Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Variación de las proteínas quinasas epididimaria y testicular de rata con la maduración sexual

Bernard, Elena Aída

1975

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Bernard, Elena Aída. (1975). Variación de las proteínas quinasas epididimaria y testicular de rata con la maduración sexual. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1461_Bernard.pdf

Cita tipo Chicago:
Bernard, Elena Aída. "Variación de las proteínas quinasas epididimaria y testicular de rata con la maduración sexual". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1975. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1461_Bernard.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"VARIACION DE LAS PROTEINAS QUINASAS EPI-DIDIMARIA Y TESTICULAR DE RATA CON LA MADURACION SEXUAL"

Autor: Elena Aída Bernard

Director: Dr. Guillermo Federico Wassermann

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Guillermo Federico Wassermann, por su constante guía y el amplio apoyo que me ha brindado durante el transcurso de este trabajo.

Al Doctor Héctor N. Torres, por su consejo y ayuda en la corrección del manuscrito.

A los Doctores Bernardo A. Houssay y Virgilio G. Foglia, por haber hecho posible mi trabajo en este Instituto.

A la Doctora Sara Chiocnio,por su colaboración en las preparaciones histológicas.

A la Señora Elisa Rojo de Wullich , por su colaboración técnica.

A mis compañeros, por su constante aliento.

INDICE

	Página
Abreviaturas	1
Introducción	
Consideraciones generales	2
Papel de las proteinas quinasas en el metabolismo celular	7
I Proteinas quinasas y la regulación del metabolismo del glucógeno	7
II Proteinas quinasas y la regulación del metabolismo lipídico	10
III Proteinas quinasas y la regulación de la actividad nuclear	10
IV Proteinas quinasas y la regulación de producción de esteroides por adrenal	12
V Proteinas quinasas y la regulación de la función reproductiva en hembras	13
VI Proteinas quinasas y la regulación de la función reproductiva en machos	15
Objeto de este trabajo	17

Parte experimental

Técnicas generales

1) Reactivos enzimas y materiales 18
Preparación de γ^{32}P-ATP 18
Preparación de sefarosa-caseina 19

2) Métodos analíticos 20
Determinación de la actividad de proteina quinasa 21

Resultados

Primera Parte: Epidídimo

Descripción del órgano 22

Presencia de proteina quinasa en epidídimo de rata 26

Actividad de proteina quinasa en cabeza y cola de epidídimo de ratas maduras e inmaduras 28

Efecto de la hemicastración 29

Acción de la testosterona en animales inmaduros 32

Segunda Parte: Testículo

Descripción del órgano 34

Espermatogénesis 34

Esteroidogénesis 35

Actividad de proteina quinasa en homogenizado de testículo de rata 37

Actividad de proteina quinasa en túbulos seminíferos y tejido intersticial aislados 39

Actividad de proteina quinasa en una preparación de espermatozoides parcialmente purificados de testículo 42

Actividad de proteina quinasa en función de la edad del animal 46

Purificación parcial de proteina quinasa de testículo de rata 48

Variaciones de las fracciones que se separan a pH 4.8 con la maduración sexual 52

Acción de hormonas 56

Purificación de las fracciones por cromatografía en columnas de DEAE celulosa 58

Efecto de la variación de concentraciones de AMP cíclico sobre la actividad específica de las proteinas quinasas 65

Fosforilación de varias proteinas por las distintas fracciones separadas por DEAE celulosa 68

Cromatografía en columna de sefarosa-caseina 72

Distribución subcelular de proteina quinasa en testículo de ratas maduras e inmaduras 78

Discusión 81

Epidídimo 81

Testículo 83

Conclusiones 89

Bibliografía 91

ABREVIATURAS

ATP	5' Adenosina trifosfato
ADP	5' Adenosina difosfato
AMP cíclico	3', 5' Adenosina monofosfato cíclico
Pi	Fosfato inorgánico
DEAE	Dietil-amino-etil-celulosa
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EGTA	Etileneglicol-bis (β -aminoetil éter) -N, N'- ácido tetraacético
TRIS	Tris (Hidroximetil) aminometano
GMP cíclico	3', 5' guanosina monofosfato cíclico
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
ACTH	Adrenocorticotrofina
RNA	Acido ribonucleico
m-RNA	Acido ribonucleico mensajero
DNA	Acido desoxiribonucleico
p moles	pico moles

INTRODUCCION

Consideraciones generales

Uno de los mecanismos conocidos para regular la actividad metabólica celular es el de la inducción y represión de enzima, mediante la acción de diversos factores que pueden ser metabolitos de la propia célula. Este tipo de mecanismos ha sido bien establecido en bacterias así como en células de animales superiores. En estas últimas, la presencia de diversas sustancias regulatorias adicionales, como por ejemplo las hormonas, hacen más complejos los mecanismos de control de la función celular (1).

Una amplia variedad de las respuestas celulares a las hormonas están mediadas a nivel molecular por el AMP cíclico, este nucleótido puede causar, además de una activación de enzimas existentes, la síntesis de nuevas enzimas (2). Este último efecto puede ser controlado por la acción del AMP cíclico durante la traducción y/o transcripción del RNA mensajero.

Una posible explicación de cómo actúa el AMP cíclico sobre la transcripción ha sido proporcionada por Langan (3,4), el que observó que la fosforilación de histonas en hígado es estimulada por el AMP cíclico. Este proceso está catalizado por un sistema enzimático complejo llamado generalmente "proteínas quinasas". Las proteínas quinasas catalizan la transferencia del fósforo terminal del adenosina trifosfato (ATP) a aminoácidos en sustratos proteicos

según la siguiente reacción:

$$\text{Proteína} + n\ \text{ATP} \xrightarrow[\text{quinasa}]{\text{proteína}} \text{Proteína} - P_n + n\ \text{ADP}$$

Reacciones de este tipo requieren un ion metálico divalente, generalmente Mg^{++} y se piensa que el sustrato verdadero es un complejo ATP - metal.

Una de las primeras descripciones de una actividad enzimática de este tipo fue comunicada por Sundararajan y col. (5), los cuales en el curso de una investigación sobre la incorporación de fósforo a caseína en la glándula mamaria secretante de conejo, encontraron una enzima que fosforilaba caseína y fosfovitina.

Poco después, Rabinowitz y Lipman (6) identificaron enzimas fosforilantes del mismo tipo en levadura y cerebro de ternero, estas enzimas también fosforilaban fosfovitina, utilizando al ATP como dador de fósforo.

En una serie de trabajos posteriores se describieron enzimas similares en membranas de eritrocitos (7), en ovario y huevos de Rana pipiens (8), riñón de rata, conejo y cerdo (9), etc.

En 1956, Krebs y Fischer (10) describieron una enzima que cataliza la fosforilación y activación de la fosforilasa de glucógeno en músculo; esta enzima se llamó fosforilasa quinasa para distinguirla de la de caseína o fosfovitina quinasa. Una enzima similar fue descripta simultáneamente en hígado por Rall y col. (11).

Desde entonces se han descripto otras enzimas que se cree

son quinasas específicas y se las llamó, de acuerdo al que se piensa que es su sustrato preferido: glucógeno sintetasa quinasa (12), histona quinasa (13), protamina quinasa (14), fosforilasa quinasa quinasa (15, 16), etc.

Como fue señalado más arriba, estas enzimas pertenecen al sistema enzimático llamado "proteínas quinasas" y todas comparten las características de ser activables por el AMP cíclico; ya en 1968 poco después de haberse demostrado la existencia de la fosforilasa quinasa quinasa, se reconoció que esta enzima que era activada por el AMP cíclico, tenía una amplia especificidad de sustrato ya que también catalizaba la fosforilación de caseína y protamina y de acuerdo a esto se la llamó proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (16). Casi simultáneamente Langan (3) encontró que el AMP cíclico aumenta la velocidad de fosforilación de histonas por preparaciones de hígado. En un estudio más amplio Kuo y Greengard (17) encontraron que proteínas quinasas AMP cíclico dependientes estaban ampliamente distribuídas en los tejidos y en diferentes especies y postularon que la mayoría de los efectos fisiológicos del AMP cíclico son debidos a la activación de este tipo de enzimas.

Además, los hallazgos de Langan de que el AMP cíclico aumenta la fosforilación de histonas cuando se administra "in vivo" (18) y que el glucagón además de aumentar la concentración de AMP cíclico en hígado (19), aumenta también la fosforilación de histonas (4) condujeron a proponer el modelo esquematizado en la figura 1 para explicar algunas de las funciones de las proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico.

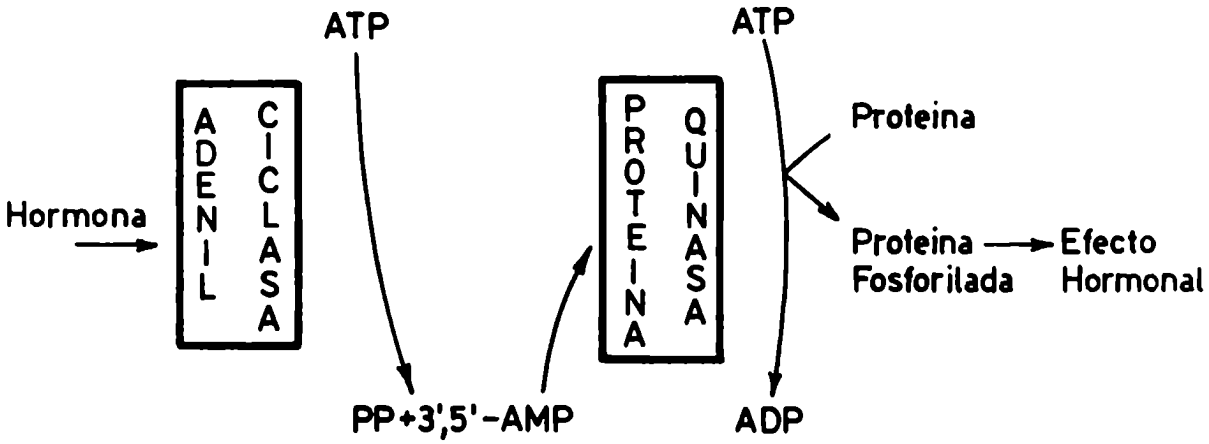
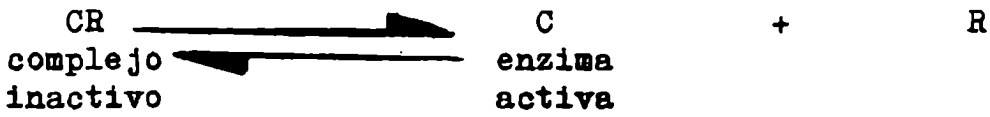

ATP
ATP
Hormona
ADENIL CICLASA
PROTEINA QUINASA
Proteina
Proteina Fosforilada
Efecto Hormonal
PP+3',5'-AMP
ADP

Figura 1

En el transcurso de sus estudios sobre la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, de corazón bovino, Brostrom y col. (20), postularon que esta enzima está formada por dos subunidades, una regulatoria: R y una catalítica : C, las que pueden disociarse en presencia de AMP cíclico.



La subunidad R es inhibidora de la subunidad catalítica C, que es la forma activa de la enzima.

La subunidad R tiene la propiedad de unirse al AMP cíclico, al aumentar la concentración de AMP cíclico intracelular por acción de hormonas, se desplaza el equilibrio de la siguiente ecuación hacia la formación de la subunidad C.

En un trabajo independiente Gill y Garren (21) también dedujeron que el AMP cíclico causa disociación de un complejo enzima-inhibidor, en esta misma línea Tao y col. (22) mostraron que la proteína quinasa de reticulocitos puede ser disociada en dos subunidades, por el AMP cíclico, una catalítica y otra que se une al nucleótido, sugiriendo un esquema similar al anterior; resultados similares obtuvieron

Kuman y col. (23) trabajando con proteína quinasa de hígado. La separación completa de las subunidades R y C fue realizada por estos últimos autores, además de Reimann y col. (24) y Erlichman y col. (25).

También ha sido descripta una proteína quinasa dependiente de GMP cíclico (26).

Papel de las proteínas quinasas en el metabolismo celular

Como fue dicho al comienzo, el AMP cíclico juega un papel preponderante en los mecanismos regulatorios hormonales y además muchos de sus variados efectos parecen reflejarse en su habilidad de activar diversas quinasas, que por la importancia de las reacciones que catalizan merecen detallarse.

1. Proteínas quinasas y la regulación del metabolismo del glucógeno

En el metabolismo del glucógeno tanto la regulación de la glucogénesis como de la glucogenólisis están moduladas en algunas de sus etapas por la acción del AMP cíclico, actuando a través de la activación de proteínas quinasas.

1) Fosforilasa quinasa quinasa

El glucógeno, en su degradación, es hidrolizado a glucosa - 1 - fosfato por la enzima fosforilasa (27, 28) la cual existe en el hígado y en el músculo bajo dos formas: fosforilasa a (activa) y b (inactiva). La fosforilasa b, es convertida en a por la fosforilasa b quinasa (29), la cual existe también bajo una

forma activa y otra inactiva. La fosforilasa b quinasa inactiva es activada por otra enzima, una proteina quinasa cuya actividad depende fundamentalmente de la presencia de AMP cíclico (16, 30, 31, 32, 33); esta proteina quinasa se denominó fosforilasa quinasa quinasa (16, 34).

Esta reacción puede ser inhibida por una proteina termoestable derivada de músculo esquelético (35, 36). Dicho inhibidor fue descripto por primera vez bloqueando la conversión de la glucógeno sintetasa independiente a su forma dependiente (37).

2) Glucógeno sintetasa quinasa

Concomitantemente con la activación de las enzimas responsables de la degradación del glucógeno, se produce una modificación en la actividad de la glucógeno sintetasa (38). Esta enzima también existe en dos formas: una fosforilada, inactiva (D) y una forma no fosforilada, activa (I). La misma proteina quinasa que cataliza la activación de la fosforilasa b quinasa, puede fosforilar la glucógeno sintetasa convirtiéndola en inactiva (39, 40). En la figura 2 presentamos un esquema de lo anteriormente expuesto.

Es oportuno destacar que las hormonas que estimulan la producción de AMP cíclico, también provocan un aumento en la actividad de estas proteinas quinasas dependientes de dicho nucleótido.

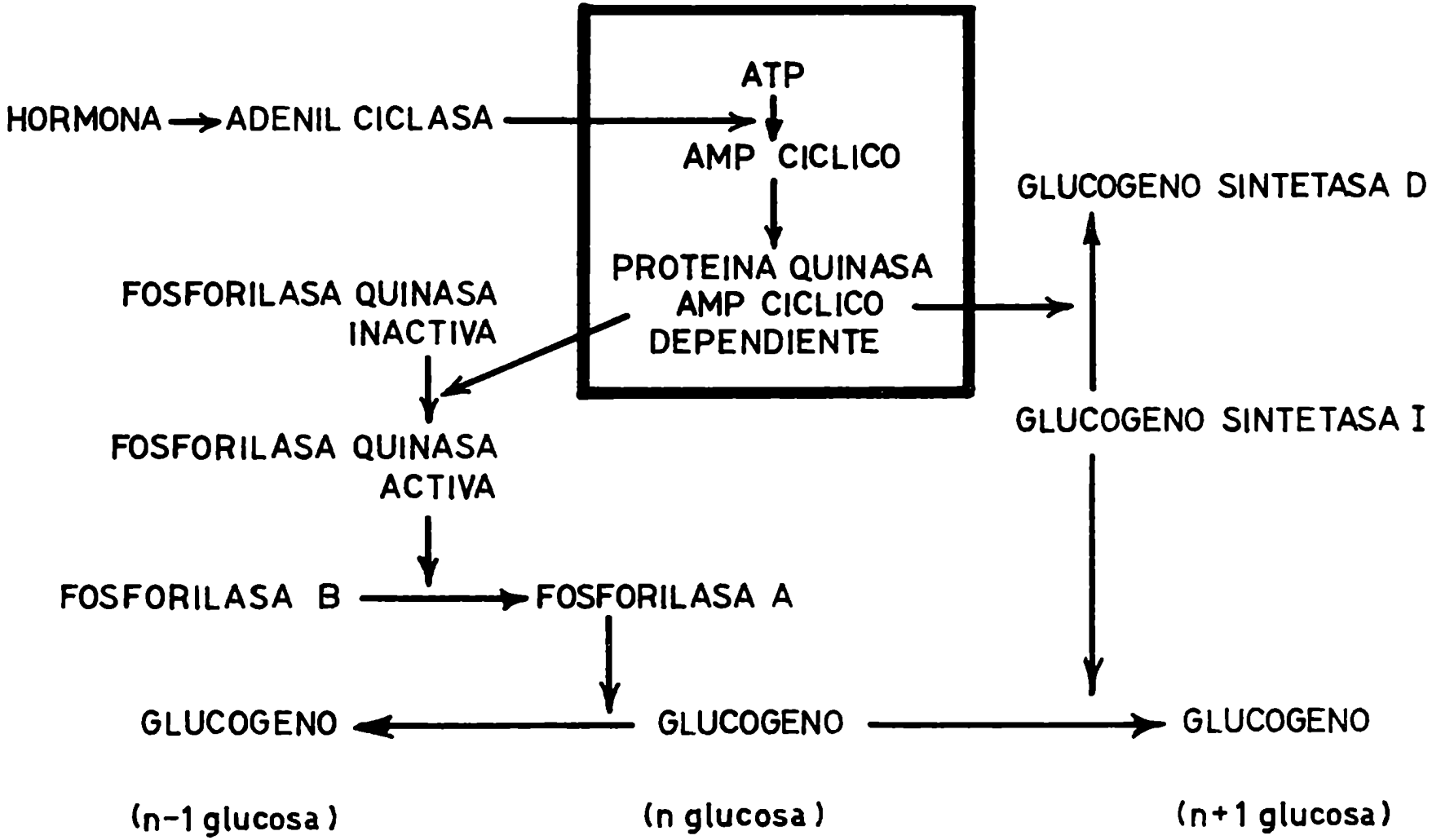

HORMONA
ADENIL CICLASA
ATP
AMP CICLICO
PROTEINA QUINASA
AMP CICLICO
DEPENDIENTE
GLUCOGENO SINTETASA D
GLUCOGENO SINTETASA I
FOSFORILASA QUINASA
INACTIVA
FOSFORILASA QUINASA
ACTIVA
FOSFORILASA B
FOSFORILASA A
GLUCOGENO
GLUCOGENO
GLUCOGENO
(n-1 glucosa)
(n glucosa)
(n+1 glucosa)

Figura 2

II. Proteínas quinasas y la regulación del metabolismo lipídico

En el tejido adiposo la hidrólisis de los triglicéridos es catalizada por una lipasa. En 1964 (41) se demostró en un sistema libre de células que la lipasa de tejido adiposo puede ser estimulada por AMP cíclico en la presencia de ATP, por analogía con lo que sucede en la activación de la fosforilasa, se pensó en la probable existencia de formas, fosforilada y no fosforilada de la lipasa. Esta idea fue parcialmente confirmada en 1969 (42) cuando se halló una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico en tejido adiposo.

