

Contribución al estudio de los factores enzimáticos de la esterilidad

HIALURONIDASA Y VITAMINA C

PROF. DR. FELIX PEREZ Y PEREZ

Como indica Roux, los procesos que rigen y reglamentan los fenómenos biológicos son de dos tipos: unos, de orden congénito, factores «cromosomal-zigóticos» que determinan el crecimiento formal del individuo, y otros, de orden biocatalítico, «factores de realización» capaces de poner en marcha en los mismos la potencia toda marcada por los primeros.

En el grupo de los llamados «factores de realización», se incluyó, en un principio, a las vitaminas y a los fermentos, pero más tarde, a consecuencia del mejor conocimiento químico y biológico de las hormonas, llegó a modificarse el concepto de estas sustancias para considerarlas como «biocatalizadores» que actuarían de manera semejante a los catalizadores de química orgánica, esto es, a pequeñas dosis, pero exigiéndose en el caso del biocatalizador hormonal una condición fundamental apuntada por Seitz, que se refiere a la existencia de un «órgano efector» o capaz de responder al estímulo hormonal. De este modo, Amóns y Dirchel incluyen a las vitaminas, hormonas y fermentos en el grupo de los biocatalizadores, con la denominación común de «erginas».

En los animales inferiores, amebas, etc., la función de reproducción no es más que una consecuencia de la de crecimiento; como hecho que demuestra la proximidad de estas funciones (reproducción y crecimiento), tenemos el que algunos factores, tal como la estrona, que en los animales inferiores se comporta como de crecimiento, en

los superiores actúa como factor de reproducción, y del mismo modo, sustancias como la crocina, identificada por Mocevus con la carotina (factor vitamínico), que en los animales se comporta como un factor de crecimiento, en las algas del género *clamidomonas* actúa en forma indispensable como «factor de reproducción».

El fenómeno enzimático más importante en la conjugación de los gametos de los animales inferiores, es el que tiene lugar entre el fermento (hialuronidasa) y el sustractum (mucina mesenquimal), que integra el cúmulo coforo y el cemento que une las células envolventes del óvulo (corona radiada).

La importancia de este fenómeno es tal, que Pincus, Chang, Duthie, Austin, etc., centran en él un interesantísimo capítulo, cual es el de la **«esterilidad de tipo enzimático»**.

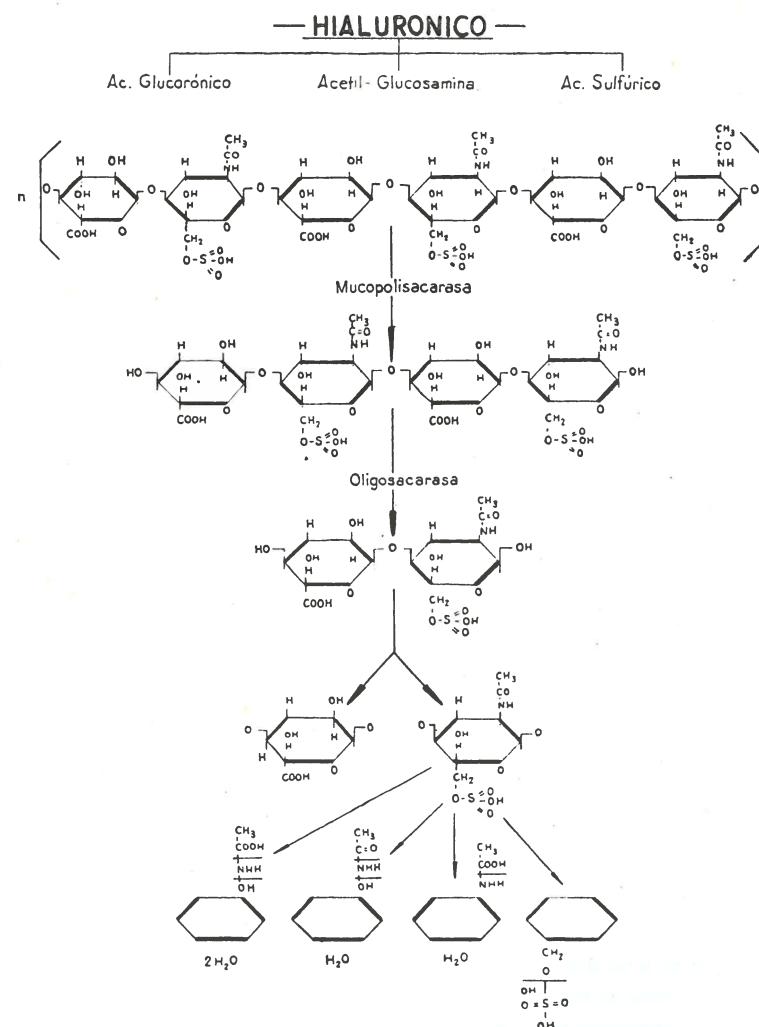
El fermento hialuronidasa fué descubierto por Duran-Reynals en 1928, en los extractos acuosos de testículo y al que llamó factor de difusión y permeabilidad; Mc Lean, en 1930, descubrió el referido fermento en gérmenes del género *clostridium*; Favilli, en 1941, relacionó la capacidad de difusión del virus rábico con la existencia de este factor y finalmente Bergamini descubrió el carácter enzimático de los fenómenos de difusión hasta entonces observados.

