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

Adenilil ciclasas dependientes de Mn++ : Purificación y propiedades

Kornblihtt, Alberto Rodolfo

1980

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

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

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

Cita tipo APA:
Kornblihtt, Alberto Rodolfo. (1980). Adenilil ciclasas dependientes de Mn++ : Purificación y propiedades. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1735_Kornblihtt.pdf

Cita tipo Chicago:
Kornblihtt, Alberto Rodolfo. "Adenilil ciclasas dependientes de Mn++ : Purificación y propiedades". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1735_Kornblihtt.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

"ADENILIL CICLASAS DEPENDIENTES DE Mn^{++} : PURIFICACION Y PROPIEDADES"

AUTOR: Alberto Rodolfo Kornblihtt

DIRECTOR: Dr. Héctor Norberto Torres

LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas,
Fundación Campomar

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

AÑO 1980

1735

A Etel

y Juan

AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis doctoral marca una etapa muy importante de la formación de un científico. En ella se encuentran reunidos los frutos de muchas horas de trabajo, estudio y discusión; horas vividas intensamente, tanto en la alegría del experimento exitoso como en la desilusión ante el resultado malogrado; horas de camaradería y humor y, por qué no, de ansiedad y nerviosismo. He tenido la suerte de recorrer este camino en el Instituto "Campomar", y quiero expresar mi agradecimiento a quienes me acompañaron en estos años;

Al Dr. Héctor N. Torres, por sus enseñanzas, la generosa transmisión de su experiencia y por haberme inculcado una actitud abierta hacia "lo nuevo" tanto en el terreno de las ideas como de la metodología experimental.

A la Dra. Mirtha M. Flawiá, por su ayuda y empuje ininterrumpidos. La mayor parte de los experimentos de esta tesis fueron realizados en conjunto con ella y fueron posibles gracias a su vasto conocimiento en el campo de la adenilil ciclasa.

Al Dr. Luis F. Leloir y a los miembros del Consejo Directivo de la Fundación Campomar por haberme permitido llevar a cabo este trabajo en el Instituto.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pro-

vincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina por haberme acordado sendas becas que posibilitaron realizar mi tarea en los últimos tres años.

A mis compañeros y amigos María Teresa Téllez de Iñón, Gerardo Glikin, Norberto Judewicz, y Diego de Mendoza por ser protagonistas de las horas mencionadas.

A Mary B. de Iozzolino, Beile Wolf y Norberto Malarini por la ayuda brindada desde el área administrativa.

A Margarita Mazzardi, Soledad de Giménez y Francisco Irusta por la esmerada asistencia técnica proporcionada.

Por último, deseo expresar mi reconocimiento a la Prof. Rosa Guaglianone por haber despertado en mí la vocación científica y a la Dra. Ana María Brunengo por sus consejos y contribución a mi formación universitaria.

INDICE

INTRODUCCION

I. CONSIDERACIONES GENERALES 1

II. PROPIEDADES GENERALES DE LAS ADENILIL CICLASAS 5

II. 1 Localización 5

II. 2 Papel de los grupos sulfhidrilo y de los puentes disulfuro 7

II. 3 Efecto del ión fluoruro 7

II. 4 Regulación por hormonas 9

II. 5 Regulación por GTP 13

II. 6 Activación por la toxina del cólera 15

II. 7 Componentes proteicos del sistema de adenilil ciclasa sensible a hormonas 17

II. 8 Acoplamiento entre el receptor hormonal y la adenilil ciclasa 23

III. EL PAPEL BIOLOGICO DEL AMP CICLICO EN EL CONTROL DEL METABOLISMO EN EUCARIOTES 28

IV. EL AMP CICLICO Y LA FUNCION TESTICULAR 39

V. LA ADENILIL CICLASA DE TUBULOS SEMINIFEROS 49

VI. LAS HORMONAS TIROIDEAS 55

VI. 1 Estructura química y efectos biológicos 55

VI. 2 Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas a nivel molecular 62

VI. 3 Hormonas tiroideas y AMP cíclico 68

VII. LA ADENILIL CICLASA DE NEUROSPORA CRASSA. 74

VII. 1 Neurospora crassa 74

VII. 2 Metabolismo del glucógeno en Neurospora crassa 77

VII. 3 La adenilil ciclasa de Neurospora crassa 78

VII. 4 Papel del AMP cíclico en la diferenciación de Neurospora crassa. 79

MATERIALES Y METODOS

I. PREPARACION DEL SUSTRATO RADIOACTIVO DE LA ADENILIL CICLASA: [α^{32}P] ATP 83

I.1 Procedimiento descripto por Flawiá y Torres 84

I.2 Procedimiento descripto por Reeve y Huang 87

II. OBTENCION Y PURIFICACION DE LAS PREPARACIONES ENZIMATICAS 90

II.1 Testículo de rata 90

II. 1.1 Cromatografía en columna de DEAE-celulosa 91

II. 1.2 Fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía en Bio Gel A 0,5 m 92

II. 1.3 Enfoques isoeléctricos en columna 93

II. 1.4 Cromatografía en columna de hidroxil-apatita 96

II.2 Neurospora crassa 97

II. 2.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo 97

II. 2.2 Homogeneización del micelio 97

II. 2.3 Cromatografía en columna de DEAE-celulosa 98

II. 2.4 Precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en Bio Gel A 5m 98

II. 2.5 Enfoque isoeléctrico en capa de Sephadex 99

III. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS ADENILIL CICLASAS 100

III.1 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa 100

III.2 Filtración en geles de agarosa (Bio-Gel) 101

IV. CALCULO DE LOS PARAMETROS HIDRODINAMICOS Y MOLECULARES 102

IV. 1 Volumen específico parcial 102

IV. 2 Radio de Stokes 105

IV. 3 Peso molecular 105

IV. 4 Cociente friccional 105

IV. 5 Parámetros de las proteínas marcadoras 106

V. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA 106

V.1 Sistema desnaturalizante con SDS 106

V.2 Sistema no desnaturalizante 108

VI. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA 108

VII. DETERMINACION DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMP CICLICO EN TUBULOS SEMINIFEROS 110

VII.1 Tratamiento de las muestras de tejido para el ensayo de AMP cíclico 110

VII.2 Ensayo del contenido de AMP cíclico en las muestras 112

VIII. ENSAYO DE UNION ("BINDING") DE $[^{125}I]$ TRIIODOTIRONINA A RECEPTORES 112

IX. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS 114

IX.1 Determinación de proteínas 114

IX.2 Determinación de DNA 114

IX.3 Determinación de la posición de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Bio-Gel 114

IX.4 Determinaciones varias 115

X. REACTIVOS UTILIZADOS 115

RESULTADOS Y DISCUSION

I. PURIFICACION Y DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES DE LAS ADENILIL CICLASA DE TUBULOS SEMINIFEROS 117

I.1 Cromatografía en DEAE-celulosa 117

I.2 Precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en Bio-Gel A 0,5m 119

I.3 Enfoques isoeléctricos 121

I.4 Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la adenilil ciclasa 133

I.4.1 Filtración en gel 133

I.4.2 Ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa 135

I.5 Discusión 138

II. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA ASOCIADA A TUBULOS SEMINIFEROS POR L-T_3 146

II.1 Efecto de la L-T_3 sobre la actividad de ciclasa de diferentes tejidos 146

II.2 Localización de la actividad de ciclasa inhibible por L-T_3 en testículo 148

II.3 Características de la inhibición por L-T_3 150

II.3.1 Cinética 150

II.3.2 Dependencia del pH 154

II.3.3 Reversibilidad de la inhibición 154

II.3.4 Relación entre la actividad enzimática y la concentración de hormona 157

II.3.5 Influencia de compuestos estructuralmente relacionados con la L-T_3 sobre la actividad de la adenilil ciclasa 160

II.3.6 Factores que modifican la actividad de adenilil ciclasa y su respuesta in vitro a la L-T_3 164

II.4 Disminución de los niveles intracelulares de AMP cíclico en testículo de rata por la L-T_3 169

II.4.1 Captación de [^{125}I] L-triiodotironina por trozos de testículo de rata 169

II.4.2 Influencia de la L-T_3 sobre los niveles de AMP cíclico de trozos de testículo decapsulados. Dependencia del tiempo de incubación 172

II.4.3 Variación de los niveles de AMP cíclico en función de la concentración de L-T_3 172

II.5 Asociación de la actividad de adenilil ciclasa a una actividad de unión (binding) de [^{125}I] L-T_3 176

II.5.1 Actividad de unión de L-T_3 en función del tiempo de incubación 177

II.5.2 Reversibilidad de la unión de [^{125}I] L-T_3 179

II.5.3 Asociación entre las actividades de adenilil ciclasa y de unión de [^{125}I] L-T_3 181

II.5.4 Constantes de disociación y capacidad de unión 184

II.5.5 Aislamiento de complejos enzimáticos conteniendo [^{125}I] L-T_3 unida 188

II.5.6 Efecto de compuestos análogos a la L-T_3 sobre la unión de [^{125}I] L-T_3 190

II.6 Discusión 191

III. COMPARACION ENTRE ALGUNAS PROPIEDADES DE LAS ADENILIL CICLASAS SOLUBLE DE TUBULOS SEMINIFEROS Y DE MEMBRANAS DE ESPERMATOZOIDES 196

III.1 Efecto de la L-T_3 sobre la actividad de la adenilil ciclasa de espermatozoides 197

III.2 Dependencia de la concentración de sustrato 200

III.3 Solubilización de la adenilil ciclasa de espermatozoides por tratamiento con detergentes 200

III.4 Discusión 203

IV. PURIFICACION PARCIAL Y PROPIEDADES DE LA ADENILIL CICLASA SOLUBLE DE NEUROSPORA CRASSA 209

ABREVIATURAS

ABP	Proteína ligadora de andrógenos
ACTH	Adrenocorticotrofina hipofisaria
ADP	5' Adenosina difosfato
3'AMP	3' Adenosina monofosfato
5' AMP	5' Adenosina monofosfato
AMP cíclico o AMPc	3', 5' Adenosina monofosfato cíclico
ATP	5' Adenosina trifosfato
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
cpm	Cuentas por minuto
DEAE	Dietilaminoetil
DIT	Diiodotirosina
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetracetato
EGTA	Etilenglicol-bis-(β aminoetileter)-N, N' tetracetato
FSH	Hormona folículoestimulante
GDP	5' Guanosina difosfato
GMP	5' Guanosina monofosfato
GMPc	3', 5' Guanosina monofosfato cíclico
GMPP(NH)P o GPP(NH)P	5' Guanililimidodifosfato
GTP	5' Guanosina trifosfato
hCG	Gonadotrofina coriónica humana

INTRODUCCION

I. CONSIDERACIONES GENERALES

El término hormona fue propuesto originalmente por el fisiólogo inglés E. H. Starling en 1905, y se definió como "cualquier sustancia producida normalmente por las células de alguna parte del organismo y transportada por el torrente sanguíneo a partes distantes, a las que afecta para beneficio de dicho organismo como conjunto". A esta definición clásica habría que agregar: "las hormonas intervienen en la regulación y coordinación de las actividades celulares, siendo eficaces en concentraciones muy bajas". Estos conceptos pueden parecer vagos y generales, y muy lejanos de aquellos que hoy nos explican el mecanismo de acción de las hormonas a nivel molecular. Sin embargo, ellos encierran ya la "idea molecular" de que la hormona es una señal del medio extracelular que de alguna manera debe ser transducida bajo la forma de un mensaje intracelular. Por otra parte, el hecho de afirmar que las hormonas son eficaces a bajas concentraciones implica la necesidad de un sistema de amplificación por el cual la señal extracelular produzca un cambio metabólico, generador a su vez de un cambio macroscópico detectable por los ojos del fisiólogo.

Se puede decir que la Endocrinología Molecular se ocupa de dilucidar las relaciones entre la señal externa, el mensajero interno y el sistema de amplificación. El nacimiento de esta

disciplina se ubica en 1957 cuando Sutherland y Rall (1,2) descubrieron un compuesto termo-estable cuya formación era catalizada por fracciones particuladas de hígado incubadas con ATP, iones Mg^{++} y glucagón o adrenalina. Dicho compuesto, requerido para la activación de la fosforilasa hepática, resultó ser el 3', 5' Adenosina monofosfato cíclico, llamado comúnmente AMP cíclico.

En el esquema propuesto por Sutherland, el AMP cíclico (figura 1) es el mensajero intracelular o segundo mensajero, mientras que la hormona representa a la señal externa o primer mensajero. La presencia del primer mensajero modificaría la con-

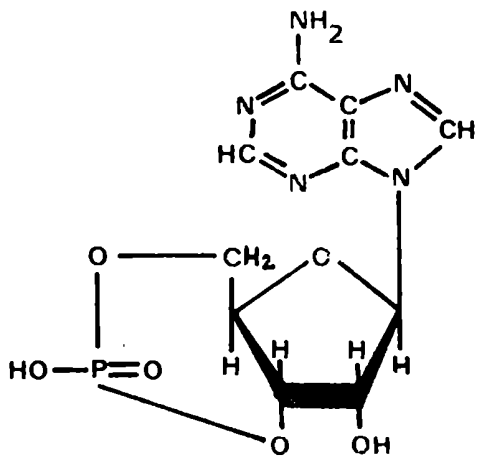


Figura 1:- Estructura de la molécula de AMP cíclico.

centración interna del segundo mensajero. La mayoría de las hormonas, y en especial las polipeptídicas por su gran tamaño, serían incapaces de atravesar la barrera constituida por la membrana plasmática. ¿Cómo logra entonces la señal externa modificar la cantidad de una sustancia que se encuentra en el interior de la célula? Es lógico suponer, y así ocurrió, que en el transcurso de la

Evolución se hayan seleccionado en la superficie celular moléculas capaces de reconocer específicamente a las diferentes hormonas por complementaridad estérica, y de tomar contacto con el sistema interno encargado de producir y/o degradar al AMP cíclico. Dichas moléculas son los llamados receptores hormonales. En la figura 2 se esquematiza simplemente el modelo de los dos mensajeros.

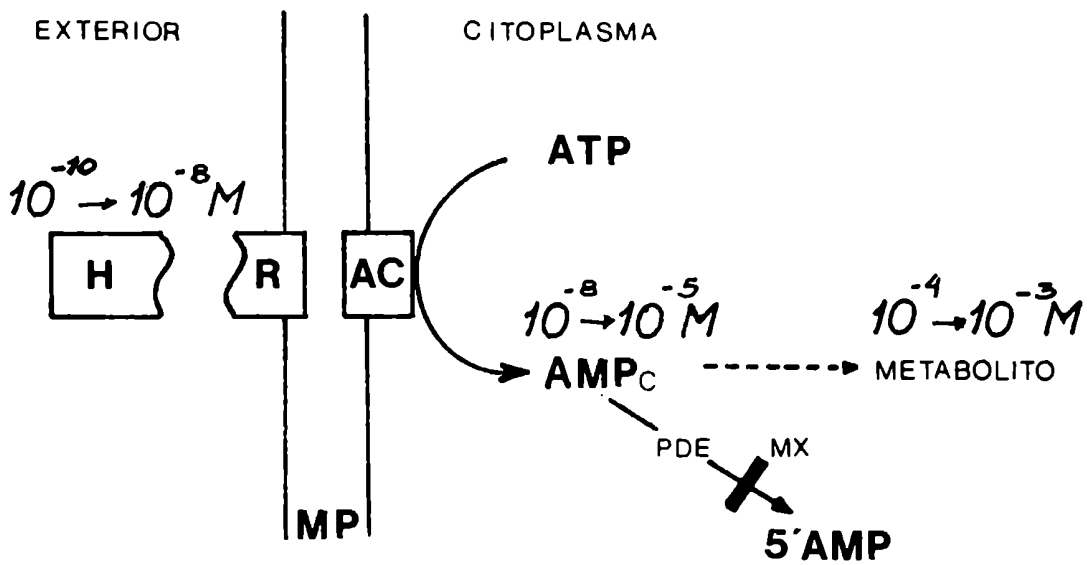


Figura 2:- Modelo de los dos mensajeros.
H = hormona; R = receptor; MP = membrana plasmática;
AC = adenilil ciclasa; PDE = fosfodiesterasa de AMPcíclico;
MX = metilxantinas.

En este esquema, cuando una hormona (por ejemplo el glucagón) aumenta su concentración extracelular de 10^{-10} a 10^{-8} M, interactúa con el receptor ubicado en la superficie externa de la membrana plasmática.

El receptor ligado a la hormona es entonces capaz de

interaccionar con la enzima responsable de sintetizar al AMP cíclico a partir del ATP, llamada adenilil ciclasa, y que se encuentra en la cara interna de la membrana celular. De esta manera, el AMP cíclico aumenta su concentración de 10^{-8} a 10^{-5} M y provoca un cambio metabólico (el modo de acción del AMP cíclico se verá más adelante) con alteración de la concentración de metabolitos. Por ejemplo en el caso de la glucosa 6 fosfato, ésta puede aumentar su concentración de 10^{-4} a 10^{-3} M, lo que implica una amplificación de la señal del orden de diez millones de veces. El AMP cíclico sintetizado puede a su vez ser degradado por la enzima fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, con producción de 5' AMP, siendo esta reacción inhibida por las metilxantinas.

El esquema descripto en la figura 2 ha demostrado ser universal para todas aquellas hormonas que actúan vía AMP cíclico (cabe recordar que existen hormonas como las esteroideas, por ejemplo, cuyo mecanismo de acción no involucra al AMP cíclico).

El objeto central de este trabajo de tesis es la caracterización y purificación de dos actividades de adenilil ciclasa dependientes de Mn^{++} encontradas en las fracciones citosólicas de testículo de rata y del hongo Neurospora crassa.

II. PROPIEDADES GENERALES DE LAS ADENILIL CICLASAS

La adenilil ciclasa (ATP pyrophosphate-lyase (cyclizing) E.C. 4.6.1.1.) es la enzima responsable de la síntesis del AMP cíclico según la reacción :

$$ATP \xrightarrow{Me^{2+}} \text{AMPcíclico} + PPi$$

Los sustratos de esta reacción pueden ser los complejos Mg ATP^{2-} o Mn ATP^{2-} actuando los cationes divalentes Mn^{++} o Mg^{++} como activadores de la misma. En el caso de algunas ciclasas como la de Neurospora (3) y la de testículo (ver resultados) la dependencia de Mn^{++} es casi absoluta. Si bien la concentración intracelular de Mn^{++} sería diez veces menor que la de Mg^{++}, la afinidad del ATP por el primero es mayor que por el segundo, lo que podría explicar que la enzima pueda actuar in vivo con ambos cationes.

II. 1 Localización

En todas las células eucariotes estudiadas las adenilil ciclasas son enzimas unidas a membrana, que se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática. Hasta el momento la excepción a esta regla la constituye la ciclasa de los túbulos seminíferos que tiene localización citoplásmica (4,5). Dejando de lado esta excepción, se puede considerar a la adenilil ciclasa como un buen marcador de membrana plasmática. Esto fue demostrado primeramente por Davoren y Sutherland (6) quienes vieron que la

adenilil ciclasa de "fantasmas" de eritrocitos sedimenta con una fracción de 600 x g, que no tiene localización predominantemente mitocondrial y que puede ser separada de contaminantes nucleares por centrifugación a través de soluciones de glicerol al 20%. La demostración definitiva y final de la asociación de la enzima a la membrana celular fue hecha por Rodbell y colaboradores (7) que establecieron la presencia de la ciclasa sensible a glucagón en preparaciones muy puras de membranas plasmáticas de hepatocitos obtenidas según el procedimiento de Neville (8).

Existen trabajos en los que se demuestra actividad de adenilil ciclasa en otras organelas subcelulares como ser microsomas (9), núcleos (10,11) y retículo sarcoplasmático (12). Sin embargo, en ninguno de estos casos existirían evidencias convincentes que indiquen que las bajas actividades detectadas no correspondan a contaminaciones de las fracciones con membranas plasmáticas (13).

Para estudiar las características moleculares de las adenilil ciclasas unidas a membrana mediante los métodos de la química de las proteínas, es necesario remover a la enzima de su entorno fosfolipídico. Numerosos trabajos describieron el uso de detergentes para solubilizar a la adenilil ciclasa. Levey (14) utilizó el Lubrol PX en la preparación de una adenilil ciclasa soluble de miocardio y determinó su peso molecular aparente (200.000 Dalton) por filtración en gel Sephadex. Esta filtración

es precedida por una cromatografía en DEAE - celulosa, necesaria para la eliminación de la mayor parte del detergente. Storm y Ryan (15) han logrado obtener una ciclasa solubilizada de membranas de hígado con Tritón X-305 (un detergente más hidrofóbico que el Tritón X-100) que preserva su capacidad de respuesta al glucagón y a la adrenalina. Experimentos realizados en nuestro laboratorio (Dr. Torres, comunicación personal) con una variedad de detergentes iónicos y no iónicos llevaron a la selección del BRIJ-58 para la solubilización de la adenilil ciclasa de Neurospora crassa.

II. 2 Papel de los grupos sulfhidrilo y de los puentes disulfuro.

Reactivos que interaccionan con grupos sulfhidrilo como el p-cloro-mercuribenzoato (PCMB) y la N-etil-maleimida (NEM) son capaces de inactivara la adenilil ciclasa de hígado. Mientras el efecto de NEM es irreversible, el de PCMB puede ser parcialmente revertido (50%) por reactivos como el ditiotreitol (DTT) o el mercaptoetanol (MSH) (13). Por otra parte, el tratamiento de membranas durante 5 minutos con mercaptoetanol a una concentración de 10 mM provoca una pérdida del 50% de la actividad de ciclasa (13) sugiriendo que además de un grupo -SH (sensible a PCMB) parece crítica la presencia de puentes -S-S- (sensibles al MSH).

II. 3 Efecto del ión fluoruro.

Con excepción de las ciclasas dependientes de Mn^{++}, todas las ciclasas eucarióticas descriptas son estimuladas por el ión fluoruro. Se conoce muy poco acerca del modo de acción del fluoruro, pero se sabe que su capacidad de activar la síntesis de AMPc *in vitro* a partir de ATP no es debido al conocido efecto inhibitorio del F^- sobre la ATPasa (ATP phosphohydrolase E.C. 3. 6.1.3.). Existen numerosas diferencias entre el proceso a través del cual el F^- activa a la ciclasa y la activación hormonal de la misma : 1) la activación por F^- no depende de la presencia de la adenilil ciclasa en la membrana ya que ciclasas solubilizadas por detergentes que han perdido su capacidad de respuesta a hormonas, conservan su sensibilidad al F^- (14-16); 2) la concentración de F^- que proporciona la mitad de la estimulación máxima varía con la temperatura (17) mientras que la de las hormonas no; 3) las curvas del efecto versus la concentración de F^- son sigmoideas mientras que las de las hormonas no.

El efecto del F^- fue primeramente descripto por Sutherland *et al.*,(18) y se vió que requiere la presencia de un catión divalente para manifestarse y que es poco reversible. Además de su efecto estimulatorio directo sobre la adenilil ciclasa, el F^- es capaz de inhibir a las ciclasas estimuladas por hormonas. Esto lo comprobaron Harwood y Rodbell (19) quienes encontraron que el F^- inhibe la acción estimulatoria de la adrenalina o el ACTH a

temperaturas por debajo de 30ºC. Por otro lado, Manganiello y Vaugham (20-22), trabajando con la adenilil ciclasa de células del panículo adiposo epididimal de rata, demostraron que la actividad estimuladora del F^- a una concentración de 5,3 mM puede ser totalmente anulada por pirofosfato 1,5 mM, mientras que el PPi no afecta a la inhibición por F^- 5,3 mM de la estimulación de la ciclasa por isoproterenol. Esto indicaría que los efectos estimulatorio directo e inhibitorio de la estimulación hormonal son eventos independientes causados por el F^-. Los mismos autores también demostraron que era posible inhibir con F^- 5,33 mM en la mezcla de incubación, a la adenilil ciclasa activada en una preincubación con F^- a una concentración de 5 mM. Este último experimento confirma la independencia de los efectos.

Durante mucho tiempo se pensó que el fluoruro estimulaba al máximo a la adenilil ciclasa y por lo tanto la actividad estimulada por F^- podía ser considerada como un buen índice de la concentración en enzima. Sin embargo, Rodbell y colaboradores (23) mostraron que el GMP-P(NH)P, un análogo del GTP con el enlace entre los fosfatos β y γ no hidrolizable, era capaz de aumentar la actividad de adenilil ciclasa a niveles muy por encima de los alcanzados con F^-.

II. 4 Regulación por hormonas.

Numerosas hormonas modifican la actividad de adenilil ciclasa en varios tejidos: la mayoría de ellas ejercen un efecto activador mientras que la insulina (24-27) ejerce un efecto inhibidor.

El hecho de que hormonas muy diferentes tengan como fin incrementar los niveles intracelulares de AMP cíclico, lo cual a su vez altera el metabolismo celular, parecería un efecto no específico sino fuera por la existencia de receptores hormonales que discriminan entre las hormonas circulantes y aseguran el acoplamiento con la adenilil ciclasa.

En la Tabla 1 se describen las principales hormonas que modifican la actividad de la adenilil ciclasa, el tejido en el que actúan y la respuesta biológica que producen.

Sutherland y sus colaboradores sugirieron originalmente cuatro criterios que debían cumplirse para asegurar que un determinado efecto hormonal es mediado por el AMP cíclico. Estos son:

1) - La hormona debe estimular a la adenilil ciclasa en extractos libres de células.
2) - Niveles fisiológicos de la hormona deben producir un incremento en los niveles de AMP cíclico que ocurra antes de, o concomitantemente con la respuesta fisiológica.
3) - Las metil xantinas (teofilina, cafeína, aminofilina) deben potenciar el efecto de la hormona. Esto se debe a que las

metil xantinas son potentes inhibidores de la fosfodiesterasa de AMP cíclico (3': 5'-Cyclic. AMP 5' nucleótido hydrolase E.C. 3.1.4.17).

4) - El agregado de AMP cíclico exógeno o de sus análogos debe imitar el efecto de la hormona.

Fain y Butcher (47) proponen agregar un quinto criterio a los de Sutherland:

5) - La toxina del cólera debe imitar el efecto de la hormona después de un período de "latencia" de 1-2 hs. (ver II.6).

Los sistemas de activación de la adenilil ciclasa por las diferentes hormonas poseen las siguientes características: a) cada hormona estimula a la adenilil ciclasa en un rango de concentraciones que es propio; b) la estimulación máxima lograda varía según el tipo de hormona del que se trate; c) antagonistas específicos solamente bloquean los efectos de los agonistas correspondientes y no de otras hormonas; d) las hormonas actúan desde el lado externo de la membrana (esto fue demostrado por Sato y colaboradores (48) para la ACTH y por Cuatrecasas (49) para la insulina, quienes comprobaron la existencia de respuestas a preparaciones hormonales unidas covalentemente a matrices insolubles); e) las características discriminatorias de los receptores y la activación de la adenilil ciclasa no requieren de la integridad celular ya que se observan en sistemas libres de células (50); f) la interacción de las hormonas con sus receptores

TABLA 1

HORMONA	TEJIDO U ORGANO	RESPUESTA
ADRENALINA	HIGADO	GLUCOGENOLISIS (28)
	MUSCULO ESQUELETICO	GLUCOGENOLISIS (28)
	MIOCARDIO	EFECTO INOTROPICO (29)
	GLANDULA SALIVAL	SECRECION DE AMILASA (30)
	TEJIDO ADIPOSO	LIPOLISIS (31)
NORADRENALINA	SISTEMA NERVIOSO	LIBERACION DE ACETILCOLINA (32)
	GLANDULA PINEAL	SINTESIS DE MELANOTONINAS (33)
GLUCAGON	HIGADO	GLUCOGENOLISIS (28)
	TEJIDO ADIPOSO	LIPOLISIS (34)
CORTICOTROFINA (ACTH)	ADRENALES	PRODUCCION DE ESTEROIDES (35)
	TEJIDO ADIPOSO	LIPOLISIS (34)
TIROTROFINA (TSH)	TIROIDES	HIDROLISIS DE TIROGLOBULINA (36)
		IODACION (37)
		OXIDACION DE GLUCOSA (38)
HORMONA PARATIROIDEA	CORTEZA RENAL	FOSFATURIA (39)
	HUESOS	REABSORCION DE CALCIO (39)
HORMONA LUTEINIZANTE (LH)	CUERPO LUTEO	SINTESIS DE ESTEROIDES (40)
VASOPRESINA	MEDULA RENAL	REABSORCION DE AGUA (41)
PROSTAGLANDINAS	HIPOFISIS (42)	
	TIROIDES (43)	
	BAZO (44)	
	MUSCULO ESQUELETICO (45)	
MELANOTROFINA	PIEL DE ANFIBIOS	MELANIZACION (46)
INSULINA	Neurospora crassa (24)	
	TEJIDO ADIPOSO (25-27)	

vista a través de la activación de la adenilil ciclasa es total y rápidamente reversible. Esto fue demostrado originalmente en el sistema de la ciclasa hepática estimulada por glucagón, estudiando los efectos de la eliminación de la hormona por lavado, o de la dilución de la hormona o de la acción de antagonistas competitivos, sobre la respuesta enzimática (51).

Los puntos a); b) y c) son consecuencia de la extrema especificidad de los receptores para las características topoquímicas de las hormonas. Tal hecho se evidencia claramente en las células grasas que poseen no menos de cinco tipos diferentes de receptores, cada uno de ellos con capacidad de activar a la adenilil ciclasa (52).

II. 5 Regulación por GTP

El papel de los nucleótidos de guanosina en el control de la adenilil ciclasa ha sido parcialmente dilucidado por cuatro líneas de trabajo:

1) - El grupo de Rodbell y Birnbaumer (53) demostró que en membranas de hígado la activación por glucagón de la adenilil ciclasa requiere GTP o su análogo, el GMP-P (NH)P. Este compuesto presenta la unión de su fosfato terminal resistente al ataque por hidrolasas (54). Por otra parte estos nucleótidos aumentan la disociación del complejo receptor-hormona tanto en el caso del glucagón (55) como en el de los agonistas β adrenérgicos. Rodbell y colaboradores mostraron

en 1977 que membranas plasmáticas de hígado "pre-marcadas" con [^{125}I] glucagón y luego solubilizadas con Lubrol PX daban origen a dos componentes separables: por un lado la adenilil ciclasa cuya actividad podría ser estimulable por GMP-P (NH)P y por otro lado glucagón unido a proteína cuya velocidad de disociación podría ser aumentada por GTP y GMP-P (NH)P de una manera similar a la vista en membranas intactas (56,57).

2) - Pfeuffer por su parte, partió de extractos de eritrocitos de paloma solubilizados con detergentes. Mediante el uso de columnas de cromatografía de afinidad en matrices conteniendo GTP unido covalentemente, logró separar dos fracciones: una con escasa actividad de ciclasa sin respuesta a GMP-P (NH)P, y otra, que se retiene en dichas columnas, carente de actividad de ciclasa. Esta última, agregada a la primera restituye la actividad enzimática estimulable por el nucleótido de guanosina (58).

3) - Gilman y colaboradores por otro lado trabajaron con variantes (mutantes) de células de linfoma S49 carentes de actividad de adenilil ciclasa dependiente de Mg^{++} (células AC^-). Cuando agregaron extractos preparados con detergentes de membranas de AC^- a membranas de células AC^+ cuya ciclasa había sido inactivada por calentamiento, la actividad en presencia de Mg^{++} se restituyó. De ello surge que para que

opere la actividad ciclizante en presencia de dicho catión se requiere un factor lábil al calor existente tanto en células AC^+ como en las AC^- (59,60).

4) - El cuarto tipo de evidencia fue provisto por Cassel y Selinger (61) quienes reconocieron la existencia en membranas de eritrocitos de pavo de una actividad hidrolítica del GTP (GTPasa) estimulable por catecolaminas e inhibible por enterotoxina del cólera.

La conclusión de estos trabajos es que la adenilil ciclasa tiene íntimamente asociada una actividad GTPásica. Se supone que el estado activo de la ciclasa es el complejo ciclasa - GTP y que la hidrólisis del nucleótido por la GTPasa disminuye la actividad de la enzima por formación de un complejo inactivo con el GDP. El GMP-P (NH)P, al no ser hidrolizable, mantendrá al sistema permanentemente en su estado activo. La figura 3 ilustra el modelo propuesto por Cassel y Selinger.

Según este esquema la enterotoxina del cólera no activaría a la ciclasa directamente sino por inhibición de la GTPasa. El complejo hormona-receptor, a su vez, aceleraría el recambio del GDP por el GTP.

II. 6 Activación por la toxina del cólera

El cólera es una enfermedad fatal provocada por una enterotoxina formada por Vibrio cholerae. La enterotoxina causa un dramático aumento de la secreción del fluído intestinal y los

enfermos mueren por deshidratación. La molécula de la enterotoxina está formada por dos subunidades proteicas de 54.000 Dalton (proteína I) y 32.000 Dalton (proteína II) de peso molecular, y esta última a su vez por dos subunidades ligadas por uniones disulfuro de 7.000 y 25.000 Dalton de peso molecular respectivamente.

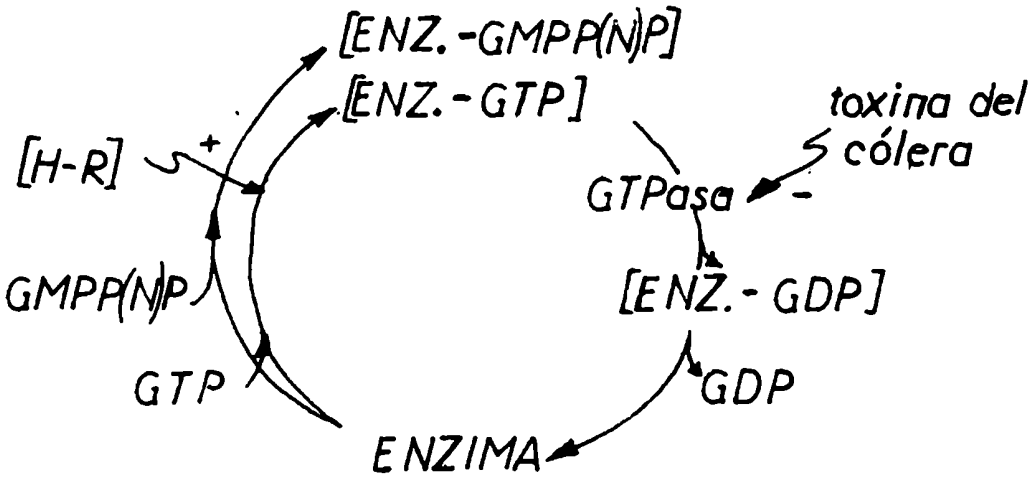


Figura 3:- Modelo propuesto por Cassel y Selinger para explicar la activación de la adenilil ciclasa por GTP y GMP-P(N)P
+ = estimulación - = inhibición

La secuencia de eventos involucrados en la acción de esta toxina se inicia con la interacción de la misma con su receptor en la membrana plasmática. Dicho receptor, el monosialo-ganglióside GM_1 está presente en la membrana plasmática de casi todas las células de mamíferos (62) y la interacción con la toxina se haría a nivel de la proteína I. Luego de ello, la proteína II se sepa

ra del complejo ganglióside - proteína I y paralelamente ocurre una reducción de los puentes disulfuro que conectan las subunidades de PM 7000 y 25000. La subunidad de 25000 a su vez es quien definitivamente activa a la ciclasa (63-66).

Ya se ha visto en el modelo de Cassel y Selinger (figura 3) que la activación por enterotoxina del cólera ocurre por inhibición de la GTPasa.

Recientemente se demostró que la subunidad activa de la toxina tiene actividad de adenosina difosfato ribosil transferasa (E.C. 3.2.2.5), es decir que es capaz de catalizar la siguiente reacción (llamada comúnmente ADPribosilación) (67).

$$NAD^{+} + \text{ACEPTOR} \longrightarrow \text{ACEPTOR - RIBOSIL ADP} + \text{NICOTINAMIDA}$$

Se supone que en el caso de la enterotoxina del cólera, el aceptor sería la GTPasa asociada a la adenilil ciclasa, la cual quedaría inhibida mientras que la ciclasa quedaría activada por el GTP de manera permanente.

II. 7 Componentes protéicos del sistema de adenilil ciclasa sensible a hormonas.

Estudios realizados en los últimos tres años, y reunidos recientemente en una revisión por Ross y Gilman (68) demostraron que la adenilil ciclasa sensible a hormonas está compuesta al menos por tres proteínas: una proteína catalítica (C) que es

relativamente inactiva y no presenta propiedades regulatorias; una proteína ligadora de guanil-nucleótidos (G/F) que media la acción estimuladora de los nucleótidos de guanosina y del fluoruro; y uno o más receptores hormonales (R). Excepto en lo que respecta a algunos receptores hormonales, las proteínas C y G/F aún no han sido purificadas a homogeneidad. Sin embargo, se conocen varias propiedades de estos componentes que han sido sumarizadas en la Tabla 2.

TABLA 2

Propiedades de los componentes protéicos del sistema de adenilil ciclasa sensible a hormonas.

RECEPTOR HORMONAL (R)

- Contiene el sitio de unión a la hormona en la cara extracelular.
- Uno o más diferentes tipos de receptores por célula.

PROTEINA CATALITICA (C)

- La actividad detectable con Mg-ATP es menos de un 10 % de la actividad con Mn-ATP.
- Dicha actividad no es estimulada por hormonas, fluoruro o nucleótidos de guanosina.
- Peso molecular aproximado de 190.000.
- Está ausente en células de ciertos clones del hepatoma HTC.
- Es sensible al calentamiento suave y a bajas concentraciones de reactivos de sulfhídrilos (NEM).

PROTEINA REGULATORIA LIGADORA DE GUANIL NUCLEOTIDOS (G/F)

- Confiere a C la capacidad para utilizar Mg-ATP como sustrato.

- Permite la regulación por fluoruro y por nucleótidos de guanosina de la actividad de C.
- Une nucleótidos de guanosina y fluoruro.
- Probable portadora de actividad GTPásica.
- Está asociada íntimamente a un péptido de 42.000 Dalton de peso molecular que es sustrato de la ADP ribosilación catalizada por la toxina del cólera.
- Está ausente en células del linfoma S49 variante AC^-.
- Es más estable al calor y a los reactivos de sulfhídrilos que la proteína C.

Las propiedades de los componentes G/F y C han sido establecidas mediante la resolución funcional o física de los mismos en base a su termosensibilidad diferencial, y a su presencia o ausencia en diferentes líneas celulares. En la tabla 3 se resumen las características de los sistemas de adenilil ciclasa en los distintos tipos celulares estudiados.

TABLA 3

Propiedades y composición proteica de los sistemas de adenilil ciclasa en distintos tipos celulares.

TIPO CELULAR	ACTIVIDAD DE CICLASA EN PRESENCIA DE:		ACTIVACION POR		COMPONENTE PRESENTE		
	Mg-ATP	Mn-ATP	F^-,GTP o col. tox.	Hormona	R	G/F	C
NORMAL (hígado, eritrocito)	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
LINFOMA S49 variante AC^-	NO	SI	NO	NO	SI	NO	SI
HEPATOMA HTC	NO	NO	NO	NO	SI	SI	NO
LINFOMA S49 variante UNC	SI	SI	SI	NO	SI	SI	SI
TESTICULO línea germinal	NO	SI	NO	?	?	NO	SI

Linfoma S49, variante AC^- (o cyc^-)

La variante AC^- del linfoma S49 fue aislada por Bourne et al (69). Dado que las células de dicho linfoma mueren al elevarse la concentración intracelular de AMP cíclico, se pudieron seleccionar variantes deficientes en adenilil ciclasa exponiendo el cultivo a agentes capaces de activar la ciclasa in vivo, como la toxi

na del cólera o agonistas β adrenérgicos del tipo del isoproterenol. Estas células variantes carecen de actividad de ciclasa medida en presencia de Mg-ATP, pero poseen actividad con Mn-ATP. La actividad con Mg-ATP, así como la sensibilidad a la activación por F^-, GTP y toxina del cólera dependen de la presencia del componente G/F cuya actividad está ausente en estas células. La actividad dependiente de Mg^{++} y las consiguientes activaciones pueden ser reestablecidas si se suplementa a las membranas de la variante AC^- con extractos de membranas de células normales (vg hígado, eritrocitos) solubilizadas con detergentes. Estos extractos aportarían el componente G/F al sistema de reconstitución mientras que las membranas AC^- aportarían el componente C. Gilman y colaboradores demostraron que eliminando la actividad de ciclasa endógena de los extractos mencionados, por calentamiento a 30°C no se anulaba la capacidad reconstituyente de los mismos frente a las membranas AC^-. Este experimento indicó que el componente G/F era más resistente al calentamiento que el C. Dado que G/F y C son sensibles a la acción de proteasas, reactivos de sulfhídrilos y a la temperatura se concluyó que ambos factores son proteínas.

Hepatoma HTC

Estas células son fenotípicamente muy similares a las de la variante AC^-, pero a diferencia de éstas últimas, carecen de actividad de ciclasa medida tanto con Mg^{++} como con Mn^{++}. Sin embargo, extractos de membranas del hepatoma HTC solubilizadas con

detergentes son capaces de reconstituir el sistema dependiente de Mg^{++} cuando son añadidos a membranas AC^-. Esto indicaría que las membranas del hepatoma poseen el componente G/F normal, pero el C inactivo. El hepatoma HTC es la única línea celular de mamíferos verdaderamente carente de actividad de adenilil ciclasa ya que tiene lesionado el sitio catalítico de la enzima. Por otra parte, el único organismo eucariote carente de actividad de ciclasa conocido hasta el momento es la mutante cr-1 (fenotipo "crisp") del hongo Neurospora crassa (70).

Linfoma S49, variante UNC

Cuando se seleccionan células del linfoma S49 en medio conteniendo agonistas β adrenérgicos se producen, además de clones AC^-, clones de un segundo fenotipo resistente. Estas células retienen actividad de ciclasa en sus membranas, la cual es estimulada por F^- o GMPP(N)P en presencia de Mg^{++} y por toxina del cólera. No obstante estas células han perdido la capacidad de responder a los agonistas β adrenérgicos y también a las prostaglandinas E_1 y E_2. Dado que las células variantes conservan sus receptores adrenérgicos intactos (demostrado por ensayos de "binding"), la lesión parece estar localizada en algún componente que produce un desacoplamiento (UNC del inglés uncoupling) de la enzima y el receptor. La capacidad de responder a hormonas es reestablecida al suplementar las membranas UNC con extractos de células normales, pero no con extractos de células AC^- (carentes de G/F) (71). Por otra parte, cuando las membranas UNC son marcadas con $[^{32}P]$ NAD y

toxina del cólera, se observa que la proteína de 45.000 Dalton característica de G/F (ver tabla 2) cambia su punto isoeléctrico a un valor más acídico que el de la misma proteína en células normales. Estos datos indicarían que la lesión UNC representa una modificación tal de la proteína G/F que no le permite actuar como factor de acoplamiento entre R y C, pero que aún conserva la capacidad de conferirle a C la dependencia de Mg^{++}.

Testículo, línea germinal

En el capítulo V y en los resultados de esta tesis están descriptas las características de la adenilil ciclasa de células germinales de testículo.

II.8 Acoplamiento entre el receptor hormonal y la adenilil ciclasa.

Numerosas especulaciones se han hecho sobre la relación entre los receptores y los efectores (v.g. adenilil ciclasa) ubicados en la cara interna de la membrana plasmática. En el pasado se supuso que los receptores mismos tenían funciones específicas y separadas (por ejemplo ionóforos para los receptores de acetil-colina). Una segunda posibilidad, en favor de la cual no existe ninguna evidencia, sería que el complejo hormona-receptor actúa enzimáticamente sobre la adenilil ciclasa y/o a través de la pro-

ducción de substancias químicas (mediadores). La tercer posibilidad, actualmente la más aceptada visualiza interacciones directas entre la estructura receptora y la efectora.

Dentro del concepto de interacción directa se pueden considerar tres esquemas:

1) - El receptor y la adenilil ciclasa son dos porciones de una misma entidad molecular que atraviesa la membrana plasmática de lado a lado, ofreciendo el extremo receptor hacia el exterior de la célula y el extremo enzimático hacia el interior. Esta hipótesis ha sido descartada por las numerosas evidencias que muestra la separación física de receptores y adenilil-ciclasa a partir de membranas plasmáticas solubilizadas con detergentes(72-74).

2) - Los receptores rodean al complejo enzimático. Se comportan como unidades regulatorias acopladas permanentemente a la molécula de ciclasa, y la manera por la cual interaccionan las subunidades puede ser entendida por analogía a la bien conocida de las enzimas solubles multiméricas. Las objeciones a éste modelo parten del hecho de que, por ejemplo, en las células grasas ocho hormonas diferentes parecen actuar sobre la adenilil ciclasa (glucagón, ACTH, secretina, LH, catecolaminas, prostaglandinas, VIP e insulina) (72) y cada una de ellas actúa mediante el "binding" a su propio receptor. Si cada receptor debe estar ligado como una subunidad regulatoria a la misma enzima y, si cada uno de éstos

componentes tiene un peso molecular que varía entre 100.000 y 200.000 Dalton, resultaría difícil que tales moléculas puedan agruparse físicamente en un único complejo en la membrana, manteniendo además la exposición hacia el exterior celular de cada componente receptor. Por otra parte semejantes complejos macromoleculares deberían ser "visibles" al microscopio electrónico en cortes convencionales o por la técnica de "congelación, fractura y grabado", hecho no descripto hasta el presente.

3) - La hipótesis del receptor móvil desarrollada por Cuatrecasas (72) está basada en los conceptos de la naturaleza dinámica y fluída de las membranas celulares, expuestos por Singer y Nicolson (75).

En esta formulación ilustrada en la figura 4 los receptores son entidades moleculares independientes de la adenilil-ciclasa. Cuando el receptor se une a la hormona, aumenta su afinidad por

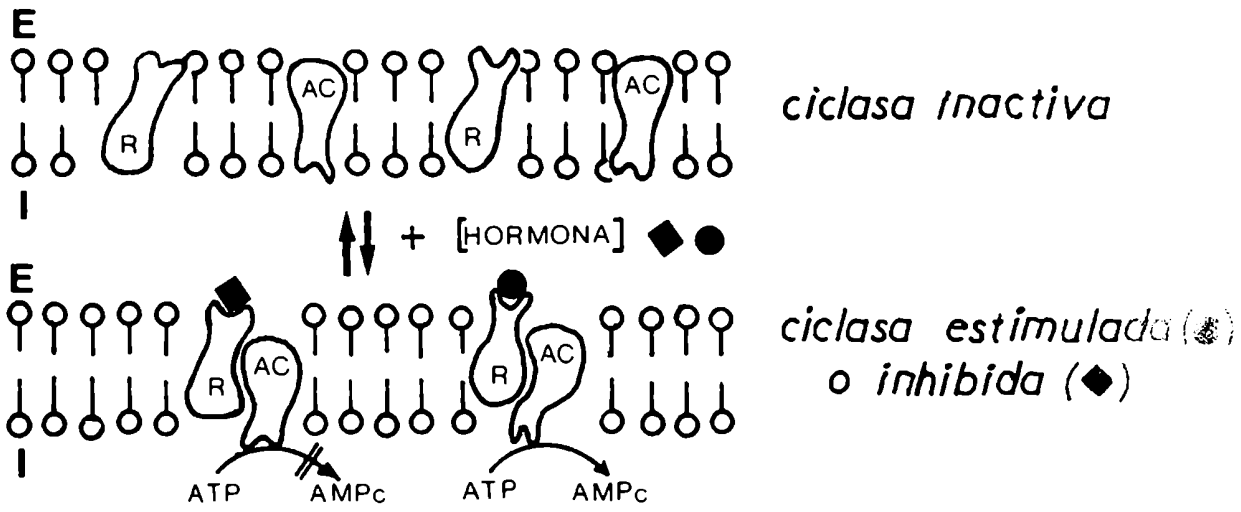


Figura 4:- Hipótesis del receptor móvil para el mecanismo de modulación de la actividad de adenilil ciclasa por hormonas.
● = hormona activante; ◆ = hormona inhibitoria;
E = exterior celular; I = interior.

dicha enzima adquiriendo además la capacidad de perturbarla modificando su actividad catalítica. El "encuentro" entre el receptor y la ciclasa se produce gracias al movimiento lateral que poseen las proteínas integrales en la matríz fluida formada por la bicapa lipídica.

Dados los tres componentes independientes: H (hormona), R (receptor) y AC (adenilil ciclasa) las interacciones posibles son:

$$H + R \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} H\text{-}R \qquad k_1 = k_1/k_{-1}$$

$$H\text{-}R + AC \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} H\text{-}R\text{-}AC \qquad k_2 = k_2/k_{-2}$$

$$H + R\text{-}AC \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} H\text{-}R\text{-}AC \qquad k_3 = k_3/k_{-3}$$

$$R + AC \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} R\text{-}AC \qquad k_4 = k_4/k_{-4}$$

La secuencia de reacciones sería:

$$H+R \overset{I}{\rightleftharpoons} H\text{-}R \xrightarrow[AC]{II} H\text{-}R\text{-}AC \xrightarrow[H]{III} R\text{-}AC \xrightarrow{IV} R + AC$$

Uno de los hechos experimentales que podría explicarse con la hipótesis de Cuatrecasas es el de la acción del GTP. Como vimos, el GTP cumple dos roles aparentemente contradictorios

en la regulación de la ciclasa de hígado por glucagón: por un lado aumenta la activación por la hormona y por otro incrementa la velocidad de disociación del complejo hormona-receptor. Según este modelo, el GTP aceleraría el paso III con disociación de la hormona y estabilizaría al complejo R-AC que sería activo aún en ausencia de hormona (sistema nemónico).

Muchos sistemas hormona receptor presentan experimentalmente dos constantes de disociación correspondientes a dos componentes: uno de alta afinidad y baja capacidad de unión y otro de baja afinidad y alta capacidad de unión. Para explicar este hecho se han propuesto numerosas teorías que van desde la existencia de dos poblaciones de receptores con afinidades diferentes, hasta la postulación de una única población de receptores donde el cambio de una afinidad a otra se produce por un efecto cooperativo negativo (76). El modelo de Cuatrecasas predice matemáticamente la existencia de dos componentes de "binding": Por los equilibrios dados en las ecuaciones I a IV es $k_3 = \frac{k_1 \times k_2}{k_4}$. Por otro lado, dado que por definición la afinidad del complejo HR por la ciclasa es mayor que la afinidad del receptor descargado por la enzima, es $k_2 > k_4$ y en consecuencia, para respetar la igualdad deberá ser $k_1 < k_3$. De ello surgen los dos componentes: el de alta afinidad y presente en poca cantidad sería el complejo R-AC mientras que el de baja afinidad y presente en mayor cantidad sería el receptor sólo (R).

La comprobación más espectacular del modelo del receptor móvil provino de los trabajos realizados por Michael Schramm y sus colaboradores (77-79). Estos autores ensayaron la hipótesis de que el receptor β adrenérgico es una unidad independiente que puede ser transferida de un sistema de adenilil ciclasa a otro. Para ello utilizaron eritrocitos de pavo, en los cuales la actividad de la adenilil ciclasa había sido anulada por tratamiento con N-etilmaleimida o por calor (poseen receptores β adrenérgicos), y células de la eritroleucemia de Friend (células F) que tienen una adenilil ciclasa normal pero carecen de receptor de tipo β. Los eritrocitos en los que la ciclasa había sido inactivada fueron fusionados con las células F en presencia de virus Sendai. Los "fantasmas" celulares de las preparaciones fusionadas mostraron una actividad de adenilil ciclasa perfectamente estimulable por isoproterenol (agonista β). La activación por isoproterenol apareció pocos minutos después de la fusión y aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas, con lo cual se demostró que el acoplamiento se produjo entre elementos preexistentes.

Repitiendo el mismo esquema experimental el grupo de Schramm logró transferir de células F con su ciclasa inactivada, receptores de prostaglandina E_1 (PGE_1) a células de tumor adrenal de ratón (Y-1) que poseen ciclasa pero carecen de los receptores mencionados.

III. EL PAPEL BIOLOGICO DEL AMP CICLICO EN EL CONTROL DEL METABOLISMO EN EUCARIOTES.

En los capítulos anteriores se describieron los aspectos fundamentales que conciernen a la síntesis biológica del AMP cíclico. En este capítulo se verá de qué manera este nucleótido interviene en el control del metabolismo celular.

El primer efecto biológico atribuido al AMP cíclico fue la activación en hígado de la fosforilasa de glucógeno (1,4 -α-D-Glucan: orthophosphate α-glucosyltransferase, E.C. 2.4.1.1), responsable de la degradación de dicho polisacárido con formación de glucosa 1- P . En el hígado y en el músculo, la fosforilasa existe bajo dos formas: fosforilasa a (activa) y fosforilasa b (inactiva). La conversión de la forma b a la a implica una fosforilación de la molécula de fosforilasa b a partir de ATP, reacción catalizada por una enzima llamada fosforilasa b quinasa (ATP: phosphorilase b phosphotransferase, E.C. 2.7.1.38). Esta última enzima, a su vez, existe en dos formas: una activa fosforilada y una inactiva defosforilada. La conversión de la forma inactiva a la activa ocurre por la acción de una proteína quinasa (ATP: protein phosphotransferase, E.C. 2.7.1.37) cuya actividad se manifiesta en presencia de AMP cíclico. Las proteína quinasas (PQ) fueron descubiertas y aisladas por el grupo de Edwing Krebs (168,169)y pueden ser consideradas como los verdaderos receptores intracelulares del AMP cíclico. Su acción catalítica radica en la transferencia del grupo fosfato terminal

del ATP a los residuos serina o treonina de las cadenas polipeptídicas, en presencia del Mg^{++}.

La fosforilasa b quinasa - quinasa (PQ), además de fosforilar a la fosforilasa b quinasa, es capaz de hacerlo a otras proteínas como la caseína, histonas, protamina y glucógeno sintetasa (UDPglucose: glycogen 4 -α- glucosyl transferase, E.C. 2.4.1.11) (170).Tal escasa especificidad para el sustrato es una característica común de este tipo de enzimas.

La manera en que el AMP cíclico regula la actividad de las proteína quinasas fue descubierta independientemente en los laboratorios de Lipman (80) y Garren (81). Trabajando con una proteína quinasa de reticulocitos de conejo y utilizando la histona como sustrato, Lipman y colaboradores detectaron que en presencia de AMP cíclico la enzima se disociaba en dos componentes más livianos que la forma nativa: uno con actividad catalítica pero sin capacidad de unir AMP cíclico, y otro sin actividad catalítica pero que une AMP cíclico. Las conclusiones finales fueron que las proteínas quinasas están formadas por 2 entidades proteicas: una regulatoria (R) que fija AMP cíclico y otra catalítica (C). Hoy se sabe que la enzima está constituída por dos subunidades catalíticas de 38.000 Dalton de peso molecular cada una, y un dímero regulatorio formado por dos monómeros de 55.000 Dalton de PM cada uno. En la figura 5 se descri

be de qué modo el AMP cíclico activa a las proteína quinasas.