Poco después (43) se demostró que una proteína quinasa de músculo esquelético de conejo aumenta la actividad lipolítica de un homogeneizado de tejido adiposo, cuando se la incuba en presencia de AMP cíclico. Casi simultáneamente, (44) se descubrió que cuando una lipasa sensible a hormonas parcialmente purificada de grasa epidimaria de rata, se incuba con ATP - Mg^{++}, AMP cíclico y proteína quinasa de músculo, aumenta su actividad; así mismo se demostró la simultánea activación y fosforilación proteica en una preparación purificada de lipasa (31). Otros autores también describieron un aumento de actividad de lipasa en una fracción incubada con ATP y AMP cíclico (45).

III. Proteínas quinasas y la regulación de la actividad nuclear

En 1966 fue demostrado (46) que complejos DNA - histona fosforilada de timo de rata, tienen mayor capacidad como templado para la síntesis de RNA " in vitro" que complejos de DNA histona no fosforilada, y se sugirió que los cambios en los ni-

veles de fosforilación puede ser un medio efectivo de alterar la habilidad de las histonas para reprimir el DNA.

Paralelamente otros autores (47) encontraron incorporación de fósforo ^{32}P a histonas de núcleo de timo de ternera y que linfocitos humanos estimulados con fitohemoaglutinina aumentan la síntesis de RNA. Esta síntesis está precedida por una estimulación en la velocidad de fosforilación de proteínas nucleares (48).

En esta misma línea se halló (49) que la insulina y la prolactina producen una estimulación marcada en la velocidad de fosforilación de proteínas nucleares en la glándula mamaria, esta estimulación coincide con el aumento de la biosíntesis de RNA. También en testículo de salmónidos, Ingles y Dixon demostraron que las protaminas son fosforiladas in vivo en ciertos estados de la espermatogénesis (50).

Las reacciones de fosforilación que ocurren en el núcleo involucran tanto a histonas como a otras proteínas nucleares (51) habiéndose postulado que intervienen en esta reacción diferentes proteínas quinasas, según sea el tipo de proteína que está sirviendo como sustrato. Las enzimas de hígado han sido muy estudiadas respecto de su capacidad para fosforilar histonas. Langan fue el primero en describir una proteína quinasa que parece actuar selectivamente con este tipo de proteínas (13). Posteriormente demostró que esta enzima es una proteína quinasa estimulable por AMP cíclico (3) y señaló que ésta provee un mecanismo por medio del cual las hormonas pueden promover la biosíntesis de RNA mensajero. Habiendo además demos-

trado que la fosforilación de histonas ocurre "in vivo" en respuesta a la estimulación del sistema cuyo intermediario es el AMP cíclico (18).

Varios autores (13, 52) encontraron que la proteína quinasa específica para las histonas está localizada principalmente en el citosol, pero es concebible que ellas puedan haber difundido fuera del núcleo durante la aislación. La fosforilación de otras proteínas nucleares diferentes de las histonas es catalizada por una proteína quinasa (o quinasas) que podría estar unida a la cromatina (13, 15, 53). Este tipo de enzima es inactiva respecto de las protaminas o histonas como sustratos y es insensible al AMP cíclico (53). Sería de interés conocer si es idéntica a la fosfovitina quinasa de hígado que también es inactiva respecto de las proteínas básicas como sustratos (13, 54).

IV. Proteína quinasa y la regulación de producción de esteroides por adrenal

Es un hecho generalmente aceptado que el ACTH promueve la biosíntesis de esteroides adrenales a través de un mecanismo que involucra el AMP cíclico como el segundo mensajero. Como resultado del sobresaliente trabajo de Garren y col. el esquema de control ha sido extendido hasta incluir una posible etapa de regulación que involucra a una proteína quinasa. Previamente se había determinado que la estimulación de la esteroidogénesis requiere nueva síntesis proteica (55, 56), pero que no es dependiente de la formación

de RNA (56, 57). Por lo tanto, se propuso que el AMP cíclico actúa a nivel de la traducción del RNA mensajero (58). Gill y Garren purificaron en glándula adrenal una proteina con capacidad de unir AMP cíclico y mostraron que está asociada a actividad de proteina quinasa (21, 59). Estos autores estudiaron la relación entre ligadura de AMP cíclico y actividad de quinasa y formularon un esquema para la activación de proteina quinasa esencialmente idéntico al ya presentado.

En un intento de identificar un sustrato para la proteina quinasa responsable de la estimulación de la biosíntesis de proteinas y el aumento de esteroidogénesis, otros autores (60) encontraron que el AMP cíclico estimula la fosforilación de proteinas asociadas a ribosomas. La cuestión general de cómo la biosíntesis proteica es regulada por fosforilación proteica al nivel ribosomal ha sido también estudiada en otros sistemas además de la glándula adrenal (61-63).

V. Proteina quinasa y la regulación de la función reproductiva en hembras

1) Glándula mamaria: dos proteinas fosfoquinasas que pueden participar en la fosforilación enzimática de proteinas nucleares fueron parcialmente purificadas en glándula mamaria de rata por Majumder y Turkington (64). Una de ellas es marcadamente estimulada por la presencia de AMP cíclico mientras que la otra no lo es. Los mismos autores (65) determinaron que en el desarrollo de la glándula mamaria de ratón durante la preñez la actividad de esta enzima aumenta de 7 a 9 veces. En cultivo de tejido de glándula mamaria de ratón encontraron que la

insulina actuando sinergísticamente con la prolactina induce la formación de proteína quinasa. Sobre esta base postularon un mecanismo alternativo de regulación en el cual el AMP cíclico no es limitante, sino que las proteínas con las cuales el AMP cíclico interactúa son inducidas hormonalmente.

2) Utero: en 1972 se demostró (66) la existencia en útero de ternera de tres proteínas quinasas, las que fosforilaban preferentemente histonas, protamina o caseína y que presentaban distintos pesos moleculares. Poco después se encontró (67) la presencia de una proteína quinasa AMP cíclico dependiente en endometrio bovino, esta actividad estaba localizada casi exclusivamente en la fracción soluble.

3) Ovario: Menon (68) aisló una proteína quinasa de cuerpo lúteo bovino la que no sólo es estimulable por AMP cíclico sino que también lo es por hormona luteinizante (LH) "in vitro". Estos dos efectos no son aditivos por lo que el autor sugirió la existencia de un mecanismo alternativo de regulación de funciones intracelulares en el tejido lúteo, por LH, independiente del AMP cíclico.

Rieber y Bacalao (69) investigando los cambios de la membrana celular que ocurren durante el cultivo de células de ovario de Hamster Chino (células CHO) por la acción de derivados del AMP cíclico encontraron que estos involucran un efecto sobre la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática. En un trabajo posterior (70) determinaron que las membranas plasmáticas de estas células poseen actividad de proteína quinasa y proteínas aceptoras de fosfato.

VI. Proteína quinasa y la regulación de la función reproductiva en machos

1) Próstata: en 1971 Reddi y col. (71) estudiaron el efecto de la orquidectomía y subsecuente administración de propionato de testosterona sobre la fosforilación de histonas y protamina por extractos solubles de próstata ventral de rata, estos tratamientos tuvieron muy poca influencia sobre la velocidad de fosforilación de las proteínas. Sin embargo, en esta misma línea, K. Ahmed (72) trabajando con núcleo aislado de próstata ventral de rata, encontró que estos incorporan ^{32}P de (γ ^{32}P) ATP a fosfoproteínas "in vitro"; la orquidectomía causa una disminución de esta actividad y este efecto es prevenido por administración de testosterona, esto sugiere un posible papel de la fosfoproteínas nucleares en el mecanismo de acción de la testosterona.

2) Espermatozoides: en 1972 (73) se descubrió la presencia de una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico en espermatozoides epididimarios bovinos y se postuló que esta enzima podría actuar fosforilando las proteínas relacionadas con los procesos de motilidad, ya que era un hecho conocido que el AMP cíclico aumenta considerablemente la motilidad en espermatozoides epidimarios bovinos y por otra parte las proteínas de la cola del espermatozoide están constituídas en su mayor parte por proteínas contráctiles (74, 75). Poco después (76) se efectuó la purificación de esta enzima y se demostró la presencia de tres enzimas que se diferencian en su peso mole-

cular, siendo todas activables por AMP cíclico.

3) Testículo: Kuo y col. en 1970 (77) investigando la presencia de proteínas quinasas en distintos tejidos de eucariontes describieron esta actividad enzimática en testículo bovino, además la purificaron y estudiaron algunas de sus propiedades. Poco después (71) se purificó la proteína quinasa de testículo de rata y determinó que esta enzima presenta una considerable actividad en ausencia de AMP cíclico. En este mismo trabajo se estudió la variación de la actividad de la proteína quinasa en función de la edad del animal, no encontrándose variaciones significativas.

Estudiando la biosíntesis de protaminas en testículo de salmónidos, Dixon y col. en una serie de trabajos (50,78), señalaron un posible papel de la fosforilación de las moléculas nacientes de protamina en su traslocación del citoplasma al núcleo de las espermátidas, seguida de la defosforilación de las protaminas antes de su combinación con el DNA del núcleo que está destinado a convertirse en parte de la cabeza del espermatozoide

Objeto de este trabajo:

De todos los datos precedentemente expuestos se hace evidente que las proteínas quinasas cumplen un papel primordial en los mecanismos metabólicos celulares así como en la mediación de diversas acciones hormonales.

Dado que por otra parte el testículo y el epidídimo son órganos que sufren profundos cambios durante los procesos de maduración y desarrollo, nos pareció de la mayor importancia la determinación de los niveles de actividad de las proteínas quinasas en estos órganos durante los cambios que acompañan la diferenciación sexual.

Debe destacarse además que la variación de actividad de los distintos sistemas enzimáticos durante el desarrollo deben ser claramente establecidos para entender un proceso tan complejo y dinámico como es la maduración. En este sentido el testículo y el epidídimo son modelos interesantes de estudio por sufrir importantes cambios durante el desarrollo que opera en períodos muy avanzados de la vida post fetal.

El objeto de este trabajo es determinar los niveles de actividad de las proteínas quinasas epididimarias y testicular durante la maduración sexual, tendiendo a correlacionar esta actividad con los distintos estadios evolutivos de la espermatogénesis y del desarrollo gonadal y la dependencia de esa actividad a las hormonas.

PARTE EXPERIMENTAL

Técnicas generales

1) Reactivos enzimas y materiales

Preparación de γ ^{32}P-ATP

Preparación de sefarosa-caseina

2) Métodos analíticos

Determinación de la actividad
de proteina quinasa

PARTE EXPERIMENTAL

Técnicas generales

1) Reactivos, enzimas y materiales usados:

a) Los distintos materiales se obtuvieron de los siguientes laboratorios: ATP; AMP cíclico; GMP cíclico; histona de timo de ternera tipo II; histona tipo III rica en lisina; histona tipo IV rica en arginina; albúmina bovina; EDTA; DEAE ; protamina, cisteina; β glicerofosfato; EGTA; teofilina; tris de Sigma Co. Sefarosa 4 B de Pharmacia; caseína de Fisher Co.; testosterona de Steraloids Inc.; gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa de músculo; 3 fosfoglicerato quinasa de levadura; 3 fosfoglicerato de Boehringer; LH ovina (NIH-LH-S 16), FSH ovina (NIH-FSH- S 9) fueron generosamente donados por la sección de estudios Endocrinológicos del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos de Norteamérica; ^{32}P libre de portador en solución clorhídica, de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina.

b) Preparación de γ ^{32}P - ATP

Esta preparación se efectuó por una ligera modificación del método de Glynn y Chappell (79) modificado por Walsh y col. (36). El método utiliza la reacción de intercambio entre fósforo inorgánico (Pi) y el fósforo terminal del ATP que se produce en presencia de fosfoglicerato quinasa y gliceraldehido 3 fosfato dehidrogenasa.

1) 3-fosfoglicerato + ATP $\underset{\text{quinasa}}{\overset{\text{fosfoglicerato}}{\rightleftharpoons}}$ 1,3-difosfoglicerato + ADP

2) 1,3-difosfoglicerato + gliceraldehido 3 fosfato dehidrogenasa $\rightleftharpoons$ 3 fosfogliceroilenzima + Pi

Se incubaron 0.5 ml de tris M PH. 8; 0.030 ml de CL_2 Mg M; 10μ moles de cisteina, 10μ moles de ATP, 5μ moles de 3-fosfoglicerato, 1 mg de gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa de músculo, 100μg de fosfoglicerato quinasa y 20 m Ci ^{32}P en volumen total de 5 ml, todo ajustado a pH 7.6. El ^{32}P se agregó como fosfato libre de portador en HCl 0.01 N. La incubación (2hs a 29° C) se detuvo por agregado de 0.5 ml de HCl 1N seguido por la adición de 60 mg de carbón (norita) y de 42 mg de polvo de celulosa. La suspensión se filtró a través de un filtro de nitrocelulosa (Millipore; 0.45 μ de poro) y el carbón se lavó con 10 ml de agua destilada.

El γ ^{32}P- ATP se eluyó de la norita con 10 ml de hidróxido de amonio 0.15 M en 50% etanol. Estos últimos compuestos se eliminaron de la preparación por evaporación a presión reducida.

c) Preparación de sefarosa-caseina

La sefarosa-caseina se preparó por el método de Cuatrecasas (80) adaptado a caseina (81) de la siguiente manera: 50 ml de sefarosa 4B lavada al vacío con 200 ml de agua y re-suspendida en 40 ml de agua destilada se activó por el agregado de 6gr de bromuro de cianógeno (150 mg/ml) recientemente

preparado, mezclando continuamente con la ayuda de un agitador magnético y manteniendo el pH en 11 mediante la adición de una solución de hidróxido de sodio 5N (la temperatura se mantuvo a 20° C por el agregado del hielo).

La reacción, que aproximadamente llevó unos 10 a 12 minutos, se consideró concluída cuando no se requirió adiciones ulteriores de alcalí para mantener el pH. En estas circunstancias se consumieron alrededor de 10 ml de HONa. Inmediatamente la suspensión conteniendo la sefarosa activada se filtró al vacío y se lavó con 1000 ml de buffer bicarbonato de sodio 0.1 M pH 10. Luego de ello el sólido se agregó a 40 ml de una solución de caseína (5mg/ml) y se agitó durante la noche a 4°C. La caseína que no reaccionó se lavó por filtración a través de un embudo de vidrio poroso con 2 lts de bicarbonato de sodio 0.1 M. La sefarosa-caseína se retomó en buffer fosfato de potasio 5mM, EDTA 2m M pH 7.2.

d) Preparación de otros reactivos

La DEAE celulosa se preparó tratándola con Na OH 1.ON y luego lavándola con agua destilada hasta neutralidad.

La caseína se solubilizó por el método de Reimann y col. (82).

2) Métodos analíticos

a) Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col. (83) utilizando albúmina cristalina de suero bovino como standard.

b) Radioactividad: se midió en un contador de centelleo líquido Packard modelo 3320 utilizando la mezcla centelleadora de Bray compuesta por naftaleno y dioxano (84).

c) Determinación de la actividad de proteína quinasa

La actividad de proteína quinasa se midió por la incorporación del fósforo radiactivo terminal del ATP γ P^{32} a un sustrato proteico: caseína, histona o protamina, de acuerdo a una ligera modificación del procedimiento de Kuo y col.(77).

El ensayo standard contenía en un volumen final de 0.15 ml: glicerofosfato de Na 40 mM (pH 6.4): Na F 8 mM, EGTA 0.3 mM, teofilina 2 mM, acetato de Mg 6.6 mM, (γ P^{32}) ATP 0.1 mM y 20 a 30 μ g de proteína de la fracción enzimática. Cuando se determinó la actividad en presencia de AMP cíclico se agregó el nucleótido a la concentración final de 0.01 mM. La reacción se comenzó siempre con el agregado del (γ ^{32}P) ATP. La mezcla se incubó a 32°C durante 10 min. y la reacción se detuvo por el agregado de 2ml de ácido tricloroacético al 5%; se agregó 25μ l de albúmina de suero bovino al 5% como portador de proteínas. Las muestras se centrifugaron, se lavó las paredes de los tubos con ácido tricloroacético y el precipitado se disolvió en 0.25 ml de solución de fosfato de sodio y amonio 1 M. Las proteínas se reprecipitaron con 2 ml ácido tricloroacético al 5%. Este lavado se repitió otra vez. El precipitado final se disolvió en 0.1ml de solución de hidróxido de sodio 1 M, determinándose la radioactividad según el procedimiento descripto más arriba.

RESULTADOS

Primera Parte: Epidídimo

Segunda Parte: Testículo

PRIMERA PARTE: EPIDIDIMO

Los espermatozoides de mamíferos son conducidos desde el testículo al conducto deferente a través del epidídimo. Este último conducto con el tejido conectivo que lo circunda forma un cuerpo compacto que cubre la superficie dorsal del testículo. Es durante su pasaje por este órgano que los espermatozoides sufren diversos procesos que determinan su maduración.

En todos los mamíferos estudiados, anatómicamente el epidídimo está aproximadamente dividido en tres regiones: 1) cabeza, que se sitúa alrededor del extremo anterior del testículo, 2) cuerpo, situado a lo largo de la cara lateral y 3) cola, ubicada alrededor del extremo posterior y que se continúa directamente con el vaso deferente. En la figura 3 se representa un esquema de este órgano.

No existe una línea precisa de demarcación entre las tres partes del epidídimo; la cabeza se adelgaza en el angosto cuerpo y éste se engrosa de nuevo en la voluminosa cola. El epitelio está formado por dos tipos distintos de células, estereociliadas y no estereociliadas. Una de las funciones que se conocen del epidídimo es reabsorver el fluído secretado por el testículo. Es un hecho conocido desde hace muchos años que el fluído secretado en la luz de los túbulos seminíferos fluye a través de la "rete testis" y del conducto eferente al epidídimo.

