



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

“AISLAMIENTO Y LOCALIZACION
INMUNOCITOQUIMICA DE LA ARGINASA DE
ESPERMATOZOIDES DE BORREGO”

BO 1340/97
Ej. 1

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
LAURA GOMEZ FERNANDEZ



MEXICO, D. F.

1997



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Agradezco al Laboratorio de Inmunquímica del Hospital de Especialidades del C.M.N.

S. XXI las facilidades que me brindaron para la realización de este trabajo.

Y sobre todo al Dr. Vianney Ortiz Navarrete por el tiempo que dedico a asesorarme y su confianza en mí trabajo.

A Araceli Santiago mi más sincero agradecimiento por ser una gran amiga que siempre me brindó su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo.

A los profesores Leticia Moreno Fierros y Luis Arturo Baiza gracias por las observaciones y asesoría que me brindaron.

Director de Tesis.
Dr. José Domingo Méndez Francisco.
Unidad de Investigación Médica
en Enfermedades Metabólicas
Hospital de Especialidades
C.M.N. S-XXI, IMSS.

Al Dr. José Domingo Méndez Francisco
gracias por su apoyo y supervisión en
la realización de este trabajo.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	9
II. INTRODUCCION.....	10
III. GENERALIDADES.....	11
Características de la arginasa.....	13
L-arginina.....	16
Metabolismo de L-arginina.....	18
Espermatozoide.....	19
Transporte a través del epidídimo.....	22
Estructura del espermatozoide.....	24
IV. ANTECEDENTES.....	27
Arginasa y Poliaminas.....	28
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
VI. MATERIAL Y MÉTODO.....	31
Obtención de espermatozoides epididímaros.....	36
Aislamiento de arginasa.....	37
Determinación de arginasa.....	38
Determinación de proteínas.....	39
Producción de anticuerpos anti-arginasa.....	40
Localización inmunocitoquímica de la arginasa de espermatozoides de borrego.....	41
Electroferograma e inmunodetección en papel de nitrocelulosa.....	42

VII. RESULTADOS.....	43
Aislamiento de arginasa.....	45
Características de la arginasa de espermatozoides epididimarios de borrego:	
Tabla	46
Gráficas	47
Titulación de anticuerpos.....	48
Electroferograma y "western blot" de proteínas de espermatozoides epididimarios de borrego.....	49
Inmunolocalización de la arginasa de los espermatozoides de epididimo de borrego:	
Cabeza	50
Cuerpo	51
Cola	52
Esquemas de los patrones más comunes de distribución.....	53
VIII. DISCUSIÓN.....	54
IX. CONCLUSIONES.....	57
X. BIBLIOGRAFÍA.....	58

I. RESUMEN.

La actividad de arginasa ha sido detectada en el espermatozoide de los mamíferos. Sin embargo su función en estas células es desconocida. En este trabajo se estudió la distribución de la arginasa en espermatozoides de borrego, obtenidos de la cabeza, del cuerpo y de la cola del epidídimo, utilizando anticuerpos policlonales anti-arginasa de hígado de bovino por medio de una técnica indirecta de inmunoperoxidasa. Por esta técnica se detectó la presencia de arginasa en el flagelo, el acrosoma y la región ecuatorial en los espermatozoides de la cabeza del epidídimo. En las células espermáticas del cuerpo del epidídimo se detectó en el flagelo y el acrosoma; y en las muestras de cola del epidídimo se localizó en flagelo, acrosoma, y región posacroosomal. La presencia de la arginasa en el espermatozoide y su distribución en las células provenientes de las diferentes fracciones del epidídimo sugiere que esta proteína al igual que otras presentes en el espermatozoide sufre un reacomodo durante su tránsito por el epidídimo; aunque su función en estas células siga siendo desconocida, probablemente facilita al igual que en otros tejidos la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas, ya que la presencia de estas moléculas en el espermatozoide ha sido reportada y principalmente la espermina presenta un patrón de distribución en el espermatozoide de borrego similar al encontrado en este trabajo para la arginasa. Las poliaminas posiblemente participan en los procesos de movilidad espermática a través de la mediación de la fosforilación de la tubulina dependiente de AMPc entre otros procesos.

II. INTRODUCCIÓN.

Desde el año de 1894 Richet mencionaba la existencia de la actividad de arginasa (L-arginina amidinohidrolasa, E.C.3.5.3.1.), cuya función es catalizar la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea, Fig.1.; posteriormente fue descubierta por Kosel y Dakin en 1904. En principio, esta actividad se detectó en el hígado de los mamíferos, describiéndose como la enzima terminal del ciclo de la urea según H.A. Krebs en 1932 (1). En 1941 Vincent encontró actividad de arginasa en el suero sanguíneo humano (2), hecho que condujo a la medición de la actividad de esta enzima 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 en hígado. La función principal y mejor conocida de la arginasa es la que realiza dentro del ciclo de la urea, mecanismo que tiene lugar en el hígado de organismos ureotéticos (aquellos que excretan el nitrógeno amínico en forma de urea).(3).

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 los mamíferos y en otros sistemas vivientes (granos en germinación, levaduras, ciertos mohos y bacterias), lo que constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular. 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.(3).

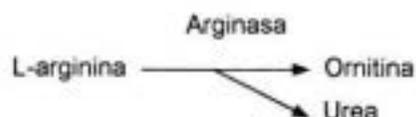


Fig. 1. Hidrólisis del aminoácido L-arginina catalizada por la arginasa.

III. GENERALIDADES.

La mayor parte de las propiedades de la arginasa se han estudiado en animales de experimentación. En las ratas se ha detectado la actividad de arginasa en el intestino delgado (18,19) el pulmón y el cerebro (20,21), la tiroides (22), el bazo, el corazón, la piel, el músculo esquelético y la glándula submaxilar (20), el páncreas (20-23), el riñón (23,24), la glándula mamaria lactante (25-27), el útero (28), etc. Las actividades de esta enzima en diferentes tejidos de rata se resumen en la tabla 1.

Como se puede apreciar, en el epidídimo de las ratas adultas existe una actividad de arginasa significativamente alta en comparación con otros tejidos (29). En los ratones la enzima se ha localizado en la epidermis (30), el cerebro (31) y otros tejidos.

Otros mamíferos en los que la actividad de la arginasa ha sido estudiada son los bovinos (34-39), las cabras (40), y los conejos (41).

En el humano se ha demostrado actividad de arginasa en el riñón (42), la placenta (43-44), la sangre (45), el corazón (46), los eritrocitos (47,48), los linfocitos y los granulocitos de leucémicos (49) en líneas de células tumorales en cultivo (50), en el suero, tanto en personas sanas (51,52), como en pacientes con enfermedades hepáticas (53-54), y otros padecimientos diversos (55,56,5,6).

En los animales, la arginasa existe en la fracción soluble del citoplasma y además en las diversas estructuras celulares: mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi, con grandes posibilidades de que también se encuentre en el núcleo de la célula. (4).

Tejidos normales	Arginasa (unidades/g de tejido)
Hígado	2545.0 356.0 (*)
Glándula submaxilar	170.0 15.0
Intestino delgado	129.0 21.0
Epidídimo	125.0 11.0
Páncreas	103.0 9.0
Duodeno	85.0 20.0
Riñón	56.5 7.0
Colon	7.0 5.7
Pulmón	5.4 1.9
Cerebro	2.5 0.5
Piel	1.8 0.3
Timo	1.9 (**)
Bazo	1.1. 0.2
Suprarenales	0.7 (**)
Corazón	0.6 0.03
Músculo esquelético	0.4 0.3

(*) S.D.

(**) Dato único

Tabla1. Actividad de arginasa en diferentes tejidos de la rata adulta (29).

Unidad.- Es la cantidad de enzima que puede convertir 1 μ mol de L-arginina a L-ornitina y urea por minuto a un pH de 9.5 a 37°C.

CARACTERÍSTICAS DE LA ARGINASA.

La arginasa del hígado de la rata tiene una estructura oligomérica, es un tetrámero que consiste en cuatro monómeros, cada uno de los cuales tiene un peso molecular de 30 000 a 40 000 daltones y un ión manganeso (Mn) íntimamente ligado (63).

Esta enzima hidroliza uniones C-N no peptídicas y tiene afinidad por el sustrato L-arginina, al cual convierte a L-ornitina y urea; pero no a los isómeros D-arginina y L-homoarginina. Los grupos carboxilo y guanidino libres de la molécula de arginina son necesarios para su actividad; un gran número de sustratos portadores de un resto guanidínico sustituido han sido ensayados para establecer la especificidad de la arginasa; los derivados monosustituídos no pueden ser sustratos de la arginasa sino cumplen la siguiente condición: Tener en el grupo guanidínico un radical NH libre y un carboxilo asociado a un grupo NH₂ o un OH en alfa. (9).

La arginasa es estabilizada por diversos iones metálicos como Mn, Co y Ni, y es inhibida por el Zn, EDTA, al igual que por ciertos aminoácidos como: lisina, ornitina, serina, etc. (4).

Los iones Cu⁺, Hg⁺ y Ag⁺ destruyen la actividad de la enzima en parte por precipitación de esta (10).

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

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

La evidencia indica que las isoenzimas son utilizadas para la dirección de metabolitos a lo largo de rutas metabólicas específicas (43). También pueden tener una determinada función catalítica conferida a una estructura o comportamiento celular. Desde su descubrimiento, estas moléculas han sido relacionadas con la diferenciación de tejidos (3). Por otra parte, se puede considerar la posibilidad de que algunas isoenzimas sean proteínas vestigiales, remanentes de la evolución genética (57).

En la tabla 2 se muestran algunas propiedades de las arginasas aisladas de diferentes fuentes.

La arginasa mejor caracterizada es la obtenida de hígado de rata. Esta enzima tienen un peso molecular de 120 000 daltones y un pH óptimo alrededor de 9.5.(27), tiene la propiedad de no ser fácilmente desnaturalizada por ácido, el tratamiento con EDTA ocasiona su inhibición por la remoción del Mn^{++} . La inhibición puede ser revertida con la adición de iones Mn^{++} (35).

El rango de pH óptimo para las isoenzimas de arginasa esta entre 9.3 a 10 en presencia de Mn o Co, mientras que cuando hay una mezcla de los dos iones es de 8.5 a 9.0 (4).

Su punto isoeléctrico es de 4.05 (58).

Animal	Tejido	P.M. (Da)	pH Optimo	Km arginina (mM)
Rata	Hígado	120 000	0-10.6 (59)	2.4 (59)
		142 000 (59)		6.8 (60)
Rata	Riñón	120 000(19)	7.5 y 9.3 (19)	18.00 (60)
Rata	Intestino	120 000 (19)	10 (19)	19.00 (19)
Caballo	Hígado	138 000 (57)	---	7.0 (61)
Conejo	Hígado	138 000 (47)	---	1.40 (47)
Oveja	Hígado	---	---	09-28(62)
Vaca	Hígado	115 000	9.5-10-5 (62)	10.80 (62)
		120 000 (62)		

Tabla 2. Comparación de algunas propiedades entre diferentes isoenzimas de la arginasa.

L-ARGININA.

La L-arginina o ácido alfa amino-gama guanidin-valeriánico, es un aminoácido diamino monocarboxílico, y entra dentro de la categoría de semi-indispensables para los mamíferos y las aves, ya que aún cuando lo sintetizan, no lo hacen en cantidades suficientes para cubrir todos los requerimientos del organismo, por lo que es necesario que lo ingieran en su dieta, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo para sostener la síntesis activa de proteínas y para la realización de múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos. Algunos estudios muestran que una dieta pobre en arginina ocasiona problemas en el crecimiento y en el hombre dificulta la espermatogénesis (4,59). Este aminoácido sigue varios destinos metabólicos por lo que sus niveles plasmáticos pueden detectarse bajos en un momento dado. Algunos órganos y tejidos pueden requerir de un mayor aporte de L-arginina por las funciones que desempeñan, tal es el caso del hígado y del páncreas (Fig.3).

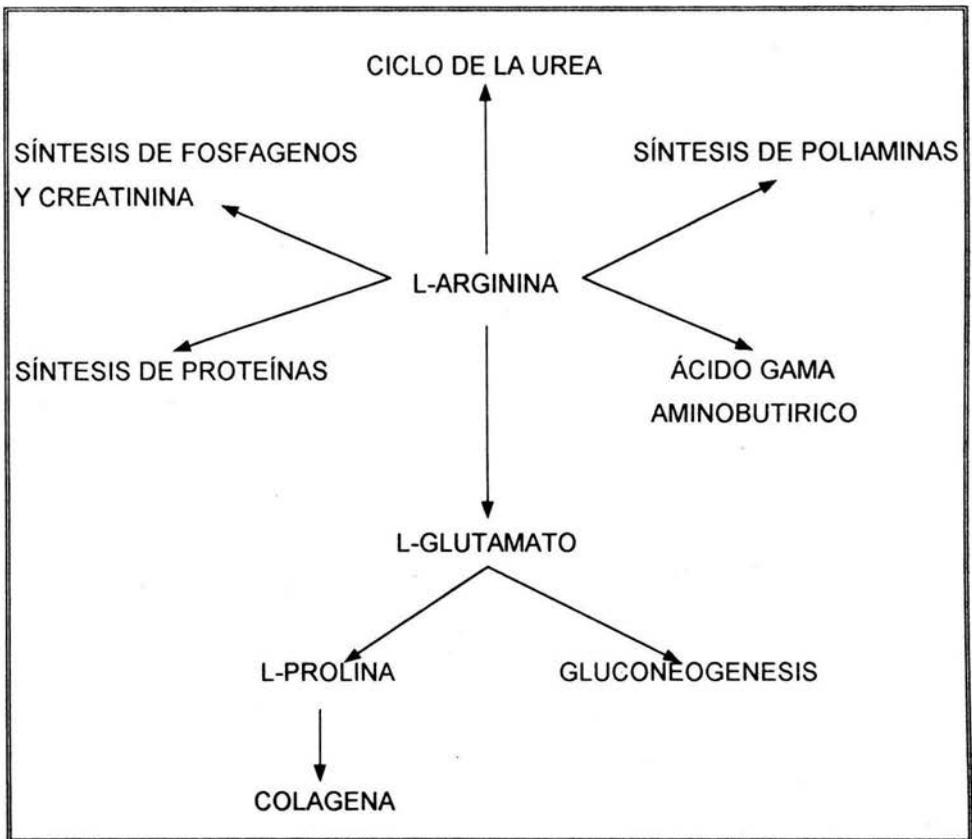


Fig.2 Diferentes vías metabólicas que sigue la L-arginina.

