

00568

12

14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) y calmodulina
durante la espermatogénesis

TESIS QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIM.
ESPECIALIDAD (BIOQUIMICA)
PRESENTA
Raquel Trejo Albarrán

1982

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

Indice	Página
I- INTRODUCCION	
Características Estructurales	1
A) Diferenciación del epitelio germinal	1
Espermatogonias	2
Espermatocitos primarios	3
Espermátidas	5
B) Organización del epitelio germinal	5
Cambios Metabólicos durante la diferenciación del epitelio germinal	
A) Metabolismo de carbohidratos	8
B) Metabolismo de lípidos	9
C) Actividad hidrolítica de ATP testicular	11
II- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
III- O B J E T I V O S	13
IV- PROGRAMA DE TRABAJO	13
A) Evolución de la actividad hidrolítica de ATP a través de la diferenciación del epitelio germinal	13
B) Actividad hidrolítica de ATP testicular durante la regresión del epitelio germinal	
a) Hipofisectomía	14
b) Criptorquidia	15
c) Tratamiento con fluoroacetamida	15

Indice

Página

- C) Desarrollo de Metodología para separar poblaciones de células germinales 15
- D) Localización y cuantificación de calmodulina, proteína activadora de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en las poblaciones de células germinales aisladas 16
- E) Determinación de la Actividad ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en las poblaciones de células germinales durante su diferenciación 16

V- R E S U L T A D O S

- A) Changes of (Ca²⁺ - Mg²⁺)-adenosine-triphosphate activity in rat testis throughout maturation. 18
- B) Increase of (Ca²⁺ - Mg²⁺)-adenosine triphosphatase activity in rat testis undergoing regression of the germinal epithelium. 23
- C) A simple and rapid technique to isolate enriched populations of spermatocytes and spermatids from the immature rat testis. 28
- D) Calmodulin content and localization in male germ cells during meiotic and postmeiotic stages and epididymal maturation. 39
- E) Identificación de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en células germinales en distintos estadios de la espermatogénesis. 61

Indice

Página

VI- RESUMEN Y CONCLUSIONES

90

VI- B I B L I O G R A F I A

94

I INTRODUCCION

El testículo es un órgano que puede considerarse como una glándula mixta, con funciones endócrinas y exócrinas que residen en compartimentos y tipos celulares distintos. La función endócrina es realizada en el compartimento intertubular por las células de Leydig, responsables de la producción de andrógenos. La función exócrina se efectúa en el interior de los túbulos seminíferos, constituyentes del segundo gran compartimento testicular y cuyo producto son los gametos masculinos (1).

Estas dos funciones son adquiridas a través de procesos de diferenciación celular que se presentan tanto en el compartimento intersticial como en el intratubular (2).

En este trabajo, nuestro interés ha sido enfocado al estudio de algunos de los fenómenos bioquímicos que se presentan en el compartimento intratubular durante la espermatogénesis.

A) Diferenciación del epitelio germinal

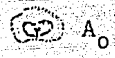
El conocimiento de la aparición cronológica de los distintos tipos celulares durante la espermatogénesis se reduce a pocas especies. Entre éstas, destaca la información existente acerca de la rata, que es el animal de experimentación empleado en este trabajo y a la cual se refieren los siguientes datos (3):

Al nacimiento, los túbulos seminíferos existen como cordones sexuales constituidos por dos tipos de células: las somáticas o de soporte, colocadas en la periferia del cordón y los gonocitos, que ocupan irregularmente la porción central. Los gonocitos se multiplican y diferencian en espermatogonias, que forman parte del epitelio germinal desde el cuarto día después del nacimiento. Morfológicamente pueden distinguirse tres tipos principales de espermatogonias, correspondien -

Esquema 1

DIFERENCIACION DE LAS ESPERMATOGONIAS

Espermatogonias
tipo A



A₀



A₁



A₂



A₃



A₄

Espermatogonia
Intermedia



Espermatogonia
tipo B



Espermatocito
primario en reposo



Producto de la diferenciación
de las espermatogonias.

Las espermatogonias, en sus diversas etapas de diferenciación, son diploides (2n), en contenido de DNA y en número de cromosomas, se dividen por mitosis.

tes a tres etapas de diferenciación y que se conocen como A, Intermedia y B. Las primeras en aparecer son las tipo A. las Intermedias y las B aparecen al sexto día (Esquema 1).

Desde los nueve a los doce días de edad, aparece un nuevo tipo celular, producto de la diferenciación de las espermatogonias tipo B: los espermatocitos primarios. La diferenciación de los espermatocitos primarios incluye la meiosis, proceso fundamental para la formación de gametos. La meiosis consta de dos divisiones celulares sucesivas, en donde sólo antes de la primera división las células sintetizan DNA y duplican su contenido diploide ($2n$), dando por resultado células tetraploides ($4n$). Estas células, después de realizada la primera división, dan lugar a células diploides ($2n$) que a su vez, tras la segunda división, originan células haploides (n) tanto en contenido de DNA como en su número de cromosomas (4).

En la rata, la primera división meiótica testicular presenta como característica muy peculiar la lentitud con que se efectúa la primera de sus fases. Solamente la profase se realiza en aproximadamente 12 días (3). Basándose en la morfología nuclear es posible definir el estadio de la meiosis que han alcanzado los espermatocitos (Esquema 2), designándose de acuerdo a ella como:

Espermatocitos primarios en reposo o espermatocitos preleptotenos.

Espermatocitos leptotenos.- Este estadio marca el inicio de la primera profase meiótica. En esta etapa, el contenido de DNA por célula es tetraploide ($4n$) y está organizado en cromosomas contraídos y con espiralización máxima. Aparece a los doce días de edad.

Espermatocitos zigotenos.- Los cromosomas homólogos forman pares y se ven engrosados, forman complejos sinaptonemales. Los nucleolos se hacen más visibles. Este estadio de diferenciación se alcanza a los quince días de edad.

Espermatocitos paquitenos.- Los cromosomas siguen engrosándose mientras se dividen longitudinalmente, excepto en la región del centrómero y se distribuyen en todo el

Esquema 2

DIFERENCIACION DE LOS ESPERMATOCITOS

Espermatocito primario
en reposo



Inicialmente son células di-
ploides (2n), pero antes de
la meiosis, duplican su conte-
nido de DNA, transformándose
en células tetraploides (4n).

PRIMERA DIVISION MEIOTICA

Primera Profase Meiótica



Leptotenos (4n)



Zigotenos (4n)



----- Paquitenos (4n) -----



Diacinesis (4n)



Metafase



Anafase



Telofase

Espermatocitos
secundarios (2n)



SEGUNDA DIVISION MEIOTICA

Profase.- No presenta las características de la primera profa-
se meiótica.

Metafase

Anafase

Telofase

Espermátidas
(células haploides, n)



Producto de la diferencia
ción de los espermatocitos.

núcleo. Puede presentarse una forma difusa donde los cromosomas forman asas. Estas células hacen su aparición entre los quince y los dieciocho días de edad.

La transición zigoteno-paquiteno, así como el estadio paquiteno mismo, son particularmente importantes porque en esta etapa se manifiestan o aumenta la actividad de algunas enzimas como la sorbitol deshidrogenasa (5), carnitina acetil transferasa (6), malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, citrato sintetasa (7) y aparecen isoenzimas específicas de testículo adulto como la deshidrogenasa láctica X (LDH-X) (8) y un tipo especial de citocromo c (9).

Espermatocitos diplotenos.- El núcleo alcanza su volumen máximo, los cromosomas se separan y forman tetradas entre los cromosomas homólogos, las cromátidas hermanas intercambian material genético (entrecruzamiento).

Espermatocitos en diacinesis.- Es el último estadio de la primera profase meiótica, tiene poca duración, se caracteriza porque los cromosomas pares sólo están unidos por quiasmas y se encuentran muy espiralizados.

El resto de las etapas de la primera división meiótica, metafase, anafase y telofase, así como la profase, metafase, anafase y telofase de la segunda división meiótica, se efectúan en pocas horas.

Como producto de la segunda división meiótica, aparecen las espermátidas a los veintitrés días de edad.