La reabsorción de este fluído ocurre principalmente en la primera parte del epidídimo de rata. La ultraestructura

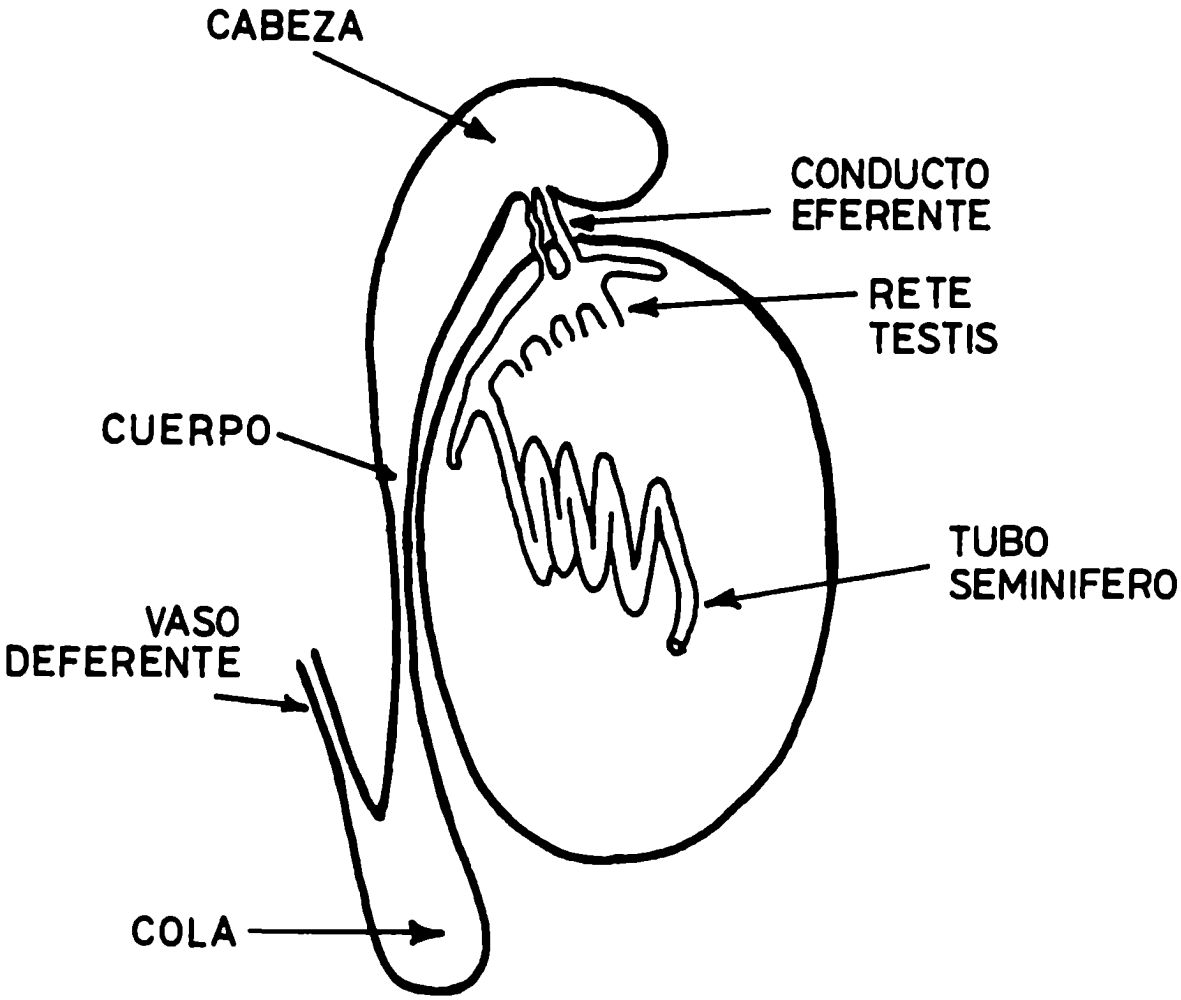

CABEZA
CONDUCTO EFERENTE
RETE TESTIS
CUERPO
TUBO SEMINIFERO
VASO DEFERENTE
COLA

Figura 3

de las células del conducto eferente y de la cabeza del epidídimo que es la típica de células con capacidad reabsorvedora apoya este hecho.

Crabo (85) calculó que en el toro y el pecarí casi el 99% del fluído que deja el testículo se reabsorve en la cabeza del epidídimo y en el carnero se ha demostrado que de los 40 ml de fluído que entran al epidídimo por día sólo 0.4 ml salen de él. Este flujo debe ser responsable, por lo menos en parte, del movimiento de los espermatozoides fuera del testículo.

Otra de las funciones conocidas del epidídimo es la maduración de los espermatozoides. Normalmente, el espermatozoide de la cabeza del epidídimo tiene una capacidad fertilizante mucho menor que el de la cola (86).

Los cambios que se producen en los espermatozoides que están madurando y la interrelación entre las gametas y los varios segmentos del epidídimo es algo todavía poco conocido.

El epidídimo responde a cambios en los andrógenos circulantes y su integridad histológica también parece depender de las hormonas masculinas (87). La castración es seguida de reducción del tamaño del órgano y pérdida de componentes celulares específicos (88). En el ratón, por ejemplo, luego de la castración disminuye la actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas (89,90). Estas respuestas pueden ser corregidas en parte por la administración de propionato de testosterona (88).

En el epidídimo eslabón final de múltiples reacciones complejas que conducen a la obtención de espermatozoides maduros,

no se ha estudiado hasta ahora ni la presencia de adenil ciclasa ni de proteína quinasa, habiéndose centrado la atención de los investigadores, por el contrario, en otro órgano accesorio, la próstata. Allí se ha demostrado que la testosterona y la dihidrotestosterona estimulan la actividad de adenil ciclasa (91) y se han purificado dos proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico (92); por otra parte se sabe que el AMP cíclico es capaz de mimetizar la acción estimulatoria de la testosterona sobre varias enzimas glicolíticas de este órgano (93).

En el epidídimo, por resultados obtenidos en este laboratorio se logró la evidencia de actividad de adenil ciclasa (observaciones no publicadas) lo que confirmó la idea de que el estudio de la proteína quinasa (aparente mediador de la acción del AMP cíclico) podría ser importante.

En el trabajo siguiente se describe el estudio de la actividad de proteína quinasa y su dependencia del AMP cíclico en la cabeza y cola de epidídimo de rata. También se analiza el efecto de la maduración sexual, de la castración y del tratamiento con testosterona sobre estas actividades.

a) Presencia de proteína quinasa en epidídimo de rata

Se utilizaron ratas Wistar macho de 18-21 y 90-120 días de edad. Estas fueron sacrificadas por un golpe en la cabeza y se extrajeron rápidamente los epidídimos, los que se colocaron sobre hielo.

Los órganos fueron divididos en tres porciones: cabeza, cuerpo y cola y se homogeneizaron separadamente en solución de EDTA 4 mM, los homogenatos se centrifugaron a 3000 x g durante 15 min. y los sedimentos se descartaron.

Se midió la actividad de proteína quinasa en una alícuota de los sobrenadantes utilizando caseína como sustrato y se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla I.

Tabla I

Actividad de proteína quinasa en cabeza, cuerpo y cola de epidídimo de ratas sexualmente inmaduras y maduras.

Edad	Región	Actividad específica en p moles/mg prot./min.	
		-3' 5' AMP	+ 3' 5' AMP
	cabeza	278	370
inm.	cuerpo	247	354
	cola	211	321
	cabeza	330	421
mad.	cuerpo	189	312
	cola	301	394

Estos datos indican que la actividad de proteína quinasa de cabeza y cola de epidídimo es mayor en ratas sexualmente maduras que en inmaduras.

Otro hecho que se puede observar en estas condiciones experimentales es que el AMP cíclico estimula poco la actividad de proteína quinasa de epidídimo.

Para los siguientes experimentos se utilizó solamente la cabeza y la cola del epidídimo debido a que el cuerpo es una zona muy angosta e indeterminada entre la cabeza y la cola, con límites imprecisos y muy difíciles, por lo mismo, de separar de manera reproducible.

Se midió el sustrato endógeno en una alícuota de ambas regiones. La medida efectuada en ausencia de AMP cíclico fue prácticamente despreciable y en presencia del nucleótido se obtuvieron los datos presentados en la tabla II

Tabla II

Actividad de proteína quinasa en cabeza y cola de epidídimo de ratas inmaduras y maduras con el sustrato endógeno y en presencia de AMP cíclico

Edad	Región	p moles/mg prot/min
inm.	cabeza	50
	cola	36
mad.	cabeza	40
	cola	38

Como estos valores son aproximadamente el 10% de los anteriores y además, no varían con la edad, no se tuvieron en cuenta en las experiencias subsiguientes.

b) Actividad de proteína quinasa en cabeza y cola de epidídimo de ratas maduras e inmaduras

En la tabla III se pueden observar las actividades de proteína quinasa, medida utilizando tres proteínas distintas como sustrato, en presencia y ausencia de AMP cíclico

Tabla III

Actividad de proteína quinasa en cabeza y cola de epidídimo de ratas inmaduras y maduras

(en p moles ^{32}P incorporado/mg prot./min.)

grupo	cAMP	cabeza			cola		
		Histona	Caseina	Protamina	Histona	Caseina	Protamina
Inm.	-	135±9	245±22	387±57	138±27	253±11	638±66(b)
	+	305±15	313±32	435±40(b)	336±41	348±14	598±67
(18 días edad)	aumento con c AMP en%	126	28	12	143	37	-6
Mad.	-	252±24	348±17	328±60	263±15	288±21	463±21(b)
	+	487±19	457±21	302±18(b)	662±29	435±11	476±17
(90 días edad)	aumento con cAMP en%	93	31	-8	152	51	3
Aumento con maduración	(a) P<	0.001	0.02	____	0.01	0.05	____

a) Los valores de P de obtuvieron por el test de "t" comparando ratas maduras e inmaduras.

b) Disminución estadísticamente significativamente ($P<0.05$) maduras respecto de inmaduras.

De las actividades presentadas en la tabla se puede deducir que tanto en la cabeza como en la cola del epidídimo, la activación de la proteína quinasa por AMP cíclico depende del sustrato utilizado. La estimulación que se produce utilizando histona como substrato es mucho mayor que la que se observa con caseína mientras que con protamina no se visualizó ninguna activación.

Si se comparan los valores de la actividad específica de proteína quinasa en animales maduros e inmaduros, con cada uno de los tres sustratos utilizados, se encuentra que con caseína e histona, esta actividad es mayor en los animales maduros en cabeza y en cola. En cambio, cuando se utilizó protamina, no se encontró aumento, en algunos casos, incluso, se observó una disminución significativa. Teniendo en cuenta estos datos se podría sugerir la presencia de dos proteínas quinasas: una que se induce con la maduración y es dependiente de AMP cíclico, otra no inducible e independiente de AMP cíclico.

También se puede observar que cuando el sustrato es caseína o histona, la cabeza y la cola del epidídimo tienen actividades específicas similares, con protamina, en cambio, la actividad de la cola es mayor que la de la cabeza.

c) <u>Efecto de la hemicastración</u>

El epidídimo es un órgano que recibe altas concentra-

ciones de testosterona y otras hormonas, directamente del testículo (principalmente la cabeza del órgano), por medio de su sistema venoso, linfático y la rete testis. Por lo tanto para tratar de establecer si la alta actividad específica de proteína quinasa en la cabeza epididimaria de animales maduros es dependiente y regulada por las hormonas testiculares o por otras causas, se procedió a hemicastrar a un grupo de animales maduros.

Se les anestesió con éter y se les extrajo uno de sus testículos, evitando dañar el epidídimo; se dejó el otro testículo intacto como control. Estos animales se utilizaron veinte días después.

Los datos que se presentan en la tabla IV indican que en la cola del epidídimo, la hemicastración no produce variación en la actividad específica de la proteína quinasa con cualquiera de los tres sustratos que se utilizaron para medirla.

En cambio, en la cabeza sí hay una disminución, la que se observa utilizando caseína o histona.

Estos resultados parecerían indicar que las variaciones observadas hasta ahora se deben a la estrecha relación epidídimo-testículo, ya que la cabeza del epidídimo recibe mayor cantidad de hormonas desde este órgano.

Tabla IV

Efecto de hemicastración sobre actividad de proteína quinasa en cabeza y cola de epidídimo (en p moles de ^{32}P incorporados mg prot/min.

grupo	cAMP	cabeza			cola		
		histona	caseina	protamina	histona	caseina	protamina
epidídimo del lado hemicastrado	-	117±12	197±2	261±23	225±7	282±9	418±28
	+	254±31	253±25	279±37	533±53	433±28	399±19
	aumento con cAMP en %	117	28	7	137	53	-4
epidídimo del lado intacto	-	194±8	294±9	254±19	222±13	262±15	328±24
	+	531±20	429±29	309±14	569±19	419±15	382±48
	aumento con cAMP en %	174	46	22	156	60	16
disminución con hemicastración P< (a)		0.01	0.01	N.S	N.S.	N.S.	N.S.

(a) Los valores de P se obtuvieron por el test de "t" comparando el lado hemicastrado con el intacto.

d) Acción de la testosterona en animales inmaduros

Para tratar de confirmar la teoría anteriormente expuesta, se trató un grupo de animales de dieciocho días con 2mg/día de propionato de testosterona, inyectado subcutáneamente, disuelta en aceite de sésamo, durante tres días; al grupo de control se lo trató con el vehículo solamente.

Como se puede apreciar en los datos de la tabla V, el tratamiento con propionato de testosterona produjo un aumento significativo de la actividad específica de la proteína quinasa en la cabeza del epidídimo.

Tabla V

Efecto de la administración de testosterona sobre la actividad de proteína quinasa de cabeza de epidídimo de ratas inmaduras (en p moles de ^{32}P incorporado/mg prot./min.)

Grupo	menos cAMP	más cAMP	aumento con cAMP en %
Control	101±6	292±42	190
Tratados con testosterona	172±6	390±13	128
Aumento con testosterona	$p < 0.001$ (a)	$p < 0.05$ (a)	———

(a) Los valores de P se obtuvieron por "t" test comparando controles con tratados.

Estos datos indicarían que la testosterona juega un importante papel en la regulación de esta actividad enzimática epididimaria durante el proceso de maduración sexual.

Esto no es sorprendente ya que en otros dos órganos accesorios masculinos: próstata y vesícula seminal la testosterona regula la síntesis de RNA y de proteínas (94). También se conoce la activación de la adenil ciclasa de próstata y de vesícula seminal por testosterona (91, 95) y la fosforilación de proteínas nucleares de próstata por una proteína quinasa (72). Evidentemente se necesita mucho más conocimiento de la fisiología de estos órganos para hacer una correcta integración de todos los datos obtenidos hasta ahora.

SEGUNDA PARTE: TESTICULO

La habilidad reproductiva del macho sexualmente maduro depende sustancialmente de la capacidad de los túbulos del testículo para producir espermatozoides viables y de las células intersticiales para producir niveles adecuados de andrógenos que aseguren la maduración del sistema reproductor.

Espermatogénesis: El proceso espermatogénico, suma de las transformaciones que terminan en la formación del espermatozoide (célula haploidea) está en preparación desde la vida embrionaria y se completa durante la pubertad para continuar durante la vida del animal, debido a una renovación continua de la progenie espermática. La célula germinal primordial migra hacia las crestas germinales y ocupan el espacio gonadal antes de la diferenciación sexual (96).

En los fetos y machos jóvenes, los gonocitos derivados de estas células germinales primordiales están contenidos dentro de los cordones sexuales.

Los gonocitos se multiplican y dan lugar a las espermatogonias. Estas últimas luego de varias divisiones mitóticas y de la diferenciación de la mayoría de las células hijas así obtenidas (las otras permanecen en estado primitivo) forman un grupo de células germinales contenidas en la capa parietal de los túbulos seminíferos. Su última generación da origen a los espermatocitos primarios.

Los espermatocitos primarios son las células germinales

que sufren meiosis. Esta comprende una profase extremadamente larga con apareamiento de cromosomas y posible intercambio de material cromosómico. La reducción en el número de cromosomas tiene lugar en el curso de dos divisiones sucesivas dando primero espermatocitos secundarios (núcleo diploideo) y luego espermátidas (núcleo haploideo).

Las espermátidas son las células germinales postmeióticas del epitelio seminífero, ellas sufren una serie de transformaciones morfológicas durante la espermiogénesis (además de modificación de sus componentes), terminando en la formación del espermatozoide. La célula germinal masculina es llamada así luego de su liberación del epitelio seminífero. Ver figura 4.

Esteroidogénesis: Los andrógenos son las hormonas que llevan a cabo el desarrollo y mantenimiento de los órganos reproductivos accesorios y las características sexuales secundarias del macho.

El testículo secreta andrógenos, los que son sintetizados principalmente en las células intersticiales o de Leydig (97)

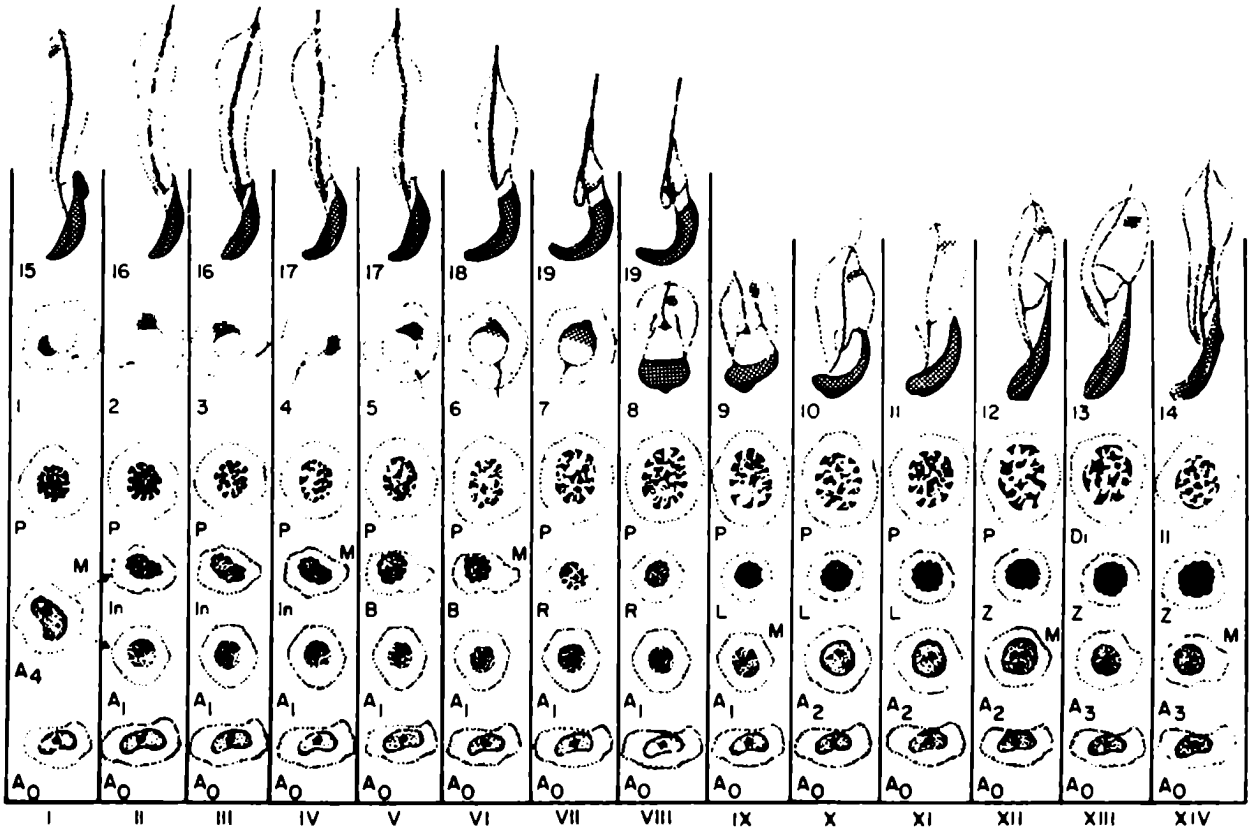


Figura 4: Estadios del ciclo espermatogénico

A_0 - A_4: Espermatogonias tipo A

In: Espermatogonias de tipo intermedio

B: Espermatogonias de tipo B

R, L, Z, P, Di: Espermatocitos primarios en distintos estadios

II: Espermatocitos secundarios

1-19: Etapas de la espermiogénesis (metamorfosis de las espermátidas a espermatozoides)

La síntesis de andrógenos por el testículo es estimulada por una hormona producida por la hipófisis anterior: hormona luteinizante (LH) (98-100).

No es claro en términos moleculares como el LH estimula la biosíntesis de andrógenos. Se sabe sí, que el AMP cíclico estimula esta síntesis (101, 102) y que el LH activa la adenil ciclasa testicular (103), además ha sido demostrada una relación directa entre la acción del LH el aumento de los niveles de AMP cíclico y el incremento de producción de testosterona (104,105).

