

CONTRIBUCIONES ORIGINALES

**CAPACIDAD METABOLICA DE NUCLEOS AISLADOS
DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS**

AGUSTÍN SOSA,* LEOBARDO CALZADA* ‡ y
ADOLFO ROSADO *

Núcleos de espermatozoides humanos fueron obtenidos y su pureza corroborada por estudios enzimáticos y de microscopía electrónica. Los núcleos aislados poseen un consumo de oxígeno detectable (2.4 nAtomos/min./mg. DNA) que es modificado por la adición de sustratos exógenos, particularmente por succinato y por malato (4.6 y 4.2 nAtomos/min./mg. DNA, respectivamente). Este consumo de oxígeno es capaz de inducir incremento significativo en el contenido de ATP (0.12 μ moles/br./mg. DNA) y en su relación P/O de 0.83. El tratamiento de esta fracción nuclear con DNasa (10 μ g. DNasa/mg. DNA) no inhibió este proceso, el que sin embargo, fue inhibido totalmente por la adición de pCMB. La ineficacia del ADP para estimular este proceso, la baja relación P/O

* Sección de Bioquímica de la Reproducción. Departamento de Investigación Científica. Centro Médico Nacional. Instituto Mexicano del Seguro Social.

‡ El autor incluirá este trabajo en su tesis profesional, requerida para la obtención de la licenciatura en Ingeniería Bioquímica en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

observada y la pureza de la fracción nuclear obtenida, aducen la presencia de síntesis aeróbica nuclear de ATP en el espermatozoide humano.

Se acepta generalmente que las mitocondrias son los únicos sitios en los que se lleva a cabo síntesis aeróbica de trifosfato de adenosina (ATP). No obstante, la descripción de algunos procesos bioquímicos endergónicos,¹ de diversas enzimas oxidativas² y de cantidades considerables de ATP y otros nucleótidos semejantes en núcleos aislados de timo,^{3, 4} estimularon a varios autores a investigar y establecer firmemente la presencia de una cadena respiratoria acoplada al proceso de fosforilación oxidativa en estos orgánulos.⁵⁻⁷

Sin embargo, la evidencia para la presencia de este proceso en núcleos aislados de otros tejidos, está poco documentada e incluso es contradictoria.⁸⁻¹⁰ Así, si la síntesis de ATP es o no una propiedad general de los núcleos de las células, es tema todavía insuficientemente estudiado.

El núcleo de las células espermáticas ha sido descrito como una estructura semicristalina¹¹ debido a la alta organización de su contenido. Así, se sabe que la maduración del espermatozoide comprende procesos complejos de estructuración nuclear¹² que culminan en la producción de una cantidad considerable de enlaces disulfuro,¹³ superhelicoidad del ácido desoxirribonucleico (DNA) y estabilización de la cromatina.¹⁴

Es posible considerar que el establecimiento y el mantenimiento de esta organización nuclear requiera de un aporte considerable de energía.¹⁵ Esta energía podría obtenerse por difusión a partir del sistema mitocondrial (pieza intermedia), pero podría también ser generado dentro

del núcleo mismo por mecanismos semejantes a los mencionados anteriormente en los núcleos aislados de timocitos. Por estas razones, se decidió estudiar la capacidad metabólica de núcleos de espermatozoides humanos, aislados mediante técnicas recientemente desarrolladas en el laboratorio de los autores para el fraccionamiento del espermatozoide de mamífero, los que permiten obtener núcleos de espermatozoides humanos muy puros.¹⁶

Material y métodos

El semen humano fue obtenido de donadores voluntarios sanos y fértiles. Cada eyaculado fue individualmente recibido en un vaso de precipitado siliconizado e incubado a temperatura ambiente durante 60 minutos para permitir su licuefacción.

Con el fin de obtener una cantidad adecuada de células el semen de seis a ocho muestras fue reunido en una sola poza general y de ésta, los espermatozoides fueron separados y lavados como previamente se ha descrito.¹⁶

Los espermatozoides así obtenidos fueron resuspendidos en suficiente volumen de amortiguador Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, hasta que la densidad óptica de esta suspensión, leída en un espectrofotómetro Coleman Jr. fue de 0.6-0.8 a 550 mμ. A esta suspensión le fue adicionada una cantidad suficiente de ditiotritol para obtener una concentración final de 0.0025 M de este componente.¹⁶ La suspensión fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se le adicionó bromuro

de cetil trimetil amonio a una concentración final de 0.25 por ciento y la mezcla fue reincubada bajo las mismas condiciones descritas.