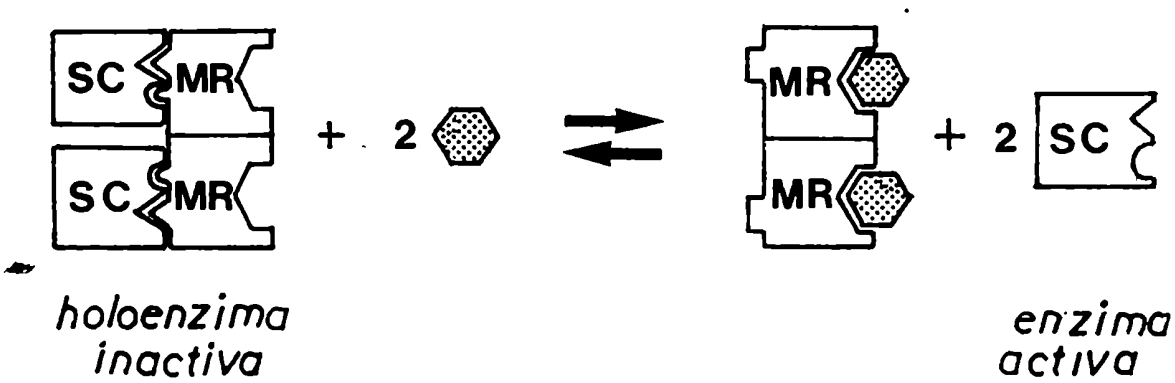


Figura 5:- Esquema que representa la activación de proteínas quinasas por el AMP cíclico. En presencia de dicho nucleótido la enzima nativa inactiva se disocia en dos subunidades catalíticas activas y un dímero regulatorio unido a dos moléculas de AMP cíclico.
SC = subunidad catalítica; MR = monómero regulatorio;
⬡ = AMPc

Existen dos tipos de proteína quinasas dependientes de AMP cíclico, denominadas I y II.

En el tipo II la interacción entre las subunidades catalíticas y regulatorias sería más fuerte que en el tipo I y requeriría para disociarse además del AMP cíclico una concentración salina alta.

Recientemente Corbin y colaboradores (82) demostraron que la proteína quinasa de tipo I es una proteína de localización citosólica mientras que la de tipo II está ligada a

membranas. Lo notable es que la unión a membrana se haría a través de las subunidades regulatorias, de manera de que al interaccionar con el AMP cíclico se liberarían al citoplasma subunidades catalíticas activas, en tanto el complejo R-AMP cíclico permanecería unido a la membrana.

Si la fosforilación de proteínas por las proteína-quinasas fuera un proceso irreversible, los efectos hormonales serían permanentes aún cuando desapareciera la causa que aumenta los niveles intracelulares del AMP cíclico. La reversibilidad del proceso está dada por la defosforilación de las proteínas fosforiladas. Esta reacción es catalizada por un grupo especial de fosfohidrolasas llamadas fosfoproteína fosfatasas (Phosphoprotein phosphohydrolase, E.C. 3.1.3.16). Las fosfoproteína fosfatasas poseerían también dos formas: una activa defosforilada y otra inactiva fosforilada. La fosforilación inactivante de una fosfoproteína fosfatasa está a cargo de una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. De esta manera, un aumento en la concentración de AMP cíclico determina una activación de las proteína-quinasas y una inactivación de las fosfoproteína fosfatasas.

Este tipo de regulación simultánea puede visualizarse muy bien en el ya conocido sistema de amplificación "en cascada" del metabolismo del glucógeno, que se muestra en la figu-

ra 6. Se tomará a esta ruta metabólica como paradigma del mecanismo de acción del AMP cíclico en los eucariotes.

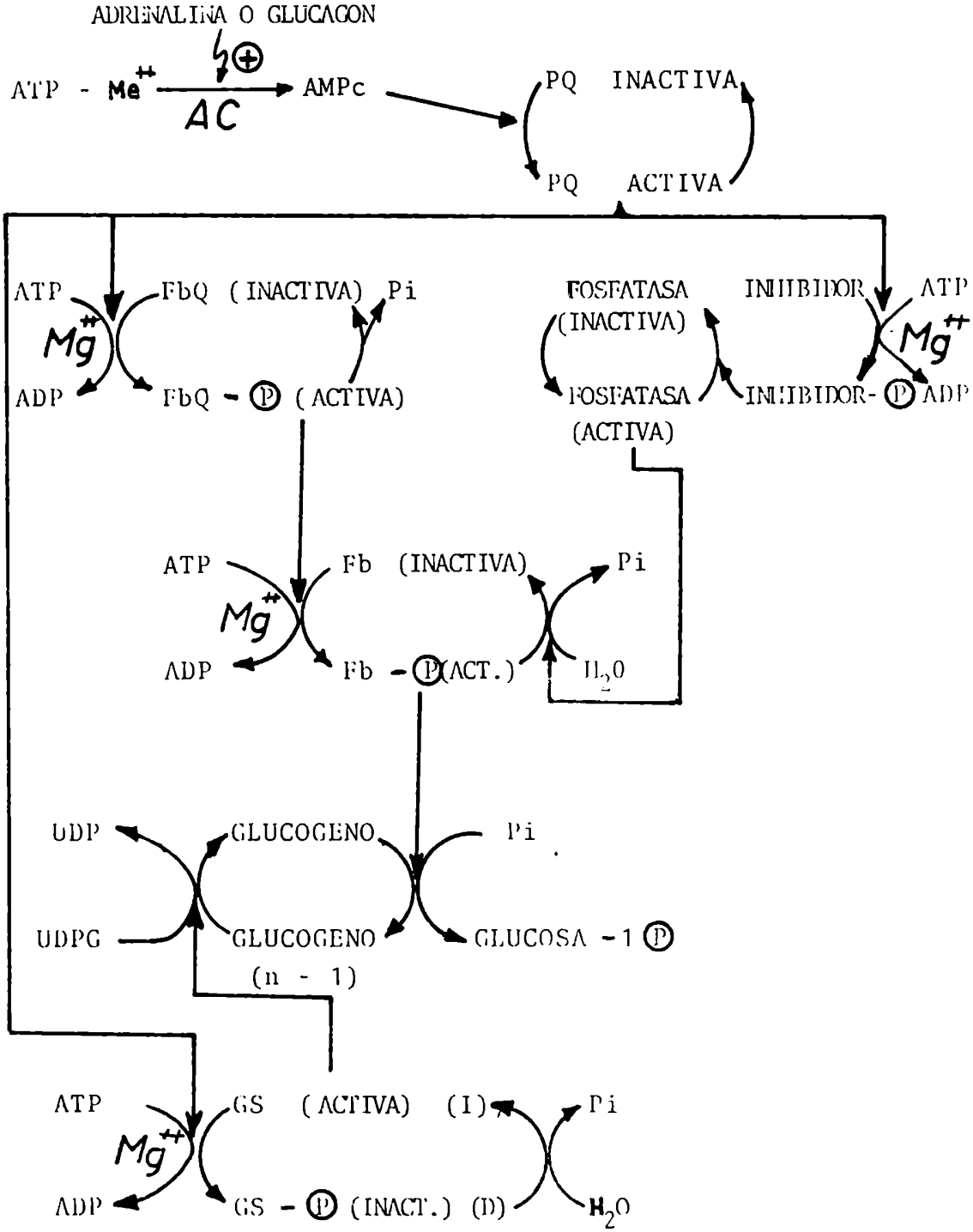


Figura 6:- Control del metabolismo del glucógeno por AMP cíclico.

En la figura 6 se ve que la acción glucogenolítica del AMP cíclico está garantizada por cuatro puntos de control: la activación de la fosforilasa de glucógeno, la inactivación de la fosfatasa capaz de inactivar a la fosforilasa de glucógeno, la inactivación de la glucógeno sintetasa y la inactivación de la fosfatasa capaz de activar a la glucógeno sintetasa.

El AMP cíclico cumple un rol similar en la lipólisis. La lipasa (Triacylglycerol acyl-hydrolase, E.C. 3.1.1.3) que hidroliza triglicéridos a glicerol y ácidos grasos existe en dos formas: una activa fosforilada y otra inactiva no fosforilada (83). En este caso también la fosforilación es catalizada por una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

En cuanto al metabolismo proteico, recientes trabajos de Severo Ochoa y colaboradores (84) asignan al AMP cíclico un rol regulador en la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos: el nucleótido activaría a una proteína quinasa que fosforila a un inhibidor de la acción del factor de iniciación de la traducción, e IF-2.

Dicho inhibidor sería a su vez una proteína quinasa independiente de AMP cíclico.

Estos y otros efectos biológicos mediados por proteína quinasas dependientes de AMP cíclico se encuentran en la tabla 4.

TABLA 4: Sitios de acción de las proteína quinasas dependientes de AMP cíclico y los eventos biológicos relacionados.

LA PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc FOSFORILA A:	EVENTO PRODUCIDO
GLUCOGENO SINTETASA	INHIBICION DE LA SINTESIS DE GLUCOGENO
FOSFORILASA b QUINASA	ACTIVACION DE LA DEGRADACION DE GLUCOGENO
LIPASA	ACTIVACION DE LA DEGRADACION DE GRASAS NEUTRAS
QUINASA DEL FACTOR eIF-2	INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS
TROPONINA	CONTRACCION MUSCULAR
COMPONENTES DE MEMBRANA	Δ DE POLARIZACION TRANSPORTE DE PRECURSORES PERMEABILIDAD AL AGUA

Las concentraciones intracelulares de AMP cíclico son cercanas a 10^{-6} M, suponiendo una distribución uniforme del nucleótido en el medio acuoso de la célula.

Sin embargo, la concentración de AMP cíclico requerida para lograr el 50% de la máxima actividad catalítica de la proteína quinasa purificada es aproximadamente de 10^{-8} M. En estas condiciones el nivel basal intracelular de AMP cíclico sería más que suficiente para mantener a la quinasa en un estado completamente activado. Los experimentos nos dicen que esto no es así; la actividad basal de proteína quinasa *in vivo* es baja y hay una buena correlación entre los aumentos intracelulares del nucleótido y el incremento de la actividad enzimática (85). Una explicación posible para esta paradoja es que el AMP cíclico y la proteína quinasa se encuentren separados en compartimentos citoplasmáticos diferentes. Steiner y su grupo (86) demostraron con la ayuda de la inmunofluorescencia, una distribución discreta del AMP cíclico y del GMP cíclico en células de la glándula tiroides, hecho que apoyaría la explicación de la compartimentalización.

Por otro lado, existen otros factores que pueden modificar la interacción de la proteína quinasa con el AMP cíclico. El primero es el efecto del Mg ATP^{2-} sobre la recombinación de las subunidades separadas de la proteína quinasa. Cuando se incuban subunidades catalíticas con el complejo subunidad regulatoria - AMP cíclico y con Mg ATP^{2-}, se reconstituye la proteína quinasa nativa (R_2 C_2) y se libera AMP cíclico. Esto no ocu-

rre en ausencia de Mg ATP^{2-}.

Es decir que en presencia de Mg ATP^{2-}, aumenta el grado de disociación entre el AMP cíclico y la proteína quinasa. La constante de disociación para el complejo $(AMPc)_2$-R_2 es de 6×10^{-9} M en ausencia de Mg ATP^{2-}; mientras que en presencia de una concentración "fisiológica" de Mg ATP^{2-} (4mM), la constante se incrementa a 2×10^{-7} M, valor cercano al de los niveles alcanzados intracelularmente por el nucleótido cíclico luego de la estimulación hormonal.

Otro factor que provoca un aumento de la constante de disociación del AMP cíclico con la proteína quinasa es el número de moléculas de enzima (PK) por célula.

Por ejemplo, en presencia de Mg ATP^{2-} y caseína, cuando la proteína quinasa se encuentra a una concentración de 10^{-8} M, la constante de disociación para el AMP cíclico es de 2×10^{-7} M; en cambio, cuando la concentración de enzima se eleva a 2×10^{-7} M, la constante de disociación se incrementa a $1,5 \times 10^{-6}$ M. Este mecanismo podría operar <u>in vivo</u> ya que la concentración de proteína quinasa en la célula es del orden de 2 a 3×10^{-7} M, casi idéntica a la de su activador.

Por último, existe una proteína termoestable que es capaz de suprimir toda actividad de proteína quinasa a niveles de nucleótido cíclico inferiores a 3×10^{-7} M (13, 47).

Como se ve, tanto el sustrato de las proteína quinasas, como la concentración de la enzima y la existencia de un factor termoestable modulan las relaciones entre el AMP cíclico y las subunidades regulatorias de manera de asegurar una correlación entre el rango dentro del cual varían los niveles intracelulares del AMP cíclico y la sensibilidad de las proteína quinasas.

IV. EL AMP CICLICO Y LA FUNCION TESTICULAR.

El papel del AMP cíclico en la fisiología del testículo es de suma importancia ya que dicho nucleótido cíclico está relacionado con los dos procesos fundamentales que ocurren en esta glándula: la secreción de hormonas sexuales masculinas (andrógenos)y la producción de espermatozoides. Desde hace muchos años se sabe que la regulación de estos dos procesos es llevada a cabo por las hormonas gonadotróficas hipofisarias: la FSH y la LH, esta última relacionada estructuralmente con la hCG (gonadotrofina coriónica humana).

En la figura 7 puede observarse el esquema de un corte histológico de testículo con la ubicación de los distintos tipos celulares.

La biosíntesis de los esteroides androgénicos está localizada en las células intersticiales de Leydig, mientras que la espermatogénesis ocurre en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos.

Los trabajos pioneros del grupo de Mancini sobre la distribución celular de las gonadotrofinas dentro del testículo por métodos inmunohistoquímicos mostraron que la FSH estaba con-

finada a las células tubulares de Sertoli, y la LH estaba localizada en las células de Leydig y peritubulares (87).

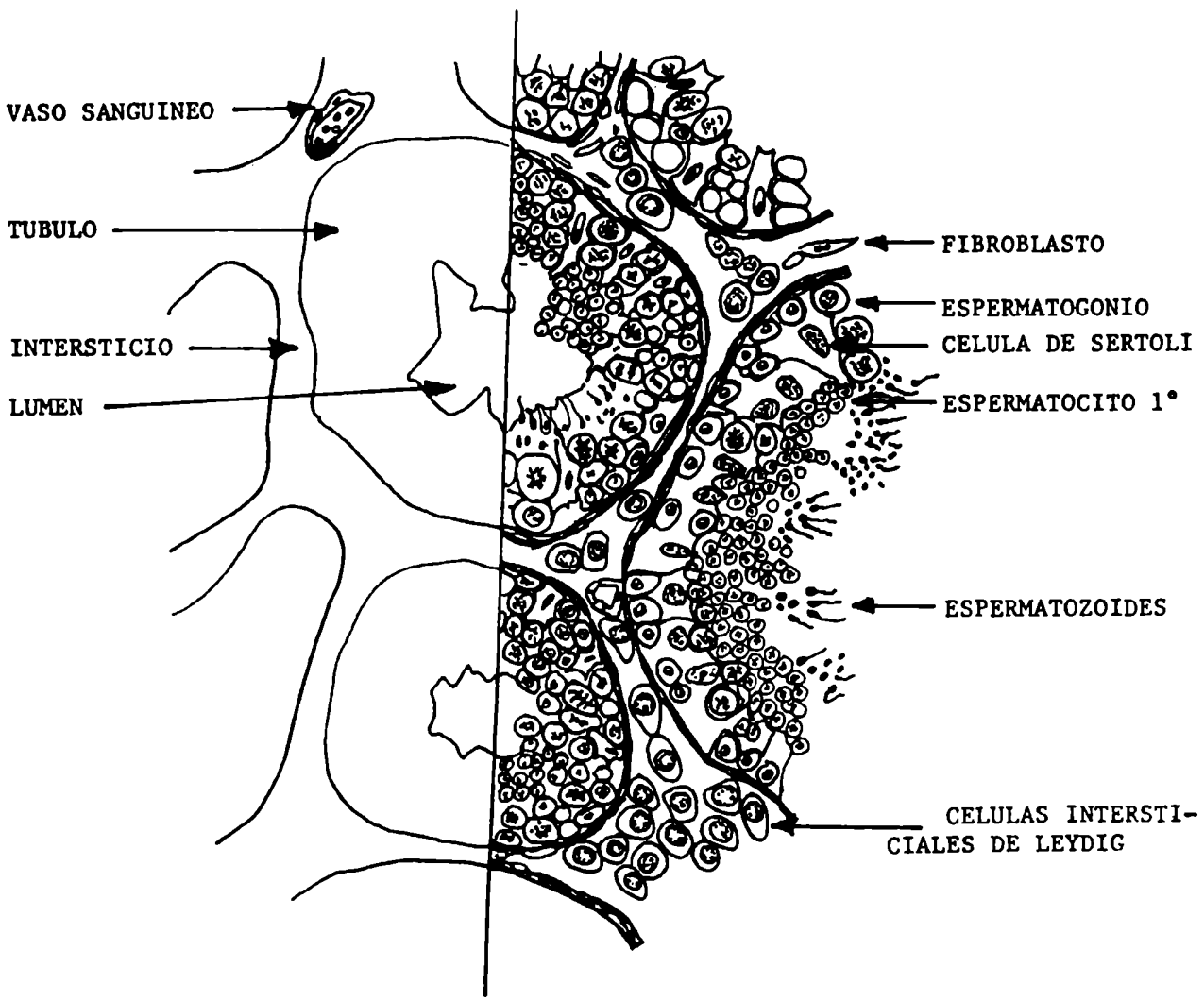


Figura 7:- Corte histológico de testículo humano X 170 tomado de Bloom, W. y Fawcett, D.W. (1966) "A Textbook of Histology" W.B.Saunders Company, Philadelphia.

A partir de esta observación numerosos trabajos han demostrado la existencia de receptores para LH y hCG en la membrana plasmática de las células de Leydig y para FSH en las células de Sertoli. Los receptores para LH/hCG han sido estudiados y caracterizados exhaustivamente por Catt, Dufau y colaboradores (88). En general la interacción gonadotrofina-receptor se caracteriza por una alta constante de asociación (1 pmol/g). Dufau et al (89) solubilizaron los receptores para LH de fracciones particuladas de testículo usando detergentes no iónicos. En estas condiciones los receptores se comportan como moléculas asimétricas con un radio de Stokes de 64 Å, un coeficiente de sedimentación de 6,5 S y un peso molecular de 200.000 Dalton. El complejo hormona-receptor por su parte tiene un coeficiente de sedimentación de 7,5 S. Por otro lado es importante destacar que estos receptores solubilizados pierden su actividad después del tratamiento con tripsina, lo que indica su naturaleza proteica. Además se ha conseguido recientemente un alto grado de purificación de los mismos por cromatografía de afinidad usando agarosa acoplada a hCG. El mismo grupo estudió la relación existente entre la ocupación de los receptores por la hCG y la activación de la esteroideogénesis en las células de Leydig. Por un lado

se estableció que las concentraciones de hCG necesarias para saturar a sus receptores específicos son muy superiores a las necesarias para alcanzar la máxima producción de esteroides. Por otra parte se descubrió que LH o hCG estimulan la producción de AMP cíclico en las células de Leydig (90, 91). Estos datos inmediatamente hicieron suponer un control de la esteroideogénesis, mediado por AMP cíclico, donde, al igual que ocurre con otras hormonas polipeptídicas, la LH/hCG se uniría a su receptor específico y activaría a la adenilil ciclasa, aumentando los niveles intracelulares de AMP cíclico. La adición de AMP cíclico o de su derivado dibutirilado al medio de incubación de las células intersticiales estimula la producción de andrógenos (90, 92). Podestá et al (93, 94) caracterizaron a la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico presente en las células de Leydig; esta enzima presenta dos formas moleculares con constantes de sedimentación de 6,5 S y 3,8 S. Durante la incubación de células intersticiales con hormonas gonadotróficas, la actividad de proteína quinasa total se estimula en una forma proporcional a la concentración de hormona, llevando a la formación de una única subunidad catalítica de 2,9 S. La conversión de las dos holoenzimas en la subunidad catalítica ocurre a concentraciones fisiológicas de gonadotrofina (10^{-11} M).

Por otro lado es importante destacar que no se conoce con exactitud cuál es el sustrato natural de la proteína quinasa de las células de Leydig, ni qué etapa de la biosíntesis de andrógenos es suceptible de ser regulada por fosforilaciones y desfosforilaciones. No obstante, una aproximación interesante al problema fue desarrollada por Cigorraga *et al* (95). El tratamiento de células intersticiales con altas dosis de hCG produce una pérdida de los receptores accesibles a la hormona y una consecuente desaparición de la respuesta a la hormona, tanto en lo referente a la producción de AMP cíclico como en la esteroideogénesis (96). Este conocido fenómeno lleva el nombre de *desensibilización* o *taquifilaxia* y ha sido descripto en los sistemas de receptores de insulina, somatotrofina, LH, TRH y catecolaminas. Los estudios realizados por Cigorraga *et al* demostraron que inhibidores selectivos de la síntesis de esteroides permiten un análisis cuantitativo de los precursores durante la estimulación hormonal *in vitro* de las células de Leydig, y comprobaron que la mayor alteración de la vía esteroideogénica en las células desensibilizadas está localizada a nivel de la *desmolasa*, la enzima responsable de la conversión de 17α-hidroxi progesterona a andrógenos. Seguramente los próximos pasos en la investigación del papel del AMP cíclico en las células intersticiales estarán dirigidos a establecer alguna correlación entre

la actividad de la desmolasa y la actividad fosforilante de la proteína quinasa.

Los andrógenos producidos en las células intersticiales pasan a la circulación para ejercer su efecto promotor del crecimiento y mantenimiento de los tejidos genitales y accesorios, controlando fundamentalmente la espermatogénesis, y, en definitiva, permitiendo la perpetuación de la especie. El mecanismo de acción de las hormonas esteroideas en general y de los andrógenos en particular constituye un vasto capítulo de la Endocrinología Molecular, que no será tratado en detalle aquí. Sólo se enunciarán los pasos principales del modo de acción de la testosterona (97):

1) Conversión de la testosterona en dihidrotestosterona (DHT).
2) Unión de la DHT a un receptor citosólico específico de coeficiente de sedimentación 9,5 S. En presencia de sales, dicho receptor es capaz de disociarse dando una subunidad de 3,8 S.
3) El complejo receptor-DHT es transferido al núcleo celular mediante un mecanismo dependiente de temperatura. Ni el receptor libre ni la DHT sola pueden penetrar en el núcleo.
4) La ciproterona, un inhibidor competitivo de la acción androgénica, actúa bloqueando el "binding" de la DHT a su receptor citosólico específico.
5) En el citoplasma existe una proteína que une andrógenos (ABP),

que no se transloca al núcleo, y que además difiere del receptor específico en que su asociación a la DHT no es bloqueada por la ciproterona.

6) En el núcleo, el complejo receptor-DHT, se uniría por lo menos a la fracción de ribonucleoproteínas de la cromatina, pero no se descarta la unión a otras proteínas de la cromatina.

7) La unión del complejo DHT-receptor a una proteína específica de la cromatina es la base de la regulación de la expresión genética en la célula sensible a testosterona. Se estimula la transcripción a nivel de la RNA polimerasa I.

En cuanto al rol de la testosterona en la espermatogénesis, se sabe que son necesarias altas concentraciones intratesticulares del esteroide para que se complete la meiosis, sobre todo a niveles de la profase II y la metafase II y que la célula de Sertoli es la encargada de mantener los altos niveles de la hormona producida por las células de Leydig.

La localización preferencial de la FSH en la célula de Sertoli (87) es compatible con la idea de que estas células pueden ser el sitio de acción de la hormona hipofisaria. Means y Vaitukaitis demostraron en 1972 la existencia de "binding" específico de ^{3}H-FSH a los túbulos seminíferos *in vitro* (98).

Más tarde, Steinberger (178), utilizando una combinación de técnicas mecánicas, enzimáticas y de cultivo de teji

dos demostró que ni las células intersticiales ni las peritubulares, ni las de la línea germinal eran capaces de unir FSH marcada con ^{125}I, mientras que los túbulos seminíferos desprovistos de células germinales tenían el mismo grado de "binding" específico que los túbulos seminíferos enteros. El mismo grupo de Steinberger estudió el "binding" específico de FSH a células de Sertoli aisladas y crecidas en cultivo comprobando que no era necesaria la hormona para inducir la presencia de receptores (99).

Finalmente Abou-Issa y Reichert (100, 101) caracterizaron los receptores de FSH de las membranas obtenidas de túbulos seminíferos de rata y de ternero y estudiaron sus propiedades al solubilizarlos con detergentes.

Tal como ocurre en otros sistemas hormonales, el segundo mensajero de la FSH en las células de Sertoli es el AMP cíclico. Numerosos grupos han descripto las propiedades de una adenilil ciclasa asociada a membranas de los túbulos seminíferos estimulable por FSH (102, 103). Además Dorrington et al mostraron un aumento en los niveles endógenos de AMP cíclico en túbulos aislados incubados con FSH (104). El papel del sistema FSH-AMP cíclico parece estar dirigido hacia un aumento en la síntesis de proteínas (105) y en especial del ABP. El ABP es una

proteína presente exclusivamente en el testículo y el epidídimo. Hay evidencias abundantes que indican que el ABP es sintetizado en las células de Sertoli bajo el control hormonal de la FSH:

1) El ABP desaparece del testículo y del epidídimo después de la hipofisectomía y reaparece después del tratamiento con FSH de una manera dependiente de la dosis.
2) El ABP testicular aumenta una hora después de la administración de FSH o 8-bromo-AMP cíclico a ratas irradiadas prenatalmente con rayos X, cuyos testículos están enriquecidos en células de Sertoli por anulación de la línea germinal.
3) La FSH estimula la producción de ABP in vitro en cultivos de células o de órgano.
4) Además de la FSH, la testosterona induce la síntesis de ABP mediante un mecanismo diferente que no involucra al AMP cíclico. En tal sentido la FSH y testosterona actuarían sinérgica, pero independientemente (106).

La función atribuida al ABP es la de aumentar la acumulación de andrógenos en la célula de Sertoli y, una vez secretado al fluido tubular, transportar los andrógenos hacia el epidídimo. Por lo tanto, con la ayuda del ABP, el testículo comparte con su órgano anexo, el epidídimo, la abundante concentración de andrógenos necesaria para la maduración del espermatozoide (106).

En el diagrama de la figura 8 se resumen los conocimientos actuales sobre la regulación hormonal mediada por AMP cíclico en el testículo:

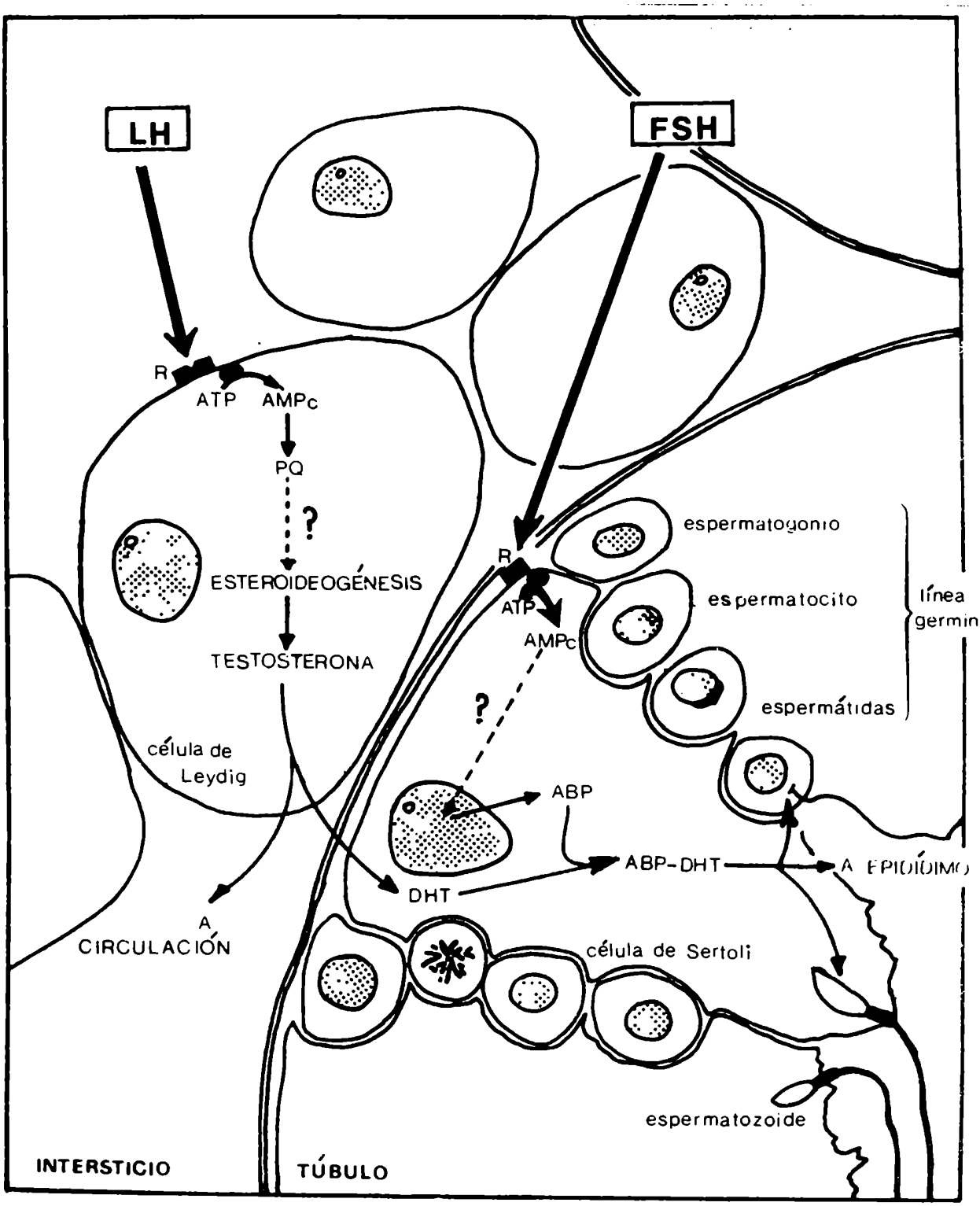


FIGURA 8

V. LA ADENILIL CICLASA DE TUBULOS SEMINIFEROS.

Algunas evidencias experimentales indicarían la existencia de distintos sistemas de adenilil ciclasa en los diferentes tipos celulares existentes en el testículo. En primer lugar, se ha detectado la presencia de una adenilil ciclasa sensible a la hormona luteinizante (LH) en las células intersticiales de Leydig (107), y una ciclasa estimulable por FSH, presente en las células de Sertoli (108). Ambas actividades enzimáticas se encontraron asociadas a fracciones de membranas y pueden funcionar tanto con Mg^{++} como con Mn^{++} además de ser estimulables por F^{-}. Un estudio reciente de Abou-Issa y Reichert (109) mostró que la actividad de ciclasa de membrana sensible a FSH en testículo de rata, es regulable por los nucleótidos de guanosina. Los autores comprobaron que el GMP-P(NH)P es capaz de estimular su actividad basal y que tanto el GTP como el GMP-P(NH)P aumentan significativamente el grado de estimulación por FSH. Además demostraron que el GMP-P(NH)P inhibe la unión de la $[^{125}I]$-FSH a las preparaciones de membranas. Estos hechos se correlacionan perfectamente con los estudios de Rodbell *et al* (55) sobre los efectos de los nucleótidos en el "binding" del glucagón y la activación de la adenilil ciclasa en membranas de hígado.

Los caracteres de las ciclasas hasta aquí descriptas concuerdan con los de las adenilil ciclasas de todas las células de mamíferos estudiadas, en cuanto a su localización celular, regulación hormonal, requerimientos de cationes divalentes y estimulación

por F^-. Sin embargo, en 1975, Braun y Dods (4) publicaron el primer trabajo en que se describe a una adenil ciclasa de testículo de rata que presenta rasgos diferenciales:

1) - Se encuentra localizada en la fracción citosólica;

2) - Es inactiva en presencia de Mg^{++} como único catión divalente;

3) - Requiere Mn^{++} para su actividad;

4) - Es estimulada por el Ca^{++} en presencia de Mn^{++} (110);

5) - El Co^{++} no puede substituir al Mn^{++} (111);

6) - No es estimulable por F^-; y

7) - Las gonadotrofinas (FSH y LH) no modifican su actividad.

En cuanto a la localización, Braun y Dods comprobaron que el 89 % de la actividad enzimática se recuperaba en el citosol, luego de una ultracentrifugación de homogeneizados de testículo a 105.000 x g durante 60'. Pruebas adicionales de la localización citosólica fueron:

a) - la permanencia de la actividad en el sobrenadante de una centrifugación a 300.000 x g durante 5 hs;

b) - la recuperación total de la actividad en el filtrado, luego del pasaje de un sobrenadante de alta velocidad a través de membranas de ésteres de celulosa (millipore) con un tamaño de poro de 0,22 μm; y

c) - ausencia de fragmentos membranosos o de vesículas al observar preparaciones de dicho filtrado al microscopio electrónico.

En un trabajo posterior al de Braun y Dods, Neer (111)

analizó la hipótesis de que la solubilidad de la ciclasa de testículo fuera consecuencia de la proteólisis de una forma enzimática unida a membranas, ocurrida durante la preparación de los extractos. Para ello incubó homogenatos de testículo a 25ºC durante una hora, al cabo de lo cual obtuvo un sobrenadante de alta velocidad y comparó su actividad con la de un sobrenadante control, de un homogenato no incubado. La autora no detectó incremento alguno en la fracción soluble del tratado respecto del control. Por otra parte, tampoco detectó variación en la distribución de la actividad de ciclasa en el sobrenadante y en el material sedimentado cuando añadió diferentes inhibidores de proteasas a la solución de homogenización. Esto demostraría la ausencia de un proceso proleolítico liberador de la ciclasa al citoplasma.

Experimentos realizados con túbulos seminíferos aislados por microdisección y con una preparación altamente enriquecida en células de Leydig demostraron que el 90 % de la adenilil ciclasa soluble se encuentra localizada en los túbulos, mientras que el 10 % restante se ubica en las células intersticiales (4); éste último porcentaje coincide con el de contaminación de la fracción de células intersticiales con células provenientes de los túbulos seminíferos. Por otra parte, Braun et al (110) no detectaron actividad de adenilil ciclasa soluble en preparaciones de testículos de ratas cuyas madres habían sido irradiadas en el 19º día de gestación. La aplicación prenatal de rayos X anula por completo la

línea germinal y las ratas presentan túbulos seminíferos enriquecidos en células de Sertoli.

Estos resultados indicarían que la ciclasa citosólica está localizada en las células de la progenie espermática.

Braun y Dods estudiaron también la "ontogenia" de la adenilil ciclasa dependiente de Mn^{++} en la rata. Como se ve en la figura 13 tomada del trabajo original (4), la actividad no es detectable en ratas de 14 días, edad en que el epitelio tubular está com-

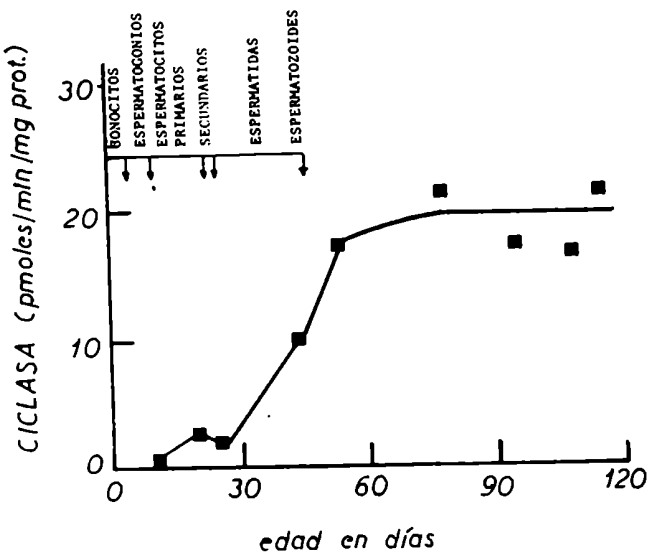


Figura 13:- Aparición de la actividad de adenilil ciclasa en testículo de rata. La actividad enzimática fue determinada en el citosol aislado de homogeneizados de testículos. Se muestran también los estadios del desarrollo morfológico en los túbulos seminíferos. Tomado de Braun y Dods. (4)

puesto principalmente por células de Sertoli, espermatogonios y espermatocitos primarios. La actividad comienza a detectarse en ratas de 22 a 26 días, cuando empiezan a aparecer las espermátidas, y el incremento rápido se da entre los 26 y 35 días, concomitantemente con la aparición de un número considerable de espermátidas; alcanzando un "plateau" máximo en las ratas adultas, sexualmente maduras. Resulta interesante recalcar la estricta correlación existente entre los niveles de la adenilil ciclasa soluble de túbulos seminíferos y el grado de maduración de la progenie espermática.

La función de la adenilil ciclasa de espermatozoides fue estudiada indirectamente observando los efectos de los inhibidores de fosfodiesterasa. La cafeína aumenta los niveles metabólicos y de movilidad en esperma epididimal de toro y en esperma eyaculado de toro, cerdo, carnero y hombre (112). Estos cambios son similares a los que ocurren como consecuencia de la capacitación de los espermatozoides. La capacitación es el proceso por el cual los espermatozoides maduros de los mamíferos son modificados por la hembra para permitir la fertilización del óvulo. En 1973, Morton y Albagli (113) demostraron que la adenilil ciclasa de espermatozoides de hamster capacitados por incubación en suero humano presentaban una actividad mucho mayor que la de los espermatozoides no capacitados.

Los trabajos de Braun (114, 115) demostraron que la ci

clasa del esperma de epidídimo de rata era dependiente de Mn^{++}, insensible a F^-, no estimulable por FSH y LH y estaba asociada a la membrana celular. Exceptuando la localización, todas las características anteriores son compartidas por la ciclasa soluble de túbulos seminíferos.

Herman et al (112) realizaron un estudio minucioso sobre la localización de la adenilil ciclasa de esperma eyaculado de toro. Encontraron que la fracción de membranas plasmáticas puras posee la mayor actividad específica, que el 70 % de la actividad total sedimenta a alta velocidad y que aproximadamente un 30 % de la actividad permanece en forma soluble, aún después de recentrifugado a 200.000 x g durante 2 hs. Es así que, las características del 30 % de la ciclasa de espermatozoides resulten idénticas a las de la enzima de túbulos seminíferos descriptos por Braun y Dods.

Estos hechos podrían sugerir que se trata de la misma enzima, que durante el desarrollo de la línea espermatogénica, se encuentra en el citoplasma, en forma libre o débilmente unida a membranas y que en el esperma maduro, tanto el eyaculado como el del epidídimo, se encontraría en su mayor parte (70 %) firmemente asociada a estructuras membranosas.

Si bien no se conocen los pasos de este eventual proceso, la incorporación a membranas de la adenilil ciclasa dependiente de Mn^{++} podría ocurrir durante la maduración de las espermátidas en el testículo o durante el transporte del esperma a través del epidídimo.

VI. LAS HORMONAS TIROIDEAS.

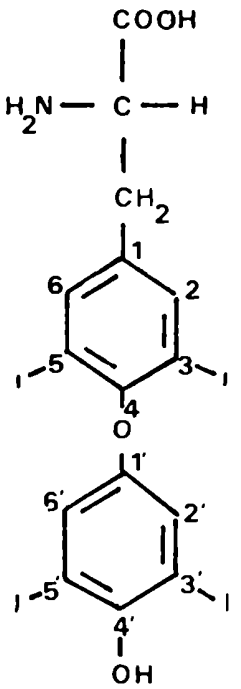
VI. 1 Estructura química y efectos biológicos.

El primer compuesto de acción hormonal conteniendo iodo fue aislado por Edward Kendall en 1914 y fue llamado tiroxina. Kendall pensaba que este compuesto de la glándula tiroides era un oxo-indol, y por eso fue originalmente llamado **tiroxindol**, luego acortado a tiroxin . La subsiguiente determinación por Harrington y Barger (116) de la estructura correcta y de la naturaleza aminoacídica de la hormona provocó la adición de la "a" terminal al nombre, dado que el sufijo "ina" se usa para nombrar a una amina.

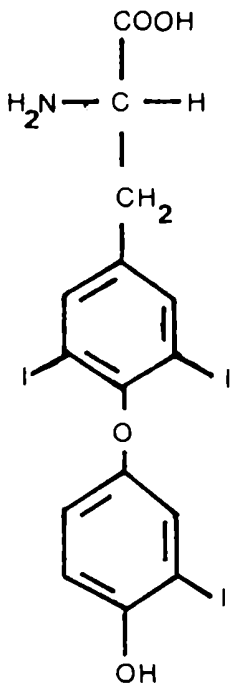
La otra hormona tiroidea, la 3, 5, 3' -triiodo-L-tironina (triiodotironina o T_3) fue descubierta en 1952 simultáneamente por Roche, Lissitzky y Michel (117) y por Gross y Pitt-Rivers (118).

La estructura de las hormonas tiroideas (figura 9) está caracterizada por la presencia de una función difenileter. En posiciones para respecto del oxígeno de la función éter se encuentra una función fenol sobre uno de los ciclos bencénicos y una cadena alanil sobre el otro.

Estudios de la estructura tridimensional de estas hormonas demostraron que la conformación de mínima energía es aquella en que los anillos aromáticos están en planos perpendiculares, participando la unión eter en un ángulo de 120º (figura 10).



3,5,3',5'-L-TETRAIODOTIRONINA
(TIROXINA o L-T_4)



3,5,3' -L-TRIIODOTIRONINA
(TRIIODOTIRONINA o L-T_3)

FIGURA 9

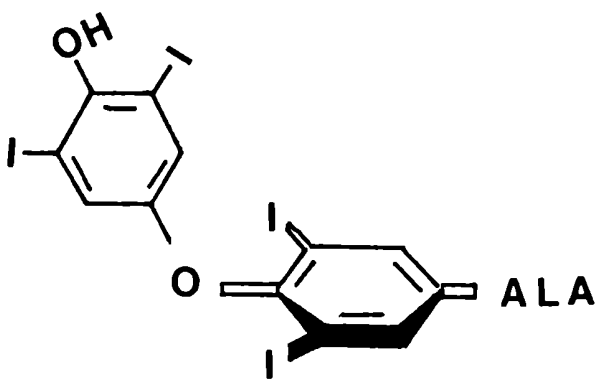


Figura 10:- Orientación espacial de los anillos aromálicos en la molécula de tiroxina.

Las hormonas tiroideas se sintetizan en las células foliculares de la glándula tiroides. Esta glándula se encuentra en todos los vertebrados. Desde el punto de vista evolutivo, la tiroides proviene de ciertas células especializadas del tracto digestivo de los cordades primitivos (Urocordados y Céfalocordados). En estos animales una estructura tubular del piso de la faringe, llamada endostilo, contiene células capaces de concentrar el iodo y de incorporarlo en una iodoproteína que es segregada al túbo digestivo e hidrolizada dando lugar a la formación de hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas liberadas al torrente sanguíneo son vehiculizadas desde la tiroides hasta los tejidos en asociación reversible con proteínas plasmáticas.

En el hombre, el 75 % de la T_4 está asociado a una glicoproteína específica llamada α-globulina ligadora de tiroxina (TBG) de 36.000 Dalton de peso molecular, el 15 % a una proteína que migra electroforéticamente delante de la albúmina, llamada prealbúmina (PA) de 57.000 Dalton de peso molecular, y el resto unido a la albúmina sérica cuyo PM = 66.000 Dalton.

En la tabla 5 figuran las concentraciones de las distintas hormonas tiroideas en el suero humano normal y de individuos hiper e hipotiroideos (117).

Las hormonas toriodeas circulantes pueden sufrir modificaciones metabólicas periféricas dando origen a compuestos iodados de importancia biológica. Por desiodación de T_4 y T_3 se llega

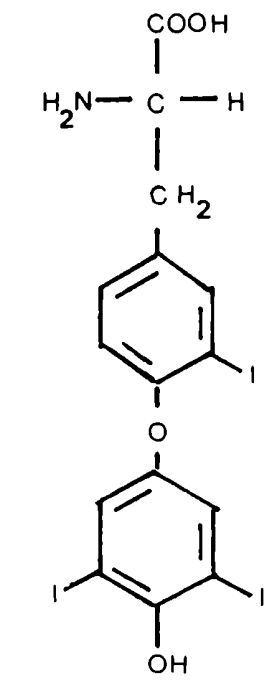
a la formación de otras tironinas iodadas: la 3, 3', 5'-triiodotironina (3, 3', 5' - T_3 o T_3 inversa o rT_3) y la 3, 3'-diiodotironina (3, 3'-T_2). Una parte de las hormonas tiroideas o de sus derivados de desiodación sufre desaminación oxidativa para dar dos derivados acéticos (ácidos triiodo o tetraiodo-tiroacéticos:TRIAC, TETRAC). Por descarboxilación todos estos compuestos pueden dar las correspondientes tiroaminas.

TABLA 5: Concentración sérica de hormonas tiroideas en individuos normales, hipo e hipertiroideos.

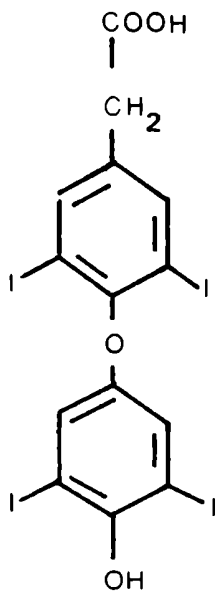
COMPUESTO	NORMAL	CONCENTRACION (M) HIPERTIROIDEO	HIPOTIROIDEO
T_4 total	$0,5 - 1,0. 10^{-7}$	$1,9. 10^{-7}$	$0,2. 10^{-7}$
T_4 libre	$3. 10^{-11}$	$1. 10^{-10}$	$0,6. 10^{-11}$
T_3 total	$2 - 4. 10^{-9}$	$1,1. 10^{-8}$	$1,3. 10^{-9}$
T_3 libre	$6. 10^{-12}$	-	-
DIT	$3 - 4. 10^{-9}$	-	-

En la figura 11 se encuentran las fórmulas de los compuestos derivados que tienen importancia biológica.

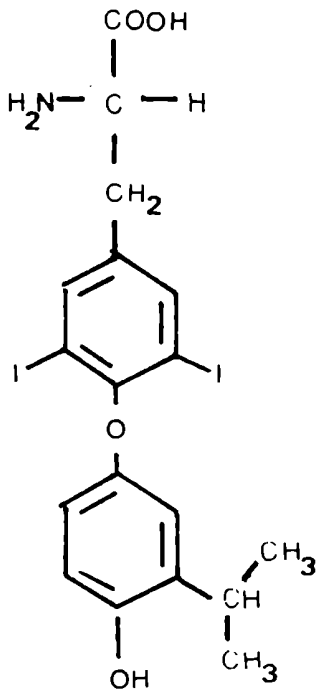
Los estudios de Schwartz et al (119) demostraron que en el hombre y en la rata, de un 30 a un 45 % de la T_4 total es degradada a T_3 en los tejidos periféricos.



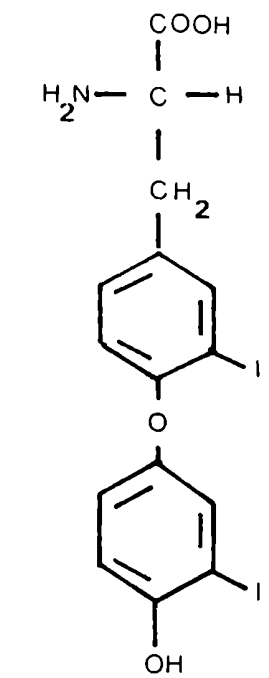
3,3',5'-TRIIODOTIRONINA



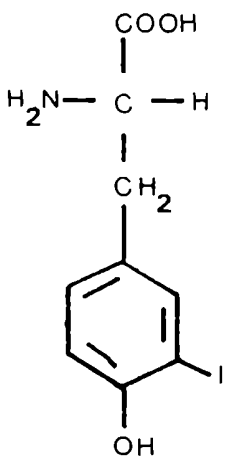
AC. 3,5,3',5'-TETRAIODOTIROACETICO



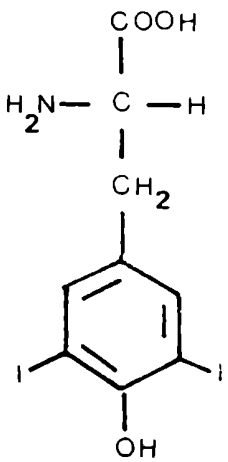
3,5-DIIODO-3'-ISOPROPIL TIRONINA



3,3'-DIIODOTIRONINA



3-MONOIODOTIROSINA (MIT)



3,5-DIIODOTIROSINA (DIT)

Figura 11:- Estructura de algunos compuestos derivados o análogos de las hormonas tiroideas.

Además, un 63 % de la T_3 total tiene su origen en la monodesiodación de T_4, mientras que el 37 % restante proviene de la secreción tiroidea. La elevada conversión de T_4 en T_3 a nivel extratiroideo y el hecho de que en la mayoría de los efectos biológicos, la T_3 es alrededor de 3 veces más activa que la T_4 han llevado a pensar que la T_3 podría ser la verdadera hormona tiroidea, en tanto que la T_4 sólo jugaría el rol de una pro-hormona.

Efectos producidos por las hormonas tiroideas (120).

Las múltiples acciones biológicas de las hormonas tiroideas pueden ser clasificadas en 2 categorías: aquellas que controlan el desarrollo y aquellas que aseguran la regulación de la actividad metabólica durante y después del desarrollo.

En el primer grupo se encuentran:

1) - Aceleración de la metamorfosis larval en anfibios: La exposición de renacuajos a las hormonas tiroideas mimetiza los eventos que acompañan a la metamorfosis espontánea: reabsorción de la cola, crecimiento de extremidades, alteraciones en la biosíntesis de hemoglobina, acortamiento del tracto gastrointestinal, y conversión del amoniotelismo al ureotelismo.

2) - Control del desarrollo del sistema nervioso en mamíferos:- Las hormonas tiroideas regulan la velocidad de crecimiento de la corteza cerebral, la ramificación axonal y dendrítica, como así también la mielinización. La evidencia bioquímica de una acción de las hormonas tiroideas en la maduración de las terminales

nerviosas estaría dada por la disminución selectiva en las ratas tiroprivas de dos enzimas mitocondriales sinaptosómicas: la succínico deshidrogenasa (Succinate: NAD^+ oxidoreductase, E.C. 1.3.1.6.) y la glutamato carboxilasa (L-glutamate 1-carboxylyase E.C. 4.1.1.15).

Por otra parte, es bien conocido en humanos el efecto retardatorio de todas las funciones intelectuales (cretinismo) causado por el hipotiroidismo precoz.

En el segundo grupo se encuentran:

3) - Aumento de la acumulación de aminoácidos neutros: La T_3 y la T_4 aumenta la acumulación de aminoácidos neutros en huevo embrionario de pollo y en linfocitos tímicos. Tanto el MIT como el DIT son ineficaces en tal sentido. En realidad el efecto consiste en un ratardo del eflujo de aminoácidos de la célula (121, 122).

4) - Aumento del consumo de O_2 y la producción de calor: La T_3 y la T_4 provocan un incremento en el consumo de O_2 en hígado y en músculo de rata, acompañado por un aumento en el K^+ intracelular y una disminución en la relación Na^+/K^+. Este efecto es debido a que las hormonas tiroideas son capaces de estimular la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ (ATP phosphohydrolase, E.C. 3.6.1.3) (123).

5) - Aumento en la síntesis de proteínas: Las hormonas tiroideas incrementan la síntesis de novo de numerosas enzimas. Entre ellas se encuentra la glicerol fosfato deshidrogenasa de

mitocondrias (sn-Glycerol-3-phosphate: NAD^+ oxidoreductase E.C. 1.1.1.8) que interviene en el ciclo de entrada a la mitocondria del poder reductor (NADH) generado en la glucólisis, la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ [threo-D_s-Isocitrate: NAD^+ oxidoreductase (decarboxilating), E.C. 1.1.1.41] que participa en la vía catabólica del ciclo de Krebs y la glucosa 6 P deshidrogenasa (D-Glucose-6-phosphate: $NADP^+$ 1-oxidoreductase, E.C. 1.1.1.49) y la 6 P gluconato deshidrogenasa (6-Phospho-D-gluconate: $NADP^+$ 2-oxidoreductase, E.C. 1.1.1.43) que intervienen en el ciclo de las pentosas.

6) - Potenciación del efecto de otras hormonas: En la rata, la potencia lipolítica de la adrenalina aumenta tres veces en presencia de las hormonas tiroideas. Además, T_3 y T_4 alteran la concentración de gonadotrofinas circulantes (FSH y LH). Aparentemente este efecto ocurriría a nivel de la secreción de las gonadotrofinas por la hipófisis ya que las velocidades de depuración de estas hormonas de la sangre no se ven afectadas por el estado tiroideo.

VI. 2 Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas a nivel molecular.

Las bases moleculares del mecanismo de acción de las hormonas tiroideas son hasta hoy prácticamente desconocidas. Tal situación no está originada en la falta de datos experimentales, sino por el contrario, por la gran diversidad de los efectos meta-

bólicos descriptos. Con el único fin de ordenar los datos disponibles se dividirá a los mecanismos de acción en aquellos que no involucran el AMP cíclico y aquellos mediados por el nucleótido cíclico. Estudios realizados en los últimos diez años demostraron la presencia de sitios de unión ("binding") específicos para L-T_3 o L-T_4 en numerosas fracciones subcelulares: núcleos (124,126), mitocondrias (124, 127, 128), membranas plasmáticas (129) y citosol (130, 131).

En 1972, el grupo Oppenheimer (125) demostró la existencia en núcleos de hígado y de riñón de sitios receptores de alta afinidad y capacidad limitada para la T_3.

En 1974 Oppenheimer, Schwartz y Surks (136) estudiaron las diferencias en la concentración de receptores nucleares para T_3 en diferentes tejidos de la rata: la máxima capacidad de "binding" se encontró en los núcleos de la hipófisis anterior, riñón, hígado y corazón; mientras que cerebro, bazo y testículo presentaron baja concentración de receptores, un hecho aparentemente concordante con la baja respuesta de estos últimos tejidos a las hormonas tiroideas. La capacidad de "binding" de los núcleos hepáticos es de 0,6 mg de T_3/mg DNA y la constante de asociación K_a=4,6. 10^{11} l/mol de T_3.

Los receptores nucleares están asociados a la cromatina y pueden ser solubilizados con NaCl 0,4 M o con soluciones ligeramente alcalinas, lo cual implica que son nucleoproteínas no histónicas. Por filtración de Sephadex G-100 se estimó que su PM se encuentra entre 60.000 y 70.000 Dalton (137).

De Groot y Torresani (138) demostraron la existencia de "binding" de L-T_3 a núcleos de hígado aislados. En experimentos *in vitro* demostraron que la unión de T_3 es máxima en incubaciones de 2 a 3 hs a 20ºC y que no requiere mediación de una proteína citosólica. Las propiedades del receptor nuclear descripto *in vitro* son similares a las del descripto *in vivo*.

Latham *et al* (139) realizaron una purificación parcial del receptor nuclear solubilizado de hígado, determinando una Kd para la L-T_3 de 10^{-9} M, un radio de Stokes de 3,5 nm, un coeficiente de sedimentación de 3,5 S y un PM de 50.500 con una relación friccional = 1,4. Además demostraron la ausencia de "binding" específico de la hormona tiroidea a enzimas nucleares purificadas como la DNA polimerasa, la deoxinucleotidil transferasa terminal, la poli A polimerasa y la RNA polimerasa I.

Un aporte fundamental al entendimiento del rol del receptor nuclear fue llevado a cabo por Mcleod y Baxter en 1976 (140): utilizando DNA unido covalentemente a celulosa (como matriz inerte) demostraron que tanto la triiodotironina marcada libre, como la unida a proteínas inespecíficas eran incapaces de asociarse a la DNA-celulosa; en cambio había una asociación específica entre el complejo $\underline{[^{125}I]\text{-}T_3}$ *-receptor nuclear* aislado y la DNA-celulosa. Un año más tarde, Blake y Oatley (141) descubrieron, mediante la técnica de difracción de rayos X, que la molécula de *prealbúmina* (una de las proteínas séricas transportadoras de hormonas tiroideas) presentaba en su superficie

dos regiones complementarias en tamaño y forma al DNA doble cadena. Lo notable es que la prealbúmina, tiene 55.000 Dalton de peso molecular y dos sitios de unión para la $L\text{-}T_4$, uno con un Kd= $1. 10^{-8}$ M y otro con un Kd= $0,1. 10^{-5}$ M. En vista de que no se conoce ninguna relación funcional entre la prealbúmina y el DNA, los autores propusieron un origen común para esta proteína y los receptores nucleares de hormonas tiroideas, en virtud a su capacidad de unirse al DNA.