Teniendo en cuenta que muchas de las acciones del AMP cíclico están mediadas por la activación de una o varias proteínas quinasas y los descubrimientos de Dixon (78) de que una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico está involucrada en los cambios que ocurren en las proteínas nucleares durante el desarrollo de las células germinales, se decidió investigar la variación de actividad de proteína quinasa durante el desarrollo sexual del testículo de rata.

a) Actividad de proteína quinasa en homogeneizado de testículo de rata

Para esta experiencia se utilizaron testículos de ratas Wistar, maduras e inmaduras. Se separó la membrana albuginea y las gónadas se homogeneizaron con tres volúmenes de solución neutra de EDTA 4 mM. El homogeneizado se centrifugó a 600 xg durante 15 minutos y el sedimento se descartó.

Para la determinación de actividad de proteína quinasa se

utilizó como aceptor de ^{32}P una proteína ácida: caseína, una proteína básica: histona y el sustrato endógeno; la actividad específica de la proteína quinasa con el sustrato endógeno del tejido es muy pequeña comparada con la que se obtiene con sustratos exógenos, ratas inmaduras: 8p moles/mg prot./min.; ratas maduras: 12 pmoles/mg prot./min.

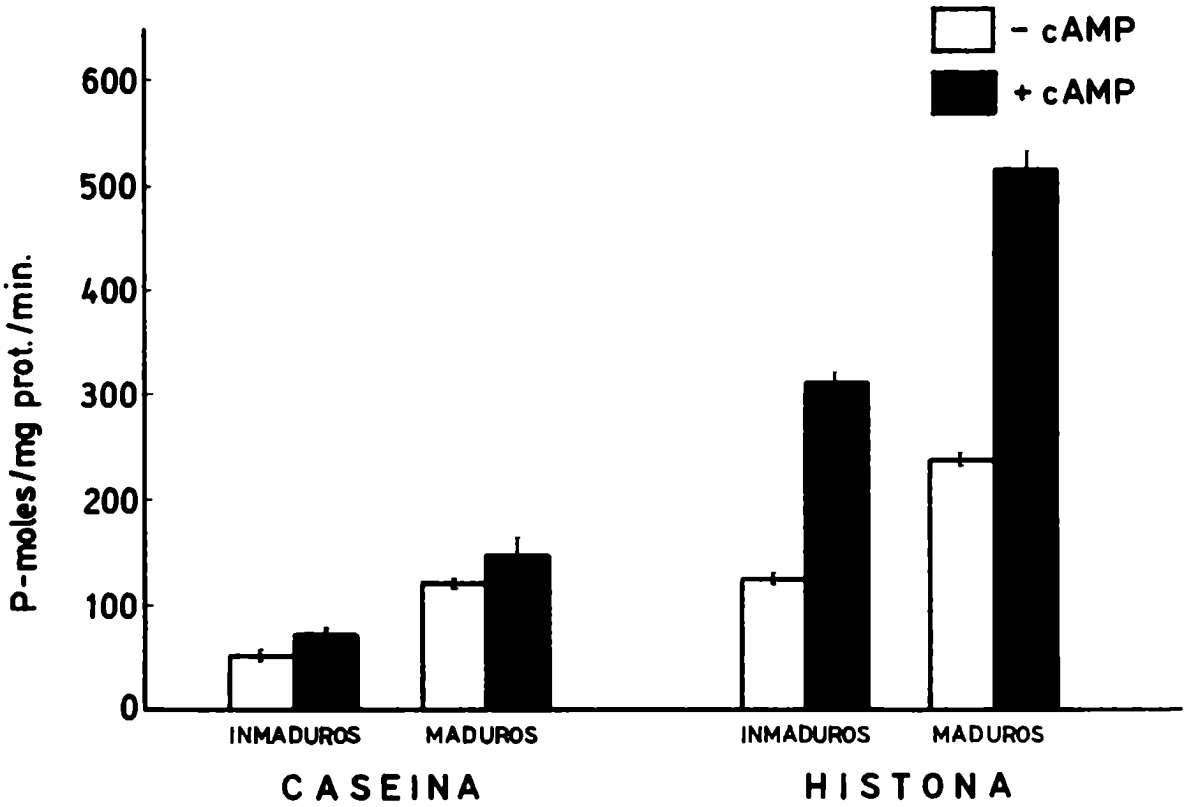


Figura 5: Actividad de proteína quinasa en homogenizados de testículos de ratas maduras e inmaduras (22-24 días). Los valores representan el valor medio de 5 animales ± error standard.

Un hecho que se desprende de los datos presentados en la figura 5 es que la actividad específica de proteína quinasa en testículo de animales maduros es aproximadamente el doble de la actividad en animales inmaduros. Este hecho es independiente del sustrato exógeno que se haya utilizado: caseína o histona. Otra observación que puede deducirse es que la activación que produce el AMP cíclico sobre la proteína quinasa testicular es mucho mayor cuando se determina la actividad en presencia de histona que cuando se determina en presencia de caseína.

b) Actividad de proteína quinasa en túbulo seminífero y tejido intersticial aislados

Como ya se indicó el testículo cumple dos papeles, uno hormonal y otro gametogénico; el primero involucra síntesis y secreción de testosterona por las células intersticiales o de Leydig, las que se encuentran entremezcladas en grupos entre los túbulos seminíferos como se puede observar en la figura 6. La segunda función involucra la espermatogénesis que es el desarrollo y maduración de células germinales en los túbulos seminíferos.

Para averiguar en cuál de estas dos estructuras se produce el cambio de actividad con la maduración, se utilizaron testículos de animales maduros e inmaduros y se separaron los túbulos seminíferos y el tejido intesticial bajo un microscopio de disección de acuerdo a la técnica de Christensen y Mason (97)

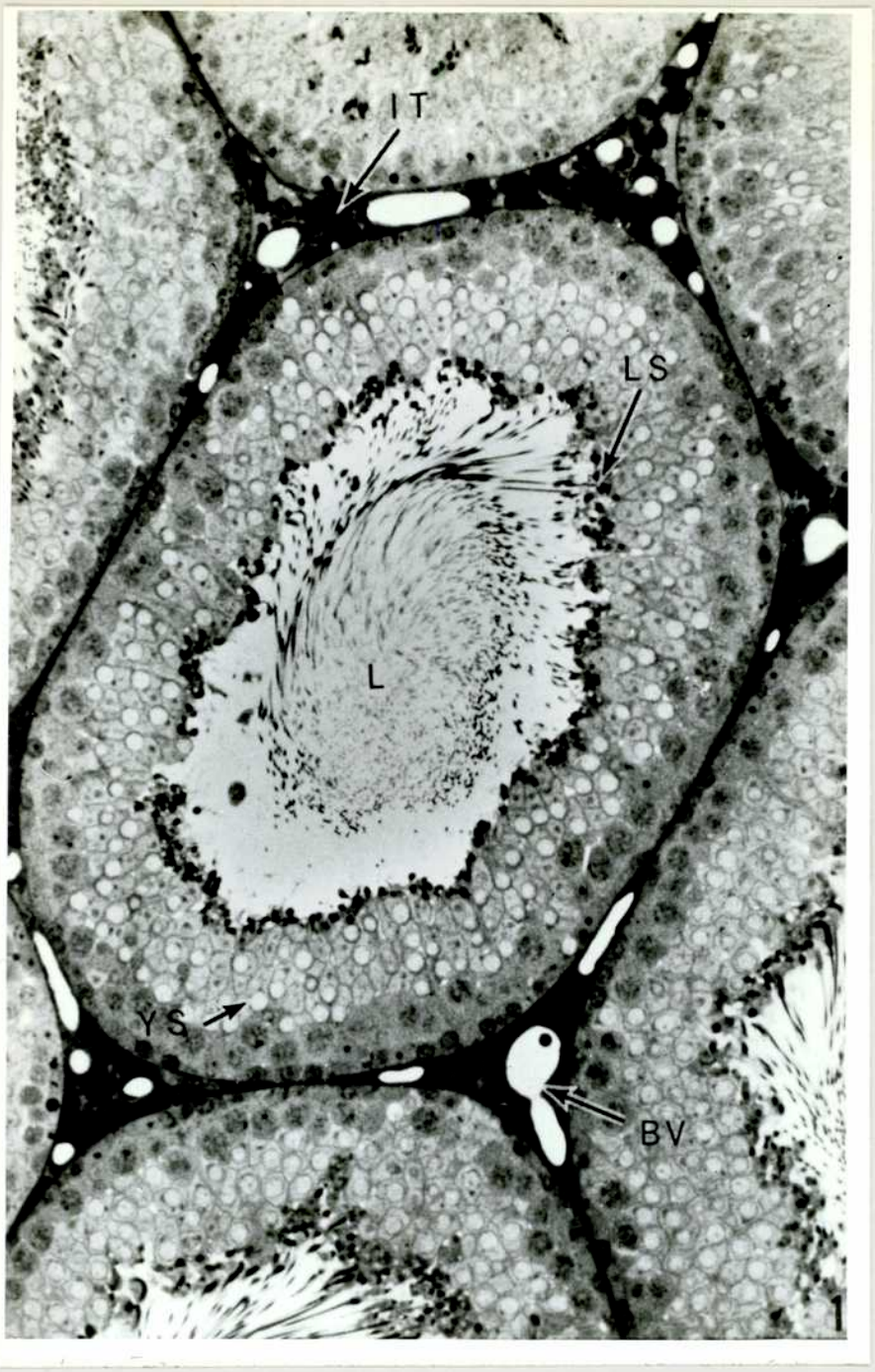
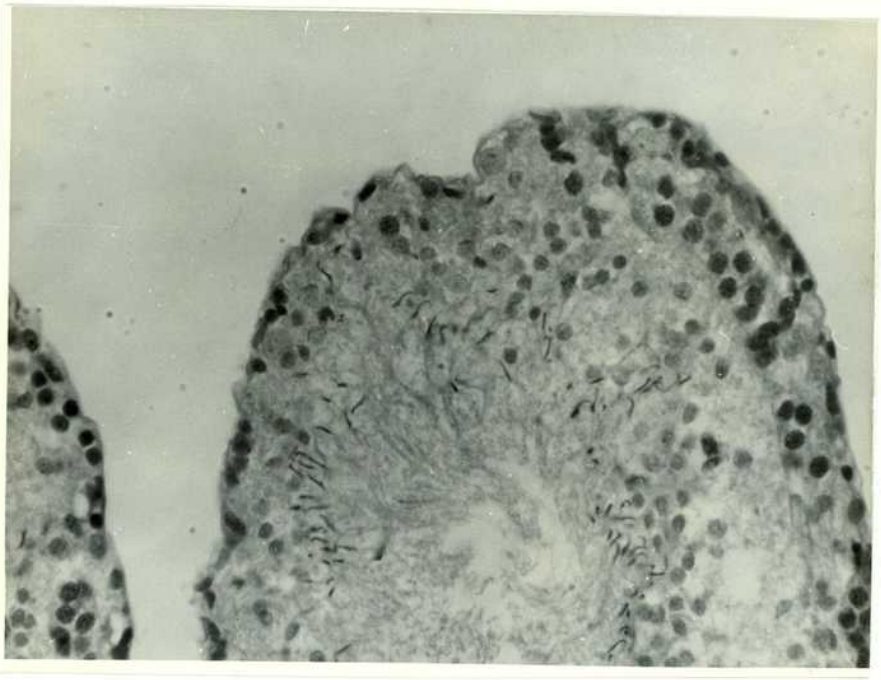
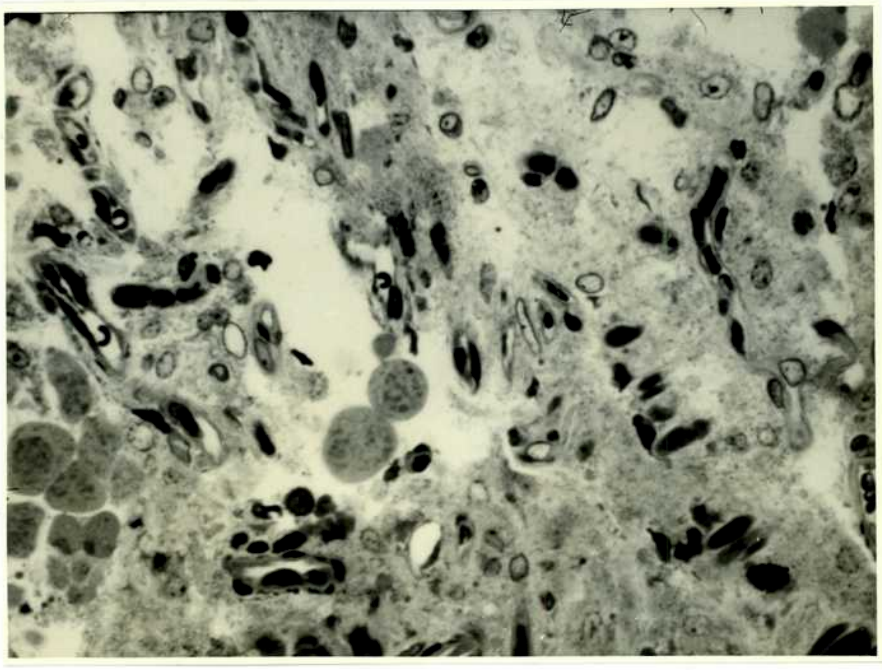


Figura 6: Vista general de la estructura del testículo con microscopio óptico, con un túbulo central. Rodeando los túbulos está el tejido intersticial (IT).





Figuras 7 y 8: Microfotografías al microscopio óptico de túbulos (arriba) y células intersticiales (abajo) aislados.

Todo este proceso tuvo lugar a 4°C y se realizó el adecuado control histológico. Ver figuras 7 y 8.

Se homogeneizaron por separado los túbulos y el tejido intersticial y se determinó la actividad específica en ambas estructuras utilizando caseína como sustrato.

Como se puede ver en la figura 9, la actividad específica de proteína quinasa es mayor tanto en tejido intersticial como en los túbulos seminíferos de los animales maduros, sin embargo esta diferencia de actividad es mucho más notable en los túbulos seminíferos. Además, la actividad específica en los túbulos seminíferos de los animales maduros es varias veces más alta que en el respectivo tejido intersticial. Teniendo en cuenta lo expuesto y que, además, los túbulos seminíferos comprenden alrededor del 90% del peso del testículo, se puede deducir que la proteína quinasa del testículo está en su mayor parte en los túbulos seminíferos.

c) <u>Actividad de proteína quinasa en una preparación de espermatozoides parcialmente purificados de testículo</u>

Como la primera diferencia histológica que se puede señalar entre los túbulos seminíferos de animales maduros e inmaduros es que en los primeros se ha completado la espermatogénesis (y además, ya ha sido descripto que los espermatozoides de epidídimo tienen una apreciable actividad de proteína quinasa 73, 76) se decidió tratar de purificar los espermatozoides testiculares y determinar su actividad. Para ello se

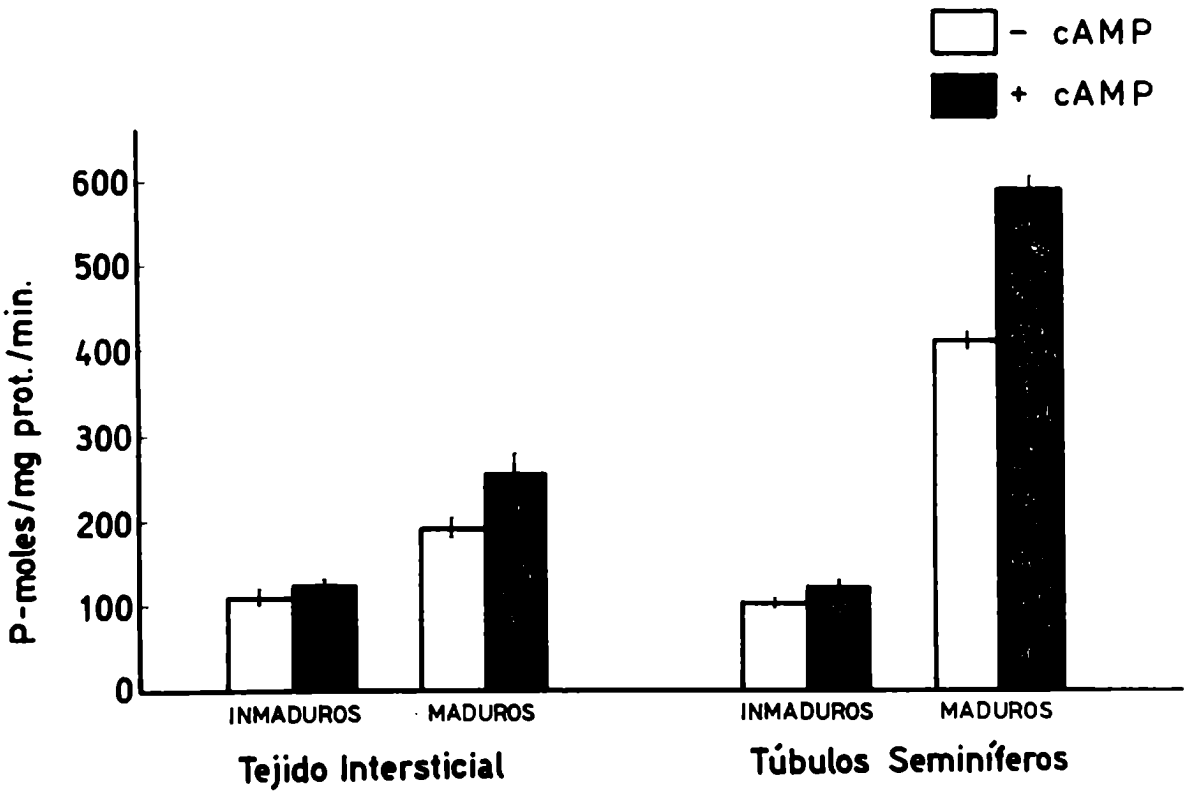


Figura 9: Actividad de proteina quinasa en tejido intersticial y túbulos seminíferos de testículos de rata de 22 y 90 días de edad. La medida se efectuó utilizando caseina como sustrato. Los valores representan el valor medio de 3 animales ± error standard.

tomaron testículos de animales maduros, se colocaron en una cápsula de Petri, conteniendo EDTA 4mM, todo sobre hielo. Los testículos fueron cuidadosamente desgarrados con pinzas para permitir la salida de los espermatozoides ya formados.

Los restos celulares se separaron por centrifugación a 200 g durante diez minutos. La suspensión sobrenadante de células se centrifugó a 800 x g durante 15 minutos y el precipitado de espermatozoides se resuspendió y homogenizó como en los casos anteriores.

La eficiencia del método se controló por examen histológico. Ver figura 10.

Los datos obtenidos se presentan en la tabla VI.

Tabla VI

Actividad de proteína quinasa en homogenato de espermatozoides parcialmente purificados en testículo de rata (en p moles/mg prot./min.

