



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**“Catepsina B y Diferenciación del
Epitelio Germinal Testicular”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ANA MARIA MARTINEZ ARRIETA

Los Reyes Iztacala, Edo. de Méx.

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Sino luchamos por lograr nuestros
objetivos, no tendria sentido nuestra vida.
Porque creer en si mismos y en los demás
es lo mas extraordinario de la vida.

A mis padres:

Por haberme dado la vida, por el cariño y
apoyo brindado.

A mis hermanos:

Chela, Laura, Luisa, Silvia, Salvador,
Georgina y Adriana.

Por haber confiado en mi y por todo su apoyo.

A mis sobrinos:

Daniel, Mónica, Leticia, Hugo, Mauricio,
Liliana, Alejandra, Karina, Mariana, Karen,
Cesar, Jessica y Lisette.

esperando que este trabajo los aliente para
lograr todas sus metas.

A DIOS :

por permitirme estar aquí.

A Carmen. Claudia, Marisa, Alejandro y Sergio,
por haberme apoyado cuando lo necesite, por compartir
conmigo mis alegrías y tristezas.

A todas aquellas personas que aportaron su
conocimiento y tiempo para mi formación académica y
que confiaron en mí.

Agradecimientos:

De manera especial a FLAG por su apoyo tanto económico como moral.

A todas aquellas personas que contribuyeron a la realización de este trabajo mediante la donación de reactivos , en especial al Dr. Benitez Bibriesca jefe de la Unidad de Invest. Clin. en Enfermedades Oncológicas del IMSS , y a todas aquellas personas que participaron de la misma manera, evitando el mencionarlos por temor a omitir a alguien.

Al Ing. José Luis Romo del DGETA de la SEP, por las facilidades prestadas para la elaboración del manuscrito final.

A la Sra. Mónica A. por su ayuda en el mecanografiado inicial de este manuscrito y por toda su paciencia

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, bajo el asesoramiento de la M. en C. Raquel Trejo Albarrán.

CONTENIDO

	pp.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCION	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS	33
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFIA	60
APENDICE I	69
APENDICE II	81

ABREVIATURAS

H.T.	Homogeneizado total
MEM	Medio mínimo esencial de EAGLE
4 MeOBNA	4-Metoxi-B-naftilamina
N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA	N α -Carbobenciloxi-arginina-arginina-4-metoxi-B-naftilamida.
N α -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA	N α -Carbobenciloxi-alanina-arginina-arginina-4-metoxi-B-naftilamida
HEPES	N-Hidroxietilpiperazina-N'2-Ácido etanosulfónico.
DTT	Ditiotreitol
HCl	Acido clorhídrico
EDTA	Sal tetrasódica del ácido etilén diamino tetrácetico
E-64	Trans-epoxisuccinil-leucido-amido (4-guanidino) butano
ATPasa-Ca ⁺⁺	ATPasa dependiente de Calcio
BSA	Albúmina sérica bovina.
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanomoles
km	Constante de Michaelis
Vmax	Velocidad máxima
NaOH	Hidróxido de sodio
DMSO	Dimetil sulfóxido
MES	Morfolino-(tetrahidro-2H-1,4 Oxazina) ácido etanosulfónico.
DPBS	Solución salina de Dulbeco
SN	Sobrenadante

RESUMEN

Se determinó la actividad de catepsina B del testículo de rata desde el nacimiento hasta los 60 días, tomando como fuente enzimática el homogeneizado total de este órgano y poblaciones de células germinales aisladas representativas de la primera división meiótica y algunas etapas de la diferenciación de las espermátides a espermatozoides.

Para medir dicha actividad se utilizaron dos sustratos sintéticos $N\alpha$ -CBZ-ala-arg-arg-4MeOBNA y $N\alpha$ -CBZ-arg-arg-4MeOBNA que no pueden ser hidrolizados por exopeptidasas, ya que el residuo amino terminal está bloqueado por el grupo carbobenciloxi (CBZ) y el carboxilo por el grupo 4 metoxi-B-naftilamina (4MeOBNA) que impiden la acción de amino y carboxipeptidasas respectivamente.

La enzima presentó una afinidad semejante por los dos sustratos sintéticos utilizados, sin embargo el $N\alpha$ -CBZ-arg-arg-4MeOBNA fue hidrolizado a una velocidad 2.5 veces mayor.

Se estudió la dependencia de la actividad proteolítica a la adición de compuestos que protegen grupos sulfhidrilo (SH) como el DTT y reactivos alquilantes de estos grupos como la iodoacetamida que los inactivan. La adición de DTT al medio de incubación, provocó un aumento de la actividad proteolítica. La iodoacetamida inhibió totalmente la actividad a una concentración 5 mM.

Se analizó la distribución subcelular de la enzima en el testículo inmaduro de ratas de 15 días de edad, debido a que los niveles más altos de actividad se presentaron en esta etapa de diferenciación. La actividad se asoció a la fracción mitocondrial-lisosomal. Mediante el esquema de centrifugación utilizado se detectaron dos poblaciones lisosomales de diferente densidad y contenido enzimático.

Al utilizar el homogeneizado total como fuente enzimática se observó que la actividad proteolítica se mantuvo constante durante el desarrollo testicular, pero cuando la actividad enzimática se determinó en células germinales dispersas de ratas de 15, 21 y 38 días de edad se observó una mayor actividad a 15 días de edad y un descenso progresivo a los 21 y 38 días .

Para definir si la actividad de catepsina B se asociaba a estadios específicos de diferenciación se determinó la actividad de esta enzima en poblaciones celulares enriquecidas en espermatoцитos primarios leptótenos (60%), espermatoцитos primarios paquítenos (85%), espermátides (75%) y espermatozoides (100%). Se observó que el nivel más alto de catepsina B estuvo asociado a los espermatoцитos primarios en estadio de paquíteno, seguido por el de las espermátides y alcanzando el nivel más bajo en los espermatozoides.

Para descartar la participación de otras enzimas proteolíticas en la hidrólisis de los sustratos empleados se adicionó el inhibidor de tripsina de soya y se determinó la actividad enzimática usando como sustrato $N\alpha$ -CBZ-ala-arg-arg-4MeOBna . Se observó que en su presencia la hidrólisis del

sustrato se inhibió en porcentajes variables dependiendo de la población celular estudiada.

La inhibición total de la actividad proteolítica usando como sustrato N α -CBZ-arg-arg-4MeOBNA se obtuvo en presencia de 30 μ M de E64, inhibidor específico de catepsina B que reacciona con la cisteína del sitio catalítico.

Se confirmó que el testículo de rata posee actividad proteolítica de catepsina B y que esta actividad se asocia principalmente a espermátocitos en estadio paquiteno y a las espermátides.

INTRODUCCION

El mantenimiento de estructuras bien diferenciadas en un organismo requiere del balance entre la síntesis y la degradación de las moléculas complejas que lo integran.

Las proteínas constituyen un elemento funcional-estructural de suma importancia cuyo recambio es altamente selectivo y se refleja en una vida media diferente para cada proteína (Herhsko y Ciechanover, 1982). El catabolismo de las proteínas puede ser realizado por la acción conjunta de varias proteasas, con diferentes requerimientos y sitio de acción.

Las proteasas pueden dividirse en dos grandes grupos:

A. Exopeptidasas, si actúan en los extremos de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Pueden ser carboxipeptidasas y aminopeptidasas.

B. Endopeptidasas cuando hidrolizan los enlaces peptídicos internos en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Las proteasas también pueden ser clasificadas en 4 grupos de acuerdo con el aminoácido que participa en la catálisis enzimática:

1. Las serino proteasas, poseen serina en el sitio activo que durante la catálisis queda covalentemente unida al sustrato. Su pH óptimo cae en el rango de 7 a 9.

2. Las tiol proteasas poseen cisteína en el sitio activo, éste participa en la formación del enlace covalente entre la enzima y el sustrato. Su pH óptimo está entre 3 y 8.

3. Las asparto proteasas presentan dos residuos de ácido aspártico en el sitio catalítico y su pH óptimo está entre 2 y 7. La reacción enzimática se realiza a través de una catálisis ácido-base.

4. Las metaloproteasas poseen zinc en el sitio activo el que induce un aumento en la polarización del enlace peptídico que va a ser hidrolizado por ataque nucleofílico. El pH óptimo está entre 7 y 9.

La tabla I resume las características de cada uno de estos cuatro tipos de proteasas y señala las enzimas que los integran.

Es muy importante señalar que aunque se ha demostrado la presencia de proteasas en todos los compartimentos celulares, en la mayoría de los casos no se ha identificado el sustrato normal, ni el estímulo que inicia la proteólisis o las proteasas involucradas en el procesamiento de proteínas con funciones específicas, sin embargo, podemos distinguir dos caminos para el catabolismo de las proteínas y que tienen distinta importancia fisiológica: el lisosomal y el citosólico.

Las proteasas lisosomales participan en la degradación total de las proteínas de la dieta y en el mantenimiento de la reserva de aminoácidos de la célula.

CLASE	SITIO CATALITICO	INHIBIDORES	LÓCALIZACION	EJEMPLOS
Serino Proteinasas	Se caracterizan por la presencia de una serina en su sitio activo. El mecanismo catalítico de estas proteasas involucra la unión covalente del sustrato al residuo de serina.	Dilisopropil fluorofosfato (DIFP) Dilisopropil fosfosfluoridato (DipF) Fenilmetanosulfonil Fluoruro de (PMSF) N-p-tosyl-L-lisina-clorometil-cetona (TLCK) leupeptina (N-propionil leucil-leucil-OL arginal)	A) Algunas de estas proteasas se localizan en estructuras específicas o en gránulos secretores de ciertos tipos celulares. B) También existe un grupo que actúa como componente estructural de la célula.	-Acrosina (espermatozoide) -Elastasa (Neutrófilos) -Catepsina G (Plaquetas) -Prolil-endopeptidasa -Proteína de citosol dependiente de ATP -Catepsina B del núcleo y del Retículo endoplásmico
Cistein o tiol proteinasas	Contienen en su sitio activo un residuo de cisteína al que se une por enlace covalente el sustrato.	p-Hidroxímercuribenzoato (PHMB) Iodoacetato Iodoacetamida N-etilmaleimida (NEM) E-64 (trans-epoxy-succinil-leucil-amido (4 guanido) butano Leupeptina Antipaina (11-carboxi-2-fenil-etil)carbamoil-L-arginil-L-valil-arginal)	La mayor parte de estas proteasas se encuentran dentro de la célula en compartimientos como los lisosomas También se encuentran en citosol	Catepsinas B H, L y S -Calpaína -Complejo multicatalítico dependiente-ATP. -Cistein proteínasa -Citosólico dependiente-metal
Proteinasas ácidas	El sitio activo presenta residuos de ácido aspártico y a través de una catálisis ácido base hidroliza al sustrato y son activadas solamente a pH ácido.	Pepstatina	A) En gránulos secretores B) Formando parte de la célula como en los eritrocitos	-Pepsina de jugo intestinal -Quimosina (estómago) -Renina (riñón y plasma) -Catepsina D E
Metalo proteinasas	Contienen (Zn ⁺⁺) en su centro activo como parte integral de su estructura y la hidrólisis del enlace peptídico involucra un ataque nucleofílico. Además pueden ser activadas por Ca ²⁺	Agentes quelantes: EDTA 1, 10-fenantrolina, fosforamidón (ramnosfosfato-leu-trp)	A) Extracelulares B) Intracelulares	-Colagenasas -Gelatinasas -Procógenasas N-proteinasas -Endopeptidasas de la membrana plasmática y de retículo endoplásmico que eliminan la secuencia señal de las proteínas

TABLA I. CLASIFICACION DE LAS PROTEASAS. Para mayor información consultar Barret, 1977 y Bond y Butler, 1987.

Las proteasas citosólicas son dependientes de ATP y están relacionadas con la degradación tanto de proteínas aberrantes como de proteínas normales.

La participación de las proteasas lisosomales fue señalada por Iodice y col. (1976), quienes estudiaron los cambios en contenido de proteínas y de la actividad proteolítica durante la etapa del desarrollo embrionario del músculo pectoral de pollos normales y de pollos distróficos. El contenido de proteínas en los dos grupos fue muy semejante, pero durante la fase de crecimiento posterior a la salida del cascarón, el contenido de proteínas del músculo de pollos distróficos era menor que el del músculo pectoral de los pollos normales.

Este menor contenido de proteínas podía ser debido a una menor síntesis de proteínas o a una mayor degradación. Se encontró que la síntesis de proteínas en ambos casos era similar pero no la autodegradación ya que la autólisis era mayor desde los 14 días en el músculo distrófico, llegando a ser tres veces más alta que la que presentaron los músculos normales a los 2-4 meses de edad.

Esta situación llevó a la determinación de la actividad de las catepsinas A, B, C y D durante la diferenciación del músculo pectoral de pollos normales y distróficos, tanto en la etapa embrionaria del desarrollo como después de la salida del cascarón.

En los animales normales se observó que la actividad de las catepsinas A, C y D durante la fase embrionaria y poco después del nacimiento era mayor que en la edad adulta. Pero a diferencia de las otras tres

catepsinas, la B en los pollos normales, mostró un incremento del 77% en su actividad a los 7 días y del 55% a los 14 días después del nacimiento. Estos cambios en la actividad de las catepsinas explicaba el menor grado de autólisis de las proteínas del músculo normal en la edad adulta y por lo tanto su mayor contenido de proteínas.

En el músculo distrófico se observaron niveles más altos de catepsina A desde la primer semana después de la salida del huevo. Las catepsinas C y D se mantuvieron constantes desde la salida del cascarón hasta el primer mes, en que se observó un incremento significativo de su actividad.

La actividad de catepsina B incrementó dos veces su nivel de actividad después de la salida del cascarón. En el intervalo de los 14 días a un mes de edad, se observaron los niveles más elevados de catepsina B, que coincidió con la elevación en la autólisis y con un menor contenido de proteínas, observados en el primer mes de edad. La participación de la catepsina B en la autólisis del músculo fue reforzada por la participación de las catepsinas C y D en la edad adulta.

Los cambios en el patrón de actividad de las proteasas lisosomales durante el desarrollo normal y patológico del músculo sugirieron que las proteasas podrían participar en la maduración funcional de los tejidos.

Podrían considerarse dos tipos de participación: a) dentro de los mecanismos inductores de diferenciación (Scher, 1987) y b) como indicador de diferenciación de células ricas en lisosomas y/o otras proteasas (Hershko y Ciechanover, 1982).

En apoyo a estas observaciones se encuentran los estudios realizados por Miyamoto y col. (1975), quienes demostraron que la administración de leupeptina y pepstatina, inhibidores de tiol y serino proteasas, bloquean o retrasan la síntesis de DNA y mitosis que preceden a la regeneración hepática, sugiriendo que las catepsinas lisosomales podrían estar involucradas en la regulación de la proliferación celular.

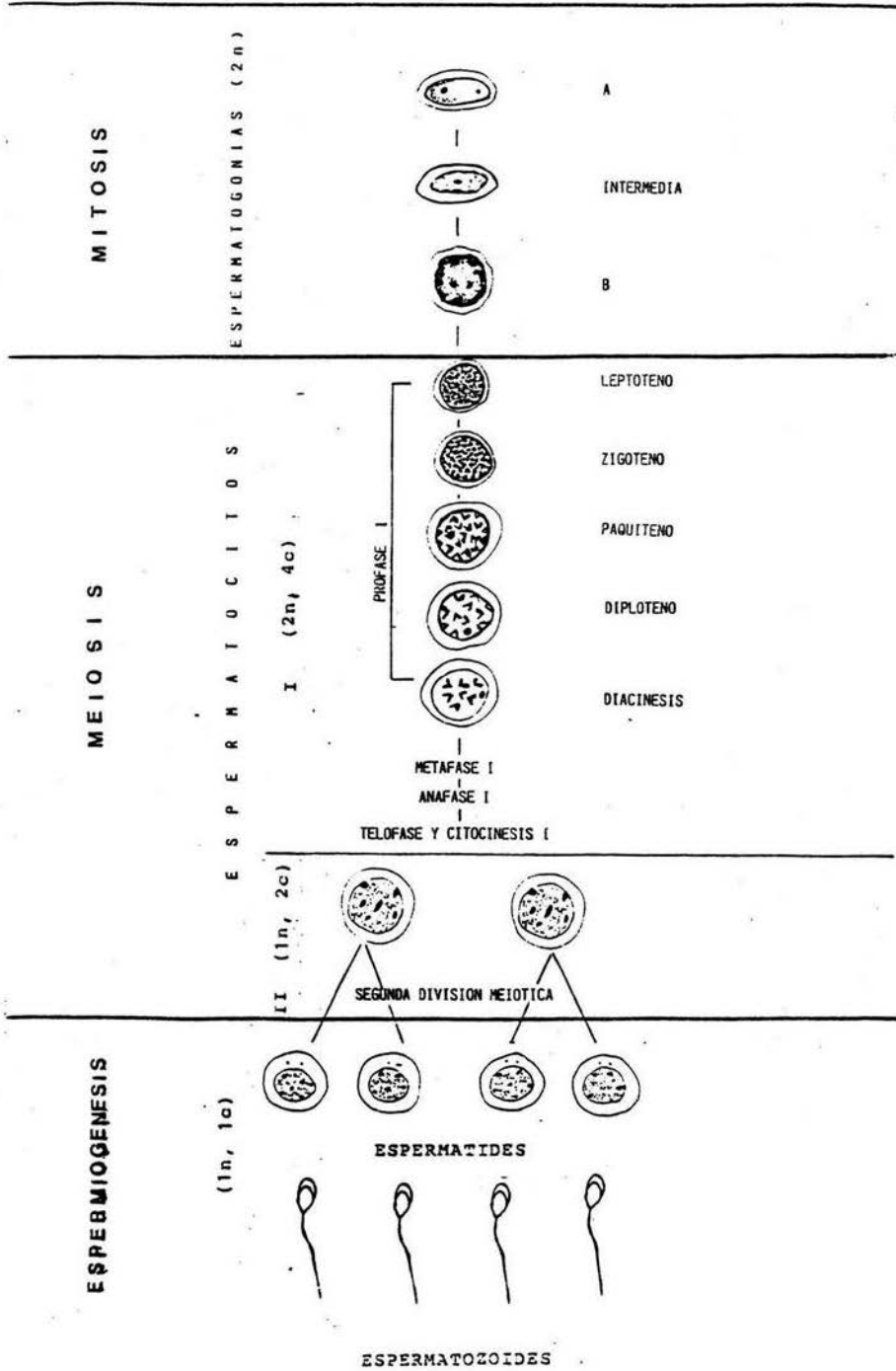
Esta posibilidad ha sido explorada en otros modelos experimentales normales y se ha demostrado que la actividad de catepsina B se encuentra más elevada en monocitos y en líneas celulares mielomonocíticas durante su diferenciación (Morland, 1985).

En pro-monocitos de la línea U937 se ha demostrado que la actividad de catepsina B aumenta en respuesta a la inducción de la diferenciación por un factor de crecimiento, el factor promotor de la formación de colonias de los granulocitos o por adición de un ester de forbol (Ward et al 1990).

Otro de los tejidos normales que puede ser utilizado como modelo experimental para estudiar el papel de las proteasas en la remodelación de tejidos y la diferenciación celular, es el epitelio germinal testicular.

En el epitelio germinal del adulto se distinguen tres tipos de poblaciones celulares: 1) la constituida por células que se dividen por mitosis, las espermatogonias; 2) la población que se divide por meiosis, los espermatocitos y 3) la constituida por células que no se dividen y que se encuentran en diferenciación terminal, las espermátides (Figura 1).