METABOLISMO DE L-ARGININA

El metabolismo de la arginina discurre por dos mecanismos esenciales, los cuales son a menudo complementarios.

1.- Hidrólisis enzimática. Que conduce a la formación de ornitina y urea. (Ciclo de la urea) (Fig. 4).

2.- Desaminación oxidativa. Que conserva el radical guanidínico y hace posible su utilización en la síntesis de creatina.

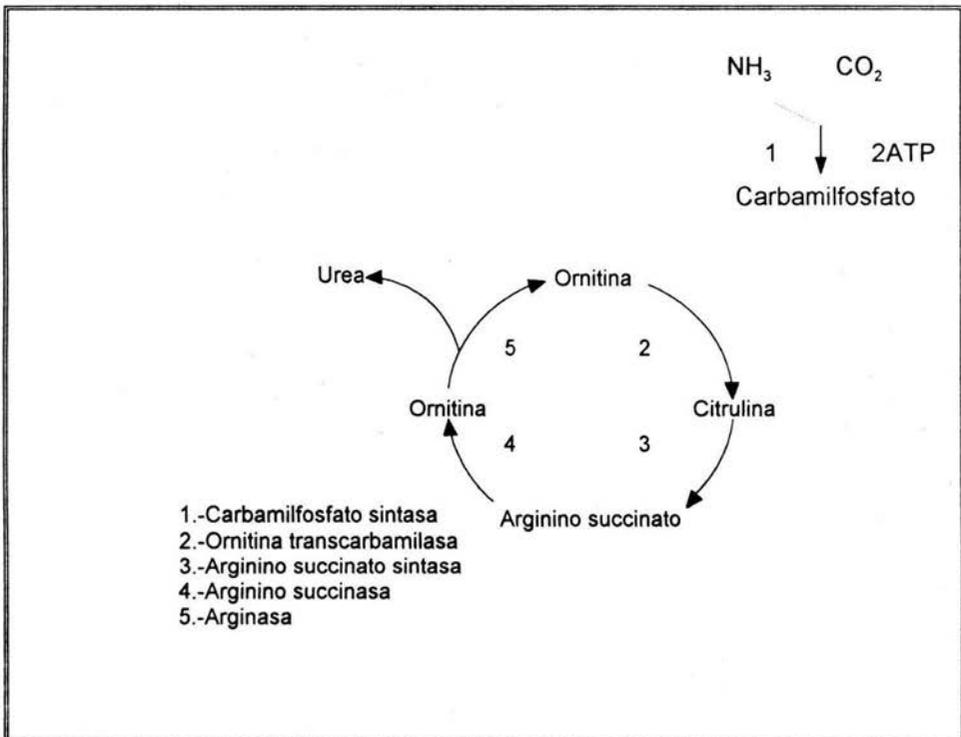


Figura 4. Ciclo de la urea y enzimas involucradas

ESPERMATOZOIDE.

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

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

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

Esta división celular, que reduce el contenido de cromosomas de las células a la mitad de las células somáticas, ocurre durante la espermatogénesis (63).

ESPERMATOGÉNESIS.

Como su nombre lo indica, este proceso significa la creación de los espermatozoides. Se inicia a partir de las espermatogonias, en realidad existen distintos tipos de estas células, las cuales solo pueden distinguirse por el aspecto de su núcleo. La espermatogonia de tipo A es de núcleo liso, la cual después de varias divisiones da lugar a células de núcleo costroso, denominadas espermatogonias de tipo B. La última mitosis de estas espermatogonias, da origen a los espermatoцитos primarios, los cuales sufren la división meiótica, después de la cual cada una de las células hijas conserva únicamente la mitad de los cromosomas de la célula madre.

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

Después de la división las células hijas toman el nombre de espermatocitos secundarios, cuya vida es muy efímera ya que dura apenas unas horas, dividiéndose posteriormente y dando lugar en la última de ellas a las espermátides. Estas células son las que finalmente sin división alguna, pero si a través de modificaciones y transformaciones morfológicas, dan lugar a los espermatozoides. Este paso se conoce con el nombre de espermiogénesis o espermioteliosis.

En el carnero se ha determinado que el lapso de tiempo transcurrido desde la primera división de los espermatocitos primarios, hasta la liberación de los espermatozoides es de aproximadamente 29 días y la espermiogénesis es de 14 a 18 días (58). Para determinar estos tiempos se han usado isótopos radioactivos para marcar el DNA, los más usados son el ^3H y el ^{14}C .

Las hormonas hipofisarias son las encargadas de actuar sobre el testículo a efecto de iniciar y mantener la espermatogénesis.

La hormona luteinizante (LH) estimula a las células de Leydig para que secreten testosterona, la cual estimula a los túbulos seminíferos y a las glándulas accesorias, para que produzcan el plasma seminal.

La hormona folículo estimulante (FSH) estimula a las células de Sertoli; ya que sin este estímulo no ocurre la transformación de espermátides en espermatozoides. Las células de Sertoli también secretan una proteína fijadora de andrógenos, que fija tanto testosterona como estrógenos y los pone a disposición del espermatozoide en maduración (3,58),(Fig. 5).

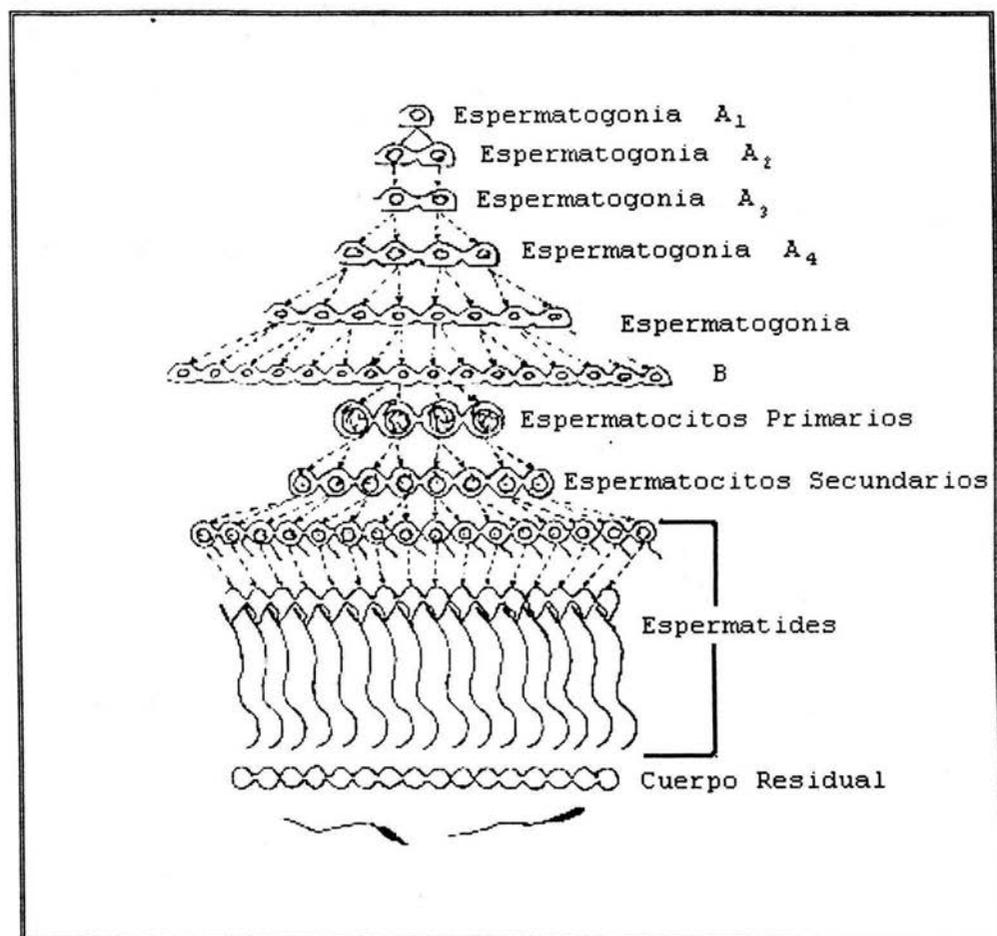


Fig. 5. Diagrama de la espermatogénesis del borrego (76)

TRANSPORTE A TRAVÉS DEL EPIDÍDIMO.

Los espermatozoides testiculares se transportan de los testículos a través de un conducto convoluto conocido como epidídimo. El cual, no solo transporta los espermatozoides distalmente desde los testículos hasta el vaso deferente, sino que durante dicho tránsito estos sufren un proceso de maduración en el cual obtienen la capacidad para sostener la movilidad y se vuelven fértiles. Además, este conducto funciona como almacén para estas células (63).

El paso de los espermatozoides a través del epidídimo depende de las contracciones realizadas en la pared del conducto. el tiempo de tránsito está en función de la especie, por ejemplo: en el conejo es de 1 día, de 6 a 8 en la rata, 11 días en el toro y 13 días en el carnero (3,63,64).

Anatómicamente el epidídimo se encuentra dividido en tres zonas: cabeza, cuerpo y cola.

Los espermatozoides inmaduros que provienen de los túbulos seminíferos suben por los vasos eferentes a la cabeza del epidídimo, para su maduración atraviesan el cuerpo hasta que llegan a la cola, en esta zona se encuentran los espermatozoides móviles y fértiles, los cuales junto con la secreción epididimal pasan a los vasos deferentes, en donde se mezclan con las secreciones de las glándulas accesorias (vesícula seminal, bulbouretrales y próstata), para de esta manera formar el semen, el cual es eyaculado durante el acto sexual (Fig. 6).

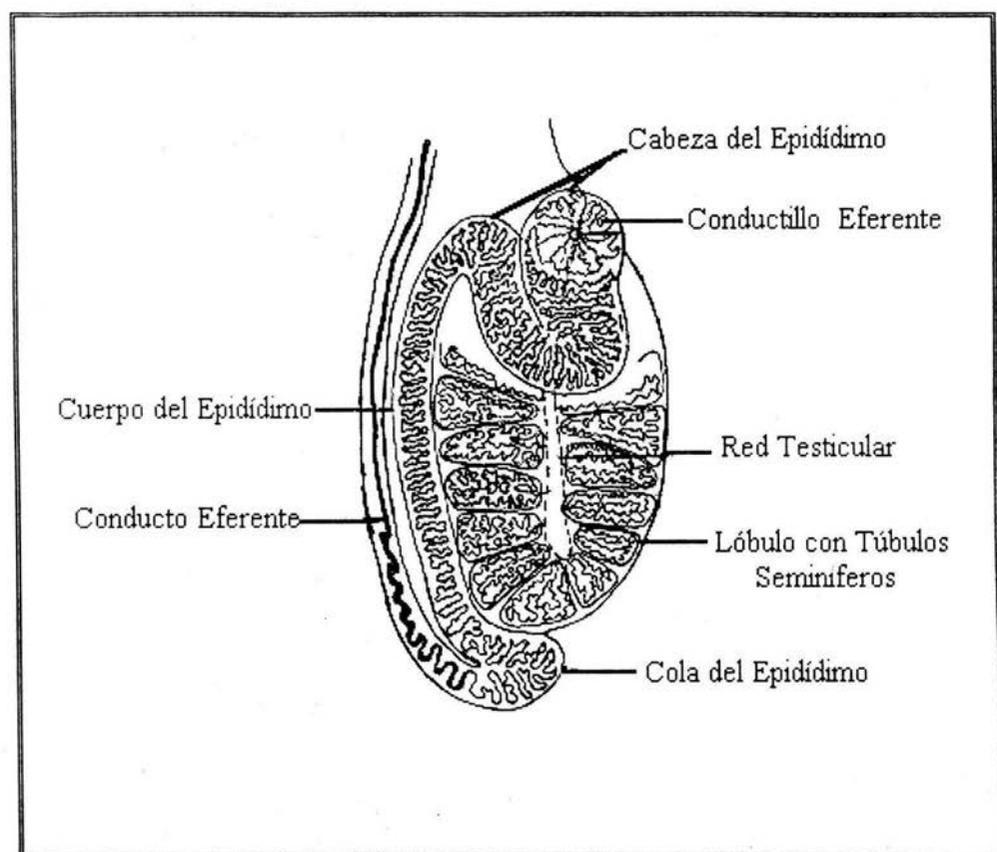


Fig. 6. Representación esquemática del epidídimo (76).

ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

Desde el punto de vista morfológico, el espermatozoide de mamíferos se divide en dos partes: cabeza y cola; ésta última a su vez se encuentra dividida en otras cuatro fracciones: cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal. Fig. 7

CABEZA

Esta formada por dos partes, el núcleo y el acrosoma.

El núcleo tiene forma oval y aplanada, contiene cromatina altamente compactada, que esta protegida por una membrana, se compone casi totalmente de DNA completándose con proteínas nucleares específicas llamadas histonas. El número de cromosomas de estas células es la mitad del de las células somáticas de la misma especie.

