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

Interacción de una glucoproteína con actividad hormonal con sus receptores específicos

Charreau, Eduardo Hernán

1975

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:
Charreau, Eduardo Hernán. (1975). Interacción de una glucoproteína con actividad hormonal con sus receptores específicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1467_Charreau.pdf

Cita tipo Chicago:
Charreau, Eduardo Hernán. "Interacción de una glucoproteína con actividad hormonal con sus receptores específicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1975. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1467_Charreau.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

INTERACCION DE UNA GLUCOPROTEINA CON ACTIVIDAD HORMONAL CON SUS RECEPTORES ESPECIFICOS

Autor : Eduardo Hernán Charreau

Director ante esta Facultad : Dr Hector N. Torres

Lugar de Trabajo : Instituto de Biología y Medicina Experimental y National Institute of Child Health and Human Development, N. I. H. Bethesda, Maryland.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN LA ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Hector N. Torres por su constante estímulo y valiosa discusión de los temas de esta tesis.

A los Doctores Kevin Catt y María Dufau del National Institute of Child Health and Human Development, quienes posibilitaron y a quienes se debe el concretar los aportes presentados.

A todos los que de una u otra forma participaron en mi formación y a todos aquellos cuyas propias actividades hicieron posible las mias.

A Ana Rosa, esposa, compañera y amiga, en reconocimiento a su esfuerzo diario y comprensión en la dificil tarea de compartir nuestras vidas.

Desde la periferia de una circunferencia conducen a su centro una infinidad de caminos. El punto elegido en la periferia como punto de salida no tiene importancia. Lo que la tiene es acertar con el punto de salida que conduce verdaderamente al punto central. Entre dos puntos no hay mas que una sola dirección : la verdadera.

INDICE

	Página
Abreviaturas	1
INTRODUCCION	
Consideraciones generales	3
Efectos "in vitro" de las gonadotrofinas	8
Características de la unión de LH y hCG en testículos y ovarios de rata	10
Ligadura de LH y hCG a sus sitios específicos y su aplicación al ensayo de dichas hormonas	13
Efecto de la estructura hormonal sobre los receptores testiculares	15
Eliminación de carbohidratos	17
Subunidades hormonales	19
Síntesis de testosterona y formación de AMPcíclico en respuesta a la estimulación gonadotrófica	21
Efectos sobre la actividad de las gonadotrofinas en la unión de estas a sus receptores	22
Objeto de la presente investigación	23
REACTIVOS Y ENZIMAS	
Preparación de gonadotrofinas	25
METODOS	
Incubaciones con testículos intactos	28
Formación de AMPcíclico	28

Pagina

Radioinmunoensayos del AMPcíclico 29

Producción de testosterona 30

Radioinmunoensayos 33

Preparación de Sepharosa-Concanavalina A 34

Obtención de hormonas radiactivas 35

Componentes de ensayo de unión de la hCG a la fracción particulada 39

Solubilización de partículas testiculares 40

Ensayos de unión al receptor soluble 42

Filtración por gel 44

Centrifugación en gradientes 46

RESULTADOS

Síntesis y liberación de AMPcíclico 49

Unión de las gonadotrofinas a los receptores y activación testicular 50

Niveles tisulares de AMPc y testosterona durante la estimulación con hCG 56

Propiedades biológicas de la asialo-hCG y asialo-agalacto-hCG 58

Actividad inmunológica de asialo y agalacto hCG 60

Potencia en el sistema receptor-radioligando 60

Actividad esteroidogénica "in vitro" 60

	Pagina
Solubilización del receptor gonadal de hCG	64
Solubilización de receptores testiculares con Triton X-100	65
Estabilidad de los receptores solubilizados	66
Estudios de unión de la hCG a receptores solubles	69
Cinética de la asociación y disociación	69
Unión al equilibrio	72
Filtración por gel y centrifugación en gradientes	75
Cálculo de algunos parametros físicos del receptor de hCG	89
Efecto del tratamiento con enzimas y agentes reductores sobre la actividad de ligadura del receptor libre	93
Diálisis del complejo hCG-receptor 7,5 S	97
Solubilización del complejo hCG-receptor obtenido de partículas premarcadas	102
Extracción de partículas premarcadas con diferentes detergentes	106
Propiedades del complejo hormona-receptor solubilizado con Triton X-100 de partículas testiculares premarcadas	108
Efectos del pH en la disociación del complejo hCG-receptor solubilizado de partículas premarcadas	110
Acción del Ca , AMPc, ATP, GTP y esteroides sobre el complejo hCG-receptor	111

Pagina

Efecto de la urea y guanidina ClH 113

Efecto de las fosfolipasas A y C sobre diferentes formas del complejo hCG-receptor 115

Efectos de las fosfolipasas sobre partículas premarcadas y receptores solubilizados de estas partículas 117

Tratamiento de los receptores solbles con neuraminidasa, RNAsa y DNAsa 120

Extracción de partículas premarcadas con diferentes detergentes 120

Solubilización y caracterización del receptor ovárico de hCG 123

DISCUSION 135

BIBLIOGRAFIA 157

ABREVIATURAS

hCG	Gonadotrofina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
ACTH	Adrenocorticotrofina
TSH	Tirotrofina
AMPc	3', 5' Adenosina monfosfato cíclico
ATP	5' Adenosina trifosfato
GTP	5' Guanosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Tris	Tris(hidroximetil)-amino metano
DEAE	Dietil-amino-etil-celulosa
SDS	Lauril sulfato de sodio
PEG	Polietilenglicol (Carbowax 6.000)
PBS	Buffer fosfo-salino (Dulbecco)
RNAsa	Ribonucleasa
DNAsa	Desoxiribonucleasa
EDTA	Etilendiaminotetraacético
DTT	Ditiotreitol (Reactivo de Cleland)
Trasylol	Inhibidor de proteasas de bazo de ternera.
Testosterona	17 β ol-4-Androsten 3 ona.

Androstenodiona	4-Androsten 3,20 diona
Dihidrotestosterona	17 β ol-5 β Androstan 3 ona
Δ 4-Androstenediol	4-Androsten 3β , 17β diol
Δ 5-Androstenediol	5-Androsten 3β , 17 β diol
Progesterona	4-Pregnen 3,20 diona
17-hidroxi-Progesterona	17 α ol-4-Pregnen 3,20 diona
17-hidroxi-Pregnenolona	3 β, 17 α diol-5 Pregnen 20 ona
Pregnenolona	3 β ol-5-Pregnen 20 ona
Estradiol	1,3,(5-10) Estratrien 3,17β diol
PM	Peso molecular
nm	nano metro
pmol	pico mol
pM	pico molar
ng	nano gramo
ug	micro gramo

AF
19
34

INTRODUCCION

Consideraciones generales.

El complejo conjunto de fenomenos que operan a nivel de un ser viviente, lleva implícito no solamente un número extenso de reacciones, sino también una sutil y eficiente interrelación entre las mismas. A nivel molecular, esto implica que cualquier transformación de una substancia en otra, dentro de cualquier célula viva, se encuentra perfectamente coordinada con las etapas precedentes y siguientes a dicha transformación, de manera tal, que en todos los casos, los niveles de cualquier metabolito se adecuan a los requerimientos celulares en un momento dado.

Por supuesto que es imposible para la célula substraerse a las influencias de todo tipo que sobre ella ejerce el nivel medio ambiente. Estímulos proteiformes, "presionan" permanentemente sobre ella y esta debe "adaptarse" para sobrevivir. Es lógico pensar que cuanto mayor sea la capacidad celular para adaptarse al medio ambiente mas amplia sera la probabilidad de supervivencia. Durante el largo proceso de evolución de los seres vivos es evidente que dicha capacidad de supervivencia ha sido ase-

gurada por dos caminos diferentes. Los organismos actualmente unicelulares, las bacterias por ejemplo, han preferido la via de una multiplicacion muy rapida en detrimento de una escasa interrelación entre cada uno de los individuos de la población. En este caso las comunicaciones intercelulares estan casi exclusivamente limitadas a un intercambio de la información química, bien mediada por transferencia cromosomica directa o bien mediada por ajustes virales (1-4). Dicho intercambio por supuesto determina la selección por parte de una población en general de los mejores mecanismos desarrollados en cada individuo por eventos mutacionales al azar.

Por el contrario, los organismos multicelulares han preferido un segundo camino. Las células se han agrupado para sobrevivir y cada una de ellas, en el conjunto, se ha "diferenciado" para cumplir una función específica. Cada conjunto de células con una misma función constituyeron un "tejido" y diferentes tejidos se han reunido como piezas de máquinas, los "órganos", dentro de la compleja estructura de esa verdadera factoría que es el organismo "in toto". La multiplicación celular es por supuesto una condición muy importante para asegurar la supervivencia del organismo, pero en este caso tambien es de tremenda importancia la interrelación entre sus dintintos componentes. Este último hecho lleva impli-

cita la existencia de vias de intercomunicación entre los mismos y entre las células que los constituyen.

Las formas por las cuales una célula o conjunto de células transfieren información a otras células son tan variadas como los tipos de información transmitida. Existe por ejemplo una forma de transmisión directa, de célula a célula mediada por los contactos intercelulares.

Estos contactos, en general de estructura glucoproteica determinan el comportamiento "social" de las células uno de cuyos ejemplos típicos es el de la "inhibición del crecimiento por contacto"(5, 6).

Otro tipo de medio de transmisión es el mediado por "mensajeros hormonales". Bajo cierto tipo de estímulos un tejido excreta un metabolito o un polipéptido de estructura muy especifica que hace las veces de "señal". La "señal" puede ser "captada" por un "receptor" muy sensible existente en la superficie de otras células que de alguna manera "amplifican" la señal y adaptan su comportamiento de acuerdo a la magnitud y naturaleza de los mismos (7).

Es muy importante destacar en este punto que tanto ciertos "receptores" como tambien ciertos "mensajeros-señales" son de estructura glucoproteica (8).

Desafortunadamente las funciones de esas sustancias ligadoras de

hormonas son en muchos casos oscuras. Esto hace que el uso del término "receptor hormonal" sea objeto de controversias desde que "receptor" ha sido definido como una macromolecula que posee habilidad de unirse a compuestos biologicamente activos y producir consecuencias biológicas de tal interacción (9).

Quiza la principal meta de los endocrinólogos moleculares es el haberse introducido en los procesos moleculares que describen las acciones hormonales fundamentales.

La primera pregunta a contestar es la localización del sitio de las hormonas en sus respectivas células receptoras.

El sitio "receptor" es el punto inicial de la interacción de la hormona y puede estar localizado en la superficie celular (como ocurre en algunas hormonas peptídicas) o en algun sitio intracelular(como sucede con las hormonas esteroideas).

Varios procedimientos se han empleado y quiza el mas interesante y provocativo ha sido el de utilizar hormonas fijadas a materiales inertes tales como celulosa o Sepharosa e incubar dichas hormonas inmovilizadas con las células receptoras aisladas. Como en esta forma las hormonas no pueden penetrar en las células, sus efectos pueden ser interpretados como una acción a nivel de la superficie celular.

Sato y colaboradores demostraron mediante este procedimiento que el ACTH inmovilizado en celulosa puede estimular la esteroidogénesis en células adrenales aisladas, en la misma forma que la hormona libre (10).

Cuatrecasas ha demostrado recientemente que la insulina fijada a agarosa estimula el transporte de glucosa e inhibe la respuesta de las células grasas aisladas a hormonas lipolíticas (11).

Estos resultados proveen de fuerte evidencia de que la membrana plasmática sea el sitio de accion para estas hormonas.

Otro procedimiento ha sido estudiar la unión de las hormonas sobre membranas aisladas.

Lefkowitz y colaboradores lo han examinado para la ACTH (12) Rodbell y su grupo han realizado estudios similares con glucagón (13) y Cuatrecasas con insulina (14, 15). En casi todos estos casos, las hormonas marcadas con I^{131} o I^{125} compiten por los sitios de union con las mismas hormonas de diferentes especies o análogos, de acuerdo a la potencia biológica conocida pero no con diferentes hormonas (discriminación selectiva o especificidad del receptor).

Otro aspecto ha sido el de tratar de entender la relación entre los receptores tisulares y la adenilato ciclasa. Un modelo simple propone que cada receptor tiene una conformación ligeramente diferente que reconoce

a diferentes hormonas, uno para el ACTH, otro para la TSH, LH y asi sucesivamente. El complejo hormona receptor activa luego la subunidad catalítica en el interior de la membrana. Sin embargo la realidad no es tan simple. Estudios aislados de uniones de hormonas a los sitios receptores no dan la respuesta de como la "señal" de entrada es acoplada y amplificada en la membrana plasmática. Mediciones simultaneas de la unión y acción de las hormonas deben realizarse como pasos iniciales para estudiar las bases moleculares de la acción hormonal. Ademas de la naturaleza del transductor debemos entender la relación cuantitativa entre hormona y discriminador, la relación estructura-función en la hormona responsable de la interacción, la relación entre la interacción de la hormona con el discriminador y el grado de estimulación de la adenilato ciclasa, la naturaleza físico química de los distintos componentes que estan organizados tridimensionalmente en la membrana (demasiado para el punto de vista bioquímico de la fisiología).

Efectos "in vitro" de las gonadotrofinas.

Estudios morfológicos empleando diferentes preparaciones de trofinas marcadas con iodo radiactivo (131 o 125) para indicar su localiza-

ción en las células involucradas en la síntesis y secreción de esteroides (16-19); demostraron la existencia de sitios receptores gonadales para las hormonas luteinizante (LH) y gonadotrofina coriónica(hCG).

La captación de LH por las células de Leydig del testículo de rata fue demostrada "in vivo" (18) e "in vitro" (20,21). En este último caso se utilizaron dispersiones o cultivos de células intersticiales. Dichas suspensiones, preparadas mediante agitación cuidadosa de los tubulos seminiferos (22 (retienen tanto la capacidad de union para estas hormonas como la de biosintetizar testosterona a partir de precursores radiactivos (22,23). Sin embargo estos preparados muestran una disminución en la respuesta estimulatoria a LH y hCG con respecto a la producción de testosterona (24) y AMP cíclico (25). En este ultimo sentido la labilidad de las células intersticiales a la dispersión fisica se refleja en una perdida de la actividad adenilato-ciclasa estimulable por LH o hCG luego de la homogeinización

Las ventajas potenciales de utilizar una suspensión de células de Leydig para estudios "in vitro" de la relación entre la union de la gonadotrofina y su acción, estan viciadas en gran medida por la pobreza en la respuesta de estas preparaciones a la estimulación hormonal.

Sin embargo, la retencion de una alta y específica afinidad de es-

tas preparaciones por las gonadotrofinas ha permitido que sean utilizadas con éxito en el estudio de los sitios receptores de estas hormonas.

Algunas correlaciones entre la unión de las gonadotrofinas a sus receptores con la estimulación de adenilato-ciclasa y síntesis de androgenos han sido realizadas utilizando incubaciones de testículos aislados intactos (24). Por otro lado es destacable que en contraste con las incubaciones de homogenatos o dispersiones celulares, los testiculos decapsulados intactos retienen una extraordinaria sensibilidad a la estimulación por LH o hCG con aumento de la síntesis de AMP cíclico y testosterona (26, 27).

Características de la unión de LH y hCG en testículos y ovarios de rata.

Diferentes preparaciones de testiculos de rata adulta y ovarios de ratas normales, pseudopreñadas y preñadas presentan una elevada captacion de LH o hCG marcadas con iodo 125 o 131 (21, 28, 31-33).

Esta captación es dependiente de la temperatura, pues medida como velocidad incial de asociación es mayor a 37° C que a 24° C o 4° C. Ademas no es afectada significativamente por el contenido en calcio del medio de incubación o por lavados de los homogenatos conteniendo hormona

ligada. La constante de equilibrio determinada mediante el diagrama de Scatchard, es de $2,4 \times 10^{10}\ M^{-1}$ a 24° C. Valores comparables fueron obtenidos por determinación de la relación de las constantes de asociación y disociación en incubaciones a 24° C (29). La capacidad de unión de los receptores testiculares por hCG es 10^{-12} mol/gr a 24° C, mientras que valores algo mas bajos se encuentran a 37° C, debido posiblemente a una degradación mas rápida de la hormona radiactiva, a pesar de una mayor tasa inicial de asociación a esa temperatura. La especificidad de ligadura de LH o hCG a los receptores parece muy alta pues la misma no es significativamentes competida por otras hormonas. (30). Por otro lado la conocida especificidad de especie existente para distintas hormonas puede ser confirmada por el hecho de que la captación de hCG-I^{125} es mas eficientemente desplazada por las hormonas humanas (LH o hCG no marcadas) que por LH de origen ovino, bovino porcino, o de rata (30). Esta diferencia es atribuible a la mayor similaridad de las hormonas hipofisaria y placentaria humana en comparación con las otras hormonas luteinizantes animales, y a la naturaleza heteróloga del sistema de inhibición utilizado.

La localización testicular de los lugares de unión en las células intersticiales, ha sido inequivocamente establecida por estudios autora-

diográficos de captación de LH y hCG "in vivo" e "in vitro".

En estos estudios no fue posible observar una captación significativa en homogenatos de túbulos seminíferos u otros tejidos tales como hígado, músculo, riñón, pulmón y bazo. Ademas es destacable que, tanto en testículo (21) como en ovario (33), la unión de la hormona parece ocurrir predominantemente a nivel de membrana celular . Aun cuando durante la homogeinización de testículos y ovarios, la membrana celular se fragmenta en un amplio espectro de partículas con caracteristicas de sedimentación entre núcleos y microsomas, las fracciones que ligan LH o hCG -I^{125} poseen la estructura correspondiente a membranas plasmáticas (29). Estos estudios juntamente con la demostración de que la LH unida covalentemente a sepharosa puede estimular la esteroidogénesis cuando es incubada con testículos intactos de rata (24), indicarían que los receptores testiculares para LH y hCG se encuentran probablemente localizados en la membrana plasmática de las células intersticiales. Otras evidencias en este sentido estarian dadas por la demostración de que una alta proporción de la hormona unida a testículos intactos puede ser liberada por tratamiento a pH ácido con retención de su actividad hormonal (34). Este hallazgo seria dificil de interpretar si la hormona unida estuviese asociada a sitios receptores intracelulares.

Ligadura de LH y hCG a sus sitios específicos y su aplicación al ensayo de dichas hormonas.

La marcada afinidad de LH y hCG por los sitios especificos en testículos de rata fueron obviamente de potencial aplicación para el ensayo por radioligando de ambas gonadotrofinas (28, 35).

Una caracteristica general de las determinaciones empleando receptores es la habilidad de combinar muchas de las ventajas de los metodos radioinmunológicos y biológicos.

El uso de receptores para sistemas de ensayos "in vitro" combina la alta precisión y uniformidad de los métodos de análisis por saturación con la especificidad de los métodos convencionales por bioensayos. Los ensayos "in vivo" constituyen los procedimientos mas apropiados para estudiar la eficacia total de las preparaciones hormonales pues son altamente sensibles a cualquier cambio en dichas preparaciones que de lugar a una perdida en su actividad. En contraste, las mediciones potencialmente con menor especificidad biológica, como es el caso de los radioinmunoensayos estan usualmente acompanadas por una alta sensibilidad no lograble corrientemente por la mayoria de los ensayos biológicos.

Existe una preocupación creciente sobre la carencia de un sistema de medición apropiado para las variadas formas de ciertas hormonas pep-

idicas. Los diferentes metodos corrientes de ensayo suministran una serie de parametros individuales de la actividad hormonal que no siempre pueden expresarse en valores cuantitativamente identicos de su potencia Para el caso de las hormonas glucoproteicas, estas diferencias se ven exacerbadas por el uso de una variedad de preparaciones algunas de las cuales son impuras pero bien definidas (ej : 2do Patrón Internacional de Referencia, preparación de gonadotrofina menopausica humana), 2do Patron Internacional de hCG el LER 907, preparación de gonadotrofina hipofisaria humana; mientras que otras son mas purificadas y menos estandardizadas.

Cuando una serie de preparaciones hormonales fueron evaluadas por su potencia utilizando los sistemas de radio ligando y bioensayos, los valores obtenidos por el primero de los métodos fueron generalmente cercanos o ligeramente mayores que los derivados de los ensayos biologicos convencionales(30), con la notable excepción de preparaciones hormonales desialiladas. La sensibilidad de los ensayos hormona-receptor para LH y hCG es de 0.5 - 1ng/ml, coincidente con la constante de equilibrio de 2,4 x 10^{10} M^{-1}. Este valor es de alrededor de un orden de magnitud mayor que los niveles obtenibles con un antisuero de alta afinidad para LH y hCG y no permitiría las determinaciones directas en plasmas

de animales no preñados.

Efecto de la estructura hormonal sobre los receptores testiculares

Recientemente han habido notables progresos en la elucidación de la química de las hormonas glucoproteicas tales como la luteinizante de ovino y bovino (36-38) la TSH bovina (39) y la gonadotrofina coriónica humana. Estas glucoproteinas estan constituidas por un "core" proteico, con cadenas de carbohidratos con residuos de ácido siálico (N-acetilneuramínico) o fucosa unido por uniones glucosídicas (40). El contenido de ácido siálico, en las tres hormonas que estimulan el crecimiento, la gametogenesis y la función esteroidogénica en los ovarios y testículos humanos, varia; siendo de 20 residuos por molécula de hCG (41), 5 por molécula de h FSH (42) y solamente 1 o 2 en la hormona luteinizante humana (43).

En acuerdo con otras hormonas glucoproteicas, la hCG posee 2 subunidades unidas no covalentemente y que han sido designadas por convención α y β (44) y que pueden obtenerse por disociación de la hCG con urea 10 M o ácido propiónico 1 M. El tamaño significativamente mayor de la subunidad β facilita la separación y purificación de las subuni-

dades por filtracion por gel. La subunidad α es una glucoproteina con un componente mayor consistente en 92 amino ácidos y dos sitios principales de unión de carbohidratos.

La composición en carbohidratos de la subunidad α -hCG es diferente de la α -LH ovina o bovina y de la α -TSH bovina. Las diferencias mas notorias son la ausencia de N-acetil galactosamina y presencia de ácido siálico y galactosa en la α hCG.

La subunidad β -hCG tiene 139 aminoácidos con dos tipos diferentes de unidades de carbohidratos, unidos a la asparagina o serina.

Las unidades carbohidratos unidas a la asparagina son complejas y grandes y se encuentran localizadas en las posiciones 13 y 28. Se observan tambien tres cadenas cortas de oligosacaridos unidos a la serina en las posiciones 118, 121 y 123 (45).

En base a los estudios de diferentes glucoproteinas la secuencia invariable alrededor de la asparagina ha sido encontrada como Asn-x-Treo/Serina y esto ha sido postulado como el sitio de reconocimiento para la enzima que adiciona N-acetilglucosamina a el amino grupo de la asparagina en uniones N-glucosídicas.

Poco se sabe en la secuencia de amino ácidos alrededor de la serina unida a las cadenas de carbohidratos en la β hCG.

Aunque los datos son escasos pareceria que la secuencia Pro-Ser/Treo puede ser el sitio de reconocimiento de la N-acetilgalactosaminil transferasa.

De la composición porcentual; los pesos moleculares para las subunidades α y β fueron aproximadamente estimados como 13.000 y 25.000 (Bahl, comunicacion personal) que se correlacionan perfectamente con los valores obtenidos en esta tesis para el peso molecular de la hCG intacta obtenido mediante la combinación de la centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración por gel de la I^{125}-hCG (peso molecular estimado 39.000).

Eliminación de carbohidratos

La especificidad del receptor por la unión a preparaciones hormonales activas provee un interesante modelo para el estudio de modificaciones estructurales en la unión de las glucoproteinas a sus receptores celulares.

Las mediciones de la afinidad "in vitro" de gonadotrofinas estructuralmente modificadas permite la evaluación de tales cambios específicos sobre la acción hormonal, en ausencia de efectos atribuibles al metabolis

mo "in vivo" de la hormona. Estos estudios han sido de particular importancia para hCG ya que la desialilación de esta hormona ha mostrado claramente que causa una marcada pérdida de actividad "in vivo", (46, 47).

Es conocido que la desialilación incrementa el metabolismo de la hCG y otras glucoproteinas "in vivo" (48, 49), presumiblemente por aumento de la captación hepática de estas hormonas modificadas (49).

Preparados de hCG totalmente desialilados y con escasa actividad biológica "in vivo", mostraron no perder su actividad de unión a los receptores testiculares "in vitro". En efecto, un pequeño aumento de su potencia de unión ha sido demostrado con asialo - hCG evidenciando en cierta forma, mayor afinidad de las hormonas desialiladas por los lugares de unión de testículos y ovarios en sistemas "in vitro"(31, 33).

Resultados similares fueron obtenidos con LH humana sometida a una extensiva desialilación (31) con perdida de su actividad biológica "in vivo" (50).

Modificaciones ulteriores de hCG por remoción de los residuos de galactosa, asi como también el acido siálico terminal no producen inhibición de su potencia ligadora "in vitro"(51). indicando que ninguno de los carbohidratos terminales de la hCG son esenciales para la interacción de la hormona con sus sitios específicos de ligadura.

Para evaluar mas aun la actividad biológica estos preparados fueron ensayados en su habilidad para activar la esteroidogénesis en testículos asilados (ensayo biológico "in vitro" sumamente sensible para LH y hCG) (26). En este sistema, tanto asialo hCG como asialo-agalacto hCG mostraron poseer disminuida su actividad estimuladora de la producción de testosterona (31, 51).

No ha sido explicado hasta el presente si esta aparente perdida de su actividad esteroide estimulante en presencia de capacidades normales o aumentadas de unión a los receptores tisulares, es atribuible a la ausencia de los residuos de carbohidratos o a otros cambios conformacionales que puedan ocurrir en la remoción del siálico o galactosa.

Subunidades hormonales

Ademas de la importancia de los residuos de carbohidratos en la actividad hormonal, las actividades biológicas de las subunidades hormonales han sido extensivamente evaluadas utilizando los receptores testiculares para el estudio de actividad ligadora y los testículos aislados para estimulación de esteroidogénesis.

Se desconoce la importancia relativa que aporta cada subunidad hormonal, a la actividad biológica de la molécula nativa. Se sabe sin embargo que las subunidades α de todas las hormonas glucoproteicas conocidas parecen poseer regiones extensas de homología, mientras que las subunidades β son quimicamente disímiles (52, 54). Por otra parte la combinacion de subunidades α de una hormona glucoproteica con subunídades β de otra glucoproteina con actividad hormonal produce compuestos con significante actividad biológica caracteristica de la hormona nativa "dadora" de la subunidad β (55, 56). Estos datos sugieren que la especificidad hormonal esta conferida por las subunidades β y que las caracteristicas compartidas de la subunidad α podrian relacionarse a funciones hormonales comunes, tales como transporte y activación de efectores en las células receptoras.

Utilizando los metodos de evaluación ya mencionados, se han realizado comparaciones de la actividad ligadora de las subunidades α y β de LH ovino y hCG y su acción en la esteroidogénesis con respecto a sus compuestos padres.

La falta de actividad biológica intrínseca en las subunidades aisladas sugiere que las propiedades específicas de reconocimiento conferidas a cada hormona glucoproteica por sus singulares subunidades β, se ma-

nifiesta solamente cuando esta presente la conformación adoptada durante la asociación con la subunidad α , como ocurre con la hormona intacta o los híbridos formados por combinación de varias subunidades α y β (50, 57).

Síntesis de testosterona y formación de AMP cíclico en respuesta a la estimulación gonadotrófica

Ciertas evidencias tenderían al indicar que los efectos de la gonadotrofina sobre sus órganos efectores incolucran al AMP cíclico como agente intermediario. El AMP cíclico y su derivado dibutirilado estimulan la producción de esteroides tanto en suprarrenal como en cuerpo lúteo y testículo(58-63). Por otra parte las gonadotrofinas incrementan la concentración intracelular de AMP cíclico y la actividad de la adenilatociclasa (64), en tejido testicular aislado (65, 66).

En conjunto, estas observaciones apoyarían de que el AMP cíclico es el intermediario en el efecto estimulante de las gonadotrofinas sobre la esteroidogénesis testicular.

Entre las observaciones mas destacables sobre este punto figuran como ejemplo las siguientes :

1) En testículos de rata, aislados intactos, hCG estimula la pro-

ducción de testosterona hasta un máximo de 1000 ng/testiculo/4 horas de incubación. Una estumulación similar puede lograrse por la adicion de dibutiril AMP cíclico a concentraciones entre 10^{-5} y 10^{-3} M. Por otro lado tal como ocurre en otros tejidos, el AMP cíclico (66) es mucho menos efectivo debido a la escasa permeabilidad de las células para este último compuesto.

2) La síntesis de AMPcíclico por testículos aislados es estimulada al minuto de adicionar hCG y llega a un máximo dentro de dos horas de incubación. Por otra parte una proporción constante del nucleótido sintetizado en respuesta a la hCG es liberado al medio.

Efectos sobre la actividad de las gonadotrofinas en la unión de estas a sus receptores.

Es facilmente demostrable que las gonadotrofinas son degradadas durante su incubación. Es por ello que se considero de interes examinar las propiedades biologicas de hCG eluida de los testículos después de su captación durante incubaciones "in vitro". La elución de hCG-I^{125} se realizo mediante disminucion del pH a valores francamente ácidos (pH2-3), manteniendo la temperatura a 4° C.

La hormona eluida en esta forma fue mejor captada por homogena-

tos testiculares frescos, en contraste con la reducida captación de la hormona remanente en el medio de la primera incubación. Mas aún, la hormona eluida de las partículas testiculares fue mas activa que las preparaciones radiactivas originales, en producir la estimulación de la producción de testosterona, y en la activación de la formación de AMP cíclico.

Estos resultados han demostrado que no ocurre degradación de la hCG durante su union a los receptores específicos del testiculo. El aumento de la actividad de la hormona eluida es atribuible a la captación preferencial de moléculas hormonales biologicamente mas activas y su ulterior selección. Las preparaciones originales de hCG -I^{125} empleadas poseen un 50 a 75 % de la actividad de la hormona eluida a pH 2-3.

Este mejoramiento en las propiedades biológicas de la hCG eluida de sus sitios testiculares podria ser considerado como un ejemplo de purificación del preparado original de hCG por cromatografía de afinidad por unión a su receptor específico.

Objeto de la presente investigación

El propósito del presente trabajo es contribuir al esclarecimiento

de algunos mecanismos moleculares de la interacción de la gonadotrofina coriónica con sus receptores específicos, analizando fundamentalmente los siguientes puntos :

1) relación entre la síntesis de testosterona y la formación de AMP cíclico en testículos sometidos a la accion de hCG a niveles fisiológicos de la hormona.

2) papel de los restos de carbohidrato de la molécula hormonal en la unión de esta al receptor.

3) solubilización y caracterización del receptor hormonal .

REACTIVOS Y ENZIMAS

Preparación de gonadotrofinas.

La gonadotrofina coriónica humana (10. 000 U. I. /mg): fue gentilmente donada por el Dr. R. Canfield(Department of Medicine, Columbia University, New York) y el Dr E. Paseron (Laboratorio-Endocrino, Buenos Aires). Preparaciones crudas de gonadotrofina coriónica humana (Pregnyl, Endocorion) se obtuvieron de Organon Inc. West Orange N. J., y Laboratorio Endocrino, Buenos Aires, Argentina y en ciertos casos fueron purificadas en DEAE-Sephadex (45) o DEAE celulosa (67) con posterior separación por cromatografía en carboximetil celulosa (68). La actividad biológica de la preparación final medida por los metodos de disminución de ácido ascórbico ovárico fue de 11. 500-13. 000 U. I. /mg.

Las asialo hCG y agalacto-hCG fueron una donación del Dr J. Hirchman (National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases). Dichas preparaciones fueron obtenidas por tratamientos con neuraminidasa de Clostridium perfringens y β galactosidasa aislada de un extracto de cultivo de Diplococcus pneumoniae (48). Estas enzimas fueron removidas de las preparaciones hormonales mediante cromatografias de afinidad en columnas de Sepharosa-4B, anticuerpo antineuraminidasa (47) o

cromatografia en DEAE-celulosa equilibrada con "buffer" acetato 0,25 M pH 5,6, bajo cuyas condiciones la asialo-agalacto hCG se eluye en el volumen de exclusión. Sus potencias relativas por el método del aumento de peso de la próstata ventral fueron 0,75 U.I. /ug (asialo-hCG) y 2,3 U.I. / ug para asialo agalo-hCG.

La tiroglobulina fue donada por el Dr J. M. Bilstad.