La hialuronidasa se encuentra en el tejido pulmonar y en distintos órganos, pero principalmente en el testículo (epitelio seminífero), y en el líquido espermático. Bergamini y Favilli han determinado los valores de hialuronidasa en el líquido espermático de toro, caballo, cerdo y aves, llegando a la conclusión de que aquellos valores (que en principio son muy bajos) se elevan a medida que transcurre el tiempo de supervivencia *«in vitro»* del esperma, de tal modo que por lo menos hasta las veinte horas después de la recogida los valores de concentración no resultan constantes.

Para Greenberg, Rizatti y Vendamini, la principal fuente de hialuronidasa radica en el propio espermatozoide y el aumento de ésta en el medio espermático es consecuencia de la difusión transespermática; a la misma conclusión llegan Delgard y Mikkelse, quienes sitúan el almacén de fermento en el zoospermo, debajo del capuchón cefálico y encima del acrosoma. De este modo, se interpreta a los espermatozoides como vectores de hialuronidasa (Chang, Rasbech, Mixner y Joughston).

Chang, en 1951, descubrió que en la coneja los espermatozoides

GRAFICA NUM. I



cuando en su marcha ascendente alcanzaban las proximidades del óvulo, frenaban su marcha progresiva manifestando únicamente movimientos oscilatorios, como si algo les impidiera llegar hasta la pelúcida; el tiempo en que aquéllos quedaban en esta situación para después lanzarse velozmente sobre el óvulo, era de unas cinco horas. A este fenómeno que el referido autor llama «capacitación of mammalian sperms» y debe interpretársele como el tiempo necesario para que los espermatozoides liberen la suficiente cantidad de fermento para despolimerizar el mucoide mesenquimatoso que los frena en su marcha.

Por otra parte, Favilli, trabajando con esperma a distintos títulos de dilución, observó que al llegar a un determinado grado de dilución, aquél perdía hasta totalmente la capacidad fecundante, capacidad que volvía a recuperarse únicamente cuando se añadía hialuronidasa. A través de estas experiencias, lo mismo que las de Caretta y Fiorentino (1952) por lo que respecta al esperma de toro, se demuestra claramente el papel de la hialuronidasa en la conjugación de los gametos, hasta el punto de resultar el «primum novens» de los fenómenos de penetración espermática y denudación de la coronaria.