FIGURA 1.-ESPERMATOGENESIS



Morfológicamente pueden distinguirse tres tipos diferentes de espermatogonias: A, intermedias y B, en la rata las primeras en aparecer son las del tipo A al cuarto día del nacimiento, las intermedias y del tipo B aparecen al sexto día (Clermont y Perey, 1952). La maduración de las espermatogonias se realiza por medio de ciclos diferenciación-mitosis.

A partir de las espermatogonias de tipo B se originan los espermatocitos primarios que se multiplicarán por meiosis y aparecen a los 9 y 10 días de edad. La meiosis consta de dos divisiones sucesivas, pero sólo exclusivamente una vez se replica el DNA, justo antes de la primera división meiótica, dando como resultado una célula tetraploide, en cuanto a su contenido de DNA (4c).

Una de las características de la primera división meiótica en el macho es la duración de la profase I que transcurre en 12 días y permite estudiar las características de las células de cada uno de los estadios que lo constituyen. Los espermatocitos primarios en reposo o preleptotenos aparecen a los 10 días, alcanzan el leptoteno a los 12 días y el zigoteno a los 14 días. El paquiteno se alcanza a los 15-16 días y permanece en ese estadio hasta los 21 días en que se alcanza el diploteno. La diacinesis y las siguientes fases de la primera división meiótica se realizan rápidamente.

Después de la primera división meiótica se producen los espermatocitos secundarios que poseen un contenido 2c de DNA pero un número haploide (n) de cromosomas. Estas células tienen una vida media muy corta, ya que la segunda división meiótica se realiza muy rápidamente dando origen a las espermátides.

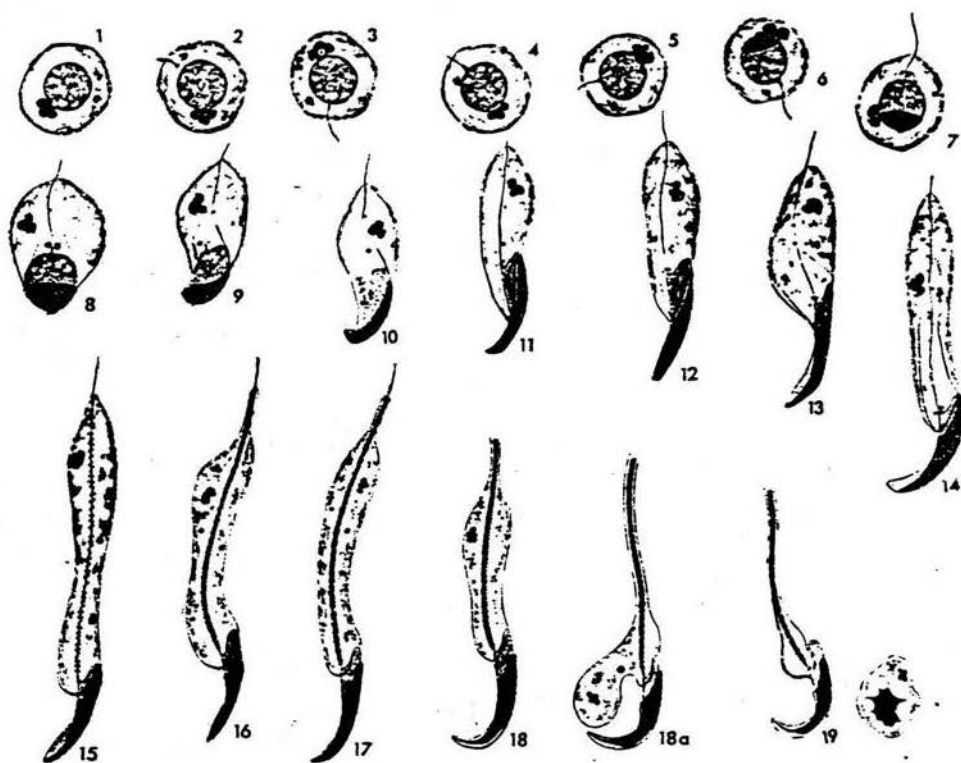
Las espermatides aparecen a los 23 días de edad y son células haploides tanto en contenido de ADN (n) como en número de cromosomas (n), constituyen la población más abundante del epitelio germinal y son células que no se vuelven a dividir. A través de transformaciones metabólicas y morfológicas que en su conjunto se denominan espermiogénesis, las espermatides se diferencian en espermatozoides que aparecen a los 45 días de edad. Este proceso de diferenciación se divide en cuatro fases de acuerdo con las modificaciones que se presentan en el acrosoma (Leblond y Clermont, 1952 y Clermont y Rambourg, 1978). (Figura 2)

La primera se denomina fase de Golgi (estadios 1 a 3) debido a que se observan transformaciones en la zona del aparato de Golgi, ya que a partir de él se elaboran los gránulos proacrosómicos. Estos gránulos proacrosómicos se fusionan y se fijan en un punto de la membrana nuclear, dando lugar al sistema acrosómico. Durante esta etapa también se inicia la polimerización de los elementos que constituirán al flagelo.

Durante la fase de capuchón (estadio 4 a 7) el acrosoma ocupa una superficie cada vez mayor, hasta que bordea la mitad de la superficie nuclear, esto provoca la migración del citoplasma al lado opuesto de la célula.

La fase acrosomal (estadio 8 a 14) se caracteriza porque el desarrollo del acrosoma se completa. El núcleo se alarga y progresivamente toma en la rata, su forma característica de hoz. En esta fase la polaridad de las células es muy clara, ya que, el contenido citoplásmico se acumula como un

FIGURA 2.- ESPERMIOGENESIS



FASE GOLGI: ESTADIOS 1-3
FASE CAPUCHON: ESTADIOS 4-7
FASE ACROSOMAL: ESTADIOS 8-14
FASE MADURACION: ESTADIOS 15-19

pequeño lóbulo en la zona caudal. Ocurren durante esta fase también numerosas modificaciones en la organización de los organelos citoplásmicos.

En la última fase denominada de maduración (estadios 15 a 19), el acrosoma no sufre más modificaciones, sin embargo continúa la reducción del contenido citoplásmico, el cual es eliminado como el cuerpo residual quedando una "gota citoplásmica" que se pierde durante la maduración epididimaria. La aparición de los espermatozoides o estadio 19 de la espermiogénesis indica el final de esta etapa.

Para poder determinar qué mecanismos moleculares son los encargados de controlar la maduración del epitelio germinal es necesario definir los procesos de diferenciación en términos de cambios bioquímicos que caracterizen las transiciones que ocurren durante este proceso.

Durante la diferenciación de las espermátides a espermatozoides una gran parte del citoplasma es eliminado como una gota citoplásmica y se ha propuesto que ésta es fagocitada por las células de Sertoli. Hasta el momento no se conocen los mecanismos que regulan la selección de los componentes celulares que deben conservarse y cuales deben ser eliminados. Tampoco se ha definido si las células germinales utilizan alguna de las dos vías proteolíticas, la lisosomal y la citosólica, en la degradación de estos componentes citoplásmicos.

Se han encontrado enzimas proteolíticas asociadas al esperma o al plasma seminal como la acrosina, proteasa acrosomal que está involucrada con la degradación de las proteínas de la zona pelúcida del óvulo durante la fertilización.

Allison y Hartree (1970) fueron los primeros en sugerir que el acrosoma también poseía actividad de catepsinas, proteasas ácidas de origen lisosomal que podrían participar en la digestión de macromoléculas y en la activación e inactivación de otras enzimas, ya que observaron una actividad proteolítica asociada a valores de pH ácidos que diferían del pH básico óptimo para la acrosina.

La catepsina B fue originalmente descrita en el bazo como la enzima capaz de desamidar a la benzoil-arginil-amida, sustrato sintético de la tripsina, pero en presencia de cisteína (Tallan, Jones y Fruton, 1952; Greenbaum y Fruton, 1957). Posteriormente se estableció que este sustrato podía ser hidrolizado por proteínas de pesos moleculares de 52 000 y 26 000, catepsina B2 y B1 respectivamente (Barret, 1977). Posteriormente se demostró que la catepsina B2 era una carboxipeptidasa lisosomal y se decidió que la catepsina B1 cambiara su nombre a catepsina B.

Otto (1971) y Distelmaier y col. (1972) realizaron un estudio comparativo de la actividad y de las concentraciones de esta enzima en diferentes tejidos de la rata, utilizando sustratos sintéticos, Na-Benzoil-L-argininamida (BAA), Na-Benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPA), Na-Benzoil-L-arginina-b-naftilamida (BANA) y Na-Benzoil-L-arginina-etilester(BAEE). Observaron que el peso molecular de la enzima responsable de la actividad proteolítica y su nivel de actividad eran variables dependiendo del tejido de donde se obtenía. En el caso del testículo se encontró que la actividad proteolítica se recuperaba en una proteína de peso molecular de 37 000 y su nivel de actividad era menor a la del hígado y riñón.

Debido a que los sustratos empleados por estos autores podían ser hidrolizados también por tripsina o enzimas semejantes a ella, como la acrosina presente en los espermatozoides del testículo adulto, y habiendo encontrado una discrepancia en el peso molecular de la enzima llevaron a plantear que la presencia de catepsina B debía ser reanalizada.

También es muy importante considerar que la actividad proteolítica testicular debe ser un proceso altamente regulado, ya que la síntesis de proteínas se efectúa principalmente en las etapas tempranas de la diferenciación. Se ha observado que en las espermatogonias, la síntesis de proteínas nucleares y citoplásmicas varía dependiendo del tipo, encontrándose que es mayor en las espermatogonias del tipo A e intermedias comparadas con las del tipo B (Monesi, 1965). En los espermatoцитos primarios, la síntesis de proteínas nucleares y citoplásmicas se presenta en todos los estadios del ciclo meiótico, pero se presenta una mayor actividad de síntesis en el estadio paquíteno seguido de un declive gradual. Durante la espermiogénesis la síntesis de proteínas se realiza a un nivel muy bajo durante los estadios 1 a 11 llegando a un valor cercano a cero a partir del estadio 16.

Esta disminución en la síntesis de proteínas va acompañada con cambios morfológicos y estructurales muy dramáticos durante la maduración final de las espermatides.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que las proteasas participan en la remodelación de tejidos durante el desarrollo (Iodice et al 1972).

En el caso de la diferenciación del epitelio germinal tradicionalmente se ha considerado que los componentes citoplásmicos que desaparecen durante la diferenciación de las espermatídes son eliminados de las células como una "gota citoplásmica" que es fagocitada por las células de Sertoli. No se conoce si la propia célula germinal podría contribuir en la degradación selectiva de los elementos que deben ser eliminados como parte de la reorganización y reducción de los organelos intracelulares, específicamente los cambios producidos en el retículo endoplásmico durante las etapas iniciales de la diferenciación de las espermatídes, así como su violenta desaparición al finalizar esta etapa (Clermont y Rambourg, 1978), sin dejar de considerar que la formación del acrosoma mismo es equivalente a la formación de un gran lisosoma, en el que se encuentran otras proteasas. La participación de las diferentes proteasas que pudieran estar presentes en las células germinales sería decisiva en la diferenciación bioquímica y morfológica de las células del epitelio germinal.

La catepsina B es una de las proteasas lisosomales involucradas en la degradación de proteínas citosólicas (Dean, 1976) cuya actividad se eleva en respuesta a factores de crecimiento o de agentes que inducen la diferenciación en algunas líneas celulares normales *in vitro* (Ward, et al 1990).

El epitelio germinal testicular puede ser considerado como un excelente modelo experimental para estudiar la relación entre la actividad proteolítica de la catepsina B y la proliferación y diferenciación celular normales.

Aunque la catepsina B fue aislada de testículo adulto por Otto en 1971, no se ha determinado si esta enzima está presente en las células germinales y si pudiera participar en los fenómenos de eliminación del material citoplásmico que se lleva a cabo durante la diferenciación de las espermatides.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son :

- Estudiar la evolución de la actividad proteolítica de la catepsina B en las fases de proliferación y diferenciación del epitelio germinal de rata.
- Analizar la actividad de esta enzima en poblaciones celulares enriquecidas y en células en estadios de diferenciación definidos.
- Caracterizar a la catepsina B en el testículo de rata.

MATERIAL Y METODOS

I.- REACTIVOS

Sacarosa	Merck
HEPES (N-2-Hidroxietilpiperazina N'-2-ácido etanosulfónico)	Sigma Chemicals, Co.
MEM (Medio mínimo esencial de Eagle)	Gibco Laboratories
Colagenasa	Sigma Chemicals, Co.
Dextran T-500	Pharmacia Fine Chemicals
N α -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNaftilamida (Sales de acetato)	Sigma Chemicals, Co.
N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOB Naftilamida	Sigma Chemicals, Co.
Acetato de sodio	Carlo Erba
Fosfato de sodio (monobásico)	Baker Analyzed
Citrato de sodio	Baker Analyzed
DTT (Ditiotreitol)	Sigma Chemicals, Co.
TRIS (Hidroximetil amino metano)	Sigma Chemicals, Co.
MgCl ₂ (Cloruro de magnesio)	Merck
EDTA (Sal tetrasódica del ácido etilen diamino tetracético)	Eastman Organic Chemistry
Iodoacetamida (cristalina)	Sigma Chemicals, Co.
Leupeptina	Sigma Chemicals, Co.
E-64 (Trans-epoxy-succinil-L- leucilamido-4-(guanidino) butano)	Sigma Chemicals, Co.
BSA (Fracción V) (Albúmina sérica bovina)	Sigma Chemicals, Co.
DMSO (Dimetil sulfóxido)	Sigma Chemicals, Co.
MES (Morfolino (tetrahidro, 2H- 1,4-oxazina) Ácido etanosulfóni- co	Sigma Chemicals, Co.

II.- ANIMALES

Se utilizaron ratas macho albinas de la cepa Sprague Dawley, proporcionadas por el bioterio del Centro Médico Nacional, Siglo XXI. alimentadas con purina y agua ad libitum.

III.- PROCEDIMIENTOS

A. OBTENCION DE HOMOGENEIZADOS TOTALES DE TESTICULO DE RATA.

La fuente enzimática la constituyó el testículo de la rata en diferentes etapas de maduración del epitelio germinal, correspondientes a:

a) Proliferación y diferenciación de las espermatogonias (5-10 días de edad).

b) Diferenciación de los espermatoцитos primarios (15, 20 y 25 días de edad).

c) Diferenciación de las espermátidas y aparición de los espermatozoides (30, 35, 40 y 45, 50 y 60 días edad).

El número de animales varió de 2 a 5 dependiendo de la edad y peso de los testículos. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitados para desanjarlos lo más posible.

Los testículos fueron expuestos haciendo una incisión en la parte inferior del abdomen, se extrajeron y recibieron en solución salina isotónica amortiguada con HEPES 20 mM pH 7.2 previamente enfriada en hielo. A partir de este momento todo el procesamiento del tejido se realizó en cuarto frío (4°C) o en hielo.

El peso del tejido testicular, libre de la túnica albugínea y de la arteria espermática, fue determinado después de dos lavados con solución salina. El exceso de líquido, fue eliminado secando suavemente cada

testículo con papel filtro Whatman y colocándolo en un vaso de precipitados previamente tarado que contenía de 1 a 5 ml del medio para homogeneización:

Sacarosa 0.25M, Hepes 20 mM pH 7.4

El tejido, en el seno del líquido, fue picado finamente con tijeras y se colocó en un homogeneizador de vidrio tipo Potter Elvehjem provisto con pistón de teflón y se adicionó el volumen necesario del medio para lograr una concentración final de tejido del 10% (p/v), es decir se adicionaron 9 ml del medio por cada gramo de peso húmedo.

Debido a que se deseaba determinar la actividad enzimática total de catepsina B, el homogeneizado fue lo más drástico posible (20 golpes) para liberar a la enzima contenida en los organelos intracelulares.

Todas las preparaciones obtenidas fueron divididas en alícuotas de 1 ml y almacenadas a -70°C hasta realizar el ensayo enzimático. Se separaron alícuotas de 200 μl de cada homogeneizado para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado por Hartree (1972).

B. DISPERSION Y PURIFICACION DE LAS CELULAS DEL EPITELIO

GERMINAL TESTICULAR.

La obtención de las poblaciones celulares se basó en la aparición cronológicamente definida de los distintos tipos celulares en el epitelio germinal siguiendo la técnica desarrollada por Alemán y colaboradores (1978), utilizando material y soluciones esterilizadas.

Se utilizaron ratas de 15 días de edad para obtener espermátocitos primarios en estadios tempranos de la meiosis, leptoteno y zigoteno principalmente. A partir de testículo de rata de 21 días de edad se aislaron a los espermátocitos primarios en estadio de paquiteno tardío. Las espermátides en fase acrosomal fueron obtenidas de testículo de rata de 38 días de edad.

Las ratas fueron sacrificadas en lotes de 12-25 animales por dislocación cervical. Se obtuvieron los testículos y se colocaron en solución salina estéril a temperatura ambiente, se les quitó la túnica albugínea y los vasos sanguíneos antes de pesarse. Posteriormente se colocaron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) estéril. El tejido se picó finamente con unas tijeras pequeñas en el seno del medio hasta lograr una suspensión homogénea. Esta se centrifugó a 92 xg por 10 min con el fin de eliminar los eritrocitos contaminantes, que fueron colectados por aspiración con pipeta Pasteur. La pastilla celular se resuspendió con MEM y se le adicionó una solución de colagenasa (8 mg/g tejido) disuelta en MEM en un volumen igual al doble del peso del tejido. Se incubó a 32° C durante 10 min con agitación de 60 rpm.

La acción de la colagenasa fue detenida mediante la adición de 3 volúmenes más de MEM con respecto al volumen original. El tejido fue resuspendido suavemente con una pipeta Pasteur para disgregar los gránulos grandes. Posteriormente el tejido se dejó sedimentar y se filtró el sobrenadante a través de una malla de nylon y dos de seda. El sobrenadante filtrado se centrifugó a 257 x g durante 5 min. El botón se resuspendió

nuevamente con 5 ml de MEM. De esta suspensión celular total se tomaron alicuotas para determinar la actividad enzimática y proteínas.

Para la purificación de las células en el estadio de maduración deseado, la suspensión de células dispersas totales se sometió a centrifugación a 60 000 x g por 20 min. en gradientes discontinuos de Dextran T500/MEM al 7.0, 8.6, 11, 13.3 y 16% (p/p) usando el rotor SW 25.1

La formación de los gradientes se llevó a cabo con 5 ml de la solución al 16%, 6.5 ml de la solución al 8.6, 11 y 13.3% y 6 ml. de la solución al 7% sobre la cual se adicionaron 1-2 ml de la suspensión celular (Ver apéndice 1).

Después de la centrifugación se recuperaron, por separado, las células que quedaron en cada interfase. Se adicionó MEM hasta tener volumen de 50 ml y se resuspendieron cuidadosamente.

Las células se recuperaron por centrifugación a 482 x g durante 20 min. El botón así obtenido se resuspendió con un ml de MEM y se lavó y resuspendió con solución salina de Dulbeco previamente esterilizada. De cada suspensión se tomaron alicuotas de 200 ul, se fijaron con 200 ul de formaldehído al 3% durante toda la noche, y se tiñeron con PAS-hematoxilina. La composición de cada población celular fue determinada basándose en las descripciones de Leblond y Clermont (1952).