El suero anti-testosterona fue obtenido mediante inmunización de ovejas a intervales de dos semanas con un conjugado de testosterona-globulina preparado por acoplamiento de la carboximetiloxima de la testosterona (69) a gamma globulina bovina en presencia de carbodiimida soluble (70).

El suero antitestosterona utilizado en el presente estudio posee una constante de asociación de $4,5 \times 10^{9}$ M^{-1} y liga 50-60 % de la testosterona H^{3} "tracer" usandolo a una dilución final de 1 : 2500.

El suero antisuccinil-AMPc-BSA: fue obtenido de Schwarz-Mann y utilizado en dilución 1:400 en "buffer" acetato 0,05 M pH 6,2.

Testosterona 1,2 H^{3} (40Ci/mMol) y AMP cíclico H^{3} (25Ci/mMol) fueron obtenidos de New England Nuclear Corporation; Carbon (Darco G-60) de Matheson Scientific y las placas delgadas para cromatografía sin indicador fluorescente de Merck (N 6062). Los solventes metanol, cloro-

formo y acetato de etilo (Baker grado analítico) se utilizaron sin posterior purificación y el eter etílico (Mallinckrodt analítico) fue utilizado inmediatamente despues de la apertura del recipiente. Polietilen-glicol (Carbowax 6000), se adquirió en Union Carbide. Sephadex G-200, Sepharosa 6 B, DEAE Sephadex, Blue Dextran 2000 y Dextran T-70 se adquirieron de Pharmacia Fine Chemicals, New Jersey y la resina Bio Rad AG 50 W-X8(100-200 mesh) y la concanavalina A a Calbiochem. Otros reactivos tales como, sacarosa, cloruro de cesio, albumina serica bovina, gamma globulina bovina y 7 S humana, fibrinogeno, apoferritina, mioglobina ovalbumina, y quimotripsinogeno fueron de Schwarz Mann y el bromuro de cianogeno de Eastman.

Tripsina y su inhibidor, neuraminidasa (Clostridium perfringens) fosfolipasa A (Vipera russelli), fosfolipasa C (Clostridium welchii) y DE AE celulosa se obtuvieron de Sigma y los tubos de poliestireno para radioinmunoensayos en fase solida de Falcon Plastic.

En todos los casos se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley que pesaban entre 250 y 300 gramos y que recibieron dieta balanceada y agua "ad libitum".

METODOS

Incubaciones con testículos intactos

Los testículos, obtenidos inmediatamente despues de sacrificar los animales por decapitación fueron decapsulados e incubados en un volumen total de 2 ml de "buffer" Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) conteniendo glucosa (1mg/ml) y suplementado como se describira.

Las incubaciones fueron realizadas a 34° C en un agitador metabólico a 150 revoluciones por minuto bajo una atmósfera de 95 % O_2, 5 % CO_2 durante períodos de hasta 4 horas.

Formación de AMP cíclico

a) Incorporación de Adenina C^{14}.

Los testículos fueron previamente incubados por 1 hora en 1,4 ml de KRB conteniendo 1 µCi de adenina C^{14} de actividad específica 225 mCi/mMol para marcar el "pool" endógeno de ATP (65 , 50).

Despues de la adición de 0,5 ml de una solución 20 mM de teofilina en KRB y 0,1 ml de "buffer" fosfato Dulbecco (PBS) conteniendo 1mg de gamma globulina bovina y concentraciones diferentes de hCG, las incu-

baciones se continuaron por períodos variados.

Alicuotas de 1ml del medio de incubación fueron anlizadas por el contenido de AMPc-C^{14} después del agregado de "portador" no radiactivo y AMPc H^3 (20.000 cpm) mediante purificación por cromàtografia en resina Dowex 50 y precipitación con hidroxido de sodio y sulfato de zinc de acuerdo al metodo de Krishna y col. (72) para la determinación de la actividad de la adenilato ciclasa. Los extractos purificados mostraron en cromatografias en capa delgada de alumina (73) un solo pico radiactivo (C^{14}) coincidente con AMPcíclico no radiactivo en el sistema acetato de etilo, etanol, acetato de amonio 0,5 M en las proporciones 5:5:2.

b) Radioinmunoensayos del AMP cíclico.

Alicuotas del medio de incubación (25, 50, y100 ul) fueron utilizadas para el análisis de AMPc por radioinmúnoensayo de acuerdo con el metodo de Steiner y col. (74) modificado por el uso de 70 % de dioxano en lugar del segundo anticuerpo, para la separación del compuesto marcado unido y libre.

Las alicuotas se incubaron por 3 horas a 4°C con 100 ul del antisuero antisuccinil-AMPc albúmina diluido 1:400 con "buffer" acetato 0,05 M pH 6,2 y 100 ul del mismo "buffer" conteniendo 6-10.000 cpm

(0,015-0,03 pMoles) de I^{125} -SCAMPTME(ester metílico de succinil AMPc-tirosina) "portador". Terminada la incubación, se agrego a cada tubo 50 ul de suero de caballo o gamma globulina bovina (5 mg/ml en PBS). Seguido por la adición de 2 ml de dioxano al 70 %. Después de centrifugar a 1500 x g durante 15 minutos y desechar los sobrenadantes, la radiactividad ligada a los precipitados se determinó en un contador gamma.

Los niveles tisulares de AMP fueron medidos similarmente por radioinmunoensayos después de homogeneizar en ácido tricloroacético 5 % (TCA) o ácido acetico etanol(1:1) los testículos previamente lavados con PBS. Para realizar el radioinmunoensayo, los extractos de TCA fueron lavados con eter etílico, llevados a sequedad con la ayuda de una corriente de aire y resuspendidos en "buffer" acetato 0,05 M pH 6,2. Resultados similares se obtuvieron por mediciones directas de los extractos o por purificacion previa por Dowex 50 , Zn-Ba, con correcciones para evaluación de pérdidas.

Producción de testosterona

La producción de testosterona durante las incubaciones realizadas se llevo a cabo radioinmunologicamente mediante la utilización de suero

antitestosterona obtenido como ya se ha detallado. Los medios de incubacion se centrifugaron a 1500 g por 10 minutos y los sobrenadantes fueron analizados inmediatamente o fueron congelados a - 15° C. Cuando se realizaron radioinmunoensayos directos en el medio de incubacion, los sobrenadantes se diluyeron 50 veces con ClNa 0, 15 M y se tomaron alicuotas de 25 a 250 ul para la determinación.

En los experimentos en que se realizaron extracción y cromatografia previa de los esteroides antes de su determinación por el anticuerpo, alicuotas de 100 ul del medio de incubación se mezclaron con un indicador interno para evaluar perdidas (1000 dpm de testosterona H^3 en 50 ul de etanol) y 1 ml de OHNa 0, 05 M. Despues de extraer las muestras con 30 ml acetato de etilo en tubos cónicos de 90 ml y aspiración de la capa acuosa, los extractos fueron lavados dos veces con 1 volumen de agua y evaporación posterior de la fase orgánica con la ayuda de una corriente de aire. Las paredes de los tubos donde se evaporó el acetato de etilo, fueron cuidadosamente lavadas por rotación del tubo con 0, 5 ml y 0, 25 ml de metanol con evaporación del mismo despues de cada lavado. De esta manera se logro concentrar en el fondo del tubo la casi totalidad de la muestra a analizar.

La determinación tisular de testosterona después de la incubación se realizo mediante homogeinización de cada glándula en 3 ml de ClNa

0, 15 M conteniendo 5 % de etanol, seguida por extracción con 30 ml de a acetato de etilo, como ya se describio.

Para cromatografiar, los extractos fueron transferidos con la ayuda de la mezcla cloroformo-metanol 1:1 a hojas de capa delgada, aplicando un marcador de 20 ug de 17α hidroxiprogesterona a 2 cm de distancia de cada extremo de la hoja y las muestras a intervalos de 4 cm . La cromatografia se desarrol lo dos veces en el sistema cloroformo eter 4:1 previamente equilibrado por dos horas. En este sistema, tanto Δ 5 androstenediol, como el Δ 4 androstenediol, androstenodiona dihidrotestosterona y el estradiol 17β se separan de la testosterona.

El uso de 17α -hidroxiprogesterona como marcador se basa en la similitud de movilidad cromatografica que presenta este esteroide en la casi totalidad de los sistemas conocidos con la testosterona y la escasa reaccion cruzada ("cross-reaction") en las determinaciones radioinmunologicas. Despues de la cromatografia las areas correspondientes cortaron y eluyeron con 6 ml de metanol , luego de ello el solvente fue evaporado con una corriente de aire o nitrógeno.

Los residuos fueron luego disueltos en 1 ml de solución fisiológica y alicuotas de 50 y 100 ul se llevaron a 250 ul para su análisis. Una tercer alicuota de 200 ul se mezclo con 10 ml de solucion centellante (42 gr de

. Permablend New England Nuclear/litro de tolueno) para evaluar la recuperación en las muestras individuales.

Radioinmunoensayos

Las muestras de testosterona "testigos" (15 a 2000 picogramos) en 250 ul de solución fisiológica se junto con 0,5 ml del anticuerpo de testosterona (diluido 1:2500 en PBS que contiene 1mg/ml de BSA) y 0,5 ml de la testosterona de referencia (35.000 dpm, 80 pg en el mismo diluyente) Se incubaron 16 horas a 4° C. Luego de ello se separó la forma unida de la libre por el agregado de 0,2 ml de una suspension de carbón-dextrano (250 mg de Carbon Darco G-60 y 25 mg de Dextran T-70 en 100 ml de agua destilada). La suspensión se agito suavemente en un vortex y luego se dejo reposar 20 minutos a 4° C, los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 1200 g, luego de ello los sobrenadantes conteniendo la forma ligada se transfirieron a viales junto con 1 ml de dioxano para asegurar la completa extracción del esteroide ligado al anticuerpo y ulteriormente se agrego 10 ml de solución centellante.

Preparación de Sepharosa-Concanavalina A

La concanavalina A fue unida a sepharosa (75, 76) de la siguiente manera : 50 gr de sepahrosa 6 B lavada y suspendida en 40 ml de agua destilada se activo por el agregado de 50 ml de una solución al 16 % (p:v) en agua de bromuro de cianógeno recientemente preparada, mezclando continuamente con la ayuda de un agitador magnético y manteniendo el pH en 11 mediante la adición de una solución de OHNa 4 M. La reaccion que aproximadamente llevó a 20° C unos 10 a 12 minutos se consideró terminada cuando no se requirió adiciones ulteriores de álcali para mantener el pH. En estas circunstancias se consumieron unos 6 a 8 ml de OHNa. Inmediatamente la suspensión conteniendo la sepharosa activada se filtro por Buchner y lavo con 100 ml de agua destilada y 100 ml de una solución 0, 1 M de bicarbonato de sodio. Luego de ello, el sólido, se agrego a una solución de 500 mg de concanavalina A disuelta en 40 ml de ClNa 1 M, completandose la mezcla en 40 ml de CO_3HNa 1M. Dicha mezcla se dejo entonces agitando durante la noche a 4° C y luego de ello la preparación se lavó por filtración a traves de un embudo de vidrio poroso con dos litros de CO_3HNa 0, 1 M.

La eficiencia del acoplamiento fue determinada por comparación

de la absorción a 280 nm de la solución original de concanavalina A con la correspondiente a los liquidos de filtrado y lavados obtenidos después de producido el acoplamiento.

El rendimiento en las condiciones mencionadas fue de un 95 a un 100 %. Las preparaciones de sepharosa-concanavalina A fueron mantenidas en PBS a 4° C. El éxito de la activación, depende casi exclusivamente de la calidad del bromuro de cianógeno.

Obtención de hormonas radiactivas

Para la mayoria de los estudios se utilizó como ligando, hCG marmarcada con I^{125} de una actividad específica correspondiente a un átomo de iodo por molécula. Una serie de pruebas comparativas han demostrado que la hCG iodada presenta mayor afinidad por los receptores testiculares que preparaciones similares de LH humano u ovino, como asi también mayor estabilidad.

Para preparaciones óptimas de la hormona marcada 10-20 µg de hCG (10-12000 U.I./mg) fueron marcadas con 1 mC de I^{125} por una modificación del metodo de la cloramina T que a continuación se detalla.

Todos los reactivos fueron agregados a tubos de vidrio de 10 x 75

mm mantenidos en hielo, de acuerdo a la sigueinte proporción:

1) hCG (10.000-12.000 U.I./mg) 1 mg/ml - 25 ul.

2) "Buffer" fosfato 0,5 M pH 7,4-65 ul.

3) I^{125} libre de portador en OHNa 0,1 N-20ul, 2mC

4) Cloramina T recién preparada, 1 mg/ml-25 ul.

Después de agitar vigorosamente durante 20 segundos, la mezcla de iodinación fue transferida a una columna de celulosa o a una de sepharosa-concanavalina A para purificación de la hormona marcada.

Ambos metodos suministran hormona marcador de propiedades aceptables para estudios de "binding", aunque el proceso de cromatografia de afinidad utilizando sepharosa-concanavalina A, suministro preparaciones de capacidad de unión significativamente mayor.

a) Purificación por columnas de celulosa.

Se preparo una pequeña columna de celulosa en polvo Whatmann CF 60 comprimiendo suavemente hasta la marca indicada de 2 ml en una jeringa descartable de plástico de 6 ml. El embolo se utilizo para la compresión. Una vez transferida la mezcla de reacción sobre la celulosa seca, la columna es lavada cuatro veces con alicuotas de 4 ml de PBS y a continuación la hormona radiactiva se eluyo con alicuotas de 4 ml de una solución al 2 % de gamma globulina o albúmina sérica bovina en PBS.

El método es rápido y simple y la mayoria de la hormona yodada se eluye en las primeras dos fracciones.

b) Purificación por cromatografia en sepharosa-concanavalina A.

La afinidad de los restos carbohidratos de las hormonas glucoproteicas por concanavalina A fue aplicada para la purificación de las gonadotrofinas marcadas.

Mediante este método, dichas hormonas son especificamente adsorbidas a sepharosa-concanavalina A y luego eluida con soluciones de α metilglucósido o α metilmanosido. La selectividad de este procedimiento por la porción de hidratos de carbono de la molécula marcada, contrasta enormemente con el metodo de absorción en celulosa, donde el componente proteico es el que desempena el papel principal.

Para la purificacion de I^{125}-hCG, la mezcla de iodinación fue transferida a una columna de sepharosa-concanavalina A (5 x 140 mm). El yodo libre y la hormona dañada fueron eluidos con 12 ml de PBS conteniendo 1mg/ml de gamma globulina bovina, luego de ello, la hormona marcada fue eluida con la misma solución conteniendo 0,2 M α metilglucósido.

La hormona preparada por combinación de los dos procedimientos posee la mayor captación específica, suministrando al mismo tiempo los mejores blancos, Las propiedades físicas de la I^{125}-hCG obtenida por es-

tos métodos, no difieren de las de la hormona no marcada por los criterios utilizados (filtración por gel, elctroforesis en gel de poliacrilamida, electrofocus).

La concentración de hormona en las preparaciones radiactivas, se determinó mediante radioinmunoensayos (77). Es de hacer notar que marcaciones de hCG por el método de la lactoperoxidasa (78) produjeron preparados similares a los obtenidos con cloramina T aunque no mostraron ventajas en su realización.

Estudios recientes, han demostrado que los residuos de tirosina marcados con I^{125} en radiodinaciones de hormonas gonadotroficas humana y ovina (79) se encuentran localizados exclusivamente en las subunidades α de estas hormonas, mientras que los correspondientes a la subunidad β permanecen sin marcar. Esto sugeriria que dichos grupos estan presumiblemente enmascarados por encontrarse en la región de union de ambas subunidades (80).

Se ha demostrado también que estas hormonas mantienen su completa actividad biológica a juzgar por los ensayos de aumento de peso de la prostata ventral y la disminución del contenido de ácido ascórbico ovárico (81-82) y la producción de testosterona por testículos aislados (34)

La actividad específica usual de la I^{125} -hCG empleada en estos es-

tudios fue de 60-100.000 dpm por nanogramos o aproximadamente 50 uCi/ug.

Componentes del ensayo de unión de la hCG a la fracción particulada

La interaccion entre las gonadotrofinas y sus receptores se estudio fundamentalmente sobre la base de la inhibición específica de la unión de I^{125}-hCG a componentes particulados de células intersticiales de testículos de rata adulta, en la presencia de LH o hCG no radiactivas. Testículos de ratas de 300 gr Sprague Dawley fueron decapsulados y desgarrados cuidadosamente (cardados) en "buffer" Dulbecco pH 7,4 (PBS) en la relación 3ml/testículo. Mediante este procedimiento se ha demostrado que fragmentos de células intersticiales de alta afinidad de unión para las hormonas LH y hCG (28, 30) son liberados al medio.

Una posterior liberación de particulas pudo obtenerse por agitacion de la masa de túbulos dispersos por 5-10 minutos con un agitador magnético. Despues de la filtración a traves de algodón, la suspensión fue centrifugada a 120 g por 20 minutos para eliminar células intactas y restos de tejido. La fracción sobrenadante fue centrifugada a 1500 g durante 15 minutos a 4° C y el precipitado obtenido diluido con PBS en la

proporción de 5 ml/testículo utilizado.

En los casos en que se procedio a la solubilización del receptor, el sobrenadante de 120 g fue centrifugado a 27.000 g durante 20 minutos y a continuación se procedió como se describirá.

Para los ensayos de unión a la fracción particulada, alicuotas de 0,5 ml de la suspensión de "receptores" fueron incubadas durante 16 hs a 24° C con 0,5 ml (200-400.000) cpm I^{125}-hCG y hormonas de referencia (0,1 ml) en un volumen final de 1,1 ml. Al dia siguiente se agregó 3 ml de PBS frío y todos los tubos se centrifugaron a 15000 g durante 10 minutos. Los precipitados fueron resuspendidos en 4 ml del mismo "buffer " y centrifugados nuevamente. Despues de aspirar los sobrenadantes, los tubos se contaron en un contador gamma. Todas las hormonas ensayadas fueron diluidas en PBS conteniendo 1 mg/ml de gamma globulina bovina.

Solubilización de partículas testiculares

Los precipitados de 27.000 g obtenidos como se detallo anteriormente fueron suspendidos en soluciones al 1 % de Triton X-100, en PBS, durante 30 minutos a 4° C. Despues de diluir las muestras a 10 veces con

PBS la solución se centrifugó a 27.000 g durante 10 minutos para remover partículas no solubilizadas. El tratamiento de la fracción particulada correspondiente a 10 testículos con 0,5 ml de Triton X-100 al 1 % extrae la mayoría de los lugares de unión formando una solución cuya concentracion en proteinas es de 4 mg/ml. Estosreceptores permanecieron en solución aun después de centrifugar las muestras a 360.000 g por 3 horas.

En algunos experimentos, las partículas testiculares fueron pre-incubadas con I^{125}-hCG para marcar los sitios receptores antes de proceder a la extracción con detergentes. En estos casos, 40 mg de particulas intersticiales fueron incubados a 4°C por 16 horas con 600.000 cpm (20 nanogramos) de I^{125}-hCG. Al final de la incubación se procedió a lavar exhaustivamente las partículas con PBS frío, mediante sucesivas centrifugaciones y resuspensiones, a fin de eliminar el exceso de hormona marcada.

En estas condiciones entre 40-60 % de la hormona fue captada por la fracción particulada y permaneció aun unido a ella al cabo de varios días de almacenamiento entre 0 y 4° C. Estas particulas marcadas fueron de gran valor para determinar la eficacia de los procedimientos de solubilización por diferentes detergentes. Por otra parte, los complejos hormona receptor extraidos de estas particulas demostraron ser mas estables

que el receptor soluble extraido de partículas testiculares que no fueron previamente marcadas con hCG.

Ensayos de unión al receptor soluble

El tamaño relativamente grande del ligando (PM 37.000) constituyó un factor limitante del rango de procedimientos para la separación de las formas libre y ligada en los ensayos de unión realizados en fracciones solubles.

Procedimientos de absorción para eliminación de la forma libre no pudieron ser aplicables y los métodos de precipitación para aislación del complejo hormona-receptor dieron en general valores relativamente elevados en los controles a causa de la coprecipitación de la hormona libre.

El complejo receptor-hormona pudo ser adsorbido por membranas de celulosa, pero nuevamente la unión no específica de la hCG libre proporcionó valores moderadamente elevados.

Resultó un método satisfactorio para la aislación del complejo hormona-receptor, la utilización de polietilenglicol (PEG) en la concentracion final de 12 % peso/volumen.

Para la aislación del complejo hCG-receptor, fue necesario precipitar a 12 % de PEG seguido por inmediata redisolución del precipitado en 0,1 % Triton X-100 y una segunda precipitación a 12 % de propilenoglicol para obtener blancos satisfactorios.

En detalle, alicuotas de 0,5 ml de la solución de "receptor" se mezclan con 0,1 ml de PBS conteniendo o no cantidades conocidas de hCG no radiactiva. Inmediatamente la mezcla es vigorosamente agitada con 50.000 cpm de I^{125}-hCG.

La ligadura no específica se determinó en ensayos donde la hormona radiactiva es incubada con el receptor en presencia de un exceso de hormona fria (20 ug hCG) y tambien en la ausencia de receptor.

El volumen final de la mezcla de incubacion fue de 0,7 ml y el tiempo de incubación de 16 horas a 4° C.

Al finalizar la incubación se agrego a cada tubo 0,2 ml de una solucion de 5mg/ml de gamma globulina bovina y 0,5 ml de una solución al 30 % en PBS de polietilenglicol. Después de agitación y reposo por 15 minutos en hielo, los tubos fueron centrifugados a 2.000 g por 10 minutos a 4° C y los sobrenadantes se descartaron. Los precipitados se redisolvieron en 0.9 ml de una solución al 0,1 % de Triton X-100 en PBS y se precipitaron con 0,5 ml de la solución al 30 % de polietilenoglicol como

ya de detallo. Después de una posterior centrifugación y aspiración de los sobrenadantes , la hormona ligada presente en los precipitados se determino contando la radiactividad remanente en los tubos de ensayo en un contador gamma. Mediante este procedimiento, la unión no específica presente en los tubos conteniendo exceso de hormona no radiactiva se encuentra generalmente por debajo del 1 % de la radiactividad agregada y la union específica varió entre 20-40 %, dependiendo de la concentración de receptor presente.

Filtración por gel

Columnas de Sephadex G-200 (2,5 x 100 cm) y Sepharosa 6B (0,9 x 100 cm) fueron equilibradas con "buffer" Tris-ClH, 50 mM pH 7,4, conteniendo 0,1 % Triton X-100 y las corridas se realizaron a 4° C.

Para minimizar la adsorción del receptor soluble a la agarosa, el "buffer" empleado en las columnas de Sepharosa 6B, tambien contuvo 0,1 % de albúmina sérica bovina.

Las columnas fueron calibradas con Blue Dextran y H_2O tritiada para definir Vt y marcadores constituidos por las siguientes proteinas no radiactivas o marcadas con H^3 y C^{14} o I^{125} : tiroglobulina, apoferritina,

7 S-Gamma globulina humana y mioglobina. En cada experimento H_2O tritiada y dos o tres proteinas de referencia fueron agregadas a la alicuota del receptor soluble aplicado en la columna y se calcularon los valores Kav para el complejo receptor-hormona, la hormona libre y en algunos casos para el receptor libre.

Para determinar Vo durante la filtración por gel del receptor soluble no fue posible utilizar Blue Dextran ya que exhibe una alta afinidad por el receptor, causando virtualmente la exclusión total del la radiactividad unida en el volumen de exclusión.

Sin embargo, un pequeño pico radiactivo con absorbancia detectable a 280 nm fue permanentemente evidenciado en el volumen de exclusión de las columnas utilizadas para filtración por gel de las preparaciones solubles del receptor que fueron equilibradas con I^{125}-hCG.

Este pico menor de material agregado coincide con la posicion del pico de Blue Dextran y fue utilizado para indicar el volumen de exclusión

Ademas de la adsorción ralativamente debil del receptor soluble a la Sepharosa 6 B durante la filtración por gel en largas columnas de agarosa, el receptor libre demostro ser fuertemente adsorbido por Sepharosa-Concanavalina A, indicando la presencia de residuos de carbohidratos en su estructura.

Centrifugación en gradientes

Los gradientes de ultracentrifugación en sacarosa 5-20 % (P/V) conteniendo 0,1 % del correspondiente detergente (Triton X-100, Lubrol PX, Lubrol WX, SDS o Deoxicolato de Sodio) fueron analizados en una ultracentrífuga Beckmann modelo L2-65 B, empleando un rotor SW 40. Dichos gradientes fueron preparados con un formador de gradientes LKB modelo 11300, utilizando un esquema lineal. Para cargar los gradientes directamente en tubos de nitrato de celulosa de 9/16" diametro x 3 3/4", se utilizó una bomba Buchler Polystaltic de tres canales.

Los gradientes se estacionaron generalmente a 4°C por 3-4 horas antes de ser utilizados. Este procedimiento suministra gradientes extremadamente lineales y reproducibles verificados por el método de Martin y Ames (83).

Las muestras de usualmente 0,5 ml fueron aplicadas despues de agregarles las proteinas marcadoras, generalmente BSA y 7 S-gamma globulina humana. Otros marcadores fueron apoferritina y tiroglobulina o la I^{125}-hCG libre, que se encontraba presente en la muestra.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo a 38.000 rpm durante 16-18 horas a 4°C, y las fracciones fueron colectadas cada 15 segundos por

aspiración a traves de un capilar de vidrio conectado a la bomba de succión. El número total de fracciones fue generalmente de 43, con un volumen individual de 0,35 ml.

La posición de los picos proteicos fue determinada mediante la lectura de su densidad optica a 280 nm y los picos radiactivos fueron localizados contando la radiactividad presente en cada fraccion.

Para determinar la densidad del complejo hormona-receptor como asi tambien la de la hormona, se realizaron centrifugaciones en gradientes isopícnicos de cloruro de cesio en presencia de 0,1 % de Triton X-100

Las muestras en un volumen de 0,4 ml fueron sembradas sobre 4,5 ml de una solución al 50 % P/V de cloruro de cesio en "buffer" Tris 50 mM, pH 7,4 conteniendo 0,1% de Triton X-100 y centrifugadas por 40 horas a 50.000 rpm en un rotor SW 65 a 4° C. Se obtuvo un total de 36 fracciones, cuyas densidades fueron determinadas por medición de los correspondientes índices de fracción a 25° C.

Las proteinas se determinaron por el metodo de Lowry y col (84) usando albúmina sérica bovina como referencia.

El acido siálico libre fue medido por el método de Warren (85) y el ligado a proteinas fue determinado después de digerir las muestras con ácido sulfúrico 0,1 M durante 1 hora a 80° C.

La determinación de la galactosa liberada por acción de β-galactosidasa se realizó mediante la reaccion con galactosa deshidrogenasa (86 (86).

RESULTADOS

Síntesis y liberación de AMPc.

En experimentos iniciales se determinó que la incubación de testículos de rata con hCG da lugar a una liberación de AMP cíclico al medio. Esta liberación pudo determinarse bien por la transformacion de adenina C^{14} a AMP cíclico o bien por la aparición en el medio de nucleótido cíclico medible por la técnica radioinmunológica. Por ambos metodos los resultados fueron equivalentes asi como tambien lo fue la actividad especifica del nucleótido cíclico medida en diferentes tiempos de incubación (Tabla I).

Dicha concordancia indica que el AMPcíclico recientemente sintetizado constituye una proporción constante del total liberado al medio. Por tal razón, en las experiencias sucesivas se utilizó para la determinación de los niveles de AMPc el metodo radioinmunológico por sus conveniencias operacionales.

TABLA I. Liberación de AMPc marcado y frío al medio de incubación de testículos de rata en presencia de 20 ng de hCG en las condiciones especificadas en métodos.

Tiempo de incubación (min)	AMPc (dpm)	AMPc inmunoreactivo (pmoles)	dpm/pmol
30	2223 ± 628	134 ± 16	16.0 ± 2.0
60	6109 ± 867	384 ± 41	15.8 ± 0.6
120	7909 ± 1021	460 ± 41	14.4 ± 0.8

"Unión" de las gonadotrofinas a los receptores y "activación" testicular.

La unión de hCG a los receptores gonadales puede ser estudiada durante incubaciones de testículos decapsulados intactos con gonadotrofinas marcadas. Esta preparación ha demostrado ser extremadamente sensible a la estimulación gonadotrofica "in vitro" y su respuesta puede determinarse por la liberación de testosterona o AMP cíclico al medio de incubación.

Durante incubaciones por cuatro horas hasta un 50 % de la hormona radiactiva agregada es captada por los testículos. En todos los casos los resultados han sido corregidos substrayendo al valor de la captación determinado, el correspondiente a la union. Este último se evaluo en presencia de un exceso de hormona fria (10^{-7} M) y en todos los casos oscilo entre un 10 y un 12 %.

En estos estudios la captación específica de hCG, medible segun dicha diferencia, fue observada aun a los niveles mas bajos de hormona empleada (1000 cpm; $0,5 \times 10^{-12}$M) y pudo determinarse que la estimulación de la síntesis de testosterona ocurre en el rango de concentración hormonal entre 10^{-12}-10^{-11} M.

Sin embargo, la captación de I^{125}-hCG, agregada sola en cantida-

des crecientes o como cantidad constante de hormona marcada en presencia de concentraciones crecientes de hormona fría, continuó en forma lineal hasta niveles mucho mayores que aquellos necesarios para producir la máxima respuesta esteroidogénica "in vitro".

La captación total de hCG por los testículos intactos, fue aproximadamente de 200 ng por testículo, mientras que la máxima esteroidogénesis se alcanzaba cuando la unión de hCG era solamente de 0,5 ng por testículo.

La determinación simultanea del AMP cíclico liberado al medio de incubación indicó que la liberación del nucleótido se hace detectable al mismo nivel de hCG requerido para producir la máxima estimulación de la producción de testosterona (Figura 1), aumentando luego en una forma proporcional a la dosis hasta un nivel máximo cuando la hCG unida era de aproximadamente 100 ng por testiculo (Figura 2).

En esta forma, la máxima estimulación en la producción de testosterona fue detectada cuando solamente un 0,25 % del número total de sitios de ligadura estaban ocupados. Por otro lado la ulterior ocupación de los sitios receptores de hCG restantes es coincidente con la estimulacion (3-400 veces) de la adenilato ciclasa.

Estos resultados demuestran la presencia en el testiculo de un

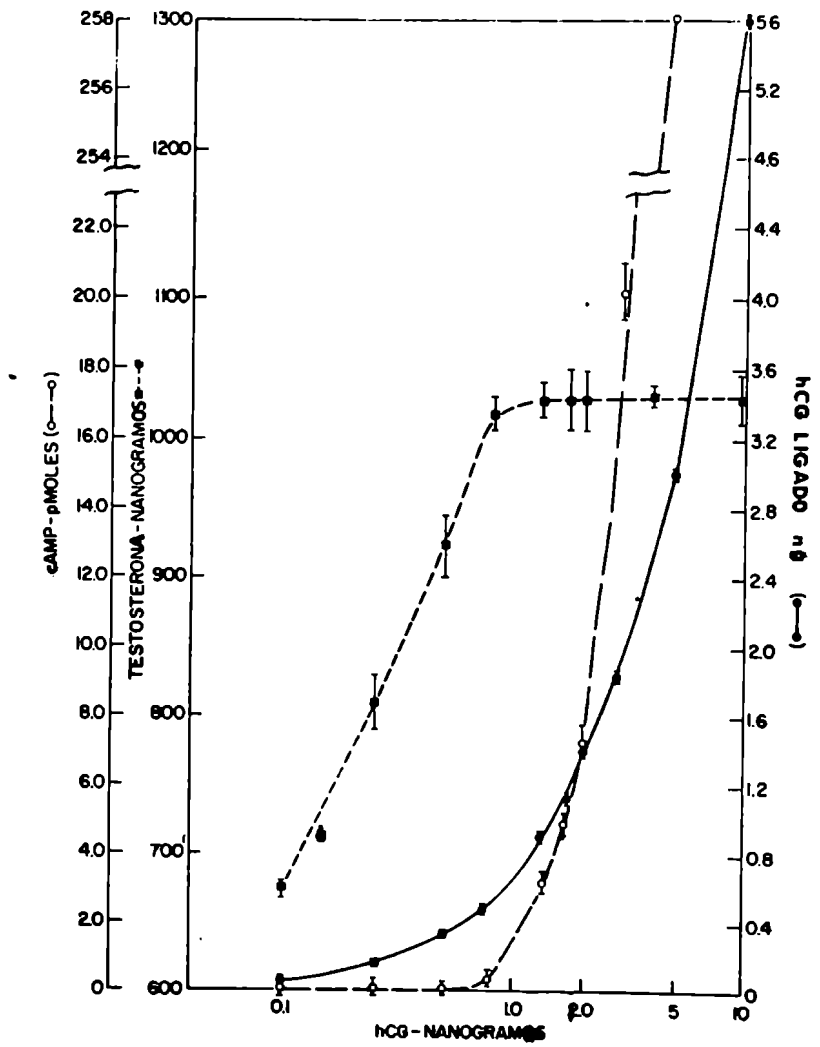

FIGURA 1 : Determinaciones simultaneas de ligadura específica de hCG (•...•), liberación de AMP cíclico (o...o) y producción de testosterona (•...•), en incubaciones de testículos de rata decapsulados, con cantidades de hCG en el rango entre 0, 1 y 10 ng/ml.