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

COLA

La cola es el elemento locomotriz por excelencia.

a) Cuello. Tiene un micrómetro de largo, y contiene al centriolo proximal. En su unión con la cabeza se originan 20 minúsculas fibras (filamento axial) que se agrupan formando dos anillos concéntricos de nueve fibras cada uno, que envuelven a su vez otras dos fibras centrales que se prolongan hasta la pieza final y le dan estructura formando el verdadero esqueleto de la cola. Las dos fibras centrales se prolongan aún más y terminan en la pieza final. El relajamiento y la contracción de estas fibras es lo que produce el característico movimiento de látigo que permite el avance de la célula.

b) Pieza media. Tiene de 8 a 10 micrometros de largo y esta constituida por el filamento axial, teniendo cerca de su unió n con la pieza principal el centriolo terminal, al que se le atribuye la funció n de coordinar la secuencia de contracciones de sus fibrillas.

El filamento axial en su recorrido a travé s de la pieza media esta envuelto por una banda espiral doble, que bien pudiera significar la fuente de energí a para la movilidad de las fibras. En la pieza media se encuentran las mitocondrias, las cuales contienen el sistema enzimático oxidativo necesario para producir ATP que es utilizado para obtener energí a para la movilidad.

c) Pieza principal. Esta formada por las 20 fibras del filamento axial (cada vez más finas) y rodeada a partir del centriolo terminal por una triple banda en espiral. Todo el filamento axial, desde el cuello hasta la pieza terminal esta encerrado en una vaina de naturaleza lipoproteí ca. La pieza terminal esta integrada solamente por las fibras sin banda espiral y sin vaina (76).

La presencia de actividad de arginasa en el espermatozoide ha sido detectada por varios autores (37), pero hasta el momento no se ha realizado ningún trabajo para determinar su ubicació n en estas células.

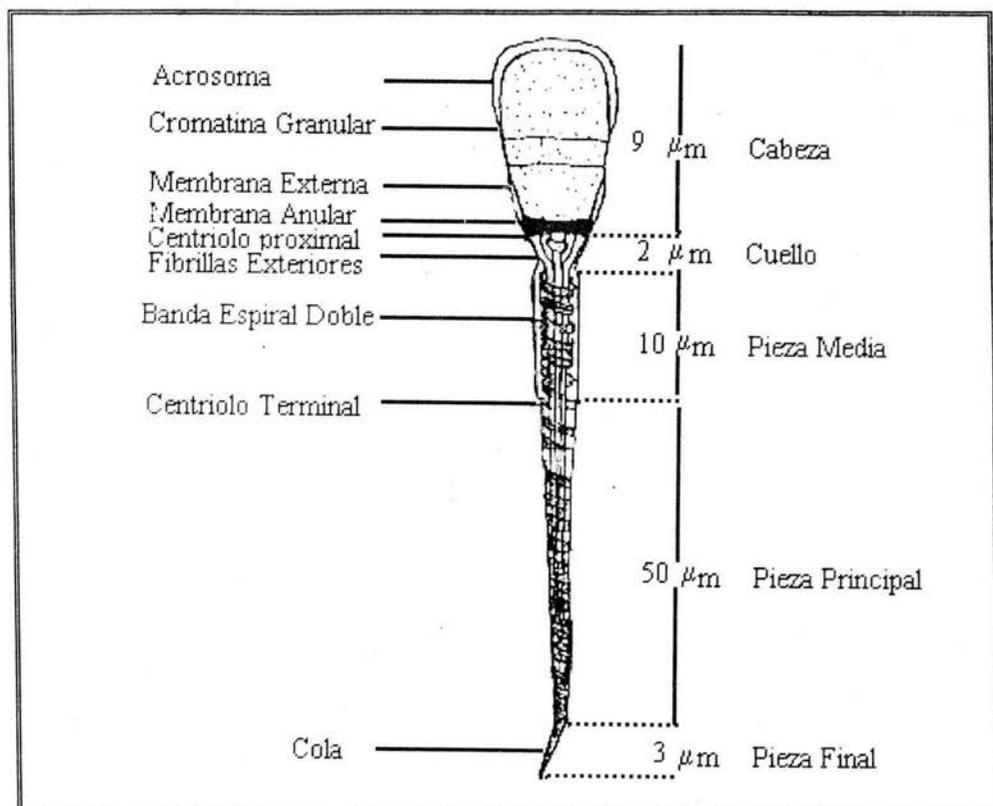


Fig. 7. Representación esquemática de un espermatozoide.(76).

IV. ANTECEDENTES.

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, la 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 aún quintuplicando las dosis de estrógenos (0.05 a 0.25 $\mu\text{g/Kg}$ de peso).

Por otra parte, en 1944, Holt y col., reportaron que una dieta pobre en L-arginina disminuye la espermatogénesis en ratas adultas.(4). Posteriormente se demostró que el plasma seminal de pacientes con espermograma patológico contiene menos L-arginina en comparación con el de pacientes normospermicos (aquellos que tienen movilidad y cuenta espermática normal) (5-11). Estas observaciones condujeron a otros investigadores a tratar algunos problemas de fertilidad con L-arginina.

En 1973, Schachter y col. (12), 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 las células espermáticas.

La L-arginina (0.004 mM) estimula la movilidad de los espermatozoides eyaculados humanos.(13). También se ha demostrado que en espermatozoides eyaculados de conejo, esta estimulación depende de la concentración, tiempo de incubación y pH, ya que un aumento máximo del 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.(14).

ARGINASA Y POLIAMINAS.

Como ya se ha mencionado la arginasa es la enzima terminal del ciclo de la urea, y su función es catalizar la hidrólisis del aminoácido L-arginina a L-ornitina y urea. La ornitina formada es el precursor de la síntesis de poliaminas. Fig. 2.

Las poliaminas son cationes polivalentes presentes tanto en procariontes como en eucariontes y pueden encontrarse en forma de bases alifáticas libres o conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos o como subunidades estructurales dentro de numerosas familias de alcaloides. (3).

Su presencia ha sido demostrada en múltiples sistemas celulares que van desde bacterias hasta diferentes tejidos de mamíferos en donde desempeñan funciones específicas. Diversos estudios han demostrado que las poliaminas intervienen en la regulación de múltiples procesos celulares entre los que destacan la diferenciación, la división y la proliferación celular. También pueden interactuar con ácidos nucleicos donde estabilizan la estructura secundaria del DNA y lo protegen de la desnaturalización térmica y de la degradación enzimática.

En biología de la reproducción las poliaminas han sido estudiadas tanto en machos como en hembras, y se ha visto que hay una correlación entre los niveles de estos compuestos y la movilidad espermática. White reportó que la adición de fosfato de espermina a espermatozoides eyaculados de conejo incrementó su movilidad (15)., Tabor presenta los mismos resultados para espermatozoides del cuyo, de la rata, del ratón y del conejo (16)., Morton menciona que la espermina amplifica la movilidad inducida por calcio y AMPc. (17).

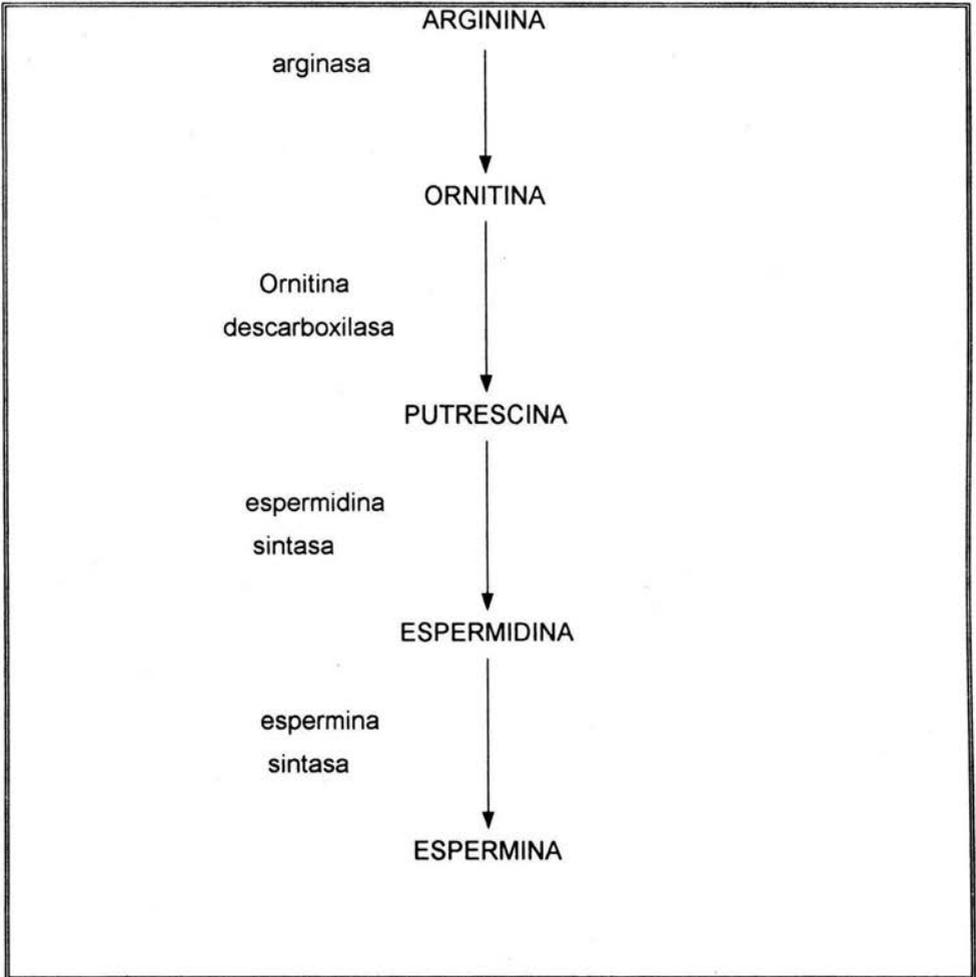


Fig. 2. Biosíntesis de poliaminas.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

De acuerdo con los estudios realizados por Kelle y Polakoski (13) y Radany y Atherton (14), la L-arginina estimula la movilidad de los espermatozoides eyaculados de humano y de conejo. Además de que interviene en otros procesos reproductivos tanto de hembras como de machos (4,10-14).

En tejidos diferentes al hepático la arginasa hidrolisa a la L-arginina y la convierte en L-ornitina y urea, la ornitina resultante es empleada por la ornitina descarboxilasa (ODC) para la síntesis de poliaminas, las cuales han sido detectadas en el espermatozoide de borrego y aunque se desconoce su función específica se han relacionado con la movilidad espermática inducida por el calcio y el AMPc "in vitro" (15-17).

Dada la importancia que tiene la arginasa en el metabolismo de la L-arginina, consideramos importante estudiar las propiedades de esta enzima en las células espermáticas del borrego, por lo que se propuso estudiar su distribución por métodos inmunocitoquímicos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se trabajo con testículos de borrego obtenidos del rastro de Tlalnepantla, los cuales fueron transportados en hielo hasta el laboratorio donde se procesaron (aproximadamente 60 minutos después de la castración).

Se extrajo el epidídimo y se secciono en tres fracciones: cabeza, cuerpo y cola. Cada fracción se macero con amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4, y posteriormente se filtro con gasas, la suspensión obtenida fue analizada con el microscopio para verificar que no estuviera contaminada con otras células que no fueran espermatozoides.

Se realizó el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer empleando una dilución de 1:200 (Ver fig. 8). Una vez establecida la cantidad de células con las que se contaba, se tomaron alícuotas de 10 millones de células para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry (64), que consiste en:

Los 10 millones de células se resuspendieron en 0.5 ml. de NaOH 1M y se incubaron 30 minutos a 37°C. Se tomaron 0.2 ml de esta solución y se completaron a 0.5 ml. con agua destilada, se añadieron 2 ml. de solución cuproalcalina se mezclaron y se dejó reposar 10 minutos, después se agregaron 0.2 ml del reactivo de folin-ciocalteau, se mezclo y se dejó reposar 20 minutos, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm y se leyeron en un espectrofotómetro a 550 nm (Ver fig. 11).

Para determinar la actividad de arginasa se utilizó el método de Kung y col., (30), el cual se basa en un método colorimétrico que mide la cantidad de urea formada:

Los 10 millones de células se resuspendieron en 500 μ l de amortiguador de arginasa (MnCl₂ 0.02M, Tris 0.04M y NaCl 0.9%), se incubaron 1 hora a 55°C y se añadió 0.1 ml de arginina 0.14M- glicina 0.15 M y se mantuvieron 15 minutos a 37°C, posteriormente se introdujeron las muestras en agua hirviendo durante 7 minutos para detener la reacción.

Se tomaron alícuotas de 0.1 ml y se completaron a 1ml. con agua destilada, se añadió 1 ml. de monoxima-tiozemicarbazida y 2 ml. de $H_2SO_4/FeCl_2$ y se incubaron 25 minutos a $95^\circ C$, las muestras fueron leídas a 530 nm en un espectrofotómetro (Ver fig. 10).

El aislamiento de arginasa se realizó de acuerdo el método de Schimke (59):

Al resto de las células obtenidas, se les agrego amortiguador 1 ($MnCl_2$ 0.2M, Tris HCl 0.04 M y NaCl 0.9% pH 7.2) y se homogenizaron con 6 pulsos de 15 segundos cada uno en un homogenizador PCU Polytron. El homogenizado se centrifugo a 10 000 rpm 15 minutos y se recupero el sobrenadante al cual se le agregaron 4 volúmenes de acetona a $4^\circ C$ para precipitar las proteínas; después de 12 horas esta mezcla se centrifugo y se recupero el sobrenadante, el cual fue resuspendido en amortiguador 2 (Tris HCl 0.01 M, $MnCl_2$ 0.01 M pH 7.5), y se dejo en agitación moderada para tratar de disolver todo el precipitado, posteriormente se centrifugo a 10 000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue dializado 24 horas en amortiguador 2, el dializado se incubo 30 minutos a $60^\circ C$ para desnaturalizar algunas proteínas contaminantes y finalmente fue liofilizado. El liofilizado se resuspendio en amortiguador 1 y se utilizo para determinar concentración de proteínas (Lowry, 64), actividad de arginasa (Kung, 30) así como pH, temperatura y tiempo óptimo donde se alcanza la máxima actividad. (Ver fig. 9).