Para la obtención de espermatozoides se utilizaron ratas adultas de 90 días de edad. En este caso, exclusivamente se utilizó éter para anestasiarlas y posteriormente se practicó la dislocación cervical. El

abdomen se limpió con benzal diluido 1 a 500 y se cortó la pared abdominal para lograr la exposición de los testículos. El epidídimo se separó cuidadosamente y se ligó a la altura del conducto deferente con hilo de sutura doble cero. Una vez hecho esto se cortó el conducto y se colocaron los testículos con el epidídimo en solución DPBS estéril a temperatura ambiente.

Posteriormente el epidídimo se separó de los testículos, obteniéndolo completo cabeza, cuerpo y cauda. La capa sérica que lo recubre fue eliminada con la ayuda de unas pinzas pequeñas. Los espermatozoides fueron obtenidos por flujo retrógrado como se describe a continuación. A la altura del conducto deferente y lo más cercano posible al sitio de la ligadura, se inyectaron de 2 a 5 ml de DPBS estéril hasta que la solución alcanzara la región de la cauda e hinchara el conducto. En este momento se practicó una incisión en esa región y los espermatozoides localizados tanto en el conducto deferente como en la cauda fueron recuperados en un tubo de fondo cónico estéril. Se adicionó más solución hasta completar 50 ml. se resuspendió cuidadosamente y centrifugó a $4,113 \times g$ por 10 min, 2 veces. El botón se resuspendió con la solución salina, se tomaron alicuotas para determinar la actividad enzimática y proteínas, se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a $-70^{\circ} C$.

C. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CATEPSINA B

La determinación de la actividad proteolítica, se llevó a cabo mediante análisis fluorométrico, usando los sustratos sintéticos $N\alpha$ -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOEtNa y $N\alpha$ -CBZ-Arg-Arg-4-MeOEtNaftilamida introducidos por Smith y Van Frank (1975).

Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Inicialmente se usó la mezcla de reacción propuesta por Szego y col. (1976) con amortiguador de fosfato de sodio 20 mM-citrato de sodio 20 mM pH 5.4, ditioneitol (DTT) 5 mM y una concentración final de sustrato de 250 μ M y 40 μ g de proteína en un volumen total de 1 ml. Los resultados obtenidos apoyaron que el amortiguador del medio de incubación se sustituyera posteriormente por MES 40 mM pH 5.4. La reacción se inició por la adición del sustrato e incubación a 37°C.

La reacción se detuvo por la adición de 0.5 ml de HCl 1N frío y el volumen se ajustó a 3 ml con agua destilada y desionizada.

La actividad enzimática fue cuantificada por la aparición del compuesto fluorescente 4 metoxi-B-naftilamida (4MeOBNA) que es liberado como resultado de la proteólisis. La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Perkin Elmer a una longitud de excitación de 290 nm y 425 nm de emisión. (apéndice II fig.18)

La curva estándar se realizó a partir de una solución patrón de 4 metoxi-B-naftilamina de 100 μ g por mililitro del amortiguador utilizado en el ensayo enzimático. La fluorescencia fue lineal de 5 a 5000 ng, equivalente a 14 picomolas y 14 nanomolas respectivamente y fue medida en presencia de 0.5 ml HCl 1 N en un volumen final de 3 ml (apéndice II fig.19).

La actividad fue referida como nanomoles de 4 metoxi-B- naftilamina producidos por mg de proteína a un tiempo determinado.

D. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA CATEPSINA B EN TESTICULO DE RATA.

La obtención de las diferentes fracciones subcelulares se realizó en dos etapas del desarrollo testicular correspondiente a 15 y 38 días de edad. El número de animales utilizados para obtener suficiente tejido fue de 25 para 15 días y 15 para 38 días.

El sacrificio de los animales y la obtención del tejido testicular se realizó a 4° C como se describió previamente. Con el fin de preservar la integridad de los organelos subcelulares el tejido fue homogeneizado cuidadosamente primero en un homogeneizador Potter Elvehjem de pistón flojo, 4-5 golpes y luego con un homogeneizador de pistón apretado dando 5 golpes más.

El tejido testicular fue homogeneizado con nueve volúmenes de sacarosa 0.25 M HEPES 20 mM pH 7.2 o sacarosa 0.25 M, Tris 0.05 M Mg Cl 5 mM pH 7.2 y se sometió a un esquema de centrifugación diferencial para obtener los diferentes componentes celulares (Fig. 3) La primera centrifugación se realizó a 439 xg durante 10 min, está se realizó dos veces (Pastilla P1).

El SN fue colectado y centrifugado a 1929 x g durante 20 min. para la obtención de la segunda fracción P2. El SN se centrifugó a 9770 x g 30 min. obteniéndose la tercera pastilla P3. El SN obtenido se centrifugó a 20,000 x g durante 40 min y se obtuvo la pastilla P4.

El SN se centrifugó a 164 737 x g durante 60 min en una ultracentrifuga Beckman con un rotor 60 de Titanio y se obtuvo la quinta pastilla P5. El SN se colectó y se dividió en alicuotas de 1 ml. Las

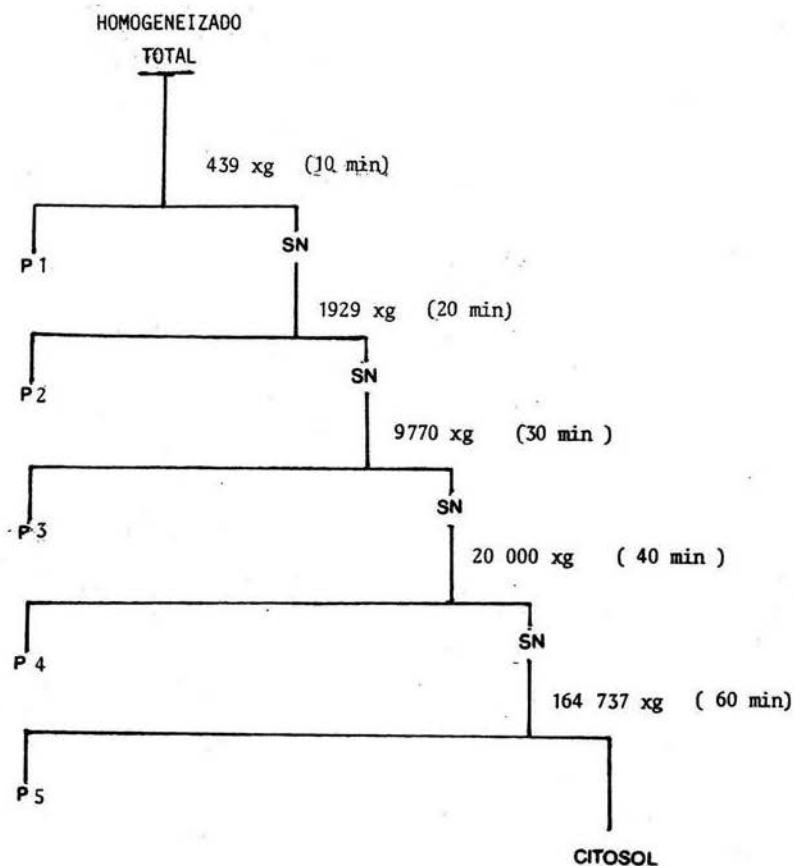


FIGURA 3.- ESQUEMA DE CENTRIFUGACION DIFERENCIAL PARA LA OBTENCION DE LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES. Los testículos de rata de 15 días de edad se homogeneizaron en Sacarosa 250mM- Hapes 20mM pH 7.4. Las fracciones esperadas son P1: núcleos y fragmentos de membrana; P2: Mitochondrias ligeras y aparato de Golgi; P3: mitochondrias ligeras y lisosomas; P4: retículo endoplásmico; P5: fracción microsomal.

pastillas obtenidas F1-P5 se resuspendieron con el medio de homogeneización, se dividieron en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C hasta el momento de llevar a cabo el análisis enzimático.

También se tomaron alícuotas de 200 μ l de cada una de las fracciones obtenidas para la cuantificación de proteínas

E. IDENTIFICACION DE LA PROTEASA RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA MEDIANTE EL USO DE INHIBIDORES.

Para poder determinar si el sustrato era hidrolizado por una proteasa se utilizaron tres tipos de inhibidores.

a) En los homogeneizados totales de testículo de rata obtenidos como se describió previamente en el inciso I se analizó el efecto del inhibidor Iodoacetamida en presencia del amortiguador citrato/fosfato de sodio y el sustrato N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA. Se utilizó una concentración de 5 mM del inhibidor, con una concentración de 20-40 μ g de proteína y 250 μ M de sustrato.

b) Por otra parte se decidió analizar el efecto del inhibidor de tripsina de soya en poblaciones celulares enriquecidas en estadios específicos de maduración. La concentración de inhibidor utilizada fue 100 μ g/ml (Pietras y Roberts, 1986) con el sustrato N α -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA, y el amortiguador citrato/fosfato con una concentración de 20-40 μ g de proteína.

c) En poblaciones celulares enriquecidas también se determinó el efecto del inhibidor E-64 ya que a diferencia de los dos inhibidores anteriores este compuesto reacciona específicamente con las cistein proteasas. La concentración utilizada del inhibidor fue 30 μM como reporta Vasishta y col. (1988). El sustrato utilizado fue $\text{Na-CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA}$ y el amortiguador MES con una concentración de 40 μg de proteína.

En cada uno de los ensayos se realizó una preincubación de 10 min a 37°C , con el fin de que el inhibidor pudiera interactuar con la enzima, formando el complejo enzima-inhibidor. La reacción fue iniciada por la adición del sustrato.

F. CARACTERIZACION DE LA CATEPSINA B

1. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO.

La actividad proteolítica fué determinada con dos sustratos sintéticos $\text{Na-CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA}$ y $\text{Na-CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA}$ adicionados a diferentes concentraciones 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 y 250 μM . La fracción de 1929 $\times\text{g}$ exclusivamente fue utilizada para caracterizar la actividad enzimática a 38 días de edad, en tanto que 15 días de edad, se incluyó además la fracción que sedimenta a 9770 $\times\text{g}$. La cantidad de proteínas se mantuvo en 40 μg . La hidrólisis de los sustratos se cuantificó después de 30 min de incubación a 37°C .

2. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Se midió la actividad enzimática a diferentes tiempos de incubación a 37°C (0, 10, 20, 30, 45, 60 y 70 min) utilizando como sustrato a $\text{Na-CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA}$ (250 μM) y como fuente enzimática a 40 μg de proteínas de la fracción subcelular con mayor actividad a 15 y 38 días de edad.

3. EFECTO DEL pH

Para esta parte de la caracterización de la enzima así como en los experimentos subsiguientes se decidió usar 40 ug de proteínas de la tracción que sedimenta a 9770 xg a 15 días, ya que presentó la mayor actividad proteolítica. El sustrato utilizado fue N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOBna en una concentración de 250 uM y el tiempo de incubación fue de 30 min.

El pH óptimo para la catepsina B testicular se determinó usando diferentes amortiguadores y valores de pH tomando el pK de cada uno como referencia, como se indica en la tabla II.

TABLA II

Amortiguador	Valores de pH
Acetato de sodio 40 mM	3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.4
Citrato de Na/Fosfato de Na 40 mM	5.4, 5.8, 6.2 y 6.6
Hepes 40 mM	7.0, 7.5 y 8.0
Mes 40 mM	5.4, 5.8, 6.2 y 6.6

4. EFECTO DEL EDTA

Se estudió el efecto de EDTA sobre la hidrólisis del sustrato N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOBna, 250 uM de concentración final, a 30 min de incubación, con 40 ug proteína (9770 x g) en presencia de MES 40 mM pH 5.4 Este compuesto fue adicionado a las siguientes concentraciones 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mM.

5. EFECTO DEL DTT

Para determinar el efecto del DTT sobre actividad proteolítica se preincubó a la enzima de diferentes concentraciones de este compuesto 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mM tomando como control la actividad de la enzima preincubada en ausencia de este reactivo.

6. EFECTO DE INHIBIDORES DE TIOL PROTEASAS

a) Iodoacetamida

Se determinó la actividad de la enzima después de ser preincubada por 10 min a 37° C con diferentes concentraciones del compuesto 0, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mM utilizando como sustrato a N α -CBZ-Arg-Arg-4MeoBNA (250 μ M) con una concentración de 40 μ g de proteína. El inhibidor fue adicionado en un volumen de 100 μ l al medio de incubación.

b) Leupeptina

Se determinó el efecto de este compuesto a diferentes concentraciones 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} y 1×10^{-9} M, sobre la hidrólisis del sustrato N α -CBZ-Arg-Arg-4MeoBNA. (250 μ M) y una concentración de 40 μ g de proteína. El inhibidor fue adicionado en un volumen de 100 μ l al medio de incubación. Al igual que en el ensayo anterior, se realizó una preincubación de 10 min a 37° C de la enzima con el inhibidor.

7. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

En todos los experimentos se efectuó la determinación de proteínas por triplicado usando el método de Lowry modificado por Hartree (1972). Para la curva estándar de proteínas se utilizó una solución de 100 ug/ml de albúmina sérica bovina (BSA).

6. CARACTERIZACION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES

Se analizó la actividad de diferentes enzimas marcadoras de los organelos celulares, para determinar la composición y pureza de cada una de las fracciones obtenidas durante el fraccionamiento subcelular. La cantidad de proteínas varió dependiendo de cada ensayo. Las enzimas marcadoras ensayadas fueron:

Membrana plasmática:	ATPasa Ca^{++} (Fabiato & Fabiato 1979)
	5' nucleotidasa (Aronson & Tawter, 1974)
	Fosfatasa alcalina (Van Belle, 1972)
Mitocondrias:	Succinato deshidrogenasa (Bryan, A.C. et al, 1978)

Reticulo endoplásmico: Glucosa 6 fosfatasa

Lisosomas: Fosfatasa ácida

Catepsina B (Szego et al 1976)

Todas estas enzimas se analizaron bajo condiciones de velocidad lineal.

H. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis de resultados se llevó a cabo mediante la utilización de la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba posterior de Tuckey (Daniel, 1977 y Haber, 1972).

RESULTADOS

I. ACTIVIDAD DE CATEPSINA B EN HOMOGENEIZADO TOTAL DE TESTICULO DE RATA.

Se analizó la actividad de catepsina B presente en el homogeneizado de testículo de rata en diferentes etapas de maduración del epitelio germinal desde los 5 días después del nacimiento, momento en que aparecen las espermatogonias, hasta los 60 días, cuando el testículo presenta ya a los espermatozoides y a todos los elementos celulares que componen el epitelio germinal del testículo adulto.

La fig. 4 muestra que durante las diferentes edades se presenta un patrón de actividad desigual, con subidas y bajadas, en dos condiciones de experimentación utilizadas.

La primera de ellas (A) se realizó utilizando el medio propuesto por Szego y col. (1976): amortiguador citrato de sodio/fosfato de sodio 40 mM pH 5.4, como sustrato $\text{Na-CEZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNa}$ (125 μM) y 25 μg de proteína, obteniéndose una actividad promedio de 14.34 ± 2.4 nanomoles/mg prot/30 min a todas las edades, excepto a los 5 días donde se observó una actividad más elevada, la cual es significativa estadísticamente ($p < 0.1$). A pesar de que el patrón de comportamiento era constante, se encontraron también diferencias significativas ($p < 0.05$) a los 20, 30, 40 días de edad, ya que la actividad descendió ligeramente en estas edades.

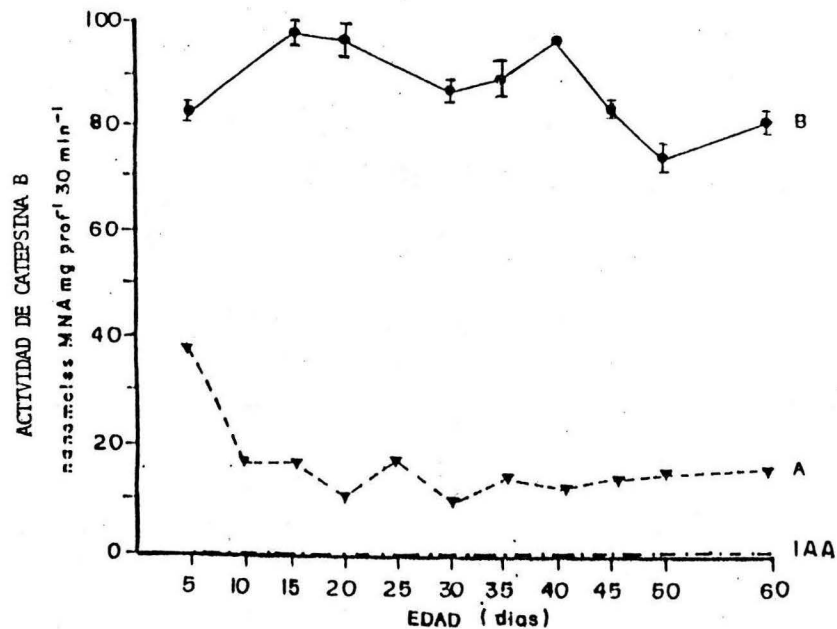


FIGURA 4.- ACTIVIDAD DE CATEPSINA B DURANTE EL DESARROLLO TESTICULAR. Los testículos de 2 a 5 ratas fueron homogeneizados en Sacarosa 250mM-Hepes 20mM; pH 7.4. Para el ensayo se utilizaron dos condiciones de experimentación: (A) Amortiguador citrato de Na-fosfato de Na, 40mM pH 5.4 y el sustrato N_{α} -CBZ-ala-arg-arg-4MeOBna (125uM), con 20ug de proteína. (B) Amortiguador MES 40mM, pH 5.4 y el sustrato N_{α} -CBZ-arg-arg-4MeOBna (250uM) y 40ug de proteína. En esta misma gráfica se presenta el efecto del inhibidor Iodoacetamida (IAA) 5mM, sobre la actividad enzimática.

$\bar{x} \pm$ de n-triplicados del ensayo

La segunda condición experimental (B) se realizó usando el amortiguador MES 40 mM pH 5.4, como sustrato N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA (250 μ M) y 40 μ g de proteína.

La actividad enzimática en estas condiciones fué de 86.55 \pm 7.29 nanomoles de sustrato hidrolizado en 30 min por mg de proteína lo que representa un incremento de 6 veces en relación a la determinada en presencia de fosfato/citrato y N α -CBZ-Ala-Arg-Arg-MeOBNA como sustrato. También bajo estas condiciones se encontraron diferencias significativas ($p < 0.1$) debidas a las edades estudiadas, pero sin seguir un patrón de comportamiento bien definido.

Aunque los resultados obtenidos con N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA como sustrato y MES permitieron detectar mejor la actividad, el uso de homogeneizado total como fuente enzimática no permitía definir si la actividad de catepsina B se asociaba con algún estadio o etapas de diferenciación específica o si todos los tipos celulares presentes en el epitelio germinal exhibían dicha actividad, ya que no existía una edad determinada en que se presentara un mayor enriquecimiento en actividad proteolítica.

Para aclarar esta situación se decidió obtener poblaciones celulares específicas.

II. ACTIVIDAD DE CATEPSINA B EN CELULAS GERMINALES AISLADAS EN DIFERENTES ESTADIOS DE MADURACION.

La actividad proteolítica de la catepsina B se determinó primero en células dispersas totales de testículo de rata a 15, 21 y 38 días que permiten obtener espermatoцитos en dos etapas de la profase meiótica I: Leptoteno-zigoteno a 15 días y paquiteno a 21 días y espermátides a 38 días de edad.