De los estudios del receptor nuclear, se puede deducir que las hormonas tiroideas deben penetrar en el núcleo para ejercer su acción, al igual que las hormonas esteroides. Sin embargo, la diferencia fundamental con éstas últimas es que no necesitan asociarse a un receptor citoplásmico para luego unirse al DNA, sino que el receptor es una proteína ya presente en la cromatina.

Recientemente, Samuels et al (142) demostraron que las hormonas tiroideas en concentraciones fisiológicas podían controlar la velocidad de crecimiento y la utilización de glucosa en un cultivo de células de hipófisis de rata, la línea tumoral GH_1. Este sistema de células somatotróficas fue el primer sistema in vitro que respondió significativamente a la acción de las hormonas tiroideas. Más tarde el mismo grupo describió una correlación cuantitativa entre la ocupación de receptores nucleares y la estimulación de la síntesis de hormona de crecimiento por ac-

ción de la L-T_3 sobre las células en cultivo (143). La evidencia definitiva provino de los trabajos de Seo et al (144): al hacer crecer a la línea celular de hipófisis (GH_3) en un medio deficiente en hormonas tiroideas, detectaron una marcada disminución en la secreción de la hormona de crecimiento y en la cantidad de RNA mensajero específico para dicha hormona proteica. La adición de triiodotironina revirtió totalmente ambos efectos en 48 hs. Sin embargo, la hormona tiroidea no tuvo ningún efecto en la secreción de prolactina ni en la cantidad de RNA mensajero para prolactina en las mismas células. Estos datos sugieren que las hormonas tiroideas son capaces de inducir la actividad transcripcional de manera selectiva,"destapando" ciertas regiones del genoma y no otras.

En cuanto a la presencia de receptores para hormonas tiroideas en el citosol, Spaulding y Davis encontraron en hígado de rata proteínas solubles capaces de unir específicamente tiroxina. Estos autores sometieron un sobrenadante de 100.000 x g previamente incubado con tiroxina radioactiva, a electroforesis en gel de poliacrilamida y detectaron en hembras tres componentes que contenían hormona radioactiva unida, y solamente dos en machos. Los pesos moleculares estimados para los componentes proteicos mencionados fueron de 130.000, 95.000 y 45.000 Dalton. El componente que no aparece en los citosoles de hígado de machos es el de 130.000. Es interesante destacar que éste último componente puede ser inducido en los machos por administración de estradiol.

Posteriormente, en 1975, Defer et al (135) describieron, mediante una metodología diferente, algunas propiedades de los receptores específicos para L-T_3 en citosol hepático. Comprobaron que el receptor soluble (constante de sedimentación 3,6 S) era diferente del nuclear y de la TBG, y que el complejo citosol-$[^{125}I]$-T_3 era incapaz de pegarse al DNA en las condiciones en que lo hace el receptor nuclear.

Además del hígado, otros tejidos presentan receptores solubles para T_4 o T_3.

Sterling et al los detectaron en riñón humano y de rata (133), y Geel (145) en cerebelo de rata.

Un tipo de efecto no relacionado con los anteriores y generalmente no comentado en la literatura es el descripto por Wolff y Wolff (146) hace más de veinte años. Estos autores encontraron que la tiroxina en concentraciones cercanas a las fisiológicas inhibe sensiblemente la actividad de numerosas deshidrogenasas que contienen Zn^{++}, entre ellas, la málico, glutámico, láctico, isocítrico, alcohol y glucosa -6- fosfato deshidrogenasas. Además, en el caso de la glutámico deshidrogenasa, la tiroxina causaría la disociación de la enzima nativa en dos subunidades de menor tamaño (147).

Por último, recientemente de Mendoza y Farías (148, 149) estudiaron el papel de T_3 y T_4 como moduladores de las transiciones alostéricas de enzimas asociadas a la membrana. La exposición de ratas por diferentes períodos de tiempo a bajas tem-

peraturas (4°C) anula las características alostéricas de la inhibición por fluoruro de la acetilcolinesterasa asociada a membranas de eritrocito.

Los autores detectaron que los factores responsables del fenómeno de desensibilización alostérica se encontraban en el plasma de las ratas expuestas al frío, y los identificaron como L-triiodotironina, L-tiroxina y tirotrofina.

VI. 3 Hormonas tiroideas y AMP cíclico.

Las evidencias respecto del papel de los nucleótidos cíclicos como intermediarios de la acción de las hormonas tiroideas son tan numerosas como contradictorias. De existir tal intermediación, parecería que no es el principal mecanismo de acción de dichas hormonas ni estaría uniformemente distribuido.

En 1975 Fernandez-Pol y Hays (150) estudiaron las alteraciones de los niveles de AMP cíclico y GMPc en distintos tejidos de perro después de una inyección intravenosa de triiodotironina (100-200 µg/kg de peso). Luego de un período de latencia 30-45 minutos, el AMP cíclico del plasma se incrementó en un 165 % respecto del control, mientras que el GMPc no varió.
En hígado, la concentración de AMP cíclico disminuyó un 54 %, en tanto el GMPc aumentó un 137 %. Por otro lado, mientras en el tejido adiposo de los animales controles, los niveles de AMP cíclico decayeron durante el transcurso del experimento, en el de los

animales tratados con L-T_3 se mantuvieron estables. Estos experimentos in vivo nos muestran que los patrones de respuesta de los nucleótidos cíclicos a las hormonas tiroideas pueden sen completamente diferentes en los distintos tejidos.

Levey y Epstein (151, 152) describieron la activación de la adenilil ciclasa de miocardio de gato por las hormonas tiroideas. La concentración de tiroxina que producía la mitad de la respuesta máxima era 5×10^{-7} M y de triiodotironina, 6×10^{-7} M Casillas y Hoskins (153) también observaron activación de la adenilil ciclasa de espermatozoides de mono por L-T_3 y L-T_4. La respuesta a la concentración de L-T_3 fue bifásica, con una estimulación máxima a un nivel de hormona de 4×10^{-6} M. Estos investigadores encontraron que la fructólisis anaerobia del espermatozoide responde a la L-T_3 de una manera bifásica similar a la encontrada para la adenilil ciclasa.

Un efecto opuesto, es decir, inhibición de la adenilil ciclasa, fue descripto recientemente por Friedman et al (154) en membranas de tiroides bovina.

Los autores determinaron que la L-T_3, a una concentración de 5×10^{-5} M, inhibía en un 15% la actividad basal de la adenilil ciclasa. Dicha inhibición llegaba a un 50% a concentraciones del orden de 10^{-4} M. Además la L-T_3 era capaz de revertir la estimulación de la ciclasa por tirotrofina y prostaglandina E_2 pero no afectaba a la estimulación por fluoruro. La inhi

bición resultó ser de tipo competitivo. Al solubilizar la enzima de las membranas de tiroides con Lubrol PX, la estimulación por tirotrofina desaparecía, conservándose sin embargo la sensibilidad a la L-T_3. Si bien las concentraciones de L-T_3 necesarias para obtener un efecto inhibitorio considerable eran mucho más altas que los fisiológicas, los autores consideran que no se trata de un efecto tóxico o no específico, fundamentalmente debido al hecho de la incapacidad de la L-T_3 de revertir la activación por F^-.

La inhibición de la ciclasa de tiroides podría explicar observaciones previas sobre la capacidad de las hormonas tiroideas de disminuir la acumulación intracelular de AMP cíclico en dicha glándula (155-157). De esta manera, un alto nivel de hormona tiroidea circulante, no sólo disminuiría la producción de tirotrofina (TSH) por la hipófisis, sino también impediría la acción de la TSH sobre la glándula tiroidea, bloqueando el efecto activador de la TSH sobre la adenilil ciclasa de dicha glándula.

Numerosas evidencias indicarían que las hormonas tiroideas inhiben a la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. La primera de ellas fue publicada en 1967 por Mandel y Kuehl (158) quienes se hallaban investigando el mecanismo por el cual la L-T_3 aumenta la actividad lipolítica de la adrenalina. Los autores encontraron un 55 % de inhibición en las fosfodiesterasas de tejido adiposo de rata y de corazón de vaca ensayadas en presencia de L-T_3

a una concentración de 10^{-3} M. La L-T_4 fue prácticamente inefectiva en la inhibición. Posteriormente, Marcus informó que la L-T_4, a concentración de 10^{-5} M, inhibe competitivamente a las fosfodiesterasas de alto y bajo Km, tanto de fracciones particuladas como solubles de tejido óseo de rata (159). Van Inwegen et al (160) comprobaron que las células grasas de ratas con hipotiroidismo experimental no responden a los agentes lipolíticos y que la fosfodiesterasa de AMP cíclico de bajo Km, unida a membrana de esas células, está elevada por encima de los valores normales. El tratamiento in vivo de las ratas hipotiroideas con L-T_3 restituye la actividad de la enzima a niveles similares a los controles. El efecto inhibitorio fue confirmado en la fosfodiesterasa de la glándula tiroides humana (161) y en la de cartílago epifisario de pollo (162).

En cuanto a la influencia de las hormonas tiroideas sobre las proteína-quinasas, se ha informado que la actividad de la proteína-quinasa asociada a la fracción de proteínas cromatínicas no hostónicas, obtenida de miocardio de rata, aumenta después de inyectar a los animales con triiodotironina.

Por otro lado las proteína-quinasas citosólicas no son afectadas por tal tratamiento (163).

Ya se ha comentado el papel de las hormonas tiroideas como inductoras de la síntesis de proteínas, especialmente con actividad enzimática. Aparentemente la adenilil ciclasa estaría

bajo este tipo de control. En este sentido, Krishna et al (164) demostraron en 1968 que en ratas hipotiroideas, la actividad de adenilil ciclasa de células grasas estaba disminuída respecto de las de ratas eutiroideas, mientras que en las hipertiroideas estaba aumentada. Estos resultados fueron confirmados por experimentos in vitro realizados por el mismo grupo (165): incubaron células grasas aisladas durante 2 hs con y sin agregado de T_3 10^{-6} M y con y sin agregado de puromicina (inhibidor de síntesis de proteínas a nivel de traducción) 10^{-5} M, y observaron que en presencia de la hormona había una inducción del 60% de la actividad de adenilil ciclasa y que dicha inducción era bloqueada totalmente por la puromicina. Otra línea de evidencias más reciente indicaría que las hormonas tiroideas inyectadas in vivo producen un aumento del número de receptores β -adrenérgicos en membranas de miocardio de rata, sin modificación alguna de la afinidad de las catecolaminas por su receptor (166).

Los efectos descriptos en los párrafos anteriores son coherentes con el hecho de que las hormonas tiroideas potencian el efecto lipolítico de las catecolaminas (160, 167) y con la taquicardia característica del síndrome hipertiroideo.

En la figura 12 se encuentra un esquema con los plausibles modos de acción de las hormonas tiroideas, las catecolaminas y las metilxantinas en la movilización de los ácidos grasos libres del tejido adiposo.

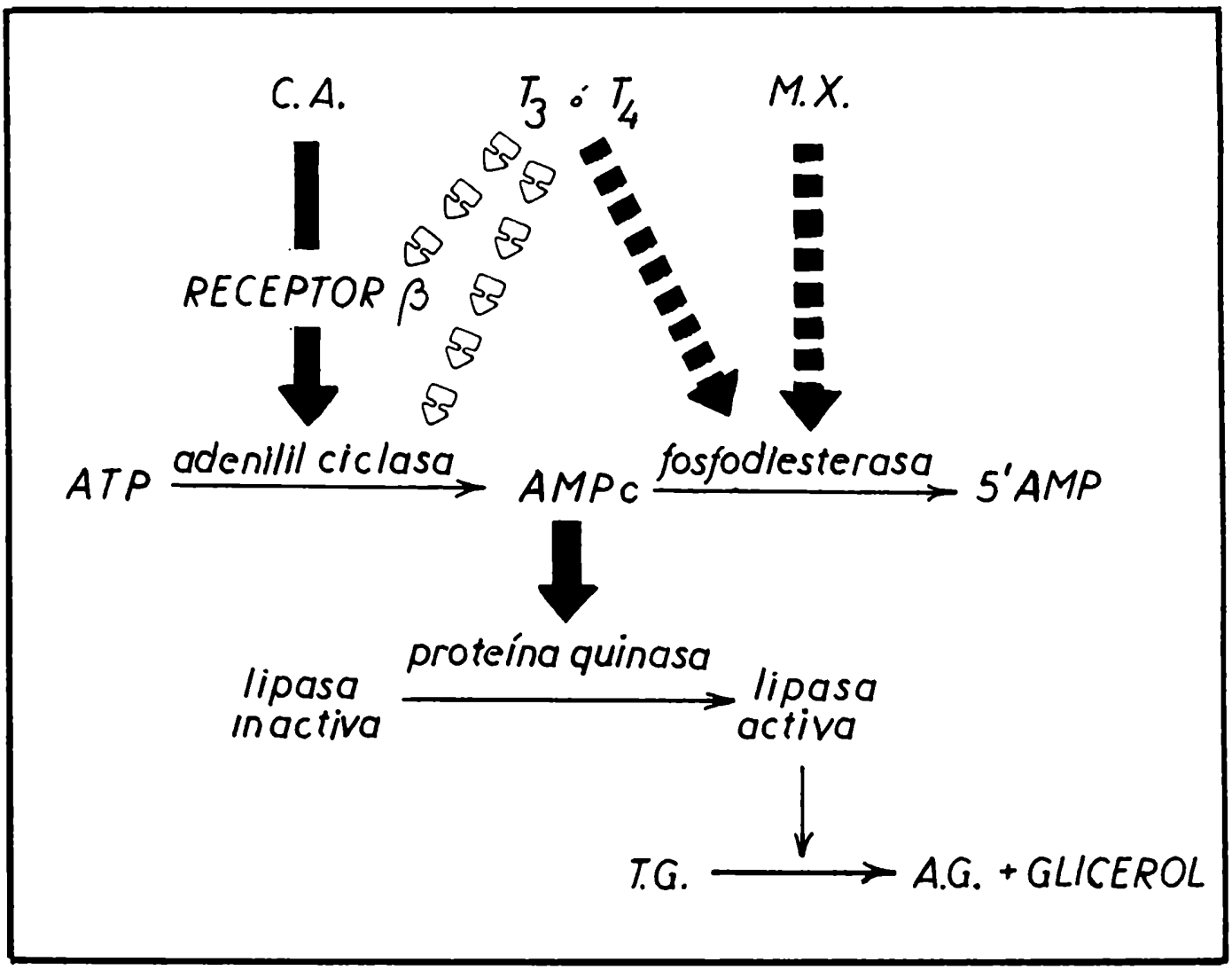


Figura 12:- Participación de las catecolaminas (C.A.), las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) y las metilxantinas (M.X.) en la lipólisis.
T.G.= triglicérido; A.G.= ácidos grasos.
Las flechas llenas indican los pasos de activación.
Las flechas punteadas, los pasos de inhibición.
Las flechitas vacías señalan procesos de inducción a nivel de síntesis de proteínas.

VII. LA ADENILIL CICLASA DE Neurospora crassa.

VII. 1 Neurospora crassa.

Neurospora crassa es un hongo ascomicete perteneciente a la familia de las Sordariaceae. Al igual que todos los hongos de la clase Ascomycetes y la subclase Euascomycetidae, su cuerpo vegetativo está constituido por un micelio formado por un entretejido de hifas tabicadas. Los tabiques transversales no son completos, sino que tienen en el centro un poro por donde se continúan las membranas plasmáticas de las células adyacentes. Las hifas se alargan por crecimiento apical y sus células pueden ser uni o multinucleadas. Los núcleos de las hifas vegetativas poseen un sólo complemento cromosómico, es decir, son haploides. La reproducción ocurre de manera asexual por la formación de conidias, o bien de manera sexual por la formación de ascosporas. En el primer caso (ciclo asexual) el micelio vegetativo desarrolla hifas diferenciadas (conidióforos) en cuyos extremos se producen sucesivas divisiones mitóticas y fragmentaciones que dan origen a numerosas conidias o esporas asexuales. Las conidias, al encontrarse en un medio apropiado, germinan originando nuevamente el micelio haploide. El ciclo de vida sexual ocurre si se encuentran dos micelios de tipo de apareamiento diferente (heterotalismo). En ambos micelios pueden desarrollarse estructuras femeninas y masculinas, pero la fecundación sólo ocurre entre estructuras de mi

celios heterotálicos. La parte femenina consta de estructuras pluricelulares llamadas protoperitecios que en su interior contienen al órgano sexual femenino o ascogonio. El ascogonio es una célula globosa, con numerosos núcleos haploides, la cual emite una prolongación filiforme de su protoplasma llamada tricogino. El tricogino funcionará como un pelo aceptor de las células masculinas que pueden ser conidias, microconidias o simplemente hifas del micelio con tipo de apareamiento opuesto. Estos elementos masculinos descargan sus núcleos haploides en el interior del tricogino y éstos núcleos se fusionan de a pares con los núcleos del ascogonio, generando numerosos núcleos diploides (proceso conocido como cariogamia). Cada núcleo diploide(única fase 2n del ciclo de vida del hongo) se dividirá por meiosis originando cuatro núcleos haploides, y cada uno de éstos se divide por mitosis originándose así ocho ascosporas. Las ascosporas quedan localizadas en una estructura en forma de saco llamada asco. El protoperitecio luego se transforma en un peritecio, que es el cuerpo de fructificación en forma de botella característico de las Sordariaceae. Cada peritecio posee entonces numerosos ascos portadores de ascosporas. Las ascospores son células resistentes a condiciones ambientales adversas, que al germinar en el medio adecuado generan nuevamente el micelio vegetativo. En la figura 14 se esquematizan los ciclos biológicos de reproducción asexual y sexual.

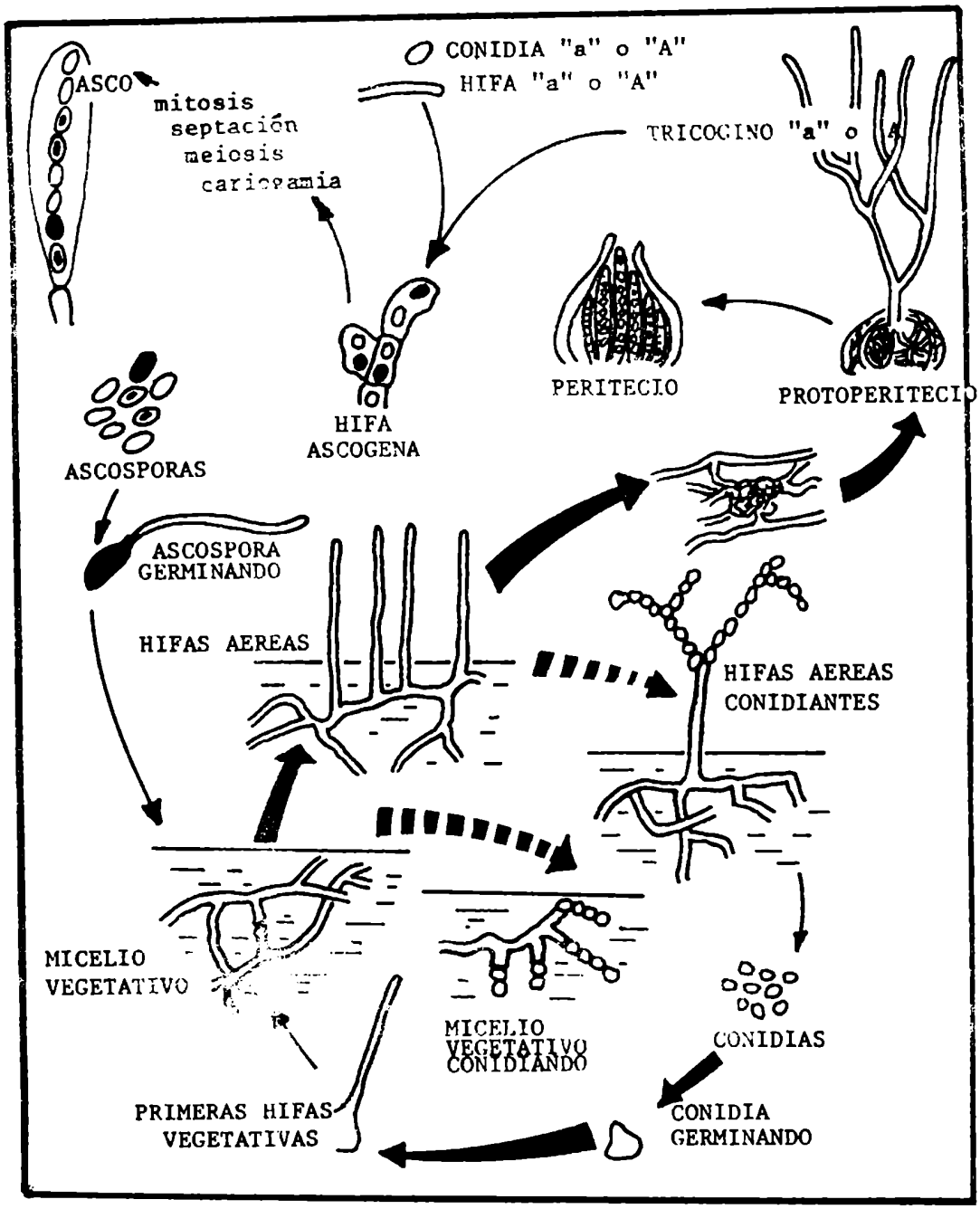


Figura 14:- Ciclo biológico de Neurospora crassa. Las flechas gruesas llenas indican los posibles pasos estimulados por el AMP cíclico. Las flechas gruesas punteadas, los pasos inhibidos por el nucleótido.

VII. 2 Metabolismo del glucógeno en Neurospora crassa.

La Neurospora es un organismo que ha sido motivo de numerosos estudios tanto desde el punto de vista genético como del bioquímico. La facilidad con que se lo cultiva en el laboratorio y la existencia de numerosos mutantes morfológicos y bioquímicos han hecho de Neurospora un material biológico modelo.

Los estudios sobre la regulación del metabolismo del glucógeno y el papel del AMP cíclico en N.crassa fueron llevados a cabo por el grupo dirigido por el Dr. Torres en la Fundación Campomar. Los trabajos de Téllez Iñón, Terenzi y Torres (171, 172) demostraron que el metabolismo del glucógeno en N.crassa está regulado de una manera similar a lo que ocurre en tejidos de mamíferos y de modo diferente a la regulación en bacterias. La sintetasa de glucógeno del hongo presenta dos formas interconvertibles. Una es dependiente de glucosa 6-P (D) y la otra es independiente de ese éster fosfórico (I).

La conversión in vitro de la forma I a la forma D requiere ATP-Mg^{++} mientras que la transformación inversa sólo requiere Mg^{++} (171). Por otra parte, la fosforilasa de glucógeno también presenta dos formas interconvertibles: una activa (forma a) y la otra inactiva (forma b) en ausencia de 5'AMP. La conversión de la forma b a la a requiere ATP-Mg^{++} y es estimulada por la presencia de AMP cíclico (172). Además, fueron identificadas las enzimas responsables de la activación e inactivación de

la fosforilasa de glucógeno: la quinasa de fosforilasa b y la fosfatasa de fosforilasa que a su vez presenta dos formas interconvertibles en los extractos del micelio. La conversión hacia la forma más activa requiere ATP-Mg^{++} (173, 177). De esta manera, el metabolismo del glucógeno en N.crassa responde a un esquema de interconversiones enzimáticas a tres niveles: activación de la fosforilasa, inactivación de la fosforilasa e inactivación de la sintetasa de glucógeno estando el primer evento controlado por AMP cíclico (comparar con el sistema de hígado descripto en la figura 6).

VIII. 3 La adenilil ciclasa de Neurospora crassa.

En 1972, Flawiá y Torres (3) describieron la existencia de una actividad de adenilil ciclasa en lisados celulares de una mutante "slime" de N.crassa (FGSC 1118). Esta mutante carece de la pared celular polisacarídica característica del micelio y crece como protoplastos aislados. La enzima está fundamentalmente asociada a la membrana plasmática, es totalmente dependiente de Mn^{++} para su actividad y no puede ser activada por fluoruro ni por GTP, ACTH o catecolaminas. Además los mismos autores comprobaron que el verdadero sustrato de la enzima es el complejo Mn-ATP, que el ATP puede funcionar como inhibidor desplazando al sustrato del sitio catalítico y que el Mn^{++} funciona como activador de la enzima sólo a bajas concentraciones del sustrato (174).

La enzima fue solubilizada por tratamiento de las membranas con el detergente no iónico Lubrol PX y fue parcialmente purificada por cromatografía en columna de DEAE-celulosa, encontrándosele una constante de sedimentación de 7,1 S (175).

Por otra parte, cuando se incubaron membranas de N.crassa "slime" con glucagón, se observó estimulación de la actividad de la adenilil ciclasa (176). El glucagón no activó a la ciclasa solubilizada con Lubrol PX. Además, al agregar glucagón a un cultivo del hongo, se observó un incremento en la velocidad de glucogenólisis, un incremento en la actividad de la glucógeno fosforilasa y una disminución en la actividad de la glucógeno sintetasa. Todos estos efectos corroboran las similitudes existentes entre los mecanismos de control de N.crassa y células animales.

Además del efecto del glucagón, Flawiá y Torres encontraron que la ciclasa de la mutante "slime" es inhibida por insulina de un modo pseudocompetitivo (24). La inhibición es contrarrestada por glucagón y sólo se observa a bajas concentraciones del sustrato Mn-ATP. La actividad de la enzima no es modificada por las cadenas polipeptídicas aisladas de la insulina (A y B), ni por otras hormonas peptídicas que contienen puentes disulfuro como la vasopresina o la hormona de crecimiento (178).

VII. 4 Papel del AMP cíclico en la diferenciación de Neurospora crassa.

El ciclo de vida asexual de la cepa salvaje de N.crassa puede ser dividido en los siguientes pasos:

1) - Germinación de las conidias y formación de hifas vegetativas;
2) - Elongacion y ramificación de las hifas vegetativas formando un micelio sumergido en medio líquido, o rastrero en medio sólido;
3) - Diferenciación de hifas que se alargan alejándose de la superficie del medio (hifas aéreas); y
4) - Formación de cadenas de conidias en los extremos de las hifas aéreas (ver figura 14).

Existe una familia de mutantes de Neurospora, denominada "crisp", que se caracteriza por poseer un fenotipo colonial con ausencia total de hifas aéreas y una acumulación prematura de conidias sobre la superficie del medio de cultivo. El fenotipo "crisp" está determinado por mutaciones en alguno de tres loci diferentes: cr-1, cr-2 y cr-3. Estos loci no son alélicos y están ubicados en el brazo derecho del grupo de ligamiento I del hongo (N.crassa tiene siete grupos de ligamiento) en las cercanías del centrómero. En 1975 Torres et al (70) observaron que una cepa "slime" de N.crassa, la FGSC 326, presentaba una actividad de adenilil ciclasa muy reducida respecto de la cepa FGSC 1118 utilizada en los estudios descriptos anteriormente. La cepa "slime" 326 había sido aislada por mutagénesis de una cepa micelial, la FGSC 329. Esta última poseía fenotipo "crisp" y también presentaba muy

baja actividad de ciclasa. Haciendo una evaluación de la actividad enzimática en diferentes cepas del hongo, los autores demostraron que sólo las cepas portadoras de la mutación cr-1 tenían bajos niveles de actividad de ciclasa. Las mutantes cr-2 y cr-3, que presentan el mismo fenotipo que la cr-1, tienen actividad de ciclasa normal (70, 179).

Además, Terenzi et al (179) demostraron que la morfología "crisp" de los mutantes cr-1 era consecuencia de la reducción en la síntesis de AMP cíclico, ya que la adición de nucleótido cíclico, o de su derivado el dibutiril AMP cíclico, al medio de cultivo hacía que la mutante cr-1 adoptara un fenotipo similar al de las cepas salvajes (fenocopia). Sin embargo, la adición de AMP cíclico a los medios de cultivo de las cepas cr-2 y cr-3 no revierte la morfología "crisp", hecho que podría indicar que estas mutantes presentan lesiones en alguna etapa de las rutas metabólicas controladas por el AMP cíclico.

Confirmando los hallazgos anteriores, el mismo grupo determinó que los niveles intracelulares de AMP cíclico eran diez a veinte veces más altos en las cepas salvajes que en las portadoras de la mutación cr-1 (180).

En las cepas salvajes esos niveles permanecen constantes durante la mayor parte del período de crecimiento, excepto durante un corto lapso, al comienzo de la fase estacionaria, en el cual se produce un marcado incremento de la concentración del nucleótido.

Si bien aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares de la acción del AMP cíclico sobre el control de la morfología en N.crassa, recientemente han aparecido dos contribuciones tendientes a dilucidar ese interrogante. En primer lugar, Judewicz y Torres (181) encontraron que el AMP cíclico estimula la fosforilación de núcleos de cepas "slime" de N.crassa. La fracción de proteínas nucleares que se fosforila preferencialmente es la de proteínas no histónicas de la cromatina. Además comprobaron que la capacidad de transcribir RNA mensajero es mayor en la cromatina extraída de núcleos fosforilados que en la obtenida de núcleos no fosforilados. Estos resultados podrían indicar que, al menos en parte, la regulación por AMP cíclico ocurriría a nivel de la transcripción de determinadas secuencias genómicas.

Por último, Judewicz, Glikin y Torres (182) describieron la presencia de tres actividades de quinasas de proteína en la fracción correspondiente al sobrenadante de 105.000 x g de un micelio de N.crassa cepa salvaje, cosechado en la fase logarítmica de crecimiento. Estas actividades enzimáticas fueron resueltas por cromatografía en DEAE celulosa y una de ellas es estimulable por AMP cíclico. Los autores enfatizaron que esta actividad de quinasa dependiente de AMP cíclico sólo es detectable en los estadíos tempranos del crecimiento del hongo, hecho que concuerda con el papel estimulador de la formación de hifas aéreas que cumple el nucleótido en ese período. Por otra parte, fueron caracterizadas las otras dos actividades de quinasa independiente de AMP cíclico de función desconocida.

MATERIALES Y METODOS

I. PREPARACION DEL SUSTRATO RADIOACTIVO DE LA ADENILIL CICLASA: $[\alpha^{32}P]$ ATP.

El método de ensayo de adenilil ciclasa usado en esta tesis se basa en la cuantificación del AMPc marcado radioactivamente con ^{32}P, para lo cual se utilizó como sustrato al ATP marcado con ^{32}P en la posición α, ya que éste es el único fosfato que se conservará en la molécula del producto, luego de la catálisis enzimática (figura 15).

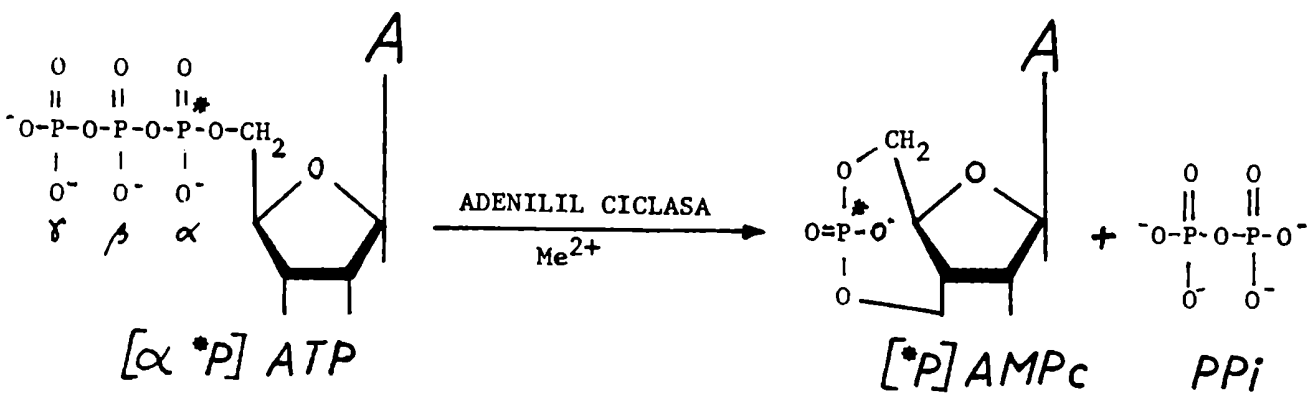


FIGURA 15

La síntesis del $[\alpha^{32}P]$ ATP fue realizada por dos procedimientos diferentes que se detallan a continuación:

I. 1 Procedimiento descripto por Flawiá y Torres (3):

Este método involucra dos pasos:

1º:- Síntesis química que implica la esterificación del $^{32}PO_4H_3$ con el oxhidrilo de posición 5' de la isopropilidén-adenosina (figura 16), seguida de una hidrólisis ácida del grupo isopropilideno para obtener 5' AMP marcado con ^{32}P.

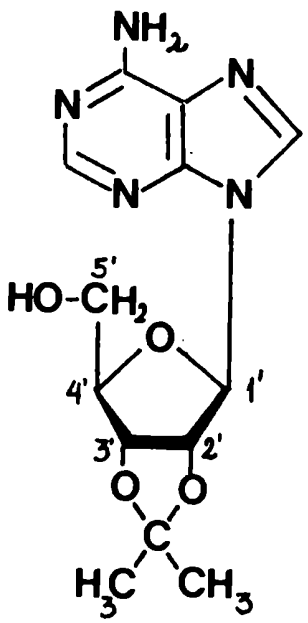


Figura 16: Isopropilidén adenosina.

2º:- Síntesis enzimática del $[\alpha^{32}P]$ ATP usando como material de partida el producto de la reacción anterior:

$$[^{32}P]\ 5'AMP + ATP \xrightarrow[\text{mioquinasa}]{Mg^{2+}} [\alpha^{32}P]\ ADP + ADP$$

$$[\alpha^{32}P]\ ADP + PEP \xrightarrow[\text{piruvato quinasa}]{K^{+}} [\alpha^{32}P]\ ATP + PIRUVATO$$

Se procedió de la siguiente manera: La solución clorhídrica de fosfato inorgánico radiactivo (50 mCi) se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. El sedimento se retomó en aproximadamente 3 ml de agua, agregándose 5 µmoles de fosfato inorgánico "frío." Volvió a evaporarse a sequedad y a retomarse el sedimento en agua. Este procedimiento se

repitió tres veces con el objeto de eliminar por completo el ácido clorhídrico en que viene disuelto el ^{32}Pi. Al sedimento de la última evaporación se le agregaron 60 mg (aprox. 200 µmoles) de isopropilidenadenosina y se secó con acetonitrilo en línea de vacío según Greenless y Symons (183). Una vez que estuvo totalmente seca la preparación, se realizó la síntesis química:

Se preparó una mezcla de dimetilsulfóxido (solvente) 3,2 ml; tricloracetonitrilo (agente condensante) 20 µl y trietilamina (catalizador) 25 µl. Se agregó rápidamente la mezcla al balón de reacción donde estaban el ^{32}Pi y la isopropilidénadenosina, se tapó herméticamente y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Luego se agregaron 6 ml de ácido acético 5 N y se calentó en baño de agua, con el balón destapado, a 100°C durante 1 hora (hidrólisis). Al cabo de ese tiempo, el contenido del balón se evaporó a sequedad, se resuspendió en 3 ml de agua y se evaporó nuevamente. Este procedimiento se repitió cuatro veces.

Síntesis enzimática:

El sedimento de la última evaporación ([^{32}P] 5'AMP) fue incubado durante 20 minutos, a 37°C en una mezcla de la siguiente composición:

buffer TRIS-HCl	100 mM pH = 7,4
$Mg\ Cl_2$	15 mM
K Cl	100 mM
ATP	0,16 mM
PEP	7,5 mM
piruvato quinasa	20 µg/ml
mioquinasa	200 µg/ml

El volumen total fue de 3,2 ml y la reacción se detuvo por el agregado de 3 ml de metanol, calentando luego en baño de agua a 100ºC durante 3 minutos.

Purificación del [α^{32}P] ATP:

Después de finalizada la síntesis enzimática, el contenido del balón fue sembrado en una columna de DEAE-Sephadex A 25 (1 x 9 cm) forma bicarbonato, previamente lavada y equilibrada con agua destilada. Una vez que la muestra penetró en la columna cromatográfica, se eluyó con un gradiente contínuo de bicarbonato de trietilamina pH = 7,5; de 0 a 1 M (volumen total 200 ml). Se recogieron fracciones de 7-8 ml, y la presencia de radioactividad en cada fracción fue estimada semicuantitativamente mediante el uso de un monitor marca Nuclear, modelo FM. Un perfil típico de la columna de DEAE-Sephadex puede verse en la figura 17.
Se juntaron las fracciones correspondientes al pico de ATP llevándoselas a sequedad en un evaporador rotatorio, o bien por congelamiento a -20ºC y luego liofilización en un liofilizador marca F.T.S. El residuo se resuspendió en 5 ml de metanol, se evaporó nuevamente y por último se retomó en un volumen apropiado de agua destilada (usualmente de 1 a 4 ml).
La caracterización del ATP radioactivo se hizo por cromatografía ascendente en hojas de polietilén-imino-celulosa, conteniendo reactivo fluorescente, usando como solvente cloruro de litio 1,5 M.
La posición de los nucleótidos utilizados como patrones (ATP, ADP

y AMP) fue detectada bajo luz UV emitida por una fuente marca Mineralight.

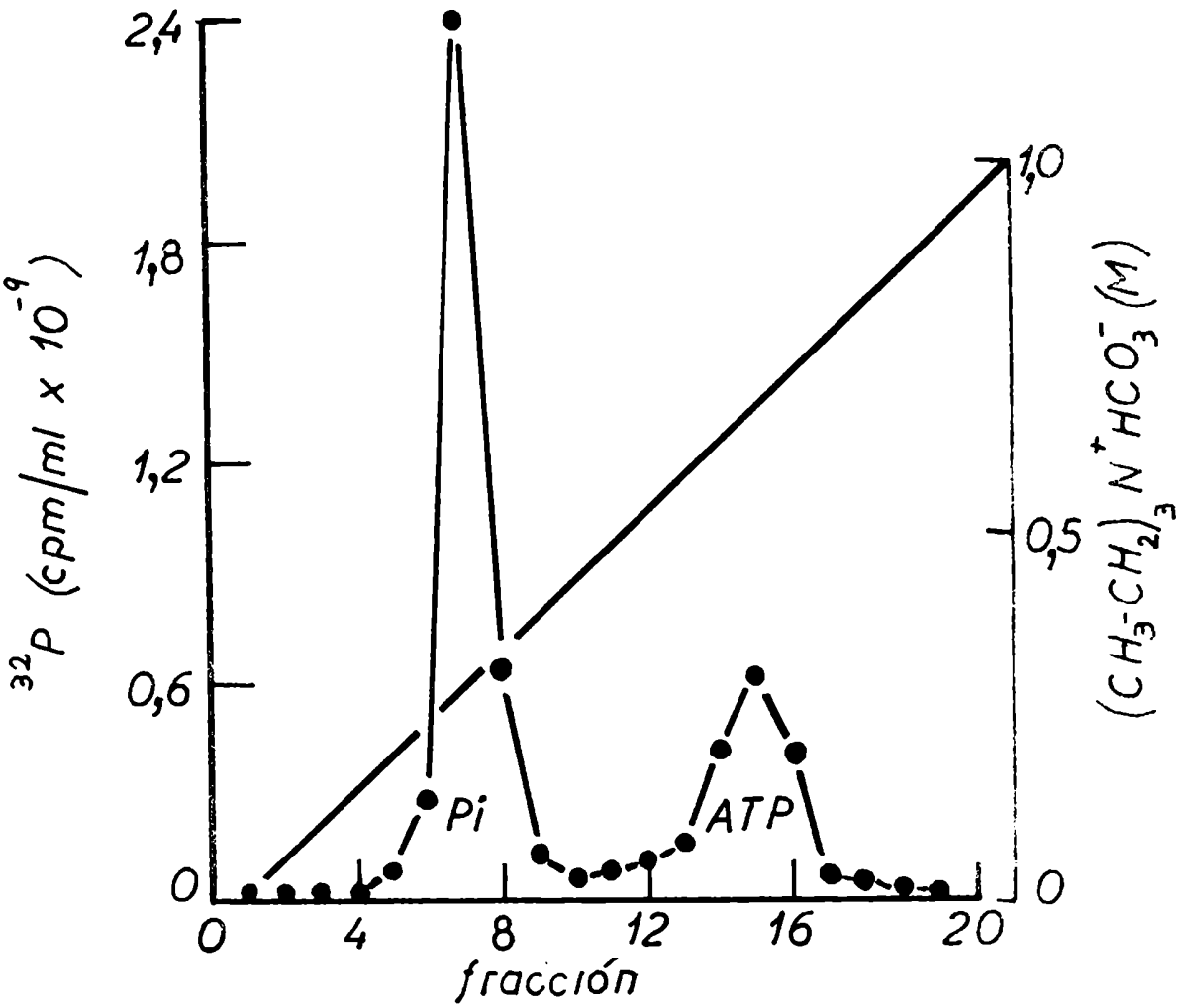


FIGURA 17

I. 2 Procedimiento descripto por Reeve y Huang (184)

En este método, la "síntesis química" del método I.1 es

reemplazada por una serie de pasos enzimáticos, al cabo de los cuales se llega al $[^{32}P]$ AMP.

Estos pasos son:

1º:- Incorporación del ^{32}Pi al 1,3 di - P - glicerato:

$$\text{Glicerald. 3 P} + \text{NAD} + {}^{32}Pi \xrightarrow[\text{3 P deshidrogenasa}]{\text{Gliceraldehído}} 1\,{}^{32}P \text{ 1,3 Di PGA} + \text{NADH} + H^+$$

2º:- Regeneración del NAD oxidado, que fue reducido en la reacción 1.

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow[\text{Deshidrogenasa}]{\text{Lactato}} \text{Lactato} + \text{NAD}$$

3º:- Síntesis de $[\gamma\,{}^{32}P]$ ATP a partir del producto de la reacción 1.

$$1.{}^{32}P \text{ 1,3 Di P Glicerato} + \text{ADP} \xrightarrow[\text{Quinasa}]{\text{PGA}} 3\text{ PGA} + {}^{32}P \text{ ATP}$$

4º:- Fosforilación del HO 5' del 3'AMP, utilizando como dador de P al $[\gamma\,{}^{32}P]$ ATP.

$$\text{3'AMP} + [\gamma\,{}^{32}P]\text{ ATP} \xrightarrow[\text{quinasa}]{\text{Polinucleótido}} [5'\,{}^{32}P]\text{ 3',5' ADP} + \text{ADP}$$

5º:- Eliminación del $[\gamma\,{}^{32}P]$ ATP que no reaccionó en el paso 4.

$$[\gamma\,{}^{32}P]\text{ ATP} + \text{Glucosa} \xrightarrow{\text{Hexoquinasa}} \text{ADP} + [{}^{32}P]\text{- Glucosa 6 - P}$$

6º:- Obtención de $[{}^{32}P]$ 5'AMP por hidrólisis enzimática del P de posición 3' del $[5'\,{}^{32}P]$ 3', 5' ADP.

$$[5'\,{}^{32}P]\text{ 3', 5'ADP} \xrightarrow{\text{Nucleasa } P_1} \text{Pi} + [{}^{32}P]\text{ 5'AMP}$$

A partir del $[^{32}P]$ 5'AMP se realiza una "síntesis enzimática" análoga a la del método I.1 reemplazando el sistema gene-

rante del ATP de la piruvato quinasa por el de la creatina quinasa:

$$[^{32}P]\ 5'AMP + ATP \xrightarrow[\text{Mioquinasa}]{Mg^{2+}} [\alpha^{32}P]\ ADP + ADP$$

$$[\alpha^{32}P]\ ADP + \text{Fosfocreatina} \xrightarrow[\substack{\text{creatina}\\\text{quinasa}}]{} [\alpha^{32}P]\ ATP + \text{Creatina}$$

El procedimiento preparativo fue el siguiente:

La solución clorhídrica de $^{32}PO_4$ fue evaporada y lavada de la manera descripta en el método I.1. El residuo de la última evaporación fue retomado en 80 µl de H_2O destilada, y se le agregaron 10 µl de una solución cuya composición es:

TRIS - HCl	500 mM	pH = 7,5
$Mg\ Cl_2$	50 mM	
NAD^+	10 mM	
Ac.Pirúvico (neutralizado con TRIS base)	50 mM	
ADP	10 mM	
Gliceraldehído-3-P	8 mM	

Luego de agitar, se añadieron 10 µl de la siguiente mezcla de enzimas:

Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (10mg/ml en SAS)	240 µl
Fosfoglicerato quinasa (10mg/ml en SAS)	30 µl
Láctico deshidrogenasa (5mg/ml en SAS)	15 µl

(Se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos a 0-4ºC y se separó el sobrenadante por aspiración. El precipitado se resuspendió en 0,8 ml de TRIS-ClH 50mM, pH= 7,4; $Mg\ Cl_2$ 5mM).

Se mezcló bien y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 10 µl de una solución conteniendo DTT 78mM, espermina 40 mM y $MgCl_2$ 80mM, se mezcló y se añadieron 10 µl de 3'AMP 25 mM y 2 µl de polinucleótido quinasa (4000 U/ml en glicerol 50 %). Se agitó, e incubó durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se añadieron 5µl de nucleasa P-1 (4mg/ml en TRIS-ClH 10mM pH=7,5) y se siguió incubando durante 30 minutos a la misma temperatura. Luego se agregaron 20 µl de hexoquinasa 0,1 mg/ml en solución de glucosa 1mM y se prosiguió incubando 30 minutos más. Las reacciones enzimáticas fueron detenidas por calentamiento en baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Luego se enfrió en baño de hielo, para finalmente agregar 20 µl de una mezcla compuesta por:

Creatina quinasa	2 mg/ml
Mioquinasa	0,2mg/ml
Creatina fosfato	50 mM pH = 7,5

Se incubó por 30-45 minutos a temperatura ambiente y luego se diluyó con 1 ml de agua destilada.

La purificación y caracterización del $[\alpha^{32}P]$ ATP se hicieron de la manera descripta en el método I.1

II. OBTENCION Y PURIFICACION DE LAS PREPARACIONES ENZIMATICAS.

II. 1 Testículo de rata.

Se utilizaron ratas macho Wistar, de 45 a 90 días de

edad, con un peso promedio entre 200 y 250 g, alimentadas ad libitum con alimento marca Purina.

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Luego se extrajeron los testículos e inmediatamente se practicó una incisión en la superficie del testículo, depositando los túbulos seminíferos en un vaso de precipitación mantenido a 4°C y eliminando la túnica vaginal. El material fue entonces homogeneizado en tres volúmenes de una solución buffer compuesta por TRIS-HCl 50mM, pH=7,4, mercaptoetanol 1 mM y EDTA 0,5 mM (buffer A), usando un desintegrador de tejidos modelo SDT (Tekmar Co.). Esta operación y las siguientes fueron realizadas a 4°C. El homogeneizado fue centrifugado a 7700 x g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada marca Sorvall, modelo RC2-B, usando el rotor SS-34. El sobrenadante de esta centrifugación (que contiene la mayor proporción de la actividad de adenilil ciclasa), denominado preparación cruda, fue sometido a una ultracentrifugación a 105.000 x g durante 60 minutos en una centrífuga marca Beckman, modelo L5-50 utilizando el rotor R65. El sobrenadante de esta ultracentrifugación, denominado S105, constituye la fracción soluble de testículo a partir de la cual se realizaron los sucesivos pasos de purificación de la adenilil ciclasa.

II. 1.1 Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa.

Se describen a continuación las condiciones de

la purificación del S105 mediante el uso de una columna de DEAE-celulosa de tipo preparativo.

La columna (2,5 x 28 cm) fue equilibrada mediante el pasaje de 4 volúmenes de la solución de homogeneización (buffer A) y luego cargada con 200 ml del S105. Una vez pasada la muestra, se lavó con 900 ml de la misma solución buffer para remover la mayoría de las proteínas no adsorbidas.

Después del lavado, se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-0,7M, 1200 ml de volumen total) hecho en la misma solución buffer. Se recogieron fracciones de alrededor de 20 ml, a una velocidad de 1,7 ml/min utilizando un colector de fracciones automático, marca LKB, modelo Ultrorac 7000.

La actividad de adenilil ciclasa eluyó como un único pico, a una concentración de 0,25-0,30 M de NaCl. La fracción correspondiente será denominada preparación de DEAE.

II. 1.2 Fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía en Bio-Gel A 0,5m:

Se juntaron las fracciones con actividad de ciclasa obtenida de la columna de DEAE celulosa (aproximadamente 80ml), precipitándose mediante la adición lenta de 34,3 ml de una solución saturada de sulfato de amonio previamente neutralizada con NH_3. La precipitación se realizó en un vaso mantenido en un baño de hielo y agua. Luego de agitar la mezcla durante 20 minutos, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos. El sedimento (precipi-

tado de 30 % de saturación) fue descartado y el sobrenadante (1 volumen) fue llevado a una concentración de sulfato de amonio del 60 % de saturación por el añadido de 0,75 volúmenes de la solución saturada de sulfato de amonio. Después de la centrifugación el sedimento fue disuelto en 5 ml de buffer A y dializado por 3 horas contra el mismo buffer. La fracción dializada (7,0 ml, 14 mg de proteína por ml) fue sembrada en una columna de Bio-Gel A 0,5 m (100-200 mesh) de 2,5 cm de diámetro x 87 cm de alto, previamente equilibrada con una solución de buffer A conteniendo NaCl a una concentración de 0,15 M (buffer B). La columna fue eluida con el mismo buffer de equilibrio, a un flujo de 1,7 ml por minuto, recogiéndose fracciones de 7 ml. Las fracciones con actividad específica de ciclasa más alta fueron combinadas (21 ml) y precipitadas por la adición de 1,5 volúmenes de una solución saturada de S.A. (60 % de saturación). Después de la centrifugación, el precipitado fue disuelto en un volumen mínimo de buffer A (aprox. 0,7 ml) y dializado contra la misma solución durante 6 horas. La fracción así obtenida será denominada preparación de Bio-Gel.

II. 1.3 Enfoques isoeléctricos en columna:

Se utilizó la columna marca LKB de 110 ml de capacidad. Los enfoques isoeléctricos fueron llevados a cabo siguiendo las instrucciones del manual de uso provisto por LKB. En todos

los casos, el medio estabilizante del gradiente de anfolitos fue sacarosa.

Enfoques isoléctricos en los rangos de pH 3,5-10,0 y 4-6:
Concentración final de anfolitos en la columna: 1 %
Polaridad: ánodo en la parte inferior de la columna
Composición de la solución anódica: sacarosa, 15 g; H_2O, 12 ml y ácido fosfórico 1M, 4 ml.
Composición de la solución catódica: NaOH 0,25M, 10 ml.

El gradiente de sacarosa y anfolitos se realizó a partir de las siguientes soluciones: Solución densa: sacarosa, 27 g; H_2O, 35 ml y anfolitos (solución al 40 % p/v del rango de pH correspondiente), 2 ml. Solución diluida: sacarosa, 2,7 g; H_2O, 52,3 ml y anfolitos (solución al 40 % p/v del rango de pH correspondiente), 0,7 ml.

Una vez formado el gradiente de sacarosa se retiró del centro de la columna un volumen del contenido igual al volumen de muestra a sembrar (aprox. 1ml). Se ajustó la concentración de la muestra (preparación de "Bio-Gel") por el agregado de sacarosa sólida, y se introdujo la muestra en el medio del gradiente con la ayuda de una bomba peristáltica modelo LKB.
La corrida se realizó a una potencia constante de 5W durante 20 horas, manteniendo el sistema refrigerado a 4°C. La intensidad de corriente y el voltaje inicial fueron 7m A y 700 V respectivamente. La intensidad final fue 2m A y el voltaje final de 1800 V. Al dar

por finalizada la corrida, el contenido de la columna fue fraccionado por bombeo en alícuotas de 2 ml. El pH de las fracciones fue medido a 4ºC.

Enfoque isoeléctrico destinado a obtener anfolitos que abarquen un rango estrecho de pH. (5,0 -5,6)

Dado que no existen comercialmente mezclas de anfolitos que abarquen un rango tan estrecho como 0,6 unidades de pH (de 5,0 a 5,6), los mismos debieron ser preparados por enfoque isoeléctrico de anfolitos que comprenden el rango de 4,0 a 6,0 unidades de pH. Las condiciones de esta preparación fueron las siguientes:

Concentración final de anfolitos en la columna: 4 %.

La polaridad y la composición de las soluciones anódica y catódica fueron idénticas a lo descripto en el item anterior.

Composición de las soluciones formadoras del gradiente de sacarosa y anfolitos. Densa: sacarosa, 27 g; H_2O, 28,9 ml y anfolitos (solución al 40 % p/v del rango de pH= 4,0-6,0), 8,1 ml. Diluida: sacarosa, 2,7 g; H_2O, 50,3 ml y anfolitos (la misma solución), 2,7 ml. La corrida se llevó a cabo durante 16 hs a una potencia constante de 10 W. La corriente inicial fue de 12 mA y el voltaje inical fue de 800 V. La corriente y el voltaje finales fueron de 6 mA y 1600 V. La temperatura se mantuvo en 4ºC. Una vez formado el gradiente de pH, se fraccionó el contenido de la columna y se combinaron aquellas fracciones cuyo pH estaba comprendido entre 5,0 y 5,6 unidades (aproximadamente 23 ml con una concentración

de sacarosa del 25 % p/v).

Enfoque isoeléctrico en el rango de pH 5,0-5,6.

Concentración final de anfolitos en la columna: 1 %

La polaridad y la composición de las soluciones anódica y catódica fueron iguales que en los casos anteriores.

Solución densa del gradiente: Sacarosa 60 % p/v, 37,5ml; anfolitos solución al 4 % (p/v) del rango de pH 5,0-5,6 con un contenido del 25 % p/v de sacarosa , 16,5 ml. Solución diluida: sacarosa 2,8 %, 48,5 ml; anfolitos (la misma solución), 5,5 ml. Primeramente se ralizó un preenfoque de los anfolitos, sin muestra, durante 6 hs a 1600 V y 2 mA. Una vez preenfocado el gradiente, la muestra (preparación de Bio-Gel) se introdujo de manera similar a lo descripto en los electroenfoques anteriores. La corriente y voltaje finales fueron 1,7 mA y 1800 V respectivamente. Al finalizar la corrida se recogieron fracciones de 2 ml.

II. 1.4 Cromatografía en columna de hidroxilapatita.

Se preparó una mezcla de 50 % de celulosa y 50 % de hidroxilapatita, con la cual se cargó una columna de vidrio de 2,2 cm de diámetro hasta 8 cm de altura. La columna fue equilibrada mediante el pasaje de 4 volúmenes de buffer A. La preparación de DEAE fue diluida con un volumen de la misma solución, y 18 ml de esta dilución fueron sembrados en la columna. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de sulfato de amonio (0-0,7 M, 340 ml de volumen total) hecho en buffer A. Se recogieron fracciones

de 6 ml a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. El pico correspondiente a la actividad de adenilil ciclasa será denominado preparación de hidroxilapatita.

II. 2 Neurospora crassa.

II. 2.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo: La cepa usada para los experimentos de caracterización y purificación parcial de la adenilil ciclasa soluble, fue la tipo salvaje St. Lawrence 74 (StL 74). Otras cepas utilizadas fueron las tipo salvaje FGSC Nros. 987 (St Lawrence), 2218 (Rockefeller-Lindegren), 1757 (Abbott) y 691 (Emerson). Además se utilizó la mutante deficiente en adenilil ciclasa FGSC 488 (fenotipo "crisp") portadora de la mutación cr-1. Los cultivos fueron realizados en frascos de Erlenmeyer de 2000 ml conteniendo 500 ml de medio mínimo de Vogel (185) suplementado con sacarosa al 2 % (p/v) y 2,5 µg/ml de d-biotina. El crecimiento fue llevado a cabo a 30°C, con agitación (120rpm) durante 40 hs.