El pH óptimo para la incubación se determino modificando el pH del amortiguador de arginasa con NaOH 1M y siguiendo el método de Kung (30). La temperatura y el tiempo de incubación en donde se presento la máxima actividad se obtuvieron incubando las muestras a diferentes temperaturas y a diferentes tiempos cuando se agregaba el amortiguador de arginasa al liofilizado y continuando con el método de Kung (30).

Debido a que la cantidad de arginasa obtenida por este método era muy pequeña, y a la dificultad para conseguir las muestras en el rastro, la producción de anticuerpos anti-arginasa se realizó con arginasa comercial marca Sigma, siguiendo el cuadro de inmunización que se describe a continuación:

La primera dosis fue de 2mg/ml de arginasa disuelta en solución salina estéril combinada con adyuvante completo de Freud (ACF) 1:1, y se aplicó vía subcutánea en sitios múltiples; a los 15 días se repitió la dosis de 2mg/ml en solución salina y adyuvante incompleto de Freud (AIF) 1:1 vía subcutánea en sitios múltiples; al día 30 se aplicó la tercera dosis de 500µg/500µl de solución salina vía intravenosa. Al día 38 se realizó un sangrado del conejo para medir el título de anticuerpos por el método de ELISA (65) de la siguiente forma:

Se estabilizaron las placas con 20 µg de arginasa comercial marca sigma diluida en 100µl de amortiguador de carbonatos pH 9.5 por cada pozo, se incubaron una hora a 37°C y toda la noche a 4°C, se realizaron 4 lavados con PBS-tween 20 al 0.1% entre cada uno de los pasos y se bloquearon con PBS-leche sveltas al 5% durante una hora a 37°C, se agregó el anticuerpo anti-arginasa de hígado de bovino en diferentes diluciones en solución de bloqueo incubándose 90 minutos a 37°C, se lavó y se agregó el segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa en una dilución 1:5000 y se incubó 90 minutos a 37°C se lavó y se agregó el sustrato que consistía en 6mg de ortofenildiamina disueltos en 12ml de amortiguador de citratos pH 5.6 más 10µl de H₂O₂; para detener la reacción se utilizó H₂SO₄ 2.5N a los 10 minutos aproximadamente y se leyeron a 490nm.

Al día 70 se realizó un refuerzo de la inmunización aplicando 250µg/250µl de solución salina vía intravenosa, finalmente la última dosis se aplicó a los 124 días de la primera dosis, y se aplicaron 125µg/125µl de solución salina vía intravenosa. El conejo fue sangrado hasta blanco 8 días después de la última inmunización. (Ver fig. 12).

Con el suero obtenido se realizaron las localizaciones inmunocitoquímicas de la siguiente forma:

Se obtuvieron espermatozoides de borrego frescos, de la forma que se describió anteriormente; las células se fijaron en formaldehído al 3% por 1 hora y se lavaron tres veces entre cada uno de los pasos con PBS y se incubaron 20 minutos con PBS-cloruro de amonio 0.05%, se lavaron, y se inactivo la peroxidasa endógena con etanol-HCl 0.074%, la permeabilización con acetona a -20°C se realizó por 20 minutos, finalmente fueron lavadas tres veces con PBS y 2 veces más con agua destilada para preparar los frotis, los cuales se bloquearon con PBS-albúmina 1% por 1 hora para evitar uniones inespecíficas, se lavaron y se aplicó el anticuerpo anti-arginasa de hígado de bovino obtenido del conejo, diluido en PBS-albúmina 1% en dilución 1:50 y se incubó 12 horas a 4°C en cámara húmeda; se lavaron, y se agregó el conjugado que contenía el segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa en una dilución 1:500 en PBS-albúmina 1%, las laminillas fueron incubadas 12 horas a 4°C en cámara húmeda y se lavaron. Se adicionó el sustrato para revelar las laminillas que se preparó de la siguiente manera:

Solución A: 20 mg de diaminobenzidina (DAB) en 100 ml de PBS diluido 1:3 con agua destilada.

Solución B: 30 mg de $NiCl_2$ + 30 mg de $CoCl_2$ en 3 ml de agua destilada.

Solución C: Se mezclan las soluciones A y B gota a gota en agitación y se filtran, se agregan 500 μ l de H_2O_2 al 30% diluido al 1% en agua destilada.

El lavado se realizó cuando empezó a aparecer el precipitado oscuro. Finalmente las laminillas se montaron con PBS- glicerol 1:1 y se revisaron al microscopio. (Ver fig. 13).

Para comprobar la especificidad de la reacción obtenida, se realizó una electroforesis y un "western blot" utilizando muestras de espermatozoides de la cabeza, del cuerpo y de la cola del epidídimo de borrego de acuerdo al siguiente método:

Se realizó un conteo de las células y por cada 100 millones se agregó 1 ml del cóctel de inhibidores de proteasas que contenía (NEM, E-64, leupeptina, pepstatina, 1-10 fenantrolina, PMSF y ácido yodoacético), más 100 μ l de SDS al 10% y se hirvieron 10 minutos y se congelaron en hielo seco-acetona 3 veces, posteriormente se homogenizaron con 6 pulsos de 15 segundos cada uno en un homogenizador PCU-Polytron y se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm, recuperándose el sobrendante. Se realizó una cuantificación de proteínas por el método de Lowry (64). Posteriormente se corrieron dos geles de poliacrilamida al 10% de acuerdo al método de Laemli (66), aplicando 40 μ g de proteínas de cada una de las fracciones del epidídimo en cada carril. Un gel fue teñido con azul de Coomassie y el otro se transfirió a papel de nitrocelulosa y se realizó un "western blot" siguiendo el método de Towbin y col. (67). El papel fue teñido con rojo de Ponceau para comprobar la transferencia y se enjuagó con agua corriente, se bloqueó con 50 ml de PBS-suero fetal de cabra al 5% durante dos horas en agitación a 37°C y durante toda la noche a 4°C, se agregó el anticuerpo anti-arginasa en una dilución de 1:100 en solución de bloqueo y se incubó toda la noche en agitación a 37°C, se lavó 4 veces 10 minutos cada vez con PBS-tween 20 al 1% y dos veces más con PBS solo, se añadió el segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa diluido en solución de bloqueo 1:1000 y se incubó en agitación 2 horas a 37°C, se lavó igual que en el paso anterior y se agregó el sustrato que consistía en 5mg de diaminobenzidina disueltos en 10 ml de PBS más 10 μ l de H₂O₂ y se lavó al chorro de agua cuando apareció la tinción.

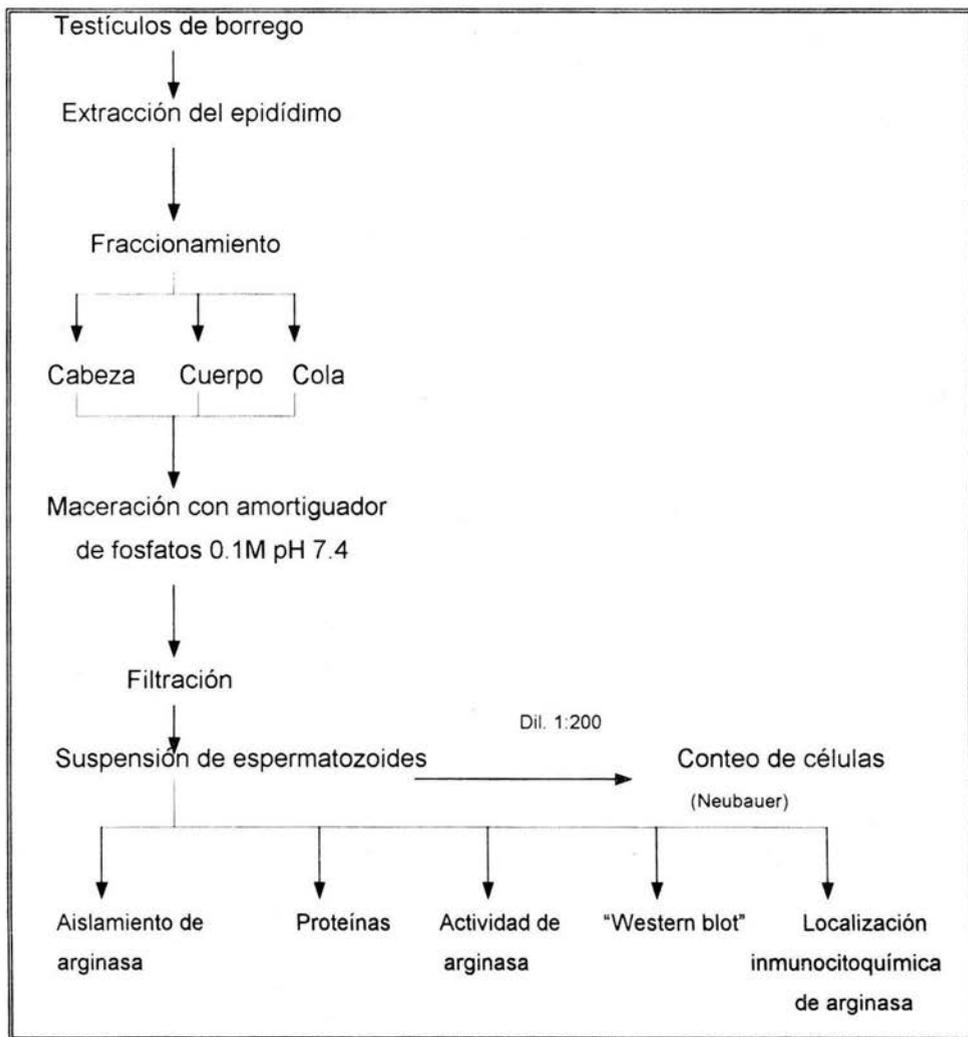


Fig. 8 Diagrama para la obtención de espermatozoides epididimarios.

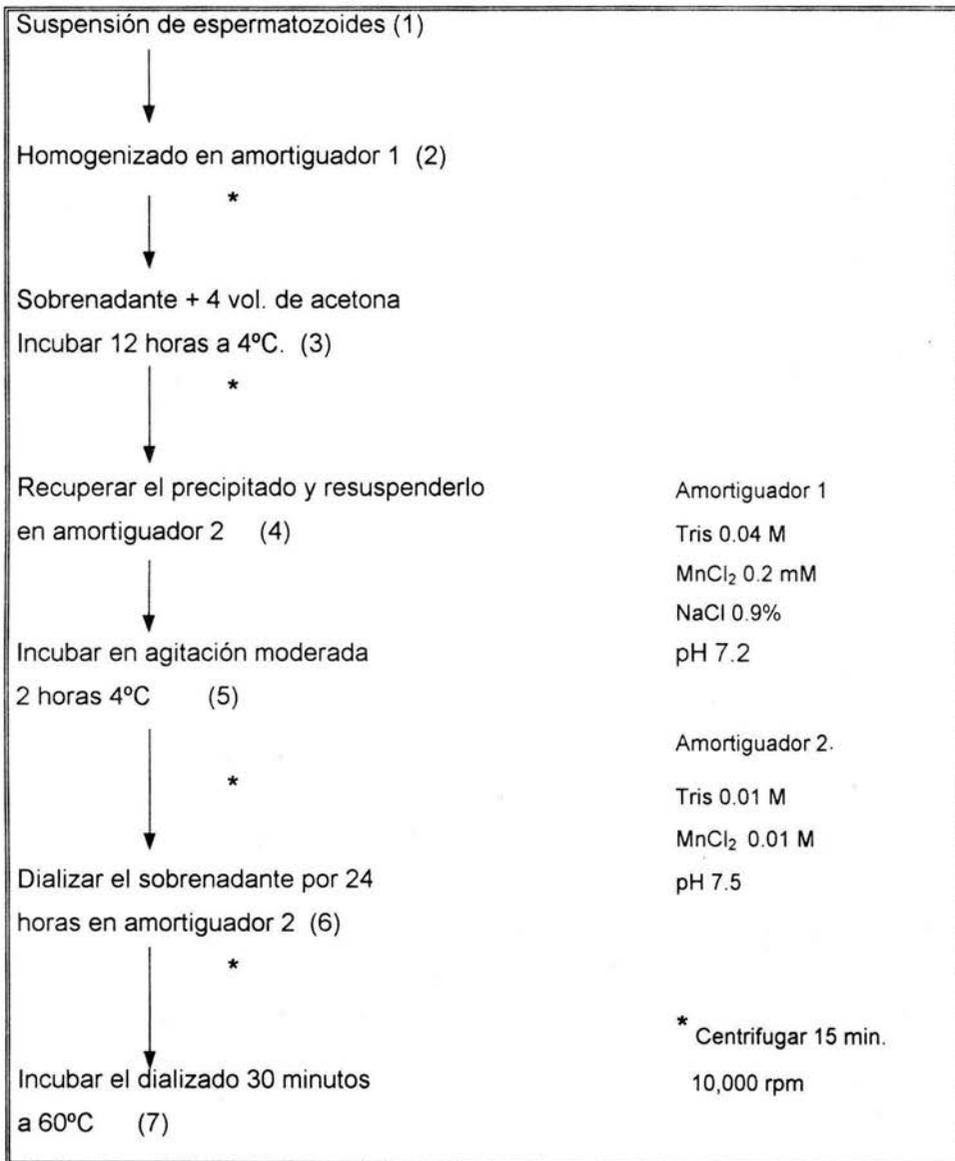


Fig 9. Diagrama para el aislamiento de la arginasa de espermatozoides de borrego de acuerdo al método de Schimke (59).