Como se puede observar en la fig 5, utilizando como sustrato $N\alpha$ -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBna y como amortiguador citrato/fosfato 40 mM pH 5.4 (Szego y col. 1976) las células totales de 15 días de edad presentaron el nivel más alto de actividad (12 nanomoles/mg prot./30min.) el cual va disminuyendo conforme el estado de desarrollo avanza, a los 21 días tenemos un descenso aproximadamente de 3 veces (4 nanomoles/mg de prot./30 min.) mientras que las células totales de 38 días presentaron la actividad más baja (1.6 nanomoles/mg de prot./30 min.). En estas condiciones si encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$) en la actividad proteolítica dependiendo de la población celular que no se presentaron de manera clara al analizar los homogeneizados totales.

Debido a la heterogeneidad de la población celular el siguiente paso fue enriquecer las poblaciones celulares en estadios específicos para determinar si la actividad de la catepsina B se encontraba asociada a un tipo de células en especial.

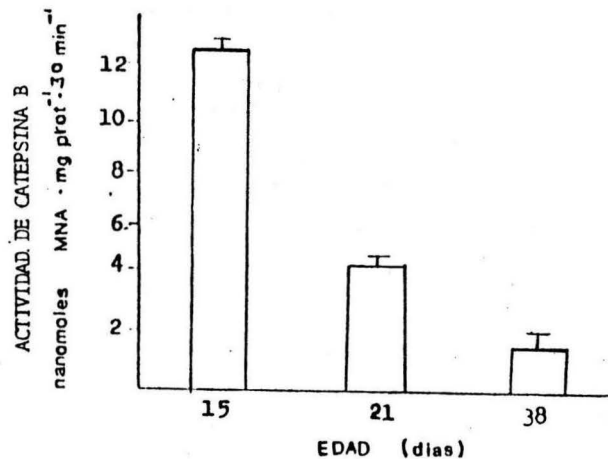


FIGURA 5.- ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN CELULAS TOTALES. La actividad de catepsina B fue determinada en células dispersas de testículo de rata a diferentes edades. La concentración de proteína utilizada fue 40ug y 125uM del sustrato N₂CBZ-aia-arg-arg-4MeOBNA y el amortiguador citrato-fosfato de sodio 40mM, pH 5.4. Células totales de 15 días: Sertoli (30%), leptotenos (53,9%); 21 días: paquiteno (63%), leptoteno (37%); 38 días: espermátides (74%), espermatoцитos (23%).

n= 3

La fig. 6 muestra la actividad de la catepsina B en una población enriquecida en espermatoцитos primarios en estadio leptoteno de 15 días (50%) en paquítenos de 21 días (85%), así como espermátides de 38 días (75%) y espermatozoides de rata adulta (100%). Los resultados muestran que las espermátides presentan una mayor actividad (15 nmoles/mg prot/30 min) con una $p < 0.01$, seguido por los espermatoцитos leptotenos (10 nmoles/mg prot/30 min) y paquíteno (9 nmoles/mg prot/30 min) y con un valor menor los espermatozoides estadísticamente significativo con respecto a las demás poblaciones ($p < 0.01$).

Como podemos observar a diferencia del resultado anterior la mayor actividad proteolítica se asocia a células que aparecen a los 21 días de edad. Esto se podría deber a que en las células totales (CT) de 15 días tenemos diversos tipos celulares y no uno en particular.

III IDENTIFICACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA MEDIANTE EL USO DE INHIBIDORES

Dado que la clasificación de las proteasas se basa en la naturaleza del grupo catalítico que poseen, es de suma importancia el uso de inhibidores capaces de reconocerlo. Por consiguiente se utilizaron 3 inhibidores de propiedades químicas diferentes para poder determinar las propiedades de la reacción proteolítica presente en el testículo de rata.

a) EFECTO DE IAA. La Iodoacetamida forma parte de un grupo de inhibidores capaces de reaccionar con los grupos sulfhidrilo (SH) que poseen las cistein proteasas tanto en su sitio activo, como en toda la secuencia de aminoácidos.

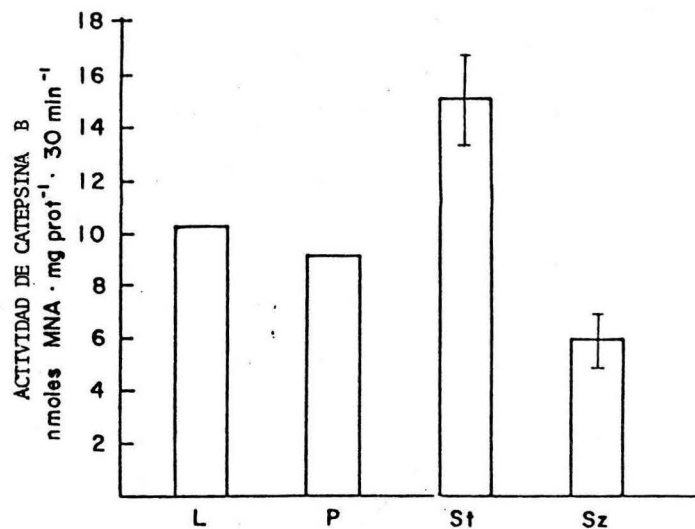


FIGURA 6.- ACTIVIDAD DE CATEPSINA B EN POBLACIONES CELULARES ENRIQUECIDAS EN DIVERSAS ETAPAS DE DIFERENCIACION. Se emplearon alícuotas de 20ug de proteína de cada una de las poblaciones celulares homogeneizadas en sacarosa 250mM pH 7.4. El sustrato empleado fue N_α -CBZ ala-arg-arg-4MeOBna, 125uM y el amortiguador citrato de sodio/fosfato de sodio, 40mM pH 5.4.
 L: leptotenos; P: paquiteno; St: espermátides; Sz: espermatozoides. n=2

Como se observa en la figura 4, la adición de 5 mM de Iodoacetamida causa una completa inhibición de la actividad de catepsina B en homogeneizados totales de testículo. A una concentración de 1 mM la Iodoacetamida inhibió sólo un 50% de la actividad enzimática, ya que la concentración de DTT en el medio era de 5 mM y por lo tanto 5 veces más alta que la de IAA, se decidió aumentar a 5 mM su concentración y determinar su efecto sobre la hidrólisis de $N\alpha$ -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA.

Esto se complementó con el uso del mismo inhibidor en células enriquecidas en otro apartado.

b) INHIBIDOR DE TRIPSINA. Tomando como fuente enzimática poblaciones celulares enriquecidas en estadios específicos de maduración se analizó el efecto del inhibidor de tripsina de soja, que ha sido utilizado para inhibir a la tripsina y a otras serino proteasas. En la figura 7, se muestra que tanto los espermatoцитos primarios leptotenos, como las espermátidas y espermatozoides presentan una actividad proteolítica sensible al inhibidor de tripsina, mientras que la actividad en los espermatoцитos paquiteno no se modificó por la presencia de este inhibidor.

La figura 8, muestra la actividad proteolítica insensible a la presencia del inhibidor de tripsina. Se puede observar que la mayor actividad proteolítica se encuentra asociada a los espermatoцитos paquiteno (21 días) y espermátidas (38 días).

El inhibidor de tripsina (soya) nos permitió detectar la participación de serino proteasas en la hidrólisis del sustrato $N\alpha$ -CBZ-Ala-

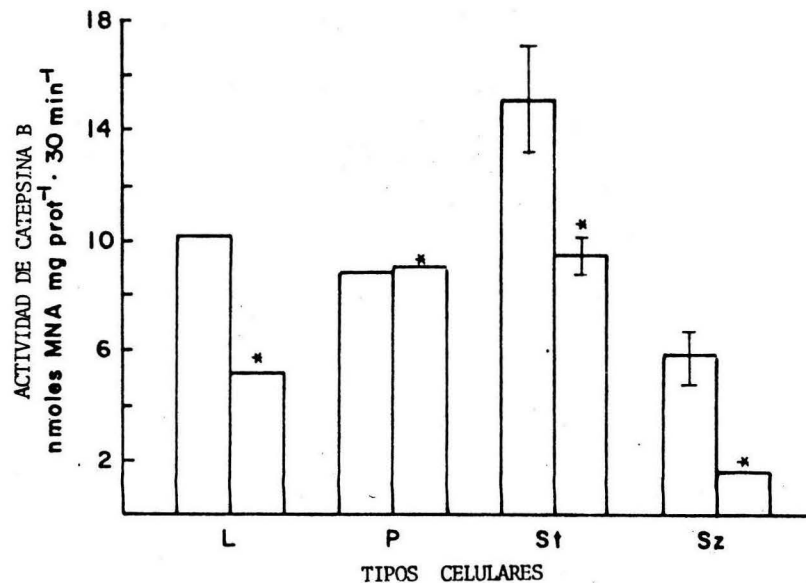


FIGURA 7.-EFECTO DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA. A las poblaciones celulares enriquecidas se les adicionó el inhibidor de tripsina de soya en una concentración de 100 ug/ml*. Las condiciones de ensayo fueron 20 ug de proteína de cada una de las poblaciones celulares, el sustrato N_{α} -CBZ-alá-arg-arg-4MeOBNA y el amortiguador citrato de sodio/fosfato de sodio 40mM pH 5.4. La enzima se preincubó con el inhibidor durante 10 min. a 37°C. ($p \leq 0.01$) $n = 2$
 L: leptotenes; P: paquiteno; St: espermátides; Sz: espermatozoides.

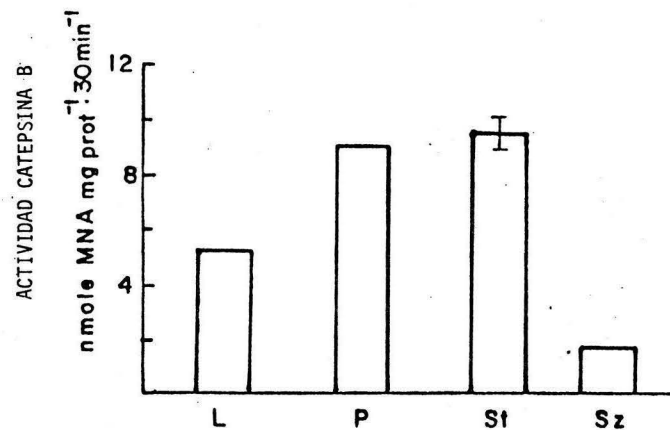


FIGURA 8.- ACTIVIDAD RESULTANTE DESPUES DE LA ADICION DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA DE SOYA. Las condiciones de experimentación son las mismas que en la figuras. 4 y 5. L: leptotenos; P: paquiteno; St; espermatides; Sz: espermatozoides.

Arg-Arg-4MeOBNA en las células del epitelio germinal, en niveles variables dependiendo de la población celular.

c) EFECTO DEL E-64 Este compuesto fue diseñado para reaccionar con el residuo cisteína 159 que participa directamente en la catálisis enzimática. Por lo tanto es un inhibidor específico de tiol proteasas y no es capaz de inhibir a otro tipo de proteasas.

Por esta razón se adicionó E-64 al medio de incubación para descartar la participación de otras proteasas además de catepsina B en la hidrólisis de sustratos sintéticos usados como análogos de los sustratos naturales de la catepsina B testicular.

Este inhibidor fue adicionado a una concentración de 30 μ M (Vasishta y col. 1988) y su efecto se determinó sobre la actividad proteolítica de las diferentes poblaciones enriquecidas. Siendo esta inhibida al 100% en todas las poblaciones celulares estudiadas (fig. 9).

Es importante también hacer notar que el efecto de E-64 se observó en presencia de N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA como sustrato y con MES, y no se probó en presencia del otro sustrato N α -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA.

El uso de N α -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA como sustrato permitió detectar una actividad diez veces más alta en la población de células dispersas totales de 15 días de edad (leptotenos 58%-células de Sertoli 30%). La actividad de los espermatoцитos leptotenos y de espermatoцитos paquitenos (21 días de edad) fue de 5-7 veces más alta ($p < 0.01$), en tanto que la actividad de espermátides y de espermatozoides fue muy semejante a la observada con el sustrato N α -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA (fig. 6 y 9 y tabla III)

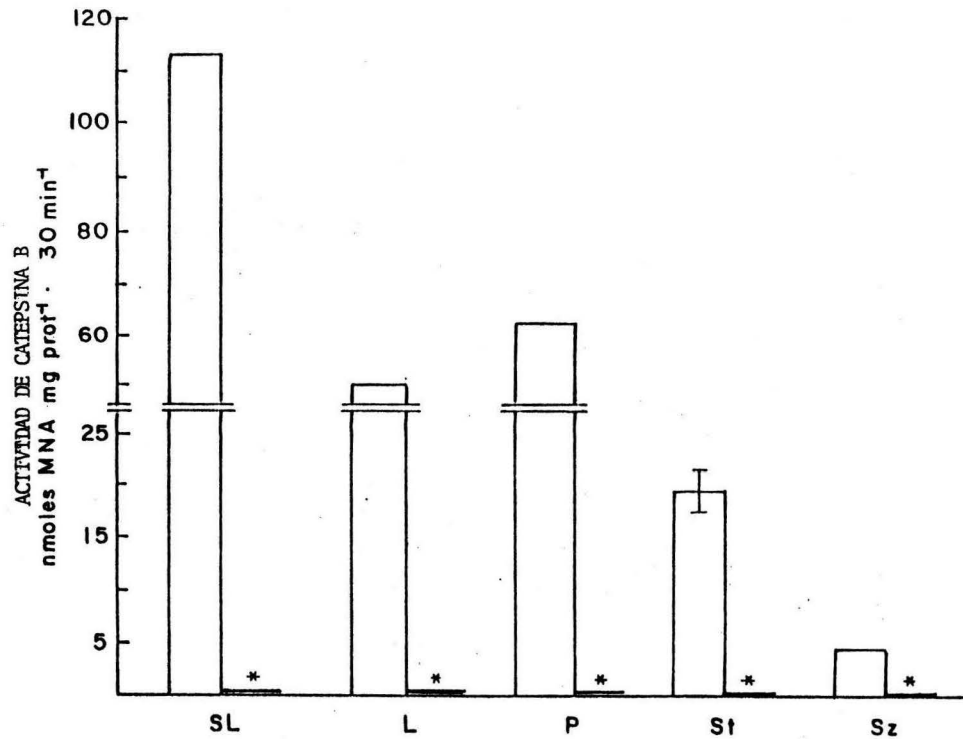


FIGURA 9.- EFECTO DEL INHIBIDOR E-64. Se tomaron alícuotas de 40ug de proteína de poblaciones celulares enriquecidas en diferentes estadios de maduración. El inhibidor se adicionó en una concentración final de 30uM. El sustrato empleado fue N_{α} -CBZ-arg-arg-4MeOBNA, 250 uM y el amortiguador MES pH 5.4. La enzima se preincubó con el inhibidor durante 10 min. a 37°C. SL: células de Sertoli-leptotenos; L: espermatoцитos leptotenos; P: espermatoцитos paquiteno; St: espermátides; Sz: espermatozoides.

POBLACION CELULAR	S U S T R A T O	
	CBZ-ala-arg-arg 4MeOBNa	CBZ-arg-arg 4MeOBNa
Células totales 15 días (Sertoli-leptotenos)	10.976 *	113.401*
Leptotenos	10.218 *	62.184*
Paquitenos	8.896 *	50.369*
Espermátides	15.169±1.78*	19.539 2.19*
Espermatozoides	6.0 ± 1.1*	4.503 *

TABLA III.- Comparación de la actividad proteolítica presente en las diferentes poblaciones celulares obtenidas en las figuras 6 y 9.
*Actividad referida como nanomoles de 4MeOBnaftilamina/mg de proteína/30 min.

Estos resultados señalan que los espermatocitos primarios de 15 y 21 días de edad presentan la mayor actividad de catepsina B, debido a lo cual se decidió caracterizar la actividad enzimática tomando al testículo de 15 días de edad como fuente de catepsina B.

IV CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE CATEPSINA B EN TESTICULO INMADURO.

Debido a que los niveles más altos de actividad se presentaron en etapas tempranas de diferenciación del epitelio germinal durante la profase de la primera división meiótica, se decidió tomar al testículo de la rata de 15 días como fuente de catepsina B para definir sus características cinéticas.

Como primer paso se estableció la localización subcelular de la enzima. El homogeneizado testicular se sometió al esquema de centrifugación descrito previamente (fig.3) Se obtuvieron 5 fracciones particuladas cuya velocidad de sedimentación varió de 437 xg a 164 377 xg y una fracción soluble o sobrenadante final.

Para determinar el origen de cada una de las fracciones obtenidas se utilizaron 6 marcadores de organelos subcelulares descritos en otros órganos (McNamee, 1989). G6Pasa para retículo endoplásmico; succinato deshidrogenasa para mitocondrias; fosfatasa ácida para lisosomas, y fosfatasa alcalina, 5'AMPasa y ATPasa-Ca⁺⁺ para membrana plasmática.

Los resultados obtenidos se resumen en las gráficas 10 y 11. Como puede apreciarse la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH) alcanzó

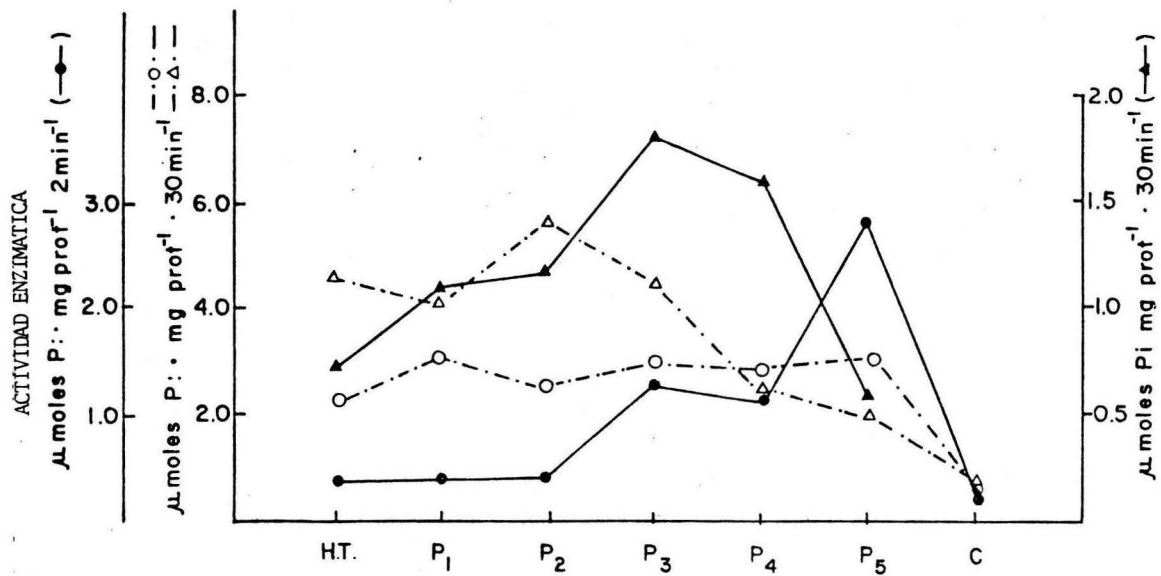


FIGURA 10.- DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE ORGANELOS. Se utilizaron concentraciones variables de proteína (dependiendo de la enzima estudiada) de cada una de las fracciones obtenidas del esquema de centrifugación diferencial utilizado. Enzimas marcadoras de membrana: ATPase-Ca⁺⁺ (—●—); 5'AMPase (---△---); fosfatasa alcalina (---○---); y la enzima marcadora de retículo endoplásmico: G6Pase (—▲—).

los niveles más altos en la fracción que sedimenta a 1979 xg (P2). Adicionalmente se presentó una actividad de SDH en la fracción citosólica soluble que corresponde al 50% de la actividad más alta.