Observaciones de esta suspensión con microscopio de luz revelaron exclusivamente la presencia de cabezas y la ausencia total de piezas medias, flagelos o espermatozoides intactos. Espermatozoides parcialmente solubilizados y material contaminante fueron removidos al centrifugarse dos veces esta suspensión a través de una solución de sacarosa 1.4 M durante 15 minutos a 1 000 x g. y a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-2B.

Los núcleos sedimentados en esta forma fueron finalmente resuspendidos en el medio ya descrito.¹⁷ De esta suspensión se separaron y procesaron alícuotas adecuadas, de acuerdo a la determinación planeada.

Una de estas alícuotas fue centrifugada a 2 500 x g. durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante fue descartado y los núcleos sedimentados fueron resuspendidos y fijados en una mezcla de glutaraldehído al 2.5 por ciento y de azul alciano al 0.5 por ciento en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.4, de acuerdo al método anteriormente descrito.¹⁸

Una segunda alícuota fue utilizada para medir el consumo de oxígeno, utilizando un oxígrafo Gilson equipado con electrodo de Clark,¹⁷ y el contenido de DNA en los núcleos recuperados después de cada experimento.¹⁹

La síntesis de ATP se determinó midiendo el contenido de ATP,²⁰ antes y después de incubaciones aeróbicas y anaeróbicas a 37°C.

Una alícuota más fue incubada durante 60 minutos a 30°C. con 10 µg de DNasa/

mg. DNA en un amortiguador de acetatos 0.05 M, pH 5.5. Las fracciones nucleares tratadas con y sin DNasa (controles) fueron lavadas dos veces por resuspensión y centrifugación y posteriormente ensayadas para determinar su consumo de oxígeno y la síntesis de ATP.

La presencia de actividad elevada de adenilato cinasa (ATP, AMP fosfotransferasa 2.7.4.3) ha sido recientemente descrita por Sosa y col.²⁰ en el espermatozoide humano completo. Ya que la presencia de esta enzima podría ser capaz de producir ATP a partir del ADP adicionando como sustrato en el sistema para medir fosforilación oxidativa, la presencia de esta enzima en los núcleos aislados fue determinada mediante el método antes indicado.²⁰

Resultados

Los estudios de microscopia electrónica de alta resolución, demostraron que con el tratamiento descrito todas las estructuras celulares excepto los núcleos habían quedado eliminadas y que los núcleos parecen retener su forma e integridad originales (fig. 1). Los depósitos de azul alciano indican la persistencia de la capa interna de la membrana nuclear, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos en algunos otros tejidos^{8, 21} usando como detergente Tritón X-100. El tratamiento con DNasa no produjo ningún cambio en la estructura de los núcleos aislados, hecho que también está de acuerdo con algunos informes previos acerca de la resistencia del DNA del espermatozoide a este tratamiento.¹⁵

Los núcleos aislados de los espermatozoides mostraron un consumo de oxígeno basal pequeño pero detectable (2.43 nAtto-



1 Núcleos de espermatozoides humanos fijados en una mezcla de glutaraldehído y azul alciano y postfijados en tetróxido de osmio y nitrato de lantano. (Arriba). Sección longitudinal de un núcleo mostrando la preservación de su forma e integridad original. Los depósitos de azul alciano indican la persistencia de la capa interna de la membrana nuclear y la presencia, en esta capa, de grupos negativos expuestos ($\times 75\,000$). (Abajo). Grupo de núcleos de espermatozoides humanos mostrando la ausencia de otras estructuras contaminantes. En algunos lugares el material nuclear parece escaparse; en estos lugares la membrana nuclear probablemente se ha disuelto totalmente ($\times 70\,000$).

mos/min./mg. DNA) que es modificado por la adición de sustratos exógenos (cuadro 1). El succinato y el malato (10 mM) dieron lugar a incremento de 100 por ciento en el consumo de oxígeno, no así la adición de glucosa o de fructosa (no indicada en el cuadro). A pesar de no inducir aumento significativo en el consumo de oxígeno, la glucosa fue capaz

de producir un incremento significativo en la síntesis de ATP y en la relación P/O, en tanto que el succinato, a pesar de que favoreció el aumento en el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP, indujo una disminución significativa en la relación P/O (cuadro 1).