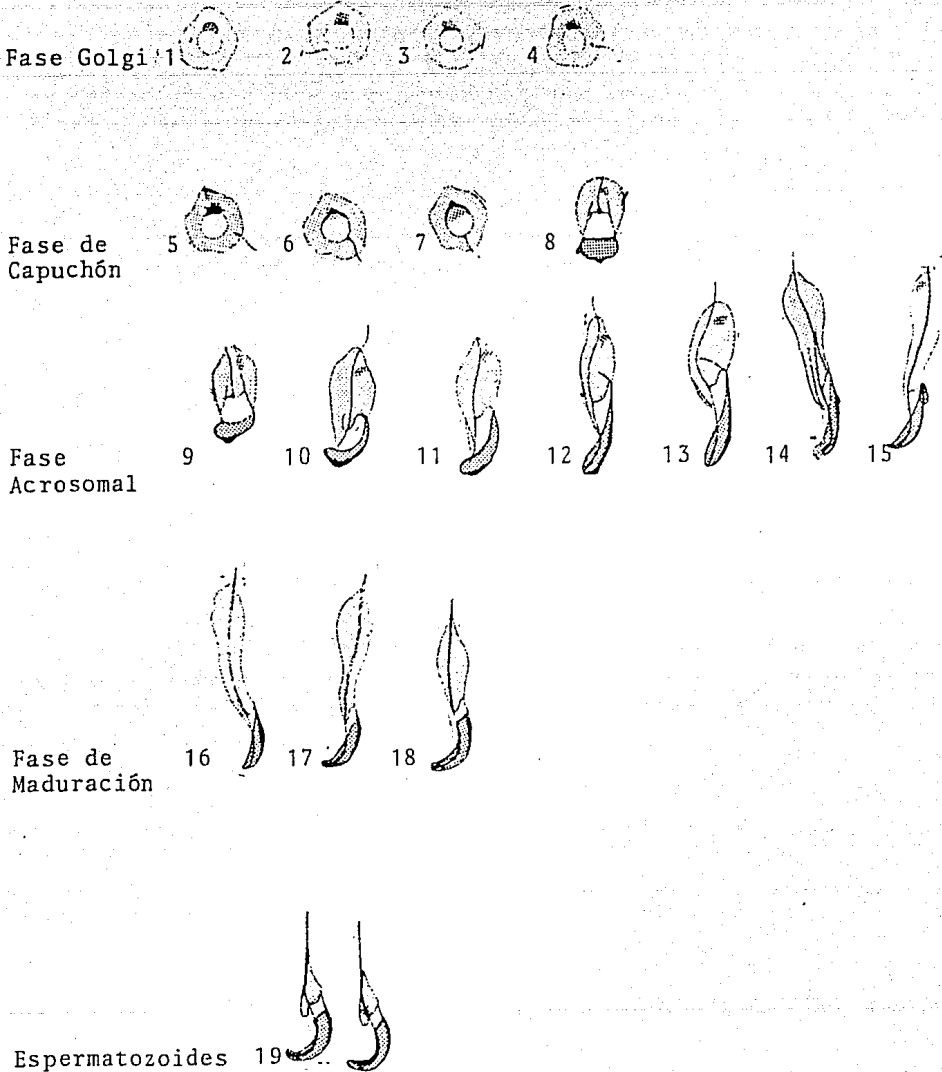
Las espermátidas son haploides (n), no vuelven a dividirse y su diferenciación a espermatozoides es a través de numerosas modificaciones morfológicas y metabólicas que culminan con la aparición de los gametos masculinos a los cuarenta y cinco días de edad (Esquema 3) (10).

B) Organización del epitelio germinal

En la organización y localización de las células germinales, las células de Sertoli juegan un papel fundamental (11). Originadas por las células de soporte, las cé

Esquema 3

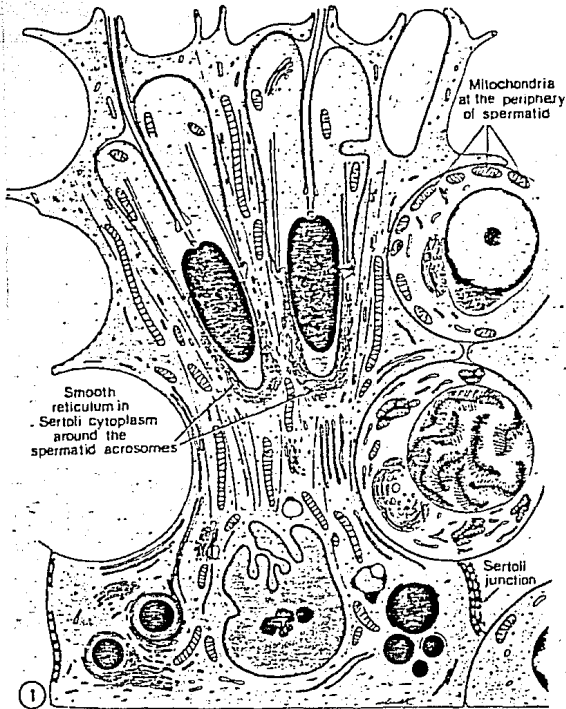
ESPERMIOGENESIS



La transformación de las espermátides en espermatozoides, espermiogénesis, no involucra ya división de estas células haploides en contenido de DNA y en número de cromosomas.

Interactions between Sertoli Cells and Germ Cells

15



Drawing of Sertoli cell-germ cell relations. Spermatogonia occupy a basal compartment below the occluding junctions between neighboring Sertoli cells. Spermatocytes and spermatids prior to elongation occupy deep niches in the sides of the supporting cell while elongated spermatids with condensed nuclei are lodged in deep apical recesses. The only visible evidences of interaction between germ cells and supporting cells are (1) accumulation of Sertoli cell smooth reticulum around the acrosome of the associated spermatids and (2) transient mobilization of mitochondria at the spermatids' interface with the Sertoli cell.

lulas de Sertoli constituyen una población fija en el interior de los túbulos seminíferos, ya que después de los quince días de edad no vuelven a dividirse, permaneciendo en número constante durante toda la vida del animal (12). También a esa edad empiezan a formar uniones herméticas entre sí (13) y dada su disposición periférica en el túbulo seminífero, constituyen el elemento decisivo de la barrera de permeabilidad hematotesticular (14, 15). Estas células se extienden desde la porción basal hasta el lumen del túbulo seminífero y forman cavidades en las que albergan a las células germinales, casi desde que inician la meiosis hasta que se transforman en espermatozoides; solamente las espermatogonias y los espermatocitos leptotenos quedan fuera de la barrera de permeabilidad y del microambiente creado por la célula de Sertoli (Esquema 4) (16).

Es notable el hecho de que existen grupos de células germinales que se diferencian en forma sincrónica (17) y que constituyen asociaciones entre sí, cuando han alcanzado estadios de diferenciación definidos (18).

Basándose en estudios acerca de la permeabilidad de las uniones entre las células de Sertoli (19, 20, 21) y sobre el control hormonal de la espermatogénesis (22), se ha propuesto que las células germinales dependen de la célula de Sertoli tanto para su nutrición, soporte y protección como para su diferenciación, aunque no se tienen en este momento, evidencias experimentales directas (16).

Cambios metabólicos durante la diferenciación del epitelio germinal

A) Metabolismo de carbohidratos .- Ha sido demostrado con anterioridad (23) que el aporte de carbohidratos, y más específicamente de glucosa, es esencial para el funcionamiento normal del testículo adulto. Las determinaciones del cociente respiratorio, RQ , del testículo en varias especies, in vivo e in vitro, dieron valores intermedios respecto al correspondiente para la combustión completa de carbohidratos, $RQ = 1$ y al de grasas, $RQ = 0.7$. Se observó que si el testículo era incu

bado en ausencia de sustratos exógenos, el valor del cociente respiratorio disminuía a 0.76 (24). Esta disminución no se manifiesta cuando otros tejidos dependientes de glucosa, como el cerebro y la retina, son incubados sin sustratos exógenos (25).

La ausencia de glucosa en el medio de incubación del testículo adulto produjo una disminución en el nivel de ATP y su adición permitió restablecerlo y aumentar el consumo de oxígeno (26).

Estas características metabólicas se expresan en el testículo de la rata sólo después de los veintidós días de edad, ya que desde el nacimiento y antes de alcanzar esa edad, el testículo no sólo no aumenta su consumo de oxígeno en presencia de glucosa (27), sino que presenta una inhibición de éste conocida como efecto Crabtree (28). El nivel basal de ATP del testículo inmaduro, de la misma magnitud que el del testículo adulto, también disminuye cuando se le incuba in vitro y la adición de glucosa no permite restaurar dicho nivel (26).