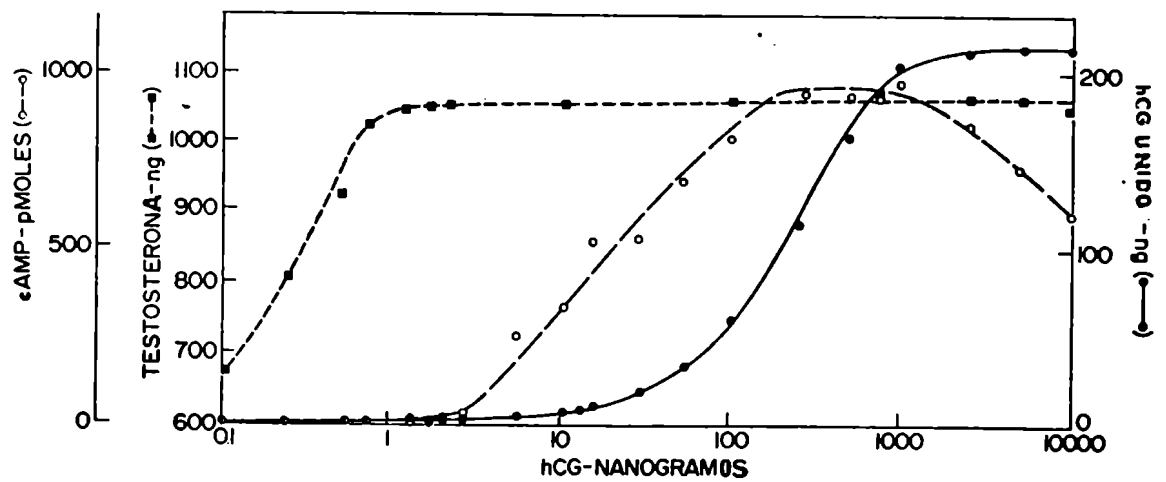

FIGURA 2 : Determinaciones simultaneas de ligadura específica de hCG, liberación de AMP cíclico y producción de testosterona en incubaciones de testículos decapsulados de rata con cantidades de hCG en el rango entre 0, 1 y 10. 000 ng/ml. Las condiciones fueron idénticas a las correspondientes a la figura 1.

gran número de sitios receptores específicos en exceso de aquellos necesarios para producir una síntesis maxima de esteroides y que tanto la unión de la hormona a sitios de ligadura como la formación de AMP cíclico, aumentan en proporción a la concentración de hCG sobre mas de dos ordenes de magnitud en exceso de la concentración requerida para producir su máximo efecto fisiológico. El papel de estos receptores en exceso, tiene que ser aún aclarado.

En estudios cuidadosos de la unión de la hCG en el rango crítico de estimulación de la esteroidogénesis, no fue detectada ninguna diferencia en la afinidad de los primeros receptores en ser ocupados por hCG, y no hay evidencias que prueben que los primeros sitios en ser estimulados difieran de aquellos activados por adiciones posteriores de gonadotrofinas.

Por otra parte en incubaciones de testículos con cantidades de gonadotrofinas en el orden de 1 ng/ml, se observó que la cantidad de AMPc liberada al medio de incubación, aumenta marcademente por el agregado de teofilina mientras que la cantidad de testosterona no es mayormente afectada por la presencia de dicho inhibidor de la fosfodiesterasa (Figura 3).

Estos experimentos tenderian a demostrar que el aumento de la

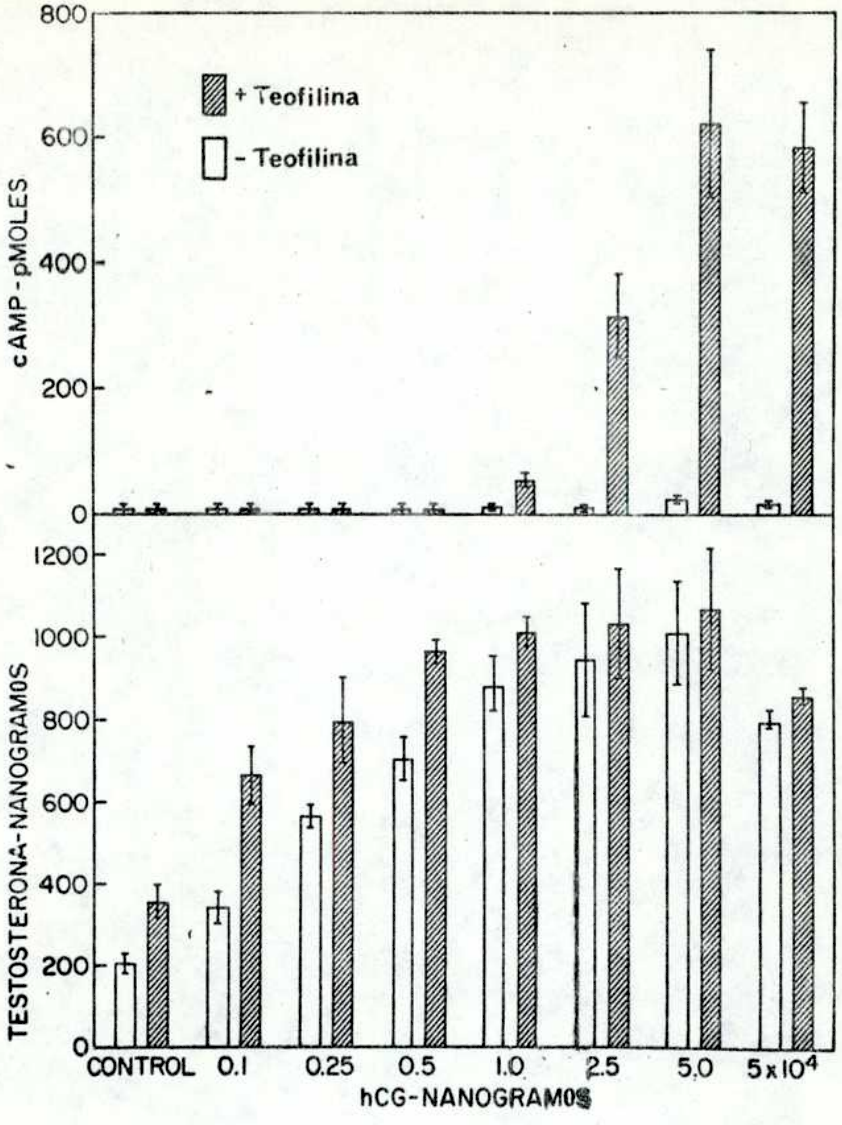

FIGURA 3 : Determinación simultanea de AMPc y testosterona liberada al medio de incubación. Los testículos decapsulados fueron incubados en "buffer" Krebs Ringer bicarbonato con las concentraciones indicadas de hCG en presencia o ausencia de teofilina durante 4 horas a 34° C.

síntesis de testosterona puede ocurrir sin aumento detectable en la formación de AMPcíclico. Estas observaciones podrian cuestionar el papel directo del AMP cíclico en la esteroidogénesis o pueden simplemente reflejar la ocurrencia de un incremento inicial de AMP cíclico en un compartimiento que es insignificante en relación con el contenido total de 3', 5' AMP.

Niveles tisulares de AMPc y testosterona durante la estimulación con hCG

Durante la incubación de los testículos por cuatro horas los niveles tisulares de AMPc no variaron respecto al control en presencia de concentraciones de gonadotrofina entre 0,25 y0,50 ng/ml (Tabla 2). Un ligero incremento en la concentración del nucleótido se observó a una concentración de hCG de 1ng/ml.

Por otra parte, el testículo intacto responde a la estimulación con concentraciones de hCG 4 veces inferiores a dicho valor, con la producción y liberación de testosterona.

TABLA 2 : Concentraciones de testosterona y AMPc en los testículos incubados durante 4 horas con concentraciones crecientes de hCG.

hCG ng.	Testosterona ng. testículo	AMPc pmoles/g
Control	24 ± 7	500 ± 53
0,25	77 ± 31	493 ± 63
0,50	214 ± 54	603 ± 58
1,00	303 ± 56	650 ± 43

TABLA 3 : Liberación de ácido siálico y galactosa por tratamiento con neuraminidasa y β galactosidasa.

Tratamiento	Proteinas totales (mg)	Acido siálico total (u moles)	Galactosa total (u moles)	Acido siálico liberado (u moles)	Galactosa liberada (u moles)
Neuraminidasa	18,5	3,9	3,45	3,53	-
Neuraminidasa + βGalactosidasa	20,5	4,23	3,93	3,98	3,5

Propiedades biológicas de la asialo-hCG y asialo-agalacto-hCG

La remoción de los residuos de acido siálico terminal de la molécula de hCG por tratamiento con neuraminidasa produce una marcada reducción de su actividad biológica "in vivo", sin alterar las propiedades inmunológicas.

Esta perdida de actividad hormonal "in vivo" ha sido atribuida al aumento de la clarificación metabólica de la hormona modificada.

Recientemente, estudios con hCG-desialilada y con asialo-agalacto hCG han demostrado que estas hormonas aun cuando retienen su afinidad por los sitios específicos testiculares, su actividad biológica determinada por la estimulación de la esteroidogénesis se encuentra substancialemnte disminuida.

Los resultados aqui presentados tratan de correlacionar la participación de los restos de carbohidratos mencionados con la "unión" de la hormona a sus receptores y la estimulación de la formación de testosterona.

La liberación de acido siálico y galactosa durante la hidrólisis enzimática de los preparados utilizados en el presente estudio se muestran en la (Tabla 3)

Tres alicuotas de 20 ug cada una de hCG intacta, asialo hCG y asialo-agalacto fueron marcadas con I^{125} y purificadas por columnas de celulosa, como se detalló en métodos. Inmediatamente despues de producida la marcación y purificación, las muestras se depositaron sobre gradientes de sacarosa 5-20 % en "buffer" Tris-ClH-50mM, pH 7,4 corridas a 55.000 rpm durante 17 horas en un rotor SW 56 Beckmann.

En estas condiciones la preparación correspondiente a asialo hCG mostro dos picos correspondientes a constantes de sedimentacion 2,75 S y 2,20 S (pesos moleculares de 28.000 y 20.000 respectivamente).

Ambas areas, fueron nuevamente centrifugadas en las mismas condiciones. La radiactividad asociada a la fracción correspondiente a asialo-hCG constituye un 45-50 % de la cantidad original.

Mediante el mismo procedimiento se verificó que un 15 % de la cantidad total original correspondiente a asialo-agalacto-hCG coinciden con las caracteristicas de sedimentacion de tal hormona, mientras que el 85 % restante corresponde a una fraccion que migra con una constante de sedimentacion promedio de 1,65 S poseyendo un peso molecular aproximado de 13.000 Daltons.

Actividad inmunológica de asialo y agalacto hCG

Los radioinmunoensayos de hCG-intacta, asialo y asialo-agalacto hCG demostraron que no existen diferencias detectables en lo que respecta a la actividad inmunológica. La actividad promedio de los tres preparados determinada radioinmunologicamente fue de 5.400 U.I./mg.

Potencia en el sistema receptor-radioligando

Como en el método de radioinmunoensayo no se observó ninguna diferencia en la habilidad de las tres preparaciones, hCG, asialo hCG y asialo-agalacto hCG, para competir con I^{125}-hCG por la unión a los sitios receptores gonadales de homogenatos de testículo (Figura 4).

Actividad esteroidogénica "in vitro"

Las preparaciones se asialo-hCG y asialo agalacto -hCG obtenidas por purificación en gradientes de sacarosa demostraron estimular la producción de testosterona en forma similar a la producida por hCG sin modificaciones estructurales (Figura 5).

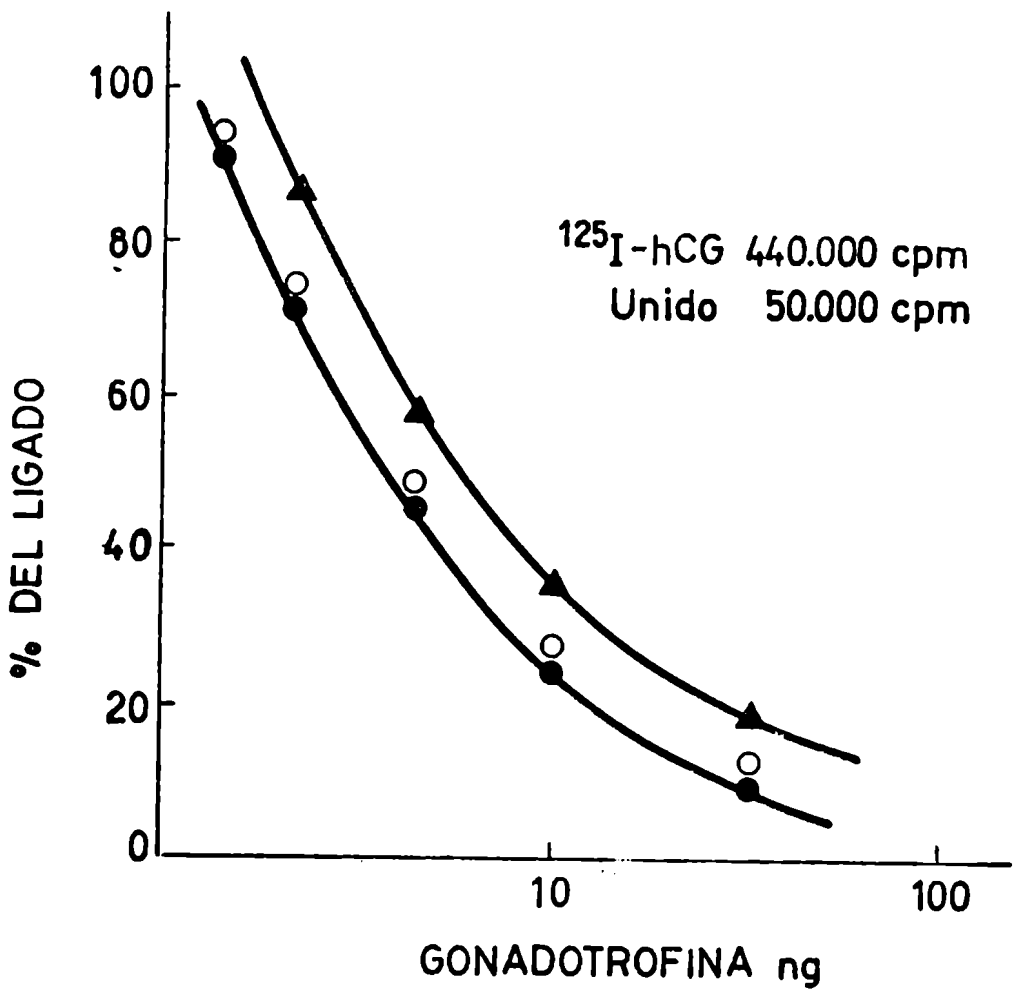

FIGURA 4 : Inhibición de la union de I ^{125}-hCG a homogenatos de testiculos de rata por concentraciones crecientes de hCG intacta (▲—▲), asialo hCG (O — O) o asialo-agalacto-hCG(● — ●). Cada punto representa el promedio de tres determinaciones.

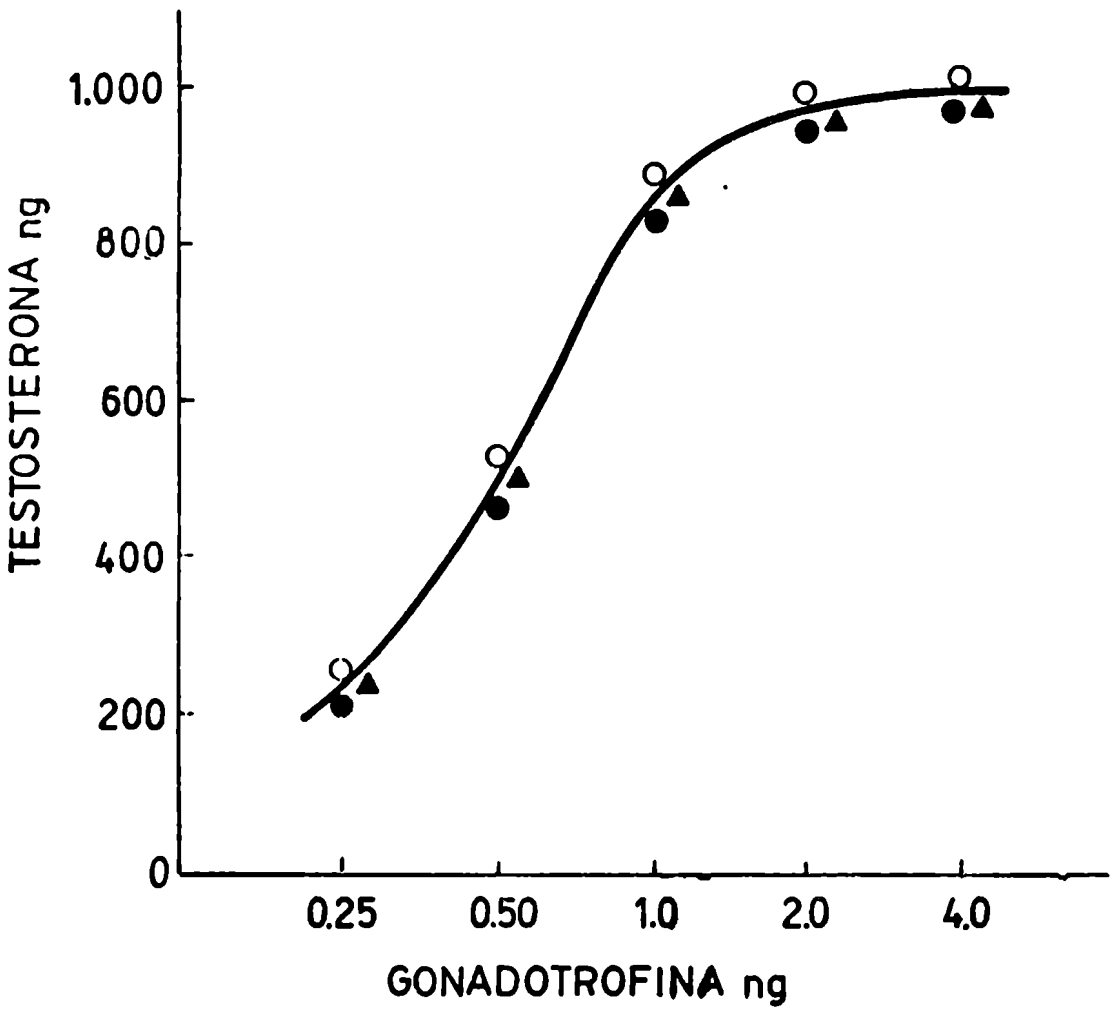

FIGURA 5 : Potencia biológica "in vitro" de preparaciones de hCG intacta (▲——▲), asialo hCG (o ——o) y asialo-agalacto hCG (●——●). Cada punto representa el promedio de 3 incubaciones expresadas como producción de testosterona en ng por testículo por 4 horas de incubación.

Estos estudios demuestran claramente que la remoción de siálico y/o galactosa de la molécula de hCG no destruye la afinidad de esa hormona por sus sitios específicos receptores ni su actividad a nivel efector a juzgar por la activación "in vitro" en la producción de testosterona.

Solubilización del receptor gonadal de hCG

Los receptores de hormonas peptídicas han sido estudiados en homogenatos y preparaciones de membranas de variados tejidos, y en algunos casos demostraron estar asociados con la actividad adenilato ciclasa en tales fracciones particuladas (12, 13, 28, 87-90).

Estos receptores son resistentes a los procedimientos físicos de fraccionamiento:homogeinización, sonicación y ruptura celular por alta presión.

Sin embargo la complejidad y la naturaleza esencialmente insoluble en soluciones acuosas de los sitios receptores ligados a membranas ha impedido un análisis detallado de sus propiedades.

Los sitios receptores para la adrenocorticotrofina en un tumor suprarrenal fueron dispersos exitosamente en minúsculos fragmentos membranosos por sonicación y por disrupcion a alta presión, en presencia de fosfotidiletanolamina (12). Mas recientemente se han utilizado tratamientos empleando detergentes tales como Lubrol y Triton X-100 para preparar formas solubles del receptor adrenérgico cardíaco (91) y de la insulina en tejidos adiposo y hepático. (92).

A fin de avanzar en el estudio de la naturaleza de los sitios receptores de gonadotrofinas, las fracciones subcelulares que presentaban alta afinidad específica por LH y hCG fueron tratados con diferentes detergentes para obtener preparaciones "solubilizadas" adecuadas para su caracterizacion fisicoquímica.

El tratamiento de fracciones particuladas con soluciones conteniendo 1% de TritonX-100 dio lugar a la solubilización de los receptores para LH y hCG. Luego de este tratamiento el material con actividad ligadora se lo obtuvo en los sobrenadantes de centrifugaciones sucesivas primero a 27. 000 g por 30 minutos y luego a 360. 000 g por 60 minutos. En ningún caso se obtuvo actividad en los precipitados respectivos.

1) Solubilización de receptores testiculares con Triton X-100

Determinaciones de recuperación, realizadas utilizando particulas que fueron premarcadas con I^{125}-hCG antes de la extracción con detergentes, indicaron que mas del 90 % de los sitios premarcados fueron extraidos con solucions conteniendo 1 % de Triton X-100 y el 80 % es con concentraciones de 0, 1 % del detergente.

Sin embargo, la recuperación de sitios receptores no ocupados du-

rante la extracción con Triton, medida mediante estudios cuantitativos de union de I^{125}-hCG a fracciones particuladas y solubles, señalaron una perdida singificativa de dicha actividad ligadora, después de la extración con el detergente. En general, entre el 30-50 % de la capacidad receptora original fue recuperada despues de la extracción con Triton X-100, siendo las capacidades de unión de las fracciones particuladas (Particulas intersticiales sedimentables a 27.000 g) y solubles de $0,4 \times 10^{-12}$ mol/mg de proteina y $0,13 \times 10^{-12}$ mol/mg de proteina, respectivamente.

2) Estabilidad de los receptores solubilizados

Ademas de las diferencias observadas en las recuperaciones de los sitios de ligadura de acuerdo con la naturaleza ocupada o libre de los receptores gonadotróficos, los receptores solubilizados por Triton X-100 fueron significativamente menos estables que las fracciones particuladas, durante el almacenamiento y la exposición a temperaturas elevadas. Es asi que, la actividad ligadora de los receptores solubilizados se redujo en un 50 % si se mantiene 24 horas a 4°C.

Por otro lado en incubaciones por 20 minutos a 34°C, se observó una perdida semejante. La adicion de inhibidor de la tripsina (2mg/ml) o

Trasylol durante la incubación a 34° no favorecieron la retención de la actividad de la unión hormonal.

La adición de ditiotreitol (1 mM) durante preincubaciones del receptor soluble a 34° C durante 20 minutos, impide significativamente la unión posterior de I^{125}-hCG obteniendose valores alrededor del 50 % de los controles. Si la adición de ditiotreitol se realiza en tubos incubados a 4°C. por 16 horas, el efecto es el mismo pero menos notorio (-20 %). Efectos similares se observaron incubando el receptor soluble con mercaptoetanol 7 mM. Esto sugeriría que la integridad de las uniones disulfuro es un factor importante en la interacción hormona-receptor (Tabla 4).

No se ha podido determinar si la pérdida de la capacidad de unión durante la incubación a 34°C en soluciones conteniendo 0, 1 % Triton fue el resultado de un efecto directo del detergente o de degradación enzimática. De cualquier manera, la relativa labilidad del receptor soluble no cargado se encuentra en marcado contraste con la mayor estabilidad presentada por el complejo hormona-receptor en las formas solubles o por la fracción particulada original.

TABLA 4 : Efecto de la preincubación del receptor soluble a 34° C durante 20 minutos en la posterior capacidad de unión a I^{125}-hCG. Los ensayos de unión fueron realizados con 37.000 cpm de I^{125}-hCG durante 16 horas a 4°C (n=5).

Condiciones	I^{125}-hCG unido a receptores solubles(cpm, M ± ESM) Controles	Preincubacion a 34°C
Sin adiciones	5151 ± 150	2300 ± 100
Inhibidor de Tripsina(2mg/ml)	5100 ± 220	2275 ± 80
Trasylol (100 K I V)	5417 ± 100	2657 ± 175
Ditiotreitol (0, 1 mM)	4239 ± 189	1126 ± 182
Mercaptoetanol (7, 0 mM)	4584 ± 90	1350 ± 210

3) Estudios de unión de la hCG a receptores "solubles".

La captación específica de I^{125} - hCG por los sitios receptores "solubilizadas" es proporcional a la concentración de la forma soluble(Figura 6).

Por otro lado la saturación de los sitios receptores por cantidades crecientes de hCG permitió demostrar una capacidad aproximada de 10^{-12} mol/mg de proteina soluble. La unión de I^{125}-hCG por receptores testiculares solubilizados presenta un pH optimo de 7,4 (Figura 7). y no es afectada por variaciones en el contenido en calcio del medio de incubación.

Aumentos progresivos de las concentraciones de LH y hCG inhibieron la union de I^{125}-hCG a los sitios receptores. Esta union no fue afectada por la presencia de otras hormonas peptidicas incluyendo hormona foliculo estimulante, prolactina, hormona del crecimiento, tirotrofina y corticotrofina.

Cinética de la asociación y disociación

La velocidad de unión de la gonadotrofina por los receptores solubilizados resulto ser temperatura-dependiente, con mayor velocidad ini-

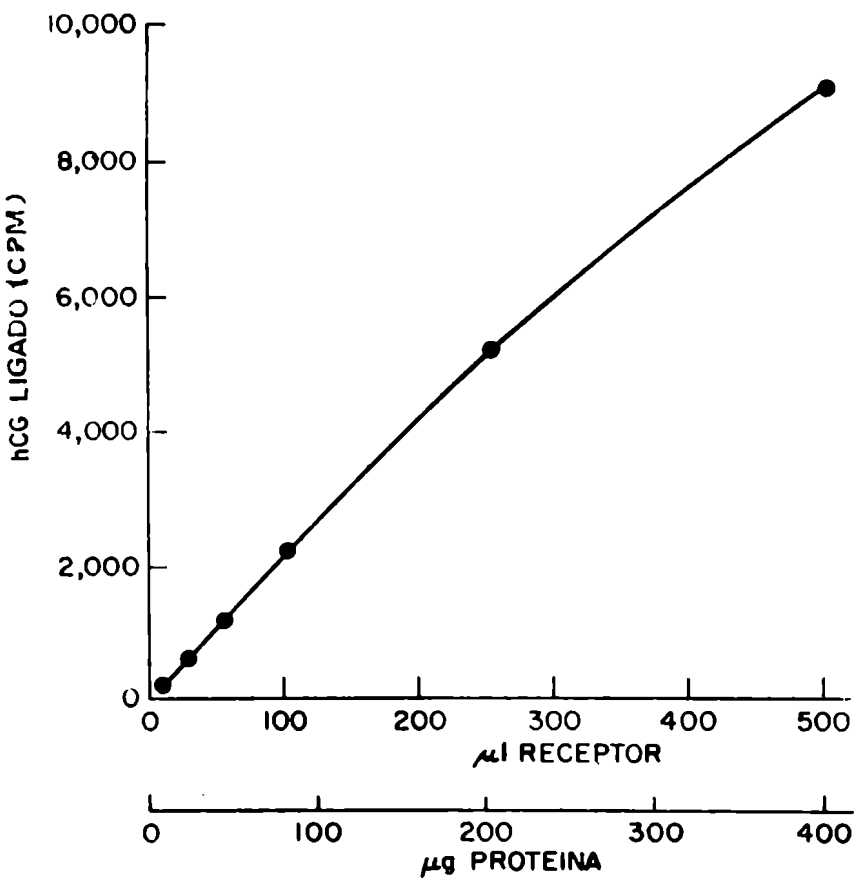

FIGURA 6 : Unión de I^{125}-hCG (32.000 cpm, 10^{-10}M) a concentraciones crecientes de receptor soluble. 31 % de la hormona utilizada se ligo a 500 ul (400 ug de proteina) de la fracción receptora.

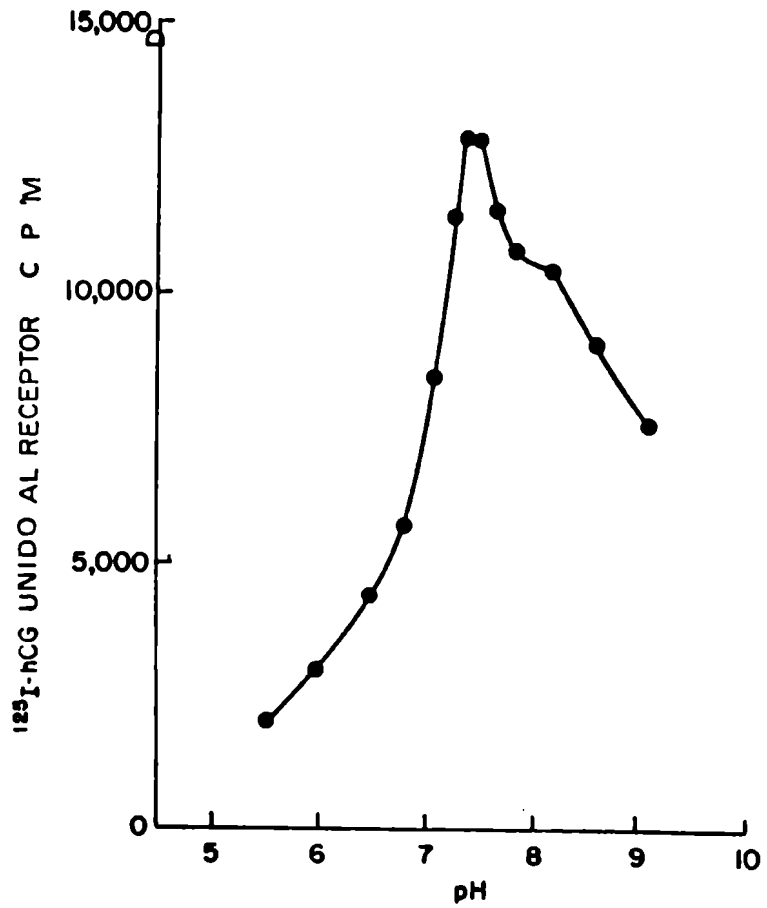

FIGURA 7 : Efecto del pH en la unión de hCG al receptor soluble. Alicuotas de 0, 3 ml (240 ug proteina) de la fracción receptora solubilizada con soluciones al 0, 1 % de Triton X-100 fueron agregadas a 0, 4 ml de soluciones "buffer" acetato dando valores de pH entre 5, 6 y 9, 4 (pH 5, 6 a 6, 6- "buffer" acetato 0, 1 M, pH 6, 9 a 7, 4-"buffer" fosfato 0, 1 M; pH 7, 6 a 9, 4 "buffer" Tris-ClH 0, 1 M). Las incubaciones se realizaron durante 16 horas a 4° C.

cial de asociación a 34°C que a 24°C y 4°C. Debido a la degradacion mas rápida de los receptores con el incremento de temperatura, a 4°C o a 24° se observo mayor captación total que en las incubaciones a 34°. A 24°C la captacion de I^{125}-hCG aumento hasta llegar a un máximo alrededor de las 6 horas, a 4°C, niveles comparables de unión fueron observados despues de 24 horas (Figura 8).

La constante de velocidad de asociación de segundo orden para la union de la hormona al receptor soluble fue de $6,1 \times 10^{5}$ M^{-1} min a 4° C.

La disociación del complejo hormona-receptor formado equilibrando la forma soluble con I^{125}-hCG a 4° C durante 24 horas fue determinada a 4° C a varios intervalos despues del agregado de 20 ug de hCG fría. Los resultados indicaron que la disociación es extremadamente lenta siguiendo una cinética de primer orden. El valor obtenido para la constante de velocidad fue de $1,2 \times 10^{-4}$ min^{-1} .