CASEINA			HISTONA		
-cAMP	+cAMP	%de aumento con cAMP	-cAMP	+cAMP	%de aumento con cAMP
74±2	88±8	19	91±6	150±17	65

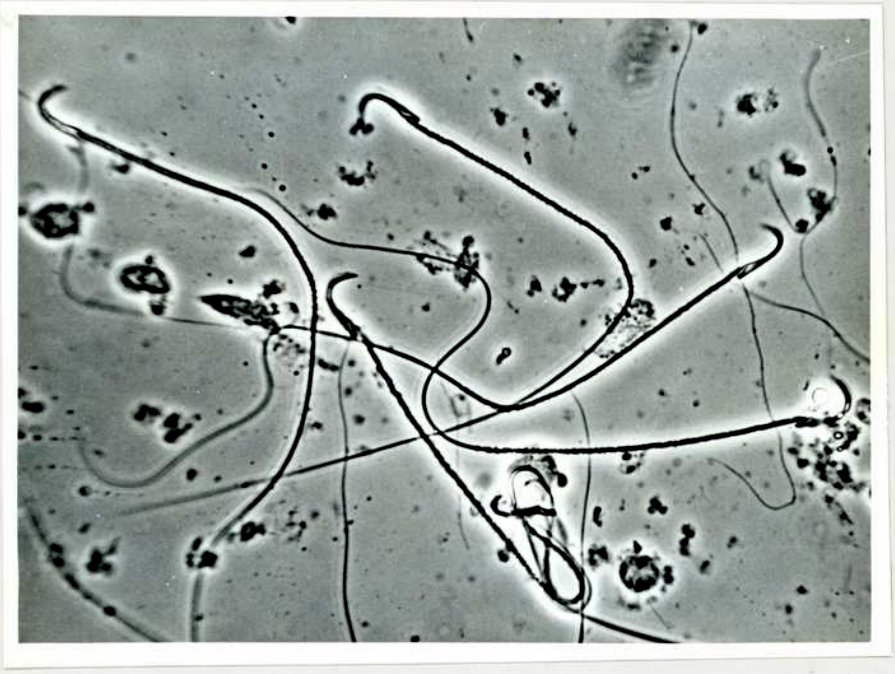


Figura 10: Microfotografía, en contraste de fase, de espermatozoides de testículo.

Como se puede observar, la actividad específica de esta preparación es menor que la similar de testículo de animales maduros, ya sea que se consideren los resultados obtenidos utilizando histona o caseína y para las determinaciones efectuadas tanto en ausencia como en presencia de AMP cíclico.

Este hecho parece indicar que las diferencias que se encontraron entre las actividades específicas de proteína quinasa, de testículos de animales maduros e inmaduros, no se debe a la proteína quinasa de los espermatozoides "libres".

d) <u>Actividad testicular de proteína quinasa en función de la edad del animal</u>

Los resultados obtenidos hasta ahora parecían indicar la importancia de estudiar con más detalle el lapso comprendido entre los 21 y 90 días de edad; con este fin se utilizaron testículos de ratas de 21, 35, 45, 60 y 90 días. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11.

En esta figura se puede observar que el mayor cambio de actividad de proteína quinasa se obtiene en los animales comprendidos entre los 35 y 45 días de edad. En efecto, entre

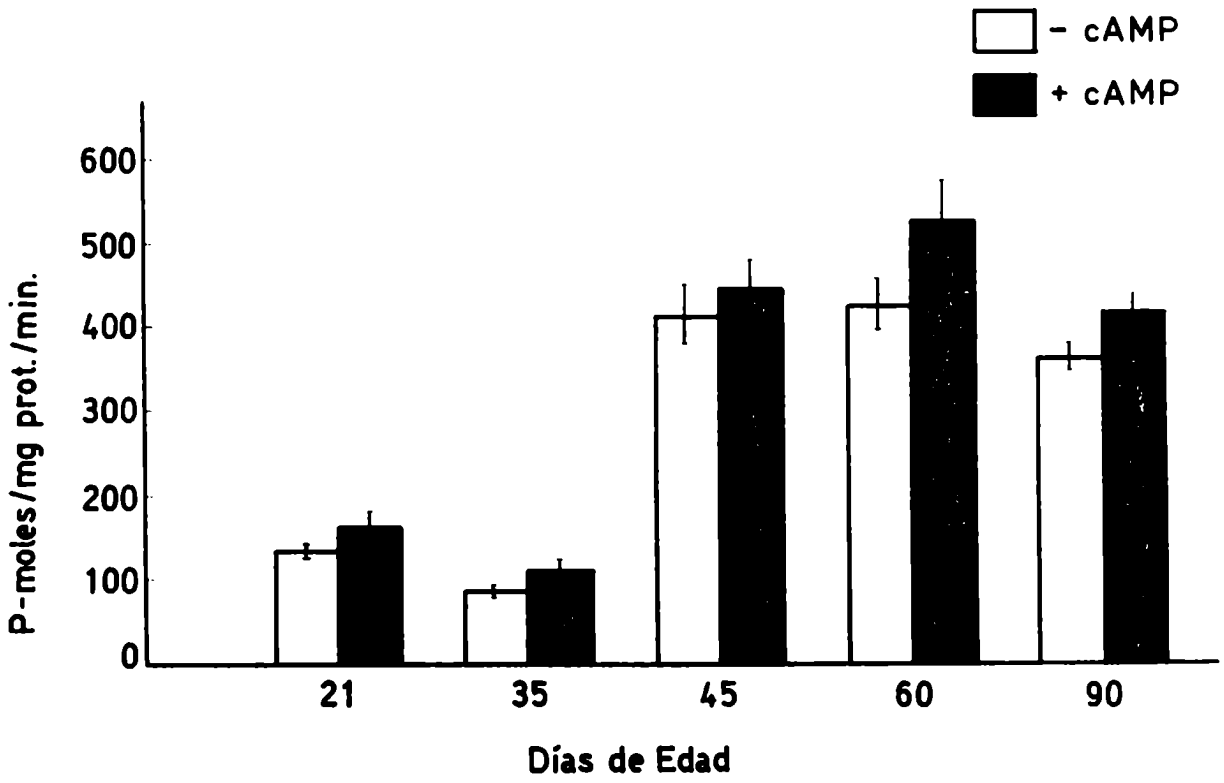


Figura 11: Actividad de proteina quinasa testicular en función de la edad del animal. Los valores representan el valor medio de 5 animales ± error standard con caseina como sustrato.

estas dos edades se produce un fuerte aumento de actividad enzimática y los valores que presentan los animales de 45 días son similares a los de los animales adultos.

De acuerdo a los trabajos de Huckins (106), en ratas Wistar la duración de la espermatogénesis en los animales prepúberes es aproximadamente de 48.5-49 días; esto indica que los espermatozoides ya formados como tales recién aparecen a esta edad. El hecho de que los testículos de animales de 45 días ya tengan la misma actividad enzimática que los animales adultos, refuerza los datos obtenidos con la preparación enriquecida en espermatozoides, lo que parece excluir a estos últimos como responsables de este aumento de actividad y parece indicar que el mismo se produce durante los procesos de metamorfosis que sufren las espermátidas para llegar a espermatozoides.

e) <u>Purificación parcial de proteína quinasa de testículo de rata</u>

El problema de si una sola proteína quinasa inicia las varias funciones que están mediadas por el AMP cíclico, o si un número variado de isoenzimas está involucrado en su diversidad de acciones, ha sido analizado en los últimos años por varios autores y se ha demostrado la presencia de diferentes isoenzimas en varios tejidos, por ejemplo, útero de ternera (66), músculo esquelético de conejo (107), músculo de pollo (108), glándula mamaria de ratón (64), hígado de rata (52, 109), eritro-

citos y reticulocitos de conejo (110, 22), espermatozoides de epidídimo bovino (73, 76), etc.

Con el fin de estudiar la posible presencia de varias enzimas en el testículo y además para investigar si las variaciones de actividad observadas entre animales inmaduros y adultos se mantenían en preparaciones más purificadas, se aplicaron las primeras etapas de purificación empleadas por Kuo y col. (77) en testículo bovino. El homogeneizado se centrifugó a 27.000 xg durante 20 minutos y el sobrenadante se ajustó a pH 4.8 por el agregado de ácido acético 1M, gota a gota con agitación. Se recentrifugó a 27.000 xg durante 30 minutos y el sobrenadante se llevó a pH 6.5 con buffer de fosfato de potasio 1M pH 7.2

Se determinó la actividad específica en la fracción soluble a pH 4.8 y se encontró que el factor de purificación era muy bajo, aproximadamente 0.5. En consecuencia, se quiso investigar si esta pérdida de actividad se debía a inactivación de la enzima por la acidificación a ese pH o a pérdidas de otro tipo. Para ello se efectuó otra preparación similar y el precipitado que se separó al acidificar, se redisolvió y neutralizó del mismo modo que el sobrenadante.

En la tabla VII se presentan los resultados obtenidos.

Como se puede observar, una gran parte de la actividad original de proteína quinasa queda en el precipitado de pH 4.8.

Otro hecho que se ve en esta tabla es que el comportamiento de la actividad enzimática en ambas fracciones es completamente distinto. La fracción sobrenadante tiene actividad específica muy baja, menor que el homogeneizado original y su dependencia

Tabla VII

Purificación parcial de proteína quinasa de testículo de ratas adultas

Fracción	Proteína total g	cAMP	Actividad específica p moles/mg prot./min. ($\times 10^{-2}$)		Actividad total p moles/min ($\times 10^{-3}$)	
			Caseína	Histona	Caseína	Histona
Sobrenadante 600 g	1.3	-	2.1	1.3	291	172
		+	2.5	3.0	340	401
Sobrenadante 27000 g	1.0	-	3.5	1.5	351	147
		+	4.5	4.3	455	433
Sobrenadante pH 4.8	0.4	-	0.8	0.4	29	14
		+	1.6	2.2	59	82
Precipitado pH 4.8	0.6	-	8.0	2.6	450	148
		+	10.6	6.9	595	390

Tabla VII (continuación)

Fracción	cAMP	Factor de purificación		% de recuperación		
		Caseína	Histona	Proteína	Caseína	Histona
Sobrenadante 600 g	-	1.0	1.0	100	100	100
	+	1.0	1.0		100	100
Sobrenadante 27000 g	-	1.6	1.1	74	121	85
	+	1.8	1.5		134	108
Sobrenadante pH 4.8	-	0.4	0.3	27	10	8
	+	0.6	0.8		17	21
Precipitado pH 4.8	-	3.7	2.1	42	155	86
	+	4.2	2.3		175	97

del AMP cíclico es bastante notable con cualquiera de los dos sustratos: histona o caseína. En cambio, la fracción que precipita tiene una actividad específica mucho mayor, y su dependencia con el AMP cíclico varía con el sustrato utilizado. Cuando se emplea histona es muy estimulada por el nucleótido, y prácticamente no hay activación con caseína.

Si se observan las actividades enzimáticas totales de cada fracción se puede ver que la actividad total del precipitado medida en presencia de caseína es mayor que la del homogenato original. Utilizando histona esto no es tan evidente, sin embargo se nota algo similar si se suman las actividades de ambas fracciones: precipitado más sobrenadante de pH 4.8. Esto parecería indicar la presencia de un inhibidor que queda en la fracción sobrenadante, el que sería algo distinto del descripto por Walsh y col. (35) y Ashby y Walsh (111) en músculo esquelético y testículo de conejo respectivamente, ya que éste actúa independiente del sustrato utilizado.

f) Variaciones de las fracciones que se separan a pH 4.8 con la maduración sexual

El hecho de que a pH 4.8 se separen dos fracciones enzimáticas de distinto comportamiento, indujo a investigar cuál de ellas, o si ambas, varían con la maduración sexual del testículo.

Se tomaron ratas maduras e inmaduras, se homogeneiza-

sus testículos, se acidificó como ya se indicó y se determinó actividad específica de ambas fracciones. Los resultados se pueden ver en la figura 12.

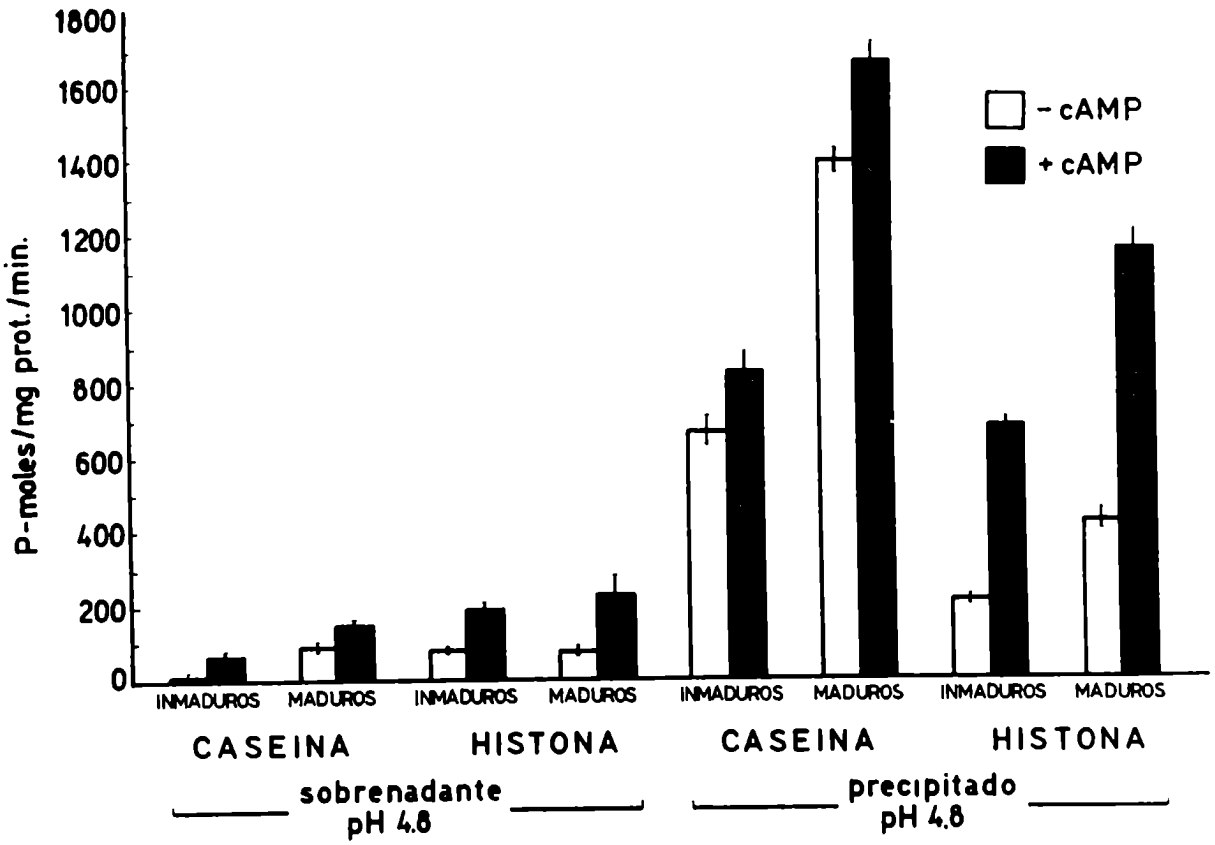


Figura 12: Actividad de proteína quinasa en las fracciones obtenidas acidificando a pH 4.8, homogeneizados de testículos de ratas maduras e inmaduras.

Si se comparan las actividades específicas de proteína quinasa en los precipitados de pH 4.8 de animales maduros e inmaduros se puede observar que usando caseína o histona, ésta es doble en los maduros. En cambio, cuando se comparan las fracciones que permanecen solubles a pH 4.8 se puede ver que en este caso la variación depende del sustrato utilizado. La actividad específica de esta fracción es mayor en los animales maduros que en los inmaduros cuando se la mide en presencia de caseína; en cambio, no hay variación cuando se la mide en presencia de histona.

Además se puede observar otra diferencia entre las fracciones sobrenadantes de ambos grupos. La activación que produce el AMP cíclico cuando se mide la proteína quinasa en presencia de caseína está en relación inversa con la edad del animal: es mucho mayor en los animales inmaduros que en los maduros.

Todo esto podría indicar la presencia de varias isoenzimas cuya proporción relativa se modificaría de modo disimilar con la maduración sexual.

Con el fin de verificar qué sucede con la aplicación del mismo tratamiento a un homogeneizado de espermatozoides, se efectuó como antes una preparación de espermatozoides de testículo, que se homogeneizó, acidificó a pH 4.8 y determinó la actividad específica de ambas fracciones. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla VIII.

Tabla VIII

Actividad de proteína quinasa en las fracciones que se obtienen al acidificar a pH 4.8 un homogenato de espermatozoides de testículo

Sustrato	3' 5' AMP	p moles/ mg prot./ min	
		precipitado	sobrenadante
caseína	-	445±20	158±14
	+	610±36	212±7
histona	-	215±35	46±3
	+	336±48	97±7

Como se puede observar, las actividades específicas de las proteínas quinasas de los espermatozoides son inferiores a las observadas en las fracciones de testículo entero de rata adulta (Figura 12), por lo tanto no pueden ser la causa del incremento observado en testículos de animales adultos

g) Acción de hormonas

Una de las causas que podrían explicar las variaciones de la actividad testicular de proteína quinasa que se observan con la maduración sexual, es la diferencia entre los estados hormonales de un animal adulto y de uno inmaduro. Para investigar este hecho se trataron grupos de animales inmaduros con administración intraperitoneal, de LH, FSH o testosterona.

En los experimentos agudos se inyectó 200 μg de LH o de FSH, disueltos en solución fisiológica, cuatro horas antes de sacrificar los animales. En el tratamiento con testosterona se inyectó una suspensión de 2 mg de testosterona (en solución fisiológica) siete horas antes. En los experimentos crónicos con LH se efectuaron dos inyecciones subcutáneas diarias de 50 μg c/u durante cinco días. En todos los casos, los controles se inyectaron con solución fisiológica. Como se puede observar en la tabla IX, ninguno de estos tratamientos modificó la actividad específica de proteína quinasa de los testículos de animales inmaduros.

Tabla IX

Actividad de proteína quinasa en homogenato de testículo de ratas inmaduras tratadas con hormonas (a)

Experimento	Tratamiento	p moles /mg prot./ min. -cAMP	+cAMP
1	control	59±4	70±4
	FSH (4hs IP)	61±3	71±3
	LH (4 hs IP)	50±6	60±3
2	control	49±4	62±4
	Testosterona (7 hs IP)	52±6	74±8
3	control	45±2	58±3
	LH (5 días SC)	42±3	58±4

(a) El sustrato empleado fue caseína.

Esto parecería indicar que el aumento de actividad enzimática que se observa en los testículos de animales entre los treinta y cinco y cuarenta y cinco días de edad debe analizarse, teniendo en cuenta principalmente las variaciones de tipos celulares que se producen en el testículo durante el ciclo espermatogénico.

De acuerdo a los trabajos de Clermont y Perey (112) en ratas Sherman, las espermátidas se diferencian de los espermatozoides entre los treinta y cinco y cuarenta y cinco días de edad. Una secuencia temporal similar fue encontrada por Huckins (106) para ratas Wistar prepúberes, a la edad de veinticinco días aparece el primer estadio de espermátidas las que necesitan veintitres días para sufrir completamente la metamorfosis a espermatozoides. En consecuencia el cambio histológico más marcado que se produce en el testículo entre los treinta y cinco y cuarenta y cinco días de edad está relacionado con la metamorfosis de las espermátidas. Parecería entonces ser éste el proceso que requiere una mayor actividad de proteína quinasa.

h) Purificación de las fracciones por cromatografía en columnas de DEAE celulosa

Las diferencias observadas en las fracciones que se separan por acidificación a pH 4.8 sugerían la heterogeneidad de estas fracciones; por lo tanto se decidió efectuar una investigación más profunda sobre la presencia de distintas isoenzimas. Se preparó un homogeneizado de testículo de ratas

adultas y se acidificó a pH 4.8, separándose el precipitado y el sobrenadante. Dichas fracciones se sometieron separadamente a cromatografía en columnas de DEAE celulosa.