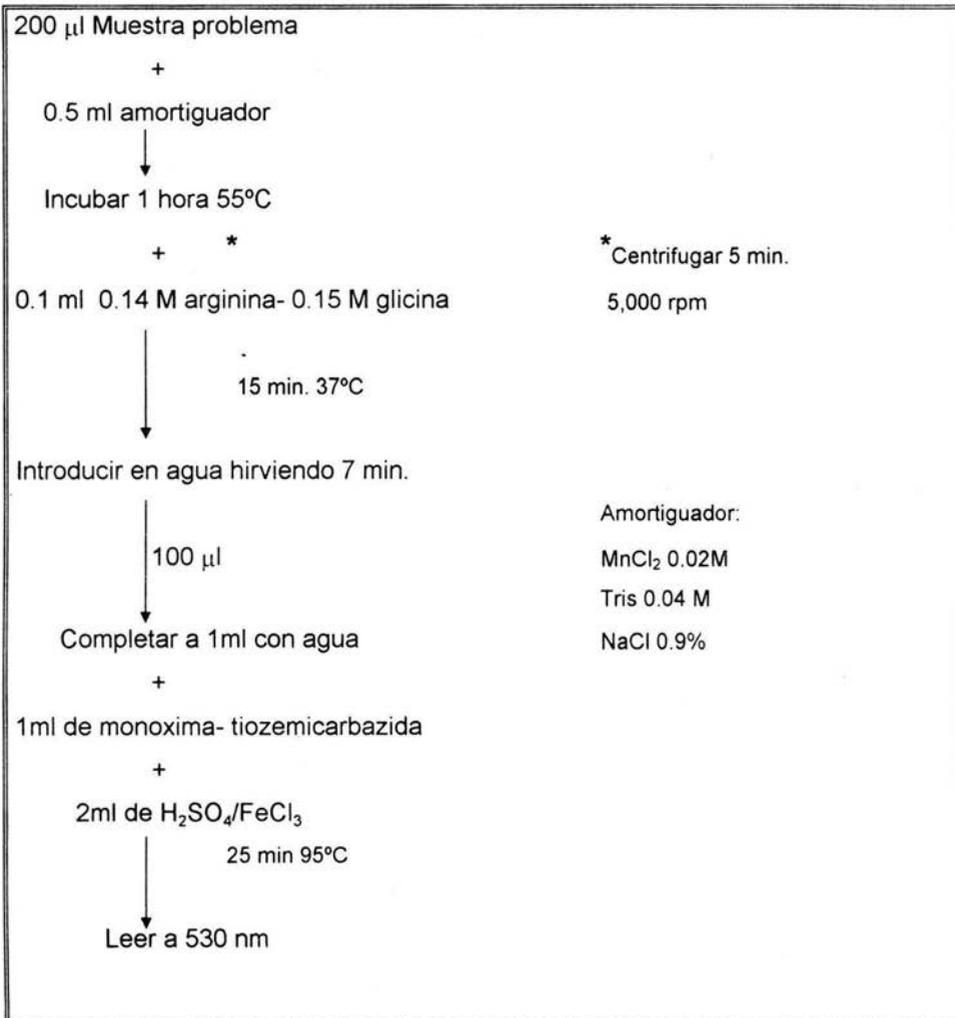


Fig. 10. Determinación de arginasa por el método de Kung y col. (30).

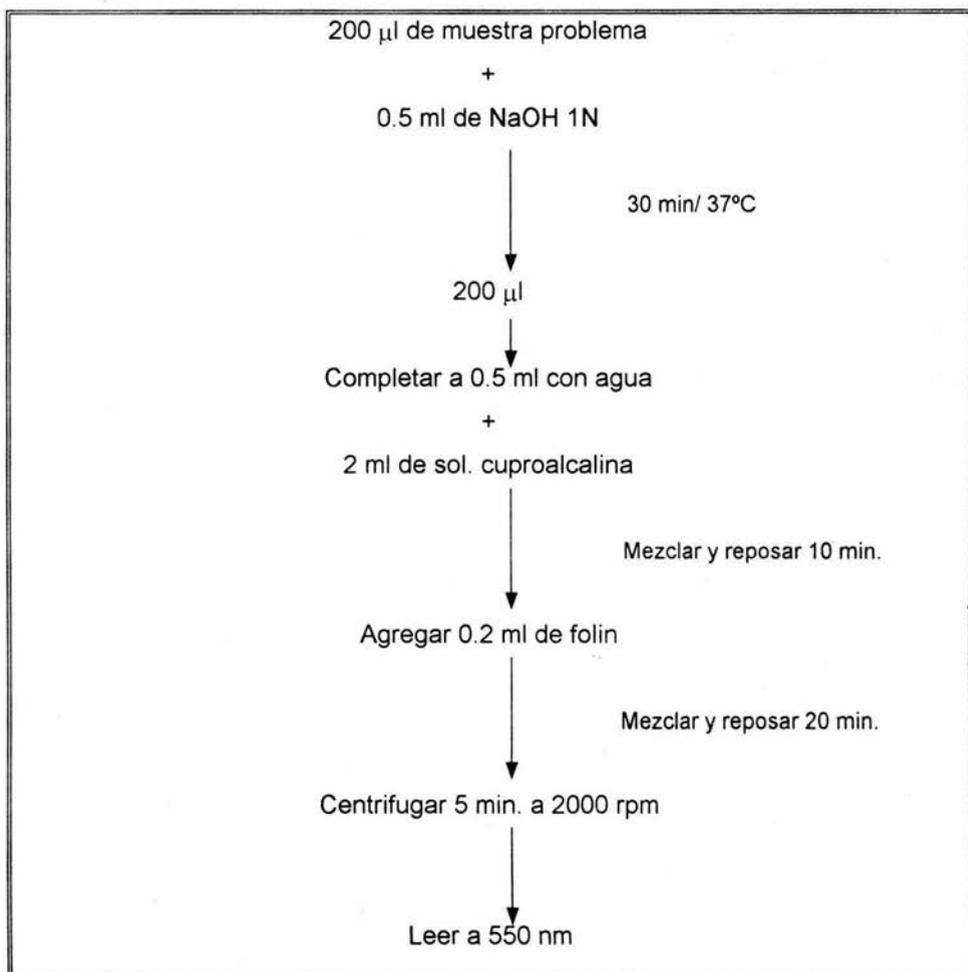


Fig. 11. Determinación de proteínas por el método de Lowry (64).

INMUNIZACIÓN N	FORMA DE APLICACIÓN	DOSIS	DÍA
1	Subcutánea en sitios múltiples	2 mg/ml con adyuvante completo de Freud	0
2	Subcutánea en sitios múltiples	2 mg/ml con adyuvante incompleto de Freud	15
3	Intravenosa	500 μ g/500 μ l	30
4	Intravenosa	250 μ g/250 μ l	70
5	Intravenosa	125 μ g/125 μ l	124

Tabla 3. Cuadro de inmunización para la producción de anticuerpos anti-arginasa de borrego.

La proteína se disolvió en solución salina estéril.

El título de anticuerpos obtenidos fue medido por la técnica de ELISA (65).

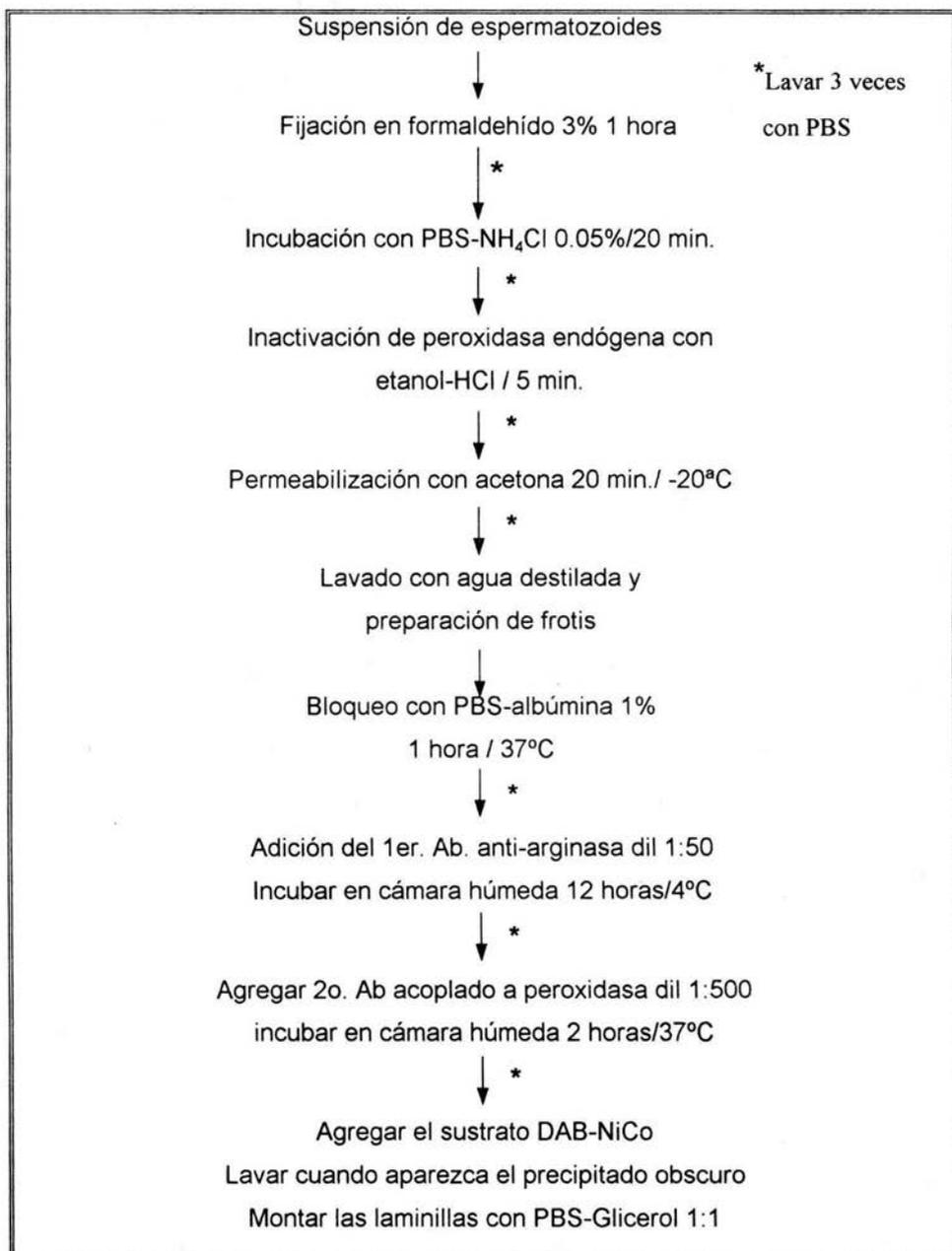


Fig. 12. Localización inmunocitoquímica de la arginasa de espermatozoides de borrego.

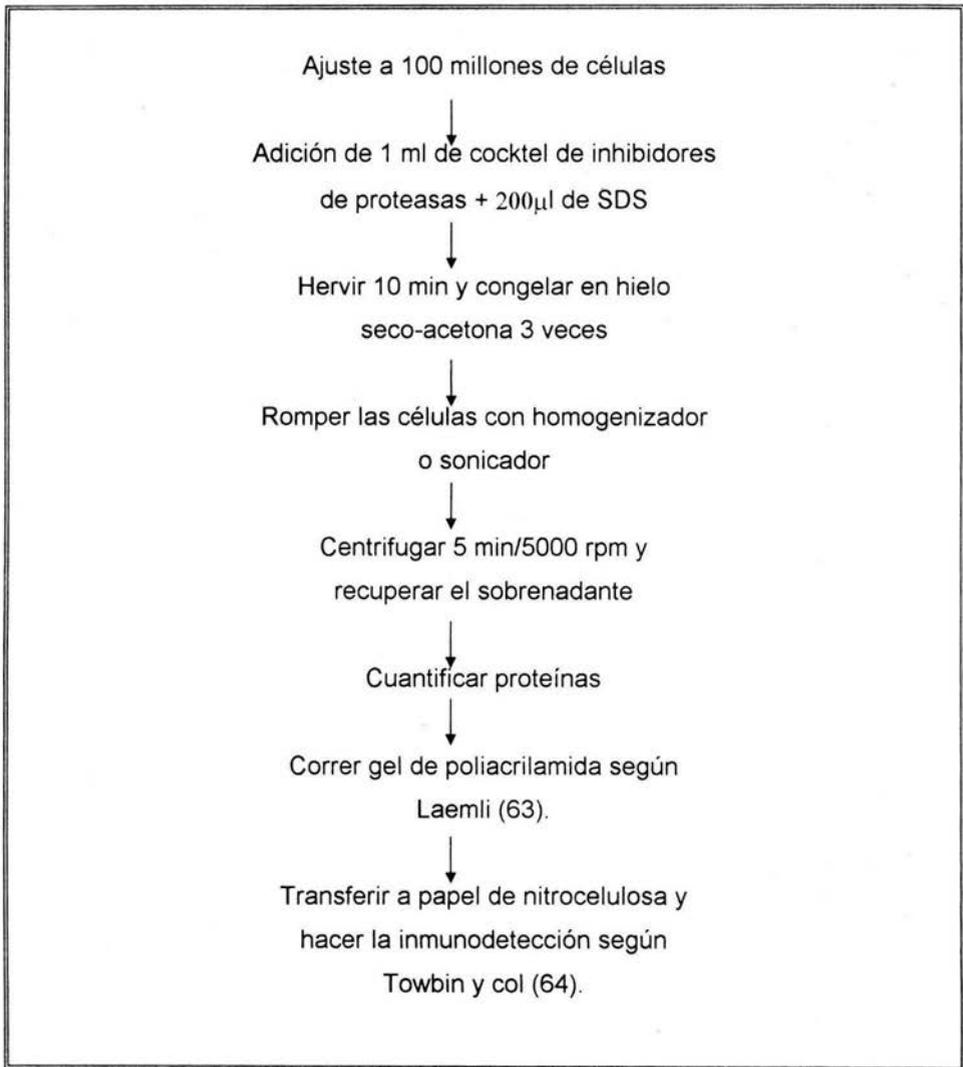


Fig. 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de proteínas de espermatozoides de borrego.