La constante de equilibrio calculada por el cociente entre las constantes de asociación y disociación correspondientes a 4°C fue $0,5 \times 10^{10} M^{-1}$

Unión al equilibrio

La rapida degradacion de los receptores solubles a 34° C puede in-

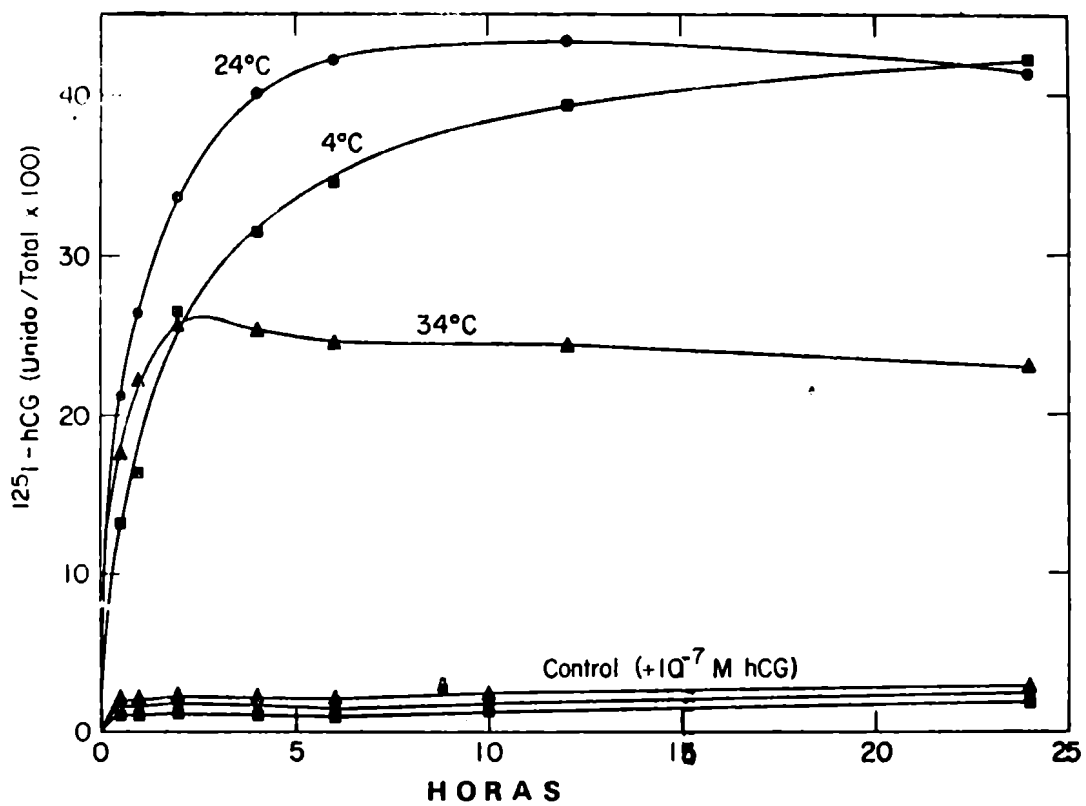

FIGURA 8 : Asociación de I^{125}-hCG con el receptor soluble en función del tiempo de incubación a 4° C, 24° C y 34° C. Los valores no específicos se obtuvieron mediante adición de 100 UI (10^{-6} M) de hCG.

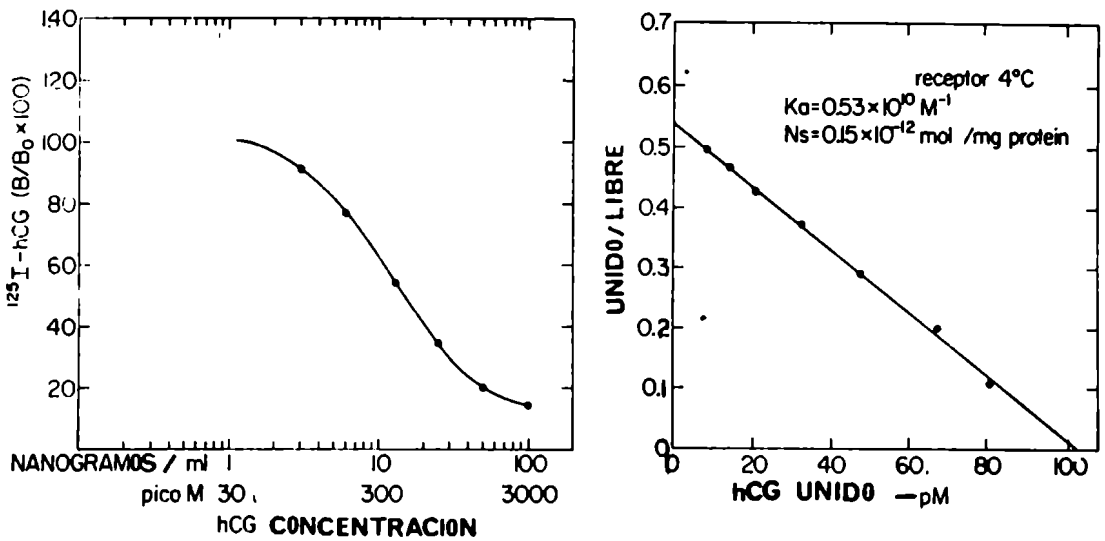

FIGURA 9 : Izquierda. Curvas de desplazamiento de la unión de I^{125}-hCG a receptor soluble en presencia de cantidades crecientes de hormona fría. Derecha. Diagrama de Scatchard derivado de los estudios de desplazamiento indicando la presencia de un orden simple de sitios de ligadura con un Ka de $0,5 \times 10^{10} M^{-1}$.
B : I^{125}-hCG unido al receptor.
Bo : I^{125}-HCG unido, sin agregado de hormona no radiactiva.

validar las determinaciones de las constantes de equilibrio a altas temperaturas. A 4° C y 24° C, los estudios de la union de ^{125}I-hCG al equilibrio se realizaron en incubaciones con concentraciones crecientes de hCG y las constantes de asociacion fueron determinadas por diagramas de Scatchard (93), (Figura 9). Los valores determinados de esta forma para la constante de asociacion (Ka) del receptor soluble fueron de 0,5-1 x 10^{10} M^{-1}.

4) Filtración por gel y centrifugación en gradientes

Los perfiles de elución obtenidos de las cromatografias del complejo I^{125}-hCG receptor en Sephadex G-200 equilibrados con "buffer" Tris-ClH 50 mM pH 7,4 conteniendo 0,1 % de Triton X-100, mostraron un pico prominente de radiactividad coincidente con el volumen de exclusion del Blue Dextran y un pico mas retardado correspondiente a la hormona libre con un Kav 0,33 (Figura 10).

El diagrama de elucion obtenido por filtracion a traves de Sepharosa 6 B tambien exhibe un componente radiactivo mayor que coincide con el pico frontal de Blue Dextran (Figura 11).

La filtración en Sephadex G-200, en ausencia de Blue Dextran mos-

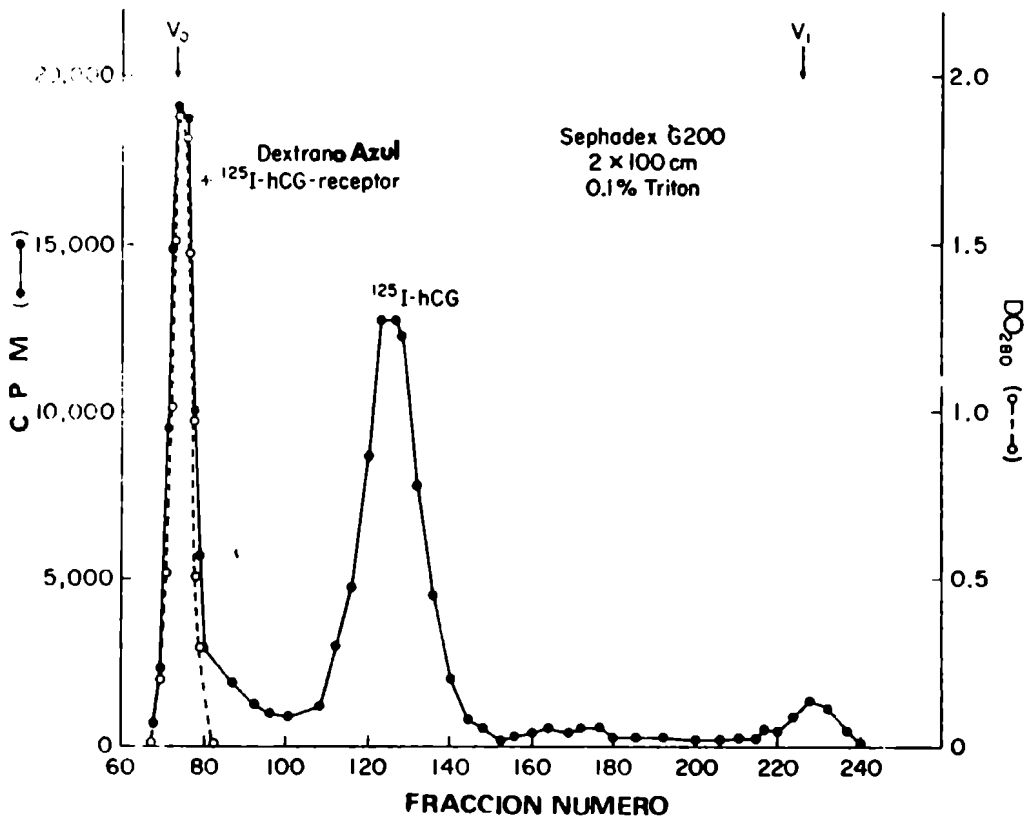

FIGURA 10 : Filtración por Sephadex G-200 del complejo I^{125}-hCG receptor. Un pico mayor de radiactividad aparece conjuntamente con el volumende exclusión indicado por el Blue Dextran, seguido por la hormona fría eluida con un Kav : 0, 33.

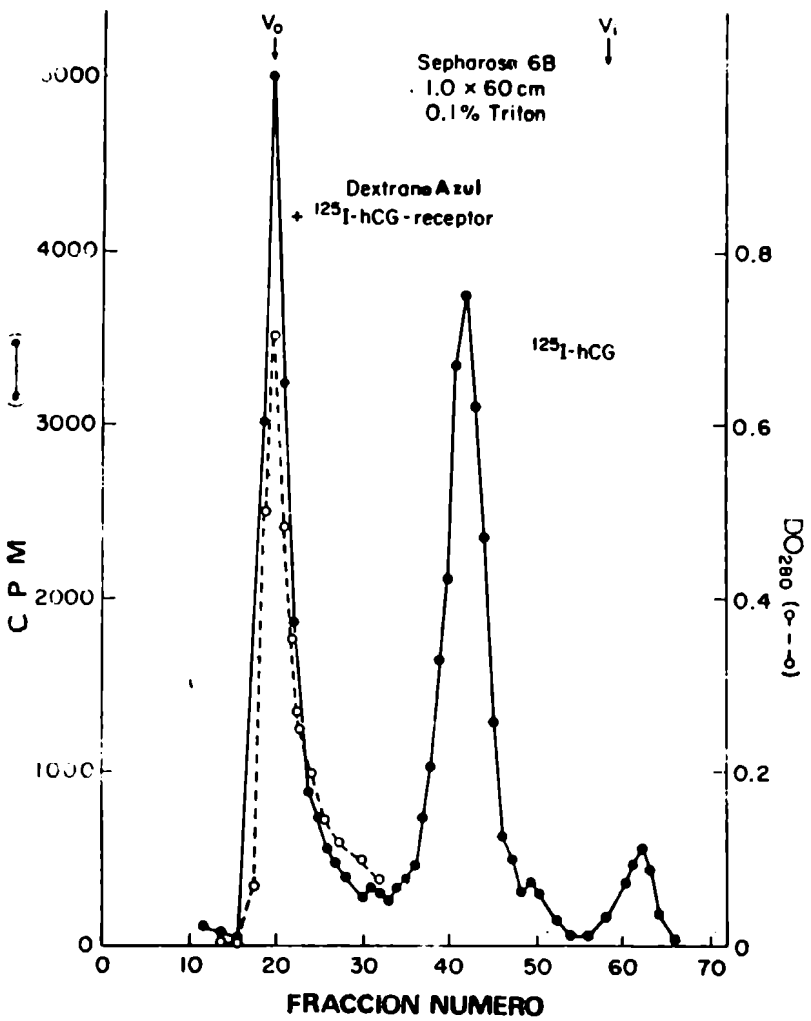

FIGURA 11 : Filtración por Sepharosa 6 B del complejo I ^{125}-hCG receptor. Un pico considerable de radiactividad fue tambien observado ligado al Blue Dextran seguido por el pico correspondiente a la hormona libre con un Kav : 0,56.

tro un pico algo mas retardado siguiendo al volumen de exclusion que pudo ser completamente eliminado realizando la incubación en presencia de un exceso de hCG no radiactiva (Figura 12).

Aún que fraccionamientos con sales no pueden ser frecuentemente aplicados a extractos que contienen detergentes no iónicos debido a la separación del detergente de la solución que lo contiene, de la combinación del fraccionameinto con sulfato de amonio, y la filtracion Sephadex G-200 del precipitado obtenido resulto una purificacion de 23 veces del complejo hCG - receptor.

La Figura 13 presenta los limites de saturación en sulfato de amonio necesarios para precipitar la mayoría del receptor soluble.

Dichos valores fueron obtenidos precipitando alicuotas de 0,5 ml del complejo I^{125}-hCG - receptor(500 ugr proteina; 9.200 cpm) con una solución saturada neutra de sulfato de amonio, seguido por disolución del precipitado y reprecipitación con PEG.

Saturaciones con sulfato de amonio entre el 25 y el 50 % producen la separación del conglomerado proteico que contiene la mayoria del complejo hormona receptor y que flota cuando es centrifugado a 105.000 g durante 1 hora, como consecuencia de la separcción simultanea del Triton X- 100 del medio.

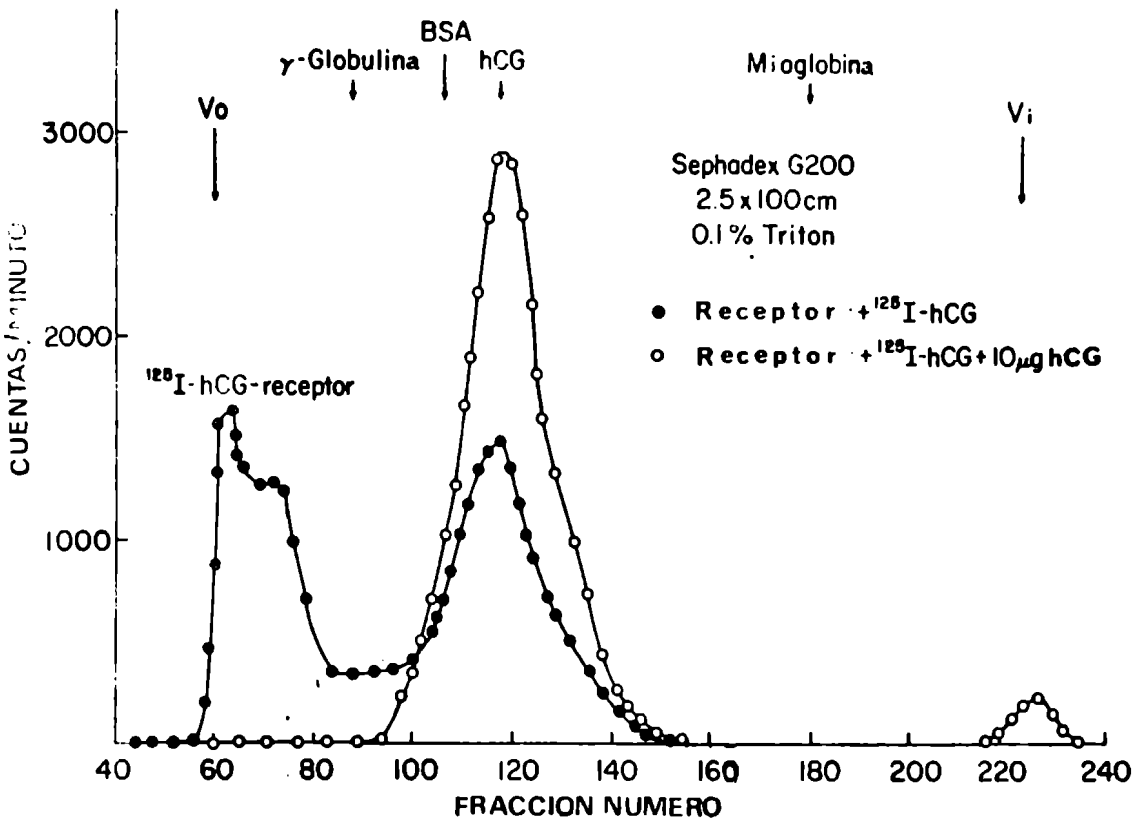

FIGURA 12 : Perfil de elución del complejo I^{125} -hCG receptor durante filtración en Sephadex G-200 en ausencia de Blue Dextran. El complejo hormona-receptor aparece inmediatamente despues del volumen de exclusión (● - ●).
Cuando las fracciones correspondientes a este pico fueron precipitadas con polietilenglicol se observo actividad específica constante en las fracciones 74-83. El pico de radiactividad asociado al complejo hormona receptor desaparece por incubaciones previas con exceso de hCG (o-o).

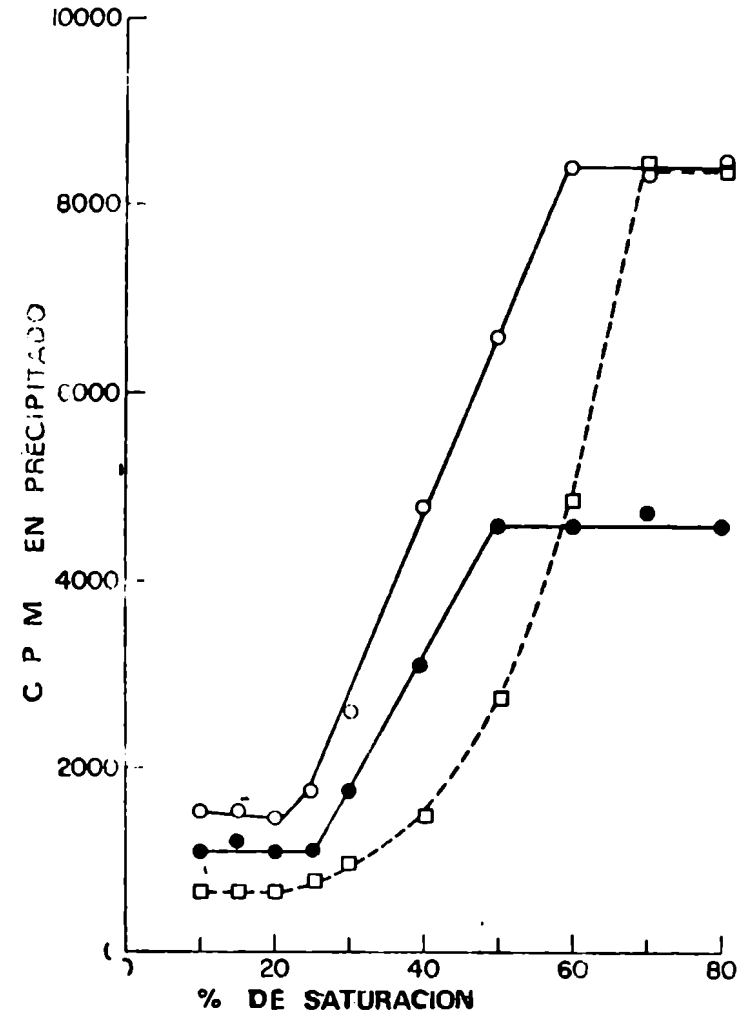

FIGURA 13 : Precipitación con sulfato de amonio del complejo receptor-hormona solubilizado con Triton X-100. Aliquotas de 0,5 ml (500 ug) del receptor soluble fueron incubadas con I^{125}-hCG (9200 cpm) durante 16 horas a 4° C.
Las muestras fueron precipitadas con cantidades crecientes de solución saturada neutra de sulfato de amonio en la región 10 - 80 % de saturación (o - o).
La unión específica de cada fracción fue determinada mediante solubilización de los precipitados en PBS y precipitación con polietilenglicol (●--●)
Se realizaron precipitaciones controles en tubos conteniendo 10 ug de hCG y 9200 cpm de I^{125}-hCG (□ -- □).

Sin embargo, el complejo hormona-receptor puede ser separado del medio por aspiración cuidadosa de la solución remanente.

Con las mismas concentraciones de sulfato de amonio, puede concentrarse el complejo receptor-hormona extraido de particulas testiculares premarcadas.

Estos concentrados mantienen su comportamiento en centrifugaciones en gradientes, siempre y cuando los precipitados fueren disueltos en soluciones que contengan 0,1 % del agente dispersante.

Cuando un extracto conteniendo 34,02 mg de proteinas y 283.000 cpm de hormona ligada (actividad especifica del complejo 8,3 cpm/ug) fue concentrado por precipitación con sulfato de amonio en el forma indicada y pasado por Sephadex G-200, la radiactividad ligada al complejo hormona-receptor se eluyo en las 10 fracciones cercanas al volumen de exclusión. Dichas fracciones mantuvieron a lo largo del pico una actividad especifica relativamente constante 192 ± 18 cpm/ug.

La Tabla 5 nos muestra los valores obtenidos en la purificación del complejo.

Utilizando Sepharosa 6 B, en ausencia de Blue Dextran, se observo un pequeño pico frontal de material agregado, seguido por dos picos adyacentes de hCG correspondientes a la hormona ligada al receptor y la for-

ma libre (Figura 14).

TABLA 5 : Purificación del complejo receptor-hCG obtenido mediante solubilización de partículas testiculares con Triton X-100 y posterior equilibrio con I^{125}-hCG.

	cpm Totales	Proteinas Totales mg	cpm/mg	Rendimiento
Extracto de Triton X- 100	283.000	34,02	8.300	-
Sulfato de Amonio 25-50 %	174.500	6,98	25.000	61
Sephadex G-200	162.000	1,18	192.000	57

El complejo hormona-receptor aparece como un hombro que precede al pico correspondiente a hCG libre(parte superior de la Figura 14) y es claramente separado despues de concentrar dicha fraccion y recromatografiarla (parte inferior de la Figura 14). El complejo hCG-receptor presenta un Kav 0,32, mientras que el de la hormona libre es Kav : 0,56.

Por comparación de los valores Kav del complejo hormona-receptor y aquellos de las proteinas de referencia, fue posible estimar el radio hidrodinámico del complejo hormona-receptor y aquellos de las proteinas de refe-

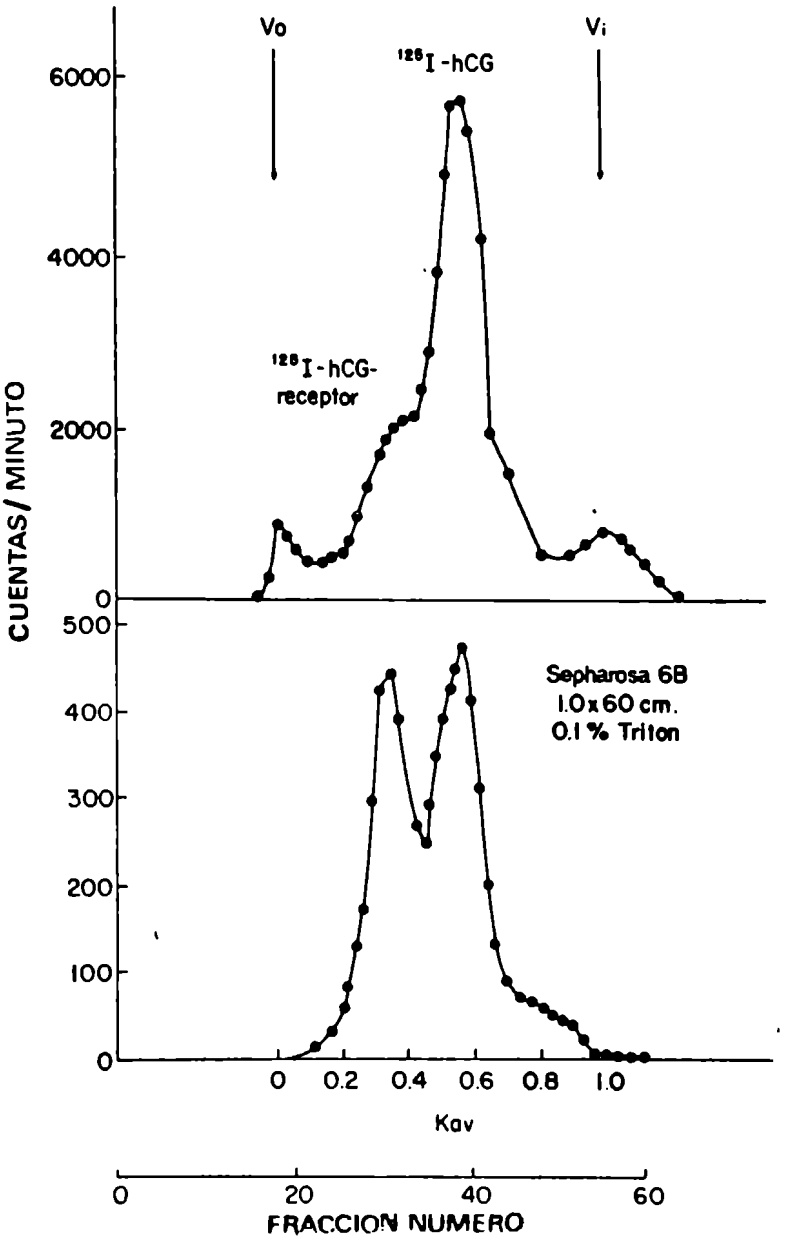

FIGURA 14 : Perfil de elución del complejo hormona-receptor en Sepharosa 6 B en ausencia de Blue Dextran.
El complejo se evidencia como un hombro que precede al pico de hormona libre (Parte superior).
Las fracciones correspondientes al pico hCG-receptor fueron concentradas 5 veces con Sephadex G 25 en polvo y refiltradas en Sephadex 6 B observandose una clara separación del complejo hormona-receptor de la hCG libre (Parte inferior).

rencia, fue posible estimar el radio hidrodinámico del complejo hormona-receptor mediante el metodo de Laurent y Killander (94). Dicho radio ha sido estimado en 64 Å (Figura 15).

Otra alicuota del pico correspondiente al complejo receptor-hormona en la filtracion por Sepharosa 6 B fue depositada en un gradiente de sacarosa 5-20 % en PBS conteniendo 0,1 % Triton X-100 y centrifugada durante 16 horas a 190.000 g en un rotor Beckmann SW 40. El perfil de sedimentación obtenido es presentado en la Figura 16. El coeficiente de sedimentación, promedio de 10 experimentos, calculados por comparación con proteinas de referencia fue de 7,5 $\pm$ 0,35 (Figura 17).

El receptor testicular de hCG libre (sin estar unido a la hormona fue tambien cromatografiado en Sepharosa 6 B en "buffer" Tris-HCl 50 mM pH 7,4 conteniendo 0,1 % de Triton X-100 y 0,01 % BSA. Despues de la elución, alicuotas de 0,5 ml correspondientes a cada fraccion fueron incubadas con 30.000 cpm de I^{125}-hCG en presencia y ausencia de un exceso de hCG no radiactivo para determinar la union especifica. Despues de 16 horas a 4° C la radiactividad especificamente unida fue determinada mediante precipitación con PEG.

Mediante este procedimiento, se evidenció un pico neto de actividad ligadora correspondiente a un Kav : 0,31 (Figura 18).

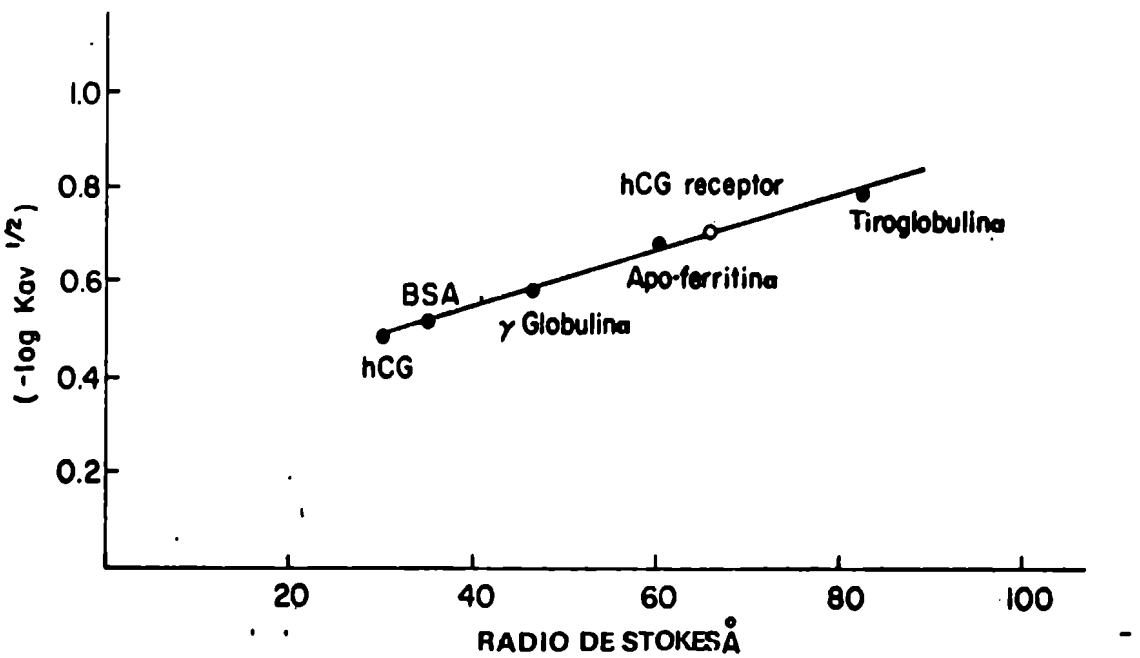

FIGURA 15 : Determinación del radio de Stokes del complejo gonadotrofina mediante datos obtenidos por filtración en Sepharosa 6 B equilibrada en "buffer" Tris ClH 50 mM pH 7,4 conteniendo 0,1 % de Triton X-100 y 0,1% de albúmina sérica bovina. La columna fue calibrada, las proteinas de referencia marcadas.
Los radios de Stodkes de las proteinas de referencia fueron linealmente relacionados a la función a:(- log Kav)1/2 (94).

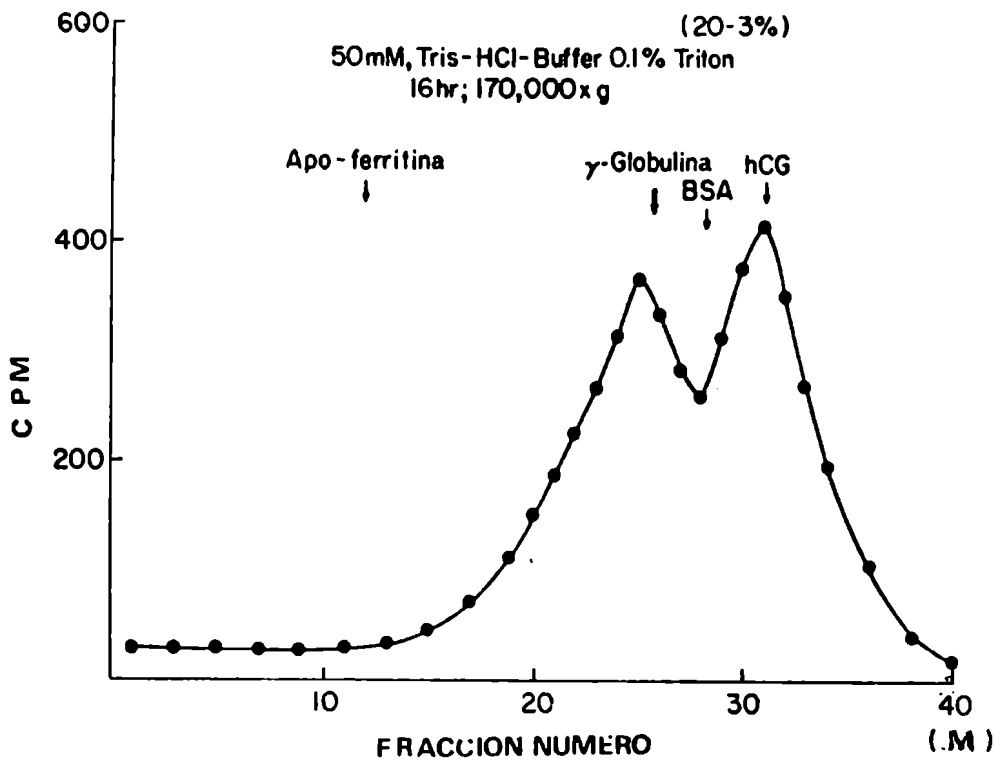

FIGURA 16 : Gradientes de centrifugación en sacarosa 5-20 % conteniendo 0,1 % de Triton X-100 en "buffer" Tris ClH 50 mM pH 7,4 del complejo hormona receptor obtenido mediante combinación de I^{125}-hCG con extractos de particulas testiculares y previamente fraccionado en Sepharosa 6 B La zona correspondiente al complejo hormona-receptor fue precipitable en un 98 % por polietilenglicol.