La actividad de las enzimas marcadoras de membrana plasmática; ATPasa-Ca⁺⁺, 5'AMPasa y fosfatasa alcalina fue detectada en todas las fracciones obtenidas. En el caso de la ATPasa-Ca⁺⁺ la mayor actividad se asoció a la fracción que sedimenta a 164 377 xg (P5), mientras que la 5'AMPasa se asoció a la fracción de 1929 xg (P2).

La actividad de Glucosa -6-fosfatasa (G6Pasa) se detectó a niveles muy similares en las fracciones que sedimentan a 439 y 1979x g (P1 y P2). La fracción que mayor actividad enzimática de G6Pasa presentó fue la de 9770 xg. La fracción de 164 737 xg presentó una actividad del 30% con respecto a la detectada en la fracción de 9770 x g.

El comportamiento de estas cuatro enzimas sugiere que las vesículas membranales formadas durante la homogeneización del tejido provenientes de membrana plasmática son muy heterogéneas ya que pueden sedimentar a diferentes aceleraciones, presentándose como contaminación en todas las fracciones.

La fosfatasa ácida, enzima marcadora de lisosomas en otros tejidos, presentó un valor de mayor actividad en la fracción de 9770 xg, aun cuando la actividad de la fracción de 1929 xg representó el 73 % del nivel observado en la fracción de 9770 xg (P3).

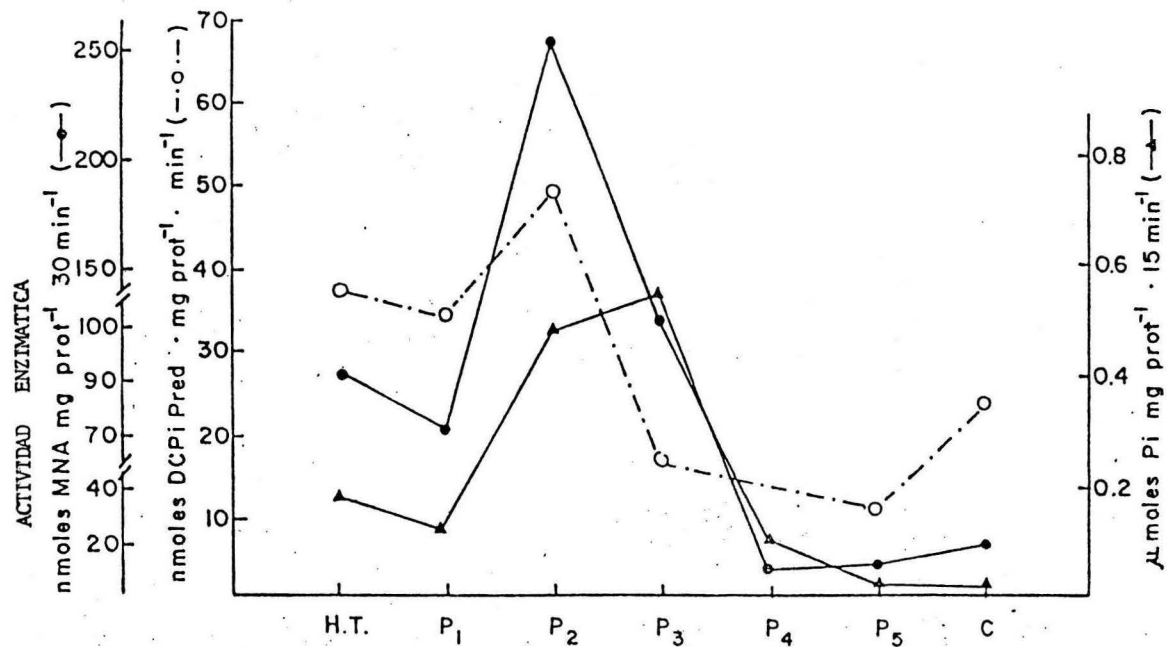


FIGURA 11.- DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LAS ENZIMAS MARCADORAS DE ORGANELOS. Se utilizaron concentraciones variables de proteina de cada una de las fracciones obtenidas del esquema de centrifugación diferencial utilizado (dependiendo de la enzima ensayada). Para mitocondrias: succinato deshidrogenasa (---o---); para lisosomas: fosfatasa ácida (—▲—) y catepsina B (—●—).

El comportamiento de esta enzima nos sugiere la presencia de dos poblaciones de lisosomas que sedimentan a dos diferentes aceleraciones. Esto no podría asociarse a la presencia de vesículas de retículo endoplásmico en ambas poblaciones, ya que la enzima en este organelo se encuentra como proenzima inactiva (Nishimura y Kato, 1987).

La actividad de catepsina B se encontró en niveles mayores en la fracción que sedimenta a 1979 xg representando un incremento de 5.5 veces la actividad que se detecta en el homogeneizado total.

La fracción de 9770 xg presentó el 60% de actividad encontrada en la fracción anterior.

AFINIDAD DE CATEPSINA B FRENTE A DOS SUSTRATOS SINTETICOS

Tomando la fracción de 9770 xg se analizó la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de sustrato. Además se utilizaron dos medios de incubación diferentes; uno utilizando MES como amortiguador y el propuesto por Szego, y col., así como dos sustratos sintéticos $N\alpha$ -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA y $N\alpha$ -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA respectivamente.

En la fig. 12 se puede observar que en ambos sistemas la afinidad por los dos sustratos es semejante ($K_m = 82$ y $75 \mu M$) y la saturación total de la enzima se obtiene desde $150 \mu M$ de sustrato.

Es importante notar que con el amortiguador MES y con $N\alpha$ -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA la actividad es 2 veces más elevada que con Citrato/Fosfato y $N\alpha$ -

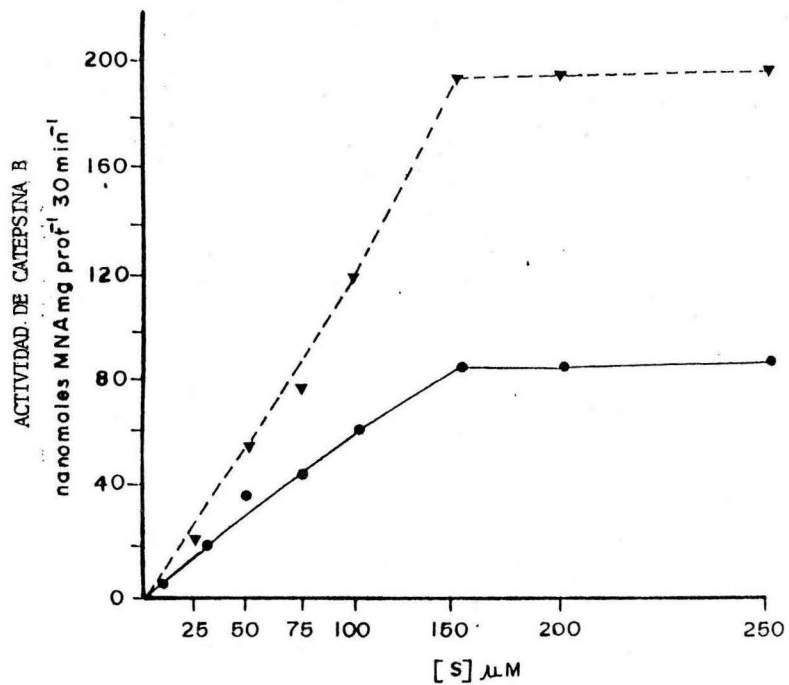


FIGURA 12.- CURVA DE SUSTRATO. Se utilizaron 40 μ g de prote \bar{i} na de la fracci \bar{o} n de 9770 xg (P3) de 15 d \bar{i} as de edad. La enzima se somet \bar{i} o a dos condiciones experimentales (— \bullet —) sustrato N -CBZ - α -la-arg-arg-4MeOBNa y el amortiguador citrato de sodio/fosfato de sodio 40mM pH 5.4 y (--- \blacktriangledown ---) sustrato N -CBZ -arg-arg-4MeOBNa y el amortiguador MES 40mM pH 5.4. Los dos amortiguadores se utilizaron en presencia de DTT 5 mM. El tiempo de incubaci \bar{o} n fue de 30 min a 37°C.

CEZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA (196.98 ± 0.58 nanomoles vs 87.46 ± 0.73 nanomoles).

EL EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE CATEPSINA B

La actividad de la catepsina B fue determinada usando acetato de sodio 40 mM, una mezcla de citrato/ fosfato de sodio 40 mM y HEPES 40 mM a diferentes rangos de pH dependiendo de su pK. La actividad enzimática y el valor del pH óptimo variaron dependiendo de la naturaleza química del amortiguador (fig. 13) Con acetato de sodio los valores de pH bajos mostraron un descenso en la actividad enzimática encontrando un pH óptimo para la enzima de 5.4, sin embargo la mezcla de citrato-fosfato presentó un cambio importante ya que al mismo valor de pH de 5.4 se encontró el 50% (140 nanomoles) de la actividad registrada con acetato de sodio (70 nmoles/mg prot/30 min), a medida que el valor de pH se incrementó también la actividad de la enzima presentó un aumento, obteniendo con este amortiguador un pH óptimo de 6.6, la actividad registrada (160 nmoles/mg prot/30 min) a este pH fue muy semejante a la obtenida con acetato de sodio pH 5.4.

A valores de pH por encima del neutro la actividad de la catepsina B muestra un marcado descenso.

En el rango de pH de 5.0-6.6 se utilizó el amortiguador MES para determinar de manera más precisa el valor de pH óptimo de la enzima ya que hasta el momento el valor dependía del amortiguador utilizado.

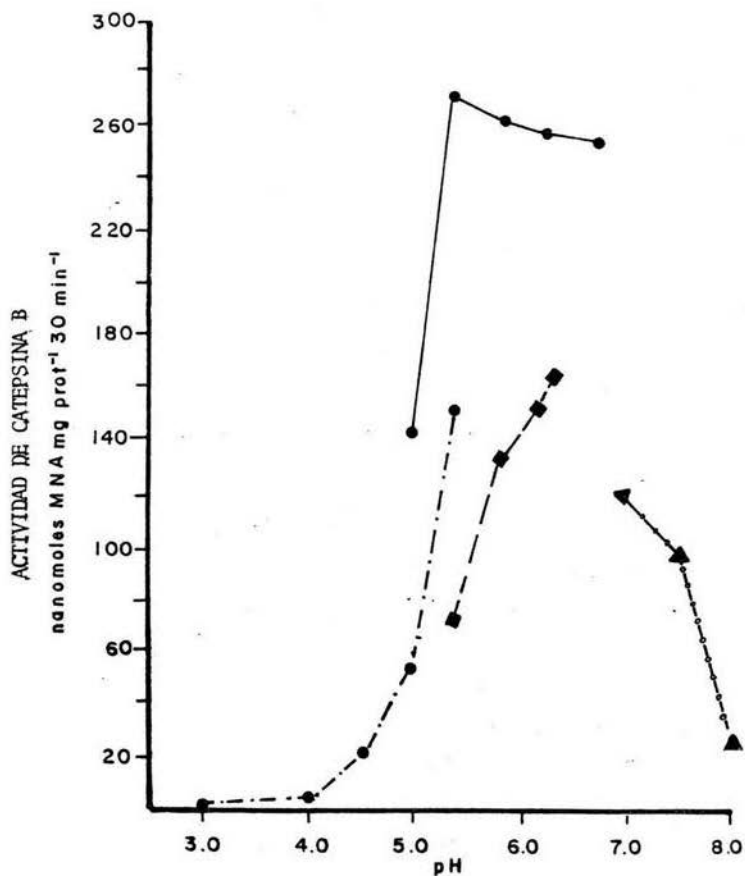


FIGURA 13.- EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE CATEPSINA B. Se utilizaron 40ug de proteína de la fracción de 9770 xg de 15 días de edad y el sustrato N -CBZ-arg-arg-4MeOBna (250 μ M). Los amortiguadores utilizados fueron: acetato de sodio 40 mM (- - · - · -); citrato de Na/fosfato de Na 40mM (- - ■ - -); Hepes 40 mM (- - ▲ - -) y MES 40 mM (- - ● - -). El tiempo de incubación fue de 30 min. Se adicionó DTT 5mM a cada uno de los amortiguadores empleados.

La actividad proteolítica en este medio mostró un patrón de comportamiento diferente a los anteriores, ya que la actividad se mantuvo con pequeñas diferencias en un rango de pH de 5.4 a 6.6, es importante también notar que el uso de este medio aumentó la actividad enzimática aproximadamente 2 veces con respecto al amortiguador de acetato de sodio y 3.5 veces con respecto a citrato/fosfato de sodio pH 5.4.

De los resultados obtenidos de este experimento se decidió utilizar en los siguientes ensayos el amortiguador MES 40 mM pH 5.4.

EFECTO DEL EDTA

Se ha encontrado que algunas catepsinas tipo B necesitan de cationes divalentes para su actividad, estas enzimas han sido denominadas tiol proteinasas dependientes de metales. En este caso el EDTA es capaz de inhibir a la enzima debido a la formación de complejos con los cationes del medio (Bond, 1987)

La figura 14, muestra la actividad de catepsina B testicular en la presencia de EDTA. La adición de EDTA a las concentraciones utilizadas, no afectó la actividad enzimática, ésta se mantuvo casi constante desde 0.25 mM hasta 5.0 mM, el incremento en la actividad no es significativo ($p < 0.01$). Sin embargo en ausencia de EDTA la actividad fue ligeramente menor que la obtenida desde 0.25 mM, pero no de manera significativa.

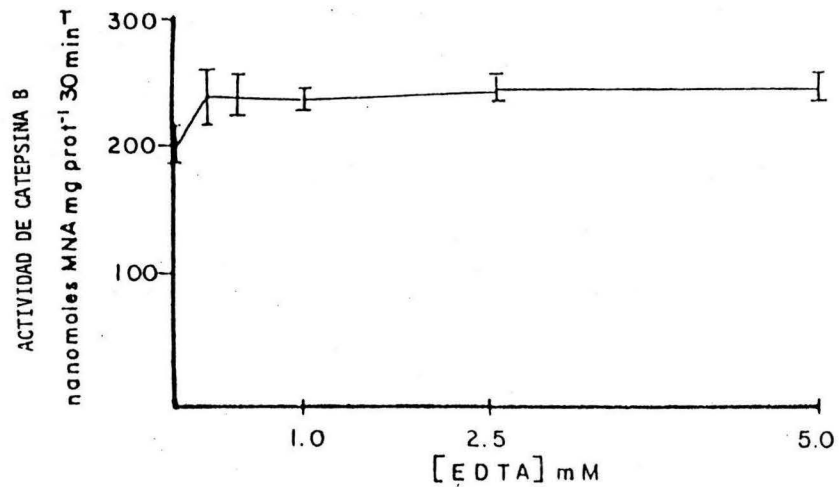


FIGURA 14.- EFECTO DEL EDTA. Se utilizaron alícuotas de 40 μ g de proteína de la fracción de 9770 xg (P3) de 15 días de edad. El sustrato empleado fue N_{α} -CBZ-arg-arg-4MeOBNA (250 μ M) en presencia de MES 40 mM, pH 5.4. El tiempo de incubación fue de 30 min a 37°C.

EFECTO DEL DTT.

Las tiol proteasas como la catepsina B requieren la presencia en el medio de incubación de reactivos sulfhidrilo que protejan los grupos SH que se requieren para la formación del complejo E-S indispensable en la catálisis enzimática (Towatari. et al, 1979)

En la fig. 15 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de ditioneitol sobre la actividad proteolítica de testículo de rata. Se puede observar que la adición de DTT estimula la actividad enzimática 3 veces con respecto a la detectada en ausencia de este reactivo.

EFECTO DE INHIBIDORES

Otra estrategia diseñada para identificar y caracterizar la actividad enzimática esta basada en el uso de diversos agentes químicos capaces de modificar a la enzima y poner de manifiesto sus propiedades.

a) Efecto de iodoacetamida

Los compuestos que reaccionan con grupos SH como la iodoacetamida, son capaces de inhibir la actividad de enzimas que requieren la integridad de estos residuos para la catálisis.

Este inhibidor se adicionó al medio de incubación en presencia de DTT, a diferentes concentraciones (0.5-10 mM) y se determinó su efecto sobre la actividad proteolítica. En la fig. 16 podemos observar que a medida que

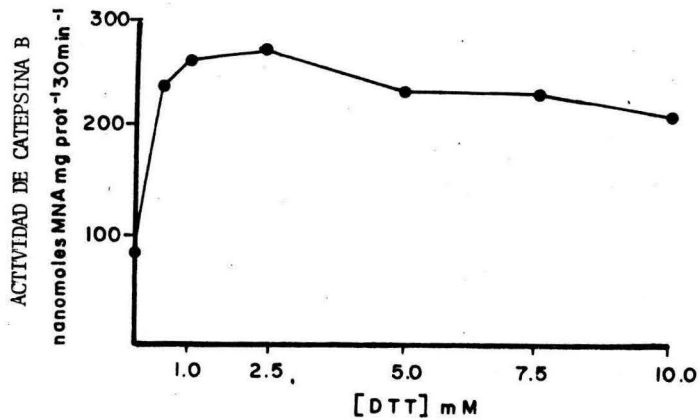


FIGURA 15.- EFECTO DEL DTT. Se preincubaron 40ug de protefna de la fracción de 9770 xg (P3) de 15 días de edad durante 15 min a 37°C en presencia de DTT a diferentes concentraciones. El sustrato empleado fue Na-CBZ-arg-arg-4MeOBNa (250uM) y el amortiguador MES pH 5.4, en este ensayo se eliminó el DTT presente en el medio de incubación. La incubación en presencia del sustrato fue de 30 min a 37°C.

va aumentando la concentración de iodoacetamida la actividad enzimática disminuye gradualmente. Con una concentración de 0.5 mM de IAA se inhibió la actividad en un 65% y desde 5 mM se inhibió casi totalmente a la enzima.

b) Efecto de leupeptina

La leupeptina es un peptidilaldehído producido por actinomicetos que puede ocupar el sitio catalítico de serino y tiol proteasas e inhibe la actividad enzimática en forma reversible.

La actividad proteolítica testicular fue determinada en presencia de diferentes concentraciones de leupeptina 1×10^{-9} a 1×10^{-6} M utilizando como sustrato $N\alpha$ -CB₂-Arg-Arg-4MeOEtNa.

Como puede observarse en la fig. 17 la adición de leupeptina inhibió la hidrólisis del sustrato desde 10^{-9} M. El 90% de inhibición se obtuvo con 1×10^{-7} M y el 100% con 1×10^{-6} M.