VII. RESULTADOS.

En la tabla no. 4 se presentan los resultados de la cantidad de proteínas totales y actividad específica de arginasa durante la purificación de la enzima, los cuales muestran que conforme se avanza en el proceso de purificación hay una disminución en el contenido de proteínas, debido a que la mayoría de ellas se pierden, mientras que la actividad específica de arginasa aumenta. Estos parámetros fueron cuantificados como controles con el fin de seguir la purificación de la arginasa de espermatozoides de epidídimo de borrego.

En la tabla no. 5 y en la figura 15. se presentan algunas características de la arginasa de espermatozoides de borrego, como son: pH óptimo, tiempo y temperatura óptimos de incubación para la activación de la enzima. Respecto al pH óptimo la máxima actividad se observó en pH 10, este resultado es similar a los datos reportados para otras isoenzimas, así como los resultados obtenidos para la temperatura de incubación donde se obtuvo la máxima actividad de la enzima (2.58,63). Solo el tiempo de incubación en presencia de manganeso para la arginasa de espermatozoides de borrego, difiere con los datos reportados para otras isoenzimas (2).

En la figura 16 se muestra el título de anticuerpos anti-arginasa de hígado de bovino, cuantificados por la técnica de ELISA, observándose una mayor concentración de anticuerpos en el suero obtenido después de la inmunización que en el suero antes de inmunizar.

La fig. 17 Es un electroferograma (A-E) de la arginasa comercial (Sigma) y de un extracto crudo de proteínas de espermatozoides de la cabeza, del cuerpo y de la cola del epidídimo, las flechas indican las bandas que coinciden con el peso molecular reportado para la arginasa. También se muestran los "western blots" (F-H) realizados para las mismas muestras, donde se aprecia una reacción positiva con el anticuerpo anti-arginasa para las muestras de la cabeza y se la cola del epidídimo, la tinción obtenida para las muestras del cuerpo fue muy débil.

En las figuras, 18, 19 y 20 se muestran las inmunolocalizaciones de la arginasa en los espermatozoides de la cabeza, del cuerpo y de la cola del epidídimo del borrego. En la muestra de la cabeza la tinción se observa principalmente en el acrosoma y la región ecuatorial. En las muestras del cuerpo la tinción permanece en el acrosoma y se pierde en la región ecuatorial. Y en las muestras de la cola del epidídimo, se observan diferentes patrones de distribución en la cabeza, se presenta en el acrosoma 20%, región posacrosomal 10% y en casi toda la cabeza pero principalmente en la base 70%. La tinción en la pieza media y en el flagelo se conserva en las muestras de las tres fracciones del epidídimo.

En la figura 21 se presentan esquemas con los patrones de distribución más frecuentes para las tres regiones del epidídimo.

PASO	PROTEÍNA TOTAL (μg)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μg urea/mg de proteína/minuto)
Homogeneizado (2) *	0.5925	0.6061
Sobrenadante (6) *	0.3428	0.8661
Sobrenadante dializado y tratado con calor (7) *	0.0052	904.8653

Tabla 4. Aislamiento de arginasa de espermatozoides epididimarios de borrego por el método de Schimke (59), donde se observa una disminución del contenido de proteínas totales y un aumento en la actividad específica de la arginasa conforme se avanza en el proceso.

* Vase la fig. 9.

Peso molecular	63 095 daltones
pH óptimo	9.5-10.5
Temperatura de incubación donde se obtuvo la máxima actividad	55°C
Tiempo de incubación en presencia de manganeso para que se alcance la máxima actividad	50-70 minutos

Tabla 5. Características de la arginasa de espermatozoides epidídimarios de borrego.

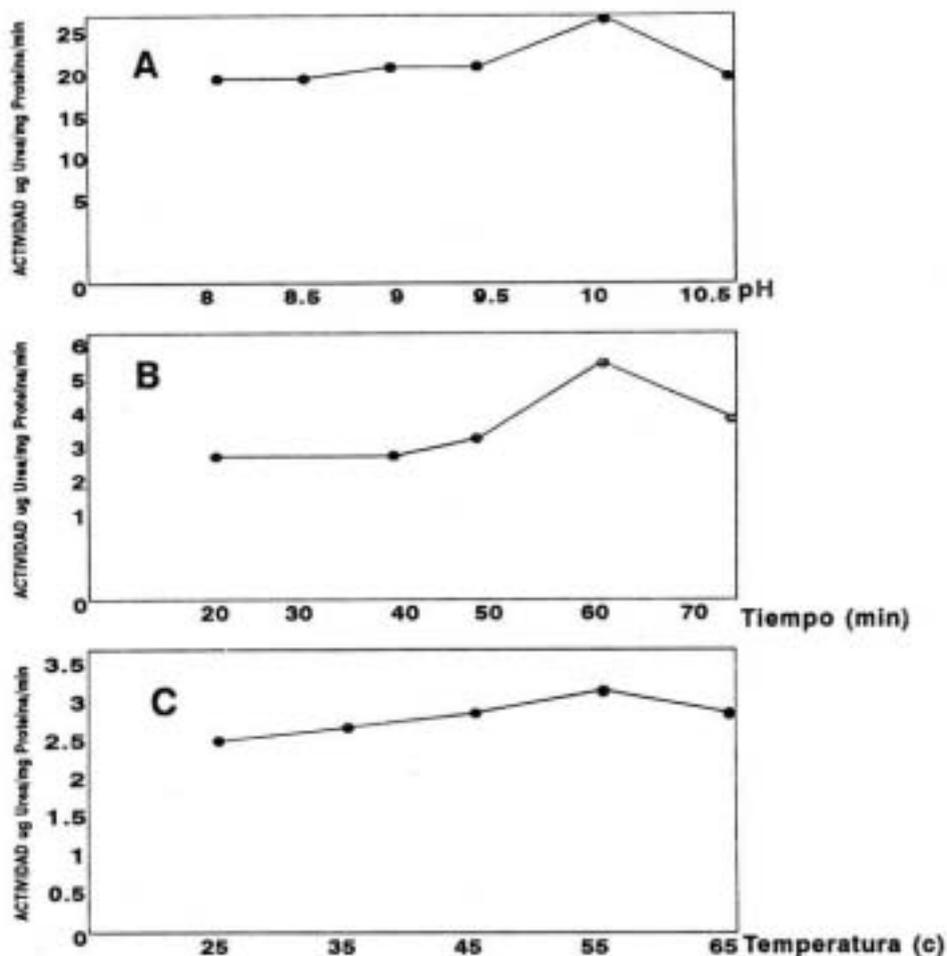
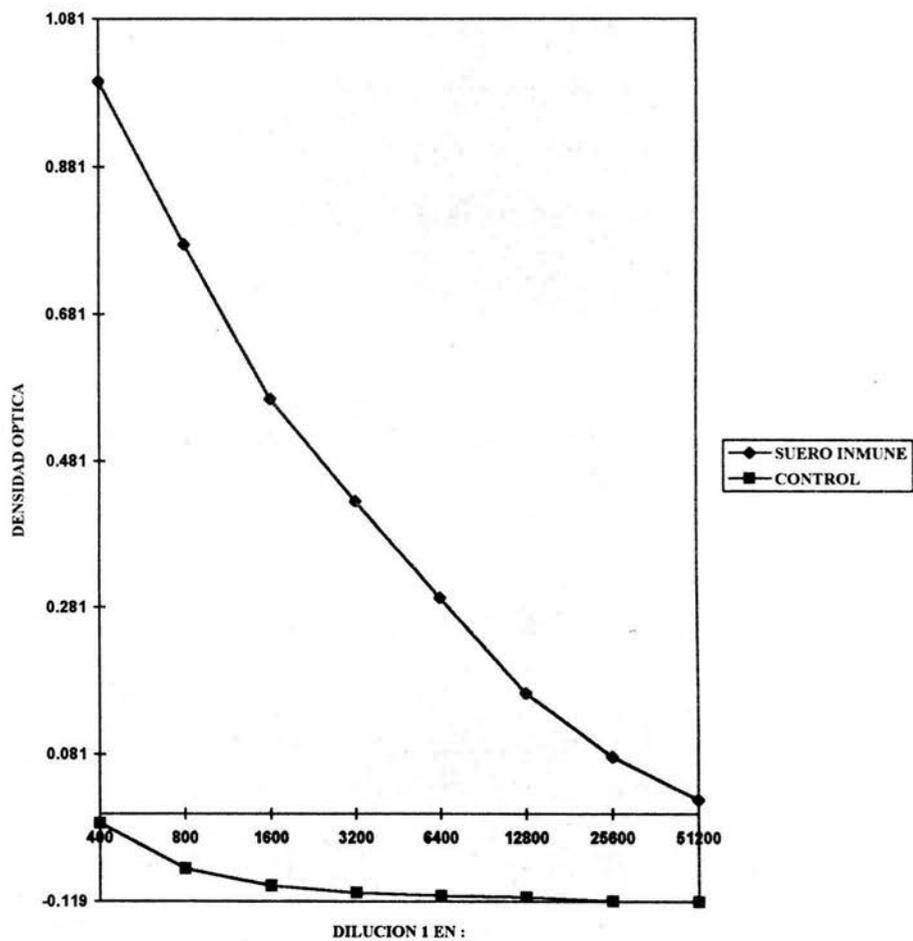


Fig. 15. Presenta las gráficas de características de la arginasa de espermatozoides epididimarios de borrego. A) El pH óptimo de la enzima fue de 10 y es similar al de otras isoenzimas. B) El tiempo de incubación en presencia de manganeso donde se presentó la máxima actividad difiere del requerido por otras isoenzimas que solo necesitan 5 minutos. C) La temperatura de incubación también fue igual a la reportada para otras isoenzimas (2,58,63).

GRAFICA 1: CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS POR EL METODO DE ELISA



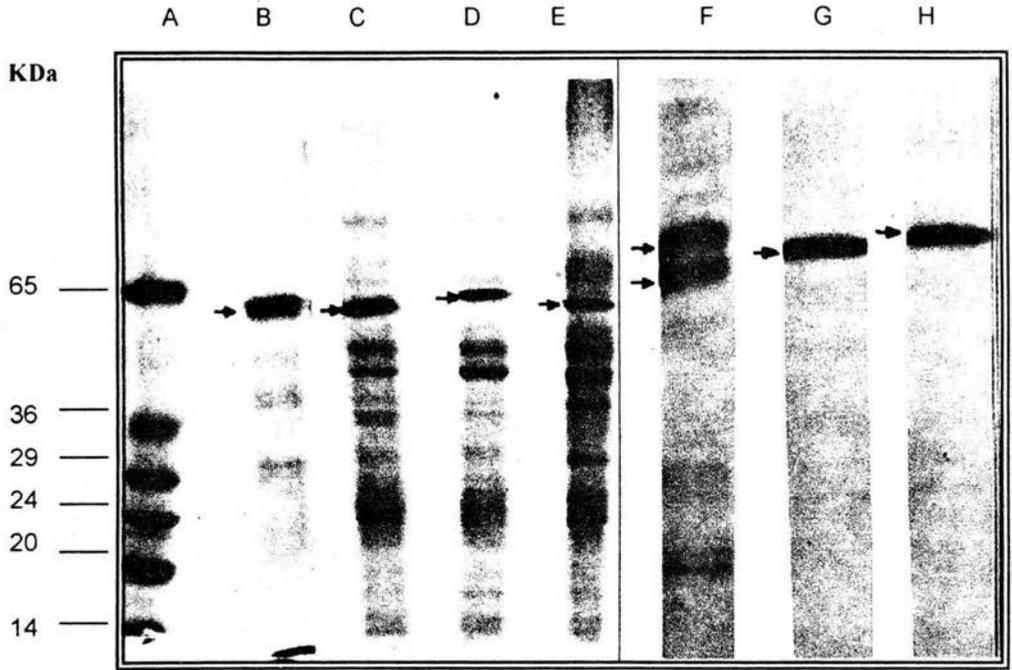


Fig. 17. Electroferograma de la arginasa comercial (Sigma), y de un extracto crudo de proteínas de espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola del epidídimo. (A-E). A) Marcadores de peso molecular. b) Arginasa de hígado de bovino (Sigma). C) Proteínas de espermatozoides de cabeza de epidídimo. D) Proteínas de espermatozoides de cuerpo de epidídimo. E) Proteínas de espermatozoide de la cola del epidídimo, donde aparecen bandas que coincide con la de la arginasa comercial en las muestras de las tres regiones del epidídimo.

También se muestran los "western blots" realizados para las mismas muestras (F-H). F) Arginasa de hígado de bovino (Sigma). G) Proteínas de espermatozoides de cabeza. H) Proteínas de espermatozoides de cola del epidídimo. Haciendo una comparación semicuantitativa entre las muestras problema, estas tendrían los siguientes valores cola (++++), cabeza (+++) y cuerpo (+). Las flechas señalan las bandas mencionadas.