Para ello, tanto el precipitado disuelto en EDTA como el sobrenadante, neutralizados, se precipitaron por agregado de sulfato de amonio sólido (20-60% saturación). Las proteínas precipitadas se recogieron por centrifugación y se dializaron, toda la noche, contra tres cambios de buffer fosfato de potasio 5mM (pH7.0) que contenía EDTA 2mM.

Las soluciones enzimáticas se adsorvieron con columnas de DEAE celulosa, equilibradas con el mismo buffer. Las columnas se lavaron con el mismo buffer y se eluyó la actividad enzimática con un gradiente lineal de buffer fosfato de potasio pH 7.0 de 5 a 500 mM, conteniendo EDTA 2 mM.

Como se puede observar en la figura 13 el comportamiento de ambas fracciones fue diferente. El sobrenadante se separó en dos fracciones y el precipitado en tres, además la elución de los picos en ambos casos ocurrió a distinta fuerza iónica del buffer. Los dos picos del sobrenadante resultaron ser activables por el AMP cíclico pero de un modo diferente, según se utilizase caseína o histona en el ensayo. Con ambos sustratos fue más activable el pico II, en cambio el pico I resultó ser activable por el AMP cíclico cuando se ensayó con histona.

El precipitado se separó en tres picos si se consideran las medidas efectuadas empleando caseína como sustrato. En este caso no hubo activación por AMP cíclico, incluso pareció haber una ligera inhibición. En cuanto a los ensayos efectuados utilizando histona como sustrato, el pico III resultó inactivo y los picos I y II mostraron una apreciable activación por AMP cíclico.

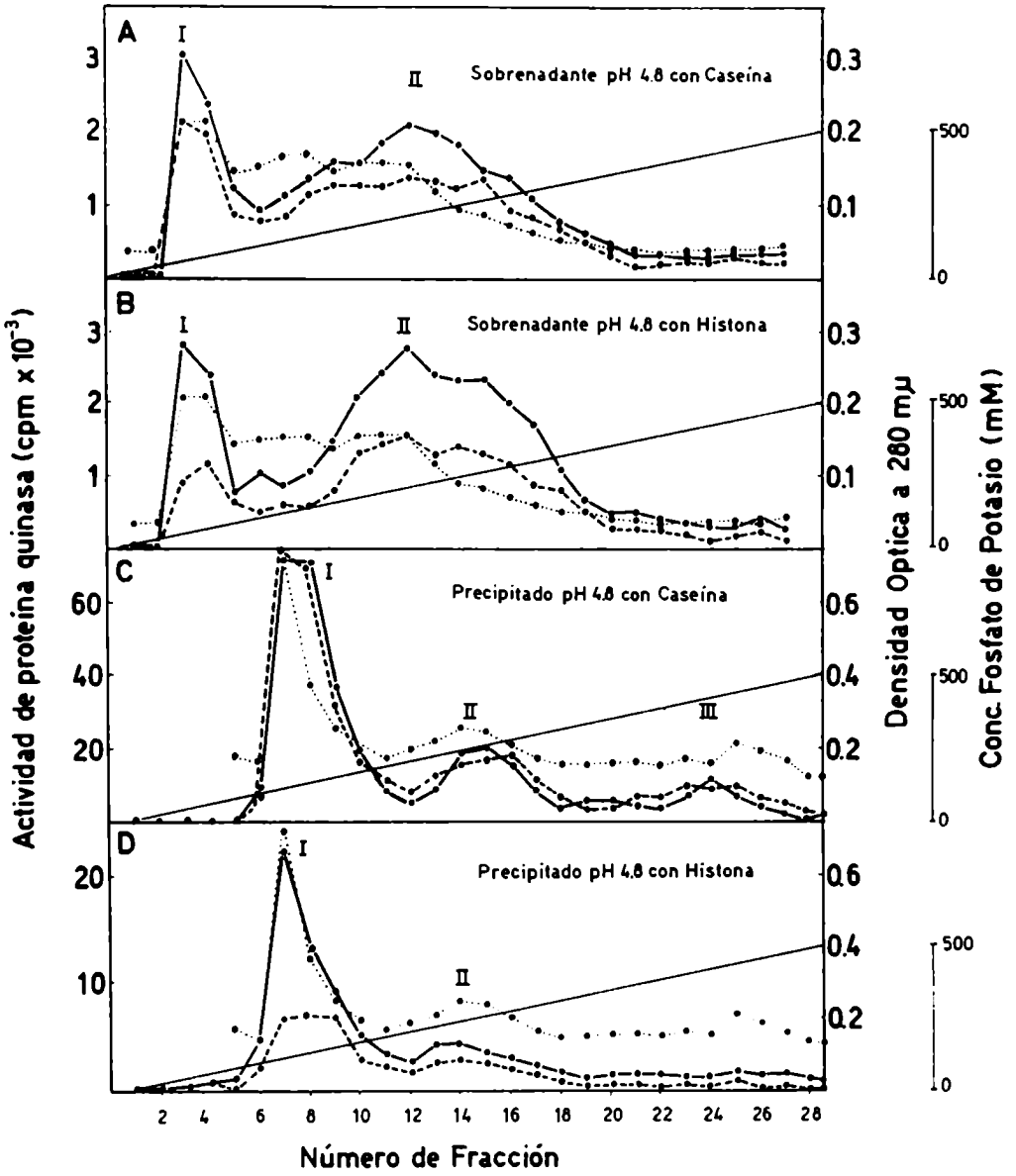


Figura 13: Cromatografía en columna de DEAE celulosa del sobrenadante y precipitado de pH 4.8
——• Actividad de proteína quinasa en presencia de AMP cíclico
•----• Actividad de proteína quinasa en ausencia de AMP cíclico
•·····• Densidad óptica a 280 mμ

En un experimento posterior se procedió a reunir el contenido de los tubos correspondientes a cada pico, se concentraron con sulfato de amonio (0.5 g/ml) y se dializaron como se indicó anteriormente. Se determinó la actividad específica en cada fracción. Los resultados se expresan en la tabla X.

Tabla X

Actividad de proteína quinasa de las distintas fracciones separadas por cromatografía en DEAE celulosa (en p moles de ^{32}P incorporados por mg prot/min)

Fracción	Caseina		Histona	
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
I Sobrenadante (fracción 3-5)	93	107	36	72
II Sobrenadante (fracción 9-17)	111	230	148	468
I Precipitado (fracción 6-9)	1088	1318	186	786
II Precipitado (fracción 13-16)	854	793	123	435
III Precipitado (fracción 23-26)	3177	2913	226	490

Con cualquiera de los dos sustratos utilizados, caseína o histona, la actividad específica de proteína quinasa fue mayor en los picos del precipitado que en los del sobrenadante. Esto es mucho más marcado cuando se considera las actividades con caseína ya que los picos del precipitado tienen gran actividad específica con este último sustrato. Todos los picos, ya sea del sobrenadante o del precipitado fueron más activables por AMP cíclico cuando se midieron en presencia de histona.

Utilizando las fracciones purificadas se verificaron las condiciones de linealidad en función del tiempo de incubación y de la cantidad de proteína enzimática. Un típico experimento en este aspecto se ve en las figuras 14 y 15.

Se puede observar que la actividad resultó ser proporcional tanto en el tiempo de incubación (hasta treinta minutos) como con la concentración enzimática (hasta 50 μ de proteína).

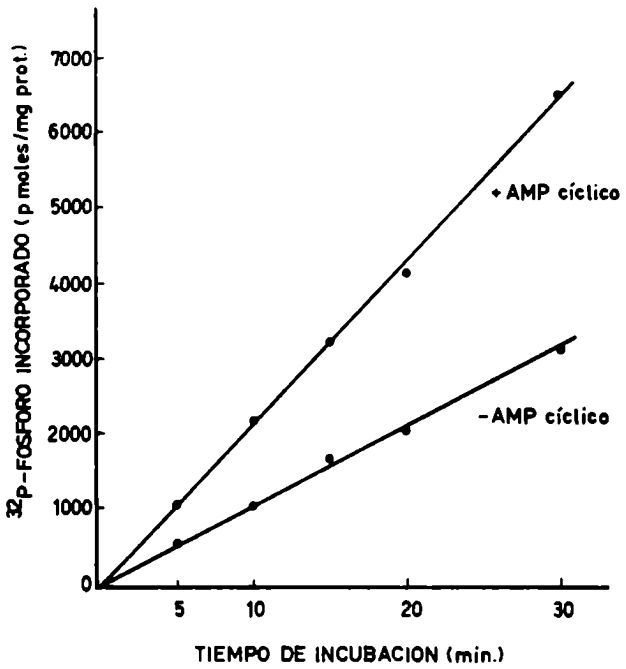


Figura 14: Fosforilación de caseína en función del tiempo de incubación; 25 µg de la fracción II s se ensayaron, en las condiciones descriptas, durante los tiempos indicados en la figura.

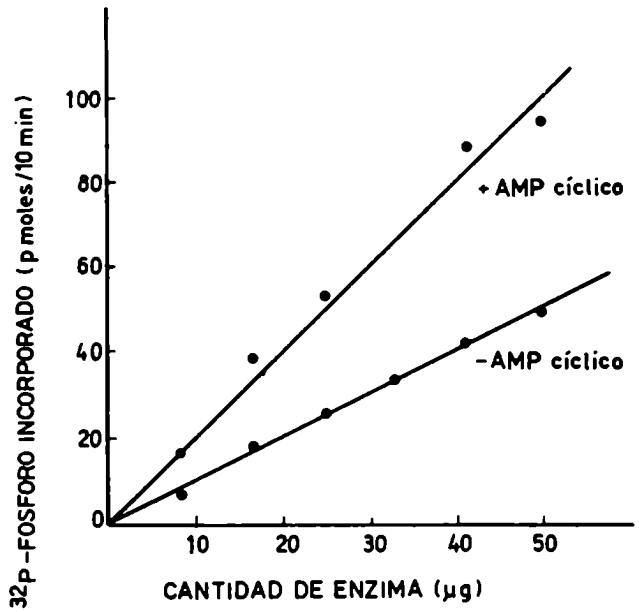


Figura 15: Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de incorporación de caseína; se utilizó la fracción II s en las cantidades indicadas en las abscisas.

i) Efecto de la variación de concentraciones de AMP cíclico sobre la actividad específica de las proteínas quinasas

Debido a las distintas activaciones observadas con AMP cíclico en cada uno de los picos que se separaron en las columnas de DEAE, se decidió estudiar la actividad de estas preparaciones enzimáticas, en función de la concentración del nucleótido. El fin perseguido fue determinar si las fracciones no activables por la concentración utilizada del nucleótido, lo eran a otras concentraciones. Se decidió utilizar como sustrato la caseína, pues es con éste donde las diferencias son más evidentes. La concentración del nucleótido varió entre 0.03 a 500 μM.

En el caso de los dos picos del sobrenadante, la estimulación alcanzó su máximo valor a aproximadamente 10 μM. Concentraciones más altas de AMP cíclico resultaron ser inhibitorias. Ver figura 16.

En el caso de los tres picos obtenidos con la fracción que precipita a pH ácido, su actividad específica no varió significativamente con ninguna de las concentraciones de AMP cíclico ensayados. Ver figura 17.

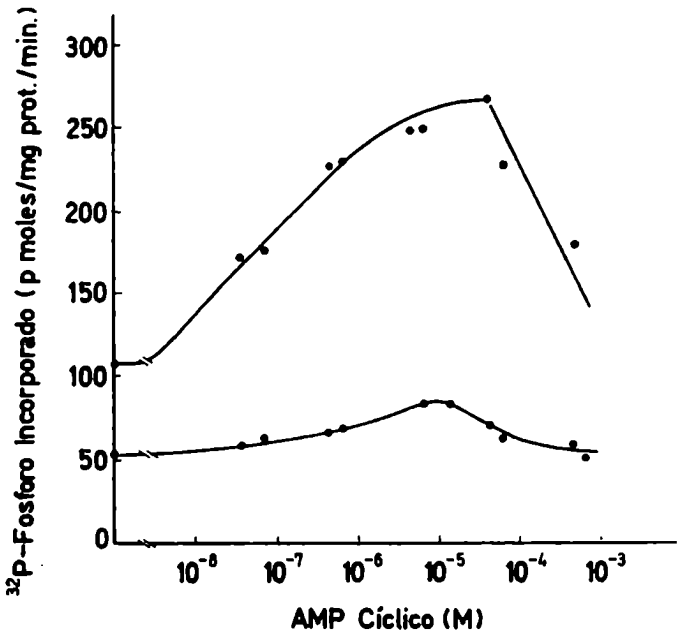


Figura 16: Actividad de proteína quinasa de las fracciones I s (abajo) y II s (arriba) en presencia de concentraciones variables de AMP cíclico.

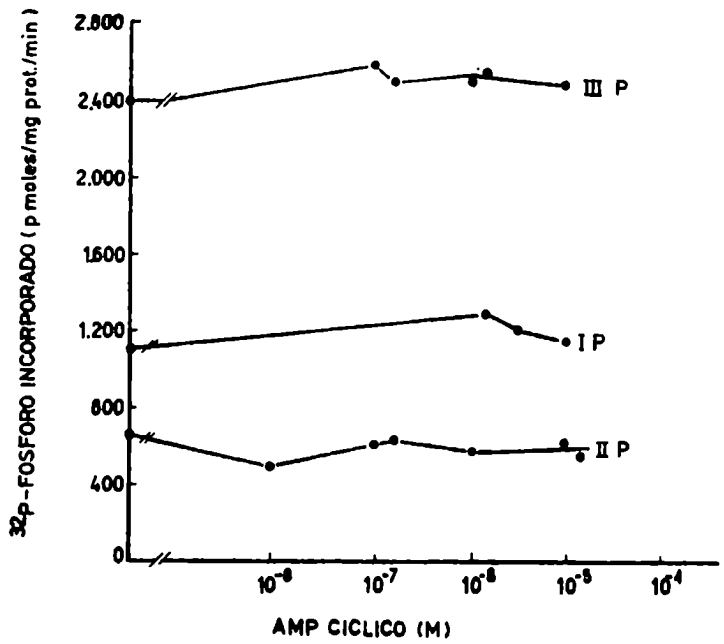


Figura 17: Actividad de proteína quinasa de las fracciones I P, II P y III P en presencia de concentraciones variables de AMP cíclico.

También se investigó si el GMP cíclico estimulaba los picos del precipitado cuando se miden en presencia de caseína, con resultado negativo. En la tabla XI se indican los datos obtenidos con el pico II.

Tabla XI

Activación del pico II del precipitado de pH 4.8 por distintas concentraciones de GMP cíclico

(3', 5' -GMP)	p moles/mg prot./min.
0	635
10^{-6}	605
10^{-5}	640
5×10^{-5}	580
10^{-4}	650

j) Fosforilación de varias proteínas por las distintas fracciones separadas por DEAE celulosa

Se quiso comparar la actividad específica de todos los picos que se separaron mediante la acidificación del homogeneizado a pH 4.8 y subsecuente cromatografía en columnas de DEAE celulosa, con distintos sustratos. Para ello se utilizaron: caseína, mezcla de histonas, histona rica en lisina, histona rica en arginina, protamina y fosfovitina. Ver figura 18.

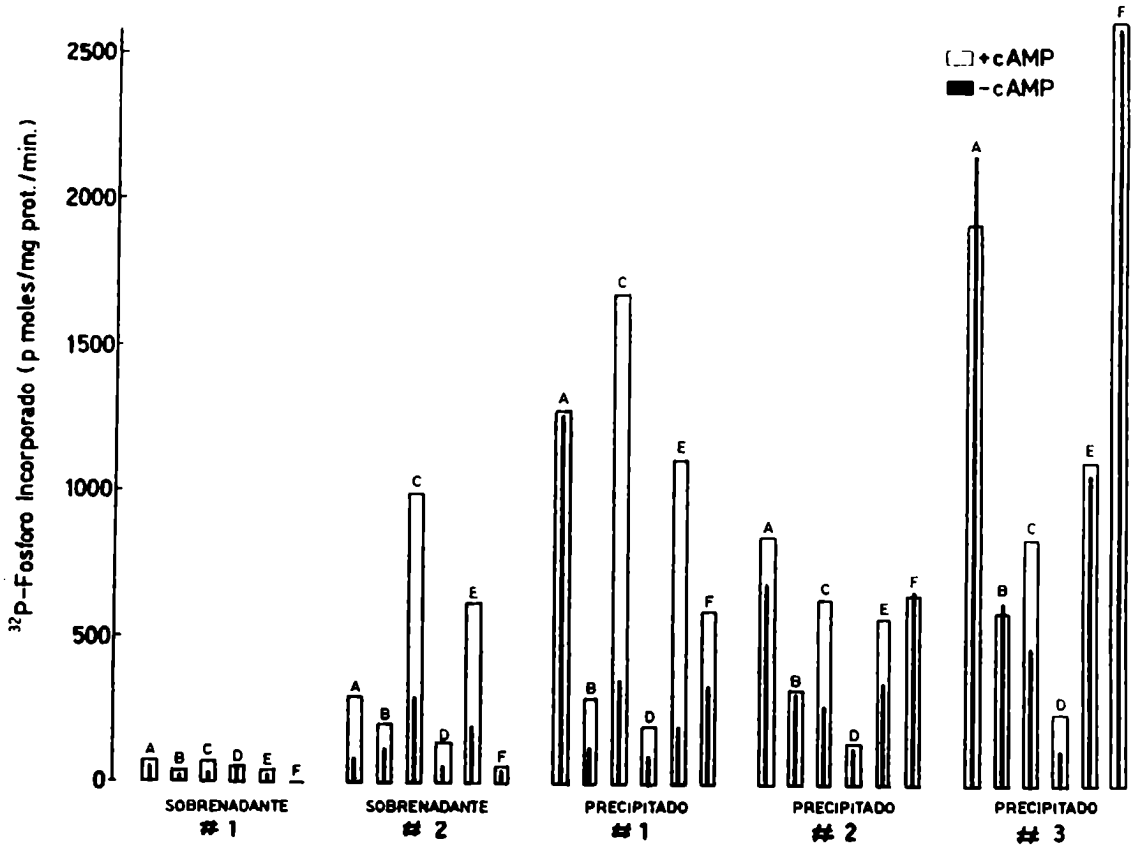


Figura 18: Actividad de proteína quinasa en las fracciones separadas por cromatografía en DEAE celulosa del sobrenadante y precipitado de pH 4.8.

Sustratos empleados:
- A: 600µg caseína
- B: 150µg protamina
- C: 150µg histona de timo de ternera
- D: 150µg histona rica en arginina
- E: 150µg histona rica en lisina
- F: 150µg fosfovitina

Como se puede ver en la figura, cada pico muestra un perfil particular y diferente de los demás con respecto de los sustratos utilizados; además, la activación que produce el AMP cíclico en cada pico varía con el sustrato.

En general, la mayor estimulación hallada fue en el pico II del sobrenadante ensayado con mezcla de histonas o histona rica en lisina y en el pico I del precipitado, cuando se utilizan los mismos sustratos.

En todas las fracciones el AMP cíclico produce su máxima estimulación cuando la actividad se mide con mezcla de histonas.

