución estándar de urea 15 ug / ml.

Aparatos :

Vórtex

Colorímetro

Parrilla eléctrica

A 0.2 ml del líquido seminal recentrifugado se le agregó 0.5 ml de una solución amortiguadora compuesta por $MnCl_2$ 0.002 M, Tris HCl 0.04 M y solución salina 0.154 M (0.9%); procediéndose a incubar a $55^{\circ}C$ durante 1 hora. Este procedimiento se llevó a cabo para activar a la arginasa en presencia de concentraciones óptimas de Mn^{2+} .

Pasado este tiempo se centrifugó y eliminó el precipitado. Al sobrenadante se le diluyó 1:100 y a 0.9 ml de esta dilución se le añadió 0.1 ml de una mezcla de L-arginina-glicina en solución y se incubó a $37^{\circ}C$, 15 minutos. Con este tratamiento se induce a la arginasa a actuar sobre su sustrato a temperatura fisiológica, para la producción de ornitina y urea; esta última se cuantifica colorimétricamente.

Después de la incubación se detuvo la reacción sumergiéndolo el tubo de ensayo en agua hirviendo durante 7 minutos. De éste último tratamiento se obtiene la alícuota a utilizar para la reacción colorimétrica que cuantificará la actividad de la enzima.

A esta última alícuota se le agregó 1 ml del reactivo colorido compuesto por tiosemicarbazida 20% con diacetilmonoxima 14%, inmediatamente después se añadieron 2 ml del reactivo ácido compuesto por 0.1 ml de $FeCl_3$ 0.12 M en H_3PO_4 al 20% con 100 ml de H_2SO_4 al 20%, se incubó 25 minutos a $91^{\circ}C$ para permitir el desarrollo de la

reacción colorida, para después leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm. La lectura obtenida se comparó con una curva estándar para obtener los "ug de urea / ul / 15 min". Las unidades anteriores se relacionan con los datos de volúmen del tratamiento previo a la muestra, para expresarlo como:

mg urea / ml de homogeneizado / 15 min

BIBLIOGRAFIA

- (1) Beyer, J. and Dabich, D.: Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal. Biochem.*, 39: 412-417, 1971.
- (2) Fujimoto, M., Kameji, T. and Kanaya, A.: Purification and properties of rat small intestinal arginase. *J. Biochem.*, 39: 441-449, 1976.
- (3) Reyer, C. and Dorner, F.: Purification of arginase from human-leukemic lymphocytes and granulocytes of their physicochemical and kinetic properties. *Eur. J. Biochem.*, 56: 137-147, 1975.
- (4) Sadasivudu, B., and Indira, H. R.: Distribution of the rat enzymes involved in the disposal of arginine and ornithine in different regions of rat brain. *Brain Research.*, 79: 326-329, 1974.
- (5) Davis R, and Paulus, T.: Uses of arginaseless cells in the study of polyamine metabolism (*Neurospora crassa*). *Methods Enzymol.*, 94: 112--116, 1983.
- (6) Lin, R., Snodgrass, P. and Rabier, R.: Induction of urea cycle enzymes by glucagon and desamethasone in monolayers cultures of adult hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 257 (9) : 5061-5067. 1982.

- (7) Reddy, P.U.M., and Ramana Rao, J.V.: Inhibition of arginase in sheep brain homogenates by some L-amino-acids. *Experientia.*, 37: 814, 1980.
- (8) Rahmatullah, M. Fong, Y.Y.L., Lee, J.S.K. and Boyde, T.R.C.: Zinc-deficiency and rat activities of urea cycle related enzymes in rats. *Experimentia.*, 36: 1281-1282, 1980.
- (9) Kuchel, P.W., Nichol, L.W. and Jeffrey, P.D.: Interpretation of the kinetics of consecutive enzyme catalyzed reactions. Studies on the arginase-urease system. *J. Bio. Chem.*, 20: 8222-8227, 1975.
- (10) Tarrab, R., Rodriguez, J., Huitron, C., Palacios, R. and Soberon, G.: Molecular forms of rat liver arginase. Isolation and Characterization. *Eur. J. Biochem.*, 20: 457-458, 1974.
- (11) Rosenfeld, J.L., Dutta, S.P., Cheda, G.B. and Tritsch, G.L.: Purine and inhibitors of arginase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 410: 164-166, 1975.
- (12) Kung, J., Brooks, S. and Jakway, J.: Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J. Exp. Med.*, 149: 665-672, 1977.
- (13) Farram, E. and Nelson, D.: Mechanism of action of mouse macrophages as antitumor effector cells: role of arginase. *Cell Immunol.*, 55 (2): 283-293, 1980.