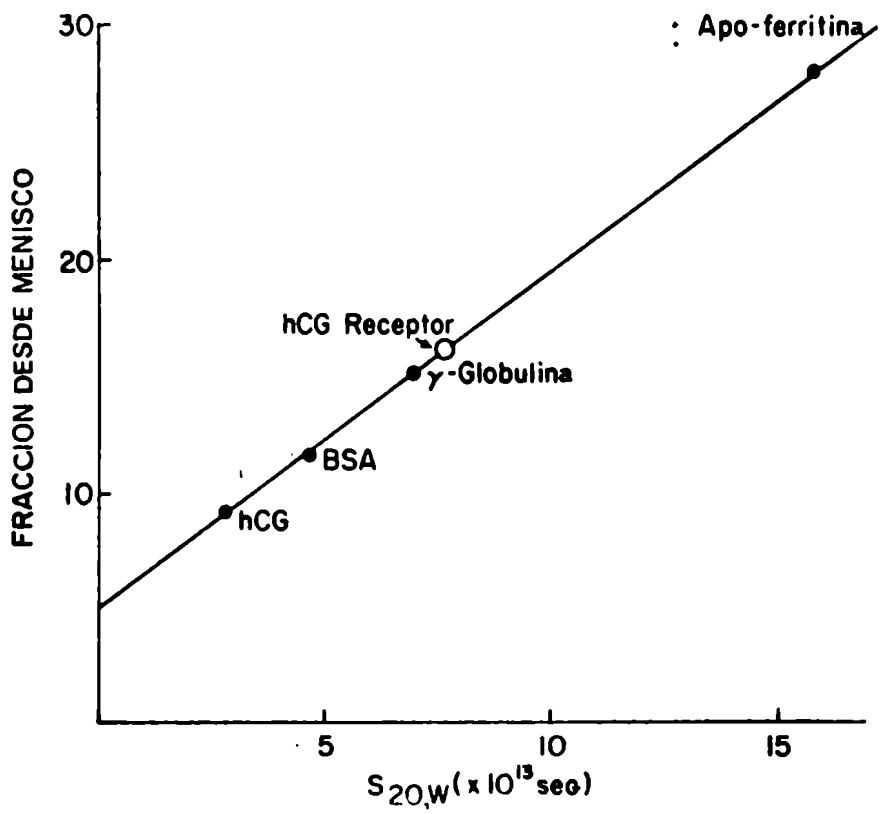

FIGURA 17 : Coeficientes de sedimentación del complejo-receptor hormona obtenido por combinación de I ^{125}-hCG con extractos de partículas testiculares y de las proteinas de referencia.
Cada punto representa el promedio de 10 experimentos.

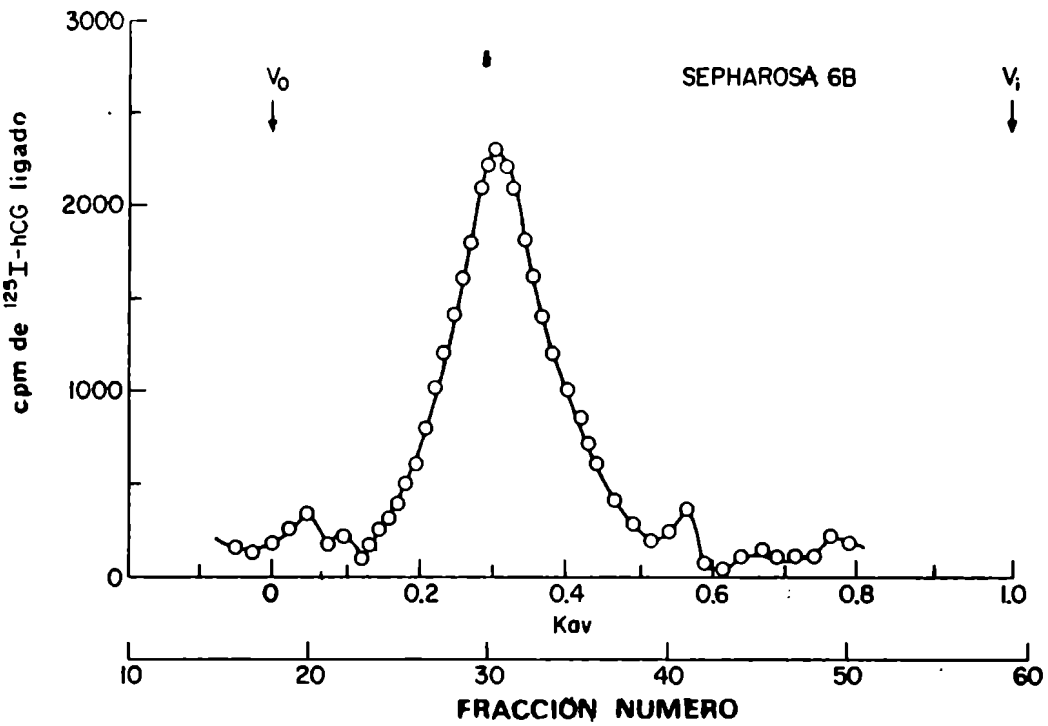

FIGURA 18 : Perfil de filtración en Sepharosa 6 B, del receptor libre. Alicuotas de 0,7 ml de cada fracción eluida, fueron incubadas con I^{125}-hCG (15.000 cpm) en presencia o ausencia de concentraciones 10^{-6} M de hormona no marcada durante 16 horas a 4° C. El complejo formado fue detectado mediante precipitación con polietilenglicol. Los valores de unión no específicos determinados en los tubos conteniendo el exceso de hCG fueron substraidos de la radiactividad total precipitable en cada fracción

El analisis del receptor libre por centrifugaciones en gradientes de sacarosa, revelaron un único pico cuyo coeficiente de sedimentación fue de 6,5 S. (Figura 19).

Cálculo de algunos parametros físicos del receptor de hCG

Los valores del radio de Stokes (a) y del coeficiente de sedimentacion (S) del receptor libre y del complejo hormona-receptor fueron empleados para calcular el peso molecular (M) y relacion friccional (f/fo) de los componentes según las ecuaciones I y II (95, 96).

$$M = \frac{6 \pi \eta \quad Na \quad S}{1 - \bar{v} \rho} \qquad (I)$$

$$f/fo = a \Big/ \left[\frac{3 M(\bar{v} + \delta/\rho)}{4 \pi \quad N} \right]^{1/3} \qquad (II)$$

donde η es la viscosidad del solvente, N es el numero de Avogadro, $\bar{V}$ el volumen parcial específico, ρ la densidad del solvente (0.9876 gr/cm^3) y δ el factor de solvatacion. Para el complejo hCG-receptor obtenido por equilibrio entre un extracto de partículas testiculares con Triton X-100 y I^{125}-hCG, el volumen parcial específico derivado de la densidad de

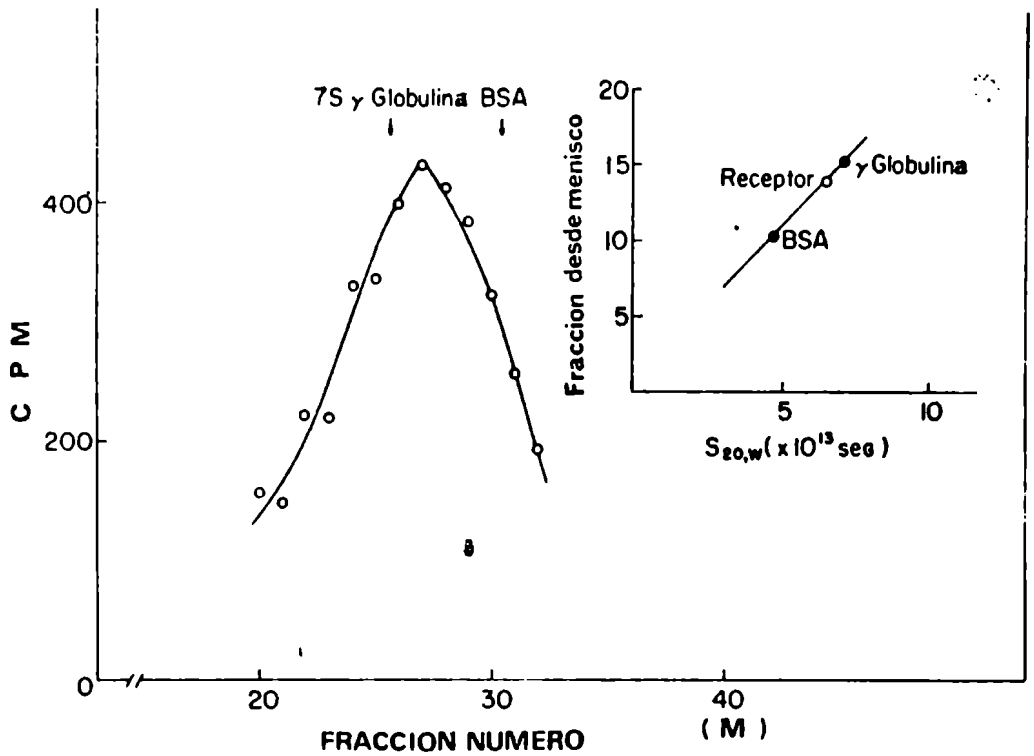

FIGURA 19 : Gradientes de centrifugación del receptor libre.
Las alicuotas de la fracción receptora de células intersticiales fueron centrifugadas en gradientes de sacarosa (5-20 %) en "buffer" Tris ClH 50 mM pH 7, 4 conteniendo 0, 1 % de Triton X-100 durante 16 horas a 170. 000 g en un rotor Beckmann SW 40.
100 ul de cada fracción fueron incubados con 5000 cpm de I^{125}-hCG en presencia o ausencia de concentraciones 10^{-6} M de hormona fría, durante 16 horas a 4° C.
La radiactividad especificamente ligada fue precipitada con polietilenglicol.

la molecula en gradientes de cloruro de cesio fue calculado como 0,776 cm^3/g.

La viscosidad realtiva (ηr) del solvente conteniendo 0,1 % de Triton X-100 determinada en un viscosimetro de Oswald fue 0,950 y el coeficiente de viscosidad (η) calculado por la formula $\eta = \eta r \cdot \eta o$ fue 0,0094 poise. Este valor, que no tiene en cuenta el posible efecto de resbalamiento, es casi idéntico al determinado por Kushner y Hubbard (97) para soluciones diluidas de Triton X-100. El peso molecular del receptor libre calculado segun la ecuación (I) fue 194.300 y el del complejo hCG-receptor 224.200.

La diferencia entre estos valores (30.100) se encuentra en razonable concordancia con el peso molecular de 37.000 para hCG, determinado por análisis estructural (98) y con el peso molecular de 39.000 calculado segun la ecuación I y los valores del coeficiente de sedimentación (2,90) y radio de Stokes (31 Å) determinados a partir de hCG radioyodada.

Los valores f/fo del receptor libre u ocupado por la hormona, calculados de acuerdo con la ecuación (II) ignorando el factor de solvatación fueron 1,65 y 1,56, correspondiendo a radios axiales de 12,0 y 10,2 respectivamente.

Los resultados de estos cálculos se encuentran resumidos en la

Tabla 6.

TABLA 6 : Algunos parametros físicos, obtenidos de la filtración en Sepharosa 6 B y centrifugacioneen gradientes de sacarosa del receptor de hCG extraidos de partículas testiculares con Triton X-100 y equilibrado con I^{125} hCG.

Parametro	Complejo hormona-receptor	Receptor libre	I -hCG
Coeficiente de partición (Kav) [a]	0,32 (5)	0,32 (3)	0,56 (10)
Radio de Stokes (Å)	64	64	31
Coeficiente de sedimentación (S 20 'W) [a]	7,5	6,5	2.9 (15)
Peso molecular calculado mediante la ecuación (I)	224,200	194,300	39.000
f/fo	1,56	1,65	1,36
Relacion axial (prolato) [c]	10,2	12	7,0

a) El número de determinaciones se indica en paréntesis.

b) Los valores de densidad de la hormona libre y del complejo hCG-receptor determinados por centrifugación en gradientes de cloruro de cesio fueron1,300 y 1,289 g/cm^3. De estos valores los volumenes específicos hidratados fueron 0,768 y 0,776 para hCG y el complejo respectivamente, esta última estimación fue tambien empleada en el cálculo del peso molecular del receptor libre.

c) Las relaciones axiales fueron obtenidas por interpolación de los valores, f/fo en la serie para prolato elipsoides descripta por Schachman (99).

Efecto del tratamiento con enzimas y agentes reductores sobre la actividad de ligadura del receptor libre

Las propiedades ligadoras de particulas de células intersticiales y receptores "solubilizados" fueron examinadas despues del tratamiento con tripsina, neuraminidasa, fosfolipasa A, foafolipasa C y varios agentes reductores.

La captacion de I^{125}-hCG por las particulas receptoras fue ligeramente aumentada por el tratamiento con neuraminidasa, pero se redujo considerablemente por acción de la tripsina y fosfolipasa A. El tratamiento con fosfolipasa C no altera la actividad ligadora de las particulas testiculares (Tabla 7).

El tratamiento del receptor "soluble" con tripsina causa una perdida sustancial de su actividad ligadora, Lo mismo ocurre cuando esta fracción es sometida al tratamiento con fosfolipasa A. Por el contrario la neuraminidasa determina un aumento en la union de la gonadotrofina al receptor soluble, al igual que la fosfolipasa C.

Los perfiles de sedimentacion de los receptores solubles tratados con tripsina, neuraminidasa y fosfolipasa se muestran en las figuras 20 y 21.

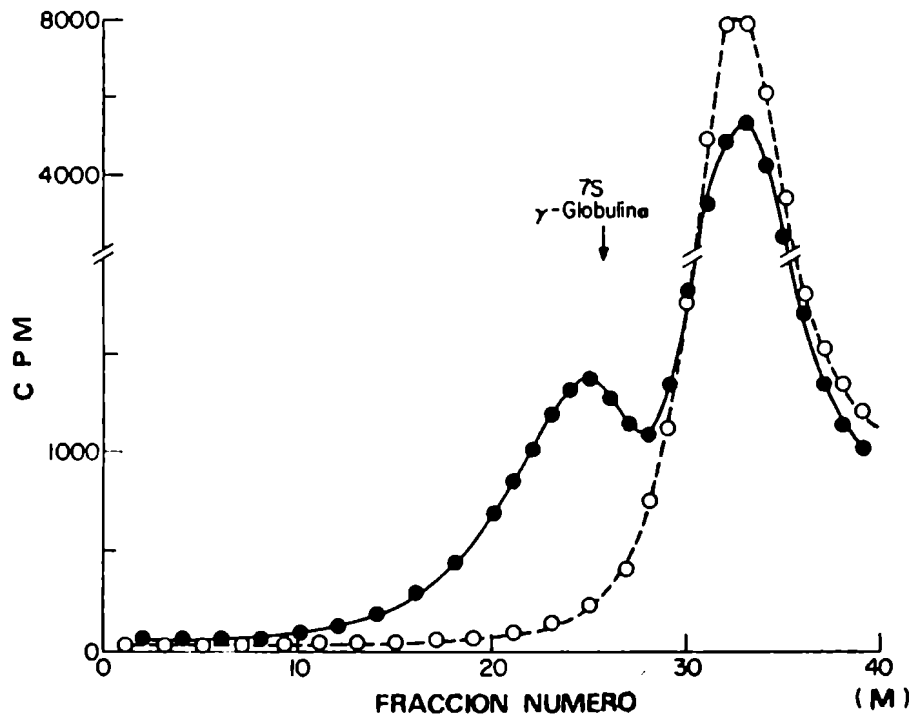

FIGURA 20 : Efecto de la tripsina en la actividad ligadora del receptor soluble. Alicuotas de la fracción receptora (400 ug de proteina)fueron incubadas con 1 mg de tripsina durante 10 minutos a 25°C. Despues de la adición de 2 mg de inhibidor de tripsina, las muestras se incubaron con 50.000 cpm *(1,5 ng)* de I^{125}-hCG durante 16 horas a 4°C. Los perfiles de centrifugación en gradientes de sacarosa muestran la perdida total de la actividad de unión (o--o) comparada con los controles (•--•).

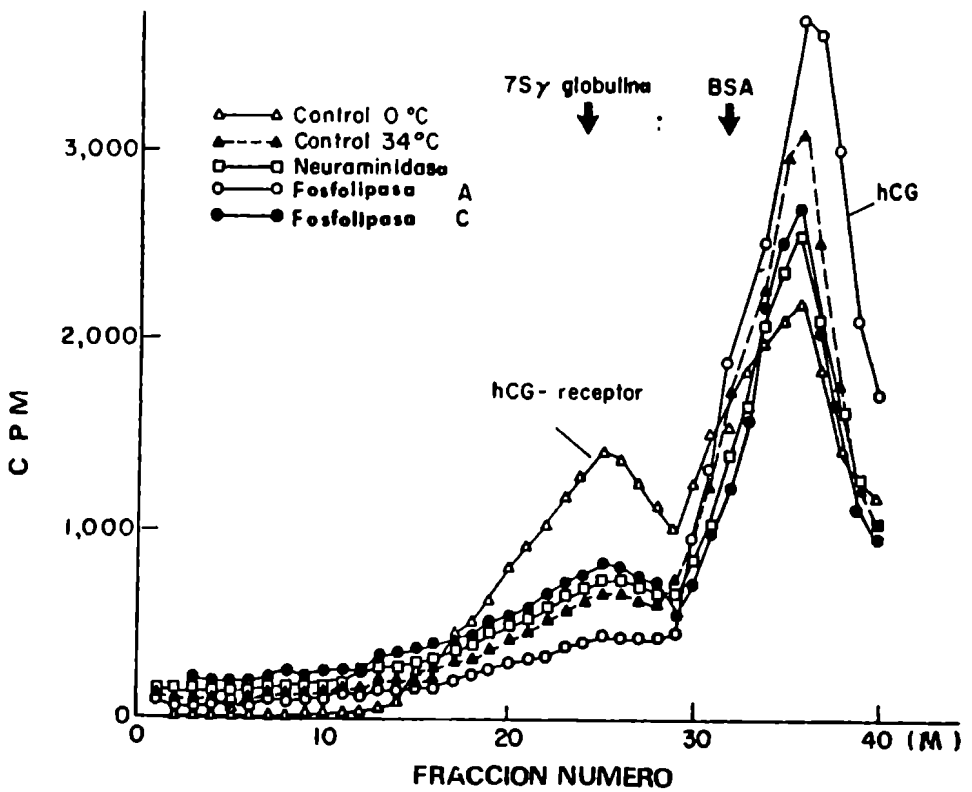

FIGURA 21 : Efectos de la neuraminidasa y fosfolipasa A y C en la actividad dad de union del receptor soluble.
Los prefiles de centrifugación en gradientes de sacarosa indican una marcada disminución en la unión de la hormona como consecuencia de la incubación a 34° C.
La neuraminidasa y fosfolipasa C aumentan levemente la actividad ligadora mientras que la fosfolipasa A produce una marcada inactivación.

TABLA 7 : Union de I^{125}-hCG al receptor de gonadotrofinas preincubado con enzimas durante 20 minutos a 34°C. Los valores presentados se expresan en cpm unidas durante la incubacion con 37.000 cpm (10^{-10} M de I^{125}-hCG). Promedio de cinco determinaciones con su error standard.

Tratamiento	I^{125}-hCG unida	
	Receptor Particulado	Receptor soluble
Control	14.028 ± 315	3496 ± 72 *
Tripsina (1mg/ml)	3.518 ± 194	400 ± 13
Neuraminidasa (0,03 U/ml)	15.900 ± 234	7799 ± 200
Fosfolipasa A(0,5 U/ml)	3.087 ± 210	2840 ± 89
Fosfolipasa C (1 U/ml)	13.900 ± 280	7040 ± 120

* Los valores controles de union de I^{125}-hCG al receptor soluble durante incubaciones a 4 C por 20 minutos fueron 7799 ± 180 cpm.

La abolición total de la actividad ligadora del receptor por el tratamiento con tripsina es claramente aparente en la figura 20. En la figura 21 puede apreciarse, presencia de material agregado en la parte baja del gradiente (izquierda) despues del tratamiento con neuraminidasa o fosfolipasa C, como asi tambien el incremento en la magnitud del pico correspondiente al complejo receptor-hCG 7,5 S en comparación con los controles.

El aumento en la unión de la hormona por el receptor como consecuencia del tratamiento con neuraminidasa puede ser atribuible a una desialilación de la hCG, desde que asialo-hCG posee mayor afinidad por sitios receptores que la hormona nativa.

La figura 21 tambien muestra la reducción de la capacidad receptora por fosfolipasa A , como asi tambien la degradacion causada por la incubación del receptor a 37 ° C, en contraste con la actividad de unión presentada por la misma solución mantenida a 4 °C.

Diálisis del complejo hCG-receptor 7,5 S

Cuando los extractos de partículas testiculares conteniendo Triton X-100 fueron incubados con I^{125}-hCG, se formaron complejos hormona-receptor que sedimentan en gradientes de sacarosa (5-20 %) con un coeficiente de 7,5 S.

Si estas preparaciones se dializan contra PBS o "buffer" Tris HCl 50 mM pH 7,4 y se filtran por gel en columnas de sepharosa 6 B de 0,9 x 100 cm equilibradas con el mismo buffer, se observan tres picos (Figura 22 circulos negros). El pico correspondiente al volumen de exclusión se debe a agregados similares aunque menos marcados que al observado pre-

vlamente durante la filtración del complejo 7,5 S; el pico siguiente de Kav : 0,27 representa el complejo hormona-receptor y no es observado cuando las muestras se preincuban con un exceso de hCG no radiactiva, el tercer pico corresponde a hCG libre con un Kav : 0,56.

Cuando el receptor libre (6,5 S) se dializa en las condiciones m mencionadas y posteriormente se filtra por Sepharosa 6 B determinando la actividad de union de las fracciones eluidas, se observa que el pico de mayor actividad corresponde a un Kav : 0,31 (Figura 22 circulos abiertos) En dos ocasiones concentrados de alicuotas correspondientes al pico del complejo dializado dieron en refiltraciones valores de Kav de 0,27 y 0,28.

El coeficiente de sedimentación del complejo hormona-receptor dializado, calculado por comparacion con proteinas de referencia fue de 8,8 ± 0,30 (DS).

Tales cambios en las características de sedimentación se producen, ya sea, si los extractos son primeramente dializados y luego incubados con la hormona o viceversa. Siendo mas conveniente realizarlos de la segunda manera porque como ya se mencionó, la unión con la hormona estabiliza al receptor.

En la figura 23, puede observarse el cambio producido en la sedimentacion del complejo I^{125} -hCG-receptor por consecuencia de la diali-

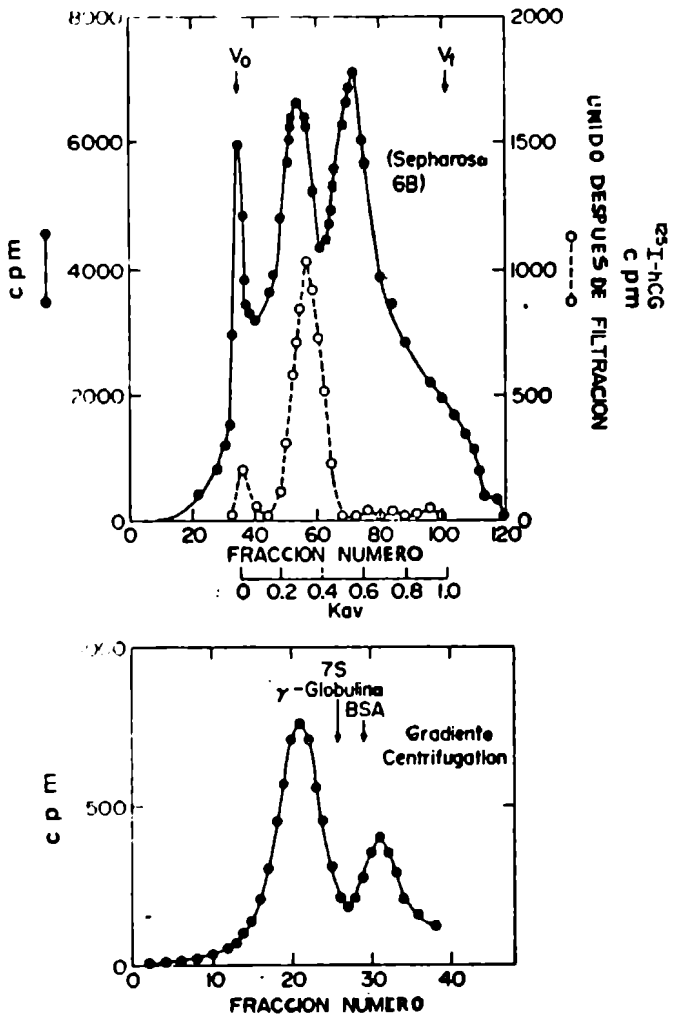

FIGURA 22 : Perfiles de elución en Sepharosa 6 B del receptor libre extraido con Triton X-100 y dializado (o--o) y del complejo receptor hormona dializado (•--•). Despues de eluir el receptor libre, 0,7 ml de cada fracción fueron incubados con 32.000 cpm de I^{125}-hCG en presencia o ausencia de 10^{-7} M hCG durante 16 horas a 4 C y la radiactividad unida fue determinada por precipitación con polietilenglicol. Los valores no específicos determinados en los tubos conteniendo exceso de hormona fueron restados de la radiactividad precipitable total.

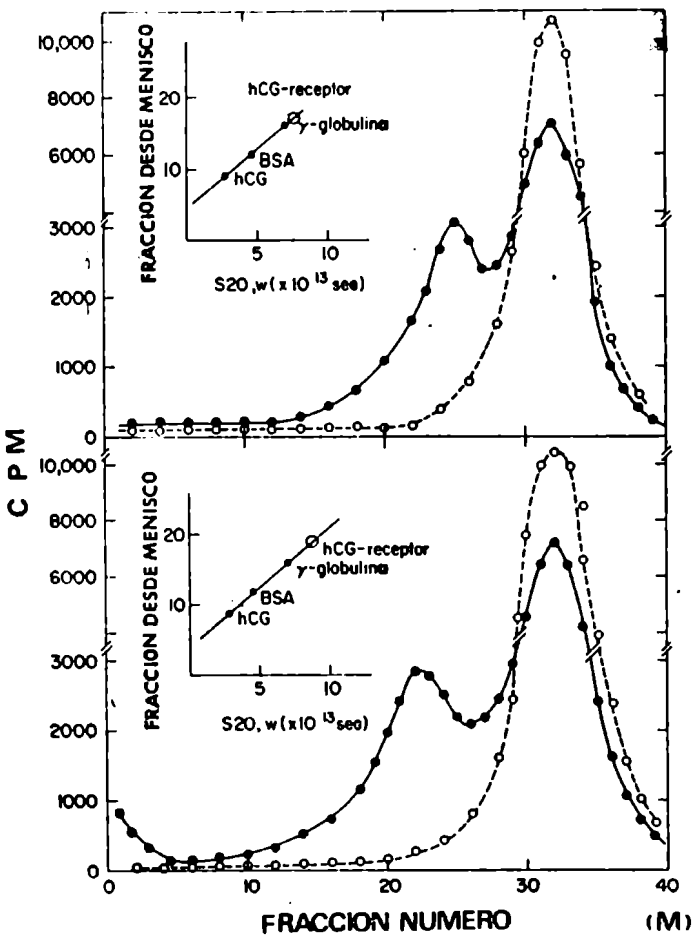

FIG. [illegible] : Perfiles de sedimentación en gradientes de sacarosa (5-20 %) en "buffer" Tris 50 mM pH 7,4 con o sin 0,1 % de Triton X-100 del complejo hormona-receptor obtenido por incubacion de extractos de partículas intersticiales, con I^{125}-hCG (parte superior) o del mismo preparado previa diálisis (24 horas a 4°C) contra "buffer" Tris 50 mM, pH 7,4 (parte inferior). La incubación de los preparados con I^{125} hCG se realiza en ausencia (o—o) o en presencia (●——●) de 10^{-6} M de hormona no marcada. En esta última condición la radiactividad ligada a la fracción receptora desaparece totalmente. Los gradientes se realizaron durante 16 horas a 4 °C en un rotor Beckmann SW 41.

sis . Las partes superior e inferior en la figura corresponden respectivamente al comportamiento de las preparaciones antes y despues de ser dializadas. Los circulos blancos corresponden a incubaciones realizadas en presencia de 20 ug de hCG no radiactiva, que demuestran la existencia de una competicion con la I^{125} -hCG por los sitios de ligadura. . Esta competencia no fue observada cuando ACTH, tirotrofina o prolactina estuvieron presentes en el medio de incubación.

Aunque el termino "soluble" es a menudo utilizado para describir muchos complejos proteicos de membranas, debe enfatizarse que tal "solubilidad", depende de la presencia de agentes dispersantes tales como detergentes, que en condiciones apropiadas, pueden formar micelas estables causando dispersiones de materiales no solubles. Para distinguir entre una solución verdadera y la formación de complejos proteinas-detergentes es necesario eliminar el agente dispersante.

Sin embargo, aun es este caso donde despues de dializar los extractos de Triton X-100, se observa un complejo receptor-hormona "soluble" de constante 8.8 S , no es facil descartar, la presencia de cantidades residuales de detergente fuertemente unido al complejo en cantidad suficiente para mantener solubilizado al receptor.

Por otra parte, este cambio en el esquema de sedimentación podria

indicar la asociación del receptor 7,5 S con algun otro componente presente en el medio y que se produce, solo cuando el detergente es eliminado.

La reversibilidad de la conversión entre las formas 7,5 y 8,8 S del complejo hormona-receptor fue observada mediante el agregado de Triton X-100 (hasta 0,1 %) a preparados previamente dializados.(Figura 24).

Solubilización del complejo hCG-receptor obtenido de particulas premarcadas.

Otro enfoque experimental consistio en marcar previamente con I^{125}-hCG las particulas testiculares y luego solubilizar el complejo formado.

a) Efectos del pH en la solubilización del complejo.

La influencia del pH en la solubilizacion del complejo I^{125}-hCG-receptor de particulas premarcadas se ilustra en la figura 25.

Aliquotas conteniendo 2 mg de partículas, premarcadas como ya se descubrió, fueron suspendidas en 0,5 ml de las soluciones buffer conteniendo 0,1 % de Triton X-100. Al cabo de 30 minutos las mezclas fue.-

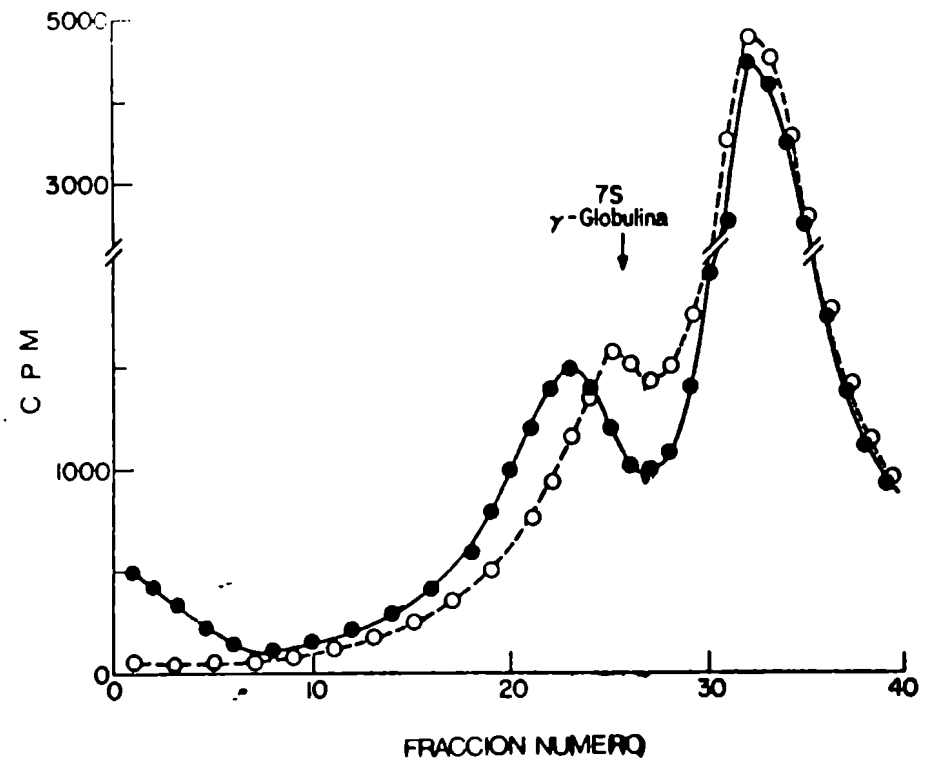

FIGURA 24 : Gradientes de centrifugación del complejo hormona-receptor dializado (8, 8 S) (•—— •) y del mismo preparado después de ser re-equilibrado con Triton al 0, 1 % (o——o). En presencia del detergente la forma 8, 8 S del complejo hormona receptor se convierte a la forma original de sedimentacion 7, 5 S.