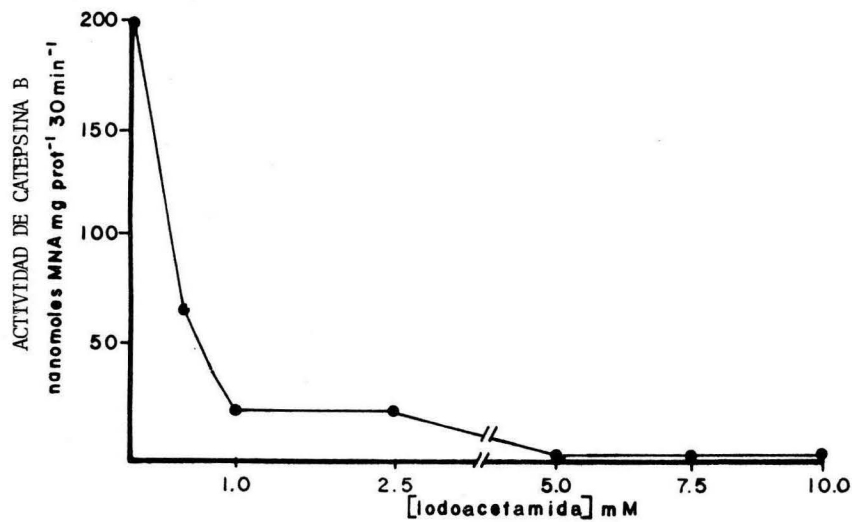


FIGURA 16.- EFECTO DE IODOACETAMIDA. Alícuotas de 40ug de proteína de la fracción de 9770 xg (P3) de 15 días de edad se preincubaron durante 10 min a 37°C en presencia del inhibidor y el amortiguador MES 40mM pH 5.4 conteniendo DTT 5mM. Posteriormente se incubó durante 30 min a 37°C en presencia del sustrato N_α-CBZ-arg-arg-4-MeOBNA 250 uM.

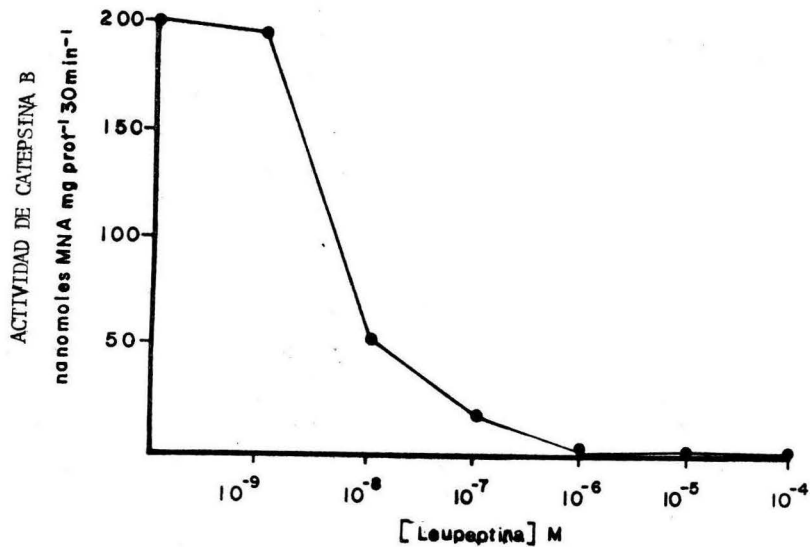


FIGURA 17.- EFECTO DE LEUPEPTINA. Alícuotas de 40ug de proteínas de la fracción de 9770 xg (P3) de 15 días de edad se preincubaron durante 10 min a 37°C en presencia del inhibidor. Posteriormente se preincubó durante 30 min a la misma temperatura en presencia del sustrato N_α-CBZ-arg-arg-4MeOBNA 250uM. El amortiguador utilizado fue MES 40mM pH 5.4

DISCUSION

Una de las objeciones hechas al trabajo de Otto (1971) y de Distelmaier y col (1972) acerca de la presencia de catepsina B en testículo de rata era que se habían utilizado sustratos sintéticos que podían ser hidrolizados por otras proteasas (Morton, 1977).

La posibilidad de contar con dos compuestos fluorescentes que han sido propuestos como sustratos específicos de la catepsina B en otros tejidos: $N\alpha$ -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNa y $N\alpha$ -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNa (Smith, y col. 1972; Smith y Van Frank, 1975) y del inhibidor específico para el sitio catalítico de la catepsina B nos han permitido confirmar la presencia de esta enzima en el testículo, reportada por Otto (1971) y Distelmaier y col. (1972).

La participación de aminopeptidasas o carboxipeptidasas en la hidrólisis de estos sustratos fue descartada ya que el amino terminal está bloqueado con el grupo CBZ y el carboxilo terminal, con el residuo 4MeOBNa.

Los resultados obtenidos muestran que la catepsina B testicular es capaz de hidrolizar activamente ambos sustratos ya que poseen dos aminoácidos básicos que pueden ocupar los sitios S1 y S2 de la enzima (Huseby y col. 1980). Estos hallazgos son acordes con lo encontrado por Smith y colaboradores (1984), ya que ellos proponen que el alargamiento de

la cadena hidrocarbonada con un aminoácido como alanina, que ocuparía el sitio tres (S3) produce niveles de actividad más bajos.

La afinidad de la catepsina B testicular por los dos sustratos empleados en este trabajo fue casi igual, $K_m = 75$ y $82 \mu M$ (Apéndice II fig.20) y semejante a la reportada en otros sistemas. Takahashi y col. (1986) encontraron que la K_m para $N\alpha$ -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBna de las dos isoenzimas de la catepsina B en hígado porcino fue de 130 y $66 \mu M$. Pietras y Roberts (1986) reportaron una k_m de $38 \mu M$ para la catepsina B de células normales de ectocervix y de $58 \mu M$ para las células tumorales del mismo tejido.

Sin embargo, el sustrato hidrolizado con más velocidad fue el CBZ-Arg-Arg-4MeOBna. La velocidad máxima fue 2.5 veces mayor que en presencia de CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBna. Sin embargo el aumento en la velocidad de hidrólisis no puede ser atribuido totalmente al sustrato exclusivamente, ya que se empleó distinto amortiguador en ambos casos y no se puede descartar la posibilidad de que se trate de la suma de los dos factores utilizados, es decir el efecto producido por el propio sustrato más el efecto del amortiguador.

Esta diferente actividad frente a diversos sustratos sintéticos ha sido demostrada en la catepsina B de hígado, bazo y riñón, donde el N -CBZ-Val-Arg-Arg es el sustrato hidrolizado a mayor velocidad, el $N\alpha$ -CBZ-Arg-Arg-4MeOBna ocupa el segundo lugar y $N\alpha$ -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBna ocupa el tercer lugar (Smith, 1984).

La posibilidad de que los sustratos empleados fueran hidrolizados por acción de una enzima fue analizada utilizando el inhibidor de tripsina de soya, leupeptina, iodoacetamida y E-64.

Cuando se uso $N\alpha$ -CEZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA como sustrato y se adicionó el inhibidor de tripsina a una concentración de 100ug/ml, se encontró un porcentaje de inhibición variable de la actividad. En la población enriquecida en espermátides la inhibición fue del 49%; en la población enriquecida en espermatoцитos leptotenos fue del 25-48% y en la población pura de espermatozoides se inhibió el 62%. No se observó inhibición de la actividad la población enriquecida en el estadio de espermatoцитo paquiteno. (fig. 7)

La inhibición en la hidrólisis de este sustrato por la adición del inhibidor de tripsina en ciertas poblaciones celulares señala la participación de serino proteasas. El hecho de que los porcentajes de inhibición varien dependiendo de la población celular sugiere que esta clase de proteasas se encuentra en niveles diferentes en las células germinales durante su maduración.

La inhibición observada en espermátides y espermatozoides por la adición del inhibidor de tripsina de soya podría deberse en parte a la inhibición de la acrosina que está presente en estas etapas y forma parte de las hidrolasas del acrosoma (Stambaugh y Buckley, 1972; Li y Stanley, 1979).

En el caso de las células dispersas totales de 15 días donde se tenía una población heterogénea con células de Sertoli, espermatoгонias y

espermatoцитos, la sensibilidad al inhibidor de tripsina de soya estaria dada posiblemente por la inhibición del activador de plasminógeno producido por las células de Sertoli ya que presenta características muy semejantes a la tripsina (Lacroix et al, 1977; Lacroix y col. 1982 y 1982a).

Cuando se usó $N\alpha$ -CBZ-Arg-Arg-4MeOBNA como sustrato y se adicionó E-64 no se observó actividad residual (fig. 9). Esta situación parece indicar que este sustrato es hidrolizado solamente por catepsina B, ya que el E-64 se considera como un inhibidor específico de esta enzima (Barret, 1982).

La actividad de catepsina B del testículo de rata mostró un alto requerimiento de grupos sulfhidrilo para llevar a cabo la catálisis enzimática, lo que la identifica como una tiol proteasa (Barret, 1973). La mayor actividad se obtuvo en presencia de una concentración de 2.5 mM de DTT. Szego y col. (1976) reportaron que la catepsina B de la glándula prepucial requiere de 5mM de DTT mientras que la enzima de hígado de rata requiere de 0.25mM (Towatari, 1979).

La participación de los residuos SH en la catálisis enzimática fue confirmada mediante el uso de dos reactivos de grupos SH, iodoacetamida y E-64.

Aunque la iodoacetamida es un inhibidor inespecífico debido a que puede reaccionar con los grupos SH independientemente de que estos formen parte del sitio catalítico o no, puede usarse como herramienta en la caracterización de la enzima. Szego y col. (1976) y Scott y col. (1987) reportaron que a una concentración de 1mM, la iodoacetamida puede inhibir la actividad de la catepsina B. La catepsina B testicular con 1mM de

iodoacetamida fue inhibida en el 90% y con 5mM se logró el 100% de inhibición. Hay que tener presente que el medio de incubación contenía 5mM de DTT para proteger los grupos SH de la enzima.

La leupeptina, inhibidor de tiol y serino proteasas (Umezawa y col. 1970) fue utilizado por Barret (1973) quien reportó una completa inhibición de la catepsina B de hígado humano con 1uM de leupeptina. La catepsina B testicular se inhibió un 96% con la misma concentración de este compuesto. La KI reportada para diversos tejidos alcanza valores de 10^{-6} a 10^{-7} M que indica una alta afinidad de estas proteasas (Barret, 1977).

E-64 es un inhibidor específico para las tiol proteinasas, ya que reacciona con el residuo cisteína del sitio catalítico y no es capaz de reaccionar con grupos SH de las serino proteasas, contrastando en especificidad con leupeptina y iodoacetamida. Barret y colaboradores (1982) reportaron que a una concentración 10 uM el E-64 inactiva rápidamente a las catepsinas B, H y L así como a la papaina, todas pertenecientes al grupo de tiol proteinasas. La adición de E-64 a una concentración de 30 uM, inhibió al 100% la actividad proteolítica de las células aisladas del epitelio germinal (fig. 9), cuando se utilizó como sustrato $N\alpha$ -CEZ-Arg-Arg-4MeOBNA y en presencia de DTT 5 mM en el medio de incubación.

El pH del medio de incubación 6.0-6.5, era otra de las objeciones para aceptar que la hidrólisis de los sustratos sintéticos utilizados por Distelmaier y colaboradores (1972) era debida a catepsina B (Morton, 1977).

En nuestro estudio el pH óptimo para la actividad de catepsina B, utilizando MES como amortiguador, fue de 5.4, coincidiendo con el pH óptimo

reportado para la catepsina B de glándula prepucial (Szego y col. 1976), con el de hígado de ternera (Takahashi, 1980) y muy cercano al valor reportado para la catepsina B de hígado de ratón (Mego, 1971). Scott y col. (1986) encontraron para la catepsina B purificada de testículo de conejo un pH óptimo de 6.0 utilizando como amortiguador una mezcla de fosfato 100 mM/cisteína 1mM en presencia de EDTA 1mM y como sustrato N α -CBZ-Arg-B-naftilamida (50 μ M).

En el presente trabajo se demostró que la naturaleza química del amortiguador tiene un efecto sobre la actividad enzimática. A pH 5.4 usando acetato de sodio 40 mM, la actividad fue 50% menor que la obtenida con MES al mismo pH. Cuando se incubó con citrato 20mM/ fosfato 20 mM la actividad descendió en un 75% con respecto a la obtenida con MES (fig. 13). La mayor actividad proteolítica detectada en presencia de MES no fue un artefacto del amortiguador sobre la fluorescencia de la 4MeOBNA, ya que la solución estándar de este compuesto fue preparada con MES.

Nuestros resultados apoyan las observaciones de Otto, quien desde 1971 reportó que la hidrólisis del sustrato disminuye cuando la concentración de fosfatos aumenta, con 0.1 M de fosfato, la actividad de catepsina B se inhibe en un 36%.

Un dato muy importante es el hecho de que la mayoría de los ensayos realizados por otros autores para determinar la actividad de catepsina B y su pH óptimo usaron fosfatos a una concentración de 0.1 M (Towatari, 1979) o una mezcla de citrato/fosfato (Szego y col. 1976).

En la fase inicial del presente trabajo también se usó la combinación de fosfato 20 mM/citrato 20 mM y aunque la concentración de fosfatos utilizada fue 5 veces menor a la reportada por Otto, (1971), pudo haber tenido un efecto inhibitorio sobre la catepsina B testicular. Se ha observado que el citrato como amortiguador no altera la actividad (Takahashi, 1980).

Existen informes contradictorios acerca del efecto de cationes divalentes sobre la actividad de catepsina B. Algunos autores (Towatari y col., 1979; Barret, 1973 y Scott y col., 1986) han demostrado la activación de la catepsina B por agentes quelantes como el EDTA. Por otra parte se tienen las observaciones de Szego y col. (1976) quienes informaron que la adición de calcio a concentraciones bajas de 25 y 50 nM incrementa la actividad en un 25 y 50% respectivamente, pero a concentraciones mayores de este rango, calcio inhibe a la enzima. El magnesio (Mg++) también produce estos efectos. La adición de EDTA o EGTA inhibe en 50 y 25 % respectivamente la actividad enzimática. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos por Takahashi (1980) de un ligero aumento en la actividad cuando el EDTA es eliminado.

Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, la adición de EDTA a diferentes concentraciones no modificó la actividad de la catepsina B testicular y no se estableció si la enzima de testículo podría ser activada por calcio a concentraciones mayores de 10^{-6} M que es la concentración de Ca^{++} en el agua desionizada empleada. Todas estas observaciones indican conflicto sobre el papel del calcio en la actividad de catepsina B (Brown y col., 1975).

Aunque se habían identificado las proteínas de testículo con actividad de catepsina B (Otto, 1971; Diestelmaier y col., 1972) y purificado la catepsina B de testículo de conejo (Scott y col., 1986) no se había definido su localización subcelular.

En los tejidos normales adultos en fase de crecimiento estacionaria, como hígado y bazo, la catepsina B se recuperó en fracciones que sedimentan a 11 000 xg o equivalentes a la fracción lisosomal-mitocondrial (Szego y col., 1971; Szego y col., 1976 y Towatari y col., 1979).

La catepsina B en tejidos tumorales parece estar asociada a la membrana plasmática y secretarse al espacio extracelular (Sylvén y col., 1974 ; Pietras y Roberts, 1981). La localización subcelular de la catepsina B testicular coincide con la distribución descrita para los tejidos en fase estacionaria de crecimiento a pesar de que el fraccionamiento subcelular se realizó a los 15 días de edad, correspondiente a la etapa logarítmica de crecimiento del órgano. La actividad de catepsina B se asoció principalmente a la fracción de 1979 xg, y a la que sedimenta a 9970 xg. La fracción rica en succinato deshidrogenasa, enzima marcadora de las mitocondrias, sedimentó a 1979 xg. La actividad de fosfatasa ácida, que denota la presencia de lisosomas, se encontró elevada en las dos fracciones que sedimentan a 1979 y 9970 xg.

La presencia de dos fracciones que presentan un enriquecimiento en actividad de catepsina B y de fosfatasa ácida (1979 y 9970 xg respectivamente), sugiere la existencia de dos poblaciones de lisosomas en el testículo, que difieren en su densidad, y por lo tanto requieren de

aceleraciones diferentes para sedimentar. Esta posibilidad es apoyada por observaciones realizadas por diversos autores. Desde los estudios realizados por deDuve y colaboradores (1975) se observaron diferencias pequeñas entre la distribución de hidrolasas ácidas y la densidad o tamaño de los lisosomas. Posteriormente se demostró la presencia de dos poblaciones de lisosomas en hígado: lisosomas pequeños, menos densos, enriquecidos en fosfatasa ácida y B-glucuronidasa y lisosomas grandes, más densos enriquecidos en nucleasas ácidas y catepsinas (Davies, 1975). Dobrotá y colaboradores (1979) encontraron que en ratas normales, la fosfatasa ácida se concentraba en los lisosomas más pequeños y menos densos. Esta observación coincide con el enriquecimiento de fosfatasa ácida en la fracción que sedimenta a una aceleración de 9970 xg, encontrada en el presente trabajo.

Mediante el uso de técnicas inmunolectroforéticas, Muno y col. (1990) examinaron el contenido de tres cistein proteinasas en diferentes poblaciones lisosomales de macrófagos de rata. Encontraron la actividad de catepsina B y H en la fracción de lisosomas más pesados. La catepsina L se recuperó en los lisosomas de baja densidad.

El hallazgo de que la actividad proteolítica, con $N\alpha$ -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA como sustrato, de la población enriquecida en espermatozoides primarios en el estadio paquiteno de la profase de la primera división meiótica fuera insensible al inhibidor de tripsina de soya y alcanzara niveles mayores que en los espermatozoides en estadio leptoteno sugiere una relación entre la progresión de la meiosis y la catepsina B. Aunque en las poblaciones celulares enriquecidas, obtenidas posteriormente (fig. 9) no se probó el efecto del inhibidor de tripsina de soya, las diferencias en la

actividad de catepsina B son significativas ($p < 0.01$) presentando un a actividad mayor también en el paquiteno.

Existen datos que apoyan la participación de las proteasas en la progresión de la meiosis. En ovocitos de rana se ha demostrado el aumento en la actividad de serino proteasas antes de que desaparezca el bloqueo en la profase I y los ovocitos prosigan su desarrollo hasta la metafase I (Morrill y Kostellaw, 1986).

A diferencia de la que ocurre en la hembra, la meiosis en el macho es un proceso continuo, sin bloqueos, con la peculiaridad de que la profase de la primera división meiótica se desarrolla lentamente

El estadio paquiteno de la primera división meiótica constituye un momento crucial en la diferenciación de las células germinales del macho. En la rata constituye el estadio de mayor duración y representa a las células germinales más activas en la síntesis de RNA y proteínas (Monesi, 1971 y Soderstrom y Parvinen, 1976).

Hasta el momento no se había reportado la presencia de alguna enzima proteolítica en este estadio de la meiosis del macho pero queda por definir qué proteínas son el sustrato de la catepsina B testicular en esta etapa de la diferenciación.

En el caso de las espermatídes, la presencia de actividad proteolítica en esta etapa del desarrollo del epitelio germinal es muy importante, ya que grandes porciones del citoplasma deben ser eliminados y los organelos

subcelulares sufren cambios drásticos o desaparecen, como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (Clermont y Rambourg, 1978).

Se ha propuesto que las células de Sertoli son las que llevan a cabo esta función, mediante la fagocitosis de los cuerpos residuales formados por las espermátides. Sin embargo, la presencia de enzimas proteolíticas en las células de la estirpe germinal nos llevan a proponer que el sistema de degradación lisosomal de la célula germinal le permitiría participar en este proceso.

Esta proteólisis podría estar asociada con la eliminación de proteínas específicas que no son necesarias en el espermatozoide maduro. Por ejemplo, la sustitución de las histonas nucleares, por un nuevo tipo de proteínas básicas, ricas en arginina denominadas protaminas (Klemm, 1989) durante la fase de maduración de las espermátides, requiere, aparentemente de su proteólisis (Marushige, 1976).