- (14) Terayama, H., Koji, T., Kontani, A. and Myokumoto, T.: Arginase as an inhibitory principle in liver plasma membranes arresting the growth of various mammalian cells in vitro. *Biochem. Biophys. Acta.*, 720: 188-192, 1982.
- (15) Carvajal, N., Acona, M., and Rodriguez, J.P.: Evidence for cooperative effects in human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 701: 146-148, 1982.
- (16) Skog, S., Eriksson, V. and Elliasson, E.: Arginase and phase enzyme in a human cell line. *Biochem. Biophys. Acta.*, 672: 33-44, 1981.
- (17) Carvajal, N., Venegas, A., Destreicher, G. and Plaza, M.: Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 250: 437-442, 1971.
- (18) Pohjanpelto, P. And Holtta, E. : Arginase activity of different cells in tissue culture. *Biochem. Biophys Acta.*, 757: 191-195, 1983.
- (19) Mendez, J. D., Yanez, R., Wong, C. and Hicks, J.J.: Uterine arginase inhibition affect the rat embryonic development. *Contraception.*, 33: 597-604, 1986.
- (20) Spector, E.B., Riece, S.D.H. and Cederbaum, S.D.: Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase defficient patients. *Pediatric. Res.*, 17 (12): 941-944, 1983.

- (21) Haggerty, D.F., Spector, E.B.: Regulation by glucocorticoids of arginase and arginino succinate synthetase in cultured rat hepatoma cells. *J. Bio. Chem.*, 257 (5): 2246-2253, 1982.
- (22) Spector, E.B., Cotta-Dethlefs, H., Kern, R. M.: The rate of induced arginase in the rabbit. *Am. J. Hum. Genet.*, 34: 47A, 1982.
- (23) Shih, V.E. and Jones, C.T.: Arginase deficiency in *Macaca fascicularis*. 1. Arginase activity and arginine concentration in erythrocytes and liver. *Pediatric. Res.*, 6: 548-551, 1972.
- (24) Konarska, L., Wiesmann, U. and Colombo, J. P. : Arginase activity in human fibroblast cultures. *Clin. Chim. Acta.*, 115: 85-92, 1981.
- (25) Farron, F.: Arginase isoenzymes and their detection by catalytic staining in starch gel. *Anal. Biochem.*, 53: 264-268, 1973.
- (26) Jergovic, I., Zuzic, I., Fiser-Herman, M. and Strauss, B.: A simple method for serum arginase determination. *Clin. Chim. Acta.*, 30: 765-774, 1970.
- (27) Van Elsen, A. and Leroy, G.: Arginase isoenzymes in human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 62 (2): 191-198, 1975.
- (28) Baranczy-Kuzma, A., Skrizypek-Osiecka, I. and Poremska, I.: Arginase from human blood serum. *Biochem. Med.*, 26: 174-184, 1981.

(29) Ville-Breitburd, F. and Orth, G.: Rabbit liver arginase. *J. Biol. Chem.*, 247: 1227-1235, 1972.

(30) Hosoyama, Y.: The reversible inactivation of rat liver arginase at low pH. *Eur. J. Biochem.*, 27: 48-52, 1972.

(31) Negoya, M.: Ultramicromethod for the determination of human arginase in the presence of urea. *Clin. Chim. Acta.*, 71: 413-418, 1976.

(32) Verma, A. and Boutwell, B.: Characterization of arginase activity from mouse epidermis and its relation to ornithine decarboxylase induction by the tumor-promoting agent, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biochim. Biophys. Acta.*, 677: 184-189, 1981.

(33) Herzfeld, A. and Raper, S.: The heterogeneity of arginase in rat tissues. *Biochem. J.*, 153: 469-478, 1976.

(34) Yip, M., Morris, C. and Knox, W.: Function of arginase in lactating mammary gland. *Biochem. J.*, 127: 893-899, 1972.

(35) Harri, M. and Hartiala, K.: Arginase activity in rat small intestinal mucosa. *Acta. Physiol. Scand.*, 89: 126-128, 1973.

(36) Oka, T. and Perry, J.: Arginase effects lactogenesis through its influence on the biosynthesis of spermidine. *Nature.*, 250: 660-661, 1974.

(37) Pace, C. and Landers, R.: Arginase inhibition. *Biochem. Biophys. Acta.*, 658 (2): 410-412, 1981.

(38) Beruter, J., Colombo, J. and Bachmann, C.: Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem. J.*, 175: 449-454, 1978.