La vía catabólica principal de la glucosa en el testículo de varias especies in vitro es la glicólisis, la vía de las pentosas participa con menos del 3% en su metabolismo (29). In vitro, la glucosa es degradada hacia la producción de lactato aún en condiciones aeróbicas y el testículo inmaduro es más activo que el adulto en su producción, tanto en presencia de oxígeno como en anaerobiosis (30, 31). La concentración de lactato en el fluido testicular in vivo (32) indica que existe una oxidación incompleta de la glucosa, en una proporción no bien definida, aún en condiciones fisiológicas.

B) Metabolismo de lípidos.- Se ha observado que los lípidos están presentes en todos los estadios de diferenciación de las células germinales y en las células de Sertoli; pero solamente se observa su almacenamiento en ésta última, cuando la espermatogénesis se inhibe o durante el envejecimiento (33).

Existen diferencias y resultados contradictorios en cuanto a los valores informa

dos acerca del contenido total y la proporción que guardan entre sí las distintas clases de lípidos testiculares durante el desarrollo del epitelio germinal.

Algunos autores informan que el nivel total de lípidos aumenta hasta los veintiocho días de edad, disminuye temporalmente entre los treinta y cinco y sesenta y tres días, alcanzando nuevamente valores altos a los setenta días de edad y que estas fluctuaciones también se presentan en fosfolípidos y lípidos neutros (34). En un trabajo previo, donde se estudió el testículo desde los quince a los setenta días de edad, se había encontrado un aumento en el contenido total de lípidos, en fosfolípidos y disminución en los lípidos neutros (35). Otros autores, que determinaron el contenido lipídico entre las cuatro y veintinueve semanas de edad, - observaron que en todos los grupos, los lípidos representaron de 2.4 a 2.6% del peso húmedo del testículo y los fosfolípidos contribuían en 60 a 70% del total de lípidos; solamente los triglicéridos mostraron un decremento en el período de nueve a veintinueve semanas (36).

En cuanto a los ácidos grasos, se han observado cambios relacionados con la pubertad: el contenido total del ácido 18:1 disminuye y simultáneamente el 22:5 aumenta, desde la fase inicial de la espermiogénesis hasta alcanzar el nivel adulto. En la etapa prepuberal, las grasas neutras y fosfolípidos presentan ácidos grasos de dieciocho átomos de carbono o menos, mientras que en la edad adulta son de cadena más larga; de los ácidos grasos asociados a colesterol, los de quince o menos átomos de carbono, disminuyen siete veces en tanto que se duplican los ácidos 18:1, 18:0, 20:4, 22:5 y 22:6 (37).

El contenido total de colesterol disminuye también con el mayor desarrollo del epitelio germinal y alcanza valores estables cuando aparecen los espermatozoides (33).

La gran diversidad de tipos celulares presentes en el epitelio germinal del testículo y su compleja relación con la célula de Sertoli han conducido al planteamiento de que las características metabólicas observadas por diferentes autores no

Pueden atribuirse a un tipo celular dado, sino que deben considerarse como la resultante de la interacción de todos los tipos celulares presentes. Así, los cambios en ciertos lípidos pueden explicarse si se toma en consideración que los distintos tipos celulares tienen capacidades metabólicas diferentes. Se ha informado que las células dispersas de testículo de rata de catorce días de edad, con predominio de espermatoцитos primarios en los primeros estadios de la profase y espermatogonias, oxidan palmitato con una velocidad cuatro veces más alta que la población de células dispersas obtenidas de testículo adulto donde los tipos celulares predominantes son espermátidas y espermatozoides (38). Así mismo, el hecho de que los espermatozoides maduros puedan catabolizar colesterol, sugiere que ellos o las células en los estadios de diferenciación más avanzados de la espermatogénesis, puedan ser los responsables de la disminución del colesterol, más rápida cuando aparecen estas células (39).

C) Actividad hidrolítica de ATP testicular.- El contenido testicular de ATP, tanto en el estado adulto como en el prepuberal, señala que el testículo posee mecanismos eficientes para la síntesis de ATP, aunque por las evidencias in vitro, las vías metabólicas y los sustratos de los que depende su mantenimiento son diferentes según el grado de desarrollo del epitelio germinal (26)..

Sin embargo, se ha demostrado que el contenido de ATP del testículo disminuye cuando se le incuba in vitro en ausencia de sustrato exógeno, lo que sugiere que el testículo no posee el sistema regulador de la concentración de ATP observado en otros tejidos, hígado y riñón (40, 41), que no presentan disminución en su nivel de ATP cuando se les incuba en condiciones semejantes.

También se ha informado que el testículo posee una capacidad de hidrólisis de ATP mayor a la observada en otros órganos. Inicialmente se presentaron evidencias de que las fosfatasa contribúan a la producción de fosfato inorgánico a partir de

ATP (42). Posteriormente se demostró que el testículo posee cuatro tipos de fosfatasa, cuya actividad diferencial se correlaciona con estadios de maduración específicos (43). Estudios realizados en túbulos seminíferos aislados de testículo de rata adulta, mostraron una alta actividad de hidrólisis de ATP inespecífica, insensible a ouabaína, estimulada por bicarbonato y asociada a la fracción mitocondrial (44). Así mismo, en testículo inmaduro de rata de 25 días de edad, se encontró que la fracción mitocondrial hidrolizaba ATP a una velocidad mayor que las obtenidas de hígado y riñón (41).

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La disminución en el contenido de ATP del testículo adulto o inmaduro incubado in vitro sin sustratos exógenos, quizá sea debida, al menos parcialmente, a la alta capacidad para hidrolizar ATP, demostrada por diversos autores, pero insuficientemente caracterizada.

Se ha considerado que debido a la elevada actividad hidrolítica de ATP inespecífica, no ha sido posible definir la presencia de la ATPasa-(Na^+ - K^+) por el método habitual de inhibición por ouabaína, aunque existe solamente un trabajo donde el 30% de la ATPasa total medida correspondió a la ATPasa-(Na^+ - K^+) (45).

Se desconocía si la actividad hidrolítica podía ser estimulada por iones divalentes, así como tampoco si era posible inhibirla con alguno de los inhibidores de otras ATPasa.

Estudios de microscopía electrónica han señalado profundas modificaciones en la morfología y localización de las mitocondrias durante la diferenciación de las células germinales (47) que posiblemente se vean acompañadas de cambios en el funcionamiento de la ATPasa mitocondrial durante la espermatogénesis.

Por otra parte, los trabajos mencionados no aclararon cuál era la participación

de la ATPasa flagelar, la dineína, presente en los flagelos de spermátidas y espermatozoides, en la actividad de hidrólisis de ATP medida.

Debido a la ausencia de trabajo experimental que identificara a cada uno de los distintos elementos enzimáticos que confieren la alta capacidad de hidrólisis de ATP al testículo, así como si su actividad presenta cambios durante la diferenciación de las células germinales, en el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos.

III OBJETIVOS

- 1° Definir si el testículo tenía igual capacidad para hidrolizar ATP a través de las diferentes etapas de su maduración.
- 2° Caracterizar dicha actividad hidrolítica por su sensibilidad a ca tiones e inhibidores.
- 3° Estudiar la evolución de una de las actividades enzimáticas presentes en la actividad total de hidrólisis de ATP testicular durante la diferenciación de las células germinales masculinas. La actividad enzimática elegida fué la ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺).

IV PROGRAMA DE TRABAJO

A) Para realizar el primer objetivo se tomó como fuente enzimática el homogeneizado total de testículo a las siguientes edades y tipos celulares:

- 1 día: gonocitos y células de soporte.
- 4 días: aparición de espermatogonias tipo A (Esquema 1).
- 8 días: espermatogonias tipo A, Intermedias y B. (Esquema 1).

- 12 días: aparición de espermátocitos leptotenos.
- 14 días: aparición de espermátocitos zigotenos.
- 16 días: aparición de espermátocitos paquitenos.
- 21 días: espermátocitos primarios en todos los estadios de la primera profase meiótica. (Esquema 2).
- 23 días: aparición de las espermátidas.
- 24 y 26 días: espermátidas tempranas, fase Golgi. (Esquema 3)
- 30, 34 y 40 días: espermátidas en todas las fases de la espermiogénesis. (Esquema 3).
- 45 días: aparición de espermatozoides en el túbulo seminífero.
- 60 y 90 días: testículo con todos los elementos celulares desarrollados.