Aun cuando el metabolismo respiratorio de los núcleos aislados de los espermatozoides no se vio modificado por el tratamiento con DNasa, fue susceptible a la acción de varios reactivos biológicos. El EDTA (ácido etilén diamino tetraacético) y el NADH fueron, independientemente, capaces de estimular el consumo de oxígeno. Cuando se adicionaron juntos o secuencialmente, produjeron incremento en este parámetro más grande que aquel que podría esperarse por la adición de estímulos independientes (cuadro 2). El NADPH (no señalado en el cuadro), aunque ligeramente menos activo que el NADH, se comportó en una forma semejante a éste.

El ADP estimuló el consumo de oxígeno suprimido por ATP y este último nucleótido fue capaz de suprimir el incremento, en el consumo de oxígeno, inducido por el primer compuesto. Es digno de mencionar que ADP fue incapaz de modificar significativamente la síntesis de ATP (cuadro 2). La acción de p-cloro mercuri-benzoato (pCMB) inhibió completamente la síntesis de ATP y el consumo de oxígeno, si bien la adición del reactivo a la cámara del oxígrafo indujo momentáneamente un aumento drástico en el consumo de oxígeno para posteriormente provocar una inhibición total de este proceso.

Altamente significativo fue el hecho de que en ninguna de las fracciones nucleares preparadas fue posible encontrar

Cuadro 1 Efecto de la adición de sustratos sobre el consumo de oxígeno y la producción de ATP en núcleos aislados de espermatozoides humanos

Número de determinaciones	Sustrato (5 mM)	Consumo de oxígeno (nAtomos/min./mg. DNA)	ATP (μmoles/hr./mg. DNA)	Relación P/O
12	—	2.4 ± 0.8	0.12 ± 0.02	0.82
5	Glucosa	2.0 ± 0.6	0.18 ± 0.05*	1.5*
4	Succinato	4.61 ± 1.5*	0.18 ± 0.06*	0.50*
4	Malato	4.26 ± 1.2*	—	—

Las cantidades expresan el promedio ± la desviación estándar del número de determinaciones indicadas en la primera columna.

* $p < 0.05$ o menos cuando se compara con la respiración endógena.

actividad de adenilato cinasa. Por consiguiente puede concluirse que, en el sistema investigado, la posible interferencia producida por conversión de ADP a ATP gracias a la actividad de esa enzima puede ser descartada.

Discusión

Avances recientes en el fraccionamiento del espermatozoide de mamífero, permiten derivar ventajas de la morfología especial de esta célula para obtener nú-

Cuadro 2 Consumo de oxígeno y producción de ATP por núcleos aislados de espermatozoides humanos

Número de determinaciones	Tratamiento (Concentración final)	Consumo de oxígeno (nAtomos/min./mg.DNA)	ATP (μmoles/hr./mg.DNA)	Relación P/O
12	—	2.4 ± 0.8	0.12 ± 0.02	0.83
4	Anaeróbico (Atmósfera de N ₂)	—	0.04 ± 0.02	—
3	DNasa	2.0 ± 0.7	0.10 ± 0.03	0.83
4	EDTA (6 mM)	4.3 ± 1.0*	—	—
5	NADH (5 mM)	4.0 ± 0.8*	—	—
4	EDTA + NADH (6 mM) (5 mM)	14.7 ± 1.5*	—	—
4	ADP (10 mM)	6.1 ± 1.2*	0.14 ± 0.08	0.38*
4	ATP (30 mM)	1.2 ± 0.4*	—	—
4	ADP + ATP (10 mM) (30 mM)	2.6 ± 0.7*	—	—
4	PCMB (5 mM)	0.9 ± 0.3*	0.0	—

Las cantidades expresan el promedio ± la desviación estándar del número de determinaciones indicadas en la primera columna.