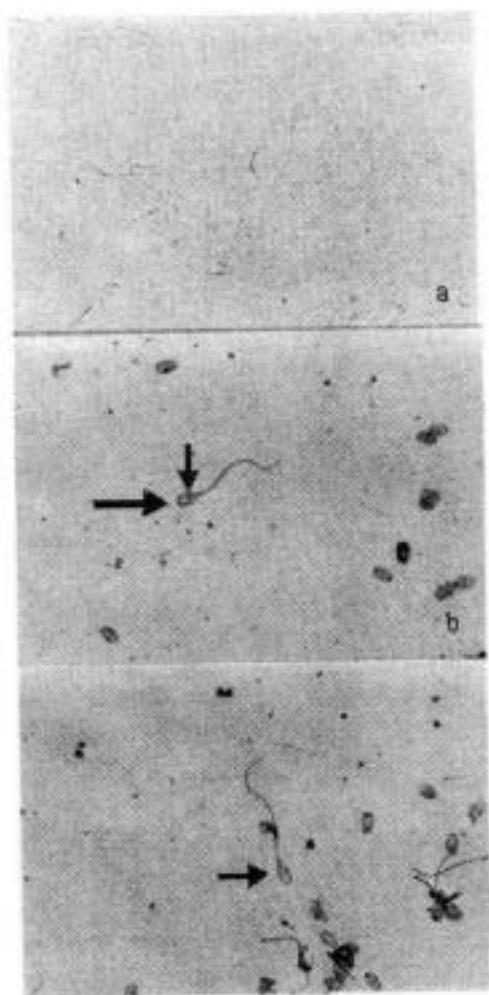


Fig. 18. Inmunolocalización de la arginasa en los espermatozoides del borrego de la cabeza del epidídimo. Los espermatozoides fueron incubados con anticuerpos anti-arginasa de borrego y 2º anticuerpo acoplado a peroxidasa y teñidos con diaminobenzidina (DAB)-cloruro de níquel y cloruro de cobalto a. Control sin anticuerpo anti-arginasa. b y c. muestras positivas la tinción se observa principalmente en el flagelo y en la cabeza aparece más intensa en la región ecuatorial que en el acrosoma (500X).

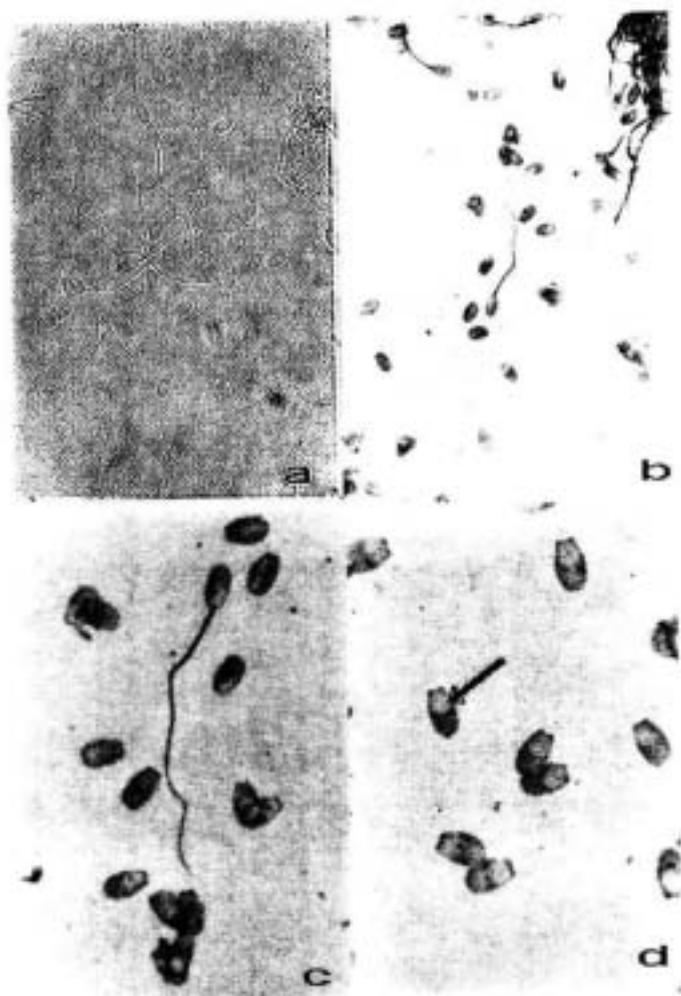


Fig.19 Inmunolocalización de la arginasa en los espermatozoides del borrego del cuerpo del epidídimo. Los espermatozoides fueron incubados con anticuerpos anti-arginasa de hígado de bovino y 2º anticuerpo acoplado a peroxidasa y teñidos con diaminobenzidina-cloruro de níquel y cloruro de cobalto. a. control sin anticuerpo anti-arginasa. b, c y d. muestras positivas, la tinción se observa básicamente a lo largo del flagelo, aunque la intensidad es mayor a nivel de la pieza media, y en la cabeza se encuentra en el acrosoma (a y b 500X , c y d 1250X).

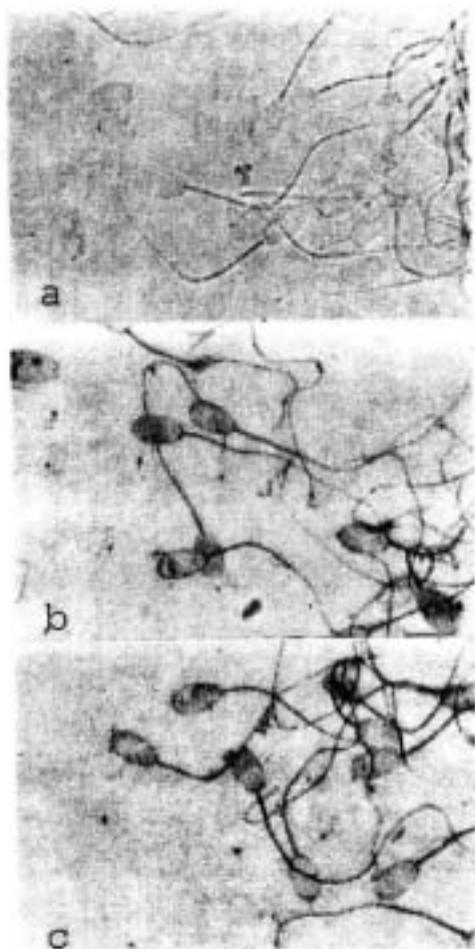


Fig. 20. Inmunolocalización de la arginasa en los espermatozoides del borrego de la cola del epidídimo. Los espermatozoides fueron incubados con anticuerpos anti-arginasa y 2º anticuerpo acoplado a peroxidasa y teñidos con diaminobenzidina-cloruro de níquel y cloruro de cobalto. a. control sin anticuerpo anti-arginasa. b y c. muestras positivas. La arginasa se encuentra distribuida a lo largo del flagelo sobre todo en la pieza media y en la cabeza se observa tanto en el acrosoma 20% como en la región posacrosomal 10% y en casi toda la cabeza principalmente en la base 70% (1250X).

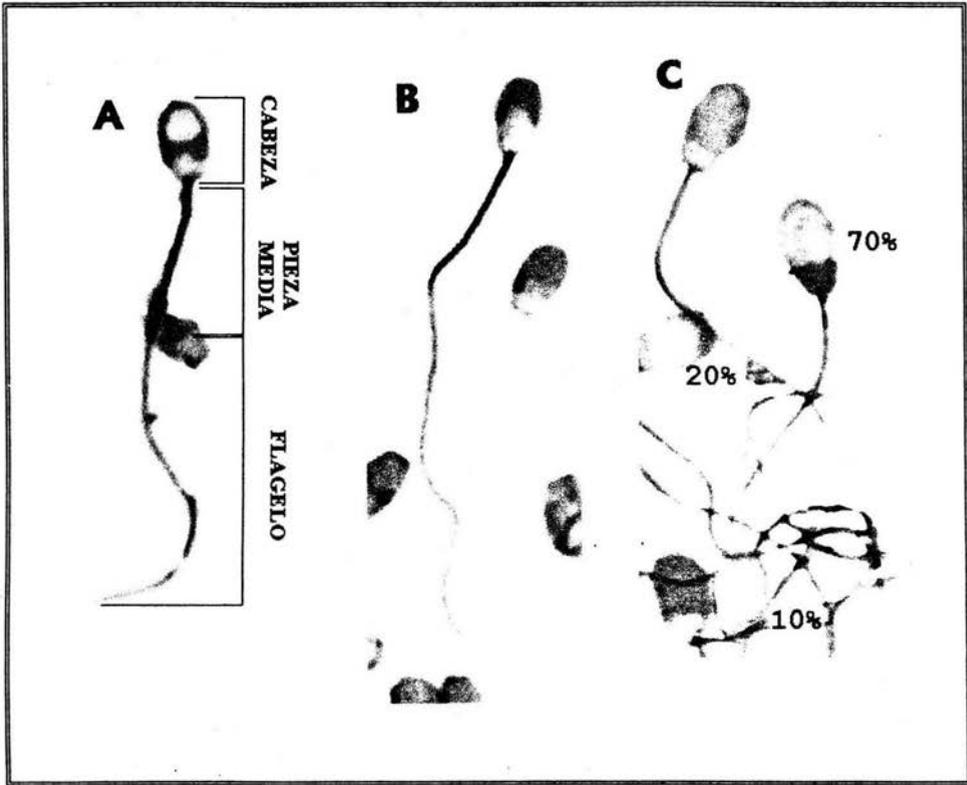


Fig. 21. Esquemas que muestran la ubicación de la arginasa en los espermatozoides de: A) la cabeza, B) el cuerpo y C) la cola del epidídimo del borrego aunque la cabeza del espermatozoide presenta diferentes patrones de distribución, la tinción permanece a lo largo del flagelo y en la pieza media.

DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de arginasa en los espermatozoides del borrego, aunque su distribución varía dependiendo de la fracción del epidídimo de la que provengan.

En espermatozoides de la cabeza del epidídimo el patrón de distribución predominante fue el siguiente: región ecuatorial, flagelo y muy poca en el acrosoma. Y en los espermatozoides del cuerpo del epidídimo se encontró en el flagelo y el acrosoma. En los espermatozoides de cola del epidídimo se encontró en el flagelo, y en casi toda la cabeza principalmente en la base (Fig. 18-21).

De acuerdo a la información recabada previamente a la realización de este proyecto, nuestra hipótesis se basó en que si los espermatozoides incubados con L-arginina "in vitro" adquirían un incremento en su movilidad, probablemente la arginasa se debía encontrar en la pieza media, ya que es en este sitio donde se encuentra el mayor número de mitocondrias que proveen la energía necesaria para ella, y también se tomó en cuenta que otros trabajos mencionan que la arginasa se encuentra en otras células en la fracción soluble del citoplasma y además en diversas estructuras celulares como son: mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi con grandes posibilidades de que también se encuentre en el núcleo de la célula (63).

Basándonos en los datos anteriores solo se esperaba encontrar arginasa en el flagelo. La presencia de arginasa en el acrosoma no es sorprendente si se considera que el acrosoma tiene su origen en el aparato de Golgi presente en las espermátidas, aunque esta distribución se presente más en los espermatozoides del cuerpo y de la cola del epidídimo.

La presencia de arginasa en la región ecuatorial y posacrosomal podría deberse a un reacomodo de las proteínas que conforman al espermatozoide, debido a su tránsito por el epidídimo. Además se sabe que durante su tránsito por el epidídimo los espermatozoides van adquiriendo su madurez y sufren una serie de cambios

como son: aparición de nuevas proteínas, desaparición de algunas existentes o reacomodo en su distribución, así mismo hay cambios en los sitios de unión de lectinas y otras moléculas sobre la superficie de la célula, lo cual podría explicar los diferentes patrones encontrados para la distribución de la arginasa.

Las propiedades cinéticas presentadas por la arginasa de los espermatozoides de borrego, presentan similitud con los requerimientos conocidos para otras isoenzimas, ya que en nuestras muestras la máxima actividad se presentó en un pH de 10 y en las arginasas de hígado de rata es de 9.8 a 10, en la de hígado de becerro es de 9.2 a 10.2 y en las de hígado y riñón de humanos fetales y adultos es de 9.5 a 11, lo que indica que la arginasa requiere de pH's básicos para poder activarse. La temperatura de incubación en presencia de manganeso en la cual se obtuvo la máxima actividad fue igual a la requerida por otras isoenzimas 55°C. Solo el tiempo de incubación en presencia de manganeso fue diferente al conocido para otras isoenzimas que solo necesitan 5 minutos para presentar su máxima actividad y nuestra muestra tuvo que ser incubada por 60 minutos (2,58,63).

La cantidad de arginasa presente en los espermatozoides de las tres regiones del epidídimo se cuantifico de manera semicuantitativa por la intensidad de la tinción presentada tanto en el "western blot" como en las inmunolocalizaciones, siendo más abundante en las muestras de la cola del epidídimo (++++), en 2º lugar la cabeza (+++) y finalmente el cuerpo (+). Estos datos podrían no concordar con la actividad enzimática de la arginasa en los espermatozoides del borrego, ya que esta disminuye durante su tránsito por el epidídimo y es menor aún en los espermatozoides eyaculados (77). Esto podría deberse a que la enzima pudiera no estar siempre activa, y por medio de la reacción inmunoquímica pueden detectarse tanto la forma activa como la inactiva de la misma, ya que los anticuerpos usados fueron policlonales; mientras que el ensayo enzimático solo detecta la forma activa. La función específica de la arginasa en el espermatozoide no se conoce pero en tejidos diferentes al hepático, facilita la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas.

La presencia de poliaminas en el espermatozoide ha sido descrita por varios autores, (15-17,68-72) y se ha observado que la espermina amplifica la movilidad inducida por el calcio y el AMPc "in vitro".

Se sabe que el AMPc se eleva en el espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo y que probablemente su papel principal en él sea mediar la fosforilación de proteínas esenciales para la iniciación o mantenimiento de la movilidad.

Otros estudios mencionan que la tubulina espermática es fosforilada de una forma dependiente de el AMPc y que el grado de fosforilación se relaciona con la proporción en que aumenta la movilidad espermática (73), lo que explica la presencia de la arginasa en el espermatozoide.

Además la presencia de ornitina descarboxilasa (ODC) en el acrosoma ha sido descrita por Tabor, y esta es una enzima que participa en la formación de poliaminas. (16).

Rubinstein (74) reporta mayor concentración de poliaminas, principalmente espermina en la pieza media del flagelo de espermatozoides de borrego, lo que concuerda con la tinción encontrada en nuestras muestras y que se permanece en las tres regiones del epidídimo.