En este primer enfoque, observamos que la actividad hidrolítica total de ATP testicular se modificaba durante la diferenciación del epitelio germinal. La actividad se duplicaba durante la diferenciación de los espermátocitos primarios y descendía gradualmente durante la maduración de las espermátidas hasta alcanzar niveles basales con la aparición de los espermatozoides y que se mantenía constante durante la edad adulta.

B) Estas variaciones fueron reexaminadas con un segundo criterio, determinar la actividad hidrolítica de ATP en testículo adulto cuyo epitelio germinal se encontrara en involución, la cual fue inducida por tres métodos diferentes: a) hipofisectomía, b) criptorquidia y c) tratamiento con fluoroacetamida.

Las células más sensibles a estos tratamientos son las más diferenciadas. Después de la hipofisectomía, desaparecen gradualmente espermatozoides y espermátidas, a los diez días no hay espermatozoides y la población de espermátidas se ha reducido en 50%, a los treinta días la

población celular ha disminuido en un 90% y solamente espermatogonias y células de Sertoli son las únicas constituyentes del túbulo seminífero (47).

La elevación de la temperatura testicular producida por la criptorquidia, induce la desaparición de espermatozoides y espermátidas rápidamente. Los espermatoцитos primarios son más resistentes, pero a tiempos prolongados llegan a desaparecer también (48, 49).

La administración de fluoroacetamida induce la desaparición de espermatozoides y espermátidas, el epitelio germinal queda constituido por espermatogonias, células de Sertoli y una pequeña población de espermatoцитos primarios (50).

Sin embargo, aunque el criterio de actividad hidrolítica total de ATP de este segundo enfoque confirmaba la observación previa de incremento en la actividad cuando los espermatoцитos primarios eran los elementos celulares predominantes del epitelio germinal, tampoco permitía discriminar si la actividad efectivamente era mayor en un tipo de células o si la presencia de diferentes tipos celulares, en los diversos estadios de maduración, causaba la dilución de la actividad total o bien que existieran factores inhibidores o estimulantes de la actividad hidrolítica de ATP ligados a las células en estadios de diferenciación definidos, nos condujo a desarrollar una metodología que permitiera la obtención de células en las principales etapas de la espermatogénesis en condiciones de viabilidad alta y en número suficiente para la medición de su actividad enzimática.

C) Basándonos nuevamente en la aparición cronológicamente definida de los distintos tipos celulares en el epitelio germinal testicular, tomamos testículo de rata de 12 días de edad para aislar espermatoцитos

leptotenos y espermatogonias; de 21 días de edad, para obtener espermatocitos paquitenos y zigotenos y de 38 días de edad para separar la población de espermátidas.

Con el objeto de complementar nuestras observaciones sobre las células germinales, también aislamos los espermatozoides del epidídimo, separándolos de cada una de las tres regiones, caput, cuerpo y cauda.

D) Ya que desde los primeros experimentos sabíamos que la hidrólisis de ATP testicular era estimulada por Ca^{2+} y/o Mg^{2+} y que de testículo de rata adulta se había aislado, purificado y caracterizado a una proteína capaz de estimular la actividad de la ATPasa-($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) (51), decidimos investigar si esta proteína estaba presente en todas las células del epitelio germinal y en qué cantidad.

Primeramente se definió la presencia y localización de la proteína activadora de la ATPasa-($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$), llamada calmodulina, empleando anticuerpos fluorescentes y posteriormente se determinó su contenido por radioinmunoanálisis, tomando las poblaciones de células germinales enriquecidas en espermatoцитos leptotenos, espermatoцитos psteptotenos, espermátidas y espermatozoides.

Nuestros resultados mostraron la presencia de calmodulina en las células germinales en todos los estadios de maduración, sólo que a niveles muy distintos. Cuando los espermatoцитos primarios alcanzan estadios de maduración postleptoteno, incrementan su contenido de calmodulina y lo mantienen durante el estadio de espermátidas.

E) La correlación entre la fase de mayor actividad de hidrólisis de ATP dependiente de Ca^{2+} y/o Mg^{2+} y la de elevación en el contenido de calmodulina, ambas durante la profase meiótica, nos llevó a identificar

si la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) estaba presente como uno de los elementos enzimáticos que conferían la alta capacidad para hidrolizar ATP al testículo.

La identificación de la presencia de esta ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) fue realizada basándonos en dos criterios:

- a) Estimulación de su actividad en presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺ por la adición de calmodulina parcialmente purificada e
- b) Inhibición de la estimulación de la actividad enzimática por trifluoroperazina, inhibidor altamente específico de la calmodulina.

La actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) fue determinada en las poblaciones celulares enriquecidas en espermatoцитos leptotenos y espermatoгонias, en espermatoцитos postleptotenos, en espermátidas, en espermatozoides de cuerpo y cauda del epidídimo. También se midió la actividad enzimática en la fracción microsomal de testículo, a las edades de 21 y 38 días de edad, a las cuales se alcanza el estadio de espermatoцитos primarios postleptotenos y el de espermátidas, respectivamente.

Nuestros resultados señalan la presencia de esta ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en las células germinales en todos los estadios de diferenciación estudiados. Su actividad es máxima durante los estadios postleptotenos, pero es permátidas, espermatoгонias, espermatoцитos leptotenos y espermatozoides efectivamente tienen niveles de actividad mucho menores.

CHANGES OF (Ca²⁺-Mg²⁺)-ADENOSINE-TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN RAT TESTIS THROUGHOUT MATURATION

G. DELHUMEAU-ONGAY, R. TREJO-BAYONA
AND L. LARA-VIVAS

*División de Biología de la Reproducción, Departamento de Investigación Científica,
I.M.S.S.—Apartado Postal 73-032-México 73, D.F.*

(Received 12th September 1972)

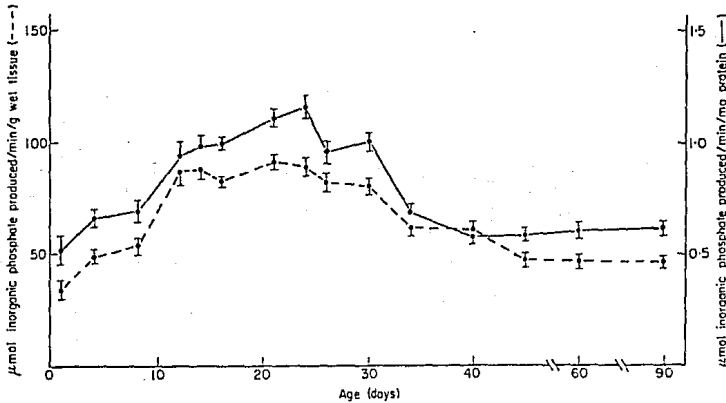
Marked changes in the pattern of energy metabolism occur in rat testis throughout maturation (Free, 1970). The mature testis, as compared with the immature one, has a lower Q_{O_2} (Tepperman, Tepperman & Dick, 1949; Leiderman & Mancini, 1968) and a different rate of aerobic and anaerobic glycolysis (Tepperman & Tepperman, 1950; Leiderman & Mancini, 1968). Adult testis utilizes glucose to a greater extent (Tepperman *et al.*, 1949) and ATP production is primarily dependent upon glucose metabolism in the mature but not in the prepuberal testis (Means & Hall, 1968). On the other hand, both adult (Tice & Barnett, 1963; Setchell, Smith & Munn, 1972) and immature (Hollinger, 1971) rat testes have been shown actively to hydrolyse ATP. However, the relationship of the rate of ATP catabolism to maturation is not clear. In the present communication, the pattern of the enzymatic hydrolysis of ATP by rat testis as a function of age is reported.

Fifteen groups by age, each consisting of three to eight albino rats of the Wistar strain, were used in the study. The rats were killed at the same hour of the morning by cervical dislocation followed by decapitation and exsanguination. Testes were immediately removed and rinsed in ice-cold twice distilled water. After removal of the tunica albuginea, testes were pooled to prepare a 10% w/v aqueous homogenate with a Potter-Elvehjem homogenizer provided with a loose Teflon pestle. The homogenate was then filtered through glass wool.