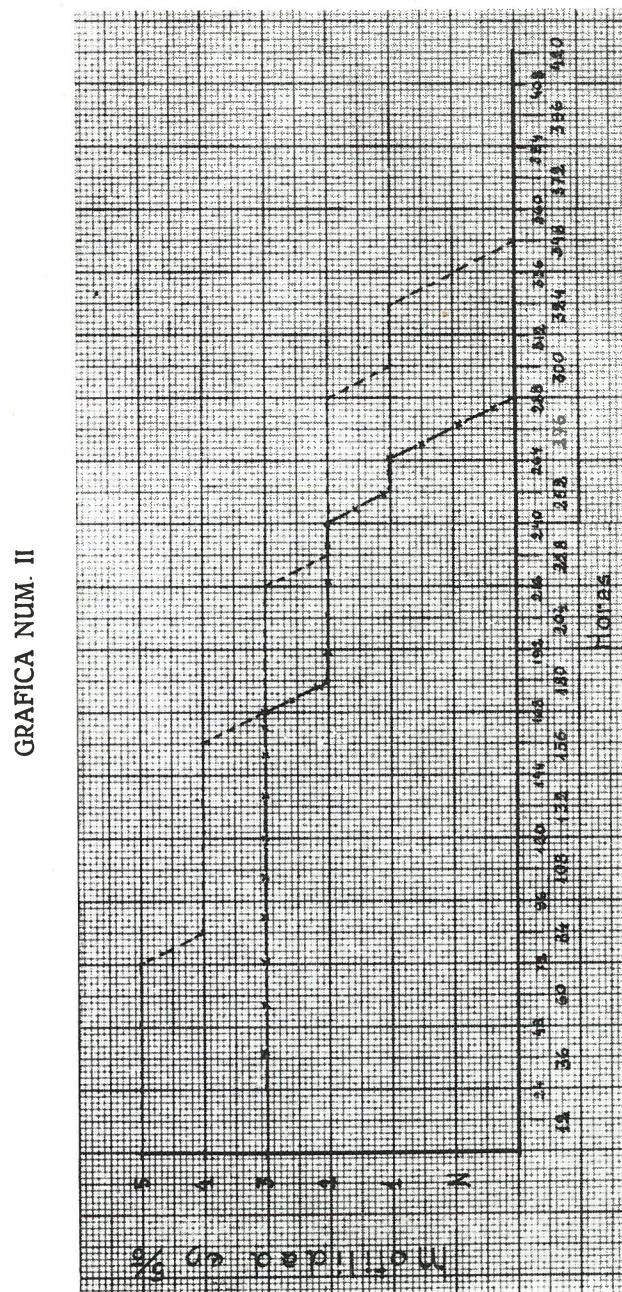
Un segundo y fundamental aspecto de este proceso enzimático, lo constituye el sustractum o mucina que rodea al óvulo y une las células de la zona coronaria. Las mucinas son sustancias abundantes en los organismos vivos, en los que sostienen funciones de alto interés biológico. En cuanto a su procedencia pueden dividirse en:

- De origen ectodérmico.
- » » endodérmico.
- » » mesodérmico.

El mesodermo constituye, en definitiva, el tejido de relleno, de sostén, que sirve de meso (unión), etc.; el auténtico mesénquima se distribuye, en términos generales, en las siguientes funciones:

- a) Sustancia amorfa intercelular.
- b) Tejido conjuntivo amorfo o poco diferenciado.
- c) Tejido de sostén, que sirve de esqueleto al diferenciado (integrando el tractus digestivo, genital, urinario, membranas cerebrales y medulares, líquido sinovial, etc.).
- d) Constituyendo órganos independientes (huesos, tendones, cartílagos, vasos, etc.).

Teniendo en cuenta la naturaleza química de los elementos mesen-



GRAFICA NUM. II

— — — Supervivencia in vitro del esperma citrato yema con 250 u. v. de hialuronidasa.
 - X - Supervivencia in vitro del esperma citrato yema con 250 u. v. de hialuronidasa.

quimales, pueden dividirse en dos grandes grupos, integrados el uno por el ac. hialurónico, formado a su vez por ac. glucorónico, acetilglucosamina y ac. sulfúrico, y el otro por el ac. condroitinsulfúrico, a su vez integrado por ac. glucorónico, acetilgalactosamina (condrosamina) y ac. sulfúrico.

Al primer grupo pertenecen los mesenquimas amorfos, y al segundo, principalmente los estructurados (cartílago, etc.).

El ac. hialurónico abunda en el humor vítreo, gelatina de Warton (umbilical), sinovia articular, músculos, tendones, prepucio, membrana sexual del mono, cresta de las aves, tumores y en la piel; aunque mezclado con el condroitinsulfúrico, constituye el elemento principal de las paredes vasculares, se encuentra en las secreciones prostáticas, en los líquidos foliculares y forma parte de ciertas estructuras bacterianas (cápsula, etc.), siendo elaborado por varios gérmenes.

Resulta interesante señalar que el ac. hialurónico no es base de las mucinas de origen epitelial (ectodermo y endodermo). De este modo no son alteradas por la hialuronidasa las mucinas (salivar, la mucoitina gástrica) ni otras que integran el moco cervical, etc., así como tampoco los mesénquimas integrados por ac. condroitinsulfúrico.