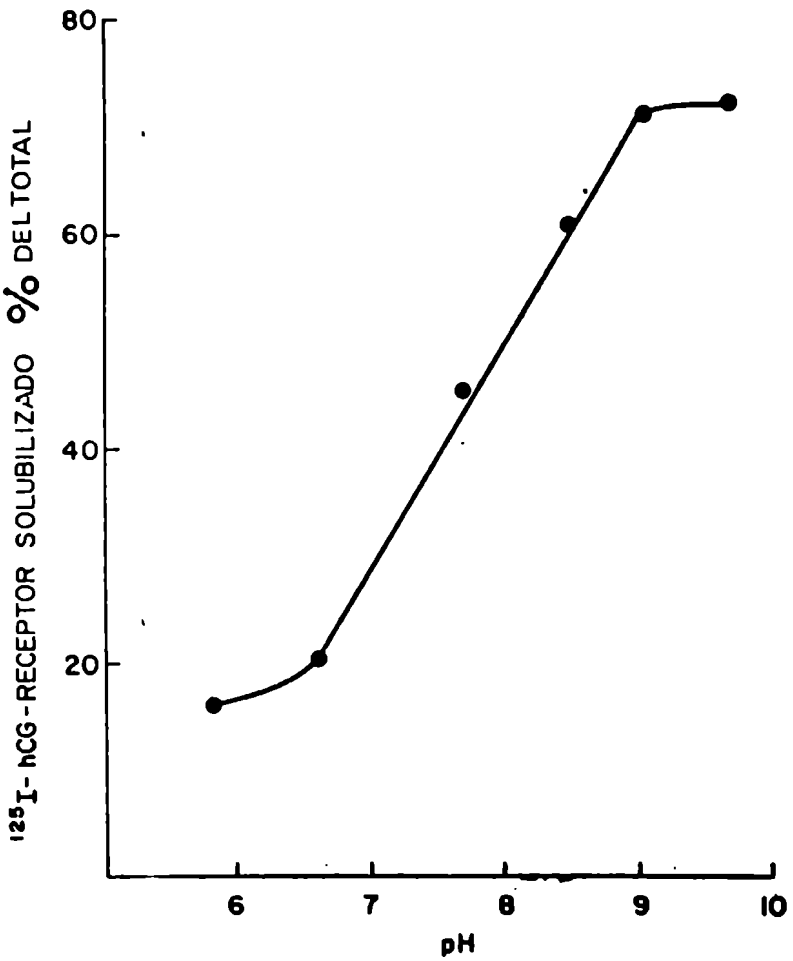

FIGURA 25 : Efecto del pH en la solubilización del receptor particulado de hCG por soluciones conteniendo 0,1 % de Triton X-100.
pH 5,8 "buffer " acetato 0,1 M, pH 6,8 "buffer" fosfato 0,1 M, pH 7,8 a 9,8 - "buffer" Tris-ClH-0,1 M.

ron centrifugadas a 27.000 g durante 20 minutos. El porcentaje del complejo hCG-receptor solubilizado representa la fracción del total del complejo encontrado en la fraccion sobrenadante después de ser precipitada con P.E.G. Según se aprecia en la figura 25, la titulación de grupos cargados de la membrana y las fuerzas de repulsión resultantes podrian jugar un papel importante en la separación del complejo receptor-hormona de los demas componentes de la membrana.

b) Efecto de las sales.

La tabla 8, indica el efecto de la presencia de diferentes sales en la solubilizacion del receptor particulado con soluciones conteniendo 0,1% de Triton X-100.

TABLA 8 : Efectos de sales en la solubilización del complejo I^{125}-hCG - receptor de partículas testiculares premarcadas. Los valores son promedio de duplicados. La concentración de Triton X-100 fue en todos los "buffers" 0,1 %. (cpm totales de I^{125}-hCG unido a las partículas 87.000).

Buffer utilizado	Adiciones	cpm extraidas
Tris -50 mM pH 7,4	-	39.200
Tris -50 mM pH 7,4	ClNa 50 mM	39.800
Tris -50 mM pH 7,4	ClNa 100 mM	39.300
Tris -50 mM pH 7,4	ClNa 200 mM	39.100
Tris -50 mM pH 7,4	ClK 200 mM	56.000
Fosfato. 50 mM pH 7,4	-	63.000
PBS	-	74.000

La presencia de ClNa hasta concentraciones 200 mM no modifico la eficacia de la extracción. Por el contrario el ClK y el buffer fosfato aumentaron notablemente la extracción que resulto maxima utilizando soluciones del detergente disuelto en PBS.

De estos estudios se observo que si bien una extensiva solubilizacion del receptor ocurre a un pH que podria causar perdida en la actividad de muchas enzimas, la misma solubilización o mas efectiva puede obtenerse a pH fisiologicos aumentando la concentracion de Triton X-100 al 1 % y utilizando PBS como "buffer".

Extracción de partículas premarcadas con diferentes detergentes

Para examinar los efectos de varios detergentes en la solubilización de complejos hormona-receptor, particulas premarcadas fueron tratadas con detergentes iónicos y no iónicos.

La eficacia de la extracción fue de 80-90 % con los detergentes no iónicos en concentraciones superiores a 0,1 % empleando preparaciones de 0,1 mg/ml de proteinas. Recuperaciones similares se observaron en las extracciones con concentraciones alrededor de 0,5 % de detergentes iónicos (Figura 26).

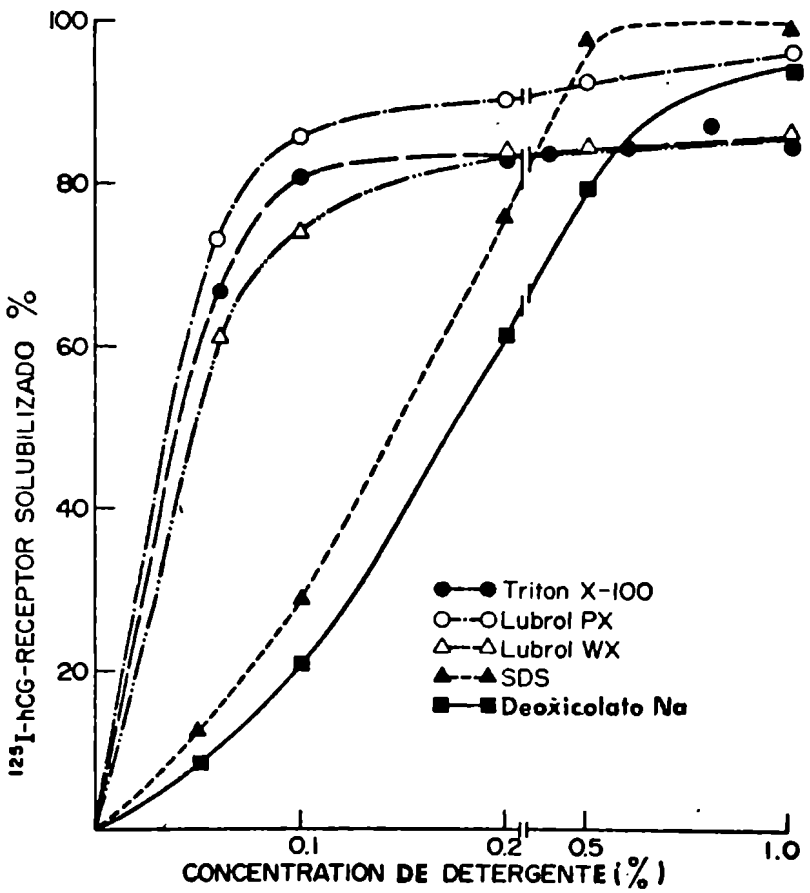

FIGURA 26 : Extracción de partículas testiculares premarcadas con I^{125}-hCG con concentraciones crecientes de detergentes iónicos y no iónicos.

Propiedades del complejo hormona-receptor solubilizado con Triton X-100 de particulas testiculares premarcadas.

La extracción de particulas premarcadas con Triton X-100 produjo un complejo hormona-receptor soluble que sedimento en gradientes de sacarosa con un coeficiente de 8,8 S. (Figura 27 parte superior). Cuando este preparado fue filtrado en Sepharosa 6 B se observo un unico pico de Kav 0,31 y un radio de Stokes de 64 A.

Cuando el detergente fue removido por dialisis el complejo hormona-receptor se convirtio en una forma rapidamente sedimentable (Figura 27 parte media). Esta característica pareceria deberse a la formación de agregados. Dichos agregados aparecieron en el volumen de exclusión en columnas de Sepharosa 6 B.

Este fenómeno es reversible ya que la adición de Triton X-100 al dializado reconstituyo el conglomerado en la forma 8,8 S original (Figura 27 parte inferior)

Parámetros fisicos del complejo hormona receptor extraido de particulas premarcadas.

Las ecuaciones descriptas por Siegel y Monty (95) se emplearon

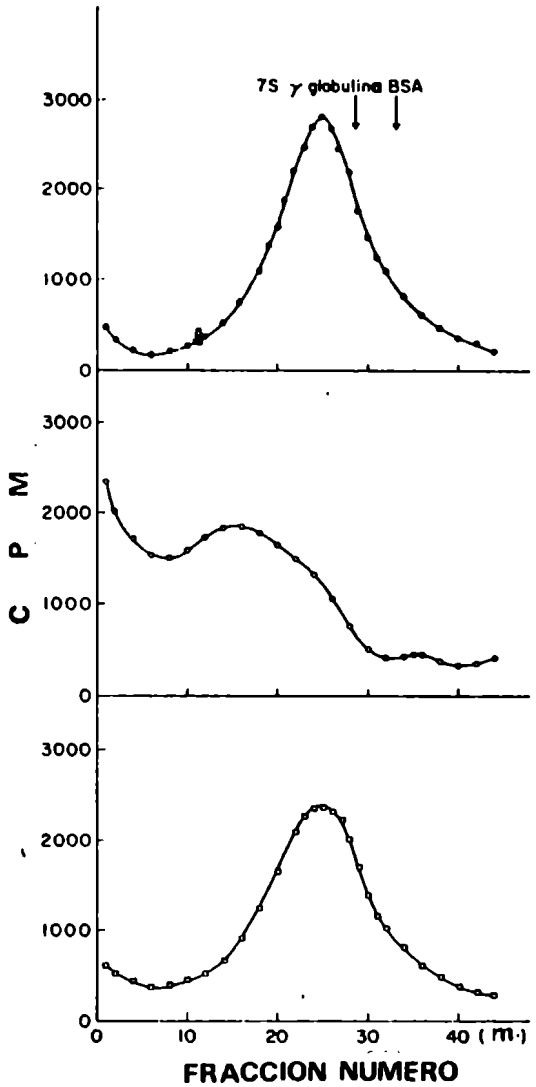

FIGURA 27 : Parte superior . Gradientes de centrifugación en sacarosa 5-20 % del complejo I^{125} -hCG receptor solubilizado con Triton X-100 de particulas premarcadas. Se observa un solo pico de radiactividad con un coeficiente de sedimentación de i 8, 8 S.
Parte media . Efecto de la diálisis en la sedimentación del preparado arriba mencionado.
Parte inferior . Efecto del Triton X-100 sobre el complejo hormona-receptor dializado.

para calcular el peso molecular y relación friccional del complejo hormona-receptor extraido de partículas premarcadas.

Para tales estimaciones se utilizaron los valores de radio de Stokes de 64 Å, coeficiente de sedimentación 8,8 S, densidad del solvente 0,9876 g/cm y coeficiente de viscosidad n = 0,0094 poise.

Para la forma de 8,8 S el volumen parcial específico derivado de la densidad del complejo en gradiente de cloruro de cesio fue 0,7825 cm^3/gr.

Por este metodo el peso molecular aparente del complejo hormona-receptor de sedimentación 8,8 S fue 270.000. La diferencia entre el peso molecular estimado para esta forma del receptor y de la previamente descripta (7,5 S, 224.000) fue de aproximadamente 46.000.

El coeficiente friccional calculado omitiendo el factor de solvatación fue 1.470 correspondiendo a un radio axial (prolato) de 8,8.

Efectos del pH en la disociación del complejo hCG-receptor solubilizado de partículas premarcadas.

Incubaciones del complejo hCG receptor solubilizado de partículas premarcadas (8,8 S) en soluciones de pH entre 5,7 y 8,6 a 37° C(pH 5,7-

6,9 "buffer" acetato 0,1 M 7,4-8,6 "buffer" Tris ClH 0,1 M), no indicaron disociación apreciable del mismo en periodos de hasta dos horas cuando se los analizo mediante precipitacion del complejo con polietilenglicol.

Sin embargo, cuando las soluciones conteniendo el complejo 8,8 S fueron acidificadas con ácido acético a pH 3,7, se produjo la inmediata disociación de la hCG de su sitio receptor. Si inmediatamente (dentro del minuto) el medio era ajustado a pH 7,4 y se continuaba la incubación por 16 horas, se produjo una restauración parcial de la unión de hCG libre, formando un complejo hormona-receptor que difiere del original en su sedimentación en gradientes de sacarosa.

Este nuevo complejo sedimento con una constante de 7,5 S siendo similar a la presentada por combinaciones de I^{125}-hCG con los reeecptores extraidos en Triton X-100 de particulas testiculares no premarcadas. (Figura 28).

Acción del Ca^{++}, AMPc, ATP, GTP y esteroides sobre el complejo hCG, receptor

El complejo hormona-receptor extraido de particulas testiculares

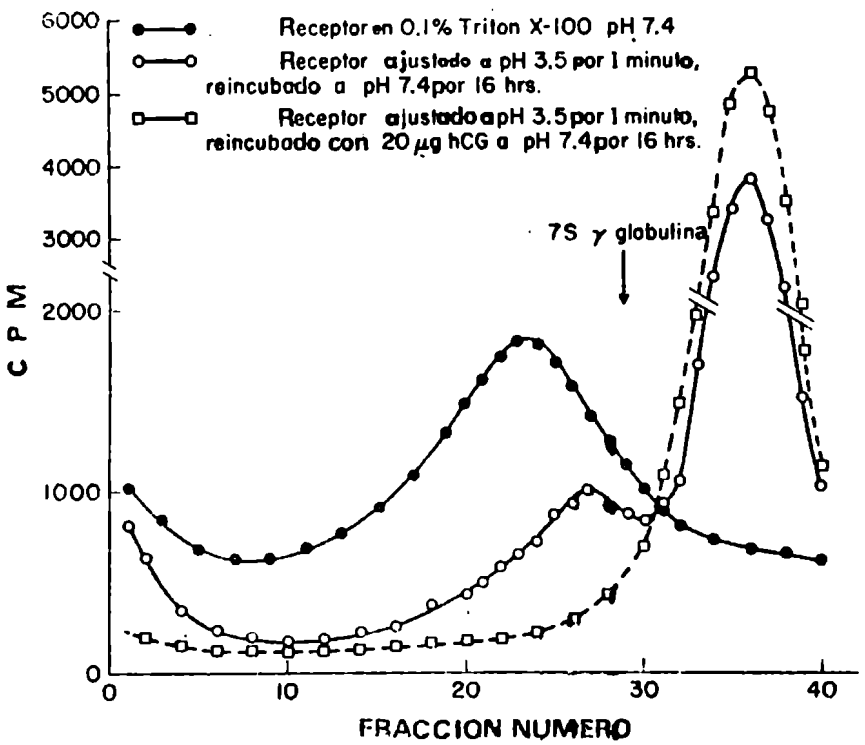

FIGURA 28 : Disociación del complejo I^{125}-hCG-receptor 8, 8 S (extraido de partículas premarcadas) durante su exposición a pH 3, 5 durante un minuto. La reasociacion en Triton 0, 1 % despues de la neutralización a pH7, 4 origina la forma 7, 5 S del complejo (o--o).
La centrifugación en gradientes de sacarosa 5-20 % en buffer Tris 50 mM pH 7, 4, conteniendo 0, 1 % de Triton se realizaron durante 16 horas a 4° C a 170. 000 g.

premarcadas (8, 8 S) demostro poseer una estabilidad fuera de lo común.

Ademas de los intentos de disociación por variaciones en el pH, se trato de disociar dicho complejo con Ca^{++} o nucleótidos que podrian actuar en la acción fisiologica de la hormona. La utilizacion de GTP se debio a su papel en la unión y disociación del glucagón a membranas hepáticas (121).

Se realizaron incubaciones de hasta 2 horas a 37°C en presencia de Ca (hasta 5 mM), AMPc (hasta 5, 7 mM), ATP (hasta 5, 7 mM), GTP (hasta 2 mM) y o los siguientes esteroides en concentraciones $1,3 \times 10^{-6}$ M testosterona, androstenodiona dihidrotestosterona, progesterona, pregnenolona, 17 α hidroxiprogesterona y 17 α hidroxipregenenolona.

En el caso de los esteroides, se utilizaron tambien complejos hCG receptor en su forama 7, 5 S y de su derivado 8, 8 S obtenido por diálisis.

En ningun caso se observoron modificaciones ni disociaciones de los complejos preformados.

Efecto de la urea y guanidina ClH

La urea y guanidina ClH en concentraciones realtivamente bajas 1-2 M produjeron la disociación completa del complejo 8, 8 S (Figura 29).

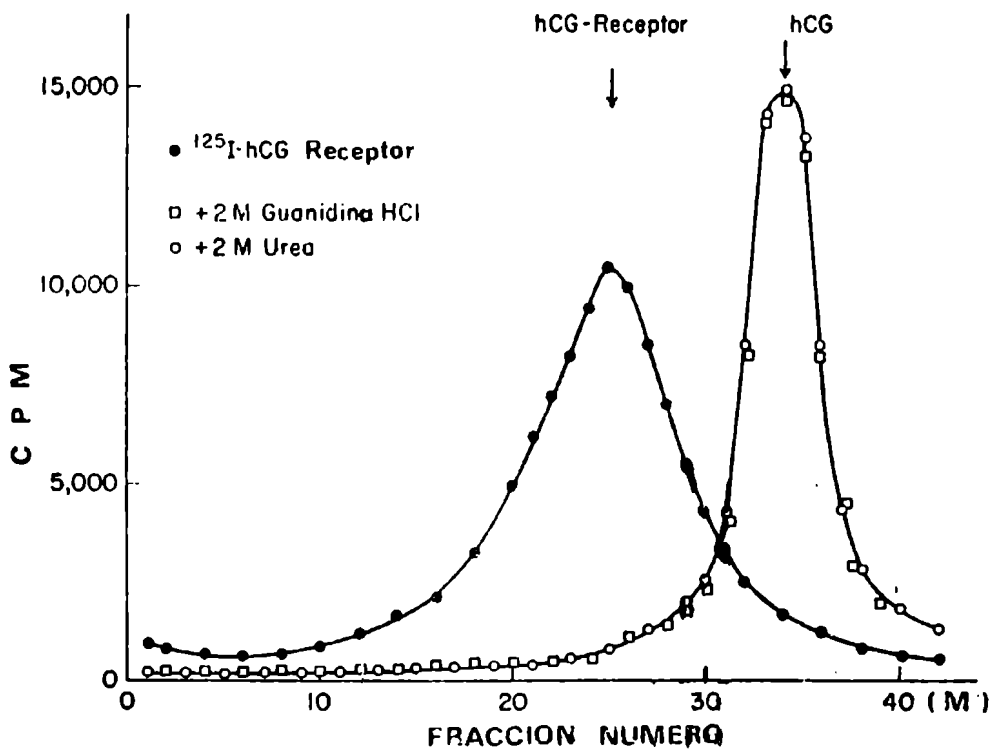

FIGURA 29 : Disociación del complejo hormona-receptor 8,8 S extraido de partículas ticulares premarcadas por la acción de urea y guanidina ClH.
Perfiles de sedimentación en centrifugaciones realizadas en gradientes de sacarosa (5-20 %).

Después de dializar los preparados para eliminación de los agentes desnaturalizantes no se pudo obtener la reconstrucción del complejo hormona-receptor, posiblemente debido a una destrucción de los sitios de ligadura desestabilizados al separarse de la hormona.

Efecto de las fosfolipasas A y C sobre diferentes formas del complejo hCG-receptor.

Efectos sobre las formas 7,5 S y su derivado de 8,8 S obtenido por diálisis.

Alicuotas del complejo I^{125}-hCG-receptor preparado por extracción de partículas testiculares con Triton X-100 y subsiguiente equilibrio con I^{125}-hCG, y del mismo preparado dializado contra buffer Tris ClH 50 mM fueron incubadas con fosfolipasa A (0,5 U/ml) en presencia de Ca^{++} 5 mM o fosfolipasa C(1,0 U/ml, Ca^{++} 3mM) durante 15 minutos a 34° C. Despues de la incubación, 0,5 ml de las correspondientes muestras fueron colocadas sobre gradientes de sacarosa y analizados como se describió en métodos. La figura 30 muestra el comportamiento de la forma 7,5 S (parte superior) y dializada (parte inferior) en gradientes, después de ser sometidas a la acción de las fosfolipasas.

La forma 7,5 S no fue afectada por los tratamientos en fosfolipa-

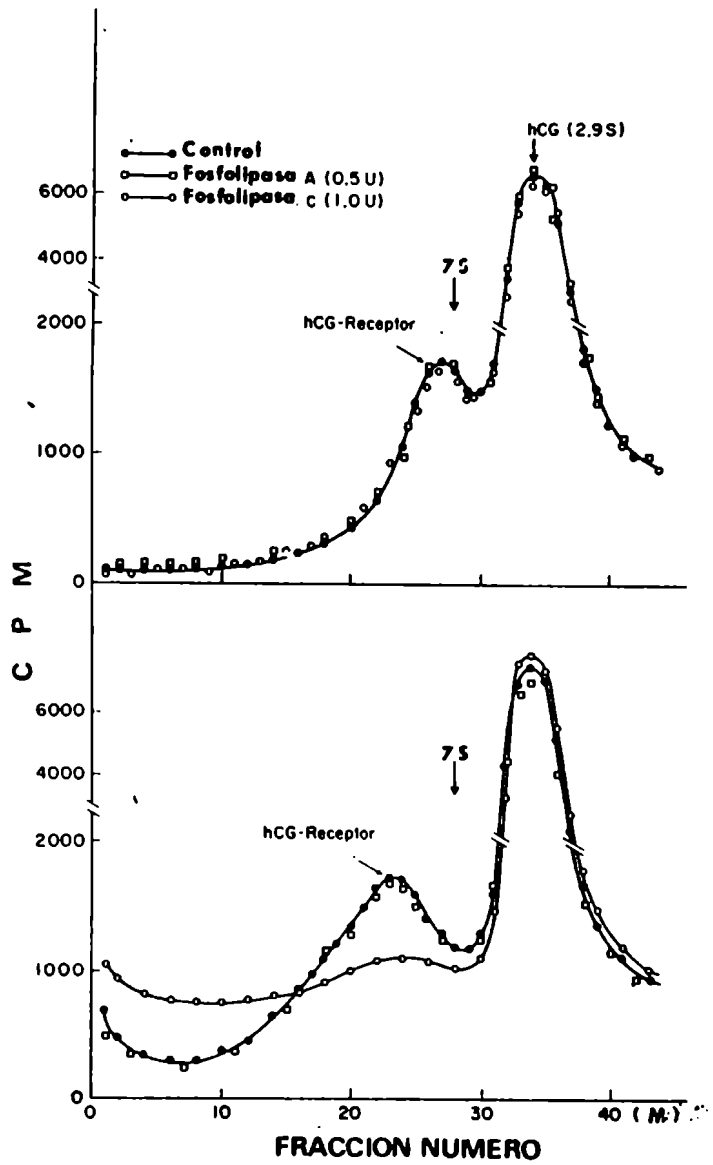

FIGURA 30 : Parte superior : efectos de las fosfolipasas A y C sobre la sedimentación en gradientes de sacarosa del complejo I^{125} -hCG receptor (7, 5 S). Preparado por extracción con Triton X-100 de particulas testiculares y subsiguiente equilibrio con I^{125} -hCG.
Parte inferior : Efectos de las fosfolipasas A y C sobre el complejo 8, 8S formado por diálisis del 7, 5 S.

sas A o C. Es posible que esta forma del complejo receptor no posea moléculas de fosfolípido disponibles a la accion de las fosfolipasas . Sin embargo algun fosfolípido debe participar en al unión de la hCG al receptor dado que el tratamiento del receptor con fosfolipasa A antes de la incubación con la hormona radiactiva, disminuye marcadamente la unión de la misma a sus sitios ligadores. (Ver figura 24).

Por el contrario la forma dializada del complejo hCG-receptor fue afectada por la acción de la fosfolipasa C.

El comportamiento diferente de ambas formas de la fosfolipasa C podría quiza explicar las diferencias observadas en las sedimentaciones del complejo hormona-receptor dializado. La diálisis permitiria la asociación de algun material de naturaleza fosfolipídica a la forma 7,5 S al eliminarse del medio el detergente que impediría que tal union ocurriera.

Efectos de las fosfolipasas sobre partículas premarcadas y receptores solubilizados de estas partículas.

Fracciones de 10 mg de proteinas correspondientes a partículas premarcadas fueron incubadas con fosfolipasas A y C en la misma forma que se detalló para la digestión del receptor soluble.

Luego de la acción enzimática, el sobrenadante de la centrifugación de las partículas a 27000 g x 10 minutos fue precipitado con PEG y los precipitados fueron extraidos con 1% de Triton X-100 y centrifugados en gradientes de sacarosa. En la parte superior de la figura 31, se observa que ambas enzimas producen la agregación del compeljo hormona-receptor cuando las particulas son expuestas a la acción enzimatica antes de la solubilización del receptor.

Una cantidad apreciable de radiactividad precipito por PEG en el sobrenadante de 27. 000 g despues del tratamiento de las partículas con fosfolipasa A. Sin embargo, cuando estos sobrenadantes fueron centrifugados en gradientes, se observo, que la radiactividad estaba distribuida en partes iguales por I^{125}-hCG libre y una serie de agregados distribuidos a lo largo del gradiente. (Figura 32).

El presente estudio podría proveer algunos datos en relacion a la organización molecular del receptor de hCG en las membranas de las celulas intersticiales. Por ejemplo, la organización molecular deberia ser tal que, permita la interacción de las fosfolipasas con los grupos ionicos y no polares de la molecula de fosfolípidos.

Por otra parte solamente la fosfolipasa C produjo agregados en el receptor soluble extraido de partículas premarcadas o en el concentrado

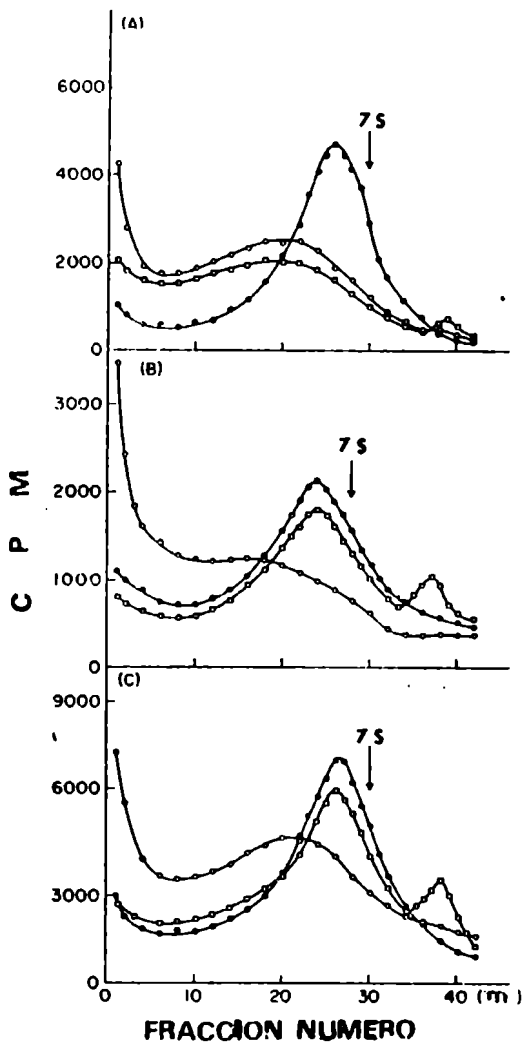

FIGURA 31 : Efectos de las fosfolipasas A (0,5 U/ml) y C(1,0 U/ml) sobre los perfiles de centrifugación del complejo I^{125}-hCG receptor 8,8 S extraido con Triton X-100 de partículas premarcadas.
A) Tratamiento enzimático de las partículas.
B) Tratamiento enzimático despues de la solubilización
C) Tratamiento enzimático del receptor soluble fraccionado con 25-50 % de saturación en $S O_4 (NH_4)_2$
(■—■) Tratamiento con fosfolipasa A; (o——o) tratamiento con fosfolipasa C; (●——●) muestra no tratada.

de sulfato de amonio de dicho receptor. (parte media e inferior de la figura 31).

Esta observacion favoreceria un modelo en que los grupos ionicos que proveen la principal especificidad de las moleculas de sustrato se dispondrian hacia afuera de la superficie del receptor.

Es quiza interesante observar que en esta forma soluble del complejo hCG-receptor, parte de la hormona es liberada por la fosfolipasa A, sugiriendo nuevamente que alguna parte de los fosfolipidos puede intervenir en la union de la I^{125} -hCG al receptor.

Tratamiento de los receptores solubles con neuraminidasa , RNAsa DNAsa

El tratamiento de las formas 7,5 S y 8,8 S con neuraminidasa (36 ug/ml-0,03 U , RNAsa (100 ug/ml) y DNAsa (25 ug/ml) no modifico las caracteristicas de sedimentacion en gradientes o precipitabilidad de los complejos con polietilenglicol.

Extraccion de particulas premarcadas con diferentes detergentes

Mientras que la solubilizacion de particulas premarcadas con Tri-

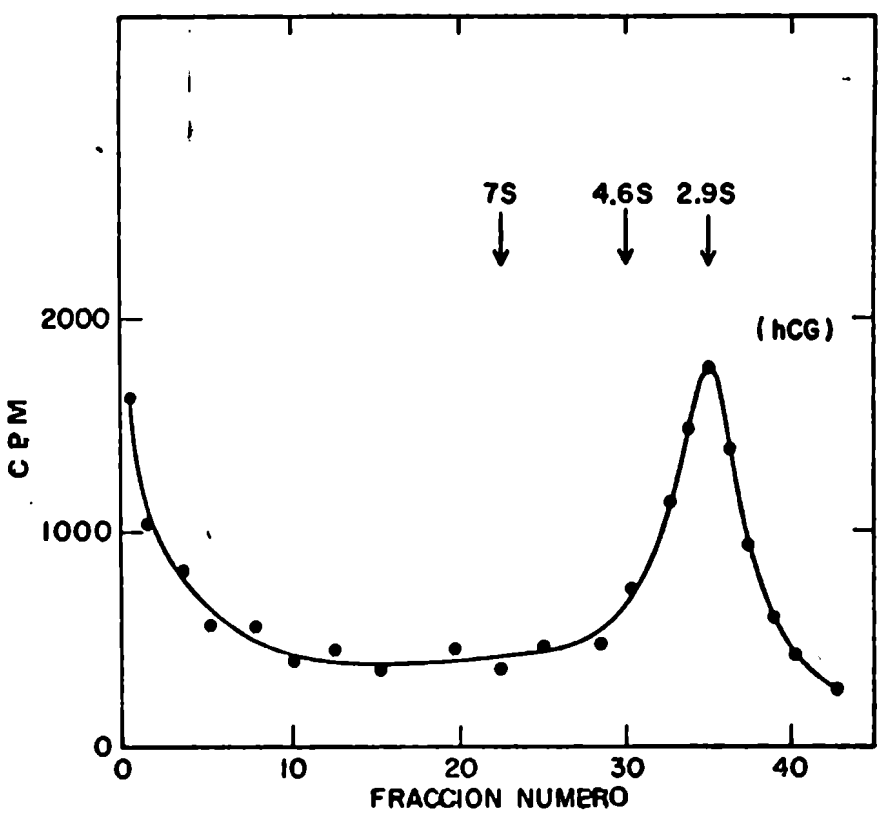

FIGURA 32 : Perfil de sedimentación en gradientes de sacarosa de la radiactividad sobrenadante del tratamiento de partículas testiculares premarcadas con fosfolipasa A.

ton X-100 produjo solamente una forma del receptor (8, 8 S) la extracción con otros detergentes llevo a la deteccion de otras formas de complejos hCG -receptor.