The method essentially described by Bonting, Simon & Hawkins (1961) was used to measure ATP hydrolysis. Bonting's medium A was used for the incubation, which was carried out at 37° C (Text-fig. 1). A 10-min pre-incubation without ATP was routinely performed in order to hydrolyse endogenous substrates. The reaction was started by the addition of ATP. All the incubations were run in quadruplicate and 0.5-ml aliquots were withdrawn at 30 sec, 1 and 2 min after the addition of ATP. The reaction was stopped by 2.5 ml ice-cold 6% perchloric acid. To separate zero-time aliquots, the substrate was added after perchloric acid. All the aliquots were allowed to stand for 30 min at 0° C and were centrifuged. Inorganic phosphate (Pi) was determined in the supernatant by the method of Bonting *et al.* (1961). Reported values are the

means of twelve phosphate determinations with their corresponding standard deviations. The protein content of the homogenates was determined by the method of Lowry, Rosebrough, Farr & Randall (1951).

The pattern of the enzymatic hydrolysis of ATP as a function of age is shown in Text-fig. 1. Twenty-four hours after birth, the enzymatic activity was already present. From the first week of life, it continuously increased until maximal values were attained at 21 to 24 days of age. These 3 weeks correspond to the appearance and differentiation of spermatogonia and spermatocytes, according to Clermont & Perey (1957), and to the observations of Sosa, Altamirano, Hernández & Rosado (1972) on the strain of rats used in the present work. After the 24th day of life, at ages corresponding to the appearance and further differentiation of spermatids, there was a statistically significant ($P < 0.001$) negative slope in the enzymatic activity. Stable lower values were



TEXT-FIG. 1. Enzymatic hydrolysis of ATP by rat testis as a function of age. The incubation mixtures contained: 1 mM-Mg²⁺, 58 mM-Na⁺, 5 mM-K⁺, 10 mM-GN⁻, 0.1 mM-EDTA, 157 mM-Cl⁻, 2 mM-ATP, 92 mM-tris (hydroxymethylamino methane) buffer (pH 7.5) and 0.1 ml total homogenate (0.6 to 1.2 mg protein) per ml.

reached at the 45th day of age when spermatozoa started to appear. These levels were maintained thereafter throughout adulthood.

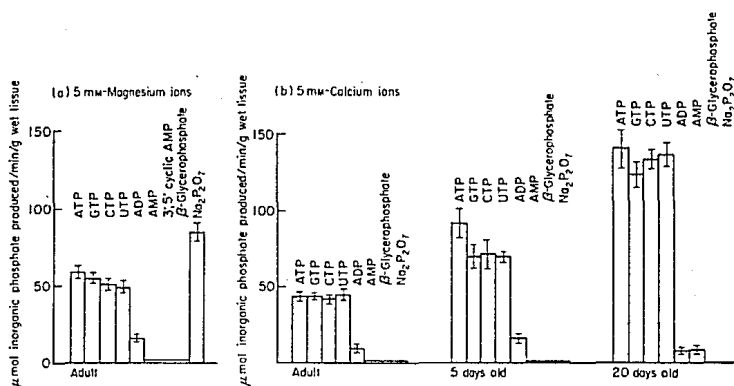
Since Kormanó (1967) has shown that the testis/body temperature difference changes with age, it seemed important to investigate the effect of the incubation temperature on the enzymatic activity at various ages. Testis homogenates from groups of rats aged 20, 30, 35 and 60 days were incubated at 0, 20, 30, 33, 35, 37, 40 and 50° C (experimental conditions as described in Text-fig. 1). Within each age group, no significant differences were observed in the enzymatic activities over the temperature range from 33 to 40° C. Thus, the incubation temperature of 37° C, non-physiological for testes from certain age groups, did not affect the results shown in Text-fig. 1.

In order to determine whether the enzymatic hydrolysis of ATP was specific or not and whether the observed chronological changes of the enzymatic activity

were quantitative or qualitative in nature, some preliminary cation-dependence and substrate-specificity studies were undertaken. Testes from both adult and immature rats were used in these studies.

(a) Cation dependence. Using 2 mM-ATP as a substrate, Na^+ , K^+ , EDTA and cyanide could be eliminated from the original Bonting's medium without any detectable change in the activity. An absolute requirement of either Mg^{2+} or Ca^{2+} was observed, 5 mM being the optimal concentration for both divalent cations. When increasing amounts of Ca^{2+} were added to the incubation mixture containing 5 mM- Mg^{2+} , the activity was inhibited (40% at equimolar concentrations, 50% at a 2:1 Ca^{2+}/Mg^{2+} ratio). This effect was similar to the one reported in placental ATPase (Shami & Radde, 1972).

(b) Substrate specificity. Text-figure 2(a) shows that, in the presence of magnesium ions, adult rat testis homogenates were able to hydrolyse ATP, GTP, CTP and UTP at similar rates. Hydrolysis of ADP took place at a lower



TEXT-FIG. 2. Enzymatic hydrolysis of various substrates by immature and adult rat testis. The incubation mixtures contained: either 5 mM- Mg^{2+} (a) or 5 mM- Ca^{2+} (b), 156 mM- Cl^- , 2 mM-substrate, 146 mM-tris (hydroxymethylamino methane) buffer (pH 7.5) and 0.1 ml total homogenate per ml.

rate. No hydrolytic activity was observed towards AMP, 3', 5' cyclic AMP or β -glycerophosphate, but a very high inorganic pyrophosphatase activity was encountered. This enzyme became saturated at 0.5 mM-substrate concentration and showed an absolute requirement for Mg^{2+} in an equimolar pyrophosphate/magnesium ratio. It was completely inhibited by 2 mM-NaF and had no activity whatsoever when calcium was used instead of magnesium. These properties shown by rat testis pyrophosphatase were markedly different from those described for inorganic pyrophosphatase from bull semen (Heppel & Hilmoe, 1951).

To determine whether ATP was hydrolysed by a phosphatase or by an organic pyrophosphatase, it was important to avoid inorganic pyrophosphatase activity. Determinations were therefore performed in the presence of 5 mM- Ca^{2+} instead of Mg^{2+} , since the pattern of nucleotide hydrolysis by adult

testis homogenates was similar with either cation (Text-fig. 2a and b). The inclusion of inorganic pyrophosphatase activity could have also been avoided by using fluoride since this did not appreciably inhibit ATP hydrolysis.

Text-figure 2(b) shows that the pattern of nucleotide hydrolysis was qualitatively similar in the adult and the immature testis, suggesting that the observed activity is mainly one of a $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -dependent ATPase. It was, however, twice as great in the 6-day-old rat testis and over three times as great in the 20-day-old rat as in the adult testis.

Nucleoside diphosphatase showed only a slight increase in activity in the 5-day-old rat and 5'-nucleotidase was only apparent in the 20-day-old rat.

A high activity of ATPase that could be stimulated by either Ca^{2+} or Mg^{2+} but not by Na^+ or K^+ was found to occur in rat testis at all ages from birth to maturity. The activity, however, showed marked quantitative changes as a function of the age of the animal. During the first 3 weeks of life, a continuous increase in activity was encountered. This observation is consistent with a high energy requirement for the very active proliferation of the germinal epithelium, as previously suggested (Free, 1970; Hollinger, 1971). Throughout the ages corresponding to the appearance and differentiation of spermatids, ATPase activity continuously decreased until the 7th week of life. A cellular dilution effect could be evoked to interpret this finding. It may also suggest that during spermiogenesis, the testis progressively changes its energy metabolism until a different and stable pattern is attained in early maturity. In fact, previous studies have shown marked differences between the metabolic energy pattern of adult and immature testis in terms of QO_2 (Tepperman *et al.*, 1949; Leiderman & Mancini, 1968), rate of glycolysis (Tepperman & Tepperman, 1950; Leiderman & Mancini, 1968), glucose utilization (Tepperman *et al.*, 1949), ATP production (Means & Hall, 1968) and now ATP hydrolysis.

It has been suggested that most of the differences observed in energy metabolism before and after maturation involve the seminiferous tubules rather than the interstitium (Leiderman & Mancini, 1968; Leiderman, 1969; Free, 1970). Since no effort was made in this study to separate these tissues, any suggestion at this stage concerning the cellular localization of the $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase would be speculative. Further experimental work is now in progress to clarify this point.

This work was partially supported by a grant from the Ford Foundation.