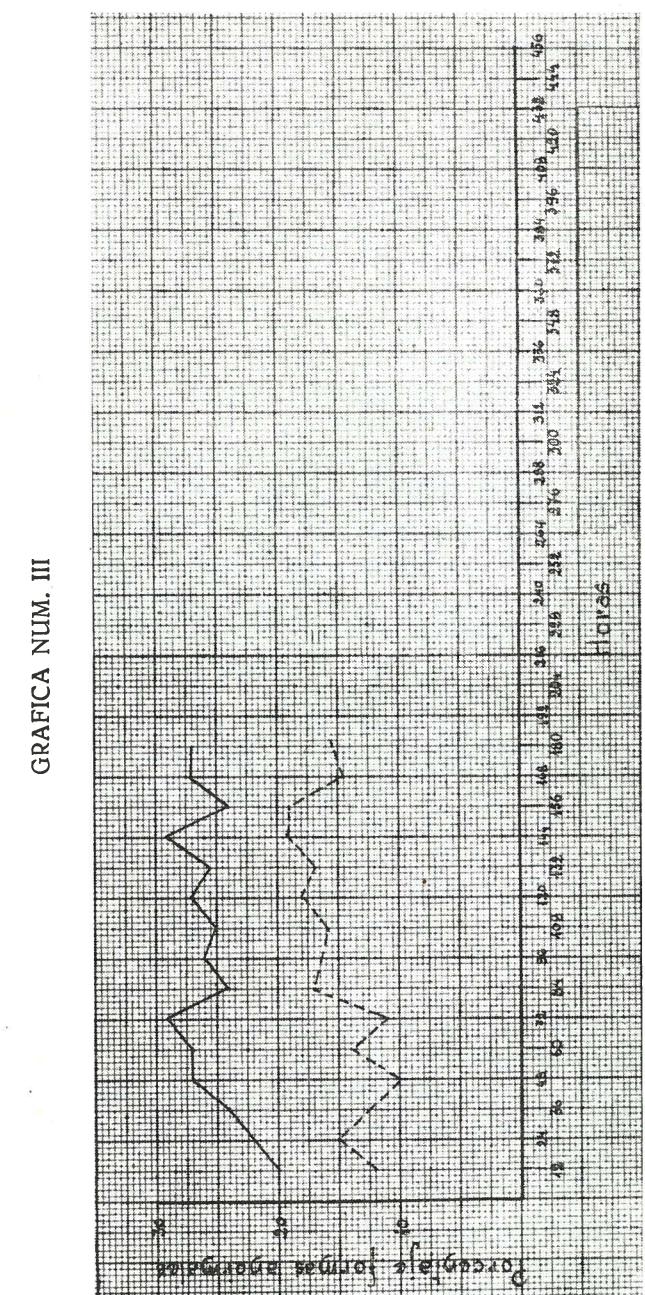
Químicamente el ac. hialurónico es un macopolisacárido compuesto de gran número de moléculas, uniéndose unas con otras mediante combinaciones anhidrasas.

Su disposición estructural ha podido ser comprobada en estos últimos tiempos gracias al microscopio electrónico. El grado de polimerización está relacionado con acciones fermentativas, quienes al mismo tiempo reducen la viscosidad del medio.

Stanndinger, en sus estudios de química coloidal, distingue en los mucopolisacáridos dos grupos. Unos de partículas esféricas y otros en disposición lineal o cateniformes, a este segundo grupo pertenecen las mucinas ovulares.

MECANISMO DEL PROCESO DE DESPOLIMERIZACION.—El primer paso de la despolimerización de los mucopolisacáridos lo da una «mucopolisacarasa», que escinde algunos metámeros formando agua y dando lugar a moléculas más simples (oligosacáridos). Los muco-oligosacáridos todavía son viscosos, no tienen acción reductora, adoptan estados coloidales y no son coagulables.

El segundo paso lo da una «oligomucosacarasa», que transforma a los oligomucosacáridos en disacáridos. En estos desaparece la vis-



cosidad y la turbidez, pero todavía no tienen acción reductora importante, de este modo queda libre la acetilglucosamina. Sobre ésta actúa una sulfatasa liberándose ac. sulfúrico y glucosa en último término, originándose, por otra parte, ac. acético, amoniaco, glucosa y agua por mecanismos que pueden observarse en la gráfica núm. I.

Las propiedades reductoras en el producto de desintegración están en relación con la liberación de glucosa; la aparición de glucosa y la pérdida completa de la viscosidad en el medio, coloca a los espermatozoides en condiciones óptimas para dirigirse hacia el óvulo, al que se mantuvo atraído por fuerzas de naturaleza no bien conocida, y entre las que puede, fundamentalmente, apuntarse las de tipo eléctrico.

El medio líquido y no viscoso favorece el movimiento reotáxico y la glucosa liberada proporciona material energético al espermatozoide (hipercinesis espermática).

Se comprende fácilmente que todas las circunstancias capaces de alterar este proceso enzimático pueden comportarse como causas de esterilidad, empleando esta palabra en más amplia significación. Presentase, pues, un nuevo capítulo, el de la «esterilidad enzimática», de extraordinaria importancia en la Fisiopatología de la reproducción animal.