II. 2.2 Homogeneización del micelio.

El micelio de la cepa StL 74 fue filtrado en un embudo de Büchner, lavado con agua destilada y liofilizado. El material liofilizado fue molido en un mortero con el agregado de nitrógeno líquido. Luego se dejó elevar la temperatura del polvo obtenido hasta 4°C y se le agregó buffer A en una proporción de 10 ml por gramo de micelio deshidratado. El extracto fue homoge-

neizado usando el desintegrador de tejidos modelo SDT (Tekmar Co) y posteriormente centrifugado a 1.100 x g por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos y el sobrenadante de esta última centrifugación fue nuevamente centrifugado a 105.000 x g durante 120 minutos. Este último sobrenadante será denominado S105 y constituye la fracción soluble del micelio a partir de la cual se realizaron los sucesivos pasos de purificación de la adenilil ciclasa.

II. 2.3 Cromatografía en columna de DEAE celulosa.

60 ml de la fracción S105 (3,1 mg proteína/ml) fueron sembrados en una columna de DEAE-celulosa (28 x 2,5 cm) previamente equilibrada con buffer A. La columna fue entonces lavada con 200 ml de la solución buffer y eluida con un gradiente lineal de NaCl en buffer A donde la concentración de la sal varió de 0 a 0,5 M. El volumen total del gradiente fue de 480 ml y se colectaron fracciones de 20 ml a una velocidad de 3,1 ml/minuto. Las fracciones que contenían actividad de adenilil ciclasa fueron combinadas denominándose a ésta preparación de DEAE.

II. 2.4 Precipitación con sulfato de amonio (S.A.) y cromatografía en Bio-Gel A 5 m.

40 ml de una preparación de DEAE fueron precipitados por el agregado de 17,2 ml de una solución saturada de S.A. (30 % de saturación). La precipitación fue llevada a cabo a 4°C

durante 20 minutos, al cabo de los cuales la preparación fue centrifugada a 10.000 x g por 10 min. El precipitado fue descartado y el sobrenadante (1 volumen) fue llevado a 60 % de saturación de S.A. por el añadido de 0,75 volúmenes de una solución saturada de la sal. El precipitado obtenido después de la centrifugación fue disuelto en aproximadamente 1 ml de buffer B y fue dializado por 3 hs contra la misma solución buffer. La fracción dializada fue sembrada en una columna de Bio-Gel A 5 m (100-200 mesh) de 0,9 cm de diámetro por 80 cm de alto, equilibrada con buffer B. Se recogieron fracciones de 1 ml a una velocidad de 0,5 ml por minuto.

II. 2.5 Enfoque isoeléctrico en capa de Sephadex.

Se utilizó el aparato marca LKB para la realización de enfoque isoeléctrico en capa delgada de gel granulado (LKB 2117-501). El medio estabilizante del gradiente de pH está constituido por un lecho de Sephadex G-75 superfino preparado de acuerdo a las instrucciones descriptas por el fabricante del aparato (186). El gel de Sephadex contenía anfolitos (rango de pH de 4,0 a 6,0) a una concentración final del 2 % (p/v). La muestra (3 ml de S105) fue sembrada en el medio del gel de la manera descripta en las instrucciones citadas. La corrida se realizó durante 16 hs a una potencia constante de 8 W, manteniendo el aparato refrigerado a 4°C. El voltaje y la intensidad de corriente iniciales fueron 500 V y 16 mA respectivamente; el voltaje y la corrien

te finales fueron 1050V y 7,5 mA respectivamente.

Al finalizar el electroenfoque, se aplicó una tira de papel Whatman 3 MM sobre la superficie del gel, a lo largo de la dirección de la corrida. Esto tuvo por objeto obtener una copia del patrón de bandas proteicas enfocadas. El papel se dejó apoyado sobre el gel durante 2 minutos, tiempo en el cual se posibilitó que parte de las proteínas del gel difundieran al papel. Luego el papel fue secado en estufa a 80°C durante 10 minutos, fijado en una solución de TCA al 10 % (p/v) y teñido en una solución de azul de Coomassie R250 al 0,2 % (p/v) hecha en metanol 40 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v). Luego el papel fue desteñido en la misma solución sin colorante. Una vez hecho esto, el gel fue seccionado con la grilla de fraccionamiento apropiada (LKB 90 00 0161). Cada uno de los 30 compartimentos de la grilla fueron vaciados con la ayuda de una espátula y su contenido depositado en columnitas de plástico. Cada columna fue eluida con 1,5 ml de H_2O midiéndose el pH, la actividad de ciclasa y la concentración de proteínas en las fracciones obtenidas.

III. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS DE LAS ADENILIL CICLASAS.

III. 1 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.

Se prepararon gradientes de 5 a 20 % (p/v) de sacarosa, hechos en agua u óxido de deuterio (D_2O) conteniendo TRIS-

HCl 50mM, pH = 7,4, mercaptoetanol 1 mM, EDTA 0,5 mM y NaCl 0,15M. Los gradientes se formaron en tubos de acetato de celulosa correspondientes al rotor Beckman SW 56 y fueron sembrados con 0,3 ml de una mezcla que contenía la preparación enzimática correspondiente y las siguientes proteínas marcadoras: catalasa (hígado bovino) 0,1 mg/ml; malato de hidrogenasa (corazón porcino) 0,01 mg/ml; lactato deshidrogenasa (músculo de conejo) 0,03 mg/ml y citocromo C (corazón de caballo), 2 mg/ml. Las centrifugaciones fueron realizadas a 45000 rpm durante 16 horas, a 2°C. Al finalizar la corrida se colectaron fracciones de 0,2 ml, succionando desde el fondo del tubo con una cánula conectada a una bomba peristáltica, a una velocidad de 1 ml/min.

III. 2 Filtración en geles de agarosa (Bio-Gel).

En el caso de la enzima de testículo de rata, la filtración se realizó en una columna de Bio-Gel A 0,5 m de dimensiones analíticas (0,9 x 75 cm) equilibrada con buffer B. La muestra sembrada fue una preparación de DEAE de testículo (1,0 ml, 3 mg de proteína por ml). La columna se eluyó con el mismo buffer, a una velocidad de 1,1 ml por minuto. La temperatura fue mantenida en 4°C y se recogieron fracciones de 1,0 ml. Proteínas marcadoras: fueron añadidas a la muestra las indicadas en la sección III. 1, a las mismas concentraciones. Se consideró como volumen de exclusión de la columna al volumen de elución del dextrano azul. En el caso de la enzima de Neurospora crassa la preparación se fil-

tró por columna de Bio-Gel A 5 m descripta en la sección II. 2.4. con el agregado de las proteínas marcadoras indicadas en la sección III.1 y de β-galactosidasa de Escherichia coli a una concentración de 0,05 mg/ml. El volumen de exclusión fue determinado usando una suspensión de Rhizobium meliloti conteniendo 6 x 10^8 bacterias por ml, siguiendo la absorbancia a 660 nm.

IV. CALCULO DE LOS PARAMETROS HIDRODINAMICOS Y MOLECULARES:

IV. 1 Volumen específico parcial.

El método usado fue desarrollado por Clarke (187) y Meunier et al (188) para determinar el volumen específico parcial de complejos de proteínas y detergentes, mediante el análisis de los coeficientes de sedimentación en gradientes de densidad hechos en H_2O o D_2O. El principio del método ha sido descripto por Edelstein y Schachman (189) y se basa en el cambio en el coeficiente de sedimentación producido por el aumento de densidad de la solución, por el uso del D_2O.

De acuerdo con el trabajo de Martin y Ames (190), la distancia r_i recorrida desde el origen por cualquier macromolécula sometida a ultracentrifugación en un medio i (i = H para H_2O e i = D para D_2O) es:

$$r_i = k_i \, S_{20,w} \, (1 - \bar{v} \rho_i) \qquad [1]$$

donde k_i es una constante en un medio de una dada densidad para cualquier macromolécula con el mismo volumen específico parcial,

$S_{20\,w}$ es el coeficiente de sedimentación de la macromelécula determinado en agua a 20°C, $\bar{v}$ es el volumen específico parcial y ρ_i es la densidad del medio i.

Dado que la densidad ρ_i aumenta linealmente a lo largo del gradiente de sacarosa, se hace una estimación promediada de ese parámetro tomando su valor a $r_i/2$. Bajo estas condiciones, el error en ρ_i es menor que el 0,5 %. Entonces, dados dos gradientes de sacarosa realizados en H_2O y en D_2O, resulta:

$$\frac{r_H}{r_D} = \frac{k_H\,(1 - \bar{v}\,\rho_H)}{k_D\,(1 - \bar{v}\,\rho_D)} \qquad [2]$$

siendo entonces:

$$\bar{v} = \frac{r_H\,k_D - r_D\,k_H}{r_H\,k_D\,\rho_D - r_D\,k_H\,\rho_H} \qquad [3]$$

Dividiendo al numerador y al denominador del segundo término de la igualdad [3] por $r_D k_H$, resulta:

$$\bar{v} = \frac{\dfrac{r_H\,k_D}{r_D\,k_H} - 1}{\dfrac{r_H\,k_D\,\rho_D}{r_D\,k_H} - \rho_H} \qquad [4]$$

Por otro lado, la ecuación [2] puede plantearse así:

$$\frac{r_H \, k_D}{r_D \, k_H} = \frac{(1 - \bar{v} \rho_H)}{(1 - \bar{v} \rho_D)} \qquad [5]$$

y según la ecuación de Svedberg:

$$\frac{(1 - \bar{v} \rho_H)}{(1 - \bar{v} \rho_D)} = \frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} \qquad [6]$$

donde S_H y S_D son los coeficientes de sedimentación aparentes determinados experimentalmente en H_2O y D_2O respectivamente, y η_H y η_D las viscocidades de las soluciones en H_2O y D_2O respectivamente, en la zona en que se ubica la macromolécula analizada.

De las ecuaciones [4] , [5] y [6] es entonces:

$$\bar{v} = \frac{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} - 1}{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} \rho_D - \rho_H} \qquad [7]$$

La ecuación [7] es la utilizada para calcular el $\bar{v}$ de las adenilil ciclasas. S_H, S_D, η_H y η_D son datos obtenidos a partir de la comparación de la movilidad de la adenilil ciclasa con respecto a la de los marcadores proteicos utilizados, en los gradientes de sacarosa en H_2O y D_2O y cuyos valores numéricos serán presentados en la sección "Resultados".

Las densidades ρ_D y ρ_H fueron determinadas por gravimetría utilizando una micropipeta de 50 μl.

IV. 2 Radio de Stokes.

El valor del radio de Stokes (a) fue obtenido a partir del perfil de elución de la actividad enzimática de las columnas de Bio-Gel. El valor fue estimado de una curva del volumen de elución normalizado (Ve/Vo) versus el radio de Stokes, construida para las proteínas marcadoras de parámetros moleculares conocidos.

IV. 3 Peso molecular.

El peso molecular de la adenilil ciclasa fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$PM = \frac{6\,\pi\,N\,\eta_{20,w}}{1 - \bar{v}\,\rho_{20,w}} \cdot a \cdot S_{20,w}$$

donde N es el número de Avogadro, $\eta_{20,w}$ es la viscocidad del agua a 20°C ($1{,}100.10^{-2}$ g/cm.seg), a es el radio de Stokes, $S_{20,w}$ es el coeficiente de sedimentación, $\bar{v}$ es el volumen específico parcial y $\rho_{20,w}$ es la densidad del agua a 20°C (0,988 cm^3/g).

IV. 4 Cociente friccional.

El cociente friccional fue calculado usando los parámetros moleculares previamente obtenidos ($\bar{v}$, a, PM) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f/fo = a \left(\frac{4\,\pi\,N}{3\,PM\,\bar{v}} \right)^{1/3}$$

IV. 5 Parámetros de las proteínas marcadoras.

En la tabla 6 se resumen los parámetros moleculares de las proteínas marcadoras usadas en las centrifugaciones en gradientes de sacarosa y en las filtraciones en gel. La tabla fue confeccionada en base a los datos reunidos por Haga et al (191).

TABLA 6:- Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas marcadoras utilizadas.

PROTEINA	COEFICIENTE DE SEDIMENTACION $S_{20,w}$ (S)	VOLUMEN ESPECIFICO PARCIAL $\bar{v}$ (ml/g)	RADIO DE STOKES a (nm)	PESO MOLECULAR PM
β GALACTOSIDASA	15,9	0,76	6,84	520.000
CATALASA	11,3	0,73	5,21	247.000
LACTATO DESHIDROGENASA	7,3	0,74	4,75	142.000
MALATO DESHIDROGENASA	4,3	0,74	3,69	70.000
CITOCROMO C	1,7	0,73	1,87	13.300

V. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

V. 1 Sistema desnaturalizante con SDS (192)

Los geles planos se armaron en una celda marca Bio Rad modelo 220. Dimensiones del gel separador: 8 cm de alto x 1,5 mm

de espesor. Composición del gel separador: acrilamida, 10 % (p/v); bisacrilamida, 0,27 % (p/v); SDS, 0,1 % (p/v); buffer TRIS-HCl pH = 8,8, 0,375 M; TEMED, 0,025 % (v/v) y persulfato de amonio (PSA), 0,033 % (p/v).

Dimensiones del gel concentrador (poro grueso): 1,5 cm de alto por 1,5 mm de espesor; ancho de cada canal, 8mm. Composición del gel concentrador: acrilamida, 5 % (p/v); bisacrilamida, 0,13 % (p/v); SDS, 0,1 % (p/v); buffer TRIS-HCl pH 6,8; 0,125 M; TEMED, 0,05 % (v/v) y PSA, 0,1 % (p/v).

Antes de ser sometidas a la electroforesis, las muestras fueron dializadas por 16 hs, a 4ºC, contra buffer TRIS-HCl 10mM, pH = 7,5 conteniendo NaCl 0,5 M y luego durante 6 hs contra la misma solución buffer sin NaCl. Las muestras fueron luego liofilizadas y calentadas por 5 minutos a 100ºC con una mezcla desnaturalizante de la siguiente composición: SDS, 2 % (p/v); β mercaptoetanol, 5 % (v/v); glicerol, 20 % (v/v); buffer TRIS-HCl pH = 6,8, 0,06 M y azul de bromofenol, 0,002 % (p/v). El volumen de la muestra aplicada en cada canal fue 0,05 ml conteniendo entre 10 y 100 µg de proteína. El buffer de corrida fue TRIS-glicina 50 mM pH = 8,0 conteniendo SDS al 0,1 % (p/v). La electroforesis se realizó a una intensidad de corriente constante de 20 mA, durante 6 a 7 horas manteniendo la temperatura en 15ºC. Las proteínas para la calibración de los pesos moleculares fueron: fosforilasa b (músculo de conejo), albúmina (suero bovino), ovoalbúmina (clara de huevo), anhidrasa carbónica (eritrocitos bovinos) e inhibidor de tripsina

(soja). Los geles fueron fijados y teñidos con una solución acuosa que contenía 25 % (v/v) de metanol, 8 % (v/v) de ácido acético, y 0,2 % (p/v) de azul de Coomassie G o R 250; y desteñidos con la misma solución sin colorante.

V. 2 Sistema no desnaturalizante (193)

El tipo de celda utilizada y las dimensiones de los geles separador y espaciador fueron los mismos que para el sistema desnaturalizante. Composición del gel separador: acrilamida, 7 % (p/v); bisacrilamida, 0,183 % (p/v); buffer TRIS-HCl pH=8,9 0,375M; TEMED, 0,028 % (v/v) y persulfato de amonio, 0,07 %(p/v). Composición del gel concentrador: acrilamida, 2,5% (p/v); bisacrilamida, 0,625 %; buffer TRIS-HCl pH 6,8, 0,617 M; TEMED, 0,057 % (v/v) y PSA, 0,05 % (p/v).

Las muestras dializadas y liofilizadas fueron resuspendidas en buffer de corrida conteniendo 20 % (v/v) de glicerol y 0,002 % de azul de bromofenol. La composición del buffer de corrida fue TRIS-borato 50 mM, pH = 8,2, EDTA, 0,05 % (p/v). La electroforesis se llevó a cabo a 20 m A durante 6 horas.

Los geles fueron teñidos y desteñidos con las mismas soluciones descriptas para el sistema desnaturalizante.

VI. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA

Composición de la mezcla de incubación: solución buffer TRIS-HCl 50mM, pH = 7,5; 3-isobutil-1 metil xantina 0,2 mM; AMPc 1 mM

$MnCl_2$ 2,5mM; [α^{32}P] ATP 0,5 mM (con una actividad específica que varía entre 50 y 200 cpm por pmol); fosfocreatina 2 mM, creatina quinasa 0,2 mg/ml y fracción enzimática (50 a 200 µg de proteína). El volumen total fue de 0,1 ml y las incubaciones fueron realizadas a 37°C por 3 a 10 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de 0,1 ml de una solución que contiene ATP 40 mM, [^{3}H] AMP cíclico 12,5 mM (actividad específica 3.800 cpm por µmol) y por calentamiento de 3 min en un baño de agua hirviendo (194).

El AMP cíclico formado fue purificado siguiendo el procedimiento de cromatografía secuencial en columnas de Dowex 50 y alúmina descripto por Salomon et al (195). La base del método consiste en separar el AMP cíclico radioactivo de los otros fosfatos nucleotídicos radioactivos o no (ATP, ADP, AMP, PPi, Pi) a través de una resina intercambiadora de cationes (Dowex 50); los H^+ de la resina se intercambian con los $-NH_2^+$ de la adenina de los fosfatos. El AMP cíclico es el único compuesto de fosfato parcialmente retenido por la resina, pues su carga positiva (adenosina) no es totalmente contrarrestada por la única carga negativa del grupo fosfato. Luego del pasaje por la Dowex 50, el AMP cíclico es adicionalmente purificado en una columna de alúmina, que retiene a todos los fosfatos aún contaminantes.

En esta columna el AMP cíclico no se retiene a pH neutro.

Los pasos de la purificación del AMPc se detallan a continuación:

Una vez detenida la reacción, se agregó 1 ml de H_2O a la muestra

y se sembró en una columna de resina Dowex AG 50 W-x 4 (200-400 mesh) forma H^+ de 4 cm de largo por 0,5 cm de diámetro interno. Después del pasaje de la muestra se lavó con 5 ml de H_2O en dos etapas, una de 1 ml y otra de 4 ml, descartándose los eluidos. Luego se pasaron 6 ml de H_2O, recogiéndose el eluido directamente sobre una columna de alúmina neutra (3 cm x 0,5 cm) previamente equilibrada con buffer Imidazol- HCl 0,1 M, pH= 7,5. Una vez pasados los 6 ml por la columna de alúmina, y habiéndose desechado el eluido correspondiente, se lavó esta columna con 1 ml de buffer Imidazol-HCl y luego con 4 ml del mismo buffer, recogiéndose el eluido en frascos de centelleo líquido. La radioactividad se midió según el método de Bray (196), añadiendo a los frascos 13,5 ml de la mezcla centelleadora (naftaleno -dioxano). Las lecturas se hicieron en un contador de centelleo líquido marca Packard modelo 574 con los siguientes parámetros: para ^3H (el AMPc tritiado agregado al finalizar la incubación permite calcular el % de recuperación del AMPc después del pasaje por las columnas), 60 % de ganancia con ventana entre 50 y 300; y para ^{32}P 5 % de ganancia, con ventana entre 300 e ∞ . Las recuperaciones usualmente oscilaron entre un 50 y un 80 %.

VII. DETERMINACION DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AMP CICLICO EN TUBULOS SEMINIFEROS.

VII. 1 Tratamiento de las muestras de tejido para el ensayo de AMP cíclico.

Trozos de testículos decapsulados fueron incubados a 37ºC con agitación en frascos de vidrio con 2 ml de Medio 199 (Gibco) ajustado a pH = 7,4, y conteniendo 3-isobutil-1-metil xantina a una concentración de 0,1 mM más las concentraciones indicadas de L-T_3. Antes de la incubación, los frascos fueron gaseados con una mezcla de O_2-CO_2 (95:5, v/v). A los tiempos indicados, las muestras de tejido fueron rápidamente transferidas a tubos de vidrio de centrifugación (Sorvall; 13 mm de diámetro interno por 100 mm de largo), que contenían 1 ml de ácido tricloracético frío al 12 % y 25 pmoles de [^{3}H] AMP cíclico (alrededor de 5.000 cpm), Luego, las muestras fueron brevemente sonicadas para disgregar el tejido y posteriormente centrifugadas a 6.000 rpm durante 10 minutos. Los fluidos sobrenadantes de esta centrifugación fueron extraídos cinco veces con cinco volúmenes de éter sulfúrico cada vez y después liofilizados.

Paralelamente los precipitados de la centrifugación anterior fueron disueltos en 2 ml de HONa 1 N con el fin de determinar su concentración proteica.

Después de la liofilización, el material fue resuspendido en 2 ml de buffer acetato de sodio 50mM, pH = 6,2. Alícuotas de 0,4 ml de esta resuspensión fueron diluidas en 5 ml de la mezcla centelleadora de Bray y se determinó la radioactividad presente en ellas. Las recuperaciones fueron de alrededor del 70 %.

VII. 2 Ensayo del contenido del AMP cíclico en las muestras.

Se tomaron alícuotas del material liofilizado y resuspendido y fueron diluidas en 3 y 9 volúmenes de buffer acetato. De estas diluciones se tomaron alícuotas de 5 y 10 µl que fueron diluidas en la misma solución buffer pero a una concentración de 0,1 M. Finalmente estas diluciones fueron acetiladas de acuerdo al procedimiento descripto por Frandsen y Krishna (197). Las muestras acetiladas fueron entonces sometidas al radioinmunoensayo siguiendo la metodología desarrollada por Steiner et al (198, 199) utilizando los reactivos provistos por New England Nuclear. Bajo estas condiciones, el ensayo detecta cantidades de AMPc que oscilan entre 5 y 100 fmoles.
Cada una de las diluciones indicadas de las muestras fue analizada por duplicado.

VIII. ENSAYO DE UNION ("binding")DE ^{125}I TRIIODOTIRONINA A RECEPTORES.

Composición de la mezcla de incubación: buffer fosfato de sodio 50mM, pH = 8,0; [^{125}I] L-T_3 5,4 nM (alrededor de 100.000 cpm totales) y aproximadamente 0,1 mg de preparación proteica. El volumen total fue de 0,1 ml y las incubaciones fueron realizadas a 20°C por 15 minutos. Al fin de este período, cada muestra fue sembrada inmediatamente en una columna de Sephadex G-25 fino (1,2 ml de volumen "muerto") mantenida a 4°C y que previamente había sido equilibrada con buffer fosfato de sodio 50mM, pH = 8. Las

columnas de Sephadex G-25 se armaron en jeringas plásticas de 2,5ml marca Rivero. Una vez pasada la muestra, cada columna fue eluida en frío con 1,5 ml de la misma solución buffer, y se determinó la radioactividad en el eluido en un contador de radiación gamma, marca Beckman, modelo 4000. La base del método de determinación de la unión de L-T_3 utilizando la filtración en columnas de Sephadex G-25, consiste en que la hormona radioactiva unida a macromoléculas se excluye de la columna mientras que la hormona libre al interaccionar con el soporte es retenida parcialmente (139). En la figura 18 se observa un perfil de elución típico en Sephadex G-25, de la [^{125}I] L-T_3 libre, y unida a proteína.

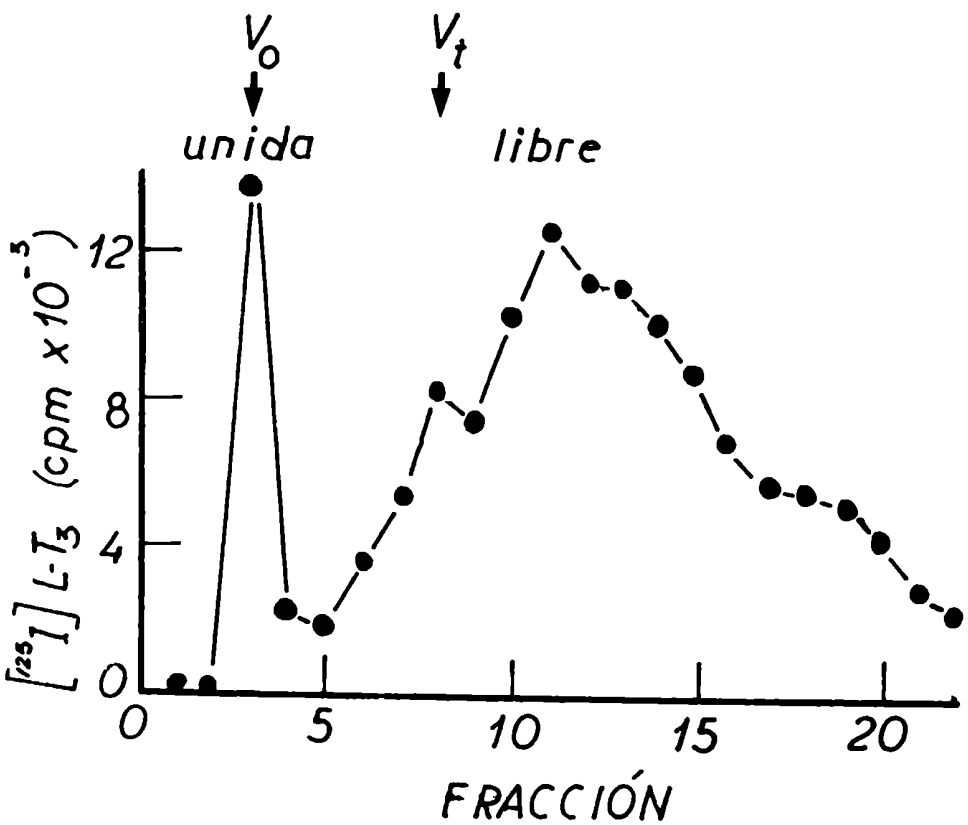


FIGURA 18

Para la determinación de la unión inespecífica, cada muestra fue paralelamente incubada con el agregado de triiodotironina no radioactiva a una concentración de 10^{-4} M. Los resultados se expresaron como masa de triiodotironina unida específicamente, y ésto se calculó como la diferencia entre la masa total unida (en ausencia de L-T_3 10^{-4}M) y la masa inespecíficamente unida (en presencia de L-T_3 10^{-4}M). Las constantes de unión fueron calculadas siguiendo el método de Scatchard (200).

IX. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS.

IX. 1 Determinación de proteínas: Se realizó por el método de Lowry y colaboradores (201) usando albúmina sérica bovina cristalina como patrón. La cuantificación de proteínas en las fracciones obtenidas de los enfoques isoeléctricos se hizo siguiendo la absorbancia a 280 nm.

IX. 2 Determinación de DNA: Se realizó por el método de Burton (202) utilizando DNA de timo de ternero como patrón.

IX. 3 Determinación de la posición de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Bio-Gel:

Citocromo C: Fue medido por su absorción en la banda de Soret (410nm).

Malato deshidrogenasa: Se midió su actividad por el consumo de

NADH, en presencia de oxalacetato, siguiendo la desaparición de su absorbancia a 340 nm según lo descripto en el Manual de enzimas de Worthington (203).

Lactato deshidrogenasa: Se midió su actividad por el consumo de NADH en presencia de piruvato, del mismo modo que para la malato deshidrogenasa.

Catalasa: La actividad fue medida siguiendo la desaparición de H_2O_2 por la conversión de ioduro a iodo, de acuerdo al método de Terenzi et al (204).

βgalactosidasa: La actividad fue medida usando O-nitrofenil-β-D-galactopiranósido como sustrato, siguiendo el método descripto en el manual de Worthington (203).

IX. 4 Determinaciones varias: La coloración de los geles para detectar la presencia de glicoproteínas (reacción de PAS) fue realizada según el método de Fairbanks et al (205).

La caracterización del sustrato y productos de las mezclas de incubación de la adenilil ciclasa se hizo por cromatografía en capa delgada (206) o cromatografía en papel (207).

La actividad de fosfodiesterasa de AMP cíclico (bajo km) fue ensayada según el método descripto por Terenzi et al (180).

X. REACTIVOS UTILIZADOS.

La creatina quinasa y la lactato deshidrogenasa (ambas de músculo de conejo) fueron obtenidas de Boheringer. La toxina del cóle

ra, la sacarosa y el sulfato de amonio fueron obtenidos de Schwartz-Mann. Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma: ATP, AMP cíclico, creatina fosfato, alúmina neutra, citocromo c de corazón de caballo, malato deshidrogenasa de corazón porcino, catalasa de hígado bovino, L-T_3, L-T_4, TRIAC, MIT, DIT, dextrano azul, óxido de deuterio, albúmina sérica bovina cristalina, TRIS, GTP, GPP(NH)P, NAD, NADH, azul de Coomassie G y PMSF. Los siguientes reactivos fueron provistos por Bio Rad: hidroxilapatita (Bio-Gel HTP), celulosa en polvo (Cellex 410), resina AG 50W-X4 (200-400 mesh), Bio-Gel A 0,5 m (100-200 mesh), Bio-Gel A 5m (100-200 mesh), acrilamida, N,N'-metilén-bisacrilamida, N, N, N',N' tetrametil etilendiamina, dodecil sulfato de sodio, glicina y DEAE-celulosa (Cellex D). El O-nitrofenil-β-D-galactósido fue obtenido de Koch-Light. La 3-isobutil-1-metilxantina fue provista por Aldrich. [^{125}I] L-T_3, [^{3}H] AMP cíclico y el conjunto de reactivos para radioinmunoensayo de AMP cíclico fueron provistos por New England Nuclear. El azul de Coomassie R 250 fue obtenido de Fluka. El conjunto de proteínas de bajo peso molecular para calibración de geles de poliacrilamida fue provisto por Pharmacia, y las placas de polietilén-iminocelulosa y el fosfato inorgánico ^{32}P fueron provistos por Baker y el Centro Radioquímico (Amersham) respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. PURIFICACION Y DETERMINACION DE LOS PARAMETROS MOLECULARES DE LA ADENILIL CICLASA DE TUBULOS SEMINIFEROS.

I. 1 Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa.

El primer paso de purificación consistió en cromatografiar un sobrenadante de 105.000 x g en una columna de DEAE-Celulosa. Los detalles experimentales de este procedimiento fueron descriptos en la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 19 vemos el perfil de elución del material sembrado en la columna. La actividad enzimática eluyó como un único pico a una concentración de NaCl de 0,25 M. No se detectó actividad de ciclasa en las fracciones correspondientes al lavado de la columna. En cuanto al perfil de elución de la proteína, éste mostró un gran pico que se excluye de la columna con el lavado en el que se encuentra la mayor parte de la hemoglobina presente en el sobrenadante de 105.000 x g, y numerosos picos incluidos en la columna, que eluyen a partir de una concentración de NaCl de 0,15 M.

La adenilil ciclasa eluyó de la columna de DEAE con una actividad específica de 30 pmoles de AMP cíclico/minuto/mg de proteína. Este valor es aproximadamente 5 veces mayor que el correspondiente al sobrenadante de 105.000 x g.

Adicionalmente se estudió la actividad de fosfodiesterasa de AMP cíclico en las distintas fracciones de la columna. Esta en-

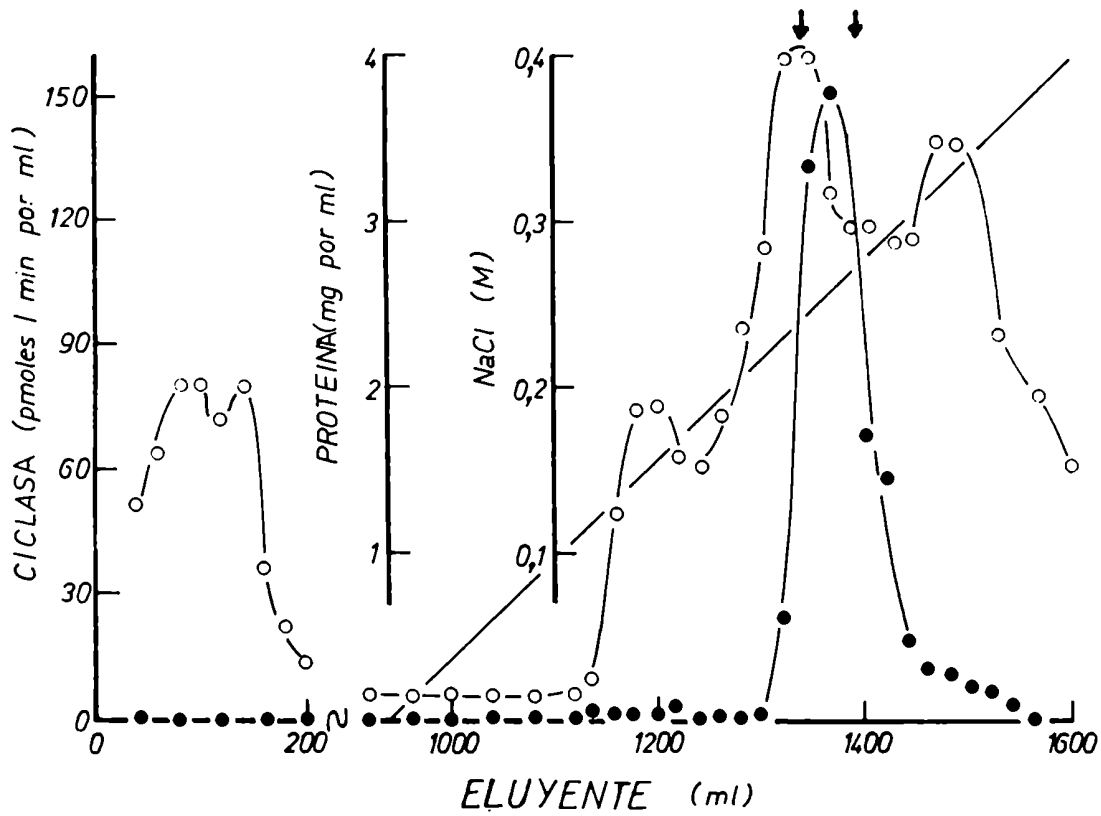


Figura 19:- Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de un S105 de testículo. ●, actividad de adenilil ciclasa; ○ proteína.
Las flechas indican las fracciones combinadas a utilizarse en el paso de purificación siguiente.

zima recién comienza a eluir a una concentración de NaCl cercana a 0,3 M (resultados no mostrados).

I. 2 Precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en Bio Gel A 0,5 m.

La preparación de DEAE (combinación de las fracciones con mayor actividad de ciclasa) fue sometida a precipitación fraccionada con sulfato de amonio y el precipitado correspondiente al corte 30-60 % de saturación fue resuspendido, dializado y cromatografiado a través de una columna de Bio Gel A 0,5 m. El perfil de esta columna puede observarse en la Figura 20. La actividad de ciclasa eluye en un pico simétrico con una constante de elución k_{el} (volumen de elución/ volumen de exclusión) de alrededor de 1.8.

El mayor problema planteado en los pasos de purificación hasta aquí enumerados fue la pérdida de actividad enzimática. No se logró mejorar la recuperación de la actividad ni por el agregado de glicerol (hasta un 30 % v/v), ni por un aumento en la concentración de β mercaptoetanol en el buffer de elución. Debido a esta dificultad, los dos primeros pasos debieron ser realizados en menos de 30 hs.

Con el objeto de encontrar un método que permitiera obtener un grado mayor de purificación, la preparación de Bio Gel fue sometida a diversos tipos de cromatografía de afinidad. Se ensayaron columnas de azul-dextrano-Sepharosa, Cibacron-azul-Sepharosa, L-triiodotironina-Sepharosa y ADP-Sepharosa. En todos estos casos los

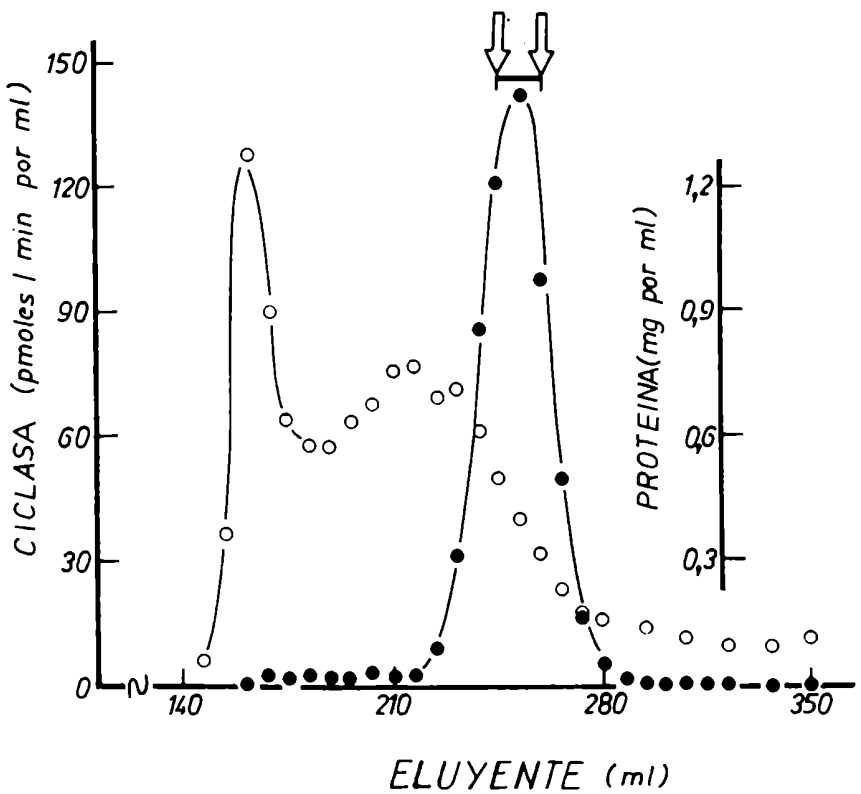


Figura 20:- Cromatografía preparativa en columna de Bio Gel A 0,5m de una preparación de DEAE de testículo de rata, fraccionada con sulfato de amonio.
●, actividad de adenilil ciclasa; ○, proteína.
Las flechas indican las fracciones combinadas a utilizarse en el paso de purificación siguiente.

resultados fueron infructuosos ya que la actividad de ciclasa no quedaba retenida en las columnas sino que eluía con el lavado a baja fuerza iónica junto al resto de las proteínas de la preparación sembrada.

I. 3 Enfoques isoeléctricos.

Con el fin de determinar el punto isoeléctrico de la adenilil ciclasa, una alícuota de una preparación de Bio Gel fue sometida a un enfoque isoeléctrico en columna con un rango de pH de 3,5 a 10,0 unidades. Este experimento preliminar mostró que la actividad de ciclasa enfocaba en un sólo pico a pH = 5,3 coincidente con un pico de proteína que representada un 6 % de la proteína sembrada en la columna. El 94 % restante de proteína enfocaba en el extremo ácido del gradiente de pH. Este resultado permitió seleccionar al electroenfoque como un buen método para la purificación de la enzima. De este manera, se sometió a la preparación de Bio-Gel a un enfoque isoeléctrico entre pH 4,0 y 6,0. Los resultados de este experimento se detallan en la Figura 21. La actividad enzimática enfocó en un sólo pico, completamente resuelto del resto de las proteínas localizadas en la zona ácida del gradiente. Sin embargo, la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS del pico de actividad de ese electroenfoque reveló la existencia de varias bandas teñidas con azul de Coomassie, cuyas movilidades correspondían a pesos moleculares de alrededor de 100.000; 80.000; 69.000; 52.000 y 43.000 (figura 22).

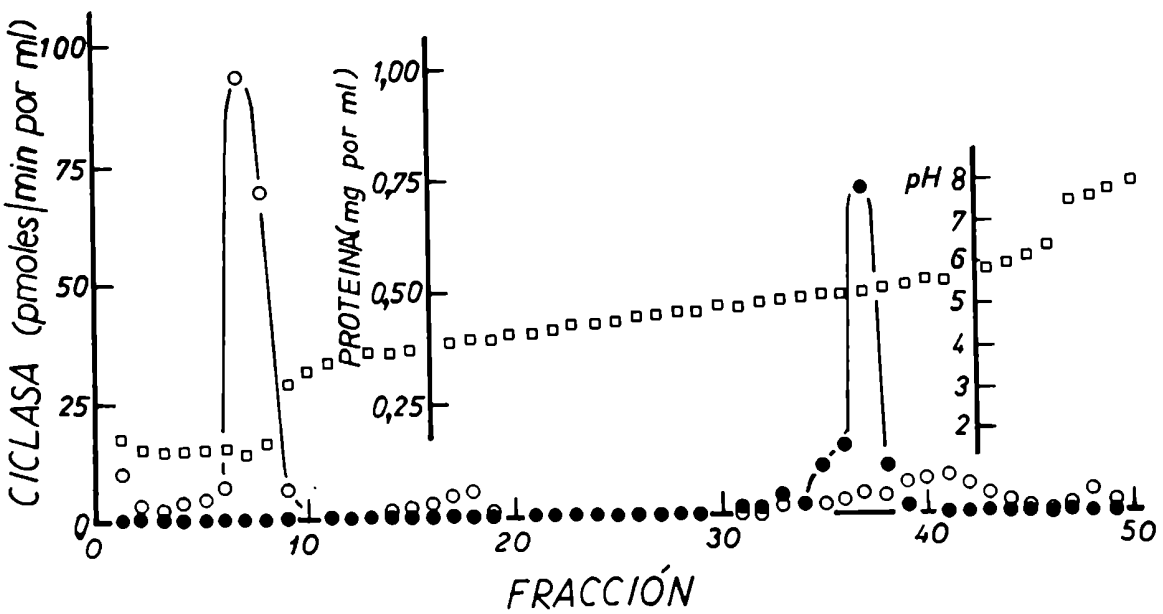


Figura 21:- Enfoque isoeléctrico de una preparación de BioGel fraccionada con sulfato de amonio y dializada.
Rango de pH: 4,0-6,0. □ , pH ; ●, actividad de adenilil ciclasa; ○, proteína.

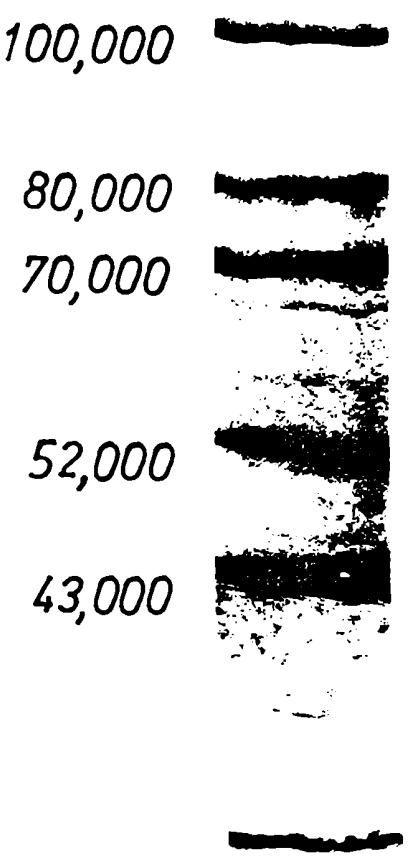


Figura 22:- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de la fracción de máxima actividad de adenilil ciclasa obtenida en un enfoque isoeléctrico entre pH = 4,0 y 6,0. Se sembraron 100 µg de proteína. La concentración de acrilamida en el gel es 7,5 % (p/v).

La actividad enzimática recuperada al final del electroenfoque fue muy escasa (sólo un 4 % de la actividad sembrada).

En vista de los resultados obtenidos con el rango de pH= 4,0-6,0 y teniendo en cuenta que se conocía con cierta precisión el punto isoeléctrico de la enzima, se decidió abordar la purificación mediante un enfoque isoeléctrico en un rango más estrecho de pH. (5,0-5,6). La solución de anfolitos para este experimento fue preparada de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos. La Figura 23 muestra el perfil de elución de la columna de electroenfoque en dicho rango. La enzima sembrada corresponde a una preparación de Bio-Gel. La actividad enzimática presenta un pico principal que enfoca a pH = 5,5 y un pico minoritario que enfoca, con la mayor parte de la proteína, en el extremo ácido.

Al someter el pico de actividad enzimática a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se observó la presencia de una sola banda polipeptídica, tanto en geles conteniendo 6,5 % (p/v) (Figura 24) como 10 % (p/v) (Figura 25) de acrilamida.

En ambos geles puede estimarse un peso molecular aparente de 69.000 para la banda polipeptídica. La Figura 26 muestra la curva de calibración del gel de poliacrilamida al 6,5 % (p/v) y un barrido densitométrico a 530 nm del canal 4 del mismo gel, teñido con azul de Coomassie R 250. Puede confirmarse la presencia de un único pico de absorción mayoritario correspondiente al peso molecular indicado. Por otra parte, un gel similar al de la Figura 25 fue sometido

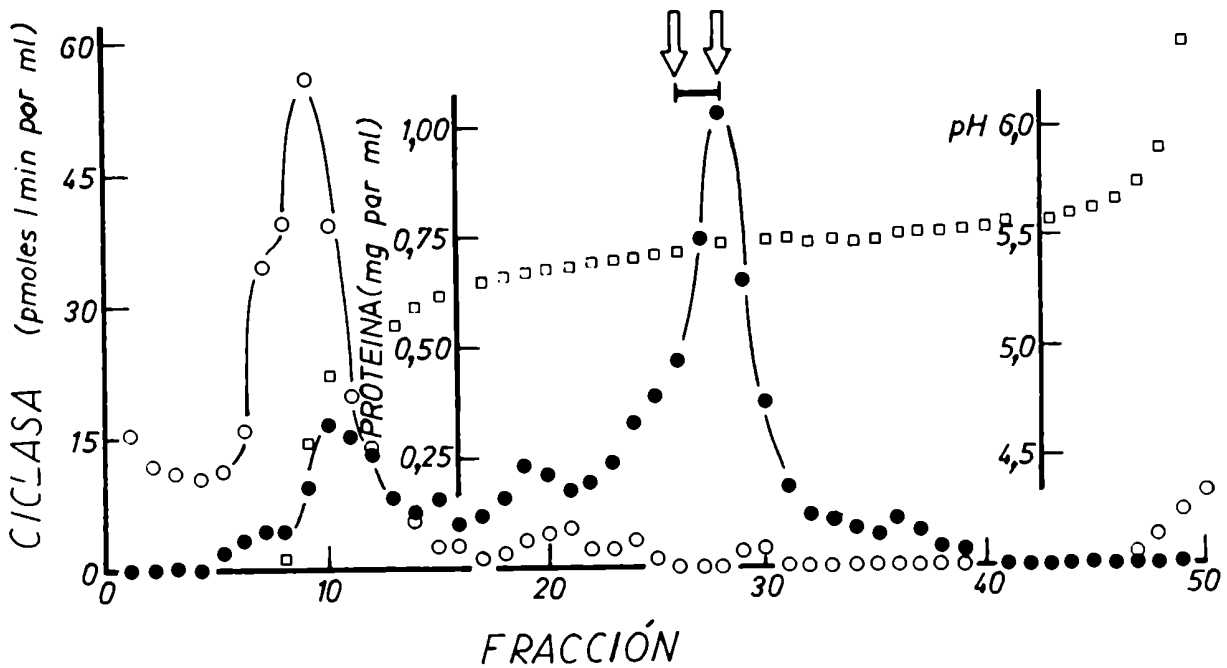


Figura 23:- Enfoque isoeléctrico de una preparación de Bio-Gel fraccionada con sulfato de amonio y dializada. Rango de pH: 5,0-5,6. Los símbolos son los mismos que en la Figura 21.

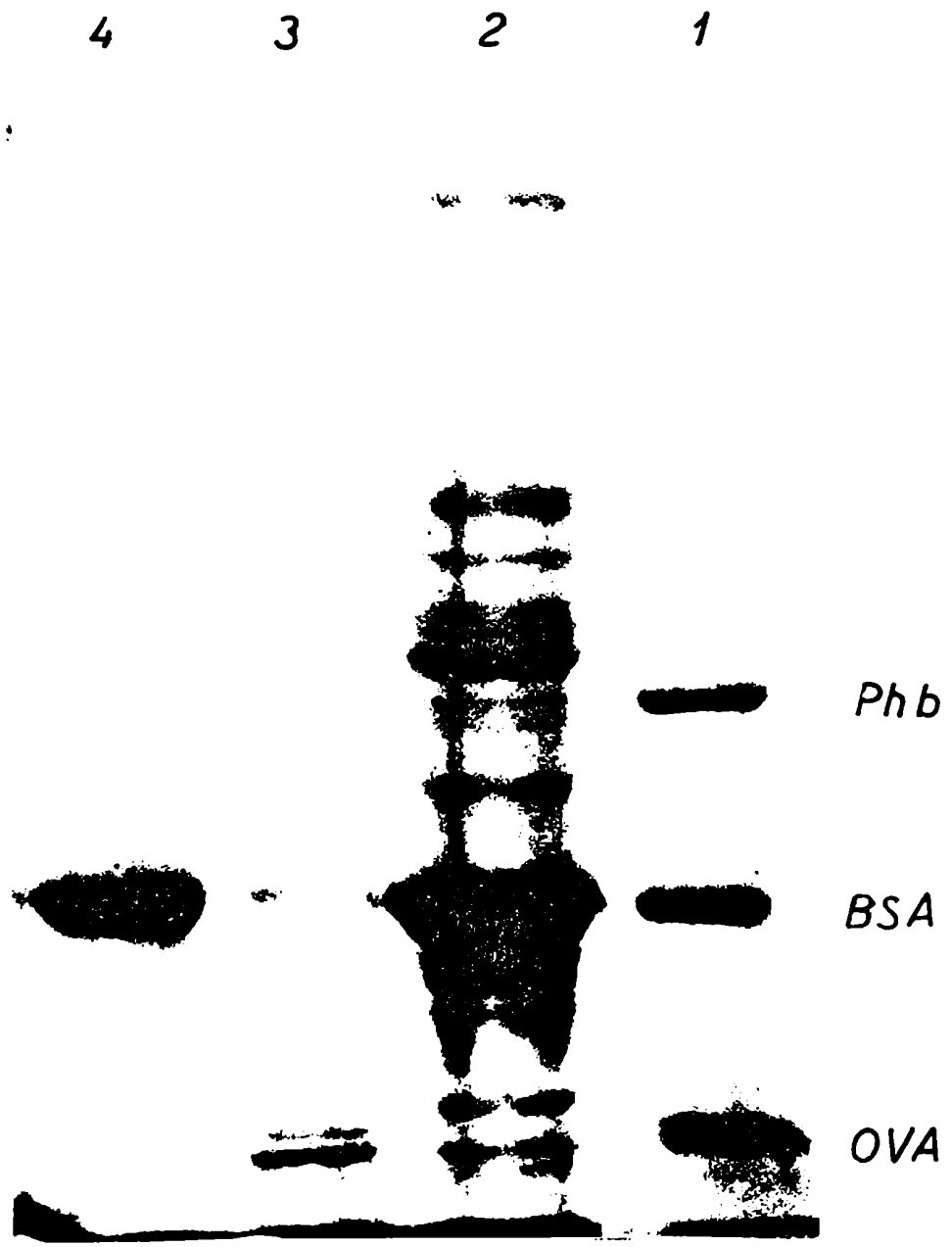


Figura 24:- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de alícuotas de varios pasos de purificación de la adenilil ciclasa de testículo.
1. proteína marcadora, 2. preparación de DEAE (100 µg de proteína), 3. preparación de Bio-Gel (50 µg de proteína) y 4. pico de actividad enzimática del electroenfoque entre pH 5,0 y 5,6 (10 µg de proteína). Phb = fosprilasa b; BSA, seroalbúmina bovina; y OVA, ovoalbúmina. La concentración de acrilamida en el gel es 6,5 % (p/v).

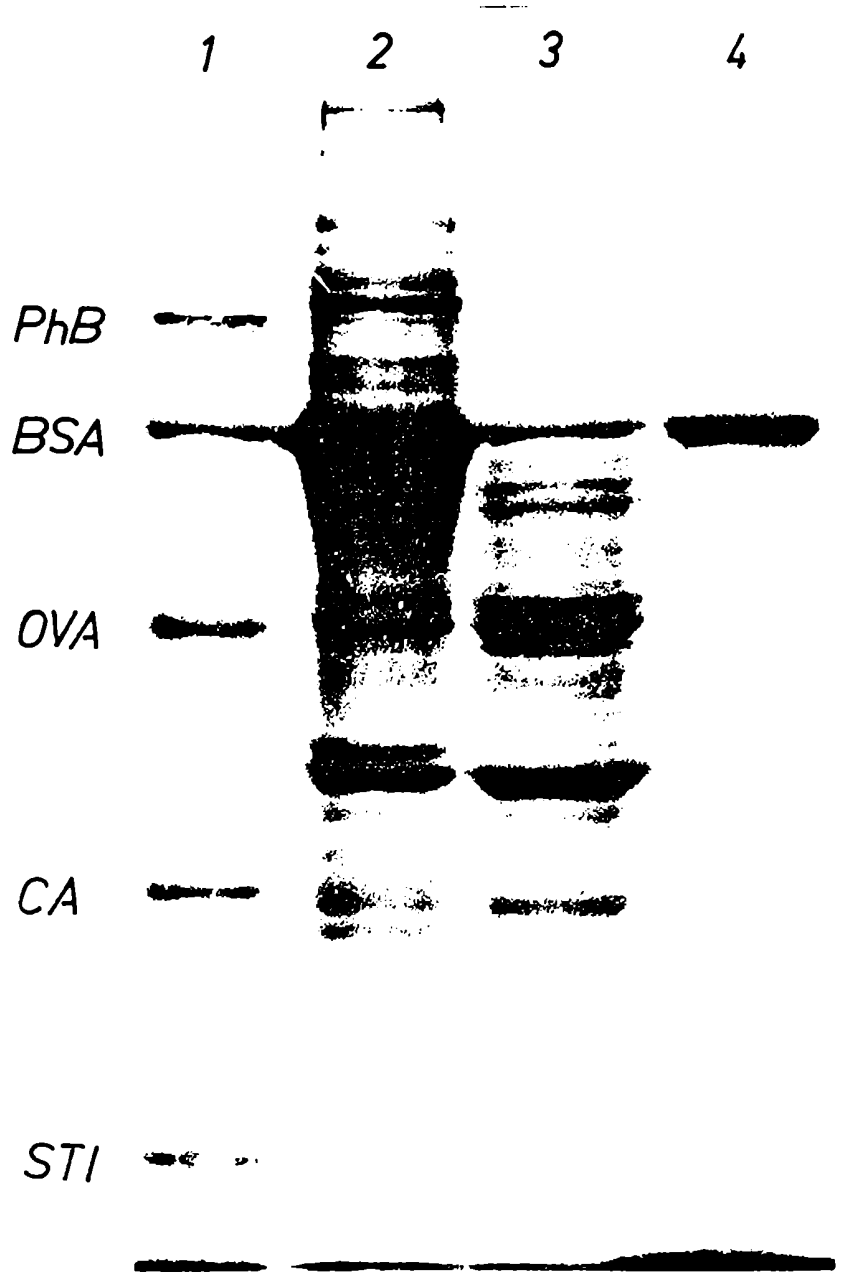


Figura 25:- Idem figura 24. La concentración de acrilamida en el gel es 10 % (p/v). CA, anhidrasa carbónica y STI, inhibidor de tripsina de soja.
Otras abreviaturas, iguales a las de la figura 24.