Se efectuó un estudio similar con GMP cíclico comparando las activaciones producidas por los dos nucleótidos cíclicos; en ningún caso las diferencias entre ambos fueron mayores del 10%. No se pudo comprobar la presencia de ninguna isoenzima de proteina quinasa dependiente solamente de GMP cíclico. Ver tabla XII.

Tabla XII

Actividad específica de la proteína quinasa en las fracciones separadas por acidificación a pH 4.8 y cromatografía en DEAE celulosa

	Sobrenadante I			Sobrenadante II		
	-	+cAMP	+cGMP	-	+cAMP	+cGMP
Cas	58	68	72	94	294	244
Prot	31	38	34	121	203	199
Hist	36	72	78	303	984	778
Hist A	64	63	71	62	140	114
Hist L	22	37	31	188	629	479
Fosfo	0	0	0	38	53	40

	Precipitado I			Precipitado II			Precipitado III		
	-	+cAMP	+cGMP	-	+cAMP	+cGMP	-	+cAMP	+cGMP
Cas	1272	1275	1364	701	860	899	2169	1930	2835
Prot	130	297	266	320	332	345	641	593	642
Hist	361	1696	1405	283	643	542	490	862	795
Hist A	99	203	213	130	138	151	129	251	193
Hist L	199	1124	764	374	587	450	1077	1127	1211
Fosfo	349	576	636	683	674	717	2628	2653	2663

k) Cromatografía en columna de sefarosa-caseína

Un modo selectivo de purificación de enzimas es la cromatografía por afinidad. Las proteínas se pasan a través de una columna que contiene un polímero o gel insoluble al cual se ha unido convalentemente la sustancia adecuada. En el caso de las enzimas se ha encontrado que condiciones requeridas para este procedimiento las reúnen los derivados de agarosa (sefarosa), unidos a un sustrato de la enzima. Las proteínas que no tienen afinidad por el sustrato no son adsorbidas por la columna mientras que las que sí la tienen, quedan retenidas y deben ser eluídas, por ejemplo, aumentando la fuerza iónica.

Para utilizar este método se preparó una columna de sefarosa-caseína y se aplicó a la misma una alícuota de la fracción del homogeneizado que precipita a pH 4.8, una vez redisuelta y neutralizada. Se lavó la columna con una solución de buffer fosfato de potasio 10 mM pH 6.5, conteniendo EDTA 1mM y luego la proteína quinasa absorbida fue eluída con el mismo buffer conteniendo cloruro de sodio 0.6 M.

Con este procedimiento esa fracción se separó en dos picos que se comportaron de un modo diferente de acuerdo con el sustrato utilizado. Ver figura 19.

El primer pico que no fue retenido en la columna tuvo mayor actividad de proteína quinasa con histona que con caseína. El segundo pico, que sí fue retenido en la columna y se eluyó por la adición de cloruro de sodio 0.6 M, mostró por el contrario mayor actividad fosforilante con caseína que con histona.

En experiencias posteriores se reunió el contenido de los diversos tubos correspondiente a cada pico de actividad en dos muestras: pico I y pico II. Estas muestras se precipitaron con sulfato de amonio y se dializaron durante la noche de manera similar a la usada para las fracciones de la columna de DEAE celulosa. A estas dos fracciones se les determinó el grado de activación con AMP cíclico de sus proteínas quinasas utilizando cuatro proteínas distintas como substrato. Ver tabla XIII.

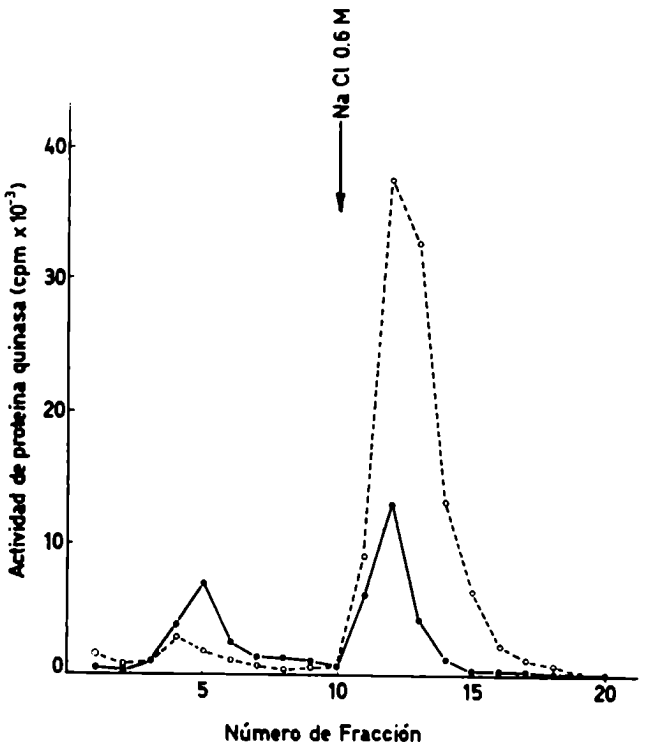


Figura 19: Actividad de proteína quinasa en las fracciones separadas por cromatografía en sefarosa caseína del precipitado de pH 4.8 c- - - -o sustrato:caseína
•——• sustrato:histona
Las medidas se efectuaron en presencia de AMP cíclico.

Tabla XIII

Actividad de proteína quinasa de los picos de una columna de caseína-sefarosa con diferentes sustratos[a]
(en p moles de ^{32}P transferidos por milígramo de prot. enzimática / min.).

Sustrato	Pico I (fracciones 3-6)[a]		Pico II (fracciones 11-15)[a]	
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
Caseína 600 μ g	31	91	402	451
Protamina 150 μg	37	54	26	19
Histona 150 μ g	72	163	63	66
Fosfovitina 150 μg	53	78	576	542
Relación $\frac{\text{caseína}}{\text{histona}}$	0.5	0.5	6.4	6.8

(a) Ver figura 19.

El primer pico mostró un apreciable grado de estimulación con AMP cíclico con todos los sustratos utilizados y la mayor actividad específica se encontró utilizando una mezcla de histonas como sustrato $\left(\frac{\text{act. con caseína}}{\text{act. con histona}}: 0.5\right)$

El segundo pico, resultó no ser activable por AMP cíclico con ninguno de los sustratos utilizados y en algunos casos hubo inhibición. La actividad específica de este pico fue mucho mayor cuando se utilizaron proteínas ácidas como sustrato, que cuando se utilizaron proteínas básicas $\left(\frac{\text{act.con cas.}}{\text{act.con hist.}}: 6.4\text{-}6.8\right)$

Posteriormente se midió la capacidad de unirse a AMP cíclico ^{3}H de ambas fracciones y las dos demostraron tener capacidad "ligadora", lo que demuestra que la falta de activación del segundo pico no se debe a la ausencia de la unidad receptora.

Cuando se efectuó una curva de AMP cíclico con ambos picos se encontró que el primero se activó al máximo a muy bajas concentraciones de nucleótido. Esta activación se mantuvo a concentraciones más altas. Ver figura 20.

En cambio, el segundo pico no se activó a ninguna de las concentraciones utilizadas y a altas concentraciones se observó inhibición. El sustrato utilizado para este ensayo fue caseína.

También se probó el efecto de agregado de GMP cíclico sobre el segundo pico (no activable por AMP cíclico) y se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla XIV.

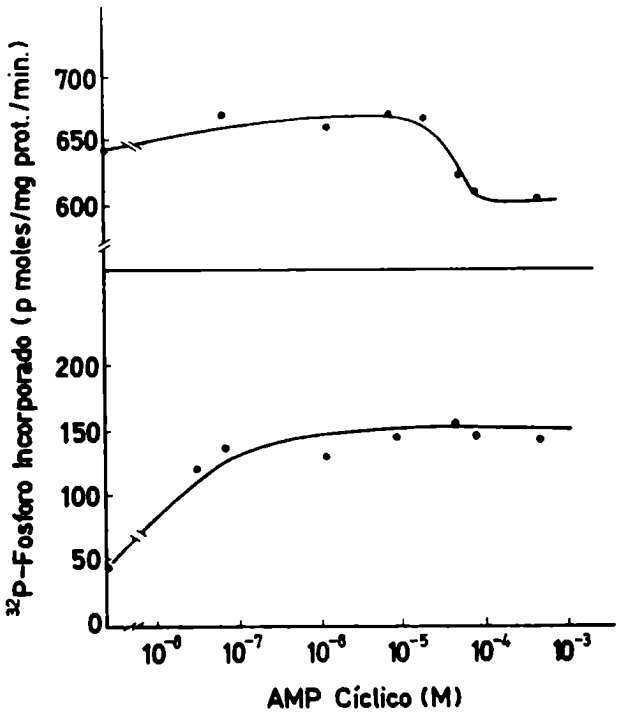


Figura 20: Actividad de proteína quinasa en las fracciones separadas por una columna de sefarosa-caseína en presencia de concentraciones variables de AMP cíclico. Sustrato utilizado: caseína; fracción N° 1: curva inferior, fracción N° 2: curva superior.

Tabla XIV

Efecto de varias concentraciones de GMP cíclico sobre la actividad de proteína quinasa del pico II obtenido de una columna de sefarosa

(3' 5' GMP)	P moles/mg prot./min
0	402
10^{-6}	509
10^{-5}	511
5×10^{-5}	545
10^{-4}	525

La ligera estimulación hallada no es suficiente para poder afirmar que esta fracción sea una proteína quinasa dependiente de GMP cíclico.

De los resultados anteriormente expuestos se puede concluir en que en el testículo de rata existen varias isoenzimas de proteína quinasa las que se distinguen por su diferente comportamiento con la acidificación a pH 4.8, disímil resolución con las columnas de DEAE celulosa y caseína-sefarosa y distinta actividad con cada uno de los sustratos utilizados y por su diverso grado de activación con el AMP cíclico.

1) Distribución subcelular de proteína quinasa en testículo de ratas maduras e inmaduras.

Se homogeneizaron testículos de ratas maduras e inmaduras en 5 volúmenes de sacarosa 0.34 M en Tris 50 mM pH 7.0. Los homogeneizados se filtraron a través de una tela de nylon (Nitex) de 80 micrones de poro. Se centrifugó y se obtuvieron las siguientes fracciones: precipitado de 600 g: núcleos; precipitado de 15.000 g: mitocondrias; precipitado de 100.000 g microsomas y sobrenadante de 100.000 g. Se ensayó la actividad proteína quinasa en alícuotas de cada fracción, utilizando histonas de timo como sustrato.

Como se puede observar en la tabla XV las fracciones con mayor actividad específica se encuentran localizadas en núcleo y sobrenadante, siendo esta última la más importante. De las fracciones estudiadas, la menor activación con AMP cíclico se obtuvo en los microsomas y la máxima en el sobrenadante.

La actividad específica de todas las fracciones es mayor en animales maduros que en animales inmaduros.

Tabla XV

Distribución subcelular de proteína quinasa en testículos de ratas maduras e inmaduras (en p moles/mg prot./min).

Fracción	Maduras			Inmaduras		
	-cAMP	+cAMP	% de incremento con cAMP	-cAMP	+cAMP	% de incremento con cAMP
Núcleos	54±3	174±10	222	21±2	81±3	285
Mitocondrias	28±2	95±2	239	9±1	25±3	177
Microsomas	46±6	79±11	71	19±0.4	28±2	47
Sobrenadante	105±7	508±60	383	56±7	382±47	582

Similares consideraciones pueden hacerse analizando los porcentajes de actividad total en cada fracción(Tabla XVI). En esta tabla se puede también observar que los testículos de animales maduros tienen mayor actividad porcentual en núcleo que los de animales inmaduros.

En ambos grupos de animales se puede concluir que la enzima es principalmente soluble.

Tabla XVI

Actividad porcentual de proteína quinasa en fracciones subcelulares de testículos de ratas

	Maduras		Inmaduras	
Fracción	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
Núcleos	12.7±0.7	9.5±0.1	6.4±0.2	3.9±0.1
Mitocondrias	4.9±0.1	3.5±0.1	4.4±0.2	1.9±0.3
Microsomas	5.1±0.4	3.0±0.2	5.6±0.1	1.3±0.1
Sobrenadante	77.3±0.8	84.9±0.3	83.5±4	92.8±1.2
TOTAL	100.0	100.9	99.9	99.9

DISCUSION

En la serie de experiencias descriptas en este trabajo se han podido detectar proteínas quinasas dependientes e independientes del AMP cíclico en los dos órganos de rata analizados: epidídimo y testículo. Como ha sido descripto para otros tejidos, estas enzimas pueden utilizar histonas, protaminas y caseína como sustratos.

En ambos órganos el grado de activación observado con el AMP cíclico varió según el sustrato que se haya utilizado. Con histona, como sustrato, la activación por el nucleótido fue más notable que con caseína y cuando se utilizó protamina no fue posible visualizar una activación franca con el AMP cíclico. Tanto en el testículo como en el epidídimo el grado de actividad enzimática pareció depender de la madurez sexual del animal, pero esta dependencia resultó ser diferente según el órgano considerado.

Epidídimo: Cuando se comparan las actividades específicas de proteína quinasa en el epidídimo de ratas inmaduras con las de ratas maduras se pueden observar que en estas últimas la actividad enzimática fue mucho mayor tanto en la cabeza como en la cola del órgano.

Esta observación es válida cuando se comparan las actividades de proteína quinasa obtenidas utilizando histona de timo de ternera o caseína como sustrato, no así cuando se utiliza protamina, lo que sugiere la heterogeneidad de este

sistema enzimático.

En animales maduros hemicastrados, la actividad específica en la cabeza del epidídimo del lado castrado fue menor que la del lado intacto. En cambio, en la cola la actividad no varió; este hecho es interesante si se tiene en cuenta que la cabeza del epidídimo recibe directamente las hormonas producidas por el testículo.

La dependencia de los órganos sexuales accesorios del macho a los andrógenos circulantes es un hecho conocido desde hace tiempo (113) y se sabe que muchas de las enzimas presentes en el epidídimo son dependientes de andrógenos. Así, por ejemplo, Allen y Slater (89, 90) demostraron que las fosfatas ácidas y alcalinas y la alilesterasa de epidídimo de ratón están bajo el control de hormonas androgénicas, su actividad disminuye con la castración y la testosterona revierte este proceso. También Marquis y Fritz (114) encontraron que la disminución de la carnitina acetil transferasa de epidídimo de rata por castración es parcialmente corregida por administración de testosterona.

En las experiencias referidas más arriba (Tabla V) cuando ratas inmaduras fueron inyectadas con testosterona, la actividad de proteína quinasa (dependiente e independiente de AMP cíclico) en la cabeza del epidídimo se incrementó. Este hecho señala nuevamente la dependencia de esta enzima a los niveles de andrógenos.

En próstata ventral de rata se encontró que núcleos aislados incorporan el fósforo terminal del ATP^{a} núcleo proteínas

"in vitro", la castración disminuye esa incorporación y la administración de testosterona previene este efecto (72). Estos resultados así como los nuestros, indican que la actividad global de la proteína quinasa en algunos de los órganos accesorios masculinos depende directamente del estado hormonal del animal. Un efecto análogo ha sido sugerido en hembras, donde el estradiol actuaría sobre la proteína quinasa del útero, activándola (115).

Testículo: El mecanismo regulatorio de la proteína quinasa parece ser diferente al hallado para el caso del epidídimo. Si bien en testículo la actividad de proteína quinasa aumenta con la maduración sexual, este cambio no parece ser debido a una acción directa de hormonas, ya que cuando se suministra LH, FSH o testosterona, no se obtienen cambios en la actividad enzimática.

Por el contrario, las variaciones de proteína quinasa observadas pueden ser correlacionadas con otro tipo de fenómenos que tienen lugar en el testículo de ratas en desarrollo, es decir, con las modificaciones inherentes a la diferenciación y maduración de los tipos celulares de la serie espermática.

Para poder visualizar con claridad este tipo de correlación es necesario tener en cuenta diferentes hechos y comprobaciones experimentales. Los resultados que se han presentado demuestran que la actividad de proteína quinasa en el testículo aumenta con la maduración y que este aumen-

to ocurre entre los treinta y cinco y cuarenta y cinco días de edad. Cuando se consideran por separado los túbulos seminíferos y las células intersticiales, se ve que este aumento de actividad depende en su mayor parte del aumento de actividad que se produce en los túbulos seminíferos. Por otra parte, la actividad específica relativamente baja de proteína quinasa que se obtuvo con una preparación de espermatozoides de testículo, así como el hecho que en la rata Wistar los espermatozoides aparecen a los cuarenta y nueve días de edad permite descartar a estos últimos como la causa de este aumento de actividad. Histológicamente el principal cambio que ocurre en el testículo entre los treinta y cinco y cuarenta y cinco días de edad, está relacionado al proceso mediante el cual las espermátidas se convierten en espermatozoides y es oportuno recordar que en la rata el tratamiento con hormonas no tiene ningún efecto en la inducción de una pubertad precoz, ni se puede anticipar la aparición de células germinales maduras (116).

Los cambios bioquímicos que ocurren durante ese proceso han sido estudiados con detalle en salmónidos y especies relacionadas dada las ventajas histo-anatómicas que representa el hecho quetodas las células de un lóbulo están simultáneamente en el mismo estadio de espermatogénesis lo que facilita su análisis.

Usando estos animales Dixon y col. (78) en una importante serie de trabajos determinaron que en los últimos estadios de la espermiogénesis se produce un recambio de proteínas nucleares unidas al DNA y que en este proceso interviene la ac-

tividad fosforilante de la proteína quinasa, dado que la fosforilación de las protaminas recientemente sintetizadas es importante para permitir su unión correcta con el DNA.

En ese contexto es útil recordar que utilizando técnicas radioautográficas en mamíferos (117-120) se determinó que en el núcleo de células germinales en desarrollo se produce un cambio de una histona rica en lisina a una histona rica en arginina y que el momento de la transición entre histona rica en lisina a histona rica en arginina o protamina ocurre durante los últimos estadios del desarrollo de la espermátida. Este proceso es constante en cada especie y variable entre especies, produciendo como resultado final ya sea protamina o histona rica en arginina que son las proteínas nucleares del espermatozoide maduro.

A este recambio de proteínas nucleares se le ha atribuído importancia como mecanismo para la supresión de la actividad genética de las gametas hasta la fertilización. Cualquier alteración o inhibición de este cambio de histonas podría conducir a trastornos de la fertilidad.

Lamentablemente, en mamíferos este cambio de proteínas nucleares sólo puede ser estudiado radioautográficamente, ya que con experimentos de síntesis proteica queda enmascarado por la síntesis total del órgano, y la separación de distintos tipos celulares en cantidad y pureza suficiente para efectuar estos experimentos es muy difícil. De cualquier manera el hecho que durante la transformación de las espermátidas hay un marcado aumento de la actividad específica de proteína quinasa parece indicar algún tipo de relación con la transición de

las proteínas nucleares como se ha observado en salmónidos.

Otro aspecto que se consideró en el transcurso del trabajo fue la presencia de diferentes isoenzimas de proteína quinasa.

Cuando un homogeneizado de testículo de rata se acidificó a pH 4.8 se obtuvo la separación de dos fracciones de características distintas, que aumentan con la maduración sexual.

En otros órganos varios autores han analizado el problema de si una sola proteína quinasa actúa en todas las funciones que son mediadas por el AMP cíclico o si un cierto número de isoenzimas está involucrado en las diferentes acciones de este nucleótido. Se ha demostrado la presencia de varias proteínas quinasas con características disímiles en diferentes tejidos: útero de ternera (66), músculo esquelético de conejo (107), músculo de pollo (108), glándula mamaria de ratón (64), hígado de rata (52, 109) y reticulocitos y eritrocitos de conejo (22, 110). En el testículo, si se someten las dos fracciones separadas a pH 4.8, a cromatografía en columna de DEAE celulosa, se obtienen cinco fracciones diferentes.