(39) Aguirre, R. and Kasche, V.: Catalytically active monomer forms of immobilized arginase. *Eur. J. Biochem.*, 5767: 307-314, 1982.

(40) Remesar, X., Arola, Ll., Palou, A. and Alemany, M.: Arginase activity during pregnancy and lactation. *Horm. Metab. Res.*, 16: 468-470, 1984.

(41) Tuegg, U. and Rusell, A.: A rapid and sensitive assay for arginase. *Anal. Biochem.*, 102: 206-212, 1980.

(42) Carvajal, N., Martinez, J. and Fernandez, M.: Immobilized monomers of human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 481: 177-183, 1977.

(43) Freeman, H., James, J. and Williams, M.: Estrogenic induction of uterine arginase activity. *Horm. Metab. Res.*, 3: 352, 1971.

- (44) Cheung, C. and Raijman, L.: Arginine mitochondrial arginase and the control of carbamyl phosphate synthesis. Arch. Biochem. Biophys., 209: 643-649, 1981.
- (45) Matsuzaki, S., Suzuki, M. and Hamana, K. : A possible role of arginase in the regulation of polyamine biosynthesis in the rat thyroid. Acta. Endocrinol. (Copenh)., 98 (1): 57-61, 1981.
- (46) Holtta, E. and Pohjanpelto, P.: Polyamine dependence of chinese hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity. Biochem. Biophys. Acta., 721: 321-327, 1982.
- (47) Jakway, J. and Horris, J.: Serum factors required for arginase induction in macrophages. Cellular Immunol., 54: 253-263, 1980.
- (48) Holt, L. E. and Albanese, A.A.: Observations on aminoacid deficiencies in man. Trans. Ass. Amer. Phys., 58: 143-156, 1944.
- (49) Krampitz, G. and Doepfmer, R.: Determination of free aminoacids in human ejaculate by ion exchange chromatography. Nature, London., 194: 684-686, 1962.
- (50) Tanimura, J.: Studies on arginine in human semen. Bull. Osaka Med. Sch., 13: 76-83, 1967.

(51) Schachter, A., Fiechman, S. Goldman, A.J. and Eckerling, B.: Treatment of oligospermia with the amino acid arginine. *Int. Gynaec. Obstet.*, 11: 206-209, 1973.

(52) Papp, G., Drof, J., Molnar, J. and Jambor, E.: Die rolle des arginingehaltes un der arginase-aktivitat in der fertilitat. *Andrologia.*, 11 (1): 37-41, 1979.

(53) Keller, D. W. and Polakoski, K.L.: L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro. *Biol. Reprod.*, 13: 154-157, 1975.

(54) Radany, E. W. and Atherton, R.W.: Arginine induced stimulation of rabbit sperm motility. *Arch. Androl.* 7: 351-355, 1981.

(55) Radany, E. W., Atherton, R. W. and Forrester, I. T.: Arginine uptake by rabbit spermatozoa. *Arch. Biochem. Biophys.*, 210 (2): 770-774, 1981.

(56) Qian, Z., Tsai, Y., Steinberger A., Lu, M., Greenfield, A.R.L. and Haddox, M.K.: Localization of ornithine decarboxylase in rat testicular cells and epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 33: 1189-1195, 1985.(56)

(57) Méndez, J. D.: Polyamines and Human reproduction. in: *The Physiology of Polyamines*. Bachrach, U. and Heimer, Y. (Eds.), CRC Press, Inc., Florida, USA., 1989. Vol. 1. pp 24-36.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- (58) Shubhada, S., Lin, S., Qian, Z., Steinberger, A. and Tsai Y.: Polyamine profiles in rat testis, germ cells and Sertoli cells during testicular maturation. *J. Androl.* 10 (2): 145-151, 1989.
- (59) Mann, T.: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. John Wiley & Sons. New York. 1964, 193.
- (60) Huggings, C.: The Physiology of the prostate gland. *Physiol. Rev.*, 25: 281, 1945.
- (61) Mroueh, A.M.D.: Effect of arginine on oligospermia. *Fertil. Steril.* 21 (3): 217-221, 1970.
- (62) Shah, G.V., Sheth, A.R.: Inhibition of phosphodiesterase activity of human spermatozoa by spermine. *Experientia.* 34 (8): 980, 1977.
- (63) Madhubala, R., Redy, P.R.K.: Stimulation of ornithine decarboxylase activity by prostaglandins in the isolated cells of immature rat testis. *FEBS Letters* 122 (2): 197, 1980.
- (64) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- (65) Lehninger, A.L.: *Biochemistry.* Worth, Yew York, 591, 1970.