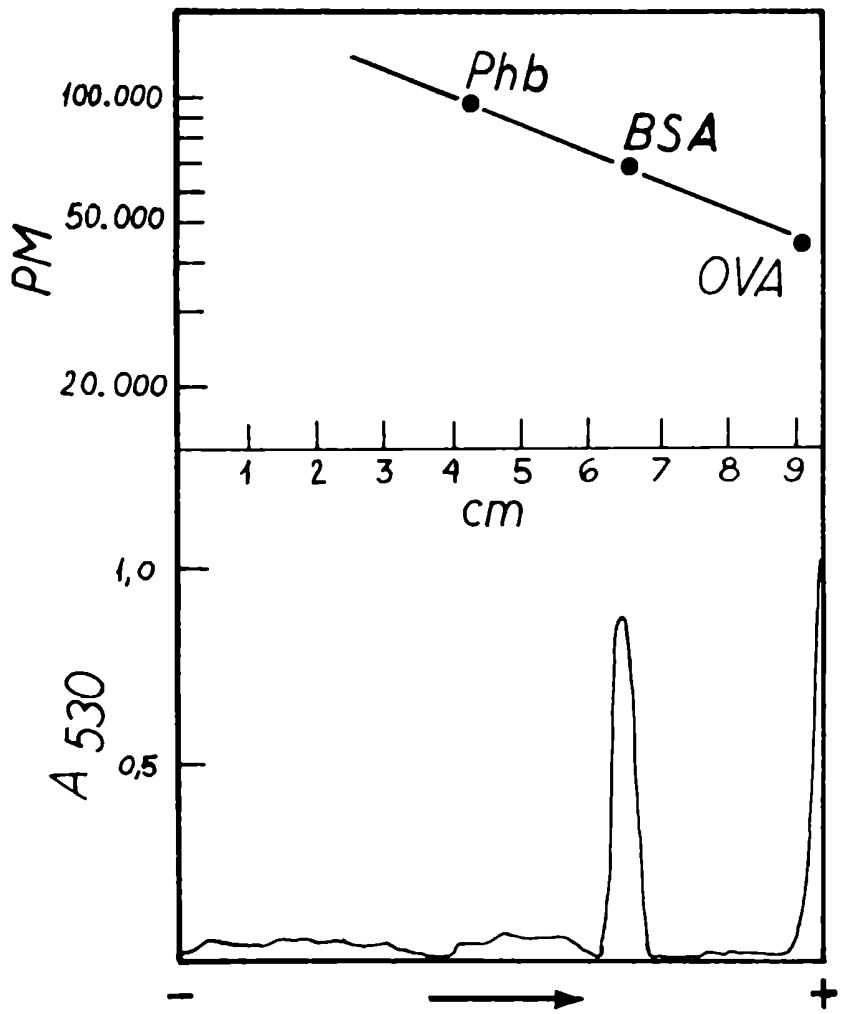


Figura 26:- Barrido densitométrico a 530 nm del canal 4 del gel mostrado en la figura 24 y correlación con la curva de calibración de dicho gel.

a la reacción de PAS (oxidación con periodato y coloración con el reactivo de Schiff). No se observó tinción alguna en la zona correspondiente a la banda de 69.000, lo cual indicaría la ausencia de carbohidratos asociados a dicho polipeptido.

La actividad enzimática recuperada en el pico de electroenfoque en rango de pH estrecho fue un 20 % de la actividad sembrada, o sea, cuatro veces mayor que la recuperada en los electroenfoques en rangos de pH más amplios. La actividad específica de adenilil ciclasa en la fracción pico del último paso de purificación fue de alrededor de 12 nmol de AMP cíclico producido por minuto por mg de proteína, lo cual representa una purificación de 1700 veces respecto del S 105.(ver tabla 7).

TABLA 7

Purificación de la adenilil ciclasa de túbulos seminíferos de rata.

FRACCION	PROTEINA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (pmoles/min)	DE RECUPERACION %	ADENILIL CICLASA ESPECIFICA (pmoles/min/ mg prot.)	PURIFICACION (veces)
S 105	1.900	15.800	100,0	7	1,0
Preparación de DEAE[a]	315	10.000	63,3	30	4,3
Preparación de Bio-Gel[a]	14	3.286	20,8	235	33,6
Enfoque isoeléctrico[a]	0,02[b]	240	1,5	12.000	1.714,3

a - Las fracciones pico fueron marcadas con flechas en las figuras 19 20 y 23.

b - La concentración de proteína fue estimada por barrido densitométrico a 530 nm de los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie R 250, usando albúmina sérica bovina como patrón.

Dada la actividad específica extremadamente baja encontrada en la fracción pico del último paso de purificación, caben dos posibilidades:

1) - A través del proceso de purificación y principalmente en la etapa del enfoque isoeléctrico la enzima va perdiendo actividad irreversiblemente. De esta manera, la banda polipeptídica de 69.000 podría representar en gran proporción enzima inactiva y en menor proporción, moléculas de ciclasa que conservan aún su actividad catalítica.

2) - La banda de 69.000 observada en los geles correspondería a un contaminante presente en gran concentración en la fracción pico del enfoque isoeléctrico, siendo la banda correspondiente a la ciclasa, una banda minoritaria casi no observable en dichos geles. Se realizaron diversos experimentos con el objeto de discernir entre las dos posibilidades:

- En primer lugar, se caracterizaron los poductos de la reacción de ciclasa catalizada por la fracción pico del electroenfoque por cromatografía en papel según lo descripto en Materiales y Métodos. El AMP cíclico fue la única sustancia radioactiva producida, tanto en presencia como en ausencia de sistema regenerante de ATP, o de AMP cíclico y 3-isobutil-1-metil-xantina en la mezcla de reacción. Además, la cantidad máxima de AMP cíclico producido por esta preparación enzimática no se vio modificada por la omisión del sistema regenerante de ATP, AMP cíclico o inhibidores de la fosfodiesterasa

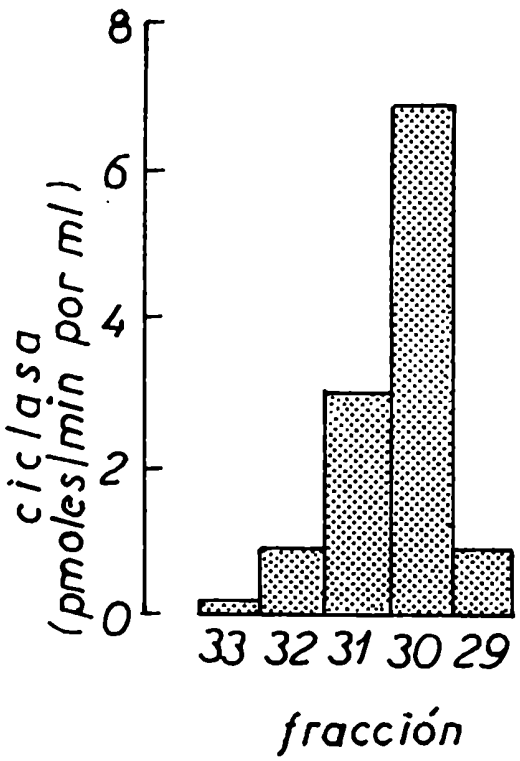
en la mezcla de reacción. Estos resultados indicarían que la fracción pico del enfoque isoeléctrico carece de otras actividades enzimáticas distintas de la ciclasa, capaces de utilizar al ATP como substrato (v.g. ATPasa), así como de fosfodiesterasa de AMP cíclico.

- Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes (ver Materiales y Métodos) de una alícuota de la preparación de Bio- Gel. Una vez finalizada la corrida, el gel fue cortado en 30 trozos de 0,25 cm y la proteína de cada trozo fue eluida con buffer TRIS 50 mM, pH 7,4 conteniendo DTT 1mM. La fracción eluida que tenía actividad de adenilil ciclasa fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (condiciones desnaturalizantes) y se observó que presentaba una única banda teñida con azul de Coomassie R 250 con una movilidad correspondiente al peso molecular de 69.000. Este experimento demuestra que, siguiendo un método analítico de purificación de principios diferentes de los del electroenfoque, la fracción con actividad enzimática también está asociada a un único polipéptido de peso molecular 69.000.

- Se combinaron las fracciones con actividad enzimática de un enfoque isoeléctrico igual al descripto en la figura 23, se dializó y liofilizó. El liofilizado fue resuspendido en un mínimo volumen y sometido a un nuevo enfoque isoeléctrico entre pH 4,0 y 6,0 en las mismas condiciones que las descriptas para el experimento de

la Figura 22. Cada una de las fracciones del pico con actividad de adenilil ciclasa fue corrida en electroforesis en gel de poli acrilamida con SDS. Los resultados pueden observarse en la Figura 27. Este experimento demuestra que la asociación entre la ac-

Figura 27:- Electroforesis en gel de poliacrilamida (10% p/v) con SDS de cada una de las fracciones con actividad enzimática de un re-electroenfoque en columna de la adenilil ciclasa de testículo. En la parte inferior del gel se encuentran los valores de actividad enzimática de cada fracción sembrada.



tividad enzimática y el polipéptido de 69.000 se mantiene aún después de un nuevo paso de purificación y, lo que es más importante, que existe una correlación entre la cantidad de polipéptido presente en el gel y la actividad enzimática de la muestra sembrada.

- Por último, cabe destacar que todos los geles fueron teñidos durante 16 hs con azul de Coomassie R 250. Este colorante es el más adecuado en los casos en que las proteínas estén presentes en el gel a muy bajas concentraciones (208) ya que permite detectar bandas de hasta 0,5 µg de proteína. En el caso de que la ciclasa fuera un péptido no detectable por tinción en el gel de la Figura 25 distinto del péptido de 69.000, la enzima debería estar presente en la fracción pico del electroenfoque en una concentración menor de 0,1 µg de proteína/ml.

Las evidencias presentadas anteriormente, sumadas al estudio de los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la adenilil ciclasa que se describen en la sección siguiente, permitirían optar por la primera de las dos posibilidades planteadas en la página. Esto es que la adenilil ciclasa soluble de testículo está constituida por un polipéptido único de PM 69.000.

I. 4 Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la adenilil ciclasa.

I. 4.1 Filtración en gel.

La Figura 28 muestra el perfil de elución de una pre-

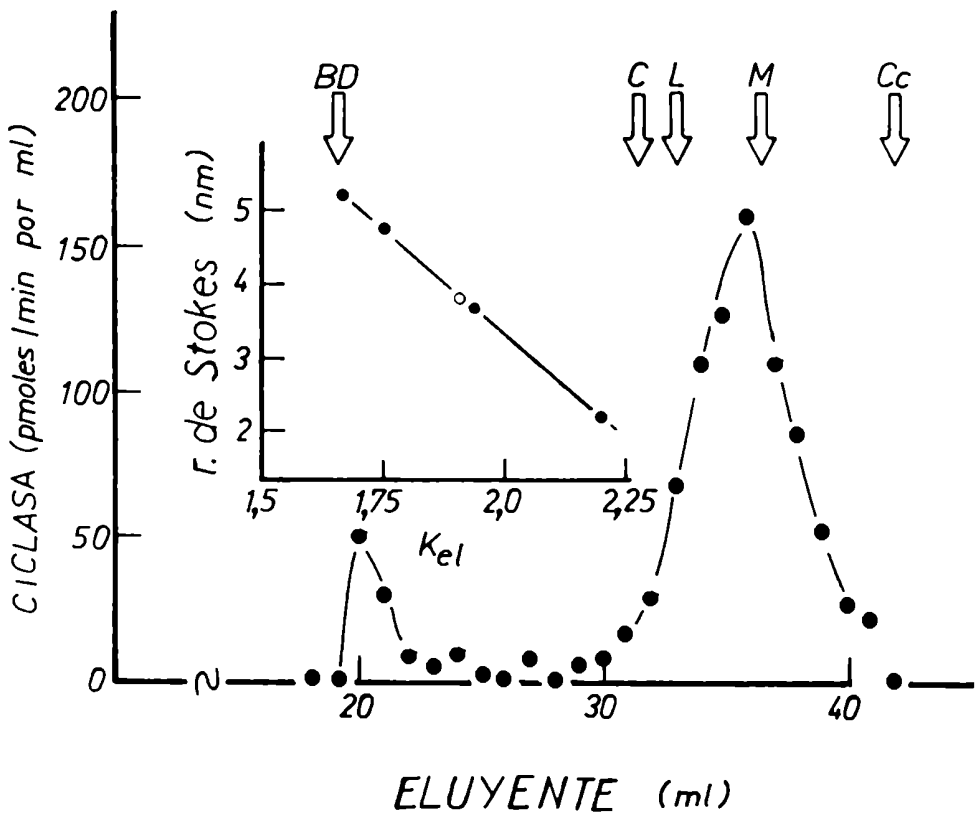


Figura 28:- Cromatografía en columna analítica de Bio-Gel A 0,5 m de una preparación de DEAE.
El gráfico incluido muestra la relación entre la k_{el} y los radios de Stokes para las diferentes proteínas marcadoras (●) y para la ciclasa (⊙). BD, azul dextrán; C, catalasa; L, lactato deshidrogenasa; M, malato deshidrogenasa; y Cc, citocromo c.

paracion de DEAE de la adenilil ciclasa de testículo cromatografiada en una columna analítica de Bio-Gel A. 0,5 m. Las flechas indican la posición de los picos de las proteínas marcadoras. La enzima eluyó según una constante k_{el}= 1,8, correspondiente a un radio de Stokes de 4,0 nm, similar al de la malato deshidrogenasa usado como marcador. Puede además observarse que existe un pequeño pico de actividad enzimática coincidente con el volumen de exclusión de la columna. Este pico podría representar agregados de las moléculas de ciclasa entre sí o con otras proteínas presentes en la preparación de DEAE.

I. 4.2 Ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa.

Con el objeto de conocer el coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) y el volumen específico parcial de la enzima ($\bar{v}$) se realizaron centrifugaciones en gradientes de sacarosa hechos en H_2O o en D_2O. Los resultados son mostrados en la Figura 29. Tanto en H_2O como en D_2O la ciclasa sedimentó generando un pico simétrico. El experimento mostrado en la figura 29 corresponde a gradientes sembrados con una preparación de DEAE. Los resultados obtenidos sembrando una preparación enzimática más purificada (hidroxilapatita, ver Materiales y Métodos) fueron cualitativamente similares. En la curva de calibración inserta en la Figura 29 se graficó la distancia recorrida por cada proteína marcadora desde el borde superior del gradiente hasta la posición alcanzada al finalizar la centrifugación (r) en función del coeficiente de sedimentación (S).

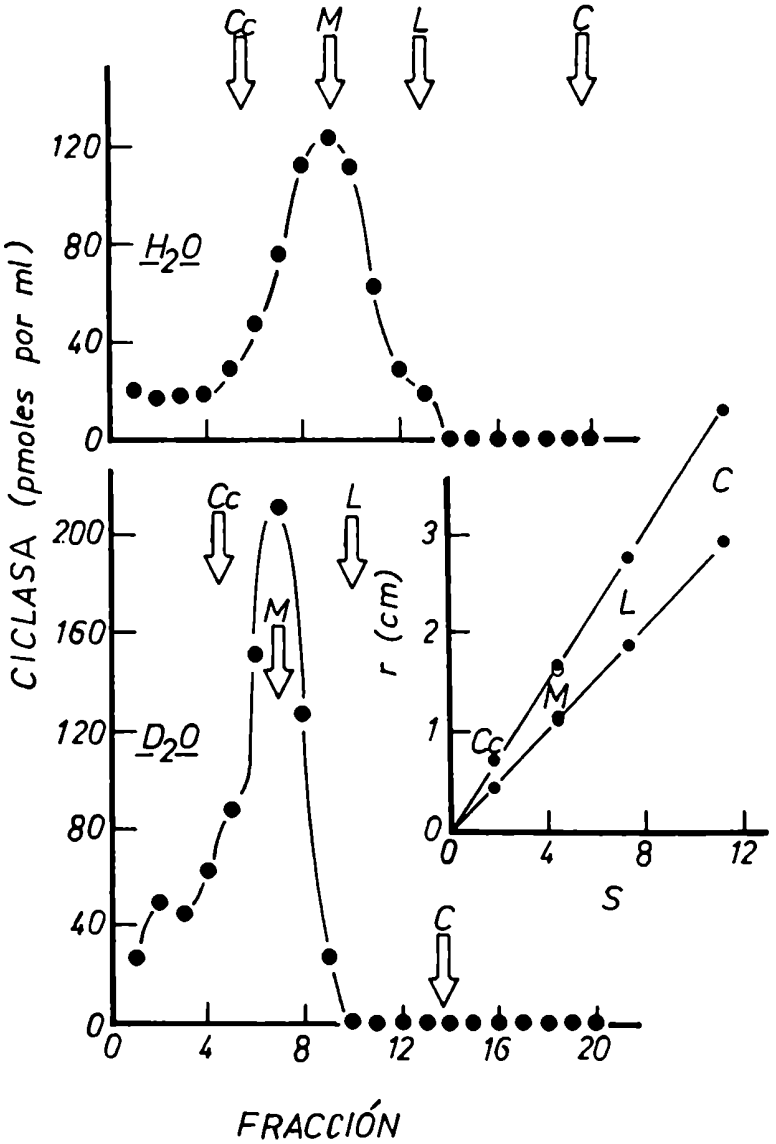


Figura 29:- Centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa de una preparación de DEAE de la adenilil ciclasa de testículo.
Los gradientes fueron hechos en H_2O o en D_2O. En el inserto se graficó la movilidad en función de las constantes de sedimentación para las proteínas marcadoras (●) y la ciclasa (○).
Las abreviaturas usadas son iguales a las de la figura 28.

Dicha curva de calibración muestra que la adenilil ciclasa de túbulos seminíferos presenta la misma constante de sedimentación en ambos solventes, 4,3 S, coincidente con la de la malato deshidrogenasa. Este hecho indica que la ciclasa posee el mismo valor de volumen específico parcial ($\bar{v}$) que las proteínas usadas como marcadoras, es decir, 0,74 ml. g^{-1}. Este valor es característico de las proteínas globulares encontradas en fracciones solubles y carentes de sustancias lipídicas asociadas.

Conociendo los valores del radio de Stokes, el coeficiente de sedimentación y el volumen específico parcial de la enzima es factible estimar su peso molecular relativo utilizando la fórmula planteada en la sección IV.3 de Materiales y Métodos. El valor hallado es de 74.000. Además, se calculó un cociente friccional de 1,41 para la enzima, usando la fórmula IV. 4 de Materiales y Métodos. La tabla 8 resume los parámetros hidrodinámicos de esta adenilil ciclasa. Los resultados corresponden a cinco experimentos diferentes realizados con distintas preparaciones enzimáticas.

TABLA 8

Parámetros moleculares e hidrodinamicos de la adenilil ciclasa de túbulos seminíferos de rata.

PARAMETRO	VALOR
$S_{20,w}$ (S)	4,3 $\pm$ 0,10
a (nm)	3,95 $\pm$ 0,05
$\bar{v}$ (ml. g^{-1})	0,74
PM	74.000
f/f_0	1,4

I. 5 Discusión.

En la sección correspondiente a la caracterización de la adenilil ciclasa de testículo se ha descripto un procedimiento rápido para la obtención de una preparación de la enzima "soluble" con un alto grado de pureza.

A pesar de que la adenilil ciclasa cumple un papel crítico en la regulación de metabolismo, muy poco se ha avanzado en su purificación desde su descubrimiento por Sutherland. Esta situación es motivada por varias razones:

1) - en casi todos los tejidos la ciclasa es una enzima de membrana y su purificación requiere que los procedimientos de fraccionamiento sean llevados a cabo en presencia de detergentes;

2) - la enzima probablemente constituye menos de un 0,005 % de la proteína total de la membrana;

3) - la actividad enzimática es extremadamente lábil, con una vida media de minutos a temperatura ambiente. La primera de las dificultades no existe en el caso de las ciclasa de testículo ya que tiene localización citosólica, y uno de los objetivos perseguidos al purificar esta enzima soluble es la obtención de anticuerpos que a su vez posibiliten avanzar en la purificación de otras ciclasas. La deficiencia principal del procedimiento de purificación aquí descripto radica en el escaso rendimiento de la actividad enzimática (1,5 %). Si se acepta que en el último paso de purificación la enzima pierde actividad irreversiblemente y que la proteína enzimá

tica (pero no su actividad) es recuperada cuantitativamente, se podría alcanzar una purificación de 10.000 veces en lugar de la de 1.700 veces determinada en base a la actividad.

Existen muy pocos trabajos en la literatura científica que describan intentos exitosos en la purificación de la adenilil ciclasa. Quizás el único trabajo completo hasta el presente sea la purificación a homogeneidad de la ciclasa "soluble" del procariote Brevibacterium liquefaciens llevado a cabo por Takai et al (219). Siguiendo procedimientos convencionales como precipitación ácida, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografías en columnas de hidroxilapatita, DEAE-Sephadex y Sephadex G 200, los autores lograron purificar la enzima 4500 veces, con un rendimiento del 10 %. La enzima homogénea fue cristalizada y presentó un peso molecular de 92.000, estando constituida por dos polipéptidos idénticos de 46.000. También determinaron la composición de aminoácidos de la enzima purificada, comprobando la presencia de un alto porcentaje de aminoácidos ácidos e hidrofóbicos, y la ausencia total de cisteína. Es interesante recalcar que la enzima pura de B.liquefaciens tiene una actividad específica de 30 nmoles/min por mg de proteína, valor que se encuentra en el mismo orden de magnitud que el que presenta la enzima purificada de testículo de rata (12 nmoles/min por mg de proteína).

En lo que respecta a organismos eucariotes, sólo existe un trabajo en la literatura que proclama haber purificado una actividad de ci

clasa (la de cerebro bovino) a homogeneidad (220). Los autores, Stellwagen y Baker, utilizaron cromatografía de afinidad en azul-dextrano-Sepharosa, seguida de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Es sabido que las enzimas cuyo sitio de unión a los nucleísidos fosfato presenta una estructura espacial del tipo del pliegue dinucleotídico (dinucleotide fold), poseen la propiedad de unirse reversiblemente a la molécula del colorante azul Cibacron. Este colorante es el grupo cromóforo del azul dextrano. Stellwagen presentó una purificación de 250 veces con un rendimiento del 20 % usando sólo los dos pasos mencionados. Estos resultados parecen poco convincentes si se los analiza a la luz de los siguientes hechos:

1) - con posterioridad al trabajo de Stellwagen, el grupo de Haber (221) presentó evidencias indicando que la resina azul-dextrano-Sepharosa no es capaz de unir a la adenilil ciclasa de corazón canino solubilizada con detergentes.

2) - En nuestro laboratorio comprobamos que la ciclasa soluble de testículo no tiene capacidad de unirse tanto a resinas de azul dextrano Sepharosa como de Cibacron azul-Sepharosa.

3) - Parece poco probable que con una purificación de sólo 250 veces se obtenga una ciclasa en estado homogéneo, sobre todo teniendo en cuenta que en la mayoría de los tejidos analizados la ciclasa constituye una proporción extremadamente baja de la proteína total de la célula.

4) - En el segundo paso de purificación del trabajo de Stellwagen

y Baker, la enzima eluye de una columna de DEAE-celulosa equilibrada a pH = 8, a una concentración de NaCl de 0,9 M. Este hecho parece bastante inusual si se tiene en cuenta que las ciclasas de testículo y Neurospora (esta tesis), como así también los de corazón canino (221), hígado de rata (223) Fasciola hepatica (222) y Brevibacterium liquefaciens (219) eluyen de columnas de DEAE-celulosa equilibradas a pH neutro o ligeramente alcalino, a concentraciones de NaCl comprendidas entre 0,2 y 0,3 M.

5) - Por último Neer (217) determinó, mediante gradientes de sacarosa y filtraciones en geles de preparaciones no purificadas, un peso molecular ee 220.000 para la ciclasa de cerebro bovino (valor que coincide con los determinados para las ciclasas de membrana de otros tejidos).

Sin embargo, Stellwagen y Baker encuentran que la ciclasa "pura" del mismo órgano presenta una única banda polipeptídica en geles de poliacrilamida con SDS, correspondiente a un peso molecular de 16.000. De acuerdo con este último dato, la molécula nativa debería estar formada por la unión de por lo menos 13 polipéptidos idénticos de peso molecular 16.000, hecho sin duda sumamente llamativo. Por otra parte, desde la publicación del trabajo de Stellwagen en 1976 hasta la fecha no se ha cofirmado la validez de estos resultados ni la utilización exitosa de la cromatografía en azul-dextrano-Sepharosa en la purificación de otras ciclasas. Por el contrario, los investigadores interesados en el tema prosiguieron ensayando nuevos métodos de purificación. De esta manera Homcy et al (221)

demostraron que la adenilil ciclasa de corazón canino se adsorbía específicamente a una resina de ATP-Sepharosa, sólo después de haber resuelto esta actividad de otras proteínas hidrofóbicas. Esto último se lograba por medio de cromatografía del tipo hidrofóbico sobre resinas constituidas por grupos alquilo de cadena larga unidos a agarosa por uniones tipo éter. De este modo, la ciclasa de corazón de perro fue purificada unas 5000 veces, aunque no se llegó a obtenerla en estado homogéneo. Los pasos utilizados fueron extracción de las membranas con detergente, cromatografía hidrofóbica en dodecil-Sepharosa, filtración en gel, cromatografía de afinidad en ATP-Sepharosa y cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Los autores obtuvieron una enzima con una actividad específica de 98 nmoles/min por mg de proteína (nuevamente el mismo orden de magnitud que el obtenido para la enzima pura de testículo en esta tesis)con un rendimiento que osciló entre el 1 y el 4 %.

Comparación del tamaño y forma de la adenilil ciclasa de testículo con las de otras ciclasas de eucariotes.

En la tabla 8 bis muestra los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la actividad de adnilil ciclasa soluble y de membrana en distintos tipos de células eucariotes.

Cabe destacar que de las enzimas mencionadas en la tabla 8 bis, sólo la adenilil ciclasa de testículo ha sido purificada a homogeneidad (columna A); en el resto de los casos, los parámetros moleculares fueron calculados a partir de experimentos realizados con prepara-

ciones crudas (columnas B, D, E, F, G, y H) o parcialmente purifi
cadas (columna C).

TABLA 8 bis

Propiedades hidrodinámicas de las adenilil ciclasas solubles y de membranas de distintos tipos de células eucariotes.

	SOLUBLES			DE MEMBRANA SOLUBILIZADAS CON DETERGENTES				
TEJIDO	TESTICULO		NEUROSPORA	TESTICULO	RIÑON	CEREBRO	HIGADO	LINFOMA S49
REFERENCIA	Kornblihtt (esta tesis)	Neer (111)	Kornblihtt (esta tesis)	Neer (111)	Neer (216)	Neer (217)	Stengel (218)	Gilman (68)
PM	74.000	56.000	202.000	190.000	159.000	220.000	180.000	190.000
$S_{20,w}$(S)	4,3	3,8	6,2	6,7	5,9	8,1	6,8	6,5
Radio de Stokes(nm)	3,9	3,4	7,3	6,8	6,2	7,0	7,0	7,1
$\bar{v}$ (ml/g)	0,74	ND	0,74	0,73	0,74	0,79	0,82	0,76
f/f_o	1,4	1,2	1,65	1,6	1,6	1,5	1,5	1,8
detergente unido (g/g prot.)	-	-	-	n.s.	n.s.	0,39	0,66	0,13
	A	B	C	D	E	F	G	H

ND = no determinado

n.s. = no significativo

Los parámetros hidrodinámicos y moleculares encontrados para la ciclasa soluble de testículo en esta tesis (columna A) difieren de los descriptos para la misma enzima por Neer en 1978 (Tabla 8 bis, columna B, ref.111).

En efecto, esta autora encontró valores de radio de Stokes y coeficiente de sedimentación menores que los aquí descriptos, lo cual le permitió calcular un peso molecular de 56.000, valor que es a su vez menor que el calculado en esta tesis (74.000).
Una de las posibles fuentes de discrepancia entre los valores hallados podría radicar en el estado de pureza de las preparaciones enzimáticas utilizadas en las determinaciones de los parámetros hidrodinámicos. Mientras en los experimentos de esta tesis se han usado distintas preparaciones enzimáticas con alto grado de pureza, Neer sólo utilizó una "enzima cruda" (sobrenadante de 105.000 x g) de testículo. Otra diferencia experimental es que Neer usa Sepharosa 6 B en lugar de Bio-Gel A 0,5 m para las filtraciones en gel, y que la duración de las centrifugaciones en gradientes de sacarosa (6 hs) es menor que la de los gradientes descriptos en esta tesis (15-16 hs) con lo cual la enzima no alcanza la posición media del gradiente, sedimentando en una zona de baja resolución para las proteínas marcadoras.
Por otra parte las evidencias presentadas en esta tesis muestran una correlación satisfactoria entre el peso molecular de la enzima nativa, calculado a partir de los parámetros hidrodinámicos, (74.000) y la movilidad de la enzima pura desnaturalizada en electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio (69.000). Este hecho indicaría que la adenilil ciclasa soluble de testículo es una proteína monomérica. En definitiva puede considerarse que metodológicamente el trabajo de Neer es defectuoso.

De todas maneras, los datos de la tabla 8bis reflejan un hecho sobresaliente: la ciclasa soluble de testículo es una molécula más pequeña que las ciclasas unidas a membrana de otros tejidos de eucariotes, las cuales presentan pesos moleculares que oscilan alrededor de 200.000. Este hecho puede dar lugar a cierto tipo de especulaciones. En primer lugar se podría suponer que la ciclasa de testículo no está estructuralmente relacionada con las ciclasas de mayor tamaño unidas a membranas, es decir que podrían ser productos de genes diferentes con la misma actividad catalítica en presencia de Mn^{++}. Alternativamente podría ocurrir que la molécula de la subunidad C (catalítica) de las ciclasas de membrana, cuyo peso molecular es 200.000, estuviera formada por más de un polipéptido, uno de los cuales fuera portador de la actividad catalítica en presencia de Mn^{++} y tuviera un peso molecular de 70.000. De acuerdo a este razonamiento, las células de la línea germinal sólo producirían el polipéptido de 70.000 y carecerían del o los otros polipéptidos que conformarían la molécula de ciclasa completa. Otra posibilidad es que en las células germinales se produzca una ciclasa más pequeña que las de membrana por causa de alguno de los siguientes mecanismos:

1) - Transcripción incompleta del gen de la ciclasa.
2) - Transcripción completa, pero procesamiento diferente del RNA mensajero.
3) - Síntesis de una molécula de ciclasa de 200.000 y procesamiento inmediato por proteólisis específica para producir un polipéptido con actividad enzimática de PM 70.000.

En cualquiera de los tres casos se podría pensar que el fragmento polipeptídico que le faltaría a la ciclasa soluble de testículo estaría involucrado en procesos como la incorporación de la enzima a la membrana o el reconocimiento e interacción con otras proteínas regulatorias del tipo del componente regulatorio G/F. Respecto de esto último cabe señalar que el grupo de Alfred Gilman ha obtenido evidencias de que la adenilil ciclasa soluble de testículo no interactúa productivamente con la proteína regulatoria G/F en experimentos de reconstitución tendientes a detectar actividad enzimática en presencia de Mg^{++} y la activación por F^{-} o por nucleósidos de guanosina (68).

Las posibilidades descriptas anteriormente son especulativas dado que aún no se conocen el número ni el peso molecular de los polipéptidos que componen a las adenilil ciclasas de membrana (subunidad C). Esto de hecho impide encarar un estudio estructural comparativo con la enzima soluble de testículo.

Por último se podría inferir un rasgo común a las ciclasas de eucariotes (tanto la soluble de testículo como las de membrana de otros órganos) que las diferencia de la ciclasa de procariotes Brevibacterium v.g.): en las primeras parece ser esencial la existencia de grupos SH reducidos para que se manifieste su actividad (se inhiben por N-etil maleimida y se activan por DTT o β mercapto etanol), mientras que en la enzima bacteriana no existiría tal efecto por carecer de cisteína.

II. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA ASOCIADA A TUBULOS SEMINIFEROS POR L-T_3.

II. 1 Efecto de la L-T_3 sobre la actividad de ciclasa de diferentes tejidos.

Dada la escasa información existente sobre efectos *in vitro* de las hormonas tiroideas sobre la actividad de enzimas claves del metabolismo (ver Introducción), se decidió investigar una posible respuesta a la L-T_3 de los sistemas de adenilil ciclasa de diferentes órganos de la rata. Para ello, se ensayaron las actividades de ciclasa basales y en presencia de una concentración muy elevada de L-T_3: 10^{-4} M. Los ensayos se realizaron ya sea con Mg^{++} o Mn^{++} como catión divalente, utilizando las fracciones con mayor actividad específica obtenidas por centrifugaciones diferenciales de homogenatos de cinco órganos diferentes.

Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 9. Las actividades de las ciclasas de hígado, riñón, cerebro y miocardio no fueron modificadas por la presencia de la referida concentración de L-T_3, independientemente del catión divalente usado. En cambio, la ciclasa de la fracción soluble de testículo mostró una clara respuesta inhibitoria a la triiodotironina. Un rasgo relevante de la actividad de adenilil ciclasa soluble de testículo es su estricta dependencia de Mn^{++}, puesto que en presencia de Mg^{++} sólo se detectó un 2,2% de la actividad medida con Mn^{++}. Además, la mayor inhibición por la L-T_3(90%) también se observó en presencia de Mn^{++}.

TABLA 9

Efecto de la L-T_3 sobre la actividad de las adenilil ciclasas asociadas a diferentes tejidos.

EXPERIMENTO	CATION	L-T_3	HIGADO	RIÑON	CEREBRO	MIOCARDIO	TESTICULO
			(pmoles/10min por mg de proteína)				
1	Mg^{++}	-	$4,7^b$	$0,6^b$	$12,5^b$	$1,4^b$	$0,7^c$
	Mg^{++}	+	$4,5^b$	-	$11,4^b$	$1,6^b$	$0,3^c$
	Mn^{++}	-	$13,3^b$	$1,2^b$	$41,0^b$	$3,8^b$	$31,2^c$
	Mn^{++}	+	$11,9^b$	$1,2^b$	$38,4^b$	$2,7^b$	$3,4^c$
2	Mn^{++}	-	$30,0^d$	$13,3^d$	$85,0^e$	$30,0^d$	-
	Mn^{++}	+	$31,0^d$	$13,3^d$	$110,0^e$	$30,0^d$	-

a - La actividad de adenilil ciclasa fue ensayada en presencia de Mn^{++} o Mg^{++} como se describió en Materiales y Métodos. Cuando se indica, la mezcla de incubación fue suplementada con L-T_3 a una concentracion final de 10^{-4} M.

b - El tejido fue trozado y homogeneizado en tres volúmenes de "buffer" A usando un homogeneizador tipo Dounce. Luego la suspensión fue centrifugada a 120 x g durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000 x g por una hora. El sedimento de la última centrifugación fue resuspendido en el mismo "buffer" y usado como fuente de enzima.

c, d, e - La homogeneización fue llevada a cabo de manera similar a la de b con la excepción de que el "buffer" A contenía sacarosa a una concentración de 0,25 M. El fraccionamiento fue realizado por centrifugaciones sucesivas del homogenato o de los correspondientes fluidos sobrenadantes a 120 x g por 10 minutos, 1.100 x g por 10 minutos, 7.700 x g por 10 minutos y 105.000 x g por 60 minutos. Los sedimentos de 7.700 x g y 105.000 x g fueron resuspendidos en "buffer" A y usados en e o d respectivamente. El sobrenadante de la última centrifugación fue usado en c.

II. 2 Localización de la actividad de ciclasa inhibible por L-T_3 en testículo.

Con el objeto de identificar la fracción celular de testículo cuya actividad de adenilil ciclasa es inhibida por la L-T_3, se realizó una centrifugación diferencial de un homogenato de testículos decapsulados hecho en sacarosa 0,25 M. En cada fracción se determinó la actividad enzimática basal o con el agregado de L-T_3 a una concentración de 10^{-4}M. Además se midió la concentración de proteínas y DNA. Los resultados se indican en la tabla 10. Puede observarse que la mayor actividad específica y casi el 90 % de la actividad total se encontraron en la fracción citosólica (sobrenadante de 105.000 x g), confirmando lo hallado por Braun y Dods (4). El DNA sedimentó a una velocidad más baja (121 y 1085 x g) correspondiente a las fracciones nucleares. La enzima asociada a la fracción

citosólica fue la única que exhibió una respuesta inhibitoria en presencia de la hormona. Por otra parte la misma fracción citosólica presentó la mayor actividad de unión específica de $[^{125}I]$-L-T_3 (44,7 %) indicando la probable existencia de una entidad receptora de hormona tiroidea en el citosol de testículo.

TABLA 10

Efecto de la L-T_3 sobre la actividad de adenilil ciclasa asociada a diferentes fracciones celulares de testículos.[a]

FRACCION	PROTEINA TOTAL		DNA TOTAL		ADENILIL CICLASA TOTAL			ADENILIL CICLASA ACTIVIDAD ESPECIFICA	
					BASAL		+L-T_3	BASAL	+ L-T_3
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(pmol/min)	(%)	(pmol/min)	(pmol/min/mg prot.)	
PPDO de 120xg	38,1	39,3	1,04	78,2	4,76	4,4	4,76	0,12	0,12
PPDO de 1100xg	6,7	6,9	0,15	11,3	1,90	1,7	1,90	0,28	0,28
PPDO de 7700xg	6,7	6,9	0,06	4,5	2,60	2,4	2,60	0,39	0,39
PPDO de 105000 xg	13,4	13,8	0,08	6,0	3,08	2,8	2,90	0,23	0,22
SOBRENADANTE DE 105000xg	32,0	33,1	0	0	96,56	88,7	23,00	3,00	0,71

a - Las condiciones del fraccionamiento fueron indicadas en la leyenda de la tabla 9, bajo el item c. Los ensayos de actividad de ciclasa y de la unión de L-T_3 fueron descriptos en Materiales y Métodos.

II. 3 Características de la inhibición por L-T_3.

II. 3.1 Cinética.

La adenilil ciclasa soluble de túbulos seminíferos fue purificada mediante diversos procedimientos comunmente utilizados en la separación de proteínas. La primer etapa de purificación consistió en una cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE celulosa del sobrenadante de 105.000 x g. Los detalles de éste y de los restantes pasos de purificación fueron expuestos en la sección I de los Resultados y en Materiales y Métodos. Sin embargo, es importante recalcar aquí que en todos los procedimientos de purificación ensayados la actividad de adenilil ciclasa conservó su respuesta inhibitoria a la L-T_3. Los experimentos cinéticos que se describen a continuación fueron llevados a cabo utilizando la preparación de DEAE como fuente de enzima.

La figura 30 muestra la actividad de adenilil ciclasa en función del tiempo de incubación, en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de L-T_3. La producción de AMP cíclico fue lineal con el tiempo hasta los 20 minutos de incubación, tanto en condiciones de actividad basal como en presencia de la hormona tiroidea. El efecto inhibitorio de la hormona no sólo no requirió incubación previa sino que se manifestó desde el comienzo de la reacción enzimática indicando que la interacción entre la L-T_3 y su sitio receptor es un fenómeno relativamente rápido.

Por otra parte se estudió la influencia de la concentración de ATP

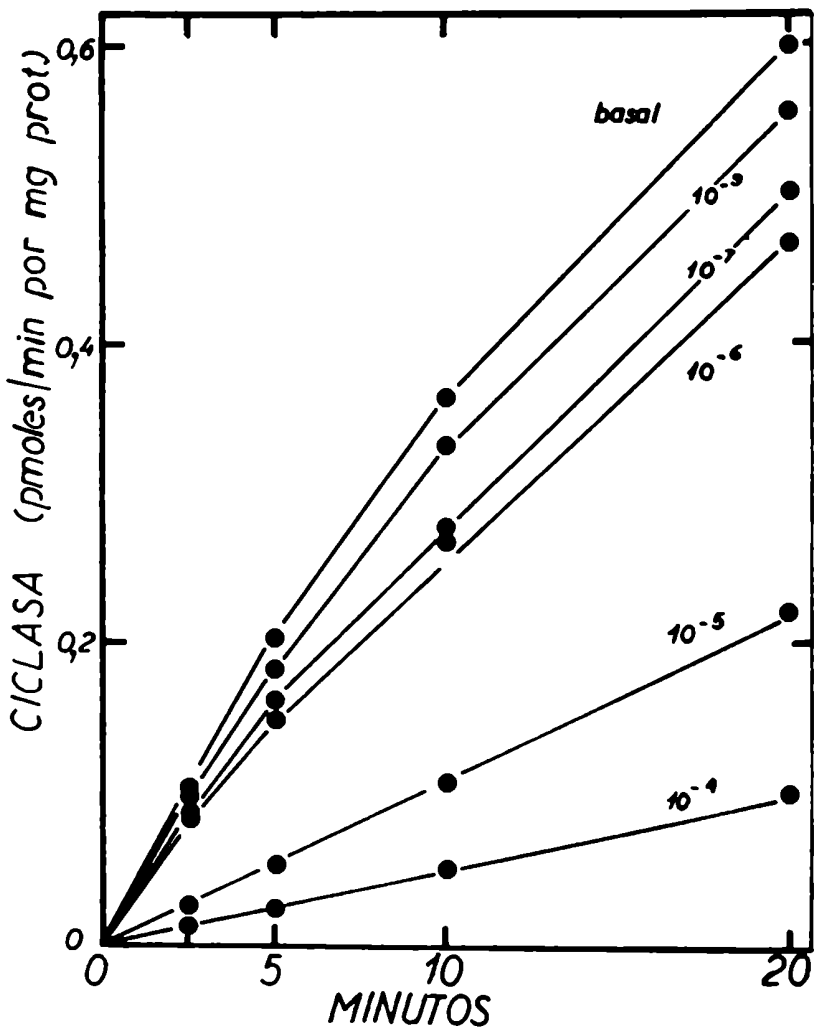


Figura 30:- Formación de AMP cíclico en función del tiempo de la reacción catalizada por una preparación de DEAE de testículo. La actividad enzimática fue ensayada en ausencia de L-T_3 o en presencia de las concentraciones molares indicadas de la hormona.

y Mn^{++} sobre la cinética de inhibición de la ciclasa por L-T_3. Los resultados fueron graficados de acuerdo a Lineweaver y Burk (209) y se encuentran en la Figura 31. Se observaron las siguientes características del sistema:

a) - En presencia de una concentración fija de Mn^{++} muy superior a la que forma el complejo Mn ATP^{2-}, se encontró una dependencia michaeliana (hiperbólica) de las velocidades iniciales respecto de la concentración total de ATP.

En estas condiciones puede establecerse una interacción de tipo no-competitivo entre el ATP y la L-T_3 (Figura 31, izquierda). Es decir, el efecto inhibitorio no fue revertido al aumentar la concentración de ATP, puesto que la presencia de la hormona disminuyó la velocidad máxima de reacción pero no modificó la afinidad de la enzima por el ATP. El valor de Km para el ATP (1mM aprox.) no varió en presencia de la hormona.

b) - Cuando se estudió la reacción fijando la concentración de ATP y variando la de Mn^{++}, las velocidades iniciales se expresaron en función de la concentración de Mn^{++} libre (Mn^{++} total menos Mn^{++} acomplejado por ATP). Como se indica en la Figura 31, derecha, también se encontró una dependencia michaeliana respecto del catión divalente, (Km para el Mn^{++} no acomplejado: 3,0 mM) sea en presencia o en ausencia de L-T_3. El tipo de inhibición observada también resultó de tipo no competitivo ya que el aumento de la concentración del metal no revirtió el efecto inhibitorio de la hormona. Este úl-

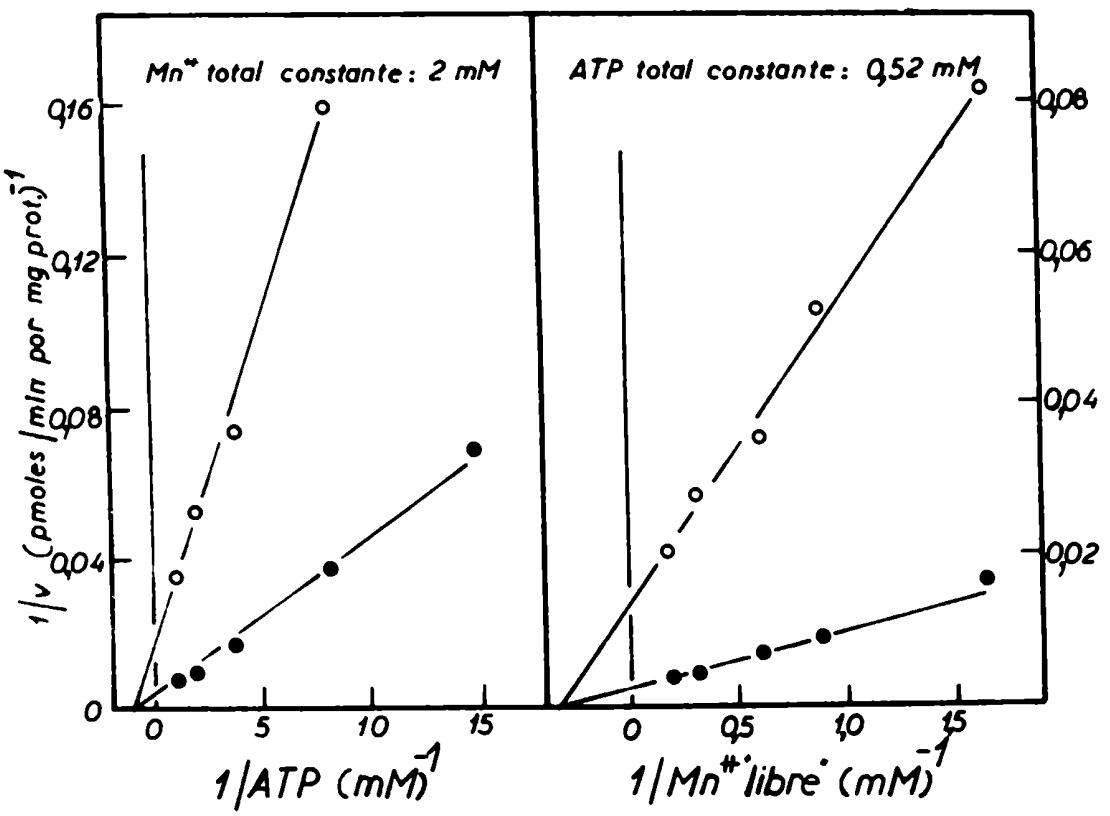


Figura 31:- Gráficos de inversas de las velocidades de reacción en función de inversas de la concentración de sustrato (Lineweaver y Burk) de la reacción de adenilil ciclasa, catalizada por una preparación de DEAE y medida variando la concentración de ATP total (izquierda) o Mn^{++} libre (derecha). Excepto en lo que respecta a las concentraciones de ATP y catión divalente, el ensayo fue realizado como se describió en Materiales y Métodos, en ausencia (●) o en presencia (○) de L-T_3 a una concentración de 10^{-4} M.

timo hecho descartó la posibilidad de que la inhibición de la actividad de adenilil ciclasa causada por la L-T_3 se debiera a un secuestro del Mn^{++} por parte de la hormona. Este punto es importante dado la conocida habilidad de las iodotironinas de actuar como quelante de cationes divalentes.

II. 3.2 Dependencia del pH.

En la Figura 32 se graficó la actividad de ciclasa de una preparación de DEAE en función de distintos pH en la mezcla de ensayo, en ausencia de L-T_3 o en presencia de dos concentraciones de hormona diferentes (10^{-4}M y 10^{-8}M). La máxima actividad basal de la enzima fue encontrada en el rango de pH comprendido entre 7 y 8. En ese mismo rango se manifestó la máxima respuesta inhibitoria a la L-T_3 a una concentración de 10^{-8}M.
El efecto hormonal disminuyó por encima o por debajo de dicho rango de pH. La presencia de una concentración elevada de L-T_3(10^{-4}M) dio origen a una "curva de pH" aplanada, pero aún en este caso puede observarse que el mayor efecto inhibitorio aparece en el intervalo entre pH 7 y 8.

II. 3.3 Reversibilidad de la inhibición.

Dado que el efecto hormonal que se describe en este trabajo es una inhibición, resulta de suma importancia poder diferenciarlo de un proceso irreversible sobre la actividad catalítica de la ciclasa. Los experimentos de cinética de la inhibición (gráficos de Lineweaver y Burk) no permiten diferencias entre una

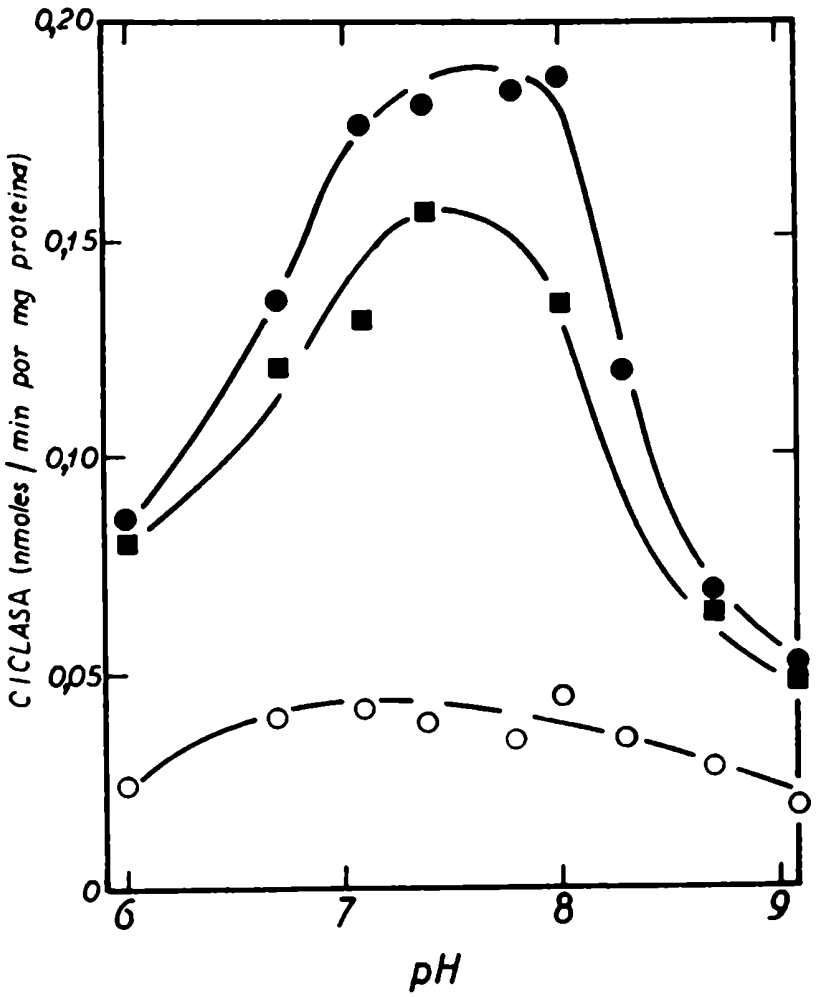


Figura 32:- Dependencia del pH de la reacción de adenilil ciclasa de testículo catalizada por una preparación de DEAE. Las condiciones del ensayo fueron las indicadas en Materiales y Métodos, excepto en la composición de las soluciones buffer. En el rango de pH entre 6,0 y 7,4 se usó buffer Pipes -NaOH a una concentración de 50mM. En el rango de pH entre 7,8 y 9,0 se usó el buffer TRIS-HCl a la misma concentración. Los ensayos de ciclasa fueron realizados en ausencia (●) o en presencia de L-T_3 en concentraciones de 10^{-4}M (○) o 10^{-8}M (■).

inhibición reversible no competitiva y una inhibición irreversible. En ambos casos la presencia del inhibidor reduce la disponibilidad de moléculas de enzima para interactuar con el sustrato; y generar luego producto. Si la unión de la hormona a un sitio receptor (forme éste parte o no de la proteína enzimática) provoca la inhibición de la enzima, es esperable que la disociarse la hormona de su sitio receptor, la enzima recupere su actividad original. Para comprobar ésto se incubó una preparación con actividad de ciclasa (sobrenadante de 105.000 x g) con L-T_3 a una concentración de 10^{-4}M durante 30 minutos a 20ºC. Al culminar la incubación se midió la actividad de ciclasa en una alícuota y el resto se pasó por una columna de Sephadex G 25. En la columna queda retenida la hormona no unida y se excluye la mayor proporción de las proteínas sembradas incluyendo a la ciclasa y a la hormona unida a su sitio receptor. Luego del pasaje por la columna se midió actividad de ciclasa en el eluido de exclusión. Paralelamente se realizó un experimento control en idénticas condiciones pero sin el agregado de L-T_3. Los resultados se indican en la tabla 11.

Al eliminar el exceso de hormona mediante el pasaje por la columna de Sephadex G 25, la actividad enzimática no sólo se recuperó sino que sobrepasó a la actividad específica del control no sometido a la filtración. En el control filtrado también se detectó un aumento de la actividad específica de la enzima respecto del control sin filtrar. Este aumento de aproximadamente un 50 % de la actividad en

zimática recuperada del Sephadex puede ser explicado o por la eliminación de un inhibidor endógeno presente en el S 105, o por un proceso de purificación de la enzima durante el pasaje por el gel. La eliminación de la hormona libre no explica per se la reversión de la inhibición observada, ya que el complejo hormona-sitio receptor debería mantener inhibida a la ciclasa. Sin embargo parece razonable suponer que en el percolado de exclusión de la columna de Sephadex, el complejo L-T_3 sitio receptor se encuentre en condiciones de disociarse rápidamente a causa de la dilución, produciéndose la concomitante pérdida de la inhibición.

TABLA 11

Reversibilidad de la inhibición de la adenilil ciclasa de túbulos seminíferos por L-T_3. Las condiciones del experimento fueron descriptas en el texto.

	ADENILIL CICLASA pmoles AMPc/min/mg prot.	
PASAJE X SEPHADEX G25	CONTROL	+ L-T_3 10^{-4}M
-	10,7	1,9
+	16,3	15,7

II. 3.4 Relación entre la actividad enzimática y la concentración de hormona.

Con el objeto de estudiar la respuesta de la actividad de adenilil ciclasa soluble a un amplio rango de concentraciones de L-T_3, se realizaron experimentos con tres preparaciones enzimáticas de distinto grado de purificación: "sobrenadante de 105.000 x g", "preparación de DEAE" y "preparación de hidroxilapatita". En los tres casos pudo observarse una inhibición de la actividad de la ciclasa de un modo dependiente de la dosis de hormona (Figura 33). En un experimento típico, no hubo efecto de L-T_3 a una concentración de 10^{-11} M; en el rango comprendido entre 10^{-10} y 10^{-6} M de la hormona la inhibición osciló entre un 15 y un 25 % y finalmente se evidenció una fuerte inhibición de la enzima al incrementar las concentraciones de 10^{-6} a 10^{-4} M. Es evidente que las curvas de dosis-respuesta de la Figura 33 son de tipo bifásico, presentando un escaso pero reproducible efecto inhibitorio (15 al 25%) en la zona de concentraciones de triiodotironina cercanas a las fisiológicas. Por otro lado, la inhibición se hace marcada sólo a concentraciones altas y no fisiológicas. Cabe señalar aquí que la denominación "concentración fisiológica" corresponde a los niveles de L-T_3 en el plasma de ratas eutiroideas y que se encuentran en el orden de 10^{-9} M (210).

La solución correspondiente a la mayor de las concentraciones de L-T_3 ensayadas (10^{-4}M) contenía HONa a una concentración de 1mM. En experimentos control, no mostrados, se comprobó que tal molaridad de NaOH en la mezcla de incubación de la ciclasa no afecta por sí misma la actividad enzimática.