En apoyo a esta posibilidad se encuentran las observaciones de Marushige y Marushige (1983) quienes identificaron dos diferentes proteasas en el núcleo de las espermátides de rata, una de las cuales fue muy específica para hidrolizar histonas y la otra presentó propiedades hidrolíticas similares a las de acrosina.

De Lumen y Tappel desde 1973 reportaron que el hígado de rata posee una actividad capaz de hidrolizar histonas, que identificaron como la catepsina B2 una carboxipeptidasa lisosomal. Sin embargo existen restricciones para aceptar que la enzima proteolítica responsable de esta actividad sea la catepsina B2 ya que el parámetro que se consideró como referencia fue la

hidrólisis del sustrato benzoil- arginina-amida estimulada por DTT. Como se mencionó con anterioridad, este sustrato puede ser hidrolizado por varias enzimas por lo que se requiere de un estudio más a fondo para poder determinar si la actividad proteolítica detectada por estos autores es en realidad la catepsina B2 y no la B1, que se incrementa por la presencia de DTT.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que la catepsina B en el testículo de rata podría estar relacionada con dos procesos: la progresión de la meiosis y la diferenciación de las espermátides, pero resulta indispensable identificar sus sustratos normales en cada estadio de diferenciación para establecer su participación en estos procesos claramente.

CONCLUSIONES

1. El testículo de rata presenta una actividad de tiol proteinasa identificada como catepsina B por su sensibilidad a reactivos de grupos SH y por su inhibición total con E-64, inhibidor específico que reacciona con el residuo de cisteína del sitio catalítico de la enzima.
- 2.- En los homogeneizados totales de testículo no se detectó enriquecimiento en la actividad de catepsina B en una etapa específica del desarrollo testicular desde el nacimiento hasta 60 días de edad.
- 3.- Poblaciones de células germinales obtenidas a 15, 21 y 30 días de edad permitieron detectar diferentes niveles de actividad proteolítica durante la espermiogénesis.
- 4.- Los niveles más altos de actividad de esta tiol proteinasa se observaron durante los estadios tempranos de la profase meiótica y durante las primeras etapas de la espermiogénesis.
- 5.- La distribución subcelular de esta actividad proteolítica indica que es de localización lisosomal-mitocondrial así como también se asoció a los lisosomas de mayor densidad.
- 6.- Se confirmó el efecto inhibitorio del fosfato sobre la actividad de catepsina B.
- 7.- Esta actividad proteolítica está asociada al sistema de degradación lisosomal de la célula germinal.

8.- La actividad de catepsina B testicular parece estar relacionada con la diferenciación de las células de epitelio germinal aunque se requiere establecer su participación en la eliminación del material citoplásmico y/o de proteínas específicas que no se requieren en el espermatozoide maduro.

9.- El uso del inhibidor tripsina de soya nos permitió detectar la presencia de serino proteasas que participan en la hidrólisis del sustrato N α -CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeOBNA.

10.- La actividad de serino proteasas se presentó a diferentes niveles en las células germinales, siendo notoria su ausencia en la población de células ricas en espermatoцитos en paquiteno.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alemán, V.; Trejo, R.; Morales, E.; Hernández, F. y Delhumeau, G. (1978) A simple rapid technique to isolated enriched population of spermatocytes and spermatids from the immature rat testis. *J Reprod Fertil* **54**:67.
- 2.- Allison, A.C. y Hartree, E.F. (1970) Lysosomal enzymes in the acrosome and their posible role in the fertilization. *J Reprod Fertil* **21**:501.
- 3.- Aronson, N.N. y Touster, O. (1974) Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods in Enzymology* Vol XXI part A. Academic Press pp 90.
- 4.- Barret, A.J. (1973) Human cathepsin B1: Purification and some properties of the enzyme. *Biochem J* **131**:809.
- 5.- Barret, A.J. (1977) Proteinases in mammalian cells and tissues. Vol 2. Dingle, J.T. & Barret, A. J. (eds). North Holland Publishing Amsterdam.
- 6.- Barret, A.J.; Kembhavi, A.A.; Brown, N.A.; Kirschke, H.; Knight, C.G.; Tamai, P.M. y Hanada, K. (1982) 1-trans-Epoxy succinyl-leucilamido(4-guanidino)butane and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J* **201**:189.
- 7.- Bond, J.S. y Butler, P.E. (1987) Intracellular proteases. *Ann Rev Biochem* **56**:333.

- 8.- Bryan, A.C.; Ackel, E.D. y Singer, T. (1978) Mammalian succinate deshidrogenase. *Methods in Enzymology* Vol LIII. Academic Press, NY. pp 466.
- 9.- Clermont, Y. y Perey, B. (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rat. *Am J Anat* **100**:241.
- 10.- Clermont, Y. y Rambourg, A. (1978) Evolution of the endoplasmic reticulum during rat spermiogenesis. *Am J Anat* **151**:191.
- 11.- Daniel, W:W: (1977) *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.* México, LIMUSA. pp283.
- 12.-Davies, M. (1975) The heterogeneity of lysosomes. En: *Lysosomes in Biology and Pathology.*Vol 4. Dingle, J.T. & Dean, R.T. (eds). North Holland Amsterdam pp 305.
- 13.- Dean, R.T. (1976) The roles of the cathepsins B1 and D in the digestion of cytoplasmic proteins in vitro by lysosomal extracts. *Biochem Biophys Res Commun* **68**(2):518.
- 14.- deDuve, C.; Presman, C.G.; Gianetto, R.; Wattiaux, R y Apelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissues. *Biochem J* **60**:604.
- 15.- deLumen, B.O. y Tappel, A.L. (1973) Histone hydrolase activity of rat liver lysosomal cathepsin B2. *Biochim Biophys Acta* **293**:217.

- 16.- Distelmaier, P.; Hübner, H. y Otto, K. (1972) Cathepsins B1 and B2 in various organs of the rat. *Enzymologia* **42**:363.
- 17.- Dobrota, M.; Burge, M.L.E. y Hinton R.H. (1979) Apparente heterogeneity of hepatic lysosomes due to membrane-bound acid phosphatase. *Eur J Cell Biol* **19**:139.
- 18.- Fabiato & Fabiato (1970) Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fiber with disrupted or closed sarcolemman calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Circ Res* **31**:293.
- 19.- Golberg, A.L. y St. John, A.C. (1976) Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. Part 2. *Ann Rev Biochem* **45**:747.
- 20.- Greenbaum, C.M. y Fruton, J.S. (1957) *J Biol Chem* **226**:173.
21. - Haber, A y Runyan, R:P: (1972) Estadística general. México, Fondo Educativo Interamericano. pp246.
- 22.- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt Biochem* **48**:422.
- 23.- Hershko, A. y Ciechanover, A. (1982) Mechanims of intracellular protein breakdown. *Ann Rev Biochem* **51**:335.
- 24.- Huseby, R.M. y Smith, R.E. (1980) Synthetic oligopeptide substrates. Their diagnostic application in blood coagulation, fibrinolysis, on other

pathologic states. En: Seminars in thrombosis and hemostasis. Vol VI No. 3. Mammen E.F. (ed). Thieme-Stratton Inc. NY pp 173.

25.- Iodice, A.A.; Chin, J.; Perker, S. y Weinstock, I.M. (1972) Cathepsins A, B, C, D, and autolysis during development of breast muscle of normal and dystrophic chickens. Arch Biochem Biophys **152**:166.

26.- Klemm, V.; Lee, C-H.; Burfeind, P.; Hake, S. y Engel, W. (1989) Nucleotide sequence of a cDNA encoding rat protamine and the haploid expression of the gene during rat spermiogenesis. Biol Chem **370**:293.

27.- Lacroix, M.; Parvinen, M. y Fritz, I.B. (1981) Secretion of plasminogen activator in discrete portions (stages VII and VIII of seminiferous tissue). Biol Rep **25**:143.

28.- Lacroix, M.; Smith, F.E. y Fritz, I.B. (1982) Secretion of plasminogen activator by Sertoli cells enriched cultures. Mol Cell Endocrinol **9**:209.

29.- Lacroix, M.; Smith, F.E. y Fritz, I.B. (1982) Changes in levels of plasminogen activator activity in normal and germ-cell depleted-testes during development. Mol Cell Endocrinol. **26**:259.

30.- Leblond, C.P. y Clermont, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann NY Academic Sci. **55**:548.

- 31.- Lui, C.W. y Meizel, S. (1979) Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction. *J Exp Zool* **207**:173.
- 32.- Marushige, Y.; Marushige, K. y Wong, T.K. (1976) Complete displacement of somatic histones during transformation of spermatid chromatin: a model experiment. *Biochemistry* **15**:2047.
- 33.- Marushige, Y y Marushige, K. (1983) Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin. *Biochim Biophys Acta* **761**:48.
- 34.- McNamee, M.G. (1989) Isolation and characterization of cell membranes. *Biotechniques* **7**(5):566.
- 35.- Mego, J.L. (1971) The effect of pH on cathepsin activities in mouse liver heterolysosomes. *Biochem J* **122**:445.
- 36.- Miyamoto, M.; Terayama, A. y Onhishi, T. (1975) Effects of protease inhibitors on liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **55**:84.
- 37.- Monesi, V. (1965) Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Exptl Cell Res* **39**:197.
- 38.- Monesi, V. (1971) Chromosome activities during meiosis and spermiogenesis. *J Rep Fertil* **13**:1.

- 39.- Morton, D.V. (1977) The occurrence and function of proteolytic enzymes in the reproductive tract of mammals. En: Proteinases in mammalian cells and tissues. Vol 2. Barret A.J. & Dingle, J.T. (eds). North-Holland Press NY pp 445-500.
- 40.- Morland, B. (1985) Cathepsin B activity in human blood monocytes during differentiation *in vitro*. Scand J Immunol 22:9
- 41.- Morrill, G.A. y Kostellow, A.B. (1986) The role of calcium in meiosis. En: Calcium and cell function. Vol VI. Cheung, W.Y. (ed). Academic Press, Inc.
- 42.- Muno, D.; Sutoh, N.; Watanabe, T.; Uchiyama, Y. y Kominami, E. (1990) Effect of metabolic alterations on the density and the contents of cathepsins B, H, and L of lysosomes in rat macrophages. Eur J Biochem 191:91.
- 43.- Nishimura, Y. y Kato, K. (1987) Intracellular transport and processing of lysosomal cathepsin B. Biochim Biophys Res Commun. 148(1):254.
- 44.-Otto, K. (1971) Cathepsins B1 and B2. Purification from bovine spleen and properties (with survey of their occurrence in various organs of the rat). En: Tissue proteinases. Barret, A.J. & Dingle, J.T. (eds). North Holland Publishing Co. pp 1-28.

- 45.- Pietras, R.J. y Roberts, J.A. (1981) Cathepsin B-like enzymes. Subcellular distribution and properties in neoplastic and control cells from human ectocervix. *J Biol Chem* **256**(16):8536.
- 46.- Scher, W: (1987) Biology of disease. The role of extracellular proteases in cell proliferation and differentiation. *Lab Invest* **57**(6):607.
- 47.- Scott, R.P.; Ninjoor, V. y srivastava, P.N. (1987) Isolation and characterization of cathepsin B from rabbit testis. *J Reprod Fertil* **79**:67.
- 48.- Smith, R.E. y Van Frank, R.M. (1975) The use of amino acid derivates of 4-methoxy-B-naphtylamine for the rat assays and subcellular localization of tissues proteinases. En: *Lysosomes in Biology and Pathology Vol 4*. Dingle, R.T. & Dean, R.T. (eds). North Holland Press NY. pp 193-249.
- 49.- Smith, R.E. (1984) Identification of protease isoenzymes after analytical isoelectric focusing using fluorogenic substrates impregnated into cellulose membranes. *J Histochem Cytochem* **32**(12):1265.
- 50.- Söderström, K.P. y Parvinen, M. (1976) RNA synthesis in different stages of rat seminiferous epithelial cycle. *Mol Cell Endocrinol* **5**:181.
- 51.- Stambaugh, R. y Buckley, J. (1970) Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus monkey, and human spermatozoa. *Biol Rep* **3**:275.

- 52.- Sylvén, B.; Snellman, O. y Sträuli, P. (1974) Immunofluorescent studies on the occurrence of cathepsin B1 at tumor cell surfaces. *Virchows Arch B Cell Path* **17**:97.
- 53.- Szego, C.M.; Seeler, B.J. y Smith, R.E. (1976) Lysosomal cathepsin B1: partial characterization and recombination in response to estradiol 17- β . *Eur J Biochem* **64**:463.
- 54.- Takahashi, K. (1980) Location of essential thiol of porcine liver cathepsin B. *J Biochem* **87**:347.
- 55.- Takahashi, T.; Yonezawa, S.; Dehdarani, A.H. y Tang, J. (1986) Comparative studies of two cathepsin B isoenzymes from porcine spleen. Isolation, polypeptide chain, arrangement, and enzyme specificity. *J. Biol Chem* **261**(20):9368.
- 56.- Tallan, H.H.; Jones, M.E. y Fruton, J.S. (1952) *J Biol Chem* **84**:793.
- 57.- Towatari, T.; Kawabata, Y. y Katunuma, N. (1979) Crystallization and properties of cathepsin B from rat liver. *Eur J Biochem* **102**:279.
- 58.- Umezawa, H.; Aoyagi, H.; Morishima, S.; Kumimoto, S.; Matsuzaki, M.; Hamada, M. y Takeuchi, T.J. (1970) *J Antibiot* **23**:425.
- 59.- Van Belle, H. (1972) Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues. *Biochim Biophys Acta* **289**:158.

60- Vasishtha, A; Baker, P.R.; Preece, P.E.; Wood, R.A.B. y Cuschieri, A.
(1988) Inhibition of proteinase-like peptidase. Activities in serum and
tissue from breast cancer patients. *Anticancer Res* **8**:785.

61.- Ward, C.J.; Crocker, J.; Chan, S.J.; Stockley, R.A. y Burnett, D.
(1990) Changes in the expression of elastase and cathepsin B with
differentiation of U937 promonocytes by GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun*
167 (2):659.

62.- Web, J.L. (1966) *Enzyme and metabolic inhibitors*. Academic Press NY
Vol II. pp 635.

APENDICE I

PREPARACION DE SOLUCIONES

1.- Solución de sacarosa 0.25 M + Hepes 20 mM pH 7.4

Se pesaron 85,575 g de Sacarosa y se disolvieron en 250 ml de agua. También se pesaron 4.76 g de HEPES y se disolvieron en 250 ml de agua. Las soluciones así obtenidas se juntaron y se llevaron a un volumen de 900 ml. Posteriormente se ajustó el pH de la solución a 7.4 con HCl 1N. y se aforó a un litro.

2.- Solución salina 0.9% amortiguada con Hepes 20 mM.

Se pesaron 9 g de NaCl y se disolvieron en 300 ml. de agua. Se pesó también 4.766 g de HEPES y se disolvieron en 300 ml. de agua destilada. Ambas soluciones se combinaron y se aforó a un volumen final de 1 litro. Esta solución se esteriliza por filtración. (filtro milipore de 0.22 μ m)

3.- Medio mínimo esencial de Eagle (MEM)

La presentación del MEM es de 11.4 g que deben llevarse a 1 l. Para prepararlo se disuelve el contenido del sobre (11.4g) en un poco de agua bidestilada a temperatura ambiente, enjuagando cuidadosamente el sobre para evitar pérdidas del compuesto, se agita suavemente. Adicionar 4.766 g de HEPES para que en la solución quede a una concentración final de 20 mM una vez diluido llevar a 900 ml con agua destilada ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N. Después de ajustar el pH esterilizar por filtración.

4.- Solución colagenasa 0.4%

Se agregán 8 mg de colagenasa por cada g. de tejido.

5.- Gradientes de Dextran T-500

a) Solución al 7% (P/P)

Pesar 1.4 g de Dextran y 18.6 g de la solución de MEM

pF=20g

b) Solución al 8.6%

Pesar 1.806 g de Dextran y 19.19 g de la solución de MEM

pF=21g

c) Solución 11%

Pesar 2.31 g de Dextran y 18.69 g de la solución de MEM

pF=21g

d) Solución 13.33%

Pesar 2.79 g de Dextran y 18.2 g de la solución de MEM

pF=21g

e) Solución 16.66%

Pesar 2.99 g de Dextran + 15.0 g de la solución de MEM

pF=18 g

Las soluciones así pesadas se disuelven y se colocan en tubos de centrifuga para formar los gradientes.

CELULAS
7.6%
8.6%
11%
13%
16.6

* Las cantidades se pesan en un vaso de precipitado de 50 ml previamente tarado.

6.- Formol al 3%

Se tomaron 3 ml de formol 40% y se diluyeron con 100 ml de MEM.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE CATEPSINA B

7.- Amortiguador de fosfato de sodio 20mM + citrato de sodio 20mM pH 5.4

Se pesaron 5.88 gr de citrato de sodio y se disolvieron en 300 ml de agua, al mismo tiempo se pesaron 2.839 g de fosfato de sodio monobásico y se disolvieron en 300 ml de agua destilada. Las dos soluciones se juntaron y se llevaron a un volumen final de 900 ml. Se ajustó el pH a 5.4 con HCl 1N se aforó finalmente a 1000 ml.

8.- DTT (Ditiotreitol) 5mM

Debido a que este compuesto es muy inestable se requiere que su preparación se realice momentos antes de utilizarse. La cantidad que se pesa de este reactivo depende del volumen de amortiguador a usar en el

ensayo enzimático. Por ejemplo para 40 ml de amortiguador pH 5.4 se pesaron 0.03084 g de DTT, para 20 ml 0.01542 g.

9.- Sustrato N α -benciloxi-Arginil-Arginil-4metoxi-B-naftilamida 250 μ M.

Debido a que la cantidad de sustrato que debía pesar era muy pequeña y a que no es fácil de manejar se optó por preparar todo el contenido del frasco y hacer alicuotas.

Cuando el reactivo tenía una presentación de 50 mg se le adicionó primero 1 ml de amortiguador usado en el ensayo enzimático, así como también 250 μ l de DMSO ya que al principio el sustrato no es totalmente soluble en el amortiguador.

Finalmente el volumen se afora a 22.9 ml con amortiguador pH 5.4 para obtener una concentración final de 250 μ M por cada 0.1 ml de solución dado a que el peso molecular del sustrato es 873.7

NOTA** Debido a que estos compuestos son altamente tóxicos y son posibles carcinógenos se recomienda manejarlos con guantes y cubreboca así como muy cuidadosamente.

10.- Solución patrón de 4 metoxi-B-naftilamina.

Debido a que la cantidad para pesar de 4MeONa es muy pequeña se preparó una solución concentrada.

Se pesaron 5 mg de 4MeONA y se disolvieron en 500 ml del amortiguador de citrato/fosfato pH 5.4 o del amortiguador utilizado en la incubación (solución 10 mg/ml).

Posteriormente se hizo una dilución 1:10 al momento de usarse para que la concentración real sea 1 mg /ml. Ej: 0.3 ml de solución estandar se llevan a 3 ml con el amortiguador. Usar guantes y cubreboca.