(66) Spector, E.B., Rice, S.C.H., Moedjono, S., Bernard, B. and Cederbaum, S.D. : Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem. Med.* 28: 165-175, 1982.

(67) Hicks, J.J. y Díaz Z., J.C. : *Bioquímica e inmunología*. Vol. 1, pp 687-688, 280; 1988.

(68) Spector, E.B., Rice, S.C., Kern, R.M., Hendrikson R. and Cederbaum, S.D.: Comparison of arginase activity in red blood cells of lower mammals, primates and man: evolution to high activity in primates. *Am. J. Genet.*, 37 (6): 1138-45, 1985.

(69) Bernar, J., Hansen, R.A., Phoenix, P., M.S., Shaw, N.F. and Cederbaum, S.D.: Arginase deficiency in a 12 year old boy with impairment of intellectual function. *J. Pediatr.* 108 (3) : 432-5, 1986.

(70) Kanalas, J.J., Spector, E.B. and Cederbaum, S.D.: Hollow-Fiber Reactors containing mammalian arginase: an approach to enzyme replacement therapy. *Biochem. Med.* 27: 46-55, 1982.

(71) Heby, O.: Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*: 1-20, 1981.

(72) Stewart, J. and Caron, H.: Arginases of mouse brain and liver. *J. Neurochem.*, 29: 657-663, 1977.

(73) Méndez, J.D., Hicks, J.J.: Presencia y función de las poliaminas en el aparato reproductor masculino. *Ginec. Obstet. Méx.* 55: 128-132, 1987.

(74) Holt, L.E. and Albanese A. A.: Observations on amino acid deficiencies in Man. *Trans. Ass. Amer. Phys.*, 58: 143-156, 1944.

(75) Eliasson, R.: *Analysis of Semen*. Raven Press, New York. Cap. 16, pp 381-390.

(76) Jacob, S. W.; Francone, C. A. and Lossow W.J.: *Anatomía y fisiología humana*, Ed. Interamericana, 4a. Ed. México 1984. pp 611-612.

(77) Davies, A.G. and Lawrence N.R.: Autoradiographic study of lysine and arginine incorporation stimulated by Follicle-Stimulating Hormone in the mouse testis in vivo. *J. Endocr.* 84: 43-48, 1980.

(78) Qian, Z., Tsai, Y., Steinberger A., Lu, M., Greenfield, A.R.L. and Haddox, M.K.: Localization of ornithine decarboxylase in rat testicular cells and epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 33: 1189-1195, 1985.

(79) Konarska, L., and Tomaszewsky, L.: Human salivary arginase and its deficiency in argininaemia. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23: 337-342, 1985.

(80) Gil-Recasens, M.E., Collado, M.L. and Hicks, J.J.: Nuevos conceptos relacionados con la implantación. III. Características bioquímicas. Ginec. Obstet. Mex. 44: 491, 1978.

(81) Williams-Ashman H. G., Lockwood D.H.: Role of polyamines in reproductive physiology and sex hormone action. Ann. N.Y. Acad. Sci.: 171: 882, 1970.

(82) Singer, R, Sagiv, M., Levinsky, H., Maayan, R., Segenreich, E. and Allalouf D.: The influence of seminal plasma and polyaminic substances on the motility of isolated human sperm. Int. J. Fertil. 34 (3): 224-230, 1989.

(83) Lindemann, C.B. and Kanous, K.S.: Regulation of mammalian sperm motility. Arch. Androl. 23: 1-22, 1989.

(84) Sheth, A.R., Moodbidri, S. B.: Significance of polyamines in reproduction. Adv. Sex. Horm. Res. 3: 51, 1977.

(85) Fair, W.R., Clark, R.B., Wehner, N.: A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human. Fertil Steril. 23 (1) : 38, 1972.

(86) Janne, J., Holta, E., Haaranen, P., Elfving, K.: Polyamines and polyaminic-metabolising enzyme activities in human semen. Clin. Chim. Acta. 48: 393, 1973.

(87) Fleming, A.P., Armstrong, D.T.: Effects of polyamines upon capacitation and fertilization in the guinea pig. J. Exp. Zool. 233: 93, 1985.

(88) Hernández, O., Ballesteros, L.M., Méndez, J.D. and Rosado, A.: Polyamine synthesis and polysome patterns in the rat uterus during the estrous cycle. Endocrinology 92: 1107, 1973.

(89) Guha, S.K., Janne, J.: The synthesis and accumulation of polyamines in reproductive organs of the rat during pregnancy. Biochim. Biophys. Acta. 437: 244, 1976.