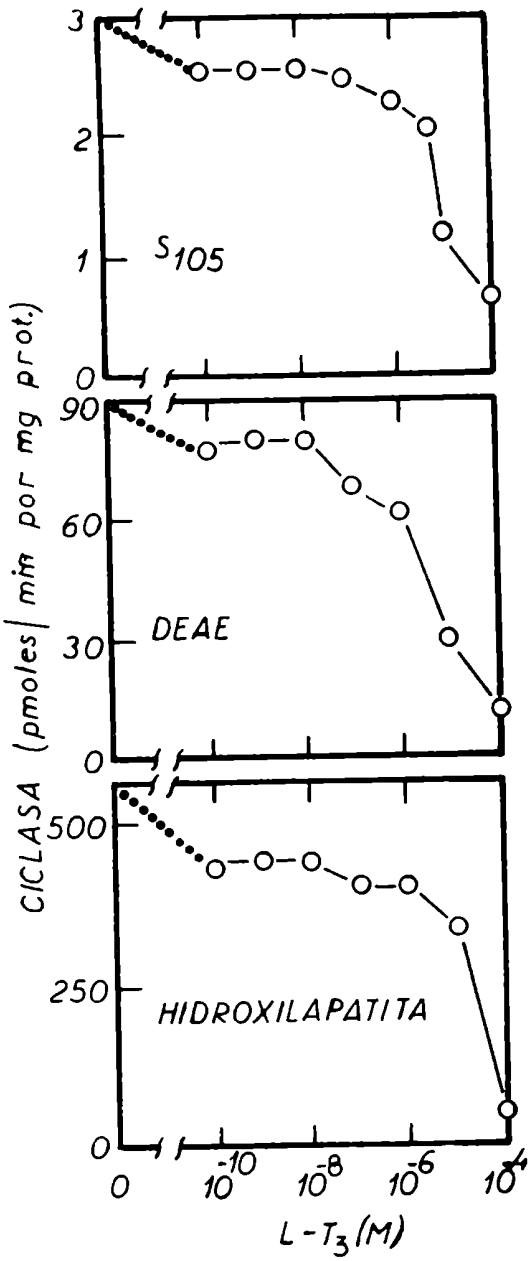


Figura 33:- Relación dosis-respuesta entre la actividad de adenilil ciclasa de túbulos seminíferos y la concentración de L-T_3 en la mezcla de reacción. Los experimentos fueron llevados a cabo con las siguientes fuentes de enzima: S 105, preparación de DEAE y preparación de hidroxilapatita.

II. 3.5 Influencia de compuestos estructuralmente relacionados con la L-T_3 sobre la actividad de la adenilil ciclasa.

El estudio de la influencia de algunos análogos de la triiodotironina sobre la actividad de la ciclasa permite por un lado conocer cuáles son los requerimientos estructurales mínimos de la molécula de L-T_3 para que se produzca la inhibición, y por otro comparar la eficiencia inhibitoria sobre la ciclasa de cada análogo con su potencia biológica en los fenómenos regulados por hormonas tiroideas descriptos en la bibliografía. Sobre esta base se realizaron los experimentos descriptos en este parágrafo.

En primer lugar se ensayó el efecto del NaI y de la 3, 3',5 triiodo-D-tironina (D T_3). El INa no afectó la actividad de la adenilil ciclasa cuando fue ensayado en un amplio rango de concentraciones (10^{-9} - 10^{-4}M), mientras que la D-T_3 mostró un efecto inhibitorio de proporciones idénticas al encontrado con la L-T_3, como puede verse en la Figura 34.

Estos resultados nos indican que el efecto inhibitorio de la L-T_3 no sería debido a la sola presencia de iodo en su molécula y por otra parte que, al no haber diferencias entre la eficiencia de la L-T_3 y la de su isómero óptico D-T_3, no existiría especificidad respecto de la configuración de la cadena de alanina de la triiodotironina.

En segundo término se estudió la respuesta de la actividad de la

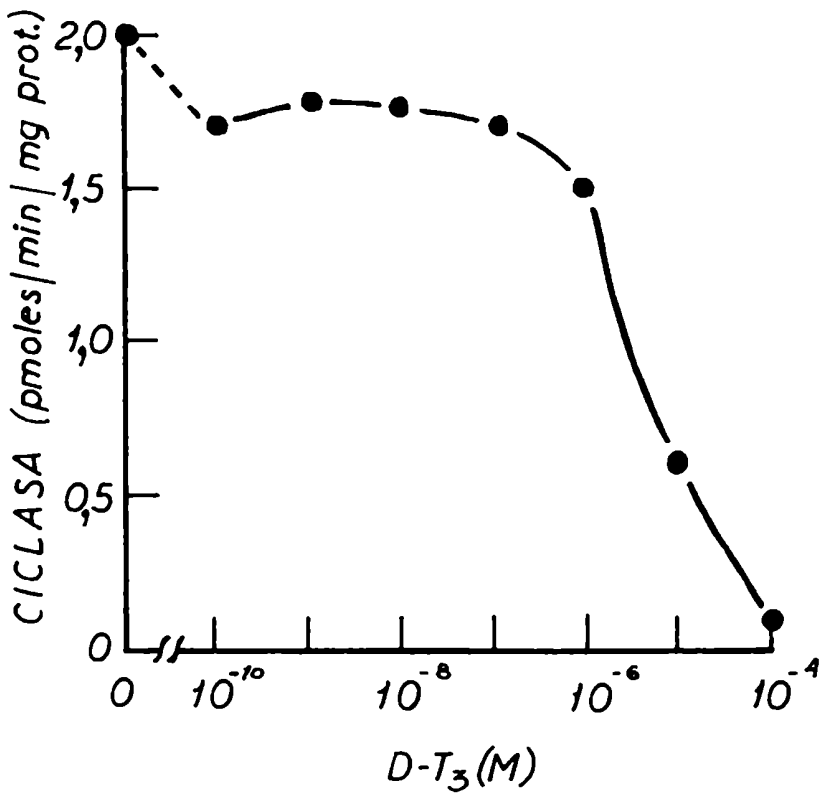


Figura 34:- Relación dosis respuesta entre la actividad de adenilil ciclasa de una S 105 y la concentración de D-T_3 en la mezcla de reacción.

enzima a concentraciones crecientes de L-T_4 (tiroxina) y algunos análogos de las hormonas tiroideas, todos de la forma L. De acuerdo con la evidencia ilustrada en la Figura 35 se pueden obtener las siguientes conclusiones:

La L-tiroxina y la isopropil-L-T_2 parecen tener la misma eficiencia inhibitoria que la L-triiodotironina, en el rango de concentraciones comprendido entre 10^{-8} y 10^{-6} M. Sin embargo, a concentraciones más altas, la inhibición lograda por estos compuestos fue menor que la alcanzada en presencia de L-T_3. Por ejemplo, a una concentración de 10^{-4} M se obtuvo una inhibición del 40 % de la actividad enzimática con la L-T_4, y del 52 % con la isop-L-T_2, mientras que la L-T_3 produjo una disminución del 80 % de la actividad de la adenilil ciclasa.

El ácido triiodotiroacético (TRIAC) presentó poco poder inhibitorio a bajas concentraciones (10^{-8}, 10^{-7}M) comparado con la L-T_3. No obstante, a molaridades mayores de 10^{-7}, la capacidad inhibitoria del TRIAC resultó ser similar a la de la L-T_3.

Las iodotirosinas, como el MIT y el DIT no produjeron inhibición significativa de la actividad de ciclasa en el rango de concentraciones ensayadas. En la curva de dosis-respuesta del DIT, puede observarse un leve efecto inhibitorio a concentraciones muy altas del compuesto.

Tomados en conjunto estos resultados nos indicarían que, para que se produzca la inhibición a altas concentraciones, parece ser nece

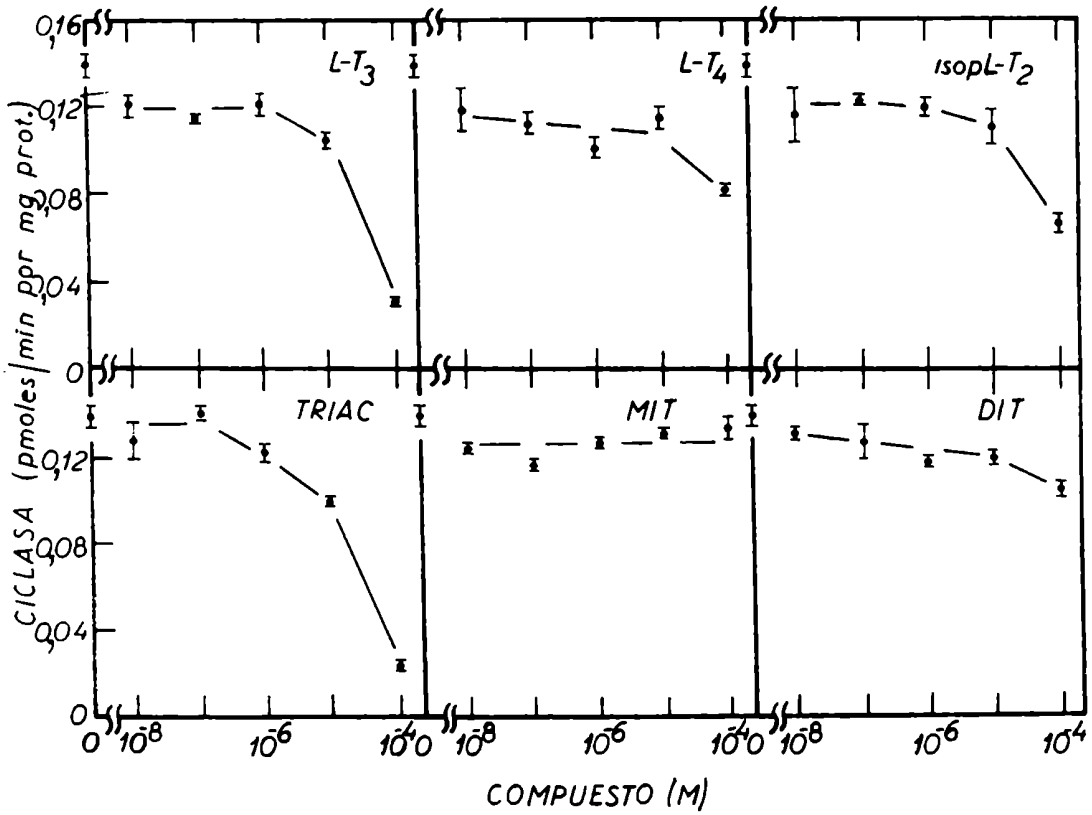


Figura 35:- Relación dosis-respuesta entre la actividad de adenilil ciclasa de una preparación de DEAE y la concentración de hormonas tiroideas y algunos de sus análogos.
Las abreviaturas usadas están descriptas en Materiales y Métodos.

saria pero no suficiente la presencia de la estructura difenil eter en el compuesto ensayado, ya que las iodotirosinas no son efectivas. Por lo demás, la cadena alanina de la L-T_3 no parece jugar un rol importante en la inhibición puesto que el TRIAC, que es un acetato substituido en α por el mismo grupo difenileter con que se encuentra substituida la alanina en la L-T_3, posee el mismo poder inhibitorio que la L-T_3. Como se dijo anteriormente, la isopropil L-T_2 produce un efecto similar al de la L-T_3 sólo a bajas concentraciones. Este compuesto es el análogo más potente de las hormonas tiroideas conocido hasta el presente ya que sus efectos in vivo (la actividad anti-bocio en rata por ejemplo) son a veces hasta un 50 % más eficientes que las de la L-T_3 (120). La causa de la alta eficiencia in vivo radicaría en la presencia de un substituyente lipofílico (CH_3-$\dot{C}$H-CH_3) en la posición 3'.

II. 3.6 Factores que modifican la actividad de adenilil ciclasa y su respuesta in vitro a la L-T_3.

El objeto de los siguientes experimentos fue explorar la posibilidad de obtener preparaciones con actividad de adenilil ciclasa, pero insensibles a altas concentraciones de L-T_3. Para ello, se preincubó una preparación de DEAE con una variedad de reactivos que son capaces de afectar la estructura enzimática de manera conocida. Los resultados se encuentran expuestos en la tabla 12. Como puede observarse, sustancias como la urea o la guanidina que desestabilizan uniones hidrógeno, disminuyeron la respuesta

TABLA 12

Efecto de la preincubación de una "preparación de DEAE" de adenilil ciclasa con diferentes reactivos.[a]

REACTIVO	CONCENTRACION	ACTIVIDAD % sin L-T_3	ACTIVIDAD % con L-T_3	INHIBICION %
NADA		100,0[b]	17,9	82,1
UREA	4 M	9,4	5,7	39,4
	2 M	47,2	16,7	64,6
	1 M	69,3	26,9	61,2
GUANIDINA - HCl	3 M	0	0	
	2 M	10,9	4,8	55,9
	1 M	37,7	10,4	72,4
N-etilmaleimida	$5,00 \times 10^{-3}$ M	0	0	
	$1,50 \times 10^{-3}$ M	0,5	0	
	$0,50 \times 10^{-3}$ M	15,9	0,96	93,9
	$0,15 \times 10^{-3}$ M	53,5	8,70	83,7
	$0,05 \times 10^{-3}$ M	83,3	16,60	80,0
Bromuro de cianógeno	$0,15 \times 10^{-3}$ M	0,8	0	
	$0,05 \times 10^{-3}$ M	2,9	0,6	79,3

(continuación.....

.....Tabla 12 continuación)

REACTIVO	CONCENTRACION	ACTIVIDAD % sin $L\text{-}T_3$	ACTIVIDAD % con $L\text{-}T_3$	INHIBICION %
Ditiotreitol	$25{,}0 \times 10^{-3}$ M	111,2	24,9	77,6
	$10{,}0 \times 10^{-3}$ M	116,2	19,7	83,0
	$2{,}5 \times 10^{-3}$ M	82,7	25,0	69,8
	$0{,}5 \times 10^{-3}$ M	104,5	20,5	80,4
NaCl	2,5 M	68,0	7,0	89,7
Hidroxilamina	$5{,}00 \times 10^{-3}$ M	126,0	33,9	73,1
	$0{,}50 \times 10^{-3}$ M	117,2	28,8	76,2
	$0{,}25 \times 10^{-3}$ M	122,5	31,1	74,6
	$0{,}05 \times 10^{-3}$ M	116,4	25,8	77,8
EGTA	$0{,}50 \times 10^{-3}$ M	103,0	19,9	80,7
TRITON X 100	0,2 %	98,5	95,5	3,0

a - La enzima fue preincubada durante 10 minutos a 37ºC en presencia de las concentraciones indicadas de los reactivos, e inmediatamente fue ensayada para actividad de ciclasa en ausencia o en presencia de $L\text{-}T_3$ a una concentración de 10^{-4}M. El tiempo de incubación fue de 5 minutos. La concentración final de los reactivos en el ensayo corresponde a la mitad de la indicada en la tabla. Las restantes condiciones fueron dadas en Materiales y Métodos.

b - El valor 100 de actividad porcentual corresponde a una actividad específica de 46 pmoles/minuto por mg de proteína.

inhibitoria a la L-T_3. Sin embargo este efecto ocurrió con una disminución concomitante y significativa de la actividad enzimática, por lo cual no se puede atribuir a dichos agentes un papel desensibilizante selectivo hacia la inhibición hormonal.

La N-etilmaleimida, que actúa bloqueando grupos sulfhídrilo (-SH) libres, no modificó la respuesta a la L-T_3, aunque provocó una inactivación de la enzima de una manera dependiente de la dosis. Esto último estaría de acuerdo con los hallazgos realizados en otros sistemas de adenilil ciclasas (ver Introducción), sobre la presencia en estas enzimas de grupos sulfhídrilo imprescindibles para que se manifieste su actividad catalítica.

Por otro lado, el bromuro de cianógeno o la alta concentración salina también redujeron la actividad enzimática sin afectar notablemente la inhibición por L-T_3.

Tanto la hidroxilamina como el ditiotreitol aumentaron levemente la actividad enzimática pero no alteraron la inhibición por la hormona. El ditiotreitol actúa como reductor de uniones disulfuro, generando grupos -SH, y su efecto estabilizante sobre la actividad de la ciclasa soluble de testículo puede correlacionarse con la inactivación observada después de la preincubación con N-etilmaleimida.

El EGTA es un quelante específico de iones Ca^{++}. Ni la actividad de adenilil ciclasa ni su respuesta a la L-triiodotironina sufrieron algún cambio apreciable a causa de la preincubación con EGTA. Recientemente se ha descripto que el Ca^{++} activa a la adenilil ci-

clasa citosólica de testículo de rata, en presencia de Mn^{++} (110). En vista de que la L-T_3 tiene capacidad de quelar cationes divalentes, podría pensarse que el efecto inhibitorio sobre la ciclasa fuera producido por un secuestro del Ca^{++} endógeno de la preparación enzimática por parte de la hormona. Sin embargo, la ausencia de diferencias en la inhibición obtenida tanto sin como con EGTA descartaría la posibilidad mencionada.

Por último, la única sustancia ensayada que produjo una verdadera anulación de la inhibición de la ciclasa por la L-T_3 fue el detergente no iónico Triton X 100.

Como puede verse en la tabla 12, el detergente no sólo anuló casi por completo el efecto inhibitorio, sino que además no modificó la actividad basal de la enzima.

Si bien hasta el momento no se ha definido las características estructurales de la interacción entre la triiodo-L-tironina y un sitio receptor asociado a la adenilil ciclasa, los resultados volcados en la tabla 12, nos permiten dilucidar algunas características funcionales de dicha interacción:

1) - Las interacciones débiles, del tipo enlace de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o uniones electrostáticas no parecen jugar un rol preponderante ya que ni la urea, ni la guanidina-HCl o la alta fuerza iónica (NaCl 2,5M) lograron desensibilizar el efecto hormonal.

2) - Ni la metionina (experimento realizado con bromuro de cianógeno), ni aminoácidos con restos -SH o puentes disulfuro (ex

perimentos con N-etilmaleimida y ditiotreitol) estarían involucrados en el reconocimiento de la L-T_3 por parte de un sitio receptor.

3):- El Ca^{++} no cumpliría ningún papel en la interacción mencionada.

4):- La desensibilización producida por el detergente podría ser un indicio de una interacción de tipo hidrofóbico entre la hormona tiroidea y su sitio receptor. El detergente actuaría secuestrando la hormona, impidiendo por lo tanto que ésta interactúe con la enzima. En experimentos preliminares no mostrados aquí se demostró que otro detergente no iónico, el BRIJ 58, tiene gran capacidad de unir [^{125}I] L-T_3.

II. 4 Dismunución de los niveles intracelulares de AMP cíclico en testículo de rata por la L-T_3.

Con el fin de correlacionar el efecto de la L-T_3 sobre la actividad de la adenilil ciclasa en un sistema libre de células, con un posible rol de la hormona a nivel del contenido de AMP cíclico en el tejido completo, se abordó el estudio de la influencia de la L-T_3 sobre la acumulación de AMPcíclico intracelular en testículo de rata.

II. 4.1 Captación de [^{125}I] L-triiodotironina por trozos de testículo de rata.

En primer lugar fue necesario demostrar, que en las condiciones elegidas para incubar los trozos de testículos de

capsulados el tejido era capaz de captar cantidades significativas de hormona tiroidea. Para ello se incubaron los trozos de tejido en presencia de $[^{125}I]$ L-T_3 a dos concentraciones diferentes: 10^{-4}M y 10^{-8}M con actividades específicas de 10 y 100.000 cpm/pmol respectivamente. Los resultados volcados en la Figura 36 indican que tanto a alta como a baja actividad específica existe una captación considerable de la hormona marcada por parte del tejido. Dicha captación fue lineal hasta los 20 minutos de incubación y se correspondió con una disminución de la marca en el medio de cultivo remanente. La desaparición de la hormona marcada del medio también fue lineal hasta los 20 minutos.

Merece destacarse que pese a haber disminuido 10.000 veces la actividad específica de la $[^{125}I]$ L-T_3 por la adición de hormona fría al medio de incubación, la captación de la hormona marcada por los túbulos sólo disminuyó en un 25 %; lo cual estaría indicando una gran avidez del tejido por concentrar L-T_3 en su interior. Esto se vería apoyado por el hecho de que a los 60' de incubación, más del 50 % de la radioactividad originalmente presente en el medio, permaneció asociada al tejido. No obstante, este tipo de experimento no nos permite asegurar que la captación se deba a una entrada de la hormona tiroidea al interior de las células, ya que no se puede descartar la ocupación de compartimientos intercelulares por parte de la misma.

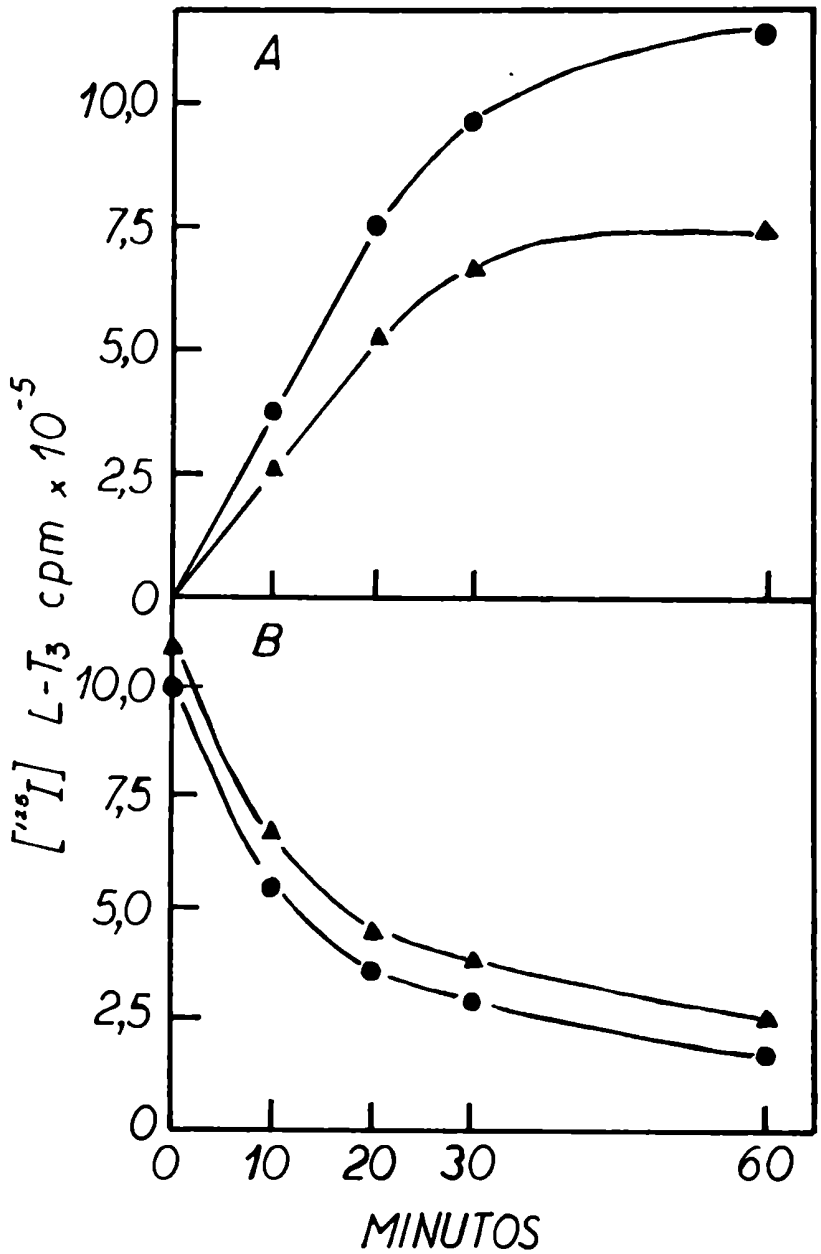


Figura 36:- Captación de [^{125}I] L-T_3 por trozos de testículo de rata. Los testículos de ratas adultas fueron decapsulados y el panículo de túbulos fue cortado en tres trozos con la ayuda de un bisturí. Cada trozo fue incubado a 37°C en un frasco conteniendo 1 ml de medio 199 y 10^6 cpm de [^{125}I] L-T_3 en las siguientes radioactividades específicas: 100.000 cpm pmol (-●-●-) y 10 cpm/pmol (-▲-▲-). En A a los tiempos indicados los trozos de testículo fueron retirados con una pinza y transferidos a tubos de centrífuga que contenían 2,5 ml de medio 199. Luego fueron centrifugados en centrífuga clínica durante 1 minuto a 2000 rpm y se realizaron 3 lavados con porciones de 2,5 ml del medio 199 fresco. Los tubos que contenían el tejido lavado fueron sometidos directamente a la detección de radioactividad en un contador tipo γ. En B a los tiempos indicados se detectó la radioactividad en una alícuota del medio de incubación.

II. 4.2 Influencia de la L-T_3 sobre los niveles de AMP cíclico de trozos de testículo decapsulados. Dependencia del tiempo de incubación.

Cuando se incubaron trozos de testículos decapsulados en medio 199 conteniendo un inhibidor de la actividad de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y en ausencia de hormona tiroidea, se observó un incremento de los niveles de AMP cíclico con el transcurso del tiempo (Figura 37). La concentración del nucleótido aumentó de 7 a 9,2 pmoles por mg de proteína al cabo de 2 hs. de incubación. La misma figura nos muestra que a bajas concentraciones de L-T_3 (10^{-8}M) se suprimió la acumulación de AMP cíclico causada por la metilxantina, observándose además una leve disminución con el tiempo del contenido del nucleótido. A una concentración de L-T_3 dos órdenes mayor que la anterior (10^{-6}M) se encontró la misma respuesta hasta los 60 minutos, pero una disminución un poco mayor a las dos horas. Finalmente, una concentración de hormona muy alta (10^{-4}M) provocó una marcada caída del nivel de AMPcíclico que fue evidente ya a partir de los 30 minutos de incubación.

II. 4.3 Variación de los niveles de AMP cíclico en función de la concentración de L-T_3.

Se estudió la correlación entre los niveles intracelulares de AMP cíclico y la concentración de L-T_3, fijando el tiempo de incubación en 2 hs. La Figura 38 presenta los resultados de

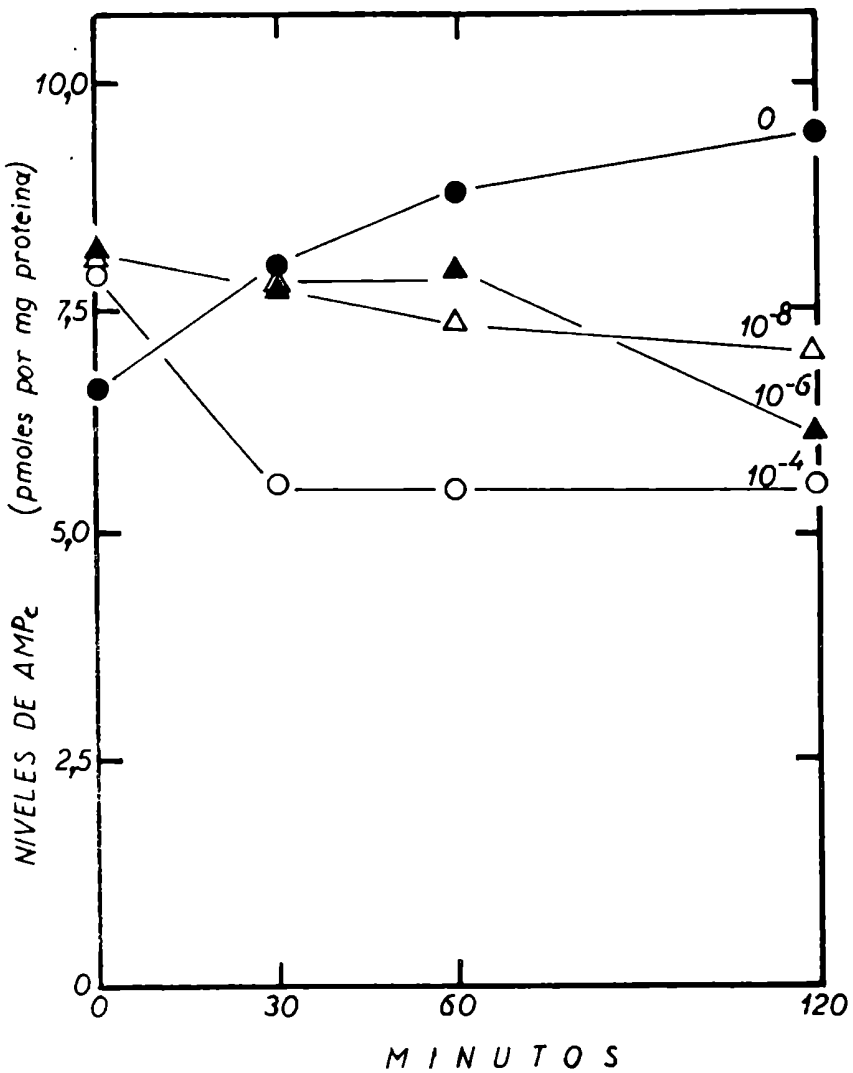


Figura 37:- Variación de los niveles endógenos de AMP cíclico en función del tiempo de incubación de trozos de testículo decapsulados. Las incubaciones fueron realizadas en medio 199 (Gibco) a pH 7,4 conteniendo 1-metil-3 isobutil xantina a una concentración de 0,1 mM, en ausencia (●) o en presencia de L-T_3 a las concentraciones de 10^{-8} M (△); 10^{-6} M (▲) o 10^{-4} M (○). A los tiempos indicados las muestras fueron procesadas según lo descripto en Materiales y Métodos.

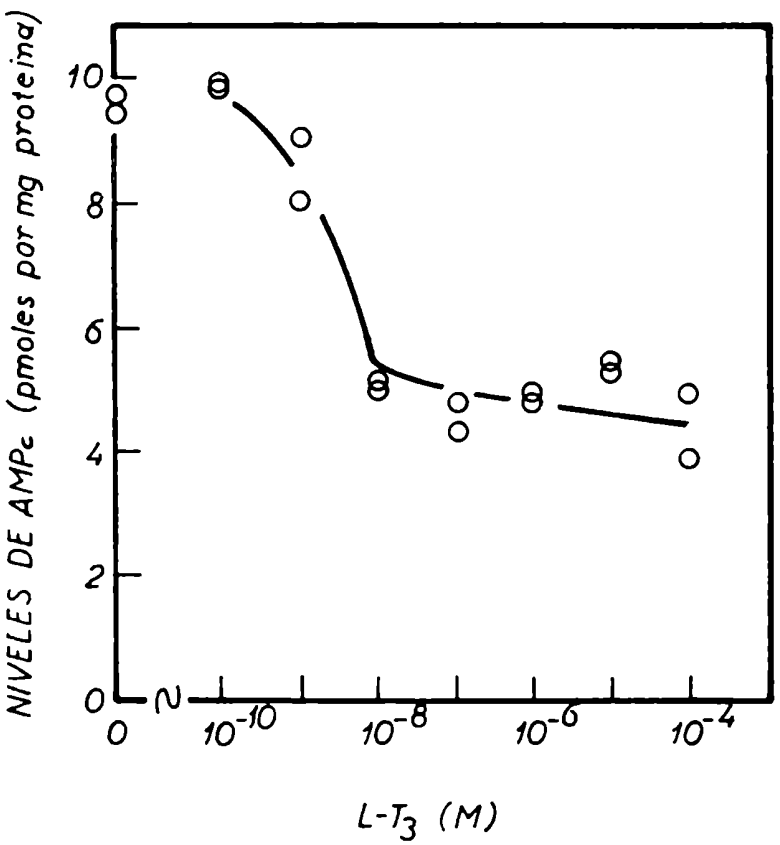


Figura 38:- Relación dosis-respuesta entre los niveles intracelulares de AMP cíclico en testículos decapsulados y la concentración de hormona tiroidea (L-T_3) en el medio de incubación.
Las condiciones experimentales fueron similares a las descriptas en la Figura 37.

dos experimentos representativos. En ambos casos se observa sensibilidad del sistema a una baja concentración de L-T_3 (10^{-8}M) y una disminución máxima que alcanza a un 50 % del contenido basal del nucleótido cuando el tejido fue incubado con la más alta concentración de hormona.

Estos resultados confirman el papel inhibitorio de la L-triiodotironina sobre la producción de AMP cíclico en el testículo. Comparando los resultados de las Figuras 33 y 38 resulta evidente que la L-T_3 no presenta la misma eficiencia en inhibir la síntesis de AMP cíclico en un extracto, que en provocar la caída de los niveles del nucleótido en el tejido entero. Esta diferencia podría deberse a que, en el último caso, se estuviera detectando un promedio entre el AMP cíclico que se produce vía ciclasa y el que se degrada vía fosfodiesterasa. Este razonamiento es válido si se supone que la fosfodiesterasa no se encuentra totalmente inhibida, pese a la presencia de una alta concentración de MIX en el medio de incubación y además que esta enzima pueda también ser regulada (inhibida) por la L-T_3 (ver Introducción). Por otra parte puede pensarse que, pese a que se demostró una rápida captación de la hormona radioactiva por el tejido, la concentración de L-T_3 alcanzada a las 2 hs de incubación en el compartimento intracelular en que se encuentra la adenilil ciclasa fuera realmente menor que la que se puso originalmente en el medio de incubación.

II. 5 Asociación de la actividad de adenilil ciclasa a una actividad de unión (binding) de $[^{125}I]$ L-T_3.

Las evidencias presentadas en la sección precedente indican que la adenilil ciclasa citosólica de túbulos seminíferos es inhibida de manera específica por la triiodotironina. En base a esto, pareció importante estudiar:

1) - la existencia de una actividad ligadora de la hormona en las preparaciones enzimáticas, y
2) - la interacción existente entre la enzima y el sitio receptor putativo.

Por otra parte el sistema descripto en esta tesis presenta características diferentes al resto de los sistemas de adenilil ciclasas sensibles a hormonas. Como se ha visto en la Introducción, en estos últimos, la ciclasa y el receptor hormonal son dos proteínas integrales de membrana, capaces de ser separados por métodos cromatográficos a partir de extractos solubilizados con detergentes. En el sistema aquí descripto, la ciclasa es una proteína citosólica y el efecto hormonal se produce en fase soluble. Por lo tanto, existirían dos posibilidades teóricas, a saber:

1) - la hormona se liga directamente a la molécula enzimática provocando la inhibición de su actividad, o
2) - la hormona se une a un componente presente en la fracción citosólica de testículo. El complejo de este componente(receptor) con la hormona produciría el efecto inhibitorio sobre la ciclasa.

A continuación se describen los experimentos realizados para caracterizar la actividad de unión de $[^{125}I]$ L-T_3 encontrada en las preparaciones enzimáticas.

II. 5.1 Actividad de unión de L-T_3 en función del tiempo de incubación.

En la sección II. 2 de los resultados se indicó la existencia de una actividad ligadora de $[^{125}I]$ L-T_3 en la fracción citosólica (S 105) obtenida luego de una centrifugación diferencial de un homogenato de testículo. Dicha actividad representa un 44,7 % de la actividad ligadora de hormona en el tejido total y puede ser considerada como una unión específica ya que su valor es disminuido hasta un 80 % cuando se agrega a la mezcla de incubación hormona no marcada en una concentración tres órdenes superior a la de la hormona radioactiva. En la Figura 39 se observa una curva de asociación de la $[^{125}I]$ L-T_3 a componentes macromoleculares presentes en un S 105 de testículo en función del tiempo. La actividad de unión resultó ser lineal hasta los 30 minutos de incubación, a partir de los cuales la cantidad de hormona unida disminuyó para estabilizarse a los 60 minutos en un valor que resultó ser aproximadamente un 50 % de la unión máxima. Estos mismos resultados fueron observados al estudiar la curva de tiempo de unión a la misma preparación realizada en condiciones del ensayo de adenilil ciclasa, es decir, a 37°C y reemplazando el buffer fosfato por la mez-

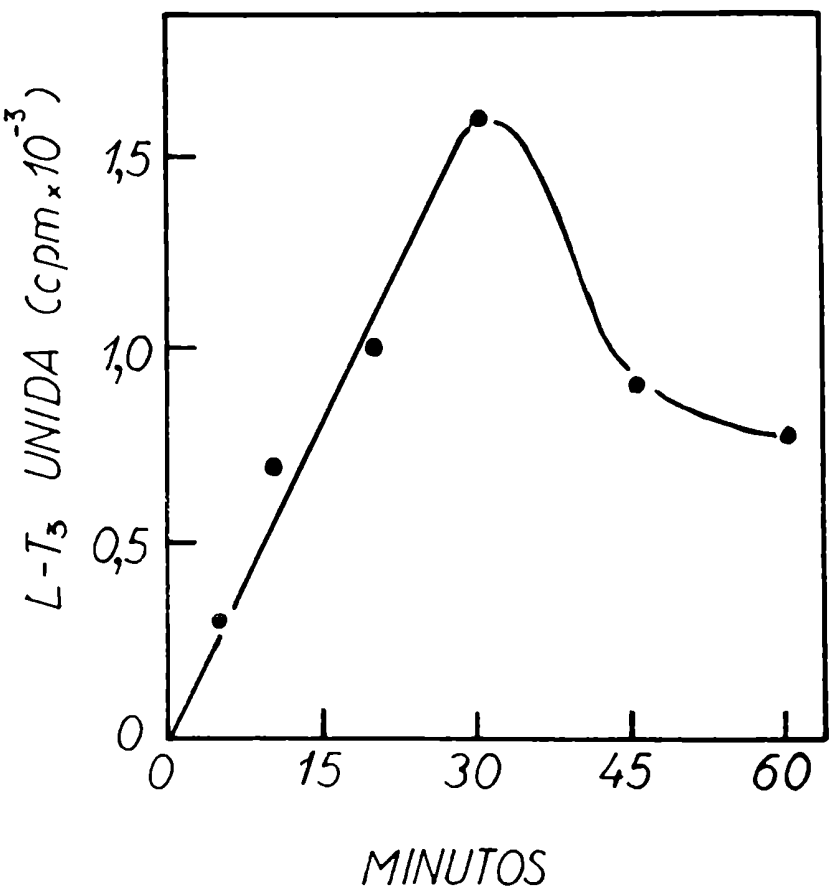


Figura 39:- Unión específica de [^{125}I] L-T_3 a componentes macromoleculares de un S 105 de testículo, en función del tiempo de incubación.
Las incubaciones se realizaron a 20°C en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos.

cla de reacción para el ensayo de la enzima. A partir de estos resultados se decidió llevar a cabo los ensayos de unión a 20ºC durante 20 minutos en buffer fosfato a pH 8 tal cual fue descripto en Materiales y Métodos.

II. 5.2 Reversibilidad de la unión de [^{125}I] L-T_3.

Una de las características fundamentales de la asociación entre las hormonas y sus receptores específicos es que la misma es reversible. Tal reversibilidad puede ser demostrada si se aislan los complejos hormona-receptor y se los incuba en un medio carente de exceso de hormona. En ese caso, al transcurrir el tiempo de incubación debe disminuir la cantidad de hormona unida. Un experimento de tales características se encuentra graficado en la Figura 40. Se incubó durante 20' a 20ºC una mezcla conteniendo buffer fosfato pH 8 50 mM, [^{125}I] L-T_3, 1.400.000 cpm en una concentración de 35 ng/ml y un S 105 de testículo en una concentración final de proteínas de 7,3 mg/ml (volumen total, 2ml). Al finalizar la incubación, la mezcla fue sembrada en una columna de Sephadex G 25 (7 ml de volumen total, armada en una jeringa descartable de 10 ml de capacidad) y una vez pasada la muestra se recogió el"volumen muerto" por elución con 4 ml de buffer fosfato 50mM pH 8. El sembrado y la elución de la columna se realizaron manteniendo la temperatura en 4ºC. El eluido fue inmediatamente llevado a 20ºC y se midió la presencia de [^{125}I]L-T_3 unida en alícuotas de 0,5 ml

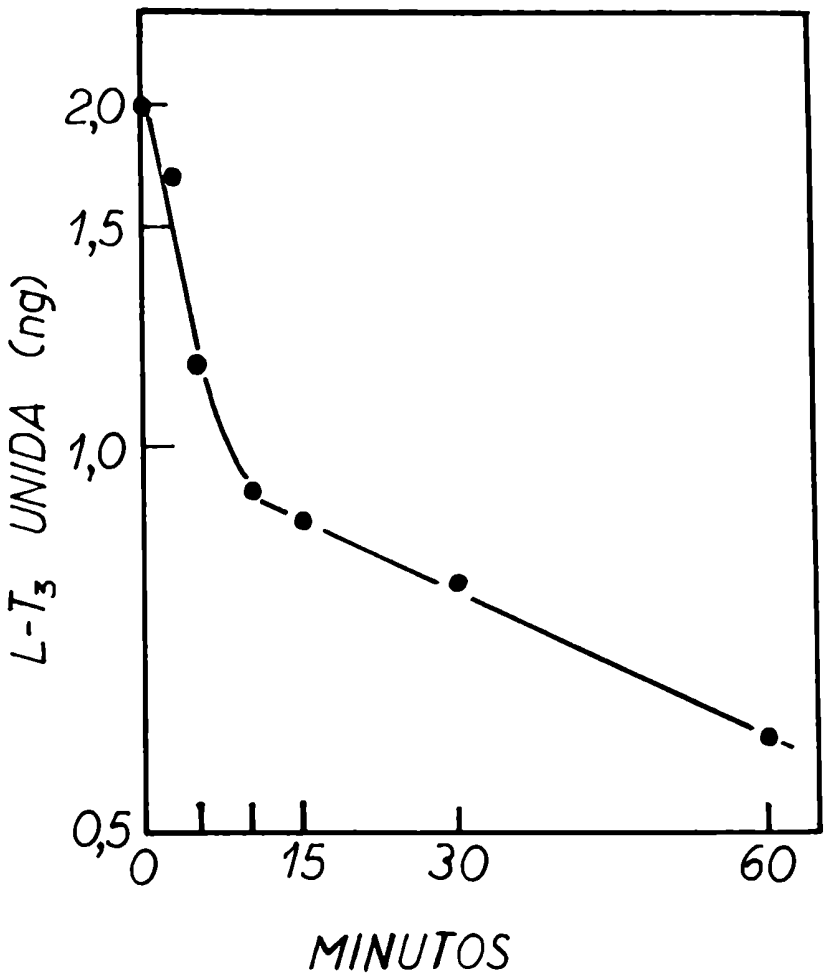


Figura 40:- Disociación espontánea de los complejos [^{125}I] L-T_3-receptor en función del tiempo. La metodología experimental fue descripta en el texto. t=0 corresponde al momento en que el eluido de la columna de Sephadex fue llevado a 20°C.

tomadas a distintos tiempos, según el procedimiento descripto en Materiales y Métodos.

La Figura 40 muestra que aparentemente existirían dos velocidades de disociación espontánea de los complejos hormona-receptor. Aproximadamente el 50 % de la [^{125}I] L-T_3 se disocia de manera rápida en los primeros 10 minutos transcurridos desde el aislamiento del complejo. A partir de este tiempo, la disociación se hace más lenta y a los 60 minutos, sólo se conserva un 30 % de la hormona unida. Este resultado confirma la naturaleza reversible de la interacción entre la triiodotironina y la molécula receptora.

II. 5.3 Asociación entre las actividades de adenilil ciclasa y de unión de [^{125}I] L-T_3.

Las actividades de unión de [^{125}I]L-T_3 y de adenilil ciclasa coexisten en el sobrenadante de 105.000 x g de un homogeneizado de testículo. Con el fin de saber si estas dos actividades están determinadas por el mismo o por componentes diferentes del S 105, esta preparación fue sometida a diferentes procedimientos de purificación. En primer lugar se hizo una cromatografía en columna de DEAE celulosa en las mismas condiciones que las de la Figura 19. La Figura 41 (A) muestra el perfil de elución de dicha columna. La actividad enzimática eluyó en un único pico a una concentración de NaCl de 0,25 M. La actividad de "binding" para la L-T_3 se encontró en un pico en el percolado y en otro pico par-

cialmente coincidente con el de la actividad de ciclasa.

Las fracciones de la columna de DEAE fueron combinadas y esta preparación diluida con 1 volumen de Buffer A (con el objeto de disminuir la fuerza iónica) y sometida a cromatografía de adsorción en columna de hidroxilapatita. Los perfiles de elución obtenidos en sucesivas repeticiones de este procedimiento cromatográfico mostraron algunas diferencias de resolución, debidas principalmente a la cantidad de proteína sembrada en las columnas. Esta dificultad hizo descartar este método como paso de purificación de la enzima.

La Figura 41 (B) muestra el perfil de una columna de hidroxilapatita cargada con 87 mg totales de proteína de una preparación de DEAE La adenilil ciclasa eluyó en un único pico, a una concentración de sulfato de amonio de 0,36 M, mientras que la actividad de "binding" de L-T_3 aparece distribuida en dos picos. Uno de ellos antecede al pico de proteína y el otro se superpone totalmente con el de la adenilil ciclasa.

Es importante puntualizar que es usual equilibrar y eluir las columnas de hidroxilapatita con soluciones del anión fosfato. En la cromatografía presentada aquí, la elución fue llevada a cabo por incremento de la concentración de sulfato de amonio debido a que éste, a diferencia del fosfato, no interfiere en el ensayo de actividad de ciclasa.

La cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) y la de adsorción (hidroxilapatita) son dos métodos de separación basados en las diferencias electrostáticas entre las moléculas proteicas. Es

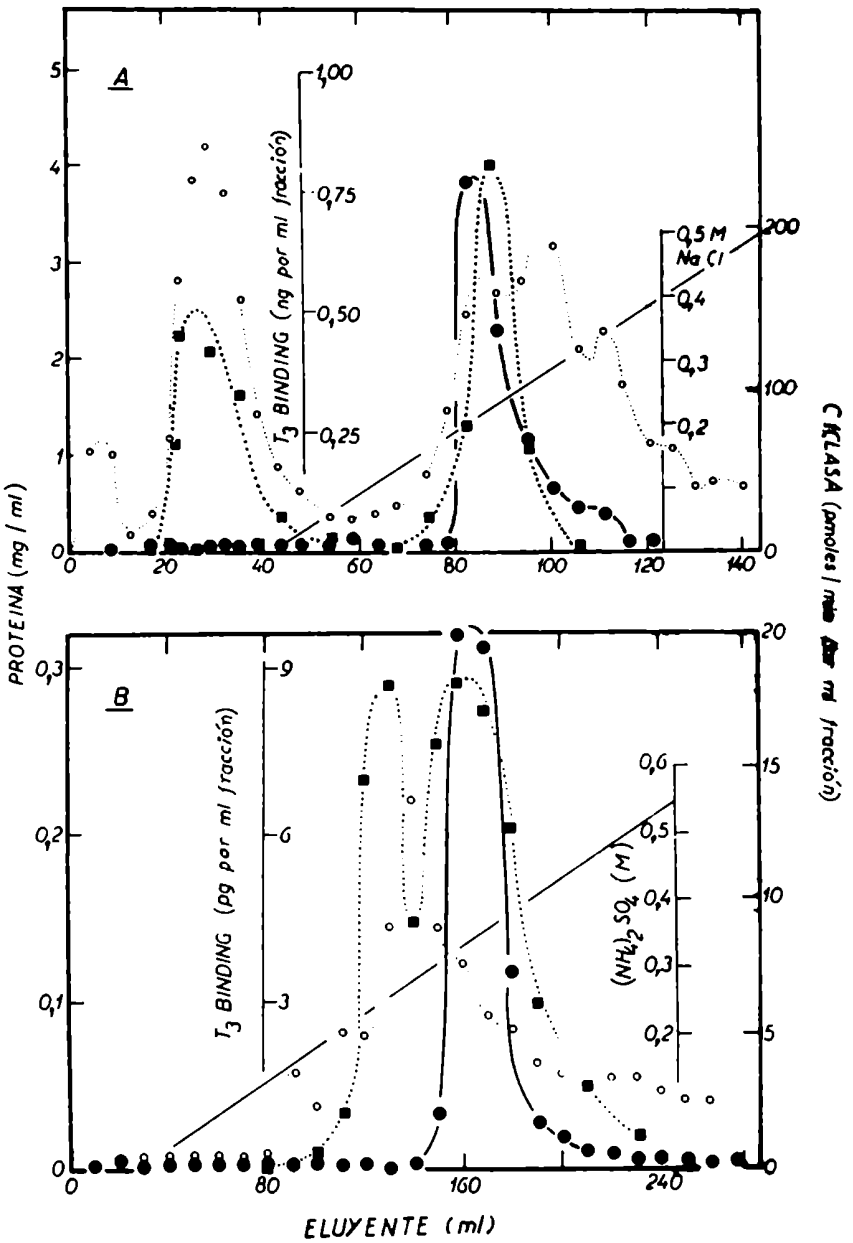


Figura 41:- Asociación de las actividades de binding de [^{125}I] L-T_3 y adenilil ciclasa en procedimientos cromatográficos.
A - Cromatografía en DEAE-celulosa, y
B - Cromatografía en hidroxilapatita.
●, actividad de adenilil ciclasa; ■, "binding" de [^{125}I] L-T_3, y ○, proteína.
Las condiciones experimentales fueron descriptas en el texto y en Materiales y Métodos.

por eso que pareció importante utilizar otro procedimiento separativo basado en las diferencias de forma y tamaño. En la Figura 42 se observa un perfil de sedimentación de las actividades de adenilil ciclasa y de "binding" de [^{125}I] L-T_3 en un gradiente de sacarosa del 5 al 20 % (p/v). La ciclasa sedimentó en un único pico simétrico coincidente con la actividad ligadora de L-T_3. Esta última apareció también en un pico con menor coeficiente de sedimentación. También se observó una coincidencia total de los picos de "binding" y actividad enzimática cuando una alícuota de una preparación de hidroxilapatita fue sometida a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

II. 5.4 Constantes de disociación y capacidad de unión.

Para calcular las constantes de disociación del complejo L-T_3-sitio receptor, se incubaron, en las condiciones ya descriptas, cantidades crecientes de hormona no radioactiva con cantidades constantes de hormona radioactiva y de una preparación enzimática con actividad de unión. (preparación de DEAE). Los datos se graficaron de acuerdo al método de Scatchard (200) y se presentan en la Figura 43. Puede observarse la existencia de dos componentes de unión: uno de alta afinidad y baja capacidad, con una constante de disociación de 6,5 x 10^{-8}M y una capacidad de unión máxima de 1ng de L-T_3 por mg de proteína; y uno de baja afinidad y alta capacidad con una constante de disociación de 3 x 10^{-6}M y una capacidad máxima de 24 ng de L-T_3 por mg de proteína.

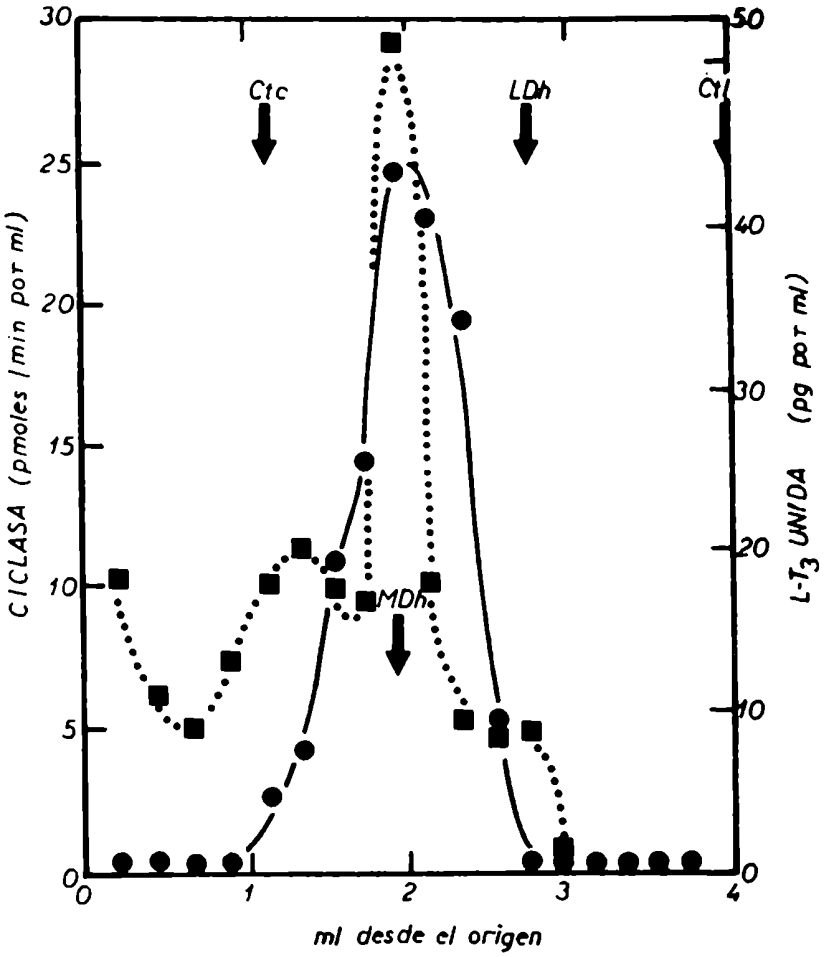


Figura 42:- Centrifugación en un gradiente de sacarosa del 5 al 20 % (p/v) de una preparación de DEAE.
●, actividad de adenilil ciclasa; ■, "binding" de [^{125}I] L-T_3.
Las condiciones experimentales de los gradientes de sacarosa fueron descriptas en Materiales y Métodos.

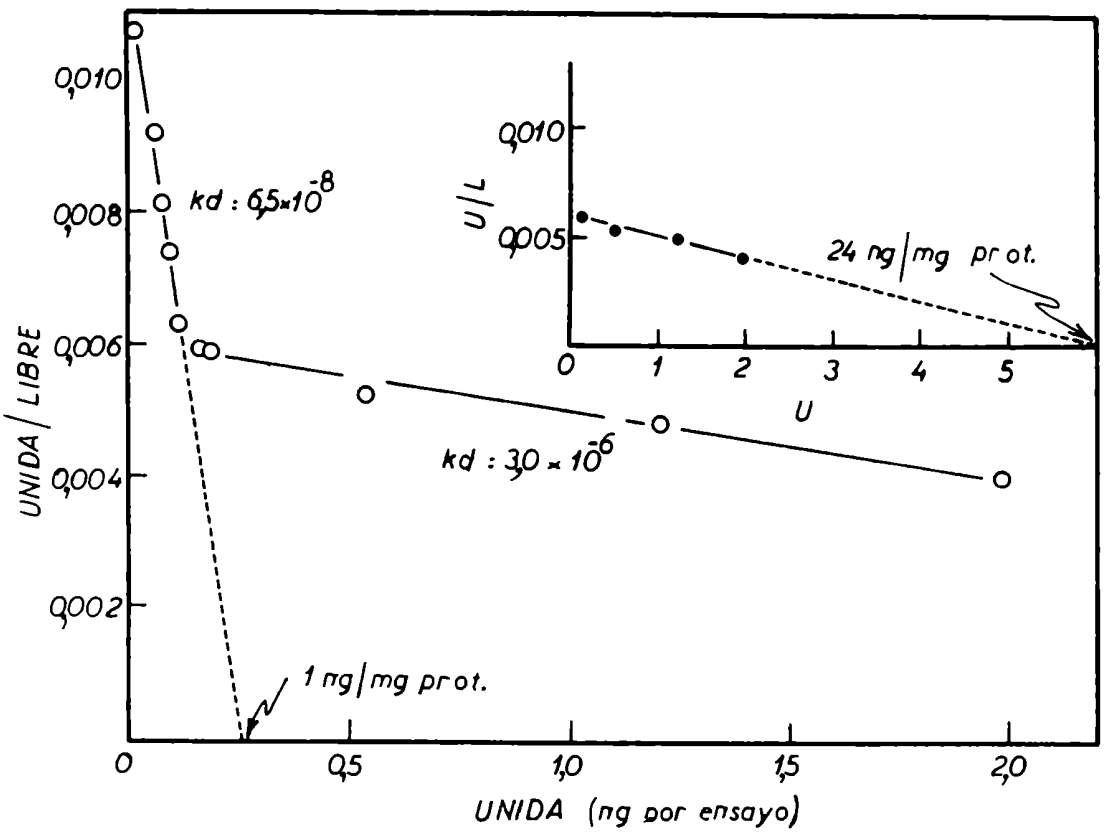


Figura 43:- Gráfico de Scatchard de la unión de L-T_3 a una preparación de DEAE de testículo de rata. El gráfico insertado (arriba,a la derecha) muestra la extrapolación de los datos correspondientes al componente de unión de "baja afinidad". Los valores han sido corregidos sustrayendo la unión no específica determinada en ensayos suplementados con L-T_3 no radioactiva a una concentración de 10^{-4}M.

La existencia de dos afinidades diferentes entre la hormona y los sitios receptores puede ser explicada de las siguientes maneras:

1) - Existirían dos poblaciones de moléculas receptoras con distintas afinidades por la hormona. La población de menor afinidad se encontraría en mayor concentración que la de mayor afinidad.

2) - Existirían dos sitios en la misma molécula receptora, con distintas afinidades por la hormona.