11.- Solución de sacarosa 0.25 M, Tris 0.05 M, MgCl₂ 5mM pH 7.4

Se pesaron 85,575 gr. de sacarosa y se disolvieron en 250 ml de agua. También se peso 6.055 g de Tris y 1.0165 g de cloruro de magnesio (Mg Cl₂) disolviendolos en 250 ml de agua destilada. Ambas soluciones se mezclaron y se llevaron a un volumen de 900 ml. Se ajusto el pH a 7.4 con HCl 1N, se aforó a un litro y se almacenó bajo refrigeración.

12.- Sustrato Na-CBZ-Ala-Arg-Arg-4MeONa 250uM.

Se preparó igual que el anterior tomando en cuenta que el PM de este compuesto es de 856.3 g por lo que al final se aforó a un volumen de 23.35 ml.

13.- Diferentes concentraciones de sustrato.

Como todo el sustrato se preparó a una concentración de 250 uM por cada 0.1 ml que se tomen, para obtener las soluciones a diferentes concentraciones del sustrato, se realizaron las siguientes diluciones.

D I L U C I O N

250 uM:	Tomar	1 ml solución concentrada (original)
200 uM:		0.8 ml sol. original + 0.2 ml amortiguador 1:1.25
150 uM:		0.6 ml sol. original + 0.4 ml amortiguador 1:1.66
100 uM:		0.4 ml sol. original + 0.6 ml amortiguador 1:2.5
75 uM:		0.3 ml sol. original + 0.7 ml amortiguador 1:3.33
50 uM:		0.2 ml sol. original + 0.8 ml amortiguador 1:5
25 uM:		0.1 ml sol. original + 0.9 ml amortiguador 1:10

14.- Amortiguador acetato de sodio 40 mM

Se pesaron 0.16 g de acetato de sodio y se disolvieron en 40 ml de agua destilada. Esta operación se repitió 6 veces ya que se requiere que esta solución presente valores diferentes de pH. El pH que se desea fue de 3.0, 3.5 4.0 4.5 5.0 y 5.4 y fue ajustado con HCl 1N aforando al final a 50 ml c/sol.

15.- Citrato de sodio 20 mM/fosfato de sodio 20 mM.

Se pesaron 0.294 g de citrato de sodio y se disolvieron en 10 ml de agua destilada, también se pesaron 0.1419 g de fosfato de sodio monobásico y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Ambas soluciones se mezclaron y se llevaron a un vol. de 40 ml. el pH se ajustó al valor deseado con HCl 1N. Los pH deseados fueron 5.0, 5.4, 5.8, 6.2 y 6.8 se aforó a 50 ml cada solución.

16.- Hepes 40 mM.

Se pesaron 0.4766 g de Hepes y se disolvieron en 45 ml de agua destilada. Esta solución se realizó por triplicado ya que cada una se ajustó a un valor de pH diferente (pH = 7.0 7.5 y 8.0) con HCl 1N. El volumen final fué de 50 ml para cada solución.

17.- EDTA a diferentes concentraciones

Para lograr las diferentes concentraciones de EDTA se pesaron las siguientes cantidades:

CONCENTRACION	GRAMOS EDTA	VOLUMEN FINAL	VOL. QUE TOMAR
=====	=====	=====	=====
a) 0.5 mM	0.0380	100 ml	0.1 ml
b) 0.75 mM	0.1156	100 ml	0.1 ml
c) 1.0 mM	0.1542	100 ml	0.1 ml
d) 2.5 mM	0.3855	100 ml	0.1 ml
e) 5.0 mM	0.03855	5 ml	0.1 ml
f) 7.5 mM	0.0578	5 ml	0.1 ml
g) 10.0 mM	0.0771 mg	5 ml	0.1 ml

La concentración de EDTA de cada una de las concentraciones está calculada para que al tomar 0.1 ml de cualquier solución se tenga la concentración deseada (ej. 0.1 ml de la solución a tiene una concentración de 0.5 mM)

18.- Diferentes concentraciones de DTT.

Para obtener las diferentes concentraciones de DTT se pesaron las siguientes cantidades: (el calculo se realizó para, que al tomar 0.1 ml de cualquier solución se tuviera la misma concentración al final).

CONCENTRACION	GRAMOS DTT	VOLUMEN FINAL	VOL. QUE TOMAR
=====	=====	=====	=====
0.25 mM	0.0103 g	10 ml	0.1 ml
0.5 mM	0.0206 g	10 ml	0.1 ml
1.0 mM	0.0412 g	10 ml	0.1 ml
2.5 mM	0.103 g	10 ml	0.1 ml
5 mM	0.2061 g	10 ml	0.1 ml
10 mM	0.4120 g	10 ml	0.1 ml

19.- Iodoacetamida.

Para obtener las diferentes concentraciones de Iodoacetamida se realizó el calculo de las cantidades a pesar para tener siempre en un volumen de 0.100 ml la concentración deseada.

CONCENTRACION	GRAMOS IAA	VOL. FINAL	VOL. QUE TOMAR
=====	=====	=====	=====
0.5 mM	0.009245	10 ml	0.1 ml
0.75 mM	0.01385	10 ml	0.1 ml
1.0 mM	0.01849	10 ml	0.1 ml
2.5 mM	0.04623	10 ml	0.1 ml

CONCENTRACION	GRAMOS IAA	VOL. FINAL	VOL. QUE TOMAR
=====	=====	=====	=====
5.0 mM	0.09245	10 ml	0.1 ml
7.5 mM	0.1386	10 ml	0.1 ml
10 mM	0.1849	10 ml	0.1 ml

20.- Leupeptina

Debido a que las concentraciones utilizadas son muy pequeñas ya que estan en el rango de 1×10^{-4} a 1×10^{-9} se preparó una solución patrón de la cual se hicieron diluciones. La concentración final siempre será referida a un volumen de 0.1 ml.

Sol. Patrón 1 mM de Leupeptina (1×10^{-3} M): pesar 0.05026 g del compuesto llevarlo a 10 ml con agua destilada.

Sol (A) 0.1 mM 1×10^{-4} tomar 1 ml sol patrón y llevarlo a 10 ml con agua

Sol (B) 0.01 mM 1×10^{-5} tomar 1 ml sol (A) y llevarlo a 10 ml con agua

Sol (C) 0.001 mM 1×10^{-6} tomar 1 ml sol (B) y llevarlo a 10 ml con agua

Sol (D) 0.0001 mM 1×10^{-7} tomar 1 ml sol (C) y llevarlo a 10 ml.

Sol (E) 0.00001 mM 1×10^{-8} tomar 1 ml sol (D) y llevarlo a 10 ml.

Sol (F) 0.000001 mM 1×10^{-9} tomar 1 ml sol (E) y llevarlo a 10 ml.

21.- E-64

Tomando en cuenta que el PM del E-64 es 357.4 se pesaron 2 mg y se disolvieron en 5.6 ml de agua destilada para obtener concentración final de 100 μ M por cada 100 μ l de la solución.

Como la concentración real que se necesita para el ensayo es de 30 μM por cada 100 μl , se realizó una dilución.

Se tomaron 0.60 ml de la sol. 100 μM y se le agregaron 1.4 ml de agua, de aquí se tomaron 100 μl para cada tubo.

22.- Amortiguador MES 40 mM pH 5.4

Se pesaron 7.808 g de MES y se disolvieron en 900 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 5.4 con HCl 1N y se aforó finalmente a 1000 ml.

23.- Amortiguador MES a diferentes valores de pH

Se pesaron 0.3904 g de MES y se llevaron a 40 ml con agua destilada. Ajustando el pH con HCl 1N. Esta operación se repitió varias veces ya que se deseaba obtener diferentes valores de pH en el amortiguador como son: 5.0, 5.4, 5.8, 6.2 y 6.6.

24.- DPBS (solución salina de Dulbecco)

Esta solución contiene la siguiente mezcla de reactivos: NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, KH_2PO_4 14 mM, NaH_2PO_4 8 mM MgCl_2 0.49 mM y CaCl_2 0.68 mM.

Pesar: 7.9478 g de NaCl, 0.0996 g de MgCl_2 , 0.09997g de CaCl_2 y 0.1938 g de KCl. Disolverlos en 250 ml de agua destilada.

Pesar: 0.1905 g de KH_2PO_4 y 1.135 g de NaH_2PO_4 . Disolverlos en 250 ml de agua destilada. Juntar las dos soluciones y llevarlo a 800ml de agua ajustar el pH a 7.2. Aforar a 1000 ml y esterilizar por filtración.

SOLUCIONES PARA CUANTIFICACION DE PROTEINA

1.- Solución patrón de albúmina (BSA) 100 ug/ml.

Se pesaron 10 mg de albúmina y se aforaron a 100 ml con agua destilada cuidando de no agitar mucho la solución para evitar la formación de burbujas. Guardar a 4° C.

2. Reactivo A.

Pesar 2g de tartrato doble de sodio y potasio y 100 g de bicarbonato de sodio. Disolverlos en 20 ml de agua destilada y agregarle 50 ml de NaOH 1N; aforar a 100 ml con agua destilada. Almacenar en un frasco de plástico, a temperatura ambiente.

3.- Reactivo B.

Pesar 2 g de tartrato doble de sodio y potasio y 1 g de sulfato de cobre llevarlo a 50 ml con agua destilada agregar, 10 ml. de NaOH 1N, aforar a 100 ml. Almacenar en una botella de plástico a temperatura ambiente.

4.- Reactivo C.

Tomar del reactivo comercial de Folin-Cilcoteau 2M de Sigma 1 ml y aforarlo a 15 ml con agua destilada para obtener una concentración final de 0.15 N. esta solución se debe preparar en el momento de su utilización.

ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE 4MEOBNA

Se determinó el espectro de emisión y de excitación de la 4-metoxi-B-naftilamida bajo nuestras condiciones de experimentación. Para determinar la longitud de onda que permitiría la mejor excitación del compuesto se hizo incidir un haz de luz de una longitud de onda que comprendiera un rango de 250 a 500 nm. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida cada 5 nm. La longitud de onda de emisión se mantuvo constante a 425 nm.

El espectro de emisión fué determinado manteniendo a 290 nm la longitud de onda de excitación y variando de 250 a 500 nm la longitud de emisión. Registrando la fluorescencia emitida $c/5$ nm.

Los resultados mostraron que las longitudes de excitación y de emisión óptima para medir la fluorescencia de este compuesto son 290 y 425 nm respectivamente.

Al mismo tiempo se observó el efecto del pH sobre la fluorescencia emitida por la 4MNA. En la fig. 1 se observa que a un pH 1.8, la fluorescencia disminuye dando un valor menor, al compararla con los valores obtenidos a pH 7.0. Esto implicaba que bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo la fluorescencia podía ser subestimada.

Ya que el valor de pH 7.0 se obtiene en la mezcla de la curva patrón, mientras que el valor de pH 1.8 es el resultado de la adición de 0.5 ml de HCl, 1N utilizado para detener la reacción enzimática.

Es importante mencionar que la fluorescencia de la 4MeOBNA también es influida por el tipo de amortiguador utilizado para su preparación. Esta diferencia fué corregida en la curva patrón de 4-MeOBNA, mediante el empleo de HCl, 1N en las mismas condiciones del ensayo para catepsina.

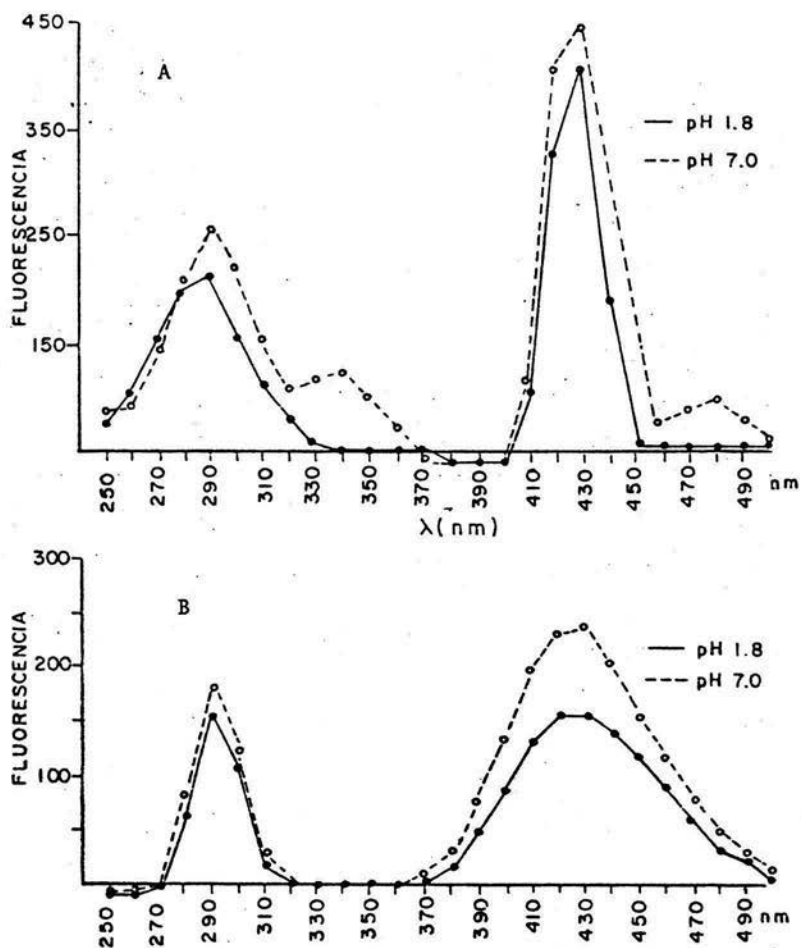


FIGURA 18.- (A) Espectro de emisión de la 4-metoxi-B-naftilamina. La longitud de excitación se mantuvo en un valor constante de 425 nm, mientras que la longitud de emisión se midió en el rango de 250 a 500nm. (B) Espectro de excitación de la 4-metoxi-B-naftilamina. La longitud de emisión se mantuvo en un valor constante de 290 nm, mientras que la longitud de excitación se midió en el rango de 250 a 500nm. Las condiciones de experimentación variaron en cuanto al pH de la muestra patrón de 4MeOBNa, utilizando dos valores de pH.

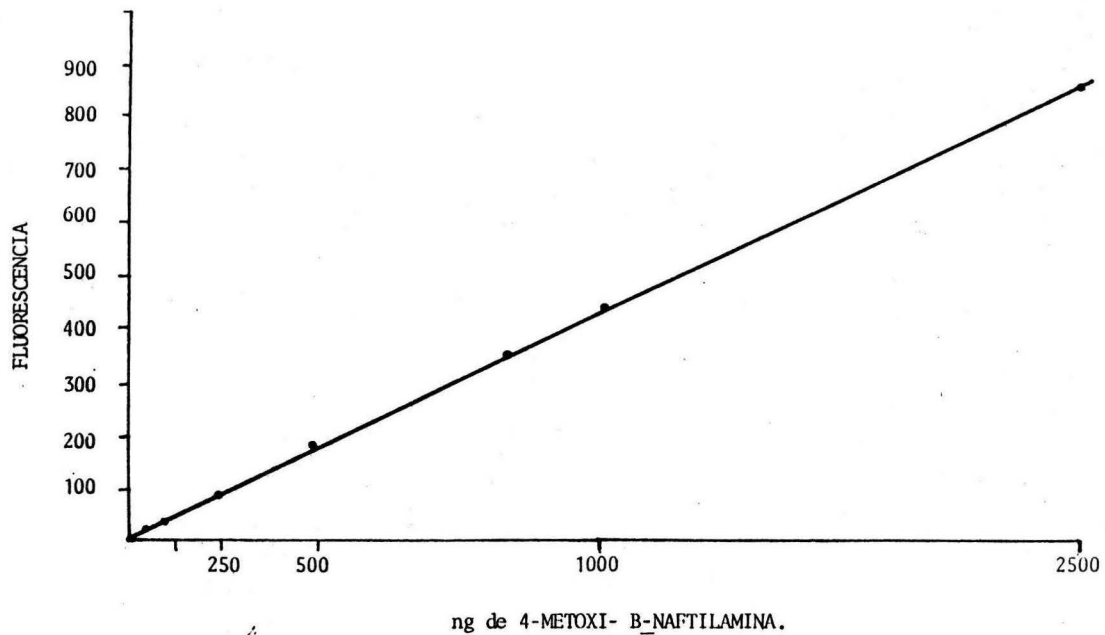


FIGURA 19.-Curva estándar de 4-metoxi-B-naftilamina, Se midió su fluorescencia a 290 de emisión y 425 nm de excitación.

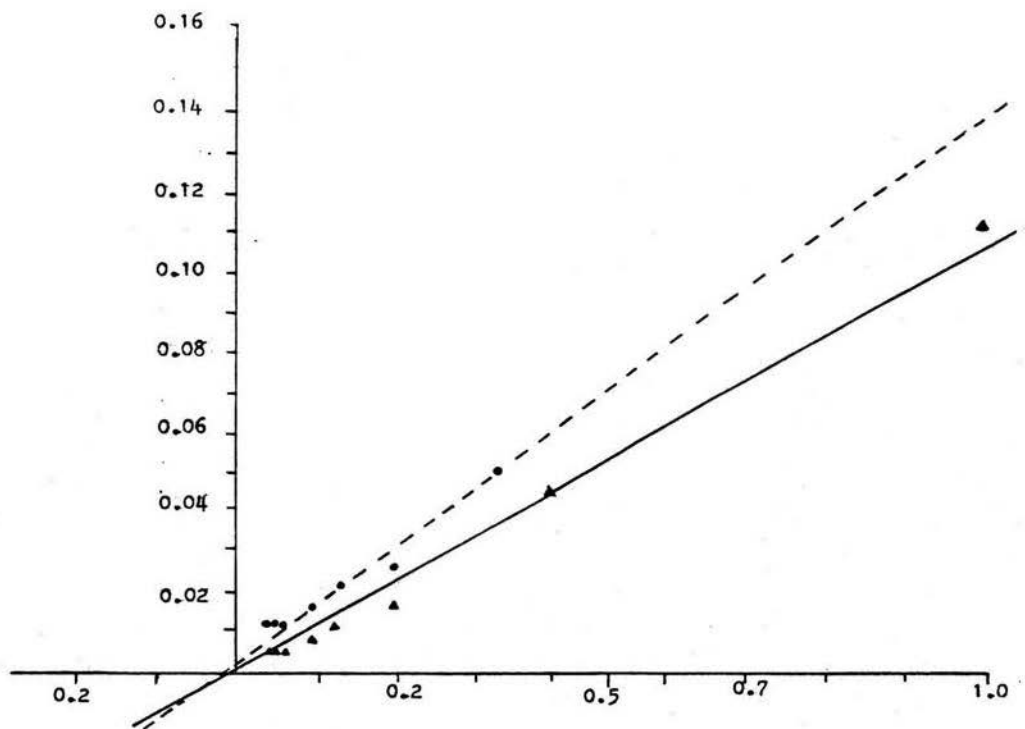
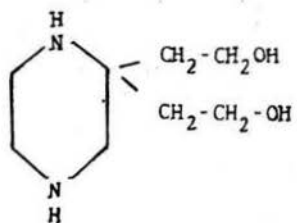
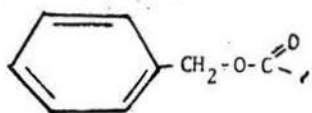


FIGURA 20.- Cálculo de la K_m por el método de Lineaweaver-Burk para los dos sustratos utilizados en la figura 12 del efecto de la concentración de sustrato.

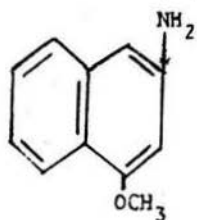
APENDICE II



HEPES



Carbobenciloxi



4-metoxi-N-NAFTILAMINA