* $p < 0.05$ o menos cuando se compara con los resultados obtenidos sin tratamiento.

** < 0.01 cuando se compara con la estimulación inducida por ADP.

cleos aislados completamente puros. Este orgánulo del espermatozoide parece comportarse en forma similar a la descrita para los núcleos aislados de timo que retienen nucleótidos ácido solubles y enzimas solubilizables como la succínico y la málico deshidrogenasa.^{9, 22} Igualmente, el núcleo del espermatozoide parece poseer capacidad de síntesis de ATP dependiente de oxígeno que dada la pureza de la fracción, puede considerarse independiente de la fosforilación oxidativa de origen mitocondrial.

Sin embargo, la incubación con DNasa pancreática, un procedimiento que inhibe significativamente la síntesis de ATP nuclear en otras células,^{5, 8} fue incapaz de interferir con este proceso en los núcleos aislados de los espermatozoides. Aunque esto puede ser tomado como evidencia de que la síntesis de ATP observada sea debida a contaminación mitocondrial, la carencia de contaminación observable por microscopía electrónica, la baja relación P/O, que está en los límites de los que prevalecen para la síntesis de ATP nuclear,⁶ la falta de estimulación de este proceso por ADP, la que está de acuerdo con los resultados de Ord y col.,⁴ en núcleos de timo de rata y finalmente la completa inhibición por pCMB sin una concomitante supresión de la respiración,¹⁰ apoyan la idea de que los resultados aquí presentados, reflejan la actividad metabólica de los núcleos aislados de los espermatozoides humanos. Además, es bien sabido que el DNA del espermatozoide se encuentra en estado altamente organizado y que es muy resistente a la digestión por DNasa,¹⁵ lo que puede explicar la falta de efecto de esta enzima sobre la fosforilación oxidativa nuclear del espermatozoide humano.

La mayor parte de las investigaciones sobre el metabolismo energético en núcleos aislados de timo han sido llevadas al cabo sin la adición de sustrato. Konings¹⁰ no sólo ha encontrado que la glucosa es utilizada en forma limitada por los núcleos de timo, sino que además esta utilización no se refleja en aumento detectable en el consumo de oxígeno. La respiración de los núcleos de espermatozoide también es insensible a la presencia de glucosa (o fructosa), aunque la presencia de este sustrato aumenta significativamente la síntesis de ATP por los núcleos aislados de los espermatozoides humanos, lo que puede ser debido a liberación intranuclear de ADP, aun cuando no existe ninguna evidencia directa que apoye esta posibilidad. Este hallazgo también corrobora el importante papel, ya sugerido, de los carbohidratos como fuente de abastecimiento de energía para el núcleo.^{5, 23}

Debe ser recordado que los núcleos preparados en la forma aquí descrita, carecen de la capa externa de la membrana nuclear y que por consiguiente podrían comportarse en forma diferente, desde el punto de vista de permeabilidad de sustratos, a los núcleos aislados de otros tejidos bajo diferentes condiciones de aislamiento.

Es posible postular, en base a los resultados obtenidos, que la síntesis de ATP nuclear en el espermatozoide humano podría estar involucrada en la estabilización de la organización del genoma de esta célula o en los procesos membranales que acompañan la penetración del óvulo por el espermatozoide. Sin embargo, la presencia y significación de este proceso debe esperar la demostración de la presencia de enzimas acarreadoras de electro-

nes y otros componentes de la cadena respiratoria (citocromos) en los núcleos aislados de los espermatozoides humanos.