3) - Existiría un sólo tipo de sitios, pero habría interacción entre los mismos por medio de un efecto cooperativo negativo. Este efecto es comúnmente visualizado como una disminución de la afinidad entre la hormona y el receptor a medida que aumenta la ocupación de los sitios receptores. Esto es, la unión de una molécula de hormona disminuirá la afinidad por una nueva molécula entrante. En la discusión posterior se evaluarán estas tres posibilidades.

Independientemente de la causa de la existencia de dos afinidades por la hormona en las preparaciones ensayadas, se puede establecer una correlación entre los dos componentes de "binding" y la curva de actividad de la adenilil ciclasa en función de la concentración de L-T_3 en el medio de incubación (Figura 33).

El efecto inhibitorio (15 al 25%) a bajas concentraciones de hormona podría estar mediado por el componente de alta afinidad, mientras que la mayor inhibición observada a altas concentraciones de hormona podría estar mediada por el componente de baja afinidad.

II. 5.5 Aislamiento de complejos enzimáticos conteniendo $[^{125}I]$ L-T_3 unida.

En el experimento de la Figura 42 se demostró la asociación de las actividades de "binding" de $[^{125}I]$ L-T_3 y de adenilil ciclasa determinando las mismas en cada una de las fracciones obtenidas de una centrifugación en gradiente de sacarosa. Otro tipo de evidencia de la existencia de dicha asociación puede ser obtenida indirectamente por incubación de una preparación de DEAE con la hormona radioactiva y posterior purificación de los complejos macromoleculares asociados con la L-T_3 mediante dos etapas sucesivas: centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en gel, usando columna de Sephadex G 25. La Figura 44 presenta los resultados de un experimento de tales características. En ausencia de exceso de hormona no radioactiva, se encontró que la $[^{125}I]$ L-T_3 presenta asociación estable con dos picos macromoleculares con constantes de sedimentación de 1,7 S y 4,7 S. Este último se superpone parcialmente al pico de actividad enzimática. La presencia de un pico de unión "liviano" no coincidente con la actividad de ciclasa había sido ya observado en el experimento de la Figura 42. Por otra parte, la presencia de hormona "fría" en alta concentración en la mezcla de incubación previa a las dos purificaciones, eliminó por completo los dos picos de "binding", confirmando la especificidad de la unión detectada.

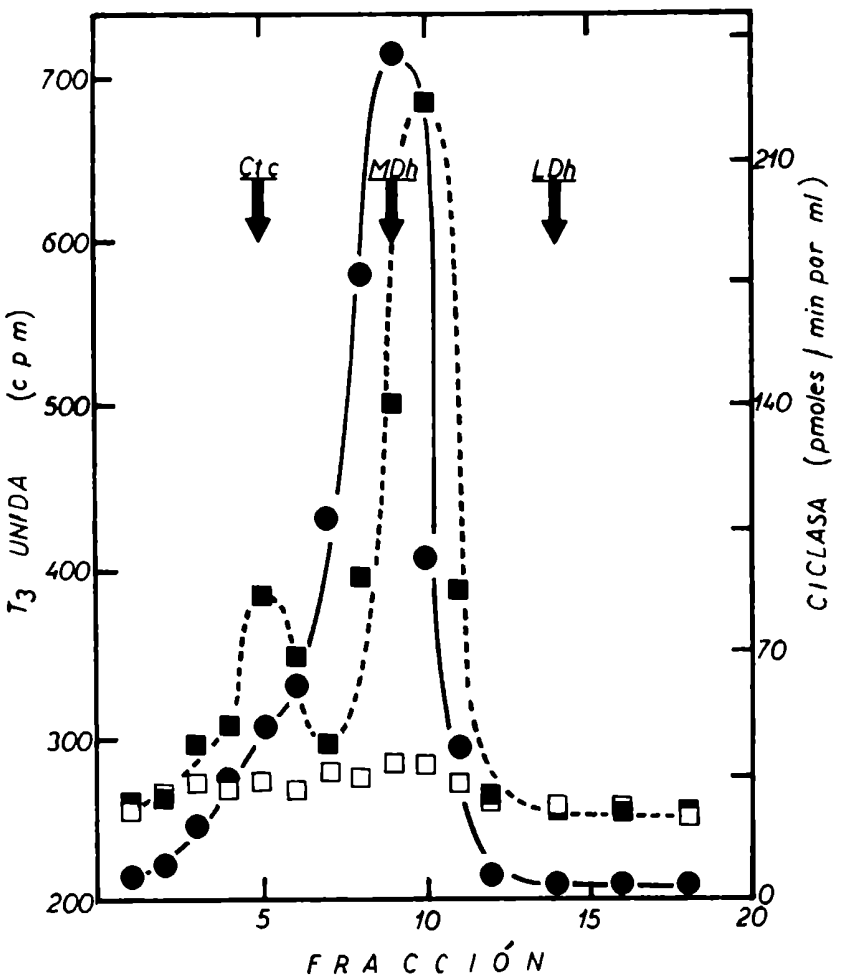


Figura 44:- Aislamiento de complejos de unión de la L-T_3. Alícuotas de una preparación de DEAE (0,3 ml) fueron incubadas a 37°C por 30 minutos con 1 µCi de [^{125}I]L-T_3 a una concentración final de hormona de 2 x 10^{-9} M (■), o 10^{-4} M (□). Al final de la incubación, las muestras fueron centrifugadas en gradientes de sacarosa de manera similar a lo descripto en la Figura 42. Después de la centrifugación y el fraccionamiento, cada fracción (0,1 ml) fue purificada por filtración en columna de Sephadex G25 como se describe en Materiales y Métodos, y en los eluídos se determinó radioactividad de ^{125}I (□) y actividad de adenilil ciclasa (●).

II. 5.6 Efecto de compuestos análogos a la L-T_3 sobre la unión de [^{125}I] L-T_3.

Para poder correlacionar el efecto inhibitorio de la L-T_3 sobre la adenilil ciclasa y la capacidad de "binding" de la L-T_3 en las preparaciones enzimáticas, resulta importante estudiar la especificidad estructural de la unión de la hormona al receptor. El estudio fue abordado determinando la capacidad de un S 105 incubado con una cantidad constante de [^{125}I] L-T_3 y cantidades crecientes de L-T_3 y L-T_4, así como otros análogos de estas hormonas. En la tabla 13 se encuentran las $I_{0,5}$ para los distintos compuestos estudiados. La $I_{0,5}$ se define como la concentración del compuesto que inhibe en un 50% la capacidad de "binding" de [^{125}I]L-T_3. Los resultados de la tabla 13 muestran que si bien no existe una coincidencia

TABLA 13

Desplazamiento del "binding" de [^{125}I] L-T_3 a una preparación S 105 por el agregado de L-T_3 no radioactiva, o distintos compuestos estructuralmente relacionados con la hormona.

COMPUESTO	Concentración de ligando no radioactivo que provoca una disminución del 50 % de la capacidad de "binding" de [^{125}I] L-T_3
L-T_3	4×10^{-8} M
L-T_4	1×10^{-7} M
TRIAC	2×10^{-6} M
MIT	10^{-4} M
DIT	10^{-4} M

numérica extrictamente de los valores de $I_{0,5}$ y la concentración de compuesto que produce un 50 % de inhibición de la actividad de adenilil ciclasa (Figura 35), se da cierto grado de correlación entre la capacidad inhibitoria de cada compuesto sobre la enzima y la correspondiente de desplazar a la $L\text{-}T_3$ de los sitios de unión. Compuestos como el MIT y el DIT, que prácticamente no inhiben a la ciclasa, tampoco desplazan la $[^{125}I]\,L\text{-}T_3$ unida. La tiroxina, que tenía un efecto inhibitorio menos potente que la triiodotironina, tiene también un $I_{0,5}$ mayor que el de la $L\text{-}T_3$. El TRIAC, que sólo presentaba un efecto de inhibición a altas concentraciones, desplaza un 50 % del "binding" a una concentración del orden de 10^{-6} M.

II. 6 Discusión.

Los resultados descriptos en esta sección indican que la adenilil ciclasa soluble de testículo es inhibida por la triiodotironina. Parte de estos resultados han sido publicados (230, 231, 232). La hormona se comporta como un inhibidor reversible no competitivo de la actividad enzimática y el efecto inhibitorio es aparentemente específico ya que no se observa en ciclasas de otros tejidos. Respecto de este último hecho podría pensarse que la $L\text{-}T_3$ es capaz de inhibir a las ciclasas dependientes de Mn^{++}, ya que el efecto también fue observado en la adenilil ciclasa de espermatozoides (sección III) y en la ciclasa de Neurospora crassa (no mostra-

do). Sin embargo en estos dos casos sólo se observó inhibición a altas concentraciones de la hormona (10^{-4}M). En el caso de la enzima de testículo, la respuesta inhibitoria cubre un rango amplio de concentraciones de L-T_3, de 10^{-9} a 10^{-4}M.

Si bien la mayor inhibición se encuentra a concentraciones de L-T_3 por encima de 10^{-6}M, el efecto observado a concentraciones cercanas a las fisiológicas (15-25%) es consistentemente reproducible. Un hecho importante es que la inhibición fue estudiada in vitro y por lo tanto no es posible atribuir alguna significación fisiológica al efecto encontrado. No obstante los siguientes elementos pueden ser tomados en consideración:

1) - Las concentraciones de L-T_3 llamadas "fisiológicas" corresponden a los niveles hormonales en plasma (tabla 5). Nada se sabe acerca de la real concentración de L-T_3 en el testículo, y mucho menos en las células de la línea germinal. Además, no se puede descartar que exista una compartimentalización de la hormona dentro de la célula, de manera tal que, por ejemplo, en el compartimento celular en que se encuentra la adenilil ciclasa, la L-T_3 pueda alcanzar concentraciones muy superiores a las del plasma. Existen evidencias de que en ciertos órganos de ratas normales tales como pulmón, hígado y riñón las concentraciones de L-T_3 son respectivamente 2, 6 y 10 veces mayores que las del plasma (224).

2) - Además del efecto inhibitorio in vitro, en experimentos realizados sin destrucción celular (Figuras 37 y 38) se demostró que

la L-T_3 es capaz de disminuir los niveles endógenos de AMP cíclico en testículo. Llama la atención la gran capacidad de acumular [^{125}I] L-T_3 del medio de incubación que poseen los trozos de testículo. Si se observa la figura 36 A, se verá que la curva de captación realizada a baja actividad específica de hormona radioactiva (10cpm/pmol) llega a una "meseta" a los 60 minutos con una incorporación al tejido de unas 700.000 cpm de [^{125}I] L-T_3. Este valor equivale a 70 nanomoles, o lo que es lo mismo, 45 µg. Teniendo en cuenta que cada trozo de testículo incubado tenía un peso húmedo de alrededor de 1g, la concentración de hormona captada llegaría a 45 µg/g de peso húmedo, valor que resulta cuatro órdenes de magnitud mayor que el encontrado en hígado de rata (0,005 µg/g) (224).

El efecto inhibitorio sobre la ciclasa de testículo es también específico en términos de la estructura hormonal. Respecto de esto se comprobó que los compuestos más potentes desde el punto de vista farmacológico (L-T_3, isopropil diiodotironina y tiroxina) presentaron la eficiencia más alta en términos de su capacidad para inhibir la actividad enzimática. En cambio estructuras poco activas farmacológicamente como la mono y di iodotirosina no produjeron mayor efecto inhibitorio.

Una posibilidad que no se puede descartar es que las hormonas tiroideas presenten la propiedad de inhibir a ciertas enzimas que utilicen nucleótidos de adenina como sustratos o como cofactores. Al respecto ya se ha mencionado en la Introducción el efecto inhibitorio

in vitro descripto para algunas deshidrogenasas dependientes de NAD (146,147) y para la fosfodiesterasa de AMP cíclico (160). De todos modos este efecto no debe ser generalizado ya que en los experimentos aquí descriptos (tabla 9) se demuestra que existen enzimas que usan ATP como sustrato (v.g. adenilil ciclasas de riñón, hígado, cerebro y corazón) que no son inhibidas por las hormonas tiroideas. La inhibición de la ciclasa soluble de testículo por las hormonas tiroideas podría ser consecuencia de una interacción directa entre la hormona y la molécula enzimática o alternativamente podría ser el resultado de un fenómeno más complejo que involucrara moléculas receptoras. Los experimentos de unión de [^{125}I]L-T_3 demostraron que en todos los pasos de purificación ensayados existe superposición entre la actividad enzimática y la actividad ligadora de hormona. En los perfiles cromatográficos y de sedimentación mostrados en las Figuras 41, 42 y 44 es posible observar por otro lado picos con actividad de unión de L-T_3 que no poseen actividad de ciclasa, pero en todos los casos la actividad de ciclasa está acompañada por actividad ligadora de hormona. Esto último, sumado al hecho de que el efecto inhibitorio es observado en preparaciones enzimáticas obtenidas después de tres pasos de purificación (DEAE, hidroxilapatita, gradiente de sacarosa) y que tal efecto no es anulado por el pretratamiento de la enzima con agentes disociantes de proteínas (ver tabla 12), podría indicar que la L-T_3 está interactuando de manera directa con la molécula de ciclasa, o bien con una molécula

receptora fuertemente unida a la misma.

Resulta interesante comparar el efecto de la L-T_3 sobre la ciclasa soluble de testículo con la inhibición *in vitro* de la ciclasa de membranas de tiroides descripta por Friedman *et al* (154). Ambos efectos ocurren a altas concentraciones de L-T_3, aunque en el caso de la ciclasa de tiroides la inhibición sólo llega a un 50 % a concentraciones de hormona del orden de 10^{-4} M. Por otro lado, mientras la inhibición de la ciclasa de testículo es de tipo no competitivo, la observada en membranas de tiroides es de tipo competitivo. El efecto sobre la ciclasa de tiroides no parece estar mediado por un receptor de membrana ya que la inhibición se conserva aún después de solubilizar la enzima con detergente.

Por último, es importante destacar que de todas las hormonas conocidas hasta el presente que modifican la actividad de las adenilil ciclasas sólo se demostró efecto inhibitorio para la insulina en membranas de panículo adiposo de epidídimo de rata (27) y en membranas de *Neurospora crassa* (24). De tener algún significado fisiológico el efecto descripto en esta tesis, la L-T_3 se convertiría en la segunda hormona conocida con capacidad de inhibir la síntesis de AMP cíclico.

III. COMPARACION ENTRE ALGUNAS PROPIEDADES DE LAS ADENILIL CICLASAS SOLUBLES DE TUBULOS SEMINIFEROS Y DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES.

Como fue mencionado en el capítulo V de la Introducción, los espermatozoides presentan una actividad de adenilil ciclasa dependiente de Mn^{++}, insensible a fluoruro y no estimulable por gonadotrofinas. Esta ciclasa está localizada fundamentalmente en la fracción correspondiente a la membrana plasmática (112, 114, 115). Dado que las células de la línea germinal poseen una actividad de adenilil ciclasa soluble y que representan los estadios precursores en el proceso de formación de espermatozoides, pareció importante estudiar algunas características de la ciclasa de espermatozoides y compararlas con las ya estudiadas para la ciclasa soluble de línea germinal.

Los espermatozoides fueron obtenidos de la siguiente manera: las porciones caudales de los epidídimos de cinco ratas fueron cortadas en trozos y sumergidas en 50 ml de una solución conteniendo buffer TRIS-HCl 10mM pH = 7,4, NaCl 140 mM, Mg SO_4 0,5mM, $CaCl_2$ 0,15 mM y albúmina sérica bovina 0,1 % (p/v).

Los trozos fueron dejados a temperatura ambiente durante 15 minutos (los espermatozoides se dispersan en el líquido por su propia movilidad) y la suspensión fue luego filtrada por "seda china". El filtrado fue centrifugado a 270 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento fue "lavado" tres veces con la solución

mencionada mediante sucesivas resuspensiones y centrifugaciones. El sedimento de la última centrifugación fue resuspendido en 10 volúmenes de Buffer A y se homogeneizó en un desintegrador de tejidos. La observación microscópica de la preparación desintegrada mostró colas sueltas, un 10 % de cabezas intactas y gran cantidad de material granular amorfo. Este homogeneizado fue centrifugado a 270 x g durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000 x g durante 90 minutos. El sedimento de esta última centrifugación fue utilizado como fuente de enzima y será denominado P 105.

III. 1 Efecto de la L-T_3 sobre la actividad de la adenilil ciclasa de espermatozoides.

En la sección II de los Resultados se ha descripto en detalle el efecto inhibitorio que ejerce la L-T_3 sobre la actividad de ciclasa soluble de testículo.

Aún cuando esta inhibición no tuviera implicancias fisiológicas, los resultados descriptos indican que es específica para la enzima de testículo y no se detecta en ciclasas de otros tejidos adultos de la rata. Este hecho puede servir para caracterizar y distinguir a la molécula de adenilil ciclasa soluble de testículo del resto de los sistemas de ciclasas unidos a membranas de células de mamíferos. Si la adenilil ciclasa de espermatozoides estuviera genéticamente relacionada con la enzima soluble de testículo, la primera debería ser sensible a la inhibición por L-T_3 al igual que la segunda. Con

el objeto de explorar esta posibilidad, se estudió la actividad de la adenilil ciclasa de espermatozoides en función del tiempo, usando Mg^{++} o Mn^{++} como catión divalente y la presencia o ausencia de L-triiodotironina a una concentración de 10^{-4}M. Los resultados se encuentran en la Figura 45. La actividad enzimática en presencia de Mg^{++} es sólo un 2 % de la detectada en presencia de Mn^{++}. Por otra parte el fluoruro no ejerce ningún efecto sobre la actividad, cualquiera sea el catión divalente utilizado. El agregado de L-T_3 a una alta concentración (10^{-4}M) produjo una inhibición de la actividad de ciclasa del orden de 85 %, tanto en ausencia como en presencia de F^-10mM. Es interesante destacar que, al igual que la enzima soluble de testículo, la actividad de ciclasa de membranas de espermatozoides es lineal hasta por lo menos 20 minutos de incubación a 37ºC. La inhibición por la L-T_3 ocurre desde el comienzo de la reacción, indicando nuevamente un tipo de interacción rápida entre la enzima y la hormona. El porcentaje de inhibición de la enzima de espermatozoides a una concentración de L-T_3 de 10^{-4}M es del mismo orden que el observado para la enzima soluble de testículo a la misma concentración de hormonas. Sin embargo, a concentraciones de L-T_3 menores que 10^{-6}M prácticamente no se observó efecto inhibitorio sobre la enzima de espermatozoides (no mostrado). Este hecho podría descartar una implicancia fisiológica de las hormonas tiroideas sobre la ciclasa de esperma, pero nos permite establecer la existencia de una similitud funcional entre esta última y la ade-

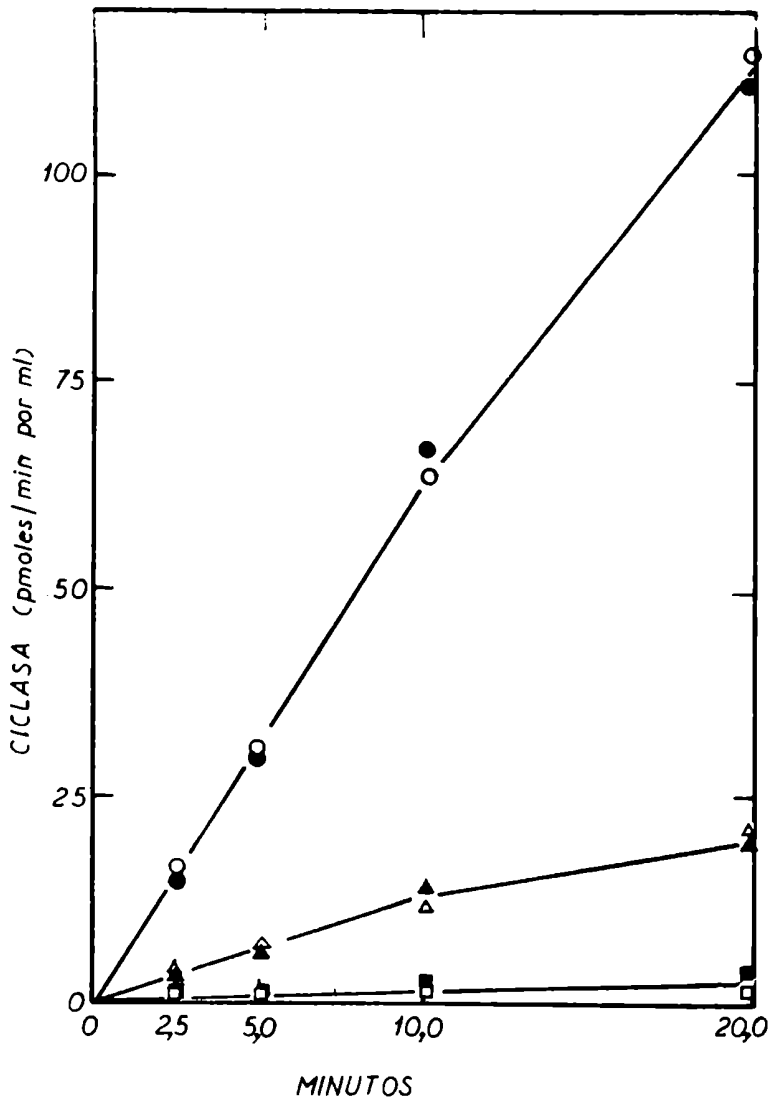


Figura 45:- Actividad de ciclasa de un P 105 de espermatozoides en función del tiempo de incubación.
(O), ensayo realizado en presencia de Mn^{++}; (Δ) ensayo realizado en presencia de Mn^{++} con el agregado de L-T_3 a una concentración de 10^{-4}M; (□) ensayo realizado en presencia de Mg^{++}. Los símbolos llenos corresponden a incubaciones suplementadas con F^- a una concentración de 10 mM.

nilil ciclasa soluble de testículo.

III. 2 Dependencia de la concentración de sustrato.

La Figura 46 muestra un gráfico de inversas de las velocidades de reacción en función de las inversas de las concentraciones de ATP en la mezcla de incubación para las actividades de adenilil ciclasa de un S 105 de testículo y un P 105 de espermatozoides. En presencia de una concentración fija de Mn^{++}, superior a la que forma el complejo Mn ATP^{2-}, ambas enzimas presentan una dependencia michaeliana de las velocidades iniciales respecto de la concentración total de ATP. Debido a que no se conoce con precisión la concentración molar de las enzimas en las preparaciones ensayadas, las velocidades máximas de ambas enzimas resultaron diferentes, pero la afinidad por el sustrato resultó ser idéntica (ambas presentan una Km ATP = 1 mM.). El valor de las constante de Michaelis determinado para estas dos enzimas es mayor que el descripto en la literatura para las adenilil ciclasas de membrana sensibles a hormonas, el cual se encuentra en el orden de 0,01 mM (211). Esto último, puede ser considerado como una característica diferencial del comportamiento de ambas enzimas, respecto de otras adenilil ciclasas de mamíferos.

III. 3 Solubilización de la adenilil ciclasa de espermatozoides por tratamiento con detergentes.

Según se ha comentado previamente, la diferencia funda-

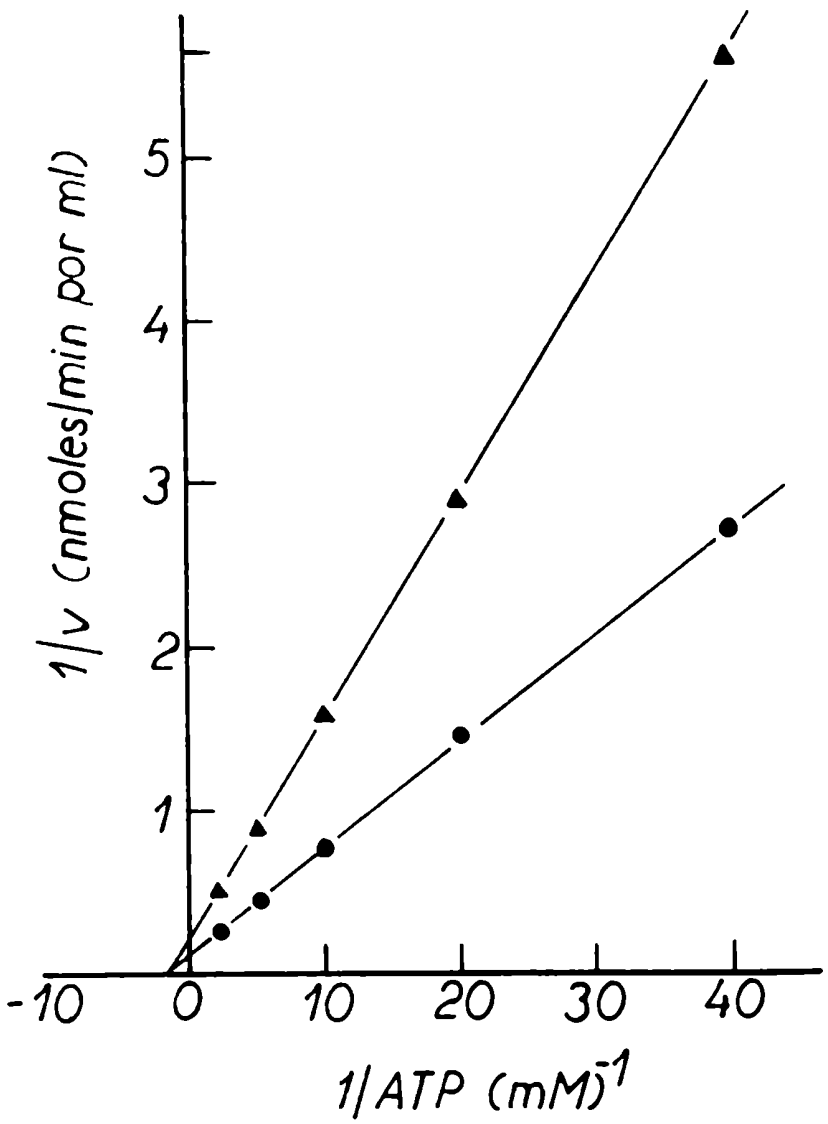


Figura 46:- Gráfico de Lineweaver y Burk de la reacción de adenilil ciclasa catalizada por un S 105 de testículo (▲) y por un P 105 de espermatozoides (●).

mental entre las adenilil ciclasas de células germinales y de espermatozoides radica en su localización intracelular. La primera se encuentra en el citosol, mientras que la segunda está asociada a la membrana plasmática. Con el objeto de conocer el tipo de interacción existente entre la adenilil ciclasa de espermatozoides y la membrana, se incubaron (a 4ºC durante 20 minutos) alícuotas de un P 105 con una solución de buffer A conteniendo distintas concentraciones de NaCl o los detergentes no iónicos BRIJ 58 y Triton X-100. Al finalizar las incubaciones, las alícuotas fueron centrifugadas a 105.000 x g durante 60 minutos. Los sobrenadantes fueron separados y los precipitados fueron resuspendidos en buffer A, midiéndose la actividad de ciclasa en ambos. Los resultados se encuentran en la tabla 14.

Como puede apreciarse, el tratamiento con buffer A libera al sobrenadante un 13 % de la actividad total de ciclasa. El aumento de la fuerza iónica la solución de lavado de las membranas del P 105 no produce mayor solubilización de la enzima (10 al 14%). En cambio, el tratamiento de las membranas con detergentes no iónicos produce una real solubilización de la enzima, del orden del 50% para el BRIJ 58 y el TRITON X 100 a concentraciones finales del 1 y 2 % (p/v) respectivamente. Estos datos indicarían que la adenilil ciclasa de espermatozoides no es una proteína de las llamadas periféricas o "débilmente unidas" a la membrana, sino que presenta una unión del tipo de las proteínas intrínsecas o integrales de membrana, ya que solamente es solubilizada con agentes disruptores de las interacci

TABLA 14

Solubilización de la actividad de adenilil ciclasa de membranas de espermatozoides. En la tabla figura la actividad de ciclasa en el precipitado y en el sobrenadante de una centrifugación a 105.000 x g de un P 105 tratado con NaCl, Brij 58 o Triton X 100. Otros detalles se encuentran en el texto.

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA pmoles totales/ml precipitado	sobrenadante	% en el sobrenadante
BUFFER A	6,95	1,04	13
+ NaCl 0,1 M	6,07	1,04	14
+ NaCl 0,2 M	5,94	0,78	11
+ NaCl 1,0 M	8,19	1,30	13
+ NaCl 1,5 M	8,12	0,91	10
+ BRIJ 58 0,1 %	5,84	1,45	20
+ BRIJ 58 1 %	3,88	4,11	51
+ Triton X100 2 %	3,57	3,93	52

nes hidrofóbicas (detergentes).

III. 4 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.

Con el objeto de comparar los coeficientes de sedimentación de las adenilil ciclasas de espermatozoides solubilizadas con Triton X 100 y citosólica de células germinales, se realizaron centrifugaciones en gradientes de sacarosa del 5 al 20 % (p/v) conte-

niendo Triton X100 al 0,5 % (p/v) (Figura 47, B y C). Como control, se corrió un gradiente de la ciclasa soluble de testículo sin detergente (Figura 47, A).

Aproximadamente un 40 % de la actividad de ciclasa de espermatozoides solubilizada con Triton sedimentó en un pico con un coeficiente de sedimentación de 4,3 S, valor idéntico al obtenido para la enzima soluble de testículo corrida en las mismas condiciones (Figura 47, B y C). El 60 % restante de la actividad enzimática sedimentó en el fondo del gradiente. Si se comparan las figuras 47 A y B, se puede observar que la presencia del detergente no iónico no alteró el coeficiente de sedimentación de la enzima soluble de testículo. Sin embargo, la presencia de Triton en el gradiente provocó la aparición de parte de la actividad de la enzima soluble sembrada, en el fondo del gradiente (Figura 47,B). El hecho de que tanto la ciclasa citosólica como la de membrana solubilizada hayan presentado actividad en el fondo de los gradientes, cuando éstos contenían Triton X 100 puede ser interpretado en términos de una formación de agregados macromoleculares entre la enzima y el detergente. Se descartó la posibilidad de que la actividad encontrada en el fondo del gradiente corresponda a una forma enzimática de alto coeficiente de sedimentación ya que, de ser así, dicha forma debería tener un coeficiente mayor de 11 S, lo cual significaría un tamaño excesivamente grande, no descripto para ninguna adenilil ciclasa de membranas (los $S_{20,w}$ para las ciclasas de membranas solubilizadas con detergentes oscilan entre 6,0 y 7,5 S). En base a

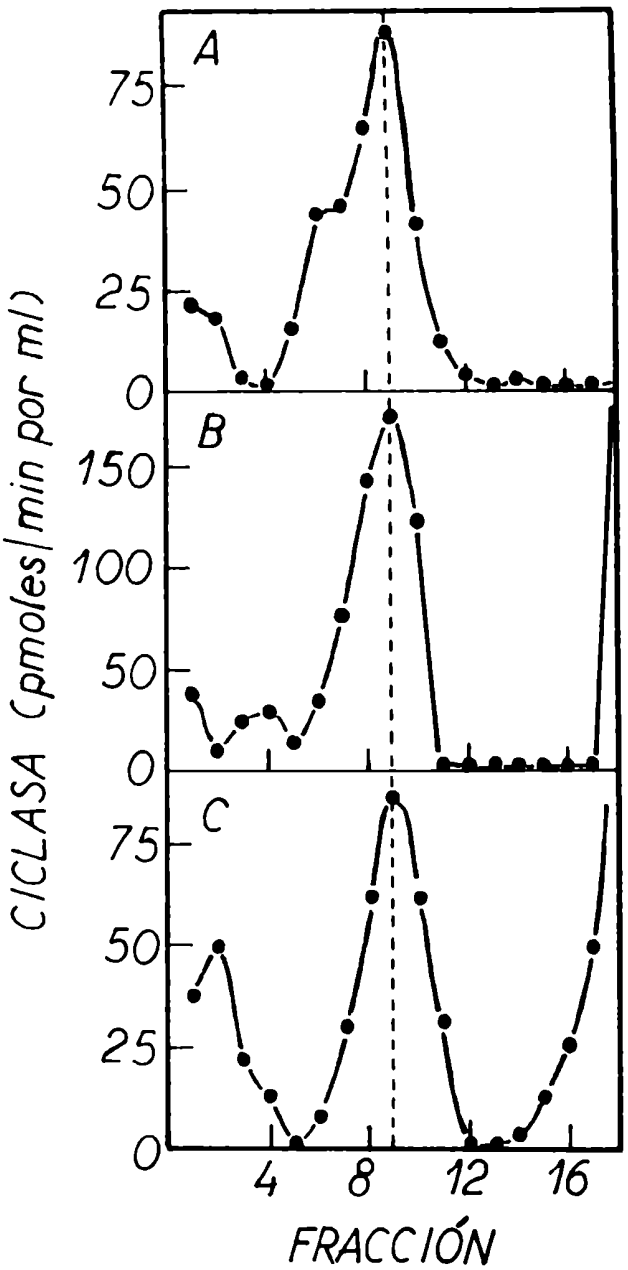


Figura 47:- Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (5-20 %). Preparaciones enzimáticas sembradas: en A, S 105 de testículo; en B, S 105 de testículo conteniendo Triton X100 al 2 % (p/v) y en C, solubilizado de un P 105 de espermatozoides con Triton X 100 al 2 % (p/v).
Los gradientes B y C contienen Triton X 100 en una concentración final del 0,5 %.

las consideraciones anteriores, podemos concluir que las ciclasas de espermatozoides y citosólica de línea germinal presentan el mismo coeficiente de sedimentación. Por otra parte, la ciclasa citosólica de testículo sería una molécula con poca capacidad de unir detergente ya que su coeficiente de sedimentación no varía por la presencia del mismo en el gradiente. Este hecho es interpretado como una escasa hidrofobicidad en la molécula y está de acuerdo con el volumen específico parcial obtenido de 0,74 ml/g (ver sección I.4.2) que es característico de proteínas globulares solubles.

III. 4 Discusión.

Los experimentos descriptos en esta sección proporcionan información adicional sobre las similitudes ya conocidas entre las actividades de adenilil ciclasa soluble de testículo y de membranas de espermatozoides. Las dos actividades son dependientes de Mn^{++} e insensibles a fluoruro, nucleótidos de guanosina y toxina del cólera. En esta tesis, se ha demostrado que ambas enzimas son sensibles a la inhibición por L-T_3 (Figura 45), que presentan la misma km para el ATP (Figura 46) y que probablemente poseen el mismo tamaño (Figura 47). Además se pudo comprobar que la ciclasa de espermatozoides es una proteína intrínseca de membranas ya que sólo es solubilizada por la acción de detergentes.

En el trabajo de Braun y Dods de 1975 (4) se lanzó por primera vez la idea de que la ciclasa de la línea germinal podía representar

una forma precursora soluble de la ciclasa de membrana de esperma tozoides. Las similitudes encontradas entre ambas enzimas podrían reforzar esta hipótesis. Sobre todo teniendo en cuenta la similitud en el tamaño de las dos ciclasas. Cabe destacar en este sentido que la enzima de espermatozoides presenta un coeficiente de sedimentación de 4,3 S que, además de ser idéntico al de la ciclasa soluble de testículo, es sensiblemente menor que los hallados para las ciclasas típicas de membrana, que oscilan entre 6,0 y 8,0 S (ver tabla 8 Bis). Estos hechos confirmarían que pese a ser una ciclasa de membrana, la enzima de espermatozoides presenta más similitudes con la ciclasa soluble de la línea germinal que con las ciclasas de membrana de otros tejidos. El proceso de incorporación de proteínas a las membranas o el pasaje de proteínas a través de las mismas para ubicarse en distintos compartimentos celulares recibe el nombre de translocación. El mecanismo por el cual ocurre esta translocación ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años (para una revisión ver 225). Existen básicamente dos modelos de translocación: co-traduccional y post-traduccional. En el primer caso la proteína va penetrando en la membrana a medida que es sintetizada por el ribosoma. Las proteínas que se sintetizan mediante este mecanismo generalmente presentan en su extremo N-terminal una secuencia de aminoácidos de composición predominantemente hidrofóbica llamada péptido señal. De este manera, el péptido naciente es dirigido por dicha secuencia hidrofóbica hacia el interior de la membrana, de tal modo que las proteínas que se translocan co-traduccionalmente son

sintetizadas en polisomas unidos a membrana (226). En el segundo caso, la proteína se sintetiza en forma completa antes de ser translocada. Esta síntesis ocurre en los ribosomas libres y determina la existencia de una forma soluble transitoria de una proteína cuyo destino final está en la membrana o en algún compartimento u organela para llegar al cual debe atravesar una membrana (227). Esta forma soluble transitoria tendría una secuencia hidrofóbica, no expuesta, ocluida en el interior de la molécula. Según la hipótesis del "gatillado" de Wickner (227), al tomar contacto con la membrana (quizás con alguna molécula receptora específica) la forma soluble sufriría un cambio conformacional que expondría la secuencia hidrofóbica permitiendo así la translocación.

Si bien hasta el presente no existen datos experimentales al respecto, se podría especular que la adenilil ciclasa de membranas de espermatozoides fue translocada por un mecanismo de tipo post-traduccional siendo su precursor soluble la ciclasa soluble de las células de la línea germinal de testículo.

IV. PURIFICACION PARCIAL Y PROPIEDADES DE LA ADENILIL CICLASA SOLUBLE DE NEUROSPORA CRASSA.

Como ya fue comentado en la Introducción (capítulo VII), Flawiá y Torres describieron en una serie de publicaciones, la existencia de una actividad de adenilil ciclasa asociada a membranas de la mutante "slime" de Neurospora crassa. Esta enzima es dependiente de Mn^{++} e insensible al fluoruro, la toxina del cólera y los nucleótidos de guanosina. Tales propiedades fueron posteriormente demostradas en ciclasas de eucariotes inferiores, a saber: Mucor Rouxii (212), Blastocladiella emersoni (213), Saccharomyces cerevisiae (214) y Trypanosoma cruzi (215). La cepa "slime" fue utilizada por los autores mencionados en virtud de que al carecer de pared celular, las células pueden ser rotas con mayor facilidad y de esta manera obtener membranas plasmáticas con alto grado de pureza y buen rendimiento. Las cepas miceliales de N.crassa también poseen una actividad de adenilil ciclasa. Sin embargo, las características de esta actividad enzimática no han sido estudiadas en detalle. Se conocen fundamentalmente dos propiedades:

1) - la actividad enzimática es estrictamente dependiente de Mn^{++}, y
2) - esa actividad está ausente en las cepas de fenotipo "crisp" portadoras de la mutación cr-1 (ver Introducción).

Experimentos preliminares mostraron que cierta proporción de la actividad de ciclasa de un homogeneizado de la cepa salvaje de N.crassa (StL.74) permanecía en el sobrenadante de una centrifugación a

105.000 x g durante 60 minutos. Este hecho podría indicar la existencia de una forma soluble de adenilil ciclasa en el hongo. Esta forma soluble tendría, por lo tanto, propiedades similares a las de la adenilil ciclasas citosólica de testículo en cuanto a su localización y requerimientos de catión divalente, y diferentes de los conocidos para los sistemas de ciclasas de membranas sensibles a hormonas. Por lo tanto, se podría aceptar especulativamente que los sistemas de adenilil ciclasas dependientes de Mn^{++} son característicos de los organismos eucariotes primitivos y de las células germinales del testículo de mamíferos, y que un rasgo peculiar de estos sistemas es la presencia de actividad catalítica en fracciones solubles. De ser cierta tal afirmación, cobra importancia el estudio de los parámetros moleculares de la forma soluble de la adenilil ciclasa de Neurospora y su comparación con los encontrados para la ciclasa citosólica de testículo.

IV. 1 Identificación de una forma soluble de la adenilil ciclasa en las cepas miceliales de N.crassa.

El primer enfoque experimental estuvo destinado a establecer fehacientemente la existencia de una forma soluble de ciclasa en Neurospora. Para ello se realizó un fraccionamiento de un homogeneizado de micelio de la cepa StL 74, mediante centrifugación diferencial. Los micelios fueron homogeneizados según se describió en Materiales y Métodos. El extracto fue centrifugado a 1.100 x g durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue sometido a centrifugación a 12.000 x g por 10 minutos. El sobrenadante de esta últi-

ma centrifugación fue centrifugado a 105.000 x g por 120 minutos. Los resultados de este experimento se encuentran en la tabla 15.

TABLA 15

Distribución de la actividad de adenilil ciclasa después de una centrifugación diferencial de un micelio de la cepa StL-74. Los sedimentos de cada centrifugación fueron homogeneizados en Buffer A.

FRACCION	VOLUMEN (ml)	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA TOTAL (pmoles/min)	ESPECIFICA (pmoles/min/mg Prot)
Homogenato	35	507	1907	3,7
1.100xg(sedimento)	15	200	1140	5,7
12.000xg(sedimento)	4	28	356	12,7
105.000xg(sedimento)	10	91	2060	22,7
105.000xg sobrenadante	23	163	1403	8,6

De los datos incluidos en la tabla 15 puede concluirse lo siguiente:

1) - La suma de las actividades totales de las fracciones de centrifugación es mucho mayor que la actividad total del homogenato inicial. Este hecho indicaría la presencia de un inhibidor (es) de la ciclasa en el homogenato. Probablemente este inhibidor sedimente a baja velocidad y se encuentre en las fracciones de 1.100 x g y/o

12.000 x g.

2) - La fracción con mayor actividad (total y específica) es el sedimento de 105.000 x g (microsomas y membranas plasmáticas). Sin embargo encontramos una cantidad considerable de enzima en el sedimento de 1.100 x g. Esta fracción corresponde a núcleos, células no rotas y pared celular. La presencia de actividad en esta fracción podría deberse a una ruptura incompleta del micelio, o a la adhesión a la pared celular de trozos de membrana plasmática.

3) - Un 40 % de la actividad de ciclasa presente en el sobrenadante de 12.000 x g, permanece en la fracción soluble después de la centrifugación a 105.000 x g por 60 minutos.

Por otro lado es importante destacar que al someter dicha fracción soluble a una nueva centrifugación a 105.000 x g durante 180 minutos, el 98 % de la actividad permaneció en el sobrenadante.

Con el fin de determinar si la existencia de una forma soluble de adenilil ciclasa era una propiedad exclusiva de la cepa salvaje StL 74 de N.crassa o si era una característica común de las cepas miceliales, se realizaron centrifugaciones diferenciales de micelios de las cepas salvajes FGSC 927, 2218, 1757 y 681. Los porcentajes de la actividad enzimática encontrada en el sobrenadante de 105.000 x g respecto de la presente en el sobrenadante de 12.000 x g por cada cepa se encuentran en la tabla 16.

En todas las cepas, la enzima se mantuvo en la fracción soluble después de una recentrifugación a la misma velocidad durante 180 minutos.

TABLA 16

Porcentaje de la actividad de adenilil ciclasa que permanece en un sobrenadante de 105.000 x g respecto de la presente en un sobrenadante de 12.000 x g en distintas cepas miceliales de N.crassa. Las condiciones del fraccionamiento fueron descriptas en el texto y en Materiales y Métodos.

CEPA	ADENILIL CICLASA % DE ACTIVIDAD EN EL S 105
StL 74	32,0
FGSC 987	26,5
FGSC 2218	20,2
FGSC 1757	23,7
FGSC 691	24,8

La presencia de una forma soluble de adenilil ciclasa en Neurospora crassa puede ser interpretada de diferentes maneras. Una de ellas es que las formas sedimentable y soluble representen dos enzimas diferentes, codificadas por distintos genes. Esta posibilidad quedaría descartada por la siguiente evidencia: la actividad de ciclasa de la cepa FGSC 488 es despreciable tanto en las fracciones del sedimento como del sobrenadante de una centrifugación a 105.000 x g. Cabe recordar que en esta cepa, portadora de la mutación cr-1, y que presenta fenotipo crisp, los niveles miceliales de AMP cíclico son diez veces más bajos que los de las cepas que llevan el gen cr-1 salvaje. Al estar ambas actividades, soluble y sedimentable, afec-

tados por la presencia de una mutación en un único locus (cr-1) se puede concluir que son dos formas de la misma molécula enzimática con diferente localización celular.

Otra posibilidad es que la forma soluble de adenilil ciclasa sea consecuencia de un proceso de proteólisis a partir de la forma unida a membrana. Para analizar esta hipótesis se realizó el siguiente experimento. Los micelios de dos cepas salvajes (StL 74 y FGSC 1757) fueron homogeneizados en buffer A conteniendo o no los inhibidores de proteasas PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) a una concentración final de 5 mM o Trasilol a una concentración de 1.000 U/ml. En la tabla 17 (experimento 1) se expresaron los valores porcentuales de actividades presentes en las fracciones P 105 y S 105 de la centrifugación de un sobrenadante de 12.000 x g de cada homogeneizado.

Puede apreciarse que tanto el Trasilol como el PMSF, a las altas concentraciones utilizadas, reducen a la mitad la actividad de ciclasa recuperable en el sobrenadante de 105.000 x g de la cepa StL 74. El efecto también se observa en la cepa FGSC 1757, pero el grado de reducción es menor. Estos resultados indicarían que la aparición de actividad de adenilil ciclasa en la fracción soluble podría ser debido, al menos en parte, a un proceso de proteólisis. Tal proteólisis podría afectar directamente a la proteína enzimática o a otra proteína de membrana a la cual estuviera unida la ciclasa.

Por otra parte existe la posibilidad de que la adenilil ciclasa de Neurospora sea una proteína de las llamadas periféricas de membrana.

TABLA 17

Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la distribución de la actividad de adenilil ciclasa en micelios salvajes.

EXP.	CEPA	FRACCION	ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA					
			A SIN INHIBIDOR		B TRASILOL(1000U/ml)		C PMSF (5mM)	
			TOTAL (%)	ESPECIFICA[a]	TOTAL (%)	ESPECIFICA[a]	TOTAL (%)	ESPECIFICA[a]
1	StL 74	P 105	67,5	41,5	83,8	64,6	85,1	54,9
		S 105	32,5	8,5	16,2	4,1	14,9	4,7
	FGSC 1757	P 105	76,1	43,7	81,1	50,8	85,3	43,4
		S 105	23,9	5,0	18,9	3,1	14,7	2,8
2	StL 74	P 105	16,1	20,2	28,1	38,0	29,4	44,3
		S 105	83,9	104,0	71,9	96,6	70,6	96,3
	FGSC 1757	P 105	35,4	22,6	30,9	41,7	47,1	62,0
		S 105	64,6	77,5	69,1	110,0	52,9	54,7
3	StL 74	P 105	69,2	23,0				
		S 105	30,8	21,0				

(a) pmoles de AMP cíclico producido por minuto por mg de proteína.

Experimento 1:- Actividades enzimáticas en fracciones obtenidas por centrifugación a 105.000 x g por 60 minutos de un sobrenadante de 12.000 x g preparado a partir de micelios homogeneizados en buffer A, conteniendo o no inhibidores de proteasas. Los sedimentos (P 105) fue

ron resuspendidos en la misma solución buffer usada en la homogeneización.
Experimento 2:- Alícuotas de los P 105 resuspendidos del experimento 1 fueron ajustadas a una concentración final de NaCl de 0,5 M y recentrifugadas a 105.000 x g durante 60 minutos. Los sobrenadantes fueron separados y los sedimentos fueron resuspendidos en buffer A conteniendo NaCl a una concentración de 0,5 M y el inhibidor de proteasas correspondiente.
Experimento 3:- Una alícuota del P 105 resuspendido del experimento 2 fue nuevamente centrifugada a 105.000 x g por 60 minutos. Después de esto, el sobrenadante fue separado y el precipitado fue resuspendido en buffer A conteniendo NaCl a una concentración de 0,5 M.

Esto es, que estuviera débilmente unida a la membrana y que parte de la actividad enzimática se liberara al sobrenadante durante los procesos de homogeneización y centrifugación diferencial. De ser así, la actividad de ciclasa debería ser extraída por tratamiento de las fracciones sedimentables con soluciones salinas de alta fuerza iónica. El experimento 2 de la tabla 17 muestra que el tratamiento de las fracciones sedimentadas y resuspendidas (P 105) del experimento 1 con una solución de buffer A conteniendo NaCl a una concentración de 0,5 M provoca una solubilización del 84 % de la actividad para la cepa StL 74 y de un 65 % para la cepa FGSC 1757 (exp. 2 columna A). Además se observa que la presencia de los inhibidores de proteasas no reduce mayormente la extracción por alta fuerza iónica (exp. 2, columnas B y C).

Valga como ejemplo lo que ocurre con la cepa StL 74. Mientras, como ya se mencionó, los inhibidores de proteasas reducían en un 50 % la cantidad de enzima recuperable en el sobrenadante de un homogeneiza

do realizado a baja fuerza iónica, los mismos inhibidores sólo reducen en un 15 % la cantidad de enzima extractable con soluciones salinas de alta fuerza iónica.

En base a los resultados de la tabla 17 se decidió realizar el siguiente experimento: en lugar de solubilizar la actividad de ciclasa por tratamiento de un P 105 con soluciones conteniendo NaCl en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas, se realizaron homogeneizaciones de micelios de Neurospora directamente en soluciones buffer conteniendo NaCl 0,5 M, en ausencia o con el agregado de un inhibidor de proteasas (PMSF o trasilol). Luego se practicó una centrifugación diferencial y se midió actividad de adenilil ciclasa en las fracciones obtenidas. Los resultados pueden verse en la tabla 18.

Los valores de la tabla 18 nos muestran que cuando las homogeneizaciones son realizadas en buffer de alta fuerza iónica, un 50 % de la actividad de ciclasa presente en un sobrenadante de 1000 x g es recuperada en el sobrenadante de 105.000 x g. Además, este porcentaje no es prácticamente alterado por la adición de inhibidores de proteasas al buffer de homogeneización.

Hasta aquí podemos concluir que, independientemente de la existencia de un proceso de proteólisis, la enzima en estudio no se comporta como una proteína integral de membrana, sino más bien como una proteína débilmente unida a la fracción sedimentable. Esta afirmación puede ser corroborada si se analizan los resultados del experimento 3 de la tabla 17.

TABLA 18

Distribución de la actividad de adenilil ciclasa en las fracciones de una centrifugación diferencial[a] de homogeneizados de micelios de Neurospora StL 74 realizados en buffer de alta fuerza iónica, con o sin el agregado de inhibidores de proteasas.

INHIBIDOR DE PROTEASAS	FRACCIONES	ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA TOTAL (pmoles/min)	%
NO	CRUDO	6953	
	P 10.000	609	8
	P 105.000	3225	43
	S 105.000	3675	49
PMSF (5mM)	CRUDO	10860	
	P 10.000	824	7
	P 105.000	5552	47
	S 105.000	5343	46
TRASILOL (100 U/ml)	CRUDO	10132	
	P 10.000	2500	21
	P 105.000	4356	37
	S 105.000	4770	42

a Tres porciones de 15 g (peso húmedo) de micelio fueron homogeneizadas cada una en 20 ml de buffer A conteniendo NaCl 0,5 M, NaCl 0,5 M + PMSF 5 mM y NaCl 0,5 M + Trasilol 100 U/ml respectivamente. Los homogeneizados fueron sometidos a una centrifugación diferencial a 1000, 10.000 y 105.000 x g. El sobrenadante de 1000 x g fue considerado fracción "cruda". Los precipitados fueron resuspendidos en las soluciones buffer de homogeneización correspondientes.

Ellos muestran que "lavando" con solución buffer conteniendo NaCl, la fracción correspondiente al P 105 del experimento 2, aún es posible solubilizar un 30 % adicional de enzima. Si se observan los resultados de la columna A para la cepa StL 74 siguiendo consecutivamente los 3 experimentos se puede razonar que si se parten de un 100 por ciento de actividad enzimática presentes en un sobrenadante de 12.000 x g y se hacen consecutivamente, una centrifugación a 105.000 x g y dos "lavados" de la fracción sedimentable con soluciones de NaCl, se llegará a tener sólo 7,5 por ciento de actividad en la última fracción sedimentable, habiendo pasado a la fracción soluble el 92,5 por ciento restante.

IV. 2 Propiedades cinéticas de la forma soluble de la adenilil ciclasa de N.crassa.

La actividad de la ciclasa soluble de N.crassa fue despreciable cuando los ensayos fueron realizados en presencia de Mg^{++} en lugar de Mn^{++}. Por otra parte, no hubo efecto de activación cuando las mezclas de reacción fueron suplementadas con fluoruro, GTP o GMPP (NH)P. Tampoco se detectó activación al preincubar o ensayar las preparaciones enzimáticas en presencia de toxina del cólera (pretratada o no con ditiotreitol) ya sea en presencia o ausencia de NAD. La actividad enzimática mostró su óptimo en el rango de pH comprendido entre 6,2 y 7,4 unidades (resultados no mostrados).

IV. 3 Purificación parcial y propiedades físicas.

Una manera de comprobar que la actividad de adenilil ciclasa asociada a la fracción soluble corresponde a una enzima auténticamente soluble y que no se trata de una enzima unida a pequeñas vesículas membranosas no sedimentables, consiste en someter la actividad enzimática mencionada a un proceso de purificación mediante métodos utilizados comúnmente para proteínas solubles. De acuerdo con esto, la actividad de adenilil ciclasa de un S 105 de la cepa StL 74 fue sometida a una cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa. La Figura 48 muestra el perfil de elución de la columna. Se ve que la actividad de ciclasa eluye en un único pico bastante estrecho a una concentración de NaCl de aproximadamente 0,27 M. Las dos fracciones con mayor actividad enzimática fueron combinadas. La preparación resultante fue precipitada con sulfato de amonio, dializada y filtrada a través de una columna de Bio Gel A 5m (experimentos preliminares habían mostrado que la actividad de ciclasa se excluía de columna de Bio Gel A 0,5m y 1,5m). Además de comprobar la autenticidad del carácter soluble de la enzima, la filtración en gel tuvo por objetivo obtener el valor del radio de Stokes de la ciclasa. Es por eso que se incluyeron proteínas marcadoras en la preparación sembrada. El perfil de elución de esta columna está graficado en la Figura 49. La ciclasa eluye en un único pico que precede a la β galactosidasa, con una k_{el} de 1,63. Este valor corresponde a un radio de Stokes de 7,3 nm (Figura 49, inserto).

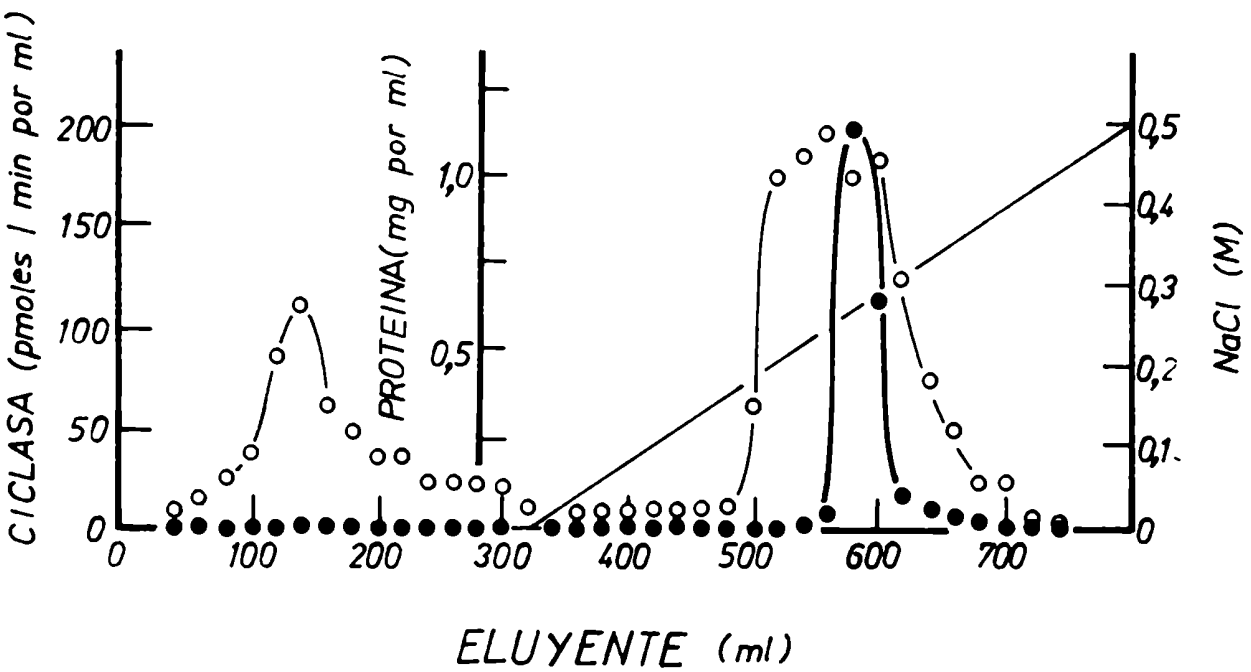


Figura 48:- Cromatografía en columna de DEAE celulosa de un S 105 de la cepa StL 74 de Neurospora crassa.
●, actividad de adenilil ciclasa; O ,proteína.
Las condiciones experimentales fueron descriptas en Materiales y Métodos.