REFERENCES

- BONTING, S. L., SIMON, K. A. & HAWKINS, N. M. (1961) Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. 1. Quantitative distribution in several tissues of the cat. *Archs Biochem. Biophys.* 95, 416.
- CLERMONT, Y. & PEREY, B. (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* 100, 241.
- FREE, M. J. (1970) *Carbohydrate metabolism in the testis*. In: *The Testis*, Vol. II, p. 125. Eds. A. D. Johnson, W. R. Gomes and N. L. VanDemark. Academic Press, London.
- HEPPEL, L. A. & HILMOE, R. J. (1951) Purification of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. biol. Chem.* 192, 87.
- HOLLINGER, M. A. (1971) Metabolism of ATP by testis mitochondria of 25-day-old rats. *J. Reprod. Fert.* 25, 443.

- KORMANO, M. (1967) Development of the rectum-testis temperature difference in the post-natal rat. *J. Reprod. Fert.* 14, 427.
- LEIDERMAN, B. (1969) Consumo de oxígeno y producción de ácido láctico de células germinales aisladas "in vitro" de testículo de rata. *Revta Soc. argent. Biol.* 45, 57.
- LEIDERMAN, B. & MANGINI, R. E. (1968) Aerobic and anaerobic lactate production in the prepubertal and adult rat testis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 128, 818.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265.
- MEANS, A. R. & HALL, P. F. (1968) Protein biosynthesis in the testis: II. Role of adenosine triphosphate (ATP) in stimulation by glucose. *Endocrinology*, 83, 86.
- SETCHELL, B. P., SMITH, M. W. & MUNN, E. A. (1972) The stimulation by bicarbonate of adenosine triphosphatase activity in the seminiferous tubules of rodents and the lack of effect of ouabain. *J. Reprod. Fert.* 28, 413.
- SHAMI, Y. & RADDE, I. C. (1972) The effect of the Ca^{2+}/Mg^{2+} concentration ratio on placental $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity. *Biochim. biophys. Acta*, 255, 675.
- SOSA, A., ALTAMIRANO, E., HERNÁNDEZ, P. & ROSADO, A. (1972) Developmental pattern of rat testis hexokinase. *Life Sciences*, 11, Part II, 499.
- TEPPERMAN, H. M. & TEPPERMAN, J. (1950) Glucose utilization *in vitro* by normal adult, immature and cryptorchid testis. *Endocrinology*, 47, 459.
- TEPPERMAN, J., TEPPERMAN, H. M. & DICK, H. J. (1949) A study of the metabolism of rat testis *in vitro*. *Endocrinology*, 45, 491.
- TICE, L. W. & BARNETT, R. J. (1963) The fine structural localization of some testicular phosphatases. *Anat. Rec.* 147, 43.

INCREASE OF $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ADENOSINE
TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN RAT TESTIS
UNDERGOING REGRESSION OF THE GERMINAL
EPITHELIUM

GRACIELA DELHUMEAU-ONGAY, R. TREJO-BAYONA,
R. ALVAREZ-BUYLLA* AND L. LARA-VIVAS

*División de Biología de la Reproducción, Departamento de Investigación Científica,
IMSS-Apartado Postal 73-032-México 73, D.F., and*

**Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional,
México*

(Received 24th October 1972)

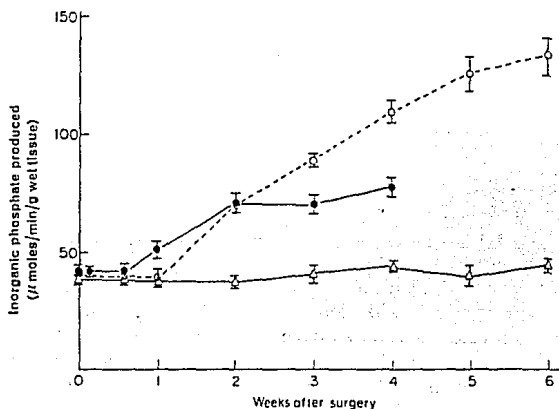
The pattern of testicular energy metabolism changes when spermatogenesis is impaired. Testes undergoing regression of the germinal epithelium show a higher Q_{O_2} (Tepperman, Tepperman & Dick, 1949; Featherstone, Nelson, Welden, Marberger, Boccabella & Boccabella, 1955; Steinberger & Wagner, 1961) and a lower glucose utilization (Tepperman & Tepperman, 1950; Means & Hall, 1968; Free, Massie & VanDemark, 1969) than normal testes. These phenomena are also observed in immature rat testes (Tepperman *et al.*, 1949; Tepperman & Tepperman, 1950) and are believed to involve the intratubular tissue rather than the interstitium (Leiderman & Mancini, 1968).

The catabolism of ATP also varies between adult and immature testes. Although both tissues hydrolyse ATP at a very high rate (Hollinger, 1971; Setchell, Smith & Munn, 1972), mainly by means of a $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase, there are marked changes in ATPase activity throughout maturation. It has been shown to increase during the proliferation of the germinal epithelium, decrease during spermiogenesis, and attain stable lower values at the beginning of adulthood (Delhumeau-Ongay, Trejo-Bayona & Lara-Vivas, 1973). In the present study, investigations were carried out to see whether $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase would change its activity in testes undergoing regression of the germinal epithelium.

This regression was induced in normal adult rats of the Wistar strain by various means: (a) using a parapharyngeal approach, hypophysectomy was performed on adult rats weighing 180 ± 20 g; serial sections of the brains of these animals at autopsy showed no traces of pituitary tissue; (b) adult rats weighing 180 ± 20 g were made unilaterally cryptorchid by placing the left testis in the abdomen and suturing the inguinal canal; (c) adult intact rats, weighing 225 ± 25 g were injected daily for periods of up to 17 days with either 50 i.u. HCG or 250 μ g fluoroacetamide in 0.25 ml saline, controls receiving the same volume of saline alone; rats were killed 24 hr after the last injection.

For histological observations, the tissue was fixed in either formol or Bouin's solution and stained with haematoxylin and eosin.

Within each treatment, and for each experimental point shown in Text-fig. 1 and Table 1, the testes of three or four rats were pooled and homogenized, and the rate of ATP hydrolysis was measured as previously described (Delhumeau-Ongay *et al.*, 1973). Reported values are the means of twelve phosphate determinations with their corresponding standard deviations. Values of statistical analysis were determined by Student's *t* test. The enzymatic activity responsible for ATP hydrolysis was characterized as a $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase following the same criteria applied by Delhumeau-Ongay *et al.* (1973).



TEXT-FIG. 1. $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity in rat testis undergoing regression of the germinal epithelium. The incubation mixtures contained: 1 mM- Mg^{2+} , 58 mM- Na^+ , 5 mM- K^+ , 10 mM- CN^- , 0.1 mM-EDTA, 157 mM- Cl^- , 2 mM-ATP, 92 mM-tris (hydroxymethylamino methane) buffer (pH 7.5) and 0.1 ml of a 10% total aqueous homogenate of rat testis (0.6 to 1.2 mg protein) per ml. Δ , Control; \bullet , hypophysectomy; \circ , cryptorchidism.

The effect of hypophysectomy on the testicular $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity is shown in Text-fig. 1. The activity started to rise 1 week after hypophysectomy, reached a plateau at the end of the 2nd week, and remained stable until the 4th week of the experiment ($P < 0.001$). Regression of the germinal epithelium started to become apparent histologically on the 4th day after surgery. Maturing spermatids and spermatozoa were still present, but their numbers were reduced. Their reduction became more evident after 1 week and by the 14th day they were absent.

Rats were made unilaterally cryptorchid on Day 0 (Text-fig. 1). The enzymatic activity of the ectopic testes was compared with that of the contralateral scrotal ones (control testes in Text-fig. 1) at different times after surgery. Little variation was observed in the enzymatic activity of the ectopic testes throughout the 6 weeks of the experiment. In the ectopic ones, a significant ($P < 0.001$) continuous increase was observed from the 2nd to the 5th week, at

which time activity began to stabilize. When data were expressed in terms of the protein content of testicular homogenates, the enzymatic activity showed almost identical patterns to those shown in Text-fig. 1. A similar pattern was also obtained when homogenates from scrotal testes were incubated at 33° C.

High doses of HCG are known to block the maturation of the germinal cells (Morabito & Strazzulla, 1963). After 1 week of a chronic course of treatment with daily intraperitoneal injections of 50 i.u. HCG, $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity was determined. The experiment was repeated four times. Control groups showed values ranging from 31.54 ± 0.76 to 38.04 ± 2.98 μ mol inorganic phosphate (Pi)/min/g wet tissue, whereas treated animals significantly increased their enzymatic activities ($P < 0.001$) to values ranging from 54.62 ± 4.34 to 71.0 ± 7.06 μ mol Pi/min/g wet tissue.