Activadores de la hialuronidasa.—Un de los factores que más influyen sobre la actividad de este fermento, es el pH. Según Rogers (1947 y 48), el pH óptimo para la hialuronidasa testicular, es de 7, diferenciándose de los de origen bacteriano que tienen un pH óptimo de 5'4 a 6'5. Mc Lean ha encontrado otro comportamiento óptimo de la hialuronidasa testicular a un pH de 6, interpretándose este fenómeno, como sospecha, de la existencia de dos fermentos diferentes.

No se conoce hasta qué punto son favorables al efecto de este fermento ciertos iones; el calcio y el magnesio resultan en general favorables, las soluciones isotónicas de cloruro sódico son más adecuadas que las hipertónicas.

Algunas sustancias, tales como las lecitinas, peptonas, glicerina, triacetina, etc., tienen acción favorable, según Duran-Reynals, a través de un efecto histamínico.

Todas las sustancias capaces de reducir la viscosidad, favorecen la acción del fermento, y gran número de sustancias reductoras se comportan del mismo modo.

La corteza suprarrenal parece poseer una marcada acción activa-

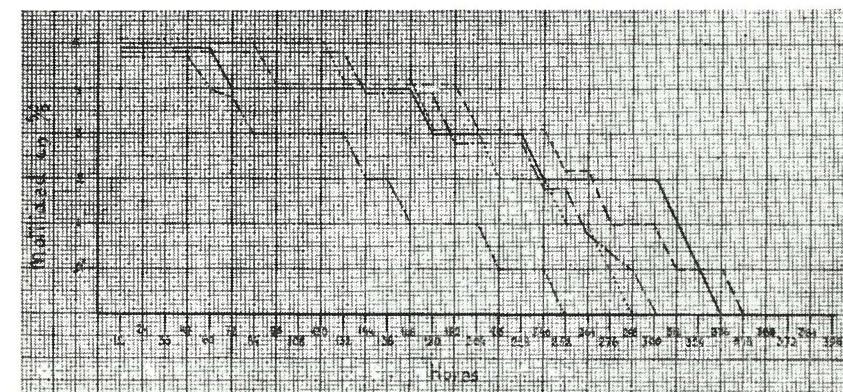
dora sobre este fermento. Luriz ha demostrado que las inyecciones de progesterona, lo mismo que corticosterona, presentan un efecto «spreading» muy acentuado.

Inhibidores de la hialuronidasa — Gibian divide los inhibidores de las mesomucinasas existentes en el suero en tres grupos: a) Los que actúan mediante combinaciones definidas; b) Anticuerpos específicos; c) Inhibidores de naturaleza proteica no específica y termolábilis.

Como inhibidores de la hialuronidasa de composición química co-

GRAFICA NUM. IV

Curvas de concentración «in vitro» de esperma-citrato-yema más Vit. C a distintas concentraciones



— Testigo con una concentración natural de 15 mgs. % de Vit. C.
 - - - - Problema con una concentración de 20 mgs. % de Vit. C.
 - - - - » » » » » 40 mgs. % de Vit. C.
 - - - - » » » » » 60 mgs. % de Vit. C.
 - - - - » » » » » 80 mgs. % de Vit. C.

nocida, tenemos, según Calesnick, distintos fenoles, cuyo efecto está relacionado con el número de grupos OH y la longitud de la cadena lateral.

En el organismo animal existen gran número de sustancias de acción inhibidora frente a la hialuronidasa espermática, entre las que tenemos la mucina gástrica, pepsina, pancreatina, condroitinsulfúrico, papaína, hemina, bilirrubina y, en consecuencia, la bilis. Mc Lean, Ro-

gers, Shuman y Swyer, han puesto de manifiesto el efecto inhibidor de la heparina, Beilar ha señalado el hecho curioso de que otros anti-coagulantes sintéticos, como el dicumarol y los polisulfonatos (Bergamini y Ferrari), presentan igualmente acción anti-hialuronidasa.

Guerra, en 1946, puso de manifiesto el efecto antagonístico entre los salicilatos y la hialuronidasa al inyectar el fermento a cobayas a quienes antes les había administrado salicilatos. Myer y Kulb, en 1917, observaron el antagonismo entre el enzima espermático y los antihistamínicos en vivo, tales como el benadril, antisina, piribenzamina, etc. A este respecto, Moynihan y Watson, en 1949, suponen que el referido efecto inhibidor se establece por un mecanismo indirecto, ya que *in vitro* no ha podido demostrarse el mismo comportamiento.