REFERENCIAS

1. Reid, B. R.; Stellwagen, R. H. y Cole, R. D.: *Further studies on the biosynthesis of very lysine-rich histones in isolated nuclei*. Biochim. Biophys. Acta 155:593, 1968.
2. Widnell, C. C. y Tata, J. R.: *A procedure for the isolation of enzymically active rat-liver nuclei*. Biochem. J. 92:313, 1964.
3. Osawa, S.; Allfrey, V. G. y Mirsky, A. E.: *Mononucleotides of the cell nucleus*. J. Gen. Physiol. 40:491, 1957.
4. Ord, M. G. y Stocken, L. A.: *Phosphate-Transfer Reactions by Nuclei from Rat Thymus Gland*. Biochem. J. 84:593, 1962.
5. McEwen, B. S.; Allfrey, V. G. y Mirsky, A. E.: *Studies on energy-yielding reactions in thymus nuclei*. J. Biol. Chem. 238:2571, 1963.
6. Betel, I. y Klouwen, H. M.: *Oxidative phosphorylation in nuclei isolated from rat thymus*. Biochim. Biophys. Acta 131:453, 1967.
7. Betel, I.: *The occurrence of cytochromes in nuclei isolated from rat thymus*. Biochim. Biophys. Acta 143:62, 1967.
8. Conover, T. E. y Siebert, G.: *On occurrence of respiratory components in rat liver nuclei*. Biochim. Biophys. Acta 99:1, 1965.
9. Siebert, G.: *Nucleus*. En: *Comprehensive biochemistry*. Florin, H. y Stotz, E. M. (Eds.). Amsterdam, Elsevier Publishing Co. 1963, Vol. 23, p. 1.
10. Konings, A. W. T.: *Substrate supply for nuclear oxidative phosphorylation*. Biochim. Biophys. Acta 223:398, 1970.
11. Marushige, Y. y Marushige, K.: *Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa*. Biochim. Biophys. Acta 340:498, 1974.
12. Loir, M. y Hochereau de Reviers, M. T.: *Deoxyribonucleoprotein changes in ram and bull spermatids*. J. Reprod. Fert. 31:127, 1972.
13. Bedford, J. M. y Calvin, H. I.: *The occurrence and possible functional significance of S-S crosslinks in sperm reads, with particular reference to eutherian mammals*. J. Exp. Zool. 188:137, 1974.
14. Tubbert, M. A. y Berlowitz, L.: *Chromatin and histones in mealy bug spermatogonia*. Exptl. Cell Res. 85:205, 1974.
15. Bedford, J. M.; Bent, M. J. y Calvin, H.: *Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa*. J. Reprod. Fert. 33:19, 1973.
16. Hernández-Montes, H.; Iglesias, G. y Mújica, A.: *Selective solubilization of mammalian spermatozoa structures*. Exptl. Cell Res. 76: 437, 1973.
17. Huacuja, L.; Sosa, A.; Delgado, N. y Rosado, A.: *A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism*. Life Sci. 13:1383, 1973.
18. Hernández-Jauregui, P.; Sosa, A. y González-Angulo, A.: *The fine structure of glycocalix in human spermatozoa*. En: *Proc. 31st Annual Meet. Electron Microsc. Soc. Arceneaux, C. J. (Ed.)*. Nueva Orleans, Claitor's Publishing Division, 1973, p. 640.
19. Giles, K. W. y Myers, A.: *An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid*. Nature (Londres) 206: 93, 1965.
20. Sosa, A.; Altamirano, E.; Giner, J. y Rosado, A.: *Adenine nucleotide concentration and redox value of human spermatozoa*. Biol. Reprod. 7:326, 1972.
21. Conover, T. E.: *On the occurrence of respiratory components in calf thymus nuclei*. Arch. Biochem. Biophys. 136:541, 1970.
22. Klouwen, H. M. y Appelman, W. M.: *Biochemical radiosensitivity of lymphoid tumors*. Cancer Res. 27:255, 1967.
23. Betel, I.: *The endogenous substrate for nuclear oxidative phosphorylation*. Arch. Biochem. Biophys. 134:271, 1969.

Funk, dice que el raquitismo es una avitaminosis, y se podría aceptar si se considera la luz como una vitamina. El tratamiento helioterápico da la razón a esta concepción. Nuestro sol confirma plenamente esta hipótesis: Existe en el espacio solar una zona invisible, constituida por radiaciones que tienen una acción química y biológica notables y cuyo monto es menor de 1% de la radiación total del sol. Los rayos ultravioletas tienen entre sus propiedades generales, un debil poder de penetración. El humo, las neblinas, los polvos atmosféricos, la humedad los absorben e interceptan en mayor o menor cantidad. Lo propio acontece con los vidrios de las ventanas. (Torroella, M. A.: *¿Por qué no existe el raquitismo en México?* GAC. MÉD. MÉX. 58:765, 1927.)