Table 1. Effect of fluoroacetamide administration on $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity in rat testis

Days of treatment	Enzymatic activity* (μ mol inorganic phosphate produced/min/g wet tissue)
0	64.33 \pm 3.78
4	64.28 \pm 3.01
6	57.21 \pm 4.03
8	60.10 \pm 2.15
13	73.56 \pm 4.89
17	98.53 \pm 3.89

Fluoroacetamide was given in consecutive daily subcutaneous injections of 250 μ g in 0.25 ml saline.

* The incubation mixture contained: 5 mm- Mg^{2+} , 156 mm- Cl^- , 2 mm-ATP, 146 mm-tris (hydroxymethylamino methane) buffer (pH 7.5) and 0.1 ml of a 10% total aqueous homogenate of rat testis (0.6 to 1.2 mg protein) per ml.

Fluoroacetamide is known to inhibit spermatogenesis specifically at the spermatid level (Steinberger & Sud, 1970). Data on the effect of the chronic administration of fluoroacetamide on testicular $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase are shown in Table 1. Numerical values were higher than those of the previously mentioned experiments because a 5 mm- instead of 1 mm-magnesium concentration was used (see Delhumeau-Ongay *et al.*, 1973). During the 2nd week of treatment, the enzymatic activity showed a significant increase ($P < 0.001$). Histological observations of the testes at this time indicated that spermatids and many spermatocytes had disappeared. The interstitium showed no detectable variations.

A significant increase ($P < 0.001$) in $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity was found to occur in rat testis when regression of the germinal epithelium was induced by any one of the means used. Each one of them is known to affect the interstitial tissue in a different manner. Thus, hypophysectomy induces both regression of the germinal epithelium (Clermont & Morgentaler, 1955) and atrophy of the interstitium (Hooker, 1970). Cryptorchidism has a major effect upon the development of the germinal cells (Hooker, 1970). High doses of

HCG appear principally to block the maturation of the germinal epithelium (Morabito & Strazzulla, 1963) and fluoroacetamide was reported to have a specific effect on spermiogenesis (Steinberger & Sud, 1970). Our own histological observations basically agreed with these previous findings. The fact that $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity always increased when the germinal epithelium was undergoing regression, in the presence or absence of a functional interstitial tissue, points to the intratubular cells as the main site of the enzymatic activity.

The different methods used to induce regression of the germinal epithelium raised the enzymatic activity to different levels. Chronologically, this increase became generally significant when the bulk of spermatids had disappeared and became even more marked with the partial disappearance of the spermatocytes.

During the regression of the germinal epithelium, the germ cells remaining in the seminiferous tubules pursue their evolution at their normal rate until they encounter unfavourable conditions (hormonal, thermal, or other) which prevent their further differentiation. They then degenerate and are eliminated from the system (Clermont & Harvey, 1965). The increase in the enzymatic activity could therefore be related to one or more of the following phases: (a) the normal proliferation and differentiation of the more primitive type of germ cells, since it has been suggested that this process has a very high energy requirement (Free, 1970; Hollinger, 1971); (b) the disposal of degenerating cells, which are phagocytosed by the Sertoli cells (Clermont & Morgentaler, 1955; Clegg, 1963), since phagocytosis is also an energy-requiring process (Selvaraj & Sbarra, 1966); (c) the disappearance of spermatids, since if these cells were low in ATPase activity, they would produce an apparent increase in the enzymatic activity.

None of the above interpretations can be definitively accepted at the present time. It is worth noting, however, that throughout both maturation and regression of the germinal epithelium, rat testis shows comparable modifications in its pattern of energy metabolism in terms of QO_2 (Tepperman *et al.*, 1949; Featherstone *et al.*, 1955; Steinberger & Wagner, 1961; Leiderman & Mancini, 1968), glucose utilization (Tepperman & Tepperman, 1950; Means & Hall, 1968; Free *et al.*, 1969), UDPase activity (Xuma & Turkington, 1972) and $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity (Delhumeau-Ongay *et al.*, 1973).

This work was partially supported by a grant from the Ford Foundation. We would like to express our gratitude to Dr Alfredo Cortés-Arcos for the surgical induction of unilateral cryptorchidism in the rats. The kind secretarial help of Miss Olivia Beltrán is also acknowledged. The HCG (Eclutón) was a gift from Organón.

REFERENCES

- CLEGG, E. J. (1963) Studies on artificial cryptorchidism. Morphological and quantitative changes in the Sertoli cells of rat testis. *J. Endocr.* 26, 567.
- CLERMONT, Y. & HARVEY, S. C. (1965) Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology*, 76, 80.
- CLERMONT, Y. & MORGENTALER, H. (1955) Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Endocrinology*, 57, 369.

- DELHUMEAU-ONGAY, G., TREJO-BAYONA, R. & LARA-VIVAS, L. (1973) Changes of $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -adenosinetriphosphatase activity in rat testis throughout maturation. *J. Reprod. Fert.* 33, 513.
- FEATHERSTONE, R. M., NELSON, W. O., WELDEN, F., MARBERGER, E., BOCCABELLA, A. & BOCCABELLA, R. (1955) Pyruvate oxidation in testicular tissues during Furadroxyl-induced spermatogenic arrest. *Endocrinology*, 56, 727.
- FREE, M. J. (1970) *Carbohydrate metabolism in the testis*. In: *The Testis*, Vol. II, p. 125. Eds. A. D. Johnson, W. R. Gomes and N. L. VanDemark. Academic Press, London.
- FREE, M. J., MASSIE, E. D. & VANDEMARK, N. L. (1969) Glucose metabolism in the cryptorchid rat testis. *Biol. Reprod.* 1, 354.
- HOLLINGER, M. A. (1971) Metabolism of ATP by testis mitochondria of 25-day old rats. *J. Reprod. Fert.* 25, 443.
- HOOKE, C. W. (1970) *The intertubular tissue of the testis*. In: *The Testis*, Vol. I, p. 483. Eds. A. D. Johnson, W. R. Gomes and N. L. VanDemark. Academic Press, London.
- LEIDERMAN, B. & MANGINI, R. E. (1968) Aerobic and anaerobic lactate production in the prepuberal and adult rat testis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 128, 818.
- MEANS, A. R. & HALL, P. F. (1968) Protein biosynthesis in the testis: I. Comparison between stimulation by FSH and glucose. *Endocrinology*, 82, 597.
- MORABITO, F. & STRAZZULLA, G. (1963) Effetto lesivo della gonadotropina corionica sul testicolo di ratto adulto. *Lo Sperimentale*, 113, 175.
- SELVARAJ, R. J. & SBARRA, A. J. (1966) Relationship of glycolytic and oxidative metabolism to particle entry and destruction in phagocytosing cells. *Nature, Lond.* 211, 1272.
- SETCHELL, B. P., SMITH, M. W. & MUNN, E. A. (1972) The stimulation by bicarbonate of adenosine triphosphatase activity in the seminiferous tubules of rodents and the lack of effect of ouabain. *J. Reprod. Fert.* 28, 413.
- STEINBERGER, E. & SUD, B. N. (1970) Specific effect of fluoroacetamide on spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 2, 369.
- STEINBERGER, E. & WAGNER, C. (1961) Observations on the endogenous respiration of rat testicular tissue. *Endocrinology*, 69, 305.
- TEPPERMAN, H. M. & TEPPERMAN, J. (1950) Glucose utilization *in vitro* by normal adult, immature and cryptorchid testis. *Endocrinology*, 47, 459.
- TEPPERMAN, J., TEPPERMAN, H. M. & DICK, H. J. (1949) A study of the metabolism of rat testis *in vitro*. *Endocrinology*, 45, 491.
- XUMA, M. & TURKINGTON, R. W. (1972) Hormonal regulation of uridine diphosphatase during spermiogenesis in the rat. *Endocrinology*, 91, 415.

A simple and rapid technique to isolate enriched populations of spermatocytes and spermatids from the immature rat testis

V. Alemán*, R. Trejo‡, E. Morales*, P. Hernández-Jáuregui† and G. Delhumeau-Ongay‡

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional*, †*División de Patología and* ‡*Sección de Hormonas Proteicas, División de Biología de la Reproducción, Subjefatura de Investigación Básica, Centro Médico Nacional, IMSS, México, D.F.*

Summary. A technique was developed to obtain enriched populations of large numbers of primary spermatocytes (70-81%) and of spermatids (75%) from immature rat testes (21-23 and 38 days old respectively) in a simple and rapid fashion. The cells were nearly all viable and membrane preservation was good. The testicular cells were dispersed by a mild mechanical treatment combined with an incubation with purified collagenase, and the cell populations were separated by centrifugation in a discontinuous dextran gradient in a cell culture medium.