La extracción con Lubrol PX (0, 1 %) produjo dos formas adicionales de sedimentacion 7, 5 S y 5 S como así también hCG libre (2, 9 S).

La diálisis de este preparado determinó el agregado de todos estos complejos que mediante adición de Triton X-100 en la concentración final del 0, 1 % revirtio el conglomerado a la forma 8, 8 S. Sin embargo el tratamiento de partículas premarcadas con 1 % de Lubrol WX o 0, 2 % de deoxicolato de sodio produjo solamente la forma 5 S.

Los receptores de gonadotrofinas extraidos con Lubrol PX de partículas premarcadas y sometidos a filtración por columnas de Sepharosa 6 B mostraron perfiles de elución idénticos (Kav : 0, 26) en soluciones de Lubrol PX o Triton X-100 al 0, 1 %. Con la utilización del coeficiente de partición 0, 26 se cálculo el radio de Stokes obtenido del complejo como 77 Å en ambas soluciones de detergente.

La densidad del complejo 5 S extraido con Lubrol WX determinada por gradientes de densidad isopicnicos fue de 1. 3150 y el peso molecular aparente calculado como ya se menciono fue de 169. 000.

Solubilización y caracterización del receptor ovárico de hCG

Los receptores de gonadotrofinas en ovario de rata ligan I^{125}-hCG con especificidad y afinidad equivalente a los receptores presentes en partículas testiculares.

Por otra parte los receptores ováricos de ratas pseudopreñadas han sido extraidos de la fracción particulada con Triton X-100 reteniendo la especificidad hormonal y alta afinidad por LH y hCG.

Los ovarios fueron homogeneizados en un homogeinizador vidrio-vidrio con dos volumenes de "buffer" fosfato salino (PBS).

Despues de centrifugar a 120g por 30 minutos a 4° C, la solución sobrenadante fue recentrifugada a 20.000 g durante 30 minutos utilizando el precipitado en :

a) solubilización por resuspención en 1% Triton X-100 en PBS por 30 minutos a 4° C y luego diluido a 0,1 % Triton con el mismo buffer.

b) suspensión en PBS y equilibrio con I^{125} -hCG (40 uC/ug, 20 ng por tres ovarios) durante 16 horas a 4° C, seguido por tres lavados con 30 ml de PBS para eliminar la hCG libre y posterior solubilización del complejo receptor hormona con soluciones al 1 % de Triton X-100.

Los receptores solubles extraidos de partículas ováricas no mar-

cadas fueron diluidos a concentraciones 0,1 % de Triton X-100 en PBS a un volumen equivalente a 25 ml por ovario, y utilizados para su posterior marcación.

Las curvas de desplazamiento se realizaron con 50.000 cpm (1ng) de I^{125}-hCG y cantidades crecientes de hCG no radiactiva hasta 100 ng por ensayo.

Las incubaciones se realizaron a 4°C por 16 horas y la separación de la hormona libre del complejo receptor-hormona se realizó mediante precipitación con polietilenglicol (PEG) como ya se describió.

Los diagrama de Scatchard obtenidos indican un orden simple de sitios de ligadura con un Ka : 0,5-1 x 10^{10} M^{-1} (Figura 33).

La capacidad de unión del receptor ovárico solubilizado fue de 0,15 x 10^{-12} moles por mg de proteina.

La filtración por gel de los preparados en columnas de Sepharosa 6 B equilibrados con 0,1% de Triton X-100, en "buffer" Tris-ClH 50 mM pH 7,4 mostraton un pequeño pico del complejo hormona-receptor (Kav : 0,36) seguido por un pico de hormona libre (Kav : 0,56) (Figura 34).

El pico correspondiente al complejo hormona-receptor desaparecio cuando la incubación se realizaba en presencia de 20 ug de hCG no marcada pero permaneció en presencia de cantidades equivalentes de .

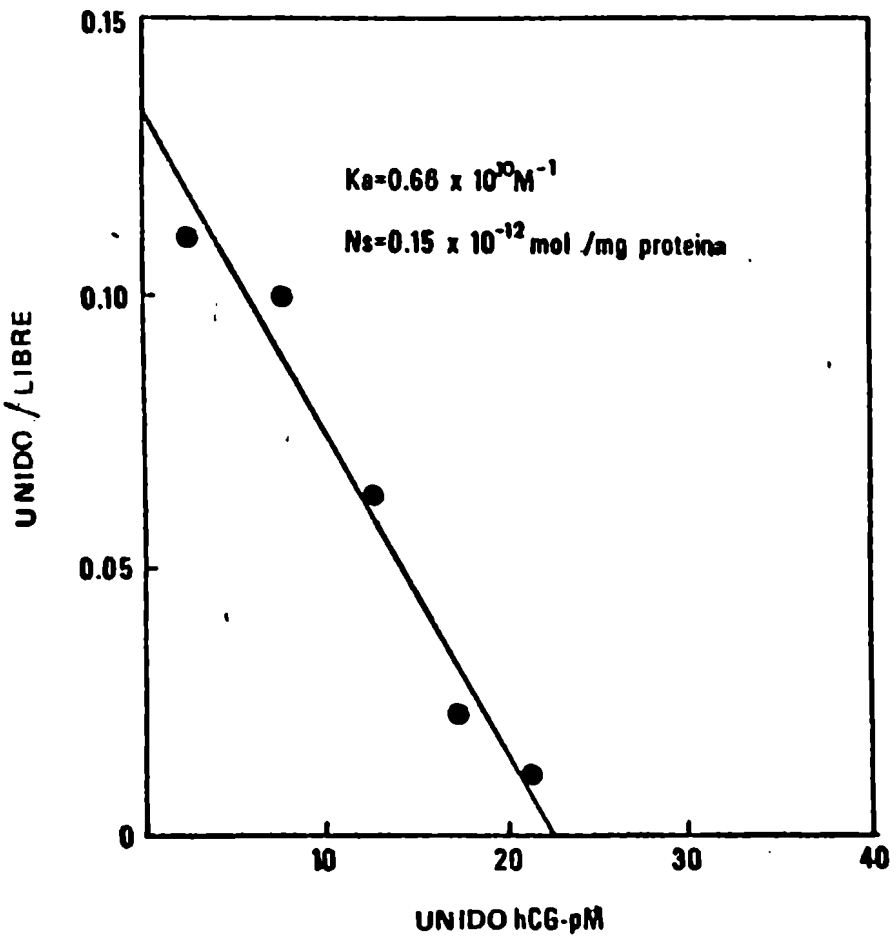

FIGURA 33: Diagrama de Scatchard de los datos obtenidos por desplazamientos en la unión de L^{125}-hCG incubada con el receptor ovárico solubilizado con Triton X-100 y concentraciones crecientes de hormona no marcada durante 16 horas a 4° C.

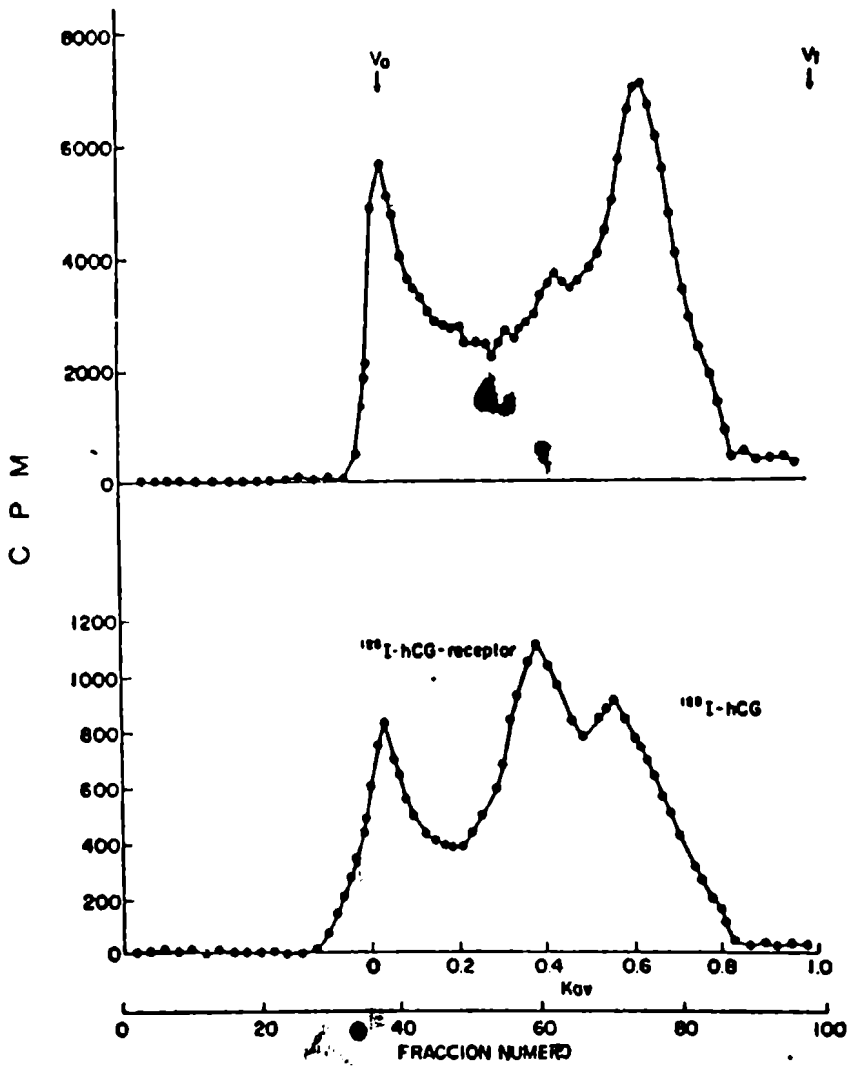

FIGURA 34 : Filtracion en Sepharosa 6 B (1 x 60 cm) del receptor ovárico solubilizado y equilibrado con I^{125}-hCG durante 16 horas a 4°C.
Parte superior . El pico radiactivo de material agregado junto al volumen muerto . es seguido por un pequeño pico del complejo hormona-receptor y de hormona libre.
Parte inferior. La refiltracion de la region correspondiente al complejo hormona-receptor presenta una separación neta entre un pico de material agregado con el frente y el de la hormona libre.

ACTH, prolactina, tirotrofina y FSH. Este complejo fue precipitado con concentraciones al 11 % de PEG, concentración que es también utilizada para la precipitación del complejo hormona-receptor solubilizado con Triton X-100 de células de Leydig.

Al igual que los preparados testiculares el receptor ovárico se absorbió al Blue Dextran durante la filtracion con el. Mediante concentración y refiltración en Sepharosa 6 B de las fracciones conteniendo el complejo ovarico hormona-receptor (Figura 34 parte inferior) se observó un pico mas prominente del complejo. A diferencia con los receptores testiculares, se observo una considerable cantidad de material agregado durante la refiltración del complejo ovárico.

El radio de Stokes determinado por comparacion con proteinas de referencia fue de 60 Å.

En gradientes de sacarosa 5-20 %, el complejo hormona-receptor obtenido por equilibrio de los extractos ováricos de Triton X-100 y ^{125}I hCG sedimentó con una constante de 7,5 S (Figura 35). Nuevamente este pico desaparecio cuando las incubaciones se realizaron en presencia de un exceso de hCG no marcada.

La densidad del complejo 7,5 en gradientes de cloruro de cesio fue 1.2859.

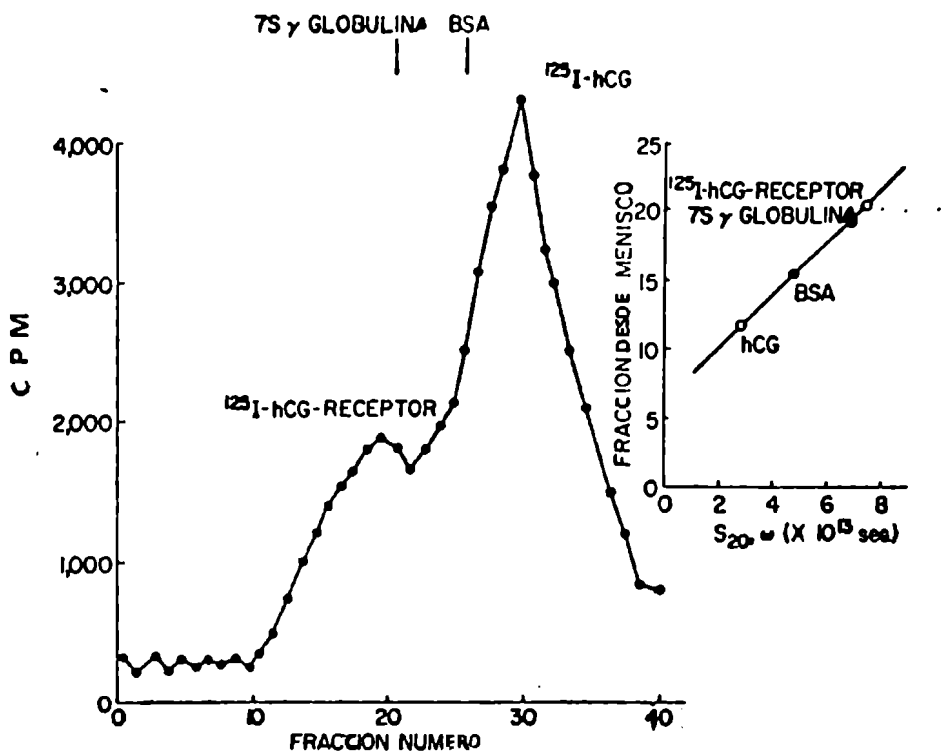

FIGURA 35 : Perfil de la centrifugación del receptor de ovario solubilizado, incubado con I^{125} -hCG en gradientes de sacarosa (5-20 %) en "buffer" Tris ClH-50 mM pH 7,4 con 0,1% Triton X-100. El pico correspondiente al complejo receptor-hormona (7,5 S) desaparece si las muestras son incubadas en exceso de hormona no marcada.

El peso molecular aparente calculado de estas determinaciones como ya se menciono omitiendo el factor de solvatacion fue de 228.000 y la relacion friccional del complejo fue 1,44.

El receptor libre fue tambien analizado por filtración en Sepharosa 6 B y detectado en las fracciones eluidas por su capacidad de union a I^{125}-hCG.

Estos experimentos mostraron un solo pico de actividad de unión con un Kav : 0,36 equivalente a un radio de Stokes de 60 Å (Figura 36).

Los gradientes de sacarosa de los receptores libres solubilizados con Triton X-100 (no combinados con la hormona) fueron dificiles de realizar por la considerable cantidad de lípidos en los extractos, pero en dos ocaciones dieron picos con actividad de unión cuyas constantes de sedimentacion fueron 6,0 S y 6,7 S.

Estos valores son comparables con el receptor libre testicular que sedimenta a 6,5 S.

El complejo hormona-receptor extraido de partículas premarcadas fue significativamente diferente del complejo receptor formado post solubilización, durante la filtración por gel y en gradientes de sacarosa.

El Kav del complejo premarcado fue de 0,30 equivalente a un radio de Stokes de 71 Å, presentando una constante de sedimentacion de 8,8 S

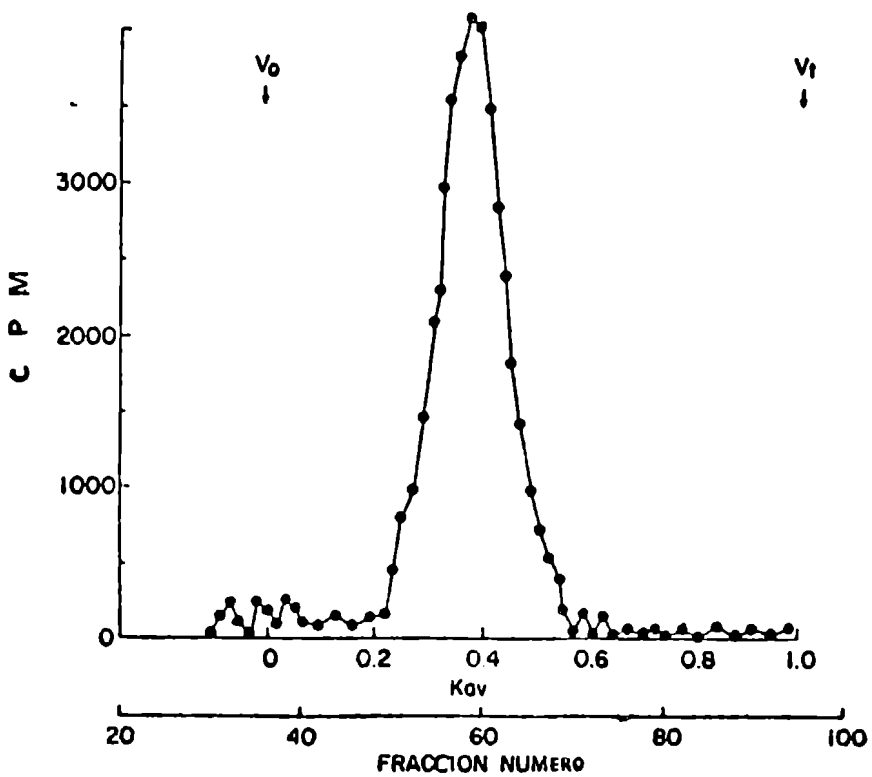

FIGURA 36 : Filtración por Sepharosa 6 B (1 x 60 cm) del receptor libre de gonadotrofinas extraido de ovarios de ratas. El pico con actividad de union (Kav : 0,36) fue localizado mediante incubacion de las fracciones eluidas, con I^{125} -hCG durante 16 horas a 4° C y precipitación con polietilenglicol.

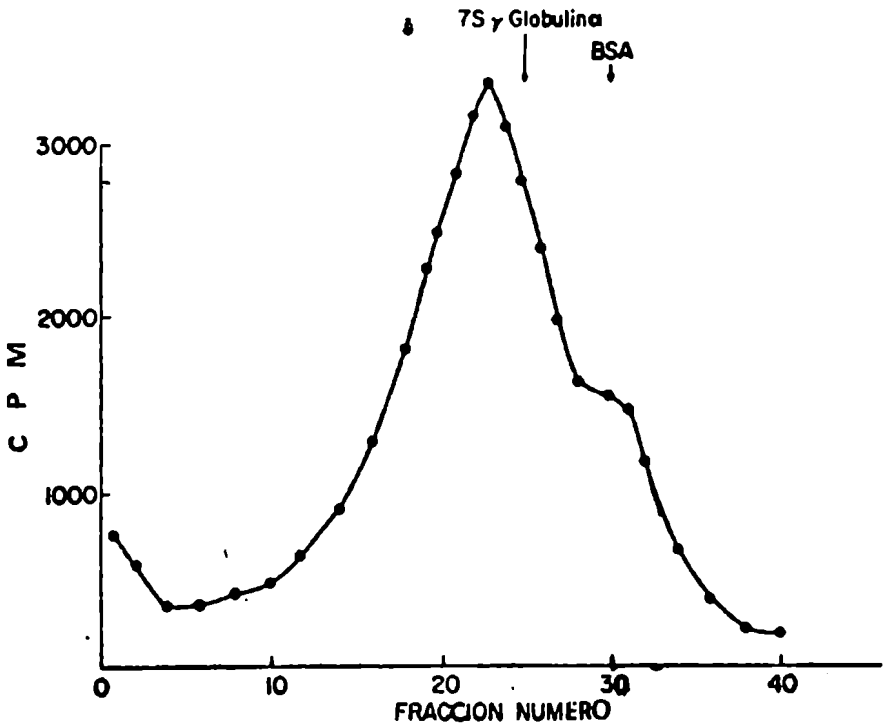

FIGURA 37 : Centrifugación en gradientes de sacarosa 5-20 % del receptor ovárico solubilizado con Triton X-100 de partículas premarcadas. El area que sedimenta con una constante de 8,8 S correspondiente al complejo hormona - receptor no se observa cuando las partículas son preincubadas con exceso de hCG no radiactiva.

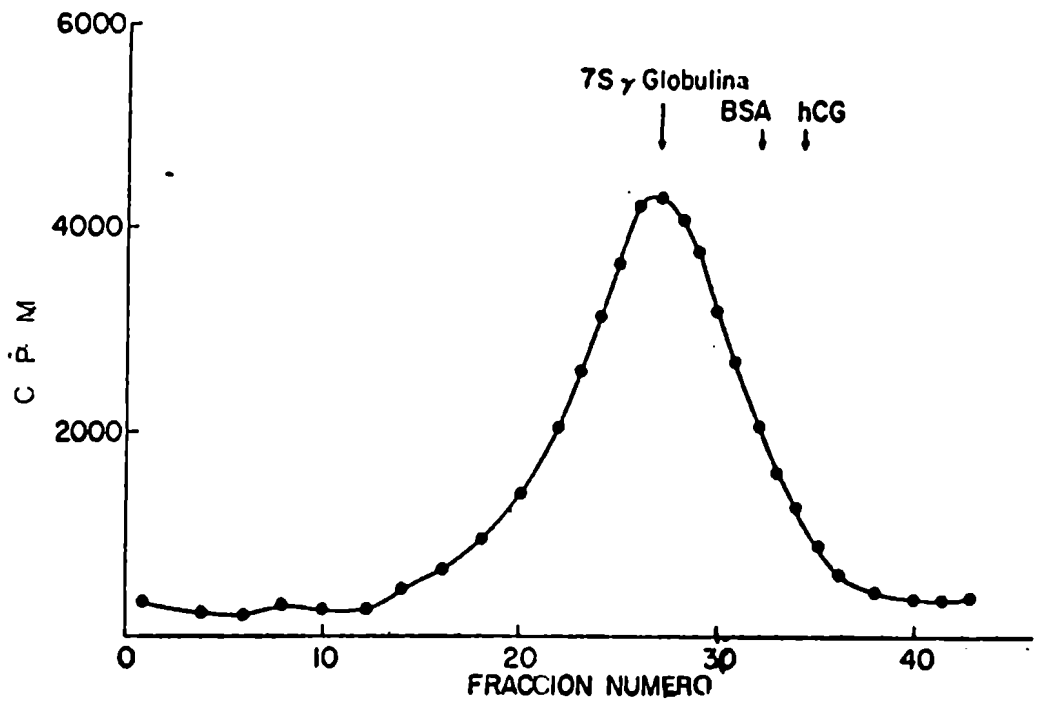

FIGURA 38 : Centrifugación en gradientes de sacarosa 5-20 % del complejo hormona-receptor ovárico solubilizado con Lubrol PX de partículas premarcadas.
El complejo hormona-receptor se comporta como una especie única con un coeficiente de sedimentación de 7,5 S.

(Figura 37) y una densidad en gradientes isopícncios de 1,2734.

La extracción de particulas premarcadas con otros detergentes como el Lubrol PX presentan complejos que sedimentan con un coeficiente de 7,5 S, análogos a los observados en extracciones similares de partículas testiculares (Figura 38).

Los estudios realizados con el receptor ovárico de hCG muestran similaridades muy marcadas con los obtenidos con el receptor solubilizado de partículas testiculares. La tabla 9 indica a manera de resumen los datos obtenidos.

TABLA 9. Comparación de las características fisico-químicas de los receptores solubilizados de ovario y testículo.

	RECEPTOR OVARICO	RECEPTOR TESTICULAR
Constante de Asociación (Ka)	0.66×10^{10} M^{-1}	0.60×10^{10} M^{-1}
Capacidad de Unión del extracto inicial	0.15×10^{-12} mol/mg proteina	0.12×10^{-12} mol/mg proteina
Radio de Stokes		
Receptor libre	60 Å	64 Å
Complejo hCG-receptor formado despues de la extracción.	60 Å	64 Å
Complejo hCG-receptor extraido de partículas premarcadas	71 Å	64 Å
Constante de Sedimentación		
Receptor libre	6.0 - 6.8 S	6.5 S
Complejo hCG-receptor formado despues de extracción	7.5 S	7.5 S
Complejo hCG-receptor extraido de partículas premarcadas	8.8 S	8.8 S
Densidad (gramo/cm^3)		
Complejo 7.5 S	1.283	1.209
Complejo 8.8 S	1.273	1.278

DISCUSION

La aplicación de los receptores gonadales en el ensayo de gonadotrofinas y el análisis "in vitro" de las variaciones estructurales hormonales ilustran perfectamente el valor general de los receptores como herramienta para el estudio de algunos aspectos de la actividad hormonal.

En este sentido debemos destacar la conveniencia y simplicidad del ensayo de las gonadotrofinas, basado en la interacción receptor-radioligando.

En cuanto a la especificidad de esta interacción se sabe que, la unión por los receptores testiculares de rata es competida por LH de varias especies y por hormona gonadotrófica humana y de otros primates. Los estudios adicionales en otras especies seran, sin lugar a dudas de valor para definir la existencia de gonadotrofinas placentarias con similaridades funcionales a LH y hCG.

Las propiedades físicas y biológicas de los sitios de ligadura testiculares son coincidentes con aquellos receptores de membrana, para gonadotrofinas placentarias con similaridades funcionales a LH y hCG.

La interaccion inicial entre estas hormonas y los receptores testiculares parece ocurrir en forma extremadamente rápida, segun lo muestra

la estimulación de la formación de AMPc al minuto después de estar el sistema en contacto con altas concentraciones de hCG (27).

La velocidad inicial de union de I^{125}-hCG con los receptores del testículo es mayor a 34° C que a temperaturas menores, pero es acompañada por un aumento de la degradación de la hormona, de tal manera que la captacion final total de hCG por el testículo es mayor a 24° C que a 37° c.

Las velocidades de asociación y disociacion a bajas concentraciones de hCG (10^{-11} M) a 24° C, son relativamente lentas (ka : $1,3 \times 10^7 M^{-1} min^{-1}$, k : $2,1 \times 10^4$ min^{-1}). Esto podria explicarse por la relativa constancia de los niveles regulatorios plasmáticos de LH o hCG, por no requerir el testiculo responder a la estimulación de LH bajo circunstancias fisiológicas normales, con cambios rápidos en la secrecion de esteroides y por lo tanto, de una necesidad de un rápido recambio de la hormona de su sitio receptor.

La constante de equilibrio de los receptores testiculares por la hCG es relativamente alta ($2,4 \times 10^{10}$ M^{-1} por estudios de equilibrio y $6 \times 10^{10} M^{-1}$ por estudios cinéticos) y esta de acuerdo con los niveles plasmaticos de gonadotrofinas.

En el sistema testículo-hCG, no fueron evidenciados dos tipos de

sitios receptores como lo observado con los receptores suprarrenales de ACTH (12). Una vez mas, la falta de una necesidad conocida para cambios rápidos minuto a minuto en la secreción de andrógenos, puede estar relacionada con la ausencia de dos ordenes de sitios de ligadura que, en el caso de la suprarrenal su existencia ha sido necesaria para proveer una mayor flexibilidad en la respuesta a la adrenocorticotrofina (100).

Es quiza de interes hacer notar que el receptor de insulina en los tejidos adiposo y hepático tambien posee un solo tipo de sitios de ligadura con afinidad comparable a los receptores de LH y hCG del testículo (101-102).

La capacidad de unión del testículo intacto por hCG excede ampliamente los valores necesarios para producir la estimulación maxima de la esteroidogénesis "in vitro". Esta claro, entonces, que la gonada contiene un vasto exceso de sitios de unión hormonal por encima del número requerido para estimular la formación de esteroides.

El papel de esos receptores en exceso, hecho observado en diversos tejidos para la ligadura de otras hormonas (103, 104) no es claro, aun, aunque es probable que cumplan un papel de reservorio.

Se sabe que la interacción con los sitios receptores no causa inactivación de la trofina y que por cierto, la hormona unida al receptor

esta protegida de los procesos de degradación que ocurren durante la incubación con el tejido efector.

Por otras parte, una alta proporción de los receptores en exceso del testículo son potencialmente activos considerando que estan acoplados a la produccion de AMPc. Esta última continua en forma manifiesta durante la captación de hCG en exceso de la cantidadrequerida para producir la maxima esteroidogénesis. Sin embargo, no esta aclarado si ese amplio rango de ligadura de la hCG y activación de la adenilato ciclasa es funcionalmente continuo con el proceso involucrado con la esteroidogénesis o representa un mecanismo adicional de aquel que opera a niveles bajos de hormona.

El examen de la relación entre AMP cíclico y la biosíntesis testicular de esteroides durante los estudios "in vitro" con testículos de rata, presenta dos tipos de evidencias acerca del papel de la adenilato ciclasa en la estimulación gonadotrofica de la secreción androgénica.

Primero, los efectos estimuladores del AMPciclico en la produccion de testosterona, y el aumento en la liberación de AMP cíclico producido por hCG, estan de acuerdo con el punto de vista generalmente aceptado de que el AMPc actua como mediador intracelular de la estimulación gonadotrofica de la esteroidogénesis (105). En este sentido la acción es-

timulante del dibutiril AMPc en la producción de testosterona esta aparentemente en un rango de concentraciones similares a las que estimulan la producción de corticosterona en células suprarrenales aisladas (106). Como en otros tejidos tales como el hígado (71) y la suprarrenal (106), el derivado dibutírico es alrededor de 50 veces mas potente que el AMPc.

Segundo, la rápida estimulación de la formación de AMPc por altas concentraciones de hCG (1minuto despues de la adición, 5×10^{-9} M), apoya también el papel intermediario del nucleótido en la acción de la trofina (27).

Las concentraciones crecientes de hCG, producen, elevaciones correspondientes en la liberación de AMP en un amplio rango de dosis-respuesta. Sin embargo, los estudios realizados a niveles bajos y fisiológicos de hormona ha revelado que la esteroidogenesis puede ser estimulada hasta casi sus niveles máximos sin aumentos detectables en la formación de AMPc.

Similares observaciones se han realizado en un sistema de suprarrenales perfundidas y estimuladas por la ACTH (107) y en células suprarrenales aisladas donde también, las curvas dosis-respuesta para la producción esteroidal y la formación de AMPc se han visto marcadamente disociadas (108) (109).

La disociación de las respuestas de AMPc y la esteroidogénesis durante la estimulación de las trofinas en testículo y suprarrenal podrían sembrar dudas sobre el papel de intermediario atribuido al AMPc, o pueden tambien reflejar la dificultad de detectar un aumento inicial de AMPc en un compartimiento intracelular que es insignificante en relación con el contenido total del nucleótido. Sin embargo, la ausencia de un aumento detectable en la liberación de AMPc en respuesta a los niveles de hCG que se expanden en la escala necesaria para inducir la producción total de testosterona, sugieren la posibilidad de que la estimulación inicial de la esteroidogenesis por las gonadotrofinas puede operar por caminos diferentes que los que involucren a la adenilato ciclasa y la formación de AMPc.

Por otra parte la unión de las gonadotrofinas a sus receptores especificos requiere que las moléculas de estas hormonas esten en su estado activo. No existe union cuando dichas moléculas se encuentran disociadas (110). Sin embargo, la existencia de ciertos restos hidrocarbonados en dichas moleculas pareceria no ser un requerimiento para dicha unión. Por ejemplo, el acido siálico terminal y los residuos de galactosa de las gonadotrofinas no son esenciales para la expresión "in vitro" de los efectos hormonales en sus receptores gonadales. Sin embargo dichos restos de carbohidratos son esenciales en la gonadotrofina coriónica humana para la expre-

sión de la actividad biológica de la hormona "in vivo",

El tratamiento con neuraminidasa reduce la actividad biológica de dicha hormona sin alterar significativamente sus propiedadss inmunoquímicas (111, 112).

El alto contenido en acido siálico de la hCG parece estar relacionado con su vida media palsmática y depuración metabólica (49), desde que se ha observado que tales residuos desempeñan un papel fundamental en la sobrevida de las glucoproteinas en la circulación (48).