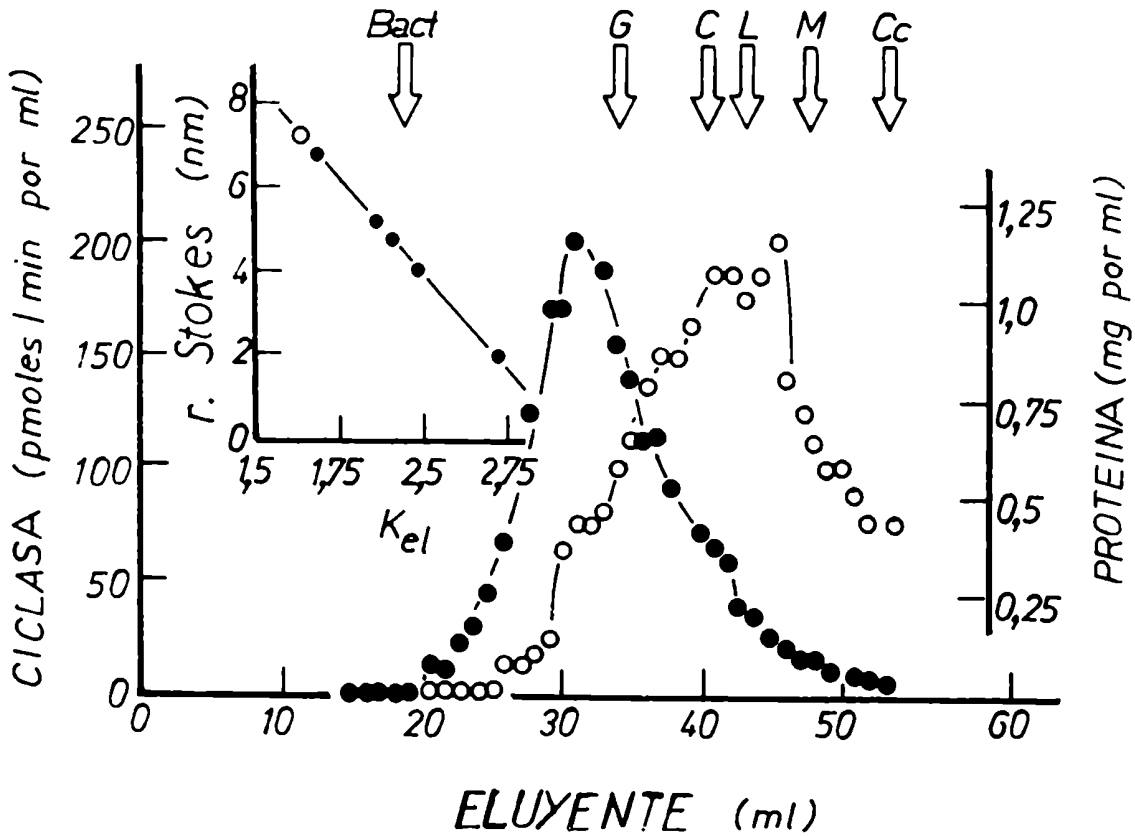


Figura 49:- Filtración por columna de Bio Gel A 5m de una preparación de DEAE de Neurospora (StL 74) precipitada con sulfato de amonio y dializada.
●, actividad de adenilil ciclasa; O, proteína. Las flechas indican la posición de elución de una suspensión de bacterias (Bact) o de las proteínas marcadoras β galactosidasa (G); catalasa (C); lactato deshidrogenasa(L); malato deshidrogenasa (M) y citocromo c (Cc). El gráfico insertado muestra la relación entre los radios de Stokes y los k_{el} para la actividad de ciclasa ( ) y para las proteínas marcadoras ( ). La k_{el} está definida por el cociente entre los volúmenes de elución de la ciclasa o las proteínas marcadoras y el volumen de elución de la suspensión de bacterias (volumen de exclusión de la columna).
Las condiciones experimentales fueron descriptas en Materiales y Métodos.

Después de los dos pasos anteriores la enzima se purificó unas 46 veces (ver tabla 19). El pasaje por DEAE-celulosa parece eliminar un inhibidor existente en el sobrenadante de 105.000 x g, ya que el rendimiento de esa etapa es de un 223 % respecto del S 105. El rendimiento del pico de actividad del Bio Gel A 5m es un 78% respecto del S 105 y sólo un 35 % respecto del pico de actividad de la DEAE celulosa.

TABLA 19

Purificación parcial de la adenilil ciclasa soluble de Neurospora crassa, cepa StL 74.

FRACCION	PROTEINA (mg TOTALES)	ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA TOTAL (pmoles/min)	RENDIMIENTO %	ESPECIFICA (pmoles/min/ mg prot)	PURIFICACION VECES
S 105	188,4	1860	100	9,87	1
DEAE-celulosa	20,0	4160	223	208,00	21
Bio-Gel A 5m	3,2	1455	78	451,86	46

Con el objeto de conocer el coeficiente de sedimentación y el volumen específico parcial de la enzima, se realizaron ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa hechos en H_2O o D_2O. La Figura 50 muestra el perfil de sedimentación de la actividad de ciclasa de una preparación de DEAE en ambos tipos de gradientes.

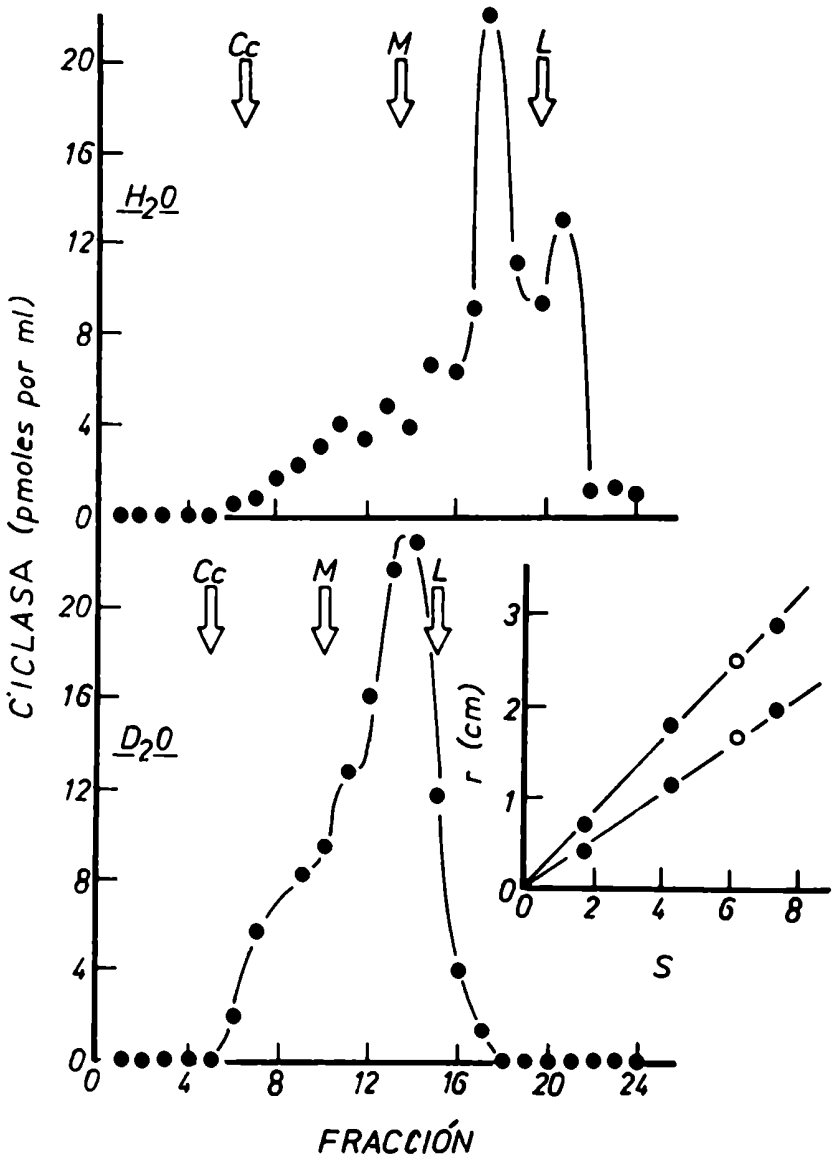


Figura 50:- Centrifugaciones en gradientes de sacarosa de una preparación de DEAE de N.crassa, StL 74. Los gradientes fueron hechos en agua o en óxido de deuterio. Las flechas indican la posición de las proteínas marcadoras: citocromo c (Cc); malato deshidrogenasa (M) y lactato de hidrogenasa (L). En el gráfico insertado se encuentra la relación entre los coeficientes de sedimentación (S) y la posición en los gradientes de la ciclasa (○) y las proteínas marcadoras (●). Las condiciones experimentales fueron descriptas en Materiales y Métodos.

Las constantes de sedimentación fueron las mismas en ambos gradientes, presentando un valor de 6,25 S (inserto de la Figura 50). Este hecho indica que la ciclasa y las proteínas marcadoras tienen esencialmente el mismo volumen específico parcial, 0,74 $ml.g^{-1}$, que es característico de las proteínas globulares solubles. En base a los datos obtenidos se pudo calcular un peso molecular de 202.000. En la tabla 20 se encuentran los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la adenilil ciclasa soluble de Neurospora. Los valores de estos parámetros son similares a los de las ciclasas de tejidos de mamíferos solubilizadas con detergentes (ver Discusión).

TABLA 20

Parámetros hidrodinámicos y moleculares de la adenilil ciclasa soluble de Neurospora crassa.

PARAMETRO	VALOR
$S_{20,w}$ (S)	6,25
a (nm)	7,3
$\bar{v}$ ($ml.g^{-1}$)	0,74
PM	202.000
f/fo	1,65
pI	4,65

Por otro lado se determinó el punto isoeléctrico de la enzima mediante un electroenfoque en capa delgada realizado entre pH 4,0 y 6,0. La preparación enzimática sembrada fue un sobrenadante de 105.000 x g. La Figura 51 presenta el perfil de elución de dicho electroenfoque. Se obtuvo un único pico de actividad enzimática a pH = 4,65, que no coincide con la banda de tinción mayoritaria con azul de Coomassie.

IV. 4 Discusión.

Las evidencias que proporcionan los experimentos descriptos en esta sección indican que es posible extraer una actividad de adenilil ciclasa soluble del micelio de Neurospora crassa. No es posible establecer si esta forma soluble existe in vivo, o si se trata de una solubilización parcial de la ciclasa unida a membrana durante el proceso de homogeneización del micelio. El hecho de que la mutación cr-1 afecte tanto a la actividad de ciclasa soluble como a la sedimentable permite concluir que esas dos actividades representan formas de la misma enzima.

Los resultados de la tabla 17 indican que la adenilil ciclasa asociada a membranas de las cepas miceliales se comporta como una proteína débilmente unida, ya que es posible solubilizarla con soluciones salinas. Esto la diferencia de las ciclasas de membrana de células de mamíferos que sólo son solubilizadas por la acción de detergentes. La existencia de formas de adenilil ciclasa solubles o

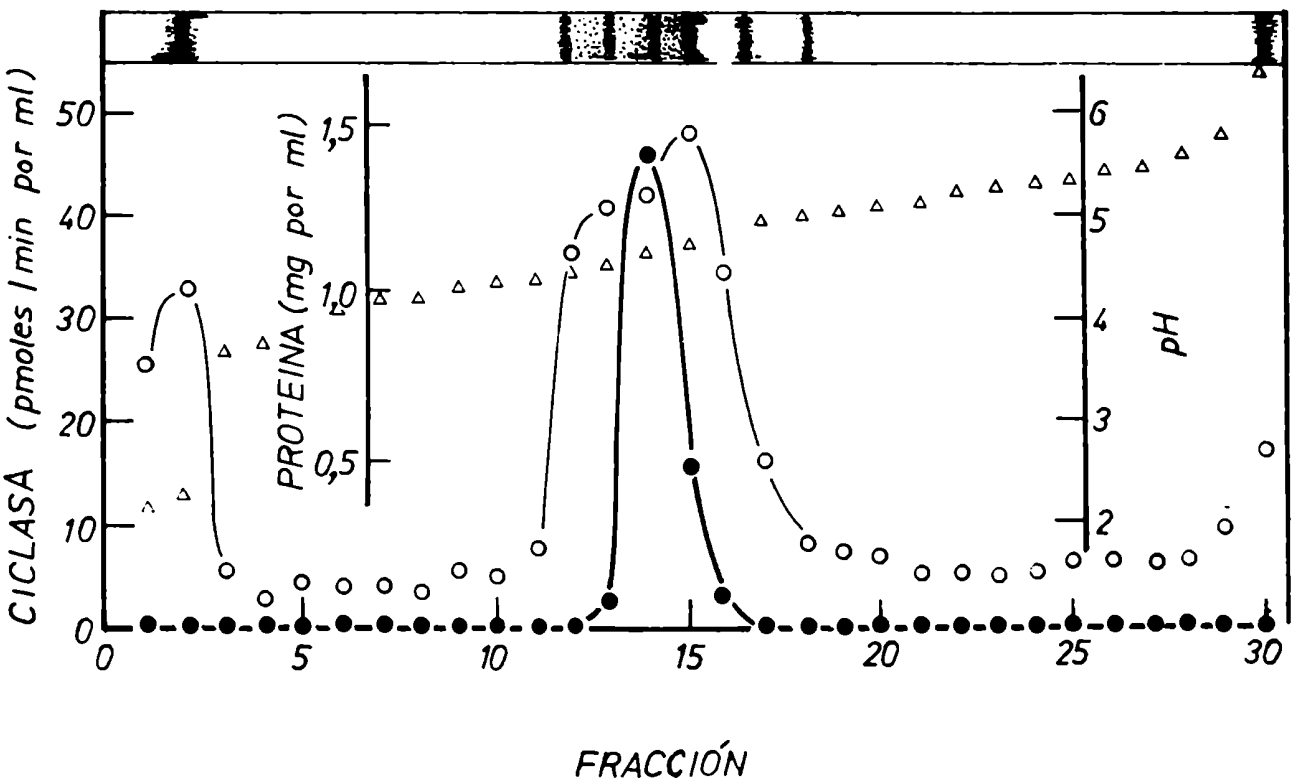


Figura 51:- Enfoque isoeléctrico en capa delgada de un S 105 de Neurospora crassa StL 74.
●, actividad de adenilil ciclasa; O, proteína y △, pH. La parte superior de la figura muestra el patrón de bandas obtenido en una tira de papel de filtro ubicada sobre la superficie del gel de Sephadex y luego teñida para proteínas con azul de Coomassie. Las condiciones experimentales fueron descriptas en Materiales y Métodos.

débilmente unidas a membrana no ha sido estudiada detalladamente en los eucariotes inferiores. Franco da Silveira et al no detectaron actividad enzimática en el sobrenadante de 105.000 x g de Trypanosoma cruzi (215). Lopes Gomes et al (213) por otro lado mostraron que si bien el 73 % de la actividad de ciclasa de Blastocladiella emersoni se encuentra en el sedimento de 105.000 x g, hay un 18 % de actividad de ciclasa en el sobrenadante post microsomal. La ciclasa sedimentable fue solubilizada con Triton X-100 al 1% pero no se probó la acción de soluciones salinas. En Saccharomyces cerevisiae existe un 16 % de la actividad de ciclasa en el sobrenadante de 105.000 x g. La actividad sedimentable fue solubilizada por Varimo y Londesborough (214) por medio de tratamiento con una mezcla de Lubrol al 0,1 % y KCl a una concentración de 0,3 M. Sin embargo los mismos autores demostraron que es posible solubilizar un 40 % de la actividad presente en el sedimento de 105.000 x g por tratamiento con soluciones conteniendo KCl a una concentración de 0,3 M o sacarosa 1 M. Además la adenilil ciclasa del protozoo Tetrahymena pyriformis también fue solubilizada por extracción con soluciones de sacarosa (228). Estos datos estarían de acuerdo con la evidencia obtenida en Neurospora crassa.

Es posible hacer algunas generalizaciones en cuanto a las características y localización intracelular de las adenilil ciclasas a lo largo de la escala evolutiva:

Según Ide (229) la adenilil ciclasa de bacterias puede ser clasifi-

cadas tentativamente en dos grupos: uno dependiente de piruvato u otros cetoácidos para manifestar su actividad y el otro independiente de los mismos. Un punto interesante es que la mayoría de las adenilil ciclasas dependientes de piruvato están asociadas a la fracción soluble mientras que las que no son activadas por dicho compuesto se encuentran en la fracción particulada. Al primer grupo pertenecen las bacterias Gram-positivas o Gram-variables como Brevibacterium, Micrococcus y Arthrobacter mientras que en el segundo grupo se encuentran tanto Gram negativas como positivas y los ejemplos más estudiados son Escherichia coli, Nocardia, Alkaligenes, Corynebacterium y Erwinia. En cuanto a los requerimientos de catión divalente en ambos grupos las ciclasas pueden funcionar con Mg^{++} o Mn^{++}, pero en E.coli y Brevibacterium liquefaciens el Mn^{++} es inhibitorio a concentraciones mayores de 5mM en tanto que en Nocardia erythropolis el Mn^{++} es mucho más efectivo que el Mg^{++} en todo rango de concentraciones.

En los eucariotes inferiores o Protistas (hongos, protozoos y algas) se podría generalizar que las adenilil ciclasas son estrictamente dependientes de Mn^{++} y están asociadas a las membranas por interacciones débiles características de las proteínas periféricas.

No existen por otro lado datos suficientes para poder establecer las propiedades generales de las ciclasas de los metazoarios (exceptuando mamíferos) y de las plantas.

En mamíferos, como ya se ha discutido anteriormente las ciclasas

son dependientes de Mg^{++}, unidas fuertemente a la membrana plasmática y regulables por hormonas, con la excepción de la ciclasa soluble de células de la línea germinal de testículo cuyas características han sido discutidas extensivamente en esta tesis.

Resulta interesante puntualizar que la forma soluble de la adenilil ciclasa de Neurospora crassa presenta los mismos parámetros hidrodinámicos y peso molecular (alrededor de 200.000) que las ciclasas unidas a membrana de mamíferos (ver tabla 8 bis).

Esto es, aún siendo soluble, la enzima de Neurospora es una molécula más asimétrica (f/fo = 1,65) y de mayor tamaño que la ciclasa soluble de testículo (f/fo = 1,4). Además ambas enzimas presentan puntos isoeléctricos diferentes: 5,30 para testículo y 4,6 para Neurospora.

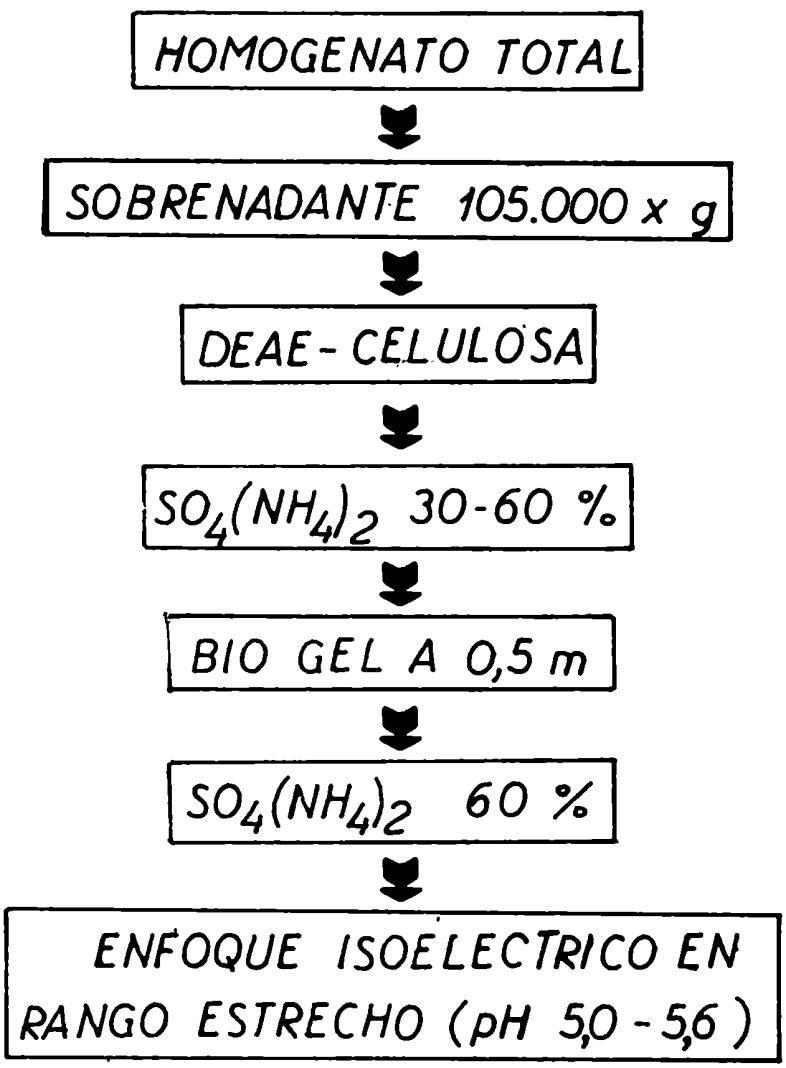
De acuerdo con estos datos, la ciclasa soluble de Neurospora es el primer caso descripto de un componente catalítico de adenilil ciclasa de peso molecular grande,susceptible de ser purificado sin el uso de detergentes. El tamaño, la forma y las propiedades cinéticas y funcionales de la ciclasa de Neurospora permitirían identificarla con la subunidad catalítica C descripta por Gilman (68) en células de mamíferos. Esto indicaría que la enzima responsable de la síntesis de AMP cíclico en Neurospora es un tipo de "proto" ciclasa en la cual está ausente el componente regulatorio G/F. Hasta el presente, este tipo de ciclasa ha sido además descripto en mutantes de líneas celulares como el linfoma S 49 (ver Introducción, sección II.7)

donde la proteína G/F está ausente.

La existencia de un organismo vivo (no una línea celular mutante) como Neurospora, que solamente posea el componente catalítico C de la ciclasa permitiría concluir que a lo largo de la evolución de los eucariotes apareció primeramente la actividad catalítica para la síntesis de AMP cíclico, siendo la actividad regulatoria una adquisición más reciente. Resumiendo, los sistemas de adenilil ciclasa dependientes de Mn^{++} en los organismos eucariotes inferiores estarían representados por un tipo de protociclasa no sujeta a los mecanismos de control conocidos que regulan a los sistemas de mamíferos donde la enzima sería una holociclasa.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1 - Se purificó a homogeneidad la actividad de adenilil ciclasa soluble de testículo de rata de acuerdo al siguiente procedimiento:



2 - La enzima pura presenta una única banda polipeptídica en electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, correspondiente a un peso molecular de 69.000. La purificación lograda fue de 1700 veces con un rendimiento del 1,5 %. La enzima presenta un punto isoeléctrico de 5,3 unidades.

3 - Se calcularon los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la enzima por medio de filtraciones en gel y ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa hechos en H_2O o D_2O. Los resultados indicaron que la enzima posee un coeficiente de sedimentación de 4,3 S, un radio de Stokes de 3,95 nm, un volumen específico parcial de 0,74 ml/g y un peso molecular relativo de 74.000. Este último dato concuerda con el peso molecular de la enzima pura en geles de poliacrilamida con SDS, lo cual indica que la ciclasa soluble de testículo es una proteína monomérica. Además se calculó el cociente friccional (f/fo) de la enzima, cuyo valor de 1,4 indica que se trata de una proteína ligeramente asimétrica.

4 - Se estudió el efecto de la triiodotironina sobre la actividad de ciclasa de distintos tejidos, observándose que la actividad enzimática asociada a la fracción soluble de testículo es inhibida selectivamente por la presencia de la hormona en la mezcla de incubación. Las actividades de ciclasa de hígado, riñón,

cerebro y corazón no son afectadas por la presencia de la L-T_3.

El efecto inhibitorio es reversible y no requiere preincubación de la enzima con la hormona.

La enzima presenta una curva V vs S de tipo michaeliano (hiperbólica) y la inhibición causada por la L-T_3 es de tipo no competitivo tanto con respecto al ATP como con respecto al Mn^{++}.

El efecto inhibitorio no es producido por la capacidad de la L-T_3 de quelar Mn^{++} u otros cationes divalentes.

5 - Se estudió la relación entre la actividad enzimática y la concentración de hormona: entre 10^{-10} y 10^{-6} M la inhibición oscila entre un 15 y un 25 % y a concentraciones mayores de 10^{-6} M se observa una fuerte inhibición llegándose a un 90 % a una concentración de L-T_3 de 10^{-4}M. Se investigó la influencia de compuestos análogos a la L-T_3 sobre la actividad de la enzima. En tanto el NaI no afecta la actividad de la ciclasa, la D-T_3 produce un efecto idéntico al de la L-T_3.

La T_4 y la isopropil T_2 presentan la misma eficiencia inhibitoria que la L-T_3 en rangos de concentraciones bajas, mientras que a concentraciones altas inhiben pero en menor medida. Las iodotirosinas (MIT y DIT) no produjeron mayor efecto sobre la ciclasa.

6 - El efecto inhibitorio no fue abolido por el tratamiento con diferentes drogas (urea, guanidina, N-etil-maleimida, bromuro de

cianógeno, ditiotreitol, hidroxilamina, EGTA y NaCl) ensayadas a distintas concentraciones.

El Triton X-100 no modificó la actividad basal de la ciclasa soluble de testículo, pero anuló por completo el efecto inhibitorio, posiblemente a causa de su capacidad de unir L-T_3 por medio de interacciones hidrofóbicas.

7 - Por otra parte se demostró que la L-T_3 es capaz de inhibir la acumulación de AMP cíclico intracelular cuando es añadida al medio de un cultivo de trozos de testículo de rata decapsulados. Esta inhibición presenta una curva de dosis respuesta que si bien no es idéntica se puede correlacionar con la curva de actividad de adenilil ciclasa en función de la concentración de L-T_3.

8 - Se detectó la existencia de una actividad ligadora ("binding") de [^{125}I] L-T_3 en el S 105 de testículo. La unión de la hormona a su presunto sitio receptor es específica, saturable, reversible y temperatura y tiempo dependiente.

9 - Al someter la preparación enzimática de testículo a diversos métodos de purificación se encontró que existe una asociación física entre las actividades de ciclasa y de unión ("binding") de [^{125}I] L-T_3. Tal asociación permitiría explicar el efecto

inhibitorio que ejerce la L-T_3 sobre la enzima, efecto que se observa en preparaciones enzimáticas de todos los grados de purificación alcanzados.

10 - Se calcularon las constantes de disociación y capacidad de unión de [^{125}I] L-T_3 a una preparación enzimática parcialmente purificada.

Existen dos componentes de unión: uno de alta afinidad (k_d = 6,5 x 10^{-8}M) y baja capacidad (1ng de L-T_3/mg prot.) y otro de baja afinidad (k_d = 3 x 10^{-6}M) y alta capacidad de unión (24 ng de L-T_3/mg prot.). La existencia de dos sitios con afinidades diferentes por la hormona podría estar correlacionada con el tipo de curva de dosis-respuesta bifásica de la inhibición de la adenilil ciclasa por la L-T_3.

11 - Se estudiaron algunas propiedades de la adenilil ciclasa asociada a membranas de espermatozoides de rata. La actividad enzimática es dependiente de Mn^{++}, insensible al fluoruro, nucleótidos de guanosina y gonadotrofinas.

Además, dicha actividad enzimática es inhibida por la L-triiodotironina a altas concentraciones (10^{-4}M). La enzima presenta un km para el ATP de 1mM y al ser solubilizada por tratamiento de las membranas con Triton X-100 presenta un coeficiente de sedimentación de 4,3 S. Todas estas características son similares

a las descriptas para la adenilil ciclasa asociada a la fracción soluble de testículo de rata, y diferentes de las propiedades conocidas para las adenilil ciclasas de membrana de otros tejidos de mamíferos.

12 - Se determinó la existencia de una forma "soluble" de adenilil ciclasa en cepas miceliales del hongo Neurospora crassa. En fraccionamientos subcelulares de homogeneizados realizados en soluciones de baja fuerza iónica, se obtiene de un 20 a un 30 % de la actividad de ciclasa en el sobrenadante post-microsomal. Si las homogeneizaciones se llevan a cabo en soluciones de alta fuerza iónica, un 50 % de la actividad enzimática permanece en el sobrenadante. Además, es posible extraer en forma soluble hasta un 90 % de la actividad de ciclasa mediante lavados sucesivos del precipitado de 105.000 x g con soluciones salinas de alta fuerza iónica.

13 - La adenilil ciclasa "soluble" de N.crassa presenta propiedades similares a las ya descriptas para la enzima asociada a membranas (dependencia de Mn^{++}, insensibilidad a F^{-}, etc.). Esta actividad no es detectable en la cepa mutante cr-1 (carente de actividad de adenilil ciclasa) lo cual podría indicar que las ciclasas de membranas y soluble del hongo representan dos formas de la misma enzima con diferente localización.

14 - La enzima fue parcialmente purificada (46 veces) a través de cromatografía en columna de DEAE-celulosa y Bio Gel A 5m. Se calcularon los parámetros hidrodinámicos y moleculares de la enzima: coeficiente de sedimentación, 6,25 S; radio de Stokes, 7,3 nm; volumen específico parcial, 0,74 ml/g; peso molecular, 202.000; cociente friccional, 1,65 y punto isoeléctrico, 4,65. Estos datos indican que la ciclasa soluble de Neurospora posee un tamaño similar al descripto para el componente catalítico C de los sistemas de adenilil ciclasas regulables por hormonas de tejidos de mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

1. Sutherland,E.W. y Rall,T.W. (1957) J.Am.Chem.Soc. 79, 3608.

2. Sutherland,E.W. y Rall,T.W. (1958) J.Biol.Chem. 232, 1077.

3. Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1972) J.Biol.Chem. 247, 6873.

4. Braun,T. y Dods,R.F. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72, 1097.

5. Kornblihtt,A.R., Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1980) Biochemistry, en prensa.

6. Davoren,P.R. y Sutherland,E.W. (1963) J.Biol.Chem. 238, 3016.

7. Pohl,S.L., Birnbaumer,L. y Rodbell,M. (1969)Science 164, 566.

8. Neville,D.M.,Jr. (1968) Biochim.Biophys.Acta 230, 539.

9. Hetcher,O., Bar,H.P., Matsuka,M. y Soifer,D. (1969) Life Sciences 8, Part 1, 935.

10. Soifer,D. y Hetcher,O. (1971) Biochim.Biophys.Acta 230, 539.

11. Liao,S., Lin,A.H. y Tymoizko,J.L. (1971)Biochim.Biophys.Acta 230, 535.

12. Perkins,J.P. (1973) Advances in Cyclic Nucleotide Research (Greengard,P. y Robinson,G.A., eds.) Raven Press, New York, vol. 4, pp. 1-64.

13. Birnbaumer,L. (1977) Receptor and Hormone Action, vol.I, cap.16, New York, pp. 485.

14. Levey,G.S. (1971) Ann.N.Y.Acad.Sci. 185, 449.

15. Ryan,J. y Storm,D.R. (1974) Biochem.Biophys.Res.Commun. 60, 304.

16. Johnson,R.S. y Sutherland,E.W. (1973)J.Biol.Chem. 248, 5114.

17. Birnbaumer,L., Pohl,S.L. y Rodbell,M. (1969) J.Biol.Chem. 244, 3468.

18. Rall,T.W. y Sutherland,E.W. (1962) J.Biol.Chem. 237, 1228.

19. Harwood,J.P. y Rodbell,M. (1973) J.Biol.Chem. 248, 4901.

20. Manganiello,V.C. y Vaughan,M. (1976) J.Biol.Chem. 251, 6205.

21. Manganiello,V.C. y Vaughan,M. (1973) J.Biol.Chem. 248, 7164.

22. Vaughan,M. y Murad,F. (1969) Biochemistry 8, 3092.

23. Rodbell,M., Lin,M.C., Salomon,Y., Londos,C., Harwood,J.P., Martin,B.R., Rendell,M. y Berman,M. (1975) Advances in Cyclic Nucleotide Research, vol. 5, Raven Press, New York, pp. 3-30.

24. Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1973) J.Biol.Chem. 248, 4517.

25. Giménez de Asúa,L.A., Surian,E.S., Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70, 1388.

26. Torres,H.N., Flawiá,M.M., Hernaez,L. y Cuatrecasas,P. (1977) Fed.Proc. 36, 736.

27. Torres,H.N., Flawiá,M.M., Hernaez,L. y Cuatrecasas,P. (1978) J.Memb.Biol. 43, 1.

28. Sutherland,E.W. y Rall,T.W. (1960) Phar.Rev. 12, 265.

29. Skelton,G.L., Levey,G.S. y Epstein,S.E. (1970) Circ.Res. 26, 35.

30. Bdolah,A. y Schramm,M. (1968) Biochem.Biophys.Res.Commun. 18,452.

31. Butcher,R.W., Ho,R.J., Meng,H.C. y Sutherland,E.W. (1965) J.Biol. Chem. 240, 4515.

32. Goldberg,A.L. y Singer,J.J. (1969) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 64, 134.

33. Shein,H.M. y Wurtman,R.J. (1969) Science 166, 519.

34. Butcher,R.W., Baird,C.E. y Sutherland,E.W. (1968) J.Biol.Chem. 243, 1705.

35. Hayners,R.C., Konitz,S.B. y Peron,F.G. (1959) J.Biol.Chem. 234, 1421.

36. Pastan,I. y Wollman,S.H. (1967) J.Cell.Biol. 35, 262.

37. Alm,C.S. y Rosenberg,I.N. (1968) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 60, 830.

38. Pastan,I. y Macchia,V. (1967) J.Biol.Chem. 242, 5757.

39. Chase,L.R. y Aurbach,G.D. (1967) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 58, 518.

40. Marsh,J.M., Butcher,R.W., Savard,K. y Sutherland,E.W. (1966) J.Biol.Chem. 241, 5436.

41. Orloff,J. y Handeler,J. (1967) Amer.J.Med. 42, 757.

42. Zor,V., Kaneko,T., Schneider,H.P., McCann,S. y Field,J.B. (1970) J.Biol.Chem. 245, 2883.

43. Rodesh,F., Neve,P., Willems,C. y Dumont,J. (1969) Eur.J.Biochem. 8, 26.

44. Butcher,R.W. y Baird,C.E. (1968) J.Biol.Chem. 243, 1713.

45. Aurbach,G.D. y Chase,L.R. (1970) Fed.Proc. 29, 1179.

46. O'Keefe,E. y Cuatrecasas,P. (1974) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 71, 2500.

47. Fain,J.N. y Butcher,F.R. "Cyclic Nucleotides in Mode of Hormone Action" en: Endocrine Physiology. Editores S.M.McCann y A.C. Guyton, p. 241-294, University Park Press, 1977.

48. Schimmer,B.P., Ueda,K. y Sato,G.H. (1968) Biochem.Biophys.Res. Commun. 32, 806.

49. Cuatrecasas,P. (1969) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 63, 450.

50. Murad,F., Chi,Y.M., Rall,T.W. y Sutherland,E.W. (1962) J.Biol. Chem. 237, 1233.

51. Birnbaumer,L., Pohl,S.L., Rodbell,M. y Sundby,F. (1972) J.Biol. Chem. 247, 2038.

52. Birnbaumer,L. y Rodbell,M. (1969) J.Biol.Chem. 244, 3477.

53. Rodbell,M., Birnbaumer,L., Pohl,S.L. y Kraus,H.M.J. (1971) J.Biol.Chem. 246, 1877.

54. Yount,R.G., Babrock,D., Ballantine,W. y Ojala,D. (1971) Biochemistry 10, 2484.

55. Rodbell,M., Kraus,H.M., Pohl,S. y Birnbaumer,L. (1971) J.Biol. Chem. 246, 1872.

56. Welton,A.F., Lad,P.M., Newby,A.C., Yamamura,H., Nicosia,S. y Rodbell,M. (1977) J.Biol.Chem. 252, 5947.

57. Lad,P.M., Welton,A.F. y Rodbell,M. (1977) J.Biol.Chem. 252, 5947.

58. Pfeuffer,T. (1977) J.Biol.Chem. 252, 7224.

59. Ross,E.M. y Gilman,A.G. (1977) J.Biol.Chem. 252, 6966.

60. Ross,E.M., Howlett,A.C., Ferguson,K.M. y Gilman,A.G. (1978) J.Biol.Chem. 253, 6401.

61. Cassel,D. y Selinger,Z. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74, 3307.

62. Cuatrecasas,P. (1973) Biochemistry 12, 3547.

63. Van Heyningen,S. y King,A.C. (1975) Biochem.J. 146, 269.

64. Gill,D.M. y King,G.A. (1975) J.Biol.Chem. 250, 6424.

65. Gill.D.M. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72, 2064.

66. Sahyoun,N. y Cuatrecasas,P. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72, 3438.

67. Martin,B.R., Houslay,M.D. y Kennedy,E.L. (1977) Biochem.J. 161, 639.

68. Ross,E.M. y Gilman,A.G. (1980) Annu.Rev.Biochem. 49, 533.

69. Bourne,H.R., Coffino,P. y Tomkins,G.M. (1975) Science 187, 750.

70. Torres,H.N., Flawiá,M.M., Terenzi,H.F. y Téllez-Iñón,M.T. (1975) Adv.Cyclic Nucl.Res. 5, 67.

71. Haga,T., Ross,E.M., Anderson,H.J. y Gilman,A.G. (1977) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. 74, 2016.

72. Cuatrecasas,P. y Hollenberg,M.D. (1976) Advances in Protein Chemistry, vol. 30, New York, p. 251-451.

73. Cuatrecasas,P. (1974) Biochem.Pharmacol. 23, 2353.

74. Bennett,V., O'Keefe,E. y Cuatrecasas,P. (1975) Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A. 72, 33.

75. Singer,S.J. y Nicolson,G.L. (1972) Science 175, 720.

76. Levitzki,A. (1974) J.Theor.Biol. 44, 367.

77. Orly,J. y Schramm,M. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 73, 4410.

78. Schramm,M., Orly,J., Eimerl,S. y Korner,M. (1977) Nature 268, 310.

79. Schulster,D., Orly,J., Seidel,G. y Schramm,M. (1978) J.Biol.Chem. 253, 1201.

80. Tao,M., Salas,M.L. y Lipmann,F. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 67, 408.

81. Gill,G.N. y Garren,L.D. (1971) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 68, 786.

82. Corbin,J.D., Sugden,P.H., Lincoln,T.M. y Keely,S. (1977) J.Biol. Chem. 252, 3854.

83. Corbin,J.D. y Krebs,E.G. (1969) Biochem.Biophys.Res.Commun. 36, 328.

84. Datta,A., de Haro,C., Sierra,J.M. y Ochoa,S. (1977) Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. 74, 1463.

85. Soderling,T.R., Corbin,J.D. y Park,C.R. (1973) J.Biol.Chem. 248, 1822.

86. Fallon,E.F.,Agarawal,R., Furth,E., Steiner,A.L. y Couden,R. (1974) Science 184, 1089.

87. Mancini,R.E., Castro,A. y Seiguer,A.C. (1967) J.Histochem.Cytochem. 15, 516.

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

89. Dufau,M.L., Charreau,E.M. y Catt,K.J. (1973) J.Biol.Chem. 248, 6973.

90. Catt,K.J. y Dufau,M.L. (1973) Nature New.Biol. 244, 219.

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

92. Mendelson,C., Dufau,M.L. y Catt,K.J. (1975) J.Biol.Chem. 250, 8818.

93. Podestá,E.J., Dufau,M.L. y Catt,K.J. (1978) Biochemistry 17, 1566.

94. Dufau,M.L., Tsuruharo,T., Horner,K.A., Podesta,E. y Catt,K.J. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74, 3419.

95. Cigorraga,S.B., Dufau,M.L. y Catt,K.J. (1978) J.Biol.Chem. 253, 4297.

96. Hsueh,A.J.W., Dufau,M.L. y Catt,K.J. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74, 592.

97. Jensen,E.V., Catt,K.J., Gorski,J. y Williams-Asham,H.G. en Frontiers in Reproduction and Fertility Control, MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 1977, p. 245-263.

98. Means,A.R. y Vaitukaitis,J. (1972) Endocrinology 90, 39.

99. Steinberger,E., Swerdloff,R.S. y Horton,R. en Frontiers in Reproduction and Fertility Control, MIT PRess, Cambridge, Massachusetts, 1977, p. 264-292.

100. Abou-Issa,H. y Reichert,L.E. (1977) J.Biol.Chem. 252, 4166.

101. Abou-Issa,H. y Reichert,L.E. (1976) J.Biol.Chem. 251, 3326.

102. Kuehl,F.A., Panatelli,D.J., Tarnoff,J. y Humes,J.L. (1970) Biol. Reprod. 2, 154.

103. Braun,T. y Sepsenwol,S. (1974) Endocrinology 94, 1028.

104. Dorrington,J.H., Vernon,R.G. y Fritz,I.B. (1972) Biochem.Biophys. Res.Commun. 46, 1523.

105. Means,A.R. y Hall,P.F. (1967) Endocrinology 81, 1151.

106. Wilson,E.M., Lea,O.A. y French,F.S. (1978) en: Receptors and Hormone Action, vol. II, O'Malley,B.W. y Birnbaumer,L. eds., Academic Press, New York, p. 491-531.

107. Dorrington,H.J. y Fritz,I.B. (1974) Endocrinology 94, 395.

108. Means,A.R. y Huckins,C. (1974) Endocrinology 94, suppl. A-107.

109. Abou-Issa,H. y Reichert,L.E. (1979) Endocrinology 104, 189.

110. Braun,H.F., Dods,R. y Sepsenwol,S. (1977) Biochim.Biophys.Acta 481, 227.

111. Neer,E.J. (1978) J.Biol.Chem. 253, 5808.

112. Herman,C.A., Zahler,W.L., Doak,G.A. y Campbell,B.J. (1976) Arch. Biochem.Biophys. 177, 622.

113. Morton,B. y Albagli,L. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 50, 697.

114. Braun,T. (1974) en: Current Topics in Molecular Endocrinology, eds. Dufau,M.L. y Means,A.R., Raven Press, New York, vol. 1, pp. 243-264.

115. Braun,T. (1975) Advances in Cyclic Nucleotides Research (eds. Greengard,P. y Robinson,G.A.), Raven Press, New York,vol.5,p.808.

116. Harrington,C.R. y Barger,G. (1927) Biochem.J. 21, 169.

117. Lissitzky,S. (1978) en: Beaulieu, Hormones, aspects fondamentaux et physio-pathologiques, cap. III, pp. 155-200.

118. Gross,J. y Pitt-Rivers,R. (1953) Biochem.J. 53, 645.

119. Schwartz,H.L., Surks,M.I. y Oppenheimer,J.H. (1971) J.Clin. Invest. 50, 1124.

120. Werner,S.C. e Ingbar,S.H. (1978) The Thyroid, a fundamental and clinic text (4a. edicion), Harper and Row, Maryland.

121. Adamson,L.F. e Ingbar,S.H. (1967) Endocrinology 81, 1362.

122. Adamson,L.F. e Ingbar,S.H. (1967) Endocrinology 81, 1372.

123. Lin,M.H. y Akera,T. (1978) J.Biol.Chem. 253, 723.

124. Tata,J.R., Ernster,L. Y Suramyi,E.M. (1962) Biochim.Biophys.Acta 60, 461.

125. Oppenheimer,J.H., Koerner,D., Schwartz,H.L. y Surks,M.I. (1972) J.Clin.Endocrin.Metab. 35, 330.

126. Morishige,W.K. y Guerney,D.L. (1978) Endocrinology 102, 1628.

127. Sterling,K. y Milch,P.O. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72, 3225.

128. Sterling,K., Milch,P.O., Brenner,M.A. y Lazarus,J.H. (1977) Science 197, 996.

129. Pliam,N.B. y Goldfine,I.D. (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun. 79, 166.

130. Yoshida,K. y Davis,P. (1977) Biochem.Biophys.Res.Commun. 78, 697.

131. Spaulding,S.W. y Davis,P.J. (1971) Biochim.Biophys.Acta 229, 279.

132. Sufi,S.B., Toccafondi,R.S., Malan,P.G. y Ekins,R.P. (1973) J.Endocrinol. 58, 41.

133. Sterling,K., Saldonha,V.F., Brenner,M.A. y Milch,P.O. (1974) Nature (London) 250, 661.

134. Dillman,W., Surks,M.I. y Oppenheimer,J.H.(1974) Endocrinology 95, 492.

135. Defer,M., Dastugue,B., Sabatier,M.M., Thomopoulos,P. y Kruh,J. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 67, 995.

136. Oppenheimer,J.H., Schwartz,H.L. y Surks,M.I. (1974) Endocrinology 95, 897.

137. Surks,M.I., Koerner,D., Dillman,W. y Oppenheimer,J.H. (1973) J.Biol.Chem. 248, 7066.

138. De Groot,L.J. y Torresani,J. (1975) Endocrinology 96, 357.

139. Latham,K.R., Ring,J.C., Baxter,J.D. (1976) J.Biol.Chem. 251, 7388.

140. McLeod,K.M. y Baxter,J.D. (1976) J.Biol.Chem. 251, 7380.

141. Blake,C.C.F. y Oatley,S.J. (1977) Nature 268, 115.

142. Samuels,H.H., Tsai,J.S. y Cintron,R. (1973) Science 181, 1253.

143. Samuels,H.H., Shapiro,L.E. y Tsai,J.S. (1976) 58th. Annual meeting of the Endocrine Society, S.F., California, Abstr. Nº 266.

144. Seo,H., Vassart,G., Brocas,H., Refetoff,S. (1977) Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A. 74, 2054.

145. Geel,S. (1977) Nature 269, 428.

146. Wolff,J. y Wolff,E.C. (1957) Biochim.Biophys.Acta 26, 387.

147. Wolff,J. (1962) J.Biol.Chem. 237, 230.

148. de Mendoza,D. y Farías,R.N. (1977) FEBS Lett. 84, 199.

149. de Mendoza,D, Moreno,H. y Farías,R.N. (1978) J.Biol.Chem. 253, 6255.

150. Fernández-Pol,J.A. y Hays,M.T. (1975) Acta Endocrinologica 79,66.

151. Levey,G.S. y Epstein,S.E. (1968) Biochem.Biophys.Res.Commun. 33, 990.

152. Levey,G.S. y Epstein,S.E. (1969) J.Clin.Invest. 48, 1663.

153. Casillas,F.R. y Hoskins,D.D. (1970) Biochem.Biophys.Res.Commun. 40, 255.

154. Friedman,Y. Lang,M. y Burke,G. (1977) Endocrinology 101, 858.

155. Takasu,N., Sato,S., Tsukui,T., Yamada,T., Furihata,R. y Makiuchi, M. (1974) J.Clin.Endocrin.Metab. 39, 772.

156. Gafni,M., Sirkis,N. y Gross,J. (1975)Endocrinology 97, 1256.

157. Van Sande,J., Grenier,G., Willems,C. y Dumont,J.E. (1975) Endocrinology 96, 781.

158. Mandel,R.R. y Kuehl,Jr.,F.A. (1967) Biochem.Biophys.Res.Commun. 28, 13.

159. Marcus,R. (1975) Endocrinology 96, 400.

160. Van Inwegen,R.G., Robinson,A., Thompson,J.W., Armstrong,K.J. y Stouffer,J.E. (1975) J.Biol.Chem. 250, 2452.

161. Nagasaka,A. e Hidaka,H. (1976) Biochim.Biophys.Acta 438, 449.

162. Ishikawa,Y. y Newcombe,D. (1976) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 152, 105.

163. Gibson,K., Tichonicky,L. y Kruh,J. (1975) Mol.Cell.Biochem. 9,79.

164. Krishna,G., Hynie,S. y Brodie,B.B. (1968) Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 59, 884.

165. Bourne,H., Pauk,G. y Krishna,G. (1968) Fed.Proc., Fed.Am.Soc.Exp. Biol. U.S.A. 27, 353.

166. Williams,L.T., Lefkowitz,R.J., Watanabe,A.M., Hataway,D.R. y Besch,Jr.,H.R. (1977) J.Biol.Chem. 252, 2787.

167. Goodman,H.M. y Bray,G.A. (1966) Am.J.Physiol. 210, 1053.

168. Walsh,D.A., Perkins,J.P. y Krebs,E.G. (1968) J.Biol.Chem. 243, 3763.

169. Brostrom,C.O., Corbin,J.D., Kurg,D.A. y Krebs,E.G. (1971) Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A. 68, 2444.

170. Villar-Palasi,C. y Schlender,K.K. (1970) Fed.Proc. 29, 938.

171. Téllez-Iñón,M.T., Terenzi,H.F. y Torres,H.N. (1969) Biochim. Biophys.Acta 191, 768.

172. Téllez-Iñón,M.T. y Torres,H.N. (1970) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 66, 459.

173. Flawiá,M.M., Téllez-Iñon,M.T. y Torres,H.N. (1972) Biochemistry of the Glycoside Linkage, editado por H.G.Pontis y R.Piras, pp. 541-571, Academic Press, New York.

174. Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1972) J.Biol.Chem. 247, 6880.

175. Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1972) Biochim.Biophys.Acta 289, 428.

176. Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 69, 2870.

177. Téllez-Iñón,M.T. y Torres,H.N. (1973) Biochim.Biophys.Acta 297, 399.

178. Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1973) FEBS Lett. 30, 74.

179. Terenzi,H.F., Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1974) Biochem.Biophys. Res.Commun. 58, 990.

180. Terenzi,H.F., Flawiá,M.M., Téllez-Iñón,M.T. y Torres,H.N. (1976) J.Bacteriol. 126, 91.

181. Judewicz,N.D. y Torres,H.N. (1979) FEBS Lett. 107, 160.

182. Judewicz,N.D., Glikin,G.C. y Torres,H.N. (1980) Arch.Biochem. Biophys. (en prensa).

183. Greenless,A.W. y Symons,R.H. (1966)Biochim.Biophys.Acta 119, 241.

184. Reeve,A.E. y Huang,R.C. (1979) Nucl.Ac.Res. 6, 81.

185. Vogel,H.J. (1956) Microbiol.Genet.Bull. 13, 4243.

186. Winter,A., Perelmutter,H. y Davies,H. (1975) Application Note 198, LKB, Suecia.

187. Clarke,S. (1975) J.Biol.Chem. 250, 5459.

188. Meunier,J.C., Olsen,R.W. y Changeux,J.P. (1972)FEBS Lett. 24, 63.

189. Edelstein,S.J. y Schachman,H.K. (1967) J.Biol.Chem. 242, 306.

190. Martin,R.G. y Ames,B.N. (1961) J.Biol.Chem. 236, 1372.

191. Haga,T., Haga,K. y Gilman,A.G. (1977)J.Biol.Chem. 252, 5776.

192. Laemmli,V.K. (1970) Nature (London) 227, 680.

193. Davis,B.J. (1964) Ann.N.Y.Acad.Sci 121, 404.

194. Rodbell,M. (1967) J.Biol.Chem. 242, 5744.

195. Salomon,Y. Londos,C. y Rodbell,M. (1974) Anal.Biochem. 58, 541.

196. Bray,C. (1960) Anal.Biochem. 1, 279.

197. Frandsen,E.K. y Krishna,G. (1976) Life Sci. 18, 529.

198. Steiner,A.L., Parker,C.W. y Kipnis,D.M. (1972) J.Biol.Chem. 247, 1106.

199. Steiner,A.L. (1974) Methods Enzymol. 38, 96.

200. Scatchard,G. (1949) Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660.

201. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. y Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265.

202. Burton,K. (1968) Methods Enzymol. 12 B, 163.

203. Worthington Enzyme Manual (1972), Worthington Biochemical Corporation, pp. 7-12, Free-hold.

204. Terenzi,H.F., Roselino,E. y Passeron,S. (1971) Eur.J.Biochem. 18, 342.

205. Fairbanks,G., Steck,T.L. y Wallach,D.F.H. (1971) Biochemistry 10, 2606.

206. Randerath,K. y Randerath,E. (1967)Methods.Enzymol. 12 A, 323.

207. Paladini,A.C. y Leloir,L.F. (1952) Biochem.J. 51, 426.

208. Gordon,A.H. (1975) "Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels" T.S.Work y E.Work eds., North Holland/American Elsevier, Amsterdam.

209. Lineweaver,H. y Burk,D. (1938) J.Amer.Chem.Soc. 56, 658.

210. Hefco,E., Krulich,L., Illner,P. y Larsen,P.R. (1975) Endocrinology 97, 1185.

211. Lin,M.C., Salomon,Y., Rendell,M. y Rodbell,M. (1975) J.Biol.Chem. 250, 4246.

212. Cantore,M.L., Galvagno,M.A. y Passeron,S. (1980) Arch.Biochem. Biophys. 199, 312.

213. Lopez Gomez,S., Menucci,L. y Da Costa Maia,J.C. (1978) Biochim. Biophys.Acta 541, 190.

214. Varimo,K. y Londesborough,J. (1976) Biochem.J. 159, 363.

215. Franco da Silveira,J., Zingales,B. y Colli,W. (1977) Biochim. Biophys.Acta 481, 722.

216. Neer,E.J. (1974) J.Biol.Chem. 249, 6527.

217. Neer,E.J. (1978) J.Biol.Chem. 253, 1498.

218. Stengel,D. y Hanoune,J. (1980) Eur.J.Biochem. 102, 21.

219. Takai,K., Kurashina,Y., Suzuki-Hori,C., Okamoto,H. y Hayaishi,O. (1974) J.Biol.Chem. 249, 1965.

220. Stellwagen,E. y Baker,B. (1976) Nature 261, 719.

221. Homcy,C., Wrenn,S. y Haber,E. (1978) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.75, 59.

222. Northup,J.K., Renart,M.F., Grove,J.R. y Mansour,T.E. (1979) J.Biol.Chem. 254, 11861.

223. Swizlocki,N.I., Magnuson,T. y Tierney,J. (1977) Arch.Biochem. Biophys.179, 157.

224. Obregon,M.J., Morreale de Escobar,G. y Escobar del Rey,F. (1978) Endocrinology 103, 2145.

225. Blobel,G. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 77, 1496.

226. Blobel,G. y Dobbenstein,J.(1975) J.Cell.Biol. 67, 835.

227. Wickner,W. (1979) Annu.Rev.Biochem. 48, 23.

228. Kassis,S. y Kindler,S.H. (1975)Biochim.Biophys.Acta 391, 513.

229. Ide,M. (1971) Arch.Biochem.Biophys. 144, 262.

230. Kornblihtt,A.R., Flawiá,M.M. y Torres,H.N. (1978) Rev.de Micr. Elect. 5, 80.

231. Flawiá,M.M., Kornblihtt,A.R., de Mendoza,D. y Torres,H.N. (1980) Mol.Cell.Biochem., en prensa.

232. Flawiá,M.M., Kornblihtt,A.R., de Mendoza,D., Glikin,G.C. y Torres,H.N. (1979) Fed.Proc. 38, 317.