Hass fundamenta sus teorías sobre inmunidad y resistencia orgánica, en que el mucopolisacárido que integra el conectivo (ac. hialurónico) es atacado por los agentes invasores, quienes disponiendo del fermento hialuronidasa despolimerizan al tejido conectivo y llegan a difundirse por el organismo; junto a los enzimas microbianos, admite otros en el organismo de acción anti-invasora y pro-invasora, de acuerdo con su comportamiento ante el fermento agresor, con el que actuarían los gérmenes patógenos.

Williams admite relación directa entre la cantidad de hialuronidasa producida por los gérmenes y virulencia de los mismos; esta hipótesis ha sido demostrada por Humphrey con relación a neumococos, y por Crowley con respecto a estreptococos.

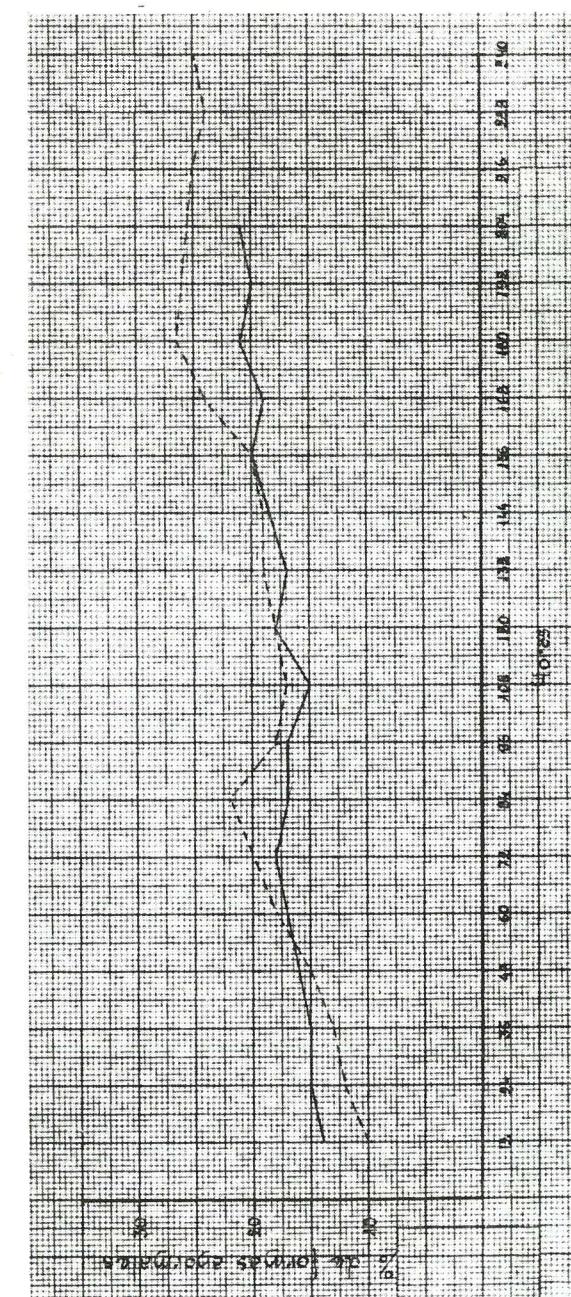
Parrot y Fusquella, en 1949, han llegado a establecer una relación entre el efecto inhibidor sobre la hialuronidasa y el protector de la fragilidad capilar, como ocurre con el factor P, ciertos glucósidos, derivados flavínicos (Clark y Geirzman) y otras sustancias contenidas en los citruc, tales como la vitamina C (Parrot y Fusquella, 1949; Beiler y Martín, 1946-48).

Watemberg y Glick, en 1949, descubren la acción inhibidora frente a la hialuronidasa de las esterinas. Los estrógenos, andrógenos y colesterinas presentan menos actividad en este sentido que la cortisona.

Vitamina C y fermento hialuronidasa.—La vitamina C o ácido ascórbico es una de las vitaminas de más alto valor biológico, y muy especialmente por lo que se refiere a funciones de reproducción. Phillips llegó a descubrir grandes concentraciones de esta vitamina en

GRAFICA NUM. V

Grafica de aparición de formas anormales en menstruo citrato-yema con Vit.



Formas anormales en esperma-citrato-yema

Formas anormales en esperma-citrato-yema y Vit. C al 40 /v

el lóbulo anterior de la hipófisis (adeno-hipófisis), hasta el punto de admitir relación directa entre vitamina C existente y función gonadotrófica hipofisaria.

De acuerdo con Rowlands, la mayor parte de los autores admiten una acción de refuerzo de la vitamina C sobre el efecto de la progesterona.

Walton y Edwards llegaron a sospechar cierta relación entre la capacidad fecundante del esperma de toro y su concentración en vitamina C; siendo perfectamente comprobada esta relación por Plank, Siebenga, en Holanda, y por Phillips, en Norteamérica.