La remoción adicional de los residuos de galactosa después de la desialilación de la hCG tampoco parece afectar las propiedades biológicas de la hormona " in vitro". Esto es coincidente con la idea de que los residuos de carbohidratos son relativamente poco importantes en el proceso de interacción de las hormonas glucoproteicas con sus órganos efectores. El papel de dichos r esiduos estaría vinculado exclusivamente con la permanencia de dichas hormonas en circulación por un período adecuado.

Análisis comparables de los factores estructurales que determinan la especificidad de los sitios de ligadura por gonadotrofinas se han visto impedidos por la naturaleza compleja de tales sitios, juntamente con su asociación a un grupo de proteinas de membrana relativamente insolubles.

La demostración de que el receptor testicular de hCG o LH puede ser solubilizado por detergentes con rendimiento relativamente bueno, indica que el complejo podría ser sujeto al análisis estructural para determinar la naturaleza de los componentes esenciales para la actividad ligadora hormonal. Las propiedades del receptor de gonadotrofinas son similares a las del receptor soluble de insulina, quiza como consecuencia de la similaridad de los procedimientos de solubilización. Sin embargo, esto no sería sorprendente si todos los receptores de hormonas peptidicas estuvieran constituidos generalmente por complejos similares de componentes con especificidad demostrable unicamente en su estructura y configuracion molecular crítica.

Los receptores testiculares de gonadotrofinas, solubilizados por extracción con detergentes, retienen la especificidad hormonal por LH y hCG y poseen alta afinidad por estas hormonas. Sin embargo, la susceptibilidad de tales receptores a la degradación posiblemente motiva, la disminución de la capacidad de unión detectable durante las incubaciones de las preparaciones solubles. Esta degradación es mas rapida a 34°C que a temperaturas inferiores, siendo aparente en los receptores libres y no en los que han sido previamente combinados con la hormona. Tal degradación del receptor puede ser consecuencia de la inestabilidad intrínseca de los

sitios de ligadura solubilizados o puede ser debida a una degradación enzimática no específica. De cualquier forma, la formación del complejo hormona-receptor estabiliza al receptor.

El efecto de la tripsina y otras enzimas sobre las propiedades de ligadura del recepotr soluble ha indicado claramente que un componente proteico es esencial para la actividad de unión, de tal manera que el efecto protector de su combinación con la hormona podria reflejar la reducida susceptibilidad de una estructura mas ordenada al ataque proteolítico.

El aumento en la unión, que se observa en el tratamiento del receptor "soluble" con neuraminidasa, es probablemente debido a la desialilación de la gonadotrofina durante la incubación posterior, desde que es conocido que asialo-hCG posee mayor afinidad por los sitios gonadales de unión, que la molecula nativa.

Experimentos similares realizados con la fracción particulada solamente mostraron un muy reducido aumento en la captación de hCG, luego del tratamiento con neuraminidasa posiblemente causado por modificaciones no específicas de las cargas del receptor.

La accion de las fosfolipasas A y C sobre la actividad de union del receptor es de interes en comparación con los efectos de estas enzimas

observados en la unión del glucagón e insulina por membranas de células hepáticas y adiposas. La unión del glucagon a los receptores de los tejidos mencionados es disminuida o eliminada por digestion con fosfolipasa C (13, 110), mientras que esta misma enzima y la fosfolipasa A aumentan notablemente la union de la insulina a los receptores de los tejidos hepático y adiposo (113). Este aumento en la unión de la insulina ha sido atribuido al "desenmascaramiento" de sus receptores por remoción de fosfolipidos de la membrana celular, con aumento de la accesibilidad del receptor a la insulina, asi como tambien a enzimas proteoliticas tales como tripsina. Sin embargo, no fue observado efecto alguno en la digestión con fosfolipasas de la forma "soluble" del receptor de insulina. Estos datos son consistente con la ausencia de fosfolipidos en el receptor solubilizado (113). Los efectos de las fosfolipasas sobre el receptor particulado testicular podrian quiza considerarse relacionados a los observados sobre los de insulina y glucagón. Como se vio anteriormente por acción de la fosfolipasa A, se reduce marcadamente la capacidad de unir hCG, mientras que la fosfolipasa C, afecta solo ligeramente dicha capacidad. El efecto de la fosfolipasa A fue tambien observado en el receptor solubilizado y podria reflejar un papel importante de los fosfolípidos en la actividad biológica de los receptores de gonadotrofinas.

El contenido lipídico del receptor de hCG soluble es probablemente muy pequeño a juzgar por la densidad relativamente alta de la molécula, aunque parece desempeñar un papel significativo en la unión hormonal.

Estudios analíticos del receptor libre y del complejo hormona-receptor, fueron dificiles, por el peso molecular relativamente elevado (37.000) del ligando y por la tendencia del receptor a absorberse a polimeros de carbohidratos incluyendo los filtros de celulosa, Sepharosa 6 B y Blue Dextran.

La asociación con Blue Dextran fue particularmente marcada y no fue reversible por aumento en las concentraciones salinas hasta niveles conocidos que provocan la disociación de otras moléculas de sus combinaciones con Blue Dextran (114, 115).

De los resultados obtenidos del análisis por filtración en gel y ultracentrifugación en gradientes, se refleja el comportamiento del receptor "soluble" como una molecula altamente asimétrica.

Los radios hidrodinámicos del receptor libre (6,5 S) y del complejo hormona-receptor (7,5 S) no presentaron diferencias detectables durante la filtracion por gel en columnas calibradas de Sepharosa 6 B, siendo en cada caso de 64 Å. Basandose en este criterio, ambas formas del receptor parecerían existir en solución como moléculas elongadas con

los respectivos pesos moleculares de 194.000 (libre) y 224.000 (complejo).

La principal pregunta acerca de la interpretación de estos valores y en particular el grado en que los detergentes puedan inducir configuraciones no presentes en la membrana organizada, debe ser considerada en relación con la considerable dificultad de solubilizar las proteinas de membrana por otros métodos.

No existe duda que la configuración del receptor solubilizado debe estar influenciada por la asociación con el detergente.

Asi el receptor testicular de gonadotrofinas y el hepático para insulina que han sido solubilizados mediante Triton X-100 (92) son comparables en forma y tamaño . Esto podría ser tambien cierto para otros receptores de membrana como el de acetil-colina (116).

De acuerdo a los estudios de ultracentrifugación en gradientes y al comportamiento en sistemas de filtración en geles, tales moléculas parecerían ser muy asimétricas en su forma. Alternativamente tambien podrian contener una proporción de carbohidratos tal que influyera en la desproporción observada entre el radio de Stokes relativamente elevado respecto de la constante de sedimentación respectiva.

La presencia de un componente glucoporteico en el receptor de

hCG, es sugerida por la interacción observada con la Concanavalina A. Esto podría contribuir a incrementar la densidad de la molécula del receptor que es relativamente alta a pesar de contener fosfolípidos, como lo indicarían los efectos de la digestión con fosfolipasas.

La eliminación de detergentes por diálisis ha provocado en algunos casos la agregación de los receptores "solubles" o su interconversión entre distintos tipos de formas (92, 117).

En el presente estudio, la diálisis del complejo hormona-receptor 7,5 S causa la conversión a una forma de 8,8 S. En este caso particular, que no ocurra adición ulterior es probablemente atribuible a la presencia de detergente residual que permanece unido al complejo hormona-receptor.

El complejo I^{125} hCG-receptor aislado de partículas premarcadas presenta un comportamiento diferente al observado en el receptor "aislado". En primer lugar, este complejo sedimenta a una constante de 8,8 S y se agrega reversiblemente cuando se lo dializa.

La demostración de actividad adenilato ciclasa activable de las hormonas en preparaciones de receptores "solubilizados" de músculo cardiaco (118, 119) podría sugerir una relación similar en los preparados de testículo.

Por esa razón nos hemos concentrado en la caracterización de las propiedades físicas de los sitios de ligadura de las gonadotrofinas como primera parte del análisis de los componentes requeridos para la respuesta hormonal. Esto es : receptores, adenilato ciclasa y el sistema que relaciona ambos componentes.

La presencia de formas múltiples del complejo hCG-receptor extraido de partículas de células intersticiales con diferentes detergentes podría atribuirse a dos mecanismos diferentes.

Primero, la naturaleza y estado de asociación del complejo receptor solubilizado de membranas celulares podría diferir de acuerdo al detergente empleado en la extracción; y segundo el grado de asociación entre los receptores y detergentes individuales podria estar sujeto a variaciones considerables.

Lo notable del presente estudio fue la reproducibilidad en que las diferentes formas del complejo receptor pudo ese extraido en las condiciones definidas para cada uno de los detergentes utilizados.

Como se ha hecho notar, la diferencia entre el receptor 6,5 S extraido de partículas testiculares con Triton X-100 y el complejo hormona-receptor 7,5 S formado por combinacion con I^{125}-hCG es atribuible a la unión de una molecula de gonadotrofina por cada molecula de proteina re-

ceptora. Las formas 8,8 S del complejo hormona-receptor fueron obtenidos ya sea por dialisis del complejo 7,5 S o por extracción con Triton X-100 de partículas previamente marcadas.

El aumento de la velocidad de sedimentación del complejo 7,5 S dializado podria deberse a la remoción de una significante proporcion de moléculas de detergente unidas al receptor con aumento correspondiente en la densidad del complejo soluble.

Las propiedades marcadamente hidrofílicas de la molécula glucoproteica hormonal altamente sialilada podría contribuir al mantenimiento de la forma soluble del complejo hromona-receptor después de la diálisis contra soluciones libres de detergentes.

Las propiedades de sedimentación del complejo 8,8 S extraido con Triton X-100 de partículas premarcadas pueden ser tambien consecuencia de un menor grado de unión del detergente. En este sentido es posible que la interacción hormona-receptor involucre regiones hidrofílicas del receptor que de esta forma quedarían menos accesibles a la subsiguiente unión con el detergente. Una reducción en la union del detergente podria resultar en una mayor densidad y un aumento de la velocidad de sedimentacion del complejo.

Sin embargo, la densidad del complejo soluble 8,8 S de partículas

premarcadas (1.277) no es mayor que la del complejo 7,5 S (1.289) y por lo tanto la disminución en la unión al detergente no puede invocarse para explicar la mayor velocidad de sedimentación de la forma 8,8 S. Persiste entonces, la posibilidad de que el complejo hormona-receptor pudiera ser extraído de partículas premarcadas como especies mas largas o menos asimétricas o conteniendo relativamente menos fosfolipidos que aquel extraido de partículas no marcadas.

Como no pudo hacerse una medición precisa del detergente unido a las minúsculas cantidades de receptor, tales especulaciones sobre la naturaleza del complejo 8,8 S seran de valor operacional hasta tanto sean desarrollados métodos mas directos para determinar la extensión y efectos de las interacciones detergente-receptor en las condiciones mencionadas.

La presencia de las formas 5 S y 7,5 S en las extracciones con Lubrol PX, Lubrol WX y deoxicolato de sodio, sugieren que estos detergentes pueden exhibir grados característicos de unión al complejo receptor siendo capaces de extraer formas menos asociadas,

Puesto que la densidad del complejo 5 S (1.315) de los extractos con Lubrol es mayor que la de la forma solubilizada con Triton (1.277) y la relación friccional es mayor (1,87), la menor velocidad de sedimentación en gradientes de sacarosa es probablemente causada por la extracción de for-

mas de receptor altamente asimétricas o de bajo peso molecular.

La forma 7,5 S extraida con Lubrol PX es analoga a la 8,8 S solubilizada con Trion X-100 y contendría presumiblemente una mayor cantidad de moléculas de detergente ligadas . Dicha forma de 7,5 S se convierte a la correspondiente de 8,8 S cuando se la dializa y equilibra con 0,1 % de Triton X-100.

El complejo 5 S extraido juntamente con el 7,5 S con soluciones de Lubrol P X es la única forma de complejo hormona -receptor solubilizado por Lubrol WX o desoxicolato de sodio. Esta forma (5 S), al menos la extraida con Lubrol WX, presenta una mayor desproporción entre el radio de Stokes (77 Å) y la constante de sedimentación (5 S), que las formas extraidas con Triton (a : 64 Å, S : 7,5 y 8.8). Esto no puede atribuirse a unión del detergente y la consecuente disminución de densidad de flotación ya que la densidad de la forma 5 S determinada por centrifugacion en gradientes isopícnicos es mayor que la correspondiente a la forma 8,8 S (1.375 vs. 1.277).

Debe hacerse notar que el ligando (hCG) unido al receptor es una glucoproteina altamente sialilada que presenta tambien un radio de Stokes (34 Å) mayor que el esperado de su constante de sedimentacion (2,0 S) y peso molecular (37.000). Esto es causado por el contenido relativamente

alto de carbohidratos de la molécula de hCG (30-33 % en peso de lo cual 1/3 corresponde a ácido siálico) y no a la unión con detergentes, desde que las propiedades físicas de la hormona no se alteran en presencia de concentraciones 0, 1 % de Triton X-100.

La densidad de hCG en gradientes de cloruro de cesio conteniendo 0, 1 % de Triton (1. 304) es muy cercana a la de los complejos hormona-receptor (7, 5 S, 1. 289, 8, 8 S, 1. 277) y en ninguno de los casos mencionados puede atribuirse a una unión considerable de detergente la marcada disparidad entre las velocidades de sedimentación y el radio hidrodinámico.

Por esta razón, la forma 5 S del complejo HCG-receptor podría representar una subunidad o bien una forma altamente asimétrica del jo 8, 8 S mientras que la diferencia entre las formas 7, 5 S y 8, 8 S es atribuible a cambios en la unión al detergente y la simetría de los complejos hormona-receptor.

El efecto de detergentes en las propiedades hidrodinámicas del receptor colinérgico del órgano eléctrico ha sido recientemente estudiado por Meunier y colaboradores (120) , quienes por medio de mediciones del volumen parcial específico (v), constante de sedimentación y radio de Stokes en presencia de Triton X-100 o deoxicolato de sodio indicaron que el comportamiento hidrodinámico fuera de lo comun de la proteina receptora, es

consecuencia de la disminución de densidad causada por la unión con el detergente y no de una asimetría molecular intrínseca.

En el caso del receptor colinérgico, la desproporción entre el radio hidrodinámico (73 Å) y la velocidad de sedimentación (12,5 S) fue menos marcada que la observada con el receptor soluble de gonadotrofinas y la unión con el detergente provee solamente de una explicación parcial del comportamiento hidrodinámico anómalo en este receptor.

La presencia de lípidos y carbohidratos en el receptor, la naturaleza glucoproteica del ligando y el grado de asimetría del receptor, probablemente contribuyan a la disparidad observada y se combinen para exagerar la aparente asimetría de la proteina receptora. La forma 5 S extraida con Lubrol WX presenta una aún mayor asimetría aparente (f/fo : 3,70) que la forma 8,8 S, no siendo su densidad (1.315) lo suficientemente desproporcionada para ser atribuida a interaccciones con el detergente.

Esta forma del complejo puede ser mas susceptible a la asociación durante la filtración por gel que durante la centrifugación en sacarosa, dando consecuentemente radios de Stokes mayores en proporcion con su velocidad de sedimentacion.

Los efectos del tratamiento enzimático sobre la sedimentacion y las propiedades de unión de los complejos hormona-receptor proveen tambien

de alguna indicación de la complejidad estructural de la molécula del receptor. Como ya se mencionó, la actividad ligadora del receptor es destruida por tripsina y se ve reducida después de la exposición de los recepceptores particulados y solubles (6,5 S) a la acción de la fosfolipasa A.

Por otra parte el tratamiento del receptor 7,5 S o su derivado dializado 8,8 S con fosfolipasas A y C presenta practicamente poco efecto a no ser por la aparición de agregados moleculares observada en gradientes de sacarosa de los preparados con fosfolipasa C.

Efectos comparables de la acción de ambas fosfolipasas fueron observados también después del tratamiento enzimático de partículas premarcadas o del receptor 8,8 S proveniente del la extracción de las mismas con Triton X-100. En ambos casos la fosfolipasa C produce la agregación del complejo extraido.

El tratamiento de partículas testiculares premarcadas con fosfolipasa A libera una considerable cantidad de la hormona ligada en la forma de agregados moleculares y hCG libre. En contraste, la fosfolipasa A parece no tener efecto sobre el complejo soluble 8,8 S. Aunque resultados variados no son simples de interpretar, la fosfolipasa A produce efectos mas pronunciados sobre los sitios de ligadura no ocupados del receptor de gonadotrofinas y en el receptor particulado no solubilizado que sobre los

complejos solubles o preformados.

Por otra parte, no se observó que la fosfolipasa C redujera o destruyera la actividad de unión, aunque frecuentemente pudo apreciarse la formación de conglomerados de los complejos solubles.

Por tal razón se propone que los fosfolípidos constituyen un componente importante del receptor y que la actividad de unión se encuentra fuertemente influenciada por una fracción fosfolipídica susceptible de ser hidrolizada por la fosfolipasa A. Como las moléculas de receptor no presentan las propiedades físicas características de lipoproteinas convencionales, es probable que el componente fosfolipídico constituya una pequeña proporción del complejo receptor siendo de importancia funcional considerable en la interacción entre la hormona y su sitio receptor.

Los resultados obtenidos con el receptor ovárico de hCG indican que las propiedades estructurales de los dos receptores gonadales son muy similares, como podría esperarse de la alta especificidad y sensibilidad de las células ováricas y testiculares a la estimulación por LH y hCG (121, 26).

Los receptores extraidos de ambos tejidos con Triton X-100 presentan una pérdida de su afinidad de unión, pero retienen su especificidad hormonal exhibiendo similaridades durante su caracterización físico-

química. La única diferencia significativa observada en los estudios realizados, fue el mayor radio hidrodinámico aparente del receptor ovárico (71 Å vs 64 Å) a pesar de poseer indénticas constantes de sedimentación (7,5 S).

Si bien fraccionamientos posteriores de los dos receptores gonadales, podrían revelar diferencias individuales entre los sitios de ligaduras específicos de cada tejido, los resultados actuales sugerirían que los receptores de gonadotrofinas extraidos con Triton X-100 tanto de testículo, como de ovario, presentan una configuración macromolecular similar.

BIBLIOGRAFIA

1) Hayes, W. en "The genetics of bacteria and their viruses". Second Edition, John Wiley and Sons, Nueva York 1970.

2) Avery, O. T.; C. M. Mc Leod y M. Mc Carty. J. Exptl. Med : 79, 137, 1944.

3) Lederberg, J.; E. M. Lederberg; M. D. Zinder y E. R. Lively. Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. : 16, 413, 1951.

4) Jacob, F y E. Wollmam en "Sexuality and the genetics of bacteria". Academic Press. Nueva York 1961.

5) Abercrombi, M. y J. E. M. Heaysman. Exptl. Cell. Res. : 6, 293, 1954.

6) Roth, S y D. White. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A. : 69, 485, 1972.

7) Sutherland, E. W. y T. W. Rall. Pharmacol. Rev. : 12, 265, 1960.

8) Cuatrecasas P. Ann. Rev. Biochem. : 43, 169, 1974.

9) Ariëns, E. J.; A. M. Simonis y J. M. Van Rossum. Mol. Pharmacol.: 1, 119, 1964.

10) Schimmer, B. P., K. Ueda y G. H. Sato, Biochem. Biophys. Res. Comm.: 32, 806, 1968.

11) Cuatrecasas, P. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. : 63, 450, 1969.

12) Lefkowitz, R., J. Roth y I. Pastan. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.: 65, 745, 1970.

13). Rodbell, M., H. M. J. Krans, Sol. Pohl y L. Birnbaumer. J. Biol. Chem : 246, 1861, 1971.

14) Cuatrecasas, P. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. : 68, 1264, 1971

15) Cuatrecasas, P. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. : 63, 450, 1969.

16) Lunenfeld, B., y A. Eshkol. Vitamins and Hormones 25, 137, 1967.

17) Espeland, D. H., F. Naftolin y C. A. Paulsen, en Rosemberg, E. (ed), Gonadotropins 1968, Geron X, California, 1968, pag. 177.

18) DeKretser, D. M., K. J. Catt, H. G. Burger, y G. C. Smith, J.Endocr. 43 : 105, 1969.

19) Castro, A. E., A. Alonso, y R. E. Mancini, J. Endocr. 52, 129,1972

20) DeKretser, D. M. K. J. Catt, M. L. Dufau y B. Hudson, J. Reprod. and Fertil., 24, 311, 1971.

21) DeKretser, D. M., K. J. Catt y C. A. Paulsen, Endocrinology : 88, 332, 1971.

22) Christensen, A. K., y N. R. Mason, Endocrinology 76, 646, 1965.

23) Hall, P., D. C. Irby, y D. M. DeKretser, Endocrinology 84, 488, 1969.

24) Dufau, M. L., K. J. Catt, y T. Tsuruhara, Biochim. Biophys. Acta 252, 574, 1971.

25) Catt, K. J., M. L. Dufau y T. Tsuruhara, Observaciones no publicadas.

26) Dufau, M. L., K. J. Catt, y T. Tsuruhara, Endocrinology 90 , 1032, 1972.

27) Dufau, M. L., K. Watanabe, y K. J. Catt, Endocrinology, 92, 6, 1973.

28) Catt, K. J., M. L. Dufau, y T. Tsuruhara, J. Clin. Endocr. 32, 860, 1971.

29) Catt, K. J , T. Tsuruhara y M. L. Dufau, Biochim. Biophys. Acta : 279, 194, 1972.

30) Catt, K. J., M. L. Dufau, y T. Tsuruhara, J. Clin. Endocr. : 34, 123, 1972.

31) Dufau, M. L., K. J. Catt, y T. Tsuruhara, Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 1022, 1971.

32) Lee, U. C., y R. J. Ryan, Endocrinology : 89, 1515, 1971.

33) Tsuruhara, T., E. Van Hall, M. L. Dufau, y K. J. Catt. Endocrinology : 91, 463, 1972.

34) Dufau, M. L., T. Tsuruhara, and K. J. Catt, Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2414, 1972.

35) Catt, K. J., M. L. Dufau y T. Tsuruhara, Colloquium on Glycoprotein Hormones, Paris, 1972, Ediciones INSERM, 1972, pag. 219.

36) Papkoff, H, M. R. Sairam y C. H. Li., J. Am. Chem. Soc : 93, 1531 1971.

37) Ward, D. N. y W. K. Liu en "Structure activity relationships of proteins and polypeptide hormones" M. Margoulies y F. C. Greenwood (ed) 1971. pag 80. Amsterdam. Excerpta Medica.

38) Maghuin-Rogister, G. C. y G. P. Hennen. Eur. J. Biochem : 21, 489, 1971.

39) Liao, T. H. y J. C. Pierce. J. Biol. Chem. : 246, 850, 1971.

40) Bahl, O. P. en "Structure activity relationships of proteins and polypeptide hormones". M. Margoulies y FC. Greenwood (ed). 1971 pag 99, Amsterdam, Excerpta Medica.

41) Canfield, R. E., F. J. Morgan, S. Kammerman, J. J. Bell y G. M. Agosto. Recent. Progr. Horm. Res. : 27, 121, 1971.

42) Butt, N. R. en "Karolinska Symp. Res. Methods Reprod. Endocrinol" E. Diczfalusy (ed) 1969 pag. 13. Copenhagen. Periodica.

43) Ryan, R. J., N. Jiorg y S. Handlon. Recent Prog. Horm. Res : 26, 105; 1970.

44) Swaminathan, N. y O. P. Bahl Biochem. Biophys. Res. Comm : 40, 422, 1971.

45) Bahl., O. P., J. Biol. Chem. : 244, 575, 1969.

46) Schuurs, A. H. W., E. de Jager, y J. D. H. Homan, Acta Endocrinol. 59, 120, 1968,

47) Van Hall, E. V., J. L. Vaitukaitis, G. T. Ross, J. W. Hickman, y G. Ashwell, Endocrinology : 88, 456, 1971.

48) Morell, A. G., R. A. Irvina, I. Steinleib., I. H. Sheinberg, y G. Ashwell, J. Biol. Chem. : 243, 155, 1968,

49) Van Hall, E. V., J. L. Vaitukaitis, G. T. Ross, J. W. Hickman, y G. Ashwell, Endocrinology, 89, 11, 1971.

50) Braunstein, G. D., L. E. Reichert, E. V. Van Hall, J. L. Vaitukaitis y G. T. Ross, Biochem. Biophys. Res. Comm. : 42, 962, 1971.

51) Tsuruhara, T., M. L. Dufau, J. W. Hickman, y K. J. Catt, Endocrinology : 91, 296, 1972.

52) Papkoff, H., Excerpta Medica Int. Congr. Ser. : 241, 73, 1971.

53) Ward, D. N, y W. K. Liu, Excerpta Medica Int. Congr. Ser. : 241, 80, 1971.

54) Pierce, J. G., T. H. Liao, J. S. Cornell, and R. B. Carlsen, Excerpta Medica Int. Congr. Ser. : 241, 91, 1971.

55) Morgan, F. J. y R. E. Canfield ; Endocrinology : 88, 1045, 1971.

56) Pierce, J. G., O. P. Bahl, J. S. Cornell y N., Swaminathan, J. Biol. Chem. : 246, 2321, 1971.

57) Papkoff, H. y M. Ekblad, Biochem Biophys Res Comm : 40, 614, 1970

58) Haynes, R. C., E. W. Sutherland y T. W. Rall, Recent Progr, Hormone Res. : 16, 121, 1960.

59) Grahame-Smith, D. G., R. W. Butcher, R. L. Ney y E. W. Sutherland J. Biol. Chem. : 242, 5535, 1967,

60) Marsh, J. M. y K. Savard, J. Biol. Chem. : 239, 1, 1964.

61) Marsh, J. M., R. W. Bucher, K. Savard y E. W. Sutherland, J. Biol. Chem. : 241, 5436.

62) Sandler, R. y P. F. Hall, Biochem Biophys. Acta. : 164, 445, 1968.

63) Connell, J. M. y K. B. Eik-Nes, Steroids : 12, 507, 1968.

64) Murad, F., B. S. Strauch y M. Vaughan, Biochim. Biophys Acta. : 177, 591, 1969.

65) Kuehl, F. A., D. J. Panatelli, J. Tarnoff y J. L. Humes, Biology of Reproduction : 2, 154, 1970.

66) Catt, K. J., K. Watanabe y M. L. Dufau, Nature : 239, 280, 1972.

67) Reisfeld, R. A. y R. Hertz, Biochem. Biophys. Acta : 43, 155, 1968.

68) Van Hell, H., Matthijsen, R., y J. D. Homan, Acta Endocrinol.(Kbh) 59, 89, 1968.

69) Erlanger, B, F. Borek, S. Beiser y S. Lieberman. J. Biol. Chem. : 228, 713, 1957.

70) Goodfriend, T., G. Fasman, D. Kemp, y L. Levine. Immunochemistry : 3, 223, 1966.

71) Kuo, J. F. y E. C. De Renzo , J. Biol Chem. : 244, 2252, 1969.

72) Krishna, G., B. Weiss, y B. B. Brodie, J. Pharmacol. Exp. Ther. : 163, 379, 1968.

73) Berg, G. R. y D. C. Klein, Endocrinology : 89, 453, 1971.

74) Steiner, A. L., D. M. Kipnis, R. Utiger, y C. Parker, Proc. Natl. Acad. Sci. U, S. A. : 64, 367, 1969.

75) Axen, R., J. Porath y S. Ernback, Nature : 214, 1302, 1967.

76) Cuatrecasas, P., M. Wilchekc y C. B. Anfinsen, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. : 61, 636, 1968.

77) Catt, K. J., Acta Endocrinol. (Kbh) 63. Suppl. 142, 222, 1969.

78) Thorell, J. I. y B. G. Johansoon en "Structure Activity relationships of Proteins and Polypeptide Hormones". M. Margoulies y F. C. Greenwood (ed) 1971. Excerpta Medica. Amsterdam

79) Yang, K. P., y D. N. Ward, Endocrinology : 91, 317, 1972.

80) Pierce, J. G., T. H. Lia, S. M. Howard, B. Shome, y J. S. Cornell, Recent. Prog. Hormone Res. 271, 165, 1971.

81) Mc Arthur, J. W., Endocrinology : 50, 304, 1952.

82) Parlow, A. F., En Human Pituitrry Gonadotropins, Albert, A. (ed) Charles C. Thomas Publishers, Springfield, Ill, 1961, pag. 300.

83) Martin, R. G. and B. N. Ames, J. Biol Chem., :236, 1372, 1961.

84) Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr y R. J. Randall. J. Biol. Chem : 193, 265, 1951.

85) Warren, L. J., J. Biol. Chem. : 234, 1971, 1959.

86) Finch, P. R., R. Yuen, H., Schacter, y Moscarello M. A., Anal. Biochem 31, 296, 1969.

87) Lin, S. Y. y T. L. Goodfriend Am. J. Physiol. : 218, 1319, 1970.

88) Tomasi, V., S. Koretz, T. K. Ray, R. J. Dunnick a G. V. Marinetti, Biochim. Biophys. Acta : 221, 31, 1970.

89) Hofmann, D., W. Wingenda y F. M. Finn, Proc. Nat. Acad. Sci. : 67, 829, 1970.

90) Freychet, P., J. Roth y D. M. Neville. Biochem. Biophys. Res. Commun. : 43, 400, 1971/

91) Levey J., J. Biol Chem. : 246, 7405, 1971.

92) Cuatrecasas, P., J. Biol Chem. : 247, 1980, 1972.

93) Scatchard, G. Ann. N. Y. Acad. Sci. : 51, 660, 1949.

94) Laurent, T. C. y J. Killander, J. Chromatog. : 14, 317, 1964.

95) Siegel, L. M. y K. J. Monti, Biochem. Biophys. Acta : 112, 346, 1966.

96) Tanford, C. en Physical Chemistry of Macromolecules. pag. 356. John Wiley and Sons Inc. New York. 1961

97) Kushner, L. M. y W. C. Hubbard J. Phys. Chem. : 58, 1163, 1954.

98) Bahl, O. P., R. B. Carlsen, y R. Belisario, Proc of the Fourth International Congress of Endocrinology. Excerpta Medica (1971).

99) Schachman, H. K., en "Ultracentrifugation in Biochemistry" pag. 239. Academic Press. New York 1959.

100) Lefkowitz, R. J. , J. Roth y I. Pastan. Ann. N. Y. Acad. Sci. : 185, 195, 1971.

101) Cuatrecasas, P., J. Biol. Chem. 246 : 7265, 1971.

102) Cuatrecasas, P., B. Desbuquois y F. Krug, Biochem. Biophys. Res. Comm. : 44, 333, 1971.

103) Stephenson, R. P., British Jour. Pharm., : 11, 379, 1956.

104) Hechter, O. y T. Brown en "Structure Activity relationships of Proteins and Polypeptide Hormones." M. Margoulies y F. C. Greenwood (ed) 1971. Excerpta Medica. Amsterdam.

105) Robinson, G. A., R. W. Butcher and E. W. Sutherland, Am. Rev. Biochem.: 37, 149, 1968,

106) Sayers, G., R. M. Ma y N Giordano, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136, 619, 1972

107) Carchman, R. A., S. D. Jaanus y R. P. Rubin, Molecular Pharmacology : 7, 491, 1971.

109) Mackie C., M. C. Richarson and Schultester. F. E. B. S. Letters : 23, 345, 1972.

110) Catt, K. J., M. L. Dufau y T. Tsuruhara, J. Clin. Endo. 36, 73, 1973.

111) Barr, W. A. y J. G. Collee, J. Endocrinol. : 38, 395, 1967.

112) Mori, K. F. Endocrinology : 86, 97, 1970.

113) Cuatrecasas, P., J. Biol Chem. : 246, 6532, 1971.

114) Swart, A. C. W. y H. C. Hemker, Biochim Biophys. Acta : 222, 692 1970.

115) Staall, G. E., J. F. Loster, H. Kamp, L. Milligen-Boersma y C. Veerger. Biochim. Biophys. Acta : 227, 86, 1971.

116) Meunier, J. C., R. W. Olsen, A. Menez, P. Fromageot, P. Bouquet y P. M. Changeaux. Biochemistry : 11, 1200, 1972.

117) Miledi, R., P. Molinoff y L. T. Potter, Nature, 229 : 554, 1971.

118) Lefkowitz, R. J. y S. Levey, Life Science : 11, 821, 1972

119) Levey, G., Biochem. Biophys. Res. Comm. : 38, 86, 1970.

120) Meunier, J. C., R. S. Olsen y J. P. Changeaux. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. : 24, 63, 1972.

121) Gospodarowicz D. Endocrinology : 89, 571, 1971,

122) Rodbell, M., H. M. Krans, S. L. Pohl y L. Birnbaumer, J. Biol. Chem. 246, 1872, 1971.