CONCLUSIONES.

1. - La arginasa esta presente en los espermatozoides del epidídimo de borrego.
2. - Presenta semejanza en los rangos de pH, temperatura, dependencia de manganeso y comportamiento electroforético con las isoenzimas aisladas de hígado y de riñón.
3. - Su función específica no es conocida, pero puede estar asociada con la producción de ornitina necesaria para la biosíntesis de poliaminas, cuya presencia en las células espermáticas es conocida y su patrón de distribución es similar al de la arginasa.
4. - Con estos datos podemos sugerir que en la célula espermática existen todas las enzimas relacionadas con el metabolismo de poliaminas, ya que previamente fue reportada la actividad de ODC y de diamino oxidasa en espermatozoides humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Lehninger A.L.: Biochemistry. Worth, New York., 1970, 591.
- 2.- Spector, E.B., Rice, S.C.H., Moedjono, S., Bernard, B., Cederbaum, S.D.: Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem. Med.* 1982, 28:165-175.
- 3.- Méndez, J.D.: Poliaminas en Bioquímica e Inmunología. Hicks, J.J. y Díaz-Zagoya J.C. (Eds). Facultad de Medicina. UNAM: 1984. 366-385
- 4.- Holtt, L.E., Albanese, A.A.: Observations on amino acid deficiencies in man. *Trans. Ass. Amer. Phys.* 1944. 58:143-156.
- 5.- Matsuzaki, S., Suzuki, M., Hamana, K.: A possible role of arginase in the regulation of polyamine biosynthesis in the rat thyroid. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 1981, 98(1):57-61.
- 6.- Holttä, E., Pohjanpelto, P.: Polyamine dependence of Chinese hamster ovary cells in serum-free culture is due to deficient arginase activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1982. 721:321-327.
- 7.- Jakway, J., Horris, J.: Serum factors required for arginase induction in macrophages. *Cellular Immunol.*, 1980. 54:253-263.
- 8.- Papp, G., Drof, J., Molnar, J., Jambor, E.: Die rolle des arginingehaltes un der arginase-aktivitat in der fertilitat. *Andrologia.* 1979. 11:(1):37-41.
- 9.- Greenberg, D.M., en: *The Enzymes* Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrbäck, K.: Academic Press. New York-London. 1960. Vol 4:257.
- 10.- Milddenhouen, W.J.: The ferrous ion as the cofactor of arginase metallo-complexes of know composition and of native arginase. *Biochim. Acta.* 1969. 191:110-121.
- 11.- Tanimura, J.: Studies on arginine in human semen. *Bull. Osaka. Med. Sch.* 1967., 13:76-83.
- 12.- Schachter, A., Friechman, S., Goldman, A.J., Eckerling, B.: Treatment of oligospermia with the aminoacid arginine. *Int. Gynaec. Obstet.* 1973., 11:206-209.
- 13.- Kelle, O.W., Polakoski, K.L.: L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro. *Biol. Reprod.* 1975., 13: 154-157.

14. - Radany, E.W., Atherton, R.W.: Arginine induced stimulation of rabbit sperm motility *Arch. Androl.* 1981., 7: 351-355.
15. - Withe, I.G.: The effect of some seminal constituents and related substances on diluted mammalian spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 1954. 7: 379-390.
16. - Tabor, C.W; Tabor, H.: Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 1984. 53: 749-790.
17. - Morton, B.; Fraser, C.; Sagadraca, R.: Initiation of hamster sperm motility from quiescence: effect of conditions upon flagellation and respiration. *Fertil. Steril.* 1979. 32: 222-225.
18. - Beyer, J., Dabich, D.: Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal. Biochem.*, 1971, 39:412-417.
19. - Fujimoto, M., Kameji, T., Kanaya, A.: Purification and properties of rat small intestinal arginase. *J Biochem.*, 1976, 39:441-449
20. - Reyer, C., Dorner, F.: Purification of arginase from human leukemic lymphocytes and granulocytes of their physicochemical and kinetic properties. *Eur. J. Biochem.* 1975, 56:137-147.
21. - Sadasivudu, B., Indira, H.R.: Distribution of the rat enzymes involved in the disposal of arginine and ornithine in different regions of rat brain. *Brain. Research.* 1974., 79: 326-329.
22. - Davis, R., Paulus, T.: Uses of arginaseless cells in the study of polyamine metabolism (*Neurospora crassa*). *Methods Enzymol.*, 1983; 94:112-116.
23. - Lin, R., Snodgrass, P., Rabier, R.: Induction of urea cycle enzymes by glucagon and desamethasone in monolayers cultures of adult hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257(9):5061-5067.
24. - Reddy, P.U.M., Ramana Rao, J.V.: Inhibition of arginase in sheep brain homogenates by some L-aminoacids. *Experientia.*, 1980, 37:814.
25. - Rahmatullah, M., Fong, Y.Y.L., Lee, J.S.K., Boyde, T.R.C.: Zinc-deficiency and rat activities of urea cycle related enzymes in rats. *Experientia.*, 1980. 36:1281-1282.
26. - Kuchel, P.W., Nichol, L.W., Jeffrey, P.D.: Interpretation of the kinetics of consecutive enzyme catalyzed reactions. Studies on the arginase- urease system. *J. Biol. Chem.*, 1975, 20:8222-8227.

- 27.- Tarrab,R., Rodríguez, J. Hiutrón,C., Palacios,R., Soberón,G.:Molecular forms of rat liver arginase. Isolation and characterization. *Eur.J.Biochem.*, 1974, 20:457-458.
- 28.- Rosenfeld,J.L., Dutta,S.P.,Cheda,G.B., Tritsch,G.L.:Purine and inhibitors of arginase *Biochem.Biophys.Acta.*, 1975, 410:164-166.
- 29.- Herzferld,A., Rapper,S.M.:The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem.J.* 1976, 153:469-478.
- 30.- Kung,J., Brooks,S., Jakway,J.:Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase *J. Exp. Med.*, 1977, 149:665-672.
- 31.- Farram,E., Nelson,D.:Mechanism of action of mouse macrophages as antitumor effector cells: role of arginase *Cell. Immunol.*, 1980, 55(2):283-293.
- 32.- Terayama,H., Koji,T., Kontani,A., Myokumoto,T.:Arginase as an inhibitory principle in liver plasma membranes arresting the growth of various mammalian cells in vitro *Biochem. Biophys. Acta.*, 1982.720:188-192.
- 33.- Carvajal,N., Acona,M., Rodríguez,J.P.:Evidence for cooperative effects in human liver arginase *Biochem. Biophys. Acta.*, 1982, 701: 146-148.
- 34.- Skog,S., Eriksson,V., Elliasson,E.:Arginase and phase enzyme in a human cell line *Biochem. Biophys. Acta.*, 1981, 672:33-44.
- 35.- Carvajal,N., Venegas,A., Destreicher,G., Plaza,M.:Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1971, 250:437-442.
- 36.- Pohjanpelto,P., Holta,E.:Arginase activity of different cells in tissue culture *Biochem. Biophys. Acta.*,1983 , 757:191-195.
- 37.- Méndez,J.D., Yañez,R., Wong,C., Hicks,J.J.:Uterine arginase inhibition affect the rat embryonic development *Contraception.*, 1986, 33:597-604.
- 38.- Spector,E.B., Riece,S.D.H., Cederbaum,S.D.:Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase deficient patients. *Pediatric. Res.*, 1983,17(12):941-944.
- 39.- Haggerty,D.F., Spector,E.B.:Regulation by glucocorticoids of arginase and arginino succinate synthetase in cultured rat hepatoma cells. *J. Bio. Chem.*,1982, 257(5): 2246-2253.

40. - Spector, E. B., Cotta-Dethlefs, H., Kern, R. M.: The rate of induced arginase in rabbit. *Am. J. Hum. Genet.*, 1982, 34:47A.
41. - Shih, V. E., Jones, C. T.: Arginase deficiency in *Macaca fascicularis*. I. Arginase activity and arginine concentration in erythrocytes and liver. *Pediatric Res.*, 1972, 6:548-551.
42. - Konarska, L., Wiesmann, U., Colombo, J. P.: Arginase activity in human fibroblast cultures. *Clin. Chim. Acta.* 1981, 115:85-92.
43. - Farron, F.: Arginase isoenzymes and their detection by catalytic staining in starch gel. *Anal. Biochem.* 1973, 53: 264-268.
44. - Jergovic, I., Zuzic, I., Fiser-Herman, M., Strauss, B.: A simple method for serum arginase determination. *Clin. Chim. Acta.* 1970, 30:765-774.
45. - Van Elhsen, A., Leroy, G.: Arginase isoenzymes in human diploid fibroblast. *J. Biol. Chem.* 1975. 62(2):191-198.
46. - Baranzyk, Kuzma, A., Skrizypek-Osiecka, I., Porembska, I.: Arginase from human blood serum. *Biochem. Med.* 1981, 26:174-184.
47. - Ville-Breitburd, F., Orth, G.: Rabbit liver arginase. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247:1227-1235.
48. - Oka, T., Perry, J.: Arginase effects lactogenesis through its influence on the biosynthesis of spermidine. *Nature.* 1974, 250:660-661.
49. - Pace, C., Landers, R.: Arginase inhibition. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1981, 658(2):410-412.
50. - Beruter, J., Colombo, J., Bachmann, C.: Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem. J.*, 1978, 175:449-454.
51. - Aguirre, R., Kasche, V.: Catalytically active monomer forms of immobilized arginase. *Eur. J. Biochem.* 1982, 7567:307-314.
52. - Remesar, X., Arola, L. I., Palou, A., Alemany, M.: Arginase activity during pregnancy and lactation. *Horm. Metab. Res.* 1984., 16:468-470.
53. - Tuegg, U., Russell, A.: A rapid and sensitive assay for arginase. *Anal. Biochem.* 1980. 102:206-212.
54. - Carvajal, N., Martinez, J., Fernández, M.: Immobilized monomers of human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1977, 481:177-183.

- 55.- Freeman,J., Williams,M.:Estrogenic induction of uterine arginase activity. *Horm. Metab. Res.* 1971. 3:352.
- 56.- Cheung,C., Rajjman,L.:Arginine mitochondrial arginase and the control of carbamyl phosphate synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981. 209:643-649.
- 57.- Cabello,J., Basilio,C., Prajoux,V.: Kinetic properties of erythrocyte and liver arginase. *Biochim.Biophys.Acta.* 1962.,48:148-152.
- 58.- Boehringer. Mannheim GMBH. *Biochemica Informatica Biochemica*, 1973. West Germany.
- 59.- Schimke,R.T.:Differential effects of fastening and protein free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 1962., 237:1921-1924.
- 60.- Kaysen,G.A., Strecker,H.J.:Purification and properties of arginase of rat kidney. *Biochem. J.* 1973.133:779-788.
- 61.- Mora,J., Martuscelli,J., Ortíz-Pineda,J., Soberón,G.: The regulation of urea Biosynthesis enzymes in vertebrates *Biochem. J.* 1965., 96:28-35.
- 62.- Harell,D., Sokolovsky,M.:Beef-liver arginase. Isolation and molecular properties. *Eur. J. Biochem.* 1972., 25:102-108.
- 63.- Cuartero,R.A. y Núñez, J.C. El enzima arginasa. *Bioquímica general, metabolismo, interés de la determinación sérica en patología hepática ARTA* 1982 4:135.
- 64.- Lowry,O.H.; Rosenbrough,N.J.; Farr,A.L.; Randall,L.J.:Protein measurements with de folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 65.- Voller,A.; De Savigny,D.:Enzyme linked immunosorbent assay. (ELISA) en: "Techniques in clinical immunology" R.A.Thompson (Eds). Blackwell Scientific Publications. 1981. 157-169.
- 66.- Laemli,U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227: 680-685.
- 67.- Towbin,H.; Staenhelin,T.; Gordon,J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some aplications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. 76: 4350-4354.
- 68.- Oliva,R.; Vidal,S.; Mezquita,C.: Cellular content and biosynthesis of polyamine during rooster spermatogenesis. *Biochem. J.* 1982. 208: 269-273.

- 69.- Bamberg, E.; Weiser, M.; Desser, H.: Polyamines in bovine epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1975. 45:363-365.
- 70.- Hamana, K.; Suzuki, M.; Wakabayashi, T.; Matsuzaki, S.: Polyamine levels in gonads, sperm and salivary gland of cricket, cockroach, fly and midge. *Comp. Biochem. Physiol.* 1989. 92 B: 691-695.
- 71.- Quian, Z.H.; Tsai, Y.H.; Steinberg, A.; Lu, M.; Greenfield, A.R.L.; Haddox, M.K.: Localization of ornithine decarboxylase in rat testicular cells and epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1985. 33: 1189-1195.
- 72.- Melendrez, C.S.; Ruttle, J.L.; Hallford, D.M.; Chaudry, P.S.; Casillas, E.R.: Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. *J. Androl.* 1992. 13(4): 293-296.
- 73.- Tash, J.S.; Means, A.R.: Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. *Biol. Reprod.* 1982. 26: 745-763.
- 74.- Rubinstein, S.; Breitbart, H.: Cellular localization of polyamines: Cytochemical and ultrastructural methods providing new clues to polyamine function in ram spermatozoa. *Biol. Cell.* 1994. 81:177-183.
- 75.- Méndez, J.D.: Polyamines and human reproduction in. *The Physiology of Polyamines*. Bachrach, U. and Heimer, Y. CRC: Press. Inc. Florida, USA. 1989.23-36.
- 76.- Hafez, E.S.E. Reproducción e inseminación artificial en animales. Saed. Ed. Interamericana-Mc Graw Hill. México. 1987. pp. 28, 205-208.
- 77.- Méndez, J.D. and Martínez, I.: Arginase activity in ram epididymal ejaculated spermatozoa. *ARTA.* 1995.7:133.