En nuestro trabajo titulado «Investigaciones de la vitamina C en el esperma de toro y morueco» (Rev. Veterinaria, Sept. 1954), se llega a la conclusión siguiente entre otras: Existe relación directa entre la concentración de la referida vitamina en el esperma, la concentración espermática y la motilidad; siendo aquella relación de orden inverso por lo que se refiere al número de formas espermáticas anormales. Por otra parte se observa que la administración intramuscular de dosis de choque de ac. ascórbico mejoran las condiciones de concentración, motilidad y disminuyen el porcentaje de formas anormales en el eyaculado.

Demostado el efecto que la vitamina C tiene en cuanto a reducir el porcentaje de formas espermáticas anormales en el esperma, pensamos concretar el mecanismo de este efecto; teniendo en cuenta que dicha vitamina, como demostró Gibian, Parrot y Fasquella, 1949; Beilier y Martín, 1948, etc., se comporta como inhibidor de la hialuronidasa, consideramos conveniente experimentar sobre la acción «in vitro» que sobre los espermatozoides presenta la hialuronidasa. Por otra parte, la acción de dosis masivas de vitamina C sobre los espermatozoides y, finalmente, el efecto que ejerce sobre la masa espermática la adición simultánea de vitamina C y fermento hialuronidasa.

PRIMERA EXPERIENCIA.—*De esperma recién recolectado se separan 0,5 c. c. como fracción testigo y el resto se diluye con citrato yema (Salisbury) al 1:5. A 10 c. c. de medio espermático-citrato-yema se le añaden 3 c. c. de solución tamponizada (fósfato, pH=6,8), que lleva disuelto 250 u. V. de hialuronidasa, el volumen total (13 c. c.) se divide en dos porciones de 6,5 c. c. cada una.*

Con respectivos tubos testigos se coloca en nevera a 2'-5° C y en estufa a 30° C.

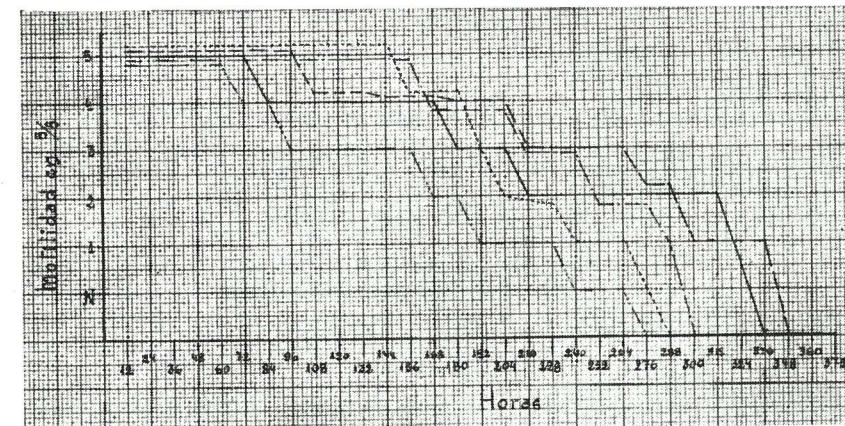
Los resultados obtenidos en los distintos controles (cada doce horas) se aprecian claramente en la gráfica núm. II.

Por otra parte, se ha determinado el porcentaje de formas anormales en la resultante citrato-yema hialuronidasa a través de controles tomados cada doce horas; valores que expresamos en la gráfica número III.

La supervivencia en estufa a 30° C, es en todo caso limitadísima apreciando como muy significativo el incremento de formas anormales en el esperma-hialuronidasa y la naturaleza de aquéllas.

GRAFICA NUM. VI

Curva de concentración «in vitro» del esperma-citrato yema con adición de Vit. C más hialuronidasa



— Testigo con 15 mgs. % de Vit. C más 250 u. v. de hialuronidasa
 — Problema con 20 » % » » 250 » »
 » con 40 » % » » 250 » »
 - - - - » con 60 » % » » 250 » »
 - - - - » con 80 » % » » 250 » »

De esta primera experiencia se llega a la conclusión de que: a) La supervivencia «in vitro» del esperma-citrato-yema, más hialuronidasa en nevera a 2°-5° C, resulta reducida en 48-72 horas con relación a los testigos sin fermento.

b) El porcentaje de formas anormales se eleva considerablemente

con la adición de hialuronidasa, alcanzando su máximo de las 36 a las 70 horas. El tipo de anormalidad resultó en el 70 por 100 de casos a consecuencia del desprendimiento del capuchón cefálico (formas calvas).

c) En las muestras conservadas a 30°C correspondientes a adición de hialuronidasa, la necrospermia final presenta imágenes en las que se observa un mayor porcentaje de formas sin capuchón con relación a los testigos.