Introduction

The metabolic pattern of the rat testis has been shown to change markedly throughout maturation, e.g. when spermatocytes are converted into spermatids (Tepperman & Tepperman, 1950; Bishop, 1969; Free, 1970; Delhumeau-Ongay, Trejo-Bayona & Lara-Vivas, 1973). To be able to study the metabolic changes occurring at these two distinct periods of maturation it seemed important to devise a technique to separate and enrich populations of spermatocytes and spermatids.

The chronological appearance of the different germinal cell types in the immature rat testis has been extensively studied (Clermont & Peery, 1957; Davis & Schuetz, 1975). At 23 days of age the tubules include most types of primary spermatocytes, while at 38 days of age spermiogenesis has reached stage 14 (Clermont, 1972). Rat testes at these two ages should therefore be very useful as the starting material for producing enriched populations of spermatocytes and spermatids respectively.

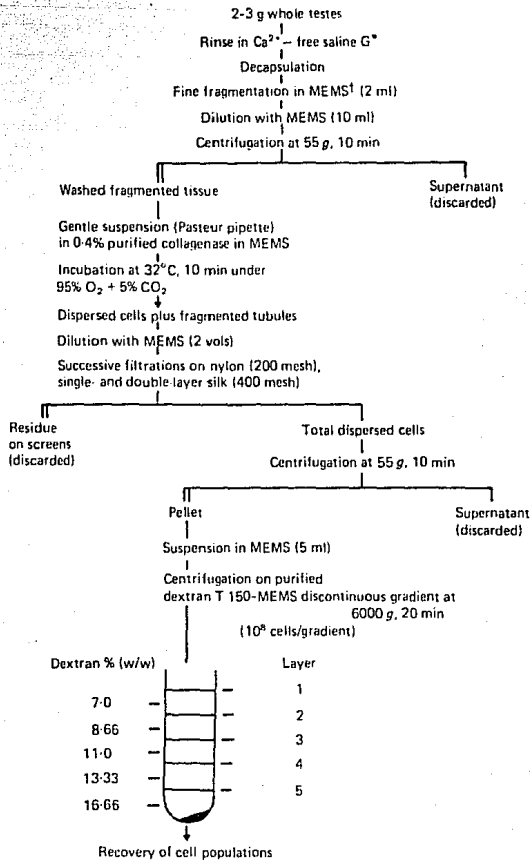
Several procedures for the separation of animal cells (Shortman, 1972) have been used for testicular tissue from various species. For example, velocity sedimentation at unit gravity for several hours in continuous gradients of albumin or ficoll has been used to obtain different germinal cell types from adult (Lam, Furrer & Bruce, 1970; Go, Vernon & Fritz, 1971; Meistrich, 1972; Meistrich, Bruce & Clermont, 1973; Romrell, Bellvé & Fawcett, 1976) and immature (Meistrich, 1972; Davis & Schuetz, 1975; Bellvé *et al.*, 1977a) rodents, and velocity sedimentation in isokinetic gradients of ficoll (Pretlow, Scalise & Weir, 1974), equilibrium density centrifugation in continuous renografin gradients (Meistrich & Trostle, 1975), centrifugal elutriation in buffered albumin (Grabske, Lake, Gledhill & Meistrich, 1975) have also been used. In these methods different techniques were used for cell dispersion.

We describe here a technique developed to separate enriched populations of spermatocytes and spermatids. The following features were kept in mind: simplicity, speed, good cell viability and preservation of cell structures, as well as the provision of a sufficiently large number of cells in each population to permit further metabolic or functional studies.

Materials and Methods

Albino rats of the Wistar-Porton and the Sprague-Dawley strains were used at 23 and 38 days of age. Throughout the experiments the manipulations were carried out at room temperature because cell viability dropped to 30-45% whenever temperatures above 33°C or below 15°C were used. The

rats were killed by decapitation and exsanguinated and the testes were removed. The method for cell dispersion and separation of the testicular cell populations is outlined in Text-fig. 1.



Text-fig. 1. Flow-chart outlining the cell dispersion and separation method for cell populations from the testes of 21-23- and 38-day-old rats.

* Ca^{2+} -free Puck's saline G solution containing 137 mM-NaCl, 5.5 mM-KCl, 1.1 mM- KH_2PO_4 , 1.1 mM- Na_2HPO_4 , 0.63 mM- MgSO_4 and no glucose.

† Eagle's Minimum Essential Medium (Gibco) supplemented with non-essential amino acids and 1% previously dialysed and freeze-dried fetal calf serum, pH 7.2-7.4.

Dispersion. Various enzymes were dissolved in Eagle's Minimum Essential Medium supplemented with non-essential amino acids (Gibco) and 1% previously dialysed and freeze-dried fetal calf serum, pH 7.2-7.4 (MEMS), and tested for their ability to effect cell dispersion. For 0.05% doubly crystallized trypsin (Nutritional Biochemicals), a mixture of 0.05% trypsin and 0.4% collagenase (form II, Koch-Light Laboratories Ltd, England), and 0.4% collagenase alone (8 mg/g

wet tissue), the viabilities were 67.5, 55.3 and 93–100% respectively. The 0.4% collagenase maintained this level of viability and good membrane preservation (100% of germinal cells with no disruption of membranes as judged by the electron microscope), but if other commercial preparations were used without further purification the germinal cells were damaged (30–40% viability).

Cells were counted in a Levy-Hausser counting chamber. Cell viability was determined by exclusion of 0.5% trypan blue in a 1:1 (v/v) mixture of MEMS and Ca^{2+} - and glucose-free Puck's saline G solution (137 mM-NaCl, 5.5 mM-KCl, 1.1 mM- $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 1.1 mM- Na_2HPO_4 and 0.63 mM- MgSO_4) and also by the ability of the cells to produce lactate aerobically compared with the ability of tissue fragments. Incubations were performed essentially as described by Leiderman (1969), and Leiderman & Mancini (1968), except that MEMS without fetal calf serum was used as the medium at 33°C.

Separation. To separate the cell populations, dextran T-150 (Pharmacia, Uppsala) discontinuous density gradients (Text-fig. 1) were prepared. The dextran, previously dialysed and freeze-dried, was dissolved in MEMS, pH 7.4. The relative densities of Layers 2, 3, 4 and 5 of the gradients were 1.0384 ± 0.0018 , 1.0535 ± 0.0016 , 1.0598 ± 0.0011 and 1.0816 ± 0.0014 , respectively ($\text{H}_2\text{O} = 1.000$). Three gradient-containing tubes were centrifuged in each run at room temperature for 20 min.

Identification. The cells were recovered from each layer and those from equivalent layers of the 3 gradients were pooled, diluted with MEMS and centrifuged at 80 g for 10 min. The cells were then washed with Ca^{2+} - and glucose-free saline G solution and centrifuged at 55 g for 10 min before identification. After fixation overnight in buffered 10% formaldehyde vapour the cells were stained with PAS-haematoxylin and identified by the criteria of Leblond & Clermont (1952) and Clermont (1972). The population percentages were calculated from the 1000 to 5000 cells counted for each gradient layer. Data shown are the averages of 4–6 different experiments.

To characterize further the cell distribution among the different layers, DNA content was determined by the modified micromethod of Giles & Myers (1965) after extraction by the method of Leyva & Kelley (1974). From these determinations cell recoveries and DNA content per cell were calculated. Diploid cells were assumed to contain 7 pg DNA/cell (Szarski, 1976). Protein was determined in each washed cell population (Hartree, 1972).

Electron microscopy. Cells from each cell population were fixed in buffered glutaraldehyde, post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol and embedded in araldite (Glauert & Glauert, 1958). Sections were obtained on a Reichert Om U₂ ultramicrotome and observed in a Philips EM-300. At least 100 cells from each population were observed and if there was full continuity of the membranes round the cell it was considered to be 'well preserved'. The identification of the cells from their ultrastructural appearance followed that of Burgos, Vitale-Calpe & Aoki (1970) and Doohar & Bennet (1973).