Cuando se compara la actividad específica de estas cinco fracciones medidas en presencia de una variedad de sustratos, se puede observar que cada fracción es diferente de las demás.

Las dos fracciones que se obtienen del sobrenadante de pH 4.8 tienen una actividad específica relativamente menor que la del precipitado, en especial la primera de ellas. Esta última no demuestra actividad cuando se la mide en presencia de fosfovitina y no es estimulada por AMP cíclico cuando se la mide

en presencia de histona rica en arginina, la segunda fracción del sobrenadante tiene mayor actividad con todos los sustratos y es estimulada por el AMP cíclico con todos ellos. En general, el sustrato con el cual se observa un mayor incremento de la actividad de todos los picos es la histona rica en lisina, aunque el segundo pico del sobrenadante también se estimula en un grado similar cuando se lo mide en presencia de caseína o de histona de timo de ternera.

Los tres picos del precipitado tienen una actividad específica mucho mayor. Estas actividades específicas varían mucho de acuerdo al sustrato utilizado. El primer pico utiliza como sustratos preferenciales histona de timo, histona rica en lisina y caseína, sobre todo cuando se mide en presencia de AMP cíclico, el segundo utiliza caseína, fosfovitina e histona rica en lisina. El grado de estimulación por AMP cíclico de los tres picos varía de acuerdo a la fracción y al sustrato utilizado, incluso en algunos casos se ve una ligera inhibición. Los resultados obtenidos con el GMP cíclico son en conjunto similares a los obtenidos con el AMP cíclico. Todos estos datos indican la heterogeneidad de la proteína quinasa testicular.

Cuando el precipitado de pH 4.8 se somete a otro procedimiento de separación, la cromatografía en una columna de afinidad por sustrato: caseína sefarosa, se separan dos fracciones de características distintas, la primera de ellas que no es retenida por la columna utiliza preferentemente histona de timo y es estimulable por el AMP cíclico con todos los sustratos utilizados, la segunda que requiere un aumento de fuer-

za iónica para ser eluida, muestra mayor actividad con caseína y no se estimula por AMP cíclico. Esta falta de estimulación por dicho nucleótido no parece deberse a la separación de las unidades catalítica y regulatoria ya que ambos picos tienen la propiedad de ligar AMP cíclico 3H.

Dada la gran complejidad celular del testículo es difícil señalar si estas diferentes isoenzimas se deben a los diferentes tipos celulares o si hay más de una de ellas en una misma célula. De cualquier modo el testículo es un órgano que es regulado por varias hormonas y además tiene una gran variedad de funciones; esto permite suponer que la presencia de diferentes isoenzimas de proteína quinasa mediarían las respuestas a los estímulos que actúan sobre las diferentes funciones testiculares.

CONCLUSIONES

Como conclusiones principales de este trabajo de tesis se pueden señalar las siguientes:

Epidídimo:

1) La actividad específica de la proteína quinasa de la cabeza y cola del epidídimo es mayor en animales maduros que en inmaduros con dos sustratos utilizados: histona y caseína.

2) Utilizando histona como sustrato la activación de la proteína quinasa epididimaria con el AMP cíclico es mayor.

3) En ratas hemicastradas la cabeza del epidídimo del lado operado tiene menor actividad enzimática que la del lado intacto.

4) La administración de testosterona a ratas inmaduras produce un incremento significativo de los niveles de proteína quinasa en la cabeza del epidídimo.

Testículo:

1) La proteína quinasa de un homogeneizado de testículo es más dependiente al AMP cíclico con histona como sustrato que con caseína.

2) La actividad específica de esta enzima aumenta con la maduración principalmente entre los 35 y 45 días de vida.

3) Este incremento es mayor en túbulos seminíferos que en tejido intersticial, aislados.

4) Dos preparaciones diferentes de proteína quinasa se obtuvieron centrifugando el homogenato acidificado a pH 4.8. Las

dos fracciones aumentaron con la maduración.

5) La actividad de las proteínas quinasas testiculares de ratas inmaduras no sufrió modificación con los tratamientos hormonales ensayados: testosterona, hormona luteinizante y folículo estimulante.

6) Mediante la aplicación de varios métodos de purificación enzimática, como cromatografía en columnas de DEAE celulosa y sefarosa caseína, se separaron varias isoenzimas de proteína quinasa, las que poseen diferentes comportamientos con diversos sustratos.

7) El fraccionamiento subcelular de proteína quinasa de testículos maduros e inmaduros mostró que esta enzima es predominantemente soluble. Además la actividad específica de todas las fracciones es mayor en animales maduros que en inmaduros.

BIBLIOGRAFIA

1) MONOD, J., Endocrinology, 78, 412, (1966)

2) PASTAN, I. y PERLMAN, R. L., Nature New Biol., 229, 5, (1971).

3) LANGAN, T. A., Science, 162, 579, (1968).

4) LANGAN, T. A., Proc.Nat. Acad. Sci. USA, 64, 1276, (1969).

5) SUNDARARAJAN, T. A., SAMPATH KUMAR, K. S. V. y SARMA, P.S. Biochim. et Biophys. Acta, 29, 449, (1958).

6) RABINOWITS, M. y LIPMANN, F., J. Biol. Chem., 235, 1043 (1960).

7) JUDAR, J.D., AHMED, K. y Mc LEAN, A. E. M., Biochim. et Biophys., Acta, 65, 472, (1962).

8) WALLACE, R. A., Biochim. et Biophys. Acta, 86, 286, (1964).

9) JACKSON, J. E., JACKSON, E. M. y FREEMAN, S., Biochim. et Biophys. Acta, 105, 483, (1965).

10) KREBS, E. G. y FISCHER, E. H., Biochim. et Biophys. Acta, 20, 150, (1956).

11) RALL, T. W., SUTHERLAND, E. W., y WOSILAIT, W. D., J. Biol. Chem., 218, 483, (1956).

12) FRIEDMAN, D. L. y LARNER, J., Biochemistry, 4, 2261,(1965).

13) LANGAN, T.A. y SMITH, L. K., Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 26, 603, (1967).

14) JERGIL, B. y DIXON, G. H., J. Biol. Chem., 245, 425, (1970).

15) KLEINSMITH, L. J. y ALLFREY, V. G., Biochim. et Biophys. Acta, 175, 123, (1969).

16) WALSH, D. A., PERKINS, J. P. y KREBS, E. G., J. Biol. Chem., 243, 3763, (1968).

17) KUO, J.F., y GREENGARD, P., Proc. Nat. Acad. Sci, USA., 64, 1349, (1969).

18) LANGAN, T. A., J. Biol. Chem., 244, 5763, (1969).

19) SUTHERLAND, E. W. y RALL, T. W., Phar. Rev., 12, 265, (1960).

20) BROSTROM,M. A., REIMANN, E. M., WALSH, D. A. y KREBS, E. G. Adv. Enzyme Regul., 8, 191, (1970).

21) GILL, G. N. y GARREN, L. D., Biochim. Biophys. Research Commun., 39, 335, (1970).

22) TAO, M., SALAS, M. L. y LIPMANN, F.. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 67, 408, (1970).

23) KUMON, A., YAMAMURA, H. y NISHIZUKA, Y., Biochim. Biophys. Research Commun., 41, 1290, (1970).

24) REIMANN, E. M., BROSTROM, C. O., CORBIN, J. D., KING, C.A. y KREBS, E. G., Biochim. Biophys. Research Commun., 42, 187, (1971).

25) ERLICHMAN, J., HIRSCH , A. H. y ROSEN, O. M., Proc. Nat. Acad. Sci., USA., 68, 731, (1971).

26) KUO, J.F. y GREENGARD, P., J. Biol. Chem., 245, 2493, (1970).

27) GREEN, A. A. y CORI, G. T., J. Biol. Chem., 151, 21, (1943).

28) CORI, G. T. y GREEN, A. A., J. Biol. Chem., 151, 31, (1943).

29) FISCHER, E. H. y KREBS, E. G., J. Biol. Chem.,216, 121, (1955).

30) BROSTROM, C. O., CORBIN, J. D., KURG, C. A. y KREBS, E. G., Proc. Nat. Acad, Sci. USA., 68, 2444, (1971).

31) HUTTUMEN, J.K., STEINBERG, D. y MAYER, S. E., Biochim. Biophys. Research Commun., 41, 1350, (1970).

32) RILEY, W. D., DE LANGE, R. J., BRATVOLD, G. E. y KREBS, E. G., J.Biol. Chem., 243, 2209, (1968).

33) HUSTON, R. B., y KREBS, E. G., Biochemitry,7, 2116, (1968).

34) KREBS, E. G. y WALSH, D. A., Fed. Eur. Biochem. Soc. Symp. 19,121, (1969).

35) WALSH, D. A., ASHBY, C. D., GONZALEZ, C., CALKINS, D., FISCHER, E. H. y KREBS, E. G., J. Biol. Chem., 246, 1977, (1971).

36) WALSH, D. A., PERKINS, J. P., BROSTROM, C. O., HO, E. S. y KREBS, E. G., J. Biol. Chem., 246, 1968, (1971).

37) APPLEMAN, M. M., BIRNBAUMER, L. y TORRES, H. N., Arch. Biochem. Biophys., 116, 39, (1966).

38) MANNERS, D. J., "The molecular structure of glycogen". Adv. Carbohydrate Chem., 12, 269, (1957).

39) SCHLENDER, K. K., WEI, S. H. y VILLAR-PALASI, C., Biochim. et Biophys. Acta, 191, 272, (1969).

40) SODERLING, T. R. , HICKENBOTTOM, J. P., REIMANN, E. M., HUNKELER, F. L., WALSH, D. A. y KREBS, E. G., J. Biol. Chem., 245, 6317, (1970).

41) RIZACK, M. A., J. Biol. Chem., 239, 392, (1964).

42) CORBIN, J.D. y KREBS, E. G., Biochim. Biophys. Research Commun., 36, 328, (1969).

43) CORBIN, J. D., REIMANN, E. M., WALSH, D. A., y KREBS, E. G., J. Biol. Chem., 245, 4849, (1970).

44) HUTTENEN, J. K., STEINBERG, D. y MAYER, S. E., Proc. Nat. Acad. Sci., USA., 67, 290, (1970)

45) TSAI, S. C., BELFRAGE, P. y VAUGHN, M., J. Lipid Research, 11, 466, (1970).

46) STEVELY, W. S. y STOCKEN, L.A., Biochem. J., 100, 20c, (1966).

47) KLEINSMITH, L. J., ALFREY, V. G. y MIRSKY, A. E., Proc. Nac. Acad. Sci., USA., 55, 1182, (1966).

48) KLEINSMITH, L. J., ALLFREY, V. G. y MIRSKY, A. E., Science, 154, 780, (1966).

49) MARZLUFF, W. F., Mc CARTY, K. S. y TURKINGTON, R. W., Biochim. et Biophys. Acta, 190, 517, (1969).

50) INGLES, C. J. y DIXON, G. H., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 58, 1011, (1967).

51) TENG, C. S., TENG, C. T. y ALFREY, V. G., J. Biol. Chem., 246, 3597, (1971).

52) CHEN, L. J. y WALSH, D. A., Biochemistry, 10, 3614, (1971).

53) TAKEDA, M., YAMAMURA, H. y OHGA, Y., Biochim. Biophys. Research Commun., 42, 103, (1971).

54) BAGGIO, B., PINNA, L. A., MORET, V. y SILIPRANDI, N., Biochim. et Biophys. Acta, 212, 515, (1970).

55) FERGUSON, J. J., J. Biol. Chem., 238, 2754, (1963).

56) GARREN, L.D., NEY, R. L. y DAVIS, W. W., Proc. Nat. Acad. Sci., USA., 53, 1443, (1965).

57) FERGUSON, J. J. y MORITA, Y., Biochim. et Biophys. Acta, 87, 348, (1964).

58) GARREN, L. D., Vitamines and Hormones, 26, 119, (1968).

59) GILL, G. N. y GARREN, L. D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 63, 512, (1969).

60) WALTON, G. M., GILL, G. N., ABRASS, I. B. y GARREN, L. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 68, 880, (1971)

61) EIL, C. y WOOL, I. G., Biochim. Biophys. Research Commun., 43, 1001, (1971).
62) KABAT, D., Biochemistry, 10, 197, (1971).
63) LOEB, J. E. y BLAT, C., FEBS Letters, 10, 105, (1970).
64) MAJUMDER, G. C. y TURKINGTON, R. W., J. Biol. Chem., 246, 2650, (1971).
65) MAJUMDER, G. C. y TURKINGTON, R. W., J. Biol. Chem., 246, 5545, (1971).
66) PUCA, G. A., NOLA, E., SICA, V. y BRESCIANI, F., Biochem. Biophys. Research Commun., 49, 970,(1972).
67) SANBORN, B. M., BHALLA, R. C. y KORENMAN, S. G., J. Biol. Chem., 248, 3593, (1973).
68) MENON, K. M. J., J. Biol. Chem., 248, 494, (1973).
69) RIEBER, M. y BACALAO, J., Biochem. J., 131, 641, (1973).
70) BACALAO, J., y RIEBER, M., FEBS Letters, 37, 37, (1973).
71) REDDI, A. H., EWING, L. L. y WILLIAMS-ASHMAN, H. G., Biochem. J., 122, 333, (1971).
72) AHMED, K., Biochim. et Biophys. Acta, 243, 38, (1971).
73) HOSKINS, D. D., CASILLAS, E. R. y STEPHENS, D. T., Biochem. Biophys. Research Commun., 48, 1331, (1972).
74) DREVIUS, L. O., J. Reprod. Fert., 28, 41, (1972).
75) GARBERS, D. L., FIRST, N. L., SULLIVAN, J. J. y LARDY, H. A., Biol. Reprod., 5, 336, (1971).
76) GARBERS, D. L., FIRST, N. L. y LARDY, H. A., J. Biol. Chem., 248, 875, (1973).
77) KUO, J. F., KRUEGER, B. K., SANES, J. R. y GREENGARD, P., Biochim. et Biophys. Acta, 212, 79, (1970).
78) DIXON, G. H. en "Gene Transcription in Reproductive Tissue" (E. DICZFALUSY Ed.) Karolinska Instituted, Suecia, p. 130, (1972).

79) GLYNN, I. M. y CHAPPELL, J. B., Biochem. J., 90, 147, (1964).

80) CUATRECASAS, P., J. Biol. Chem., 245, 3059, (1970).

81) MEDRANO, E., PIRAS, R., y MORDOH, J., Exptl. Cell Res. 86, 295, (1974).

82) REIMANN, E. M., WALSH, D. A. y KREBS, E. G., J. Biol. Chem., 246, 1986, (1971).

83) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J., J. Biol. Chem., 193, 265, (1951).

84) BRAY, G. A., Anal. Biochem., 1, 279, (1960).

85) CRABO, B., Acta Vet. Scand., 6, Suppl. 5, (1965).

86) ORGEBIN-CRIST, M. C., Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 7, 373, (1967).

87) MANEELY, R. B., Acta Zool, 40, 1, (1959).

88) CAVAZOS, L. F., Anat. Rec., 132, 209, (1958).

89) ALLEN, J. M. y SLATER, J. J., Anat. Rec., 129, 255, (1957).

90) ALLEN, J. M. y SLATER, J. J., Anat. Rec., 130, 731, (1958).

91) SINGHAL, R. L. y SUTHERLAND, D. J. B., J. Cell. Biol., 59, 321a, (1973).

92) TSANG, B. K. y SINGHAL, R. L., Can. J. Physiol. Pharmacol. 51, 942, (1973).

93) SINGHAL, R. L., Ann. N. Y. Acad. Sci., 185, 181, (1971).

94) WILLIAMS-ASHMAN, H. G., J. Cell and Comp. Physiol., 66, 111, (1966).

95) THOMAS, J. A. y SINGHAL, R. L., Biochem. Pharmac., 22, 507, (1973).

96) COURCT, M., HOCHEREAU -de REVIERS, M. T. y ORTAVANT, R., en "The Testis", I, (A. D. Johnson, W. R. Gomes y N. L. Vandemark Eds.) Acad. Press, New York, P. 339, (1970).

97) CHRISTENSEN, A. K. y MASON, N. R., Endocrinology, 76, 646, (1965).

98) BRINCK-JOHNSEN, T. y EIK-NES, K. B., Endocrinology, 61, 676, (1957).

99) HALL, P. F. y EIK-NES, K. B., Biochim.et Biophys. Acta, 71, 438, (1963).

100) BRADY, R. O., J. Biol. Chem., 193, 145, (1951).

101) SANDLER, R. y HALL, P. F., Endocrinology, 79, 647, (1966).

102) CONNELL, G. M. y EIK-NES, K. B., Steroids, 12, 507, (1968).

103) MURAD, F., STRAUCH, B. S. y VAUGHAN, M., Biochim. et Biophys. Acta, 177, 591, (1969).

104) ROMMERTS, F. F. G., COOK, B. A., VAN DER KEMP, J. W. C. M. y VAN DER MOLEN, H. J., FEBS Letters, 24, 251, (1972).

105) ROMMERTS, F. F. G., COOK, B. A., VAN DER KEMP, J. W. C. M. y VAN DER MOLEN, H. J., FEBS Letters, 33, 114, (1973).

106) HUCKINS, C., Anat. Rec., 151, 364, (1965).

107) CORBIN, J. D., BROSTROM, C. O., KING, C. A. y KREBS, E. G., J. Biol. Chem., 247, 7790, (1972).

108) PIRAS, M. M., STANELONI, R., LEIDERMAN, B. y PIRAS, R., FEBS Letters, 23, 199, (1972).

109) YAMAMURA, H., KUMON, A., NISHIYAMA, K., TAKEDA, M. y NISHIZUKA, Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 1560, (1971).

110) TAO, M. y HACKETT, P., J. Biol. Chem., 248, 5324, (1973).

111) ASHBY, C.D. y WALSH, D. A., J. Biol. Chem., 247, 6637 (1972).

112) CLERMONT, Y y PEREY, B., Am. J. Anat., 100, 241, (1957).

113) MOORE, C. R., en "Sex and Internal Secretions" (E. Allen ed.) Bailliere, Tindall y Cox, Londres, 2a. ed., p. 353, (1939).

114) MARCUS, N. R., y FRITZ, I. B., J. Biol. Chem., 240, 2197 (1965).

115) ARNAUD, M., BEZIAT, Y., BORGNA, J. L., GUILLEUX, J. C. y MOUSSERON-CANET, M., Biochim. Biophys. Acta, 254, 241, (1971).

116) CRITCHLOW, V. y BAR-SELA, M. E., en "Neuroendocrinology" (L. Martini y W. F.Ganong eds.) Ac. Press. N. York, Vol. II, p. 101, (1967).

117) MONESI, V. Exptl. Cell. Res., 36, 603, (1964).

118) GLEDHILL, B. L., GLEDHILL, M. P., RIGLER, R. y RINGERTZ, N. R., Exptl. Cell. Res., 41, 652, (1966).

119) VAUGHN, J.C., J. Cell Biol., 31, 257, (1966).

120) LOIR, M., Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 12, 411, (1972).