SEGUNDA EXPERIENCIA.—*Se adiciona a la mezcla citrato-yema (Salisbury) vitamina C. Las soluciones de ac. ascórbico se han verificado en medio tampón (fosfato, pH= 6,8), a fin de neutralizar la acidez del ascórbico.*

De este modo se consiguieron concentraciones, en el medio espermático, de 20-40-60 y 80 mgs. por 100 c. c. En las muestras testigos de esperma se presentaba una concentración natural de 15 mgs. por 100 de vitamina C.

Los resultados, en cuanto a tiempo de supervivencia en nevera 2°-5° C y en cuanto de porcentaje de formas anormales, se expresan en las gráficas números V y IV, respectivamente.

CONCLUSIONES

a) Las adiciones de vitamina C al esperma en las condiciones anteriormente señaladas, no prolongan la supervivencia «in vitro» de los espermatozoides.

b) Se observa una mejoría en la actividad cinética y se mantiene ésta más elevada que en el testigo.

c) Las concentraciones de ac. ascórbico al 60 y 80 mgs. por 100, sobre todo ésta última, reducen el tiempo de supervivencia en 84 horas. Este fenómeno puede explicarse por la dificultad del medio tamponizado para neutralizar tan elevada concentración de ac. ascórbico.

d) El porcentaje de formas anormales resulta ostensiblemente menor cuando se adiciona vitamina C al medio.

TERCERA EXPERIENCIA.—*Añadir al medio esperma-citrato-yema hialuronidasa y vitamina C.* Una vez preparada la solución tamponizada de ac. ascórbico en ella se disolvieron 250 u. V. de hialuronidasa como en los casos anteriores (previo control, separación de

material testigo y acomodación térmica), se conservó el material en nevera a 2°-5° C.

Los resultados observados cada doce horas quedan resumidos en la gráfica núm. VI.

CONCLUSIONES

a) Se observa una reducción en el tiempo de conservación «in vitro» semejante a la encontrada en la segunda experiencia (adiciones crecientes de vitamina C).

b) El porcentaje de formas anormales resulta semejante al de la segunda experiencia. Lo que indica que el porcentaje positivo, que en este sentido presentaba la hialuronidasa (primera experiencia, gráfica núm. II), ha sido anulado por la acción de la vitamina C.

BIBLIOGRAFIA

- C. R. Austin, Nature, Che. Abstr. 42 (1948).
L. Berhamini, Chem. Abstr. 43 (1949).
S. Bergquist, Acta Tuberc. Scand. 23,2 (1949).
J. Chaney, J. E. Rhoads, Fed. Proc. 5,218 (1946).
M. C. Chang, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 66,51-54 (1947).
M. C. Chang, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1192-95 (1953).
J. F. Christensen, J. Pathol. Bacteriology 48,287 (1939).
F. Durán-Reynals, Ann. N. Y. Acad. Sci. 52,946-57 (1950).
F. Durán-Reynals, u E. D. Goldsmith, Science (New York) 110,74-75 (1949).
S. K. Elster, M. E. Freeman u. E. L. Lowry, J. Lab. Clin. Med. 34,834 (1949).
S. K. Elster, M. E. Freeman u. E. L. Lowry, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 96,332-37 (1949).
G. Favilli, J. Exp. Medicine 54,197-206 (1931).
G. Favilli, Boll. Ist. Sierotherapie Milan. 19,481-500 (1940).
G. Favilli, Boll. Soc. Med. Modena 47,15 (1947).
F. Guerra, Science (New York) 686-87 (1946).
E. Haas, J. biol. Chemistry 163,63 (1946).
E. Y. Hakanson u. D. Glik, J. Clin. Invest. 28 (1949).
J. Seifter, Ann. N. Y. Acad. Sci. 52,1141 (1950).
R. S. Tislow u J. F. Chase, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1156 (1950).
G. H. Warren, Science (New York) 111,473-474 (1950).
Phillips R. W. Zeller J. H. 1941 Some factors affecting fertility in swinw. Am. J. Vet. Res. Vol 2 n. 5, Octb
Comstock R. 1939 (Agr. Exp. Station. Univ Of Minnesota) A study of the mammalian sperm cell. I Variations in the glycolytic power of spermatozoa and their relation to motility and its duration (J. of Exp. Zool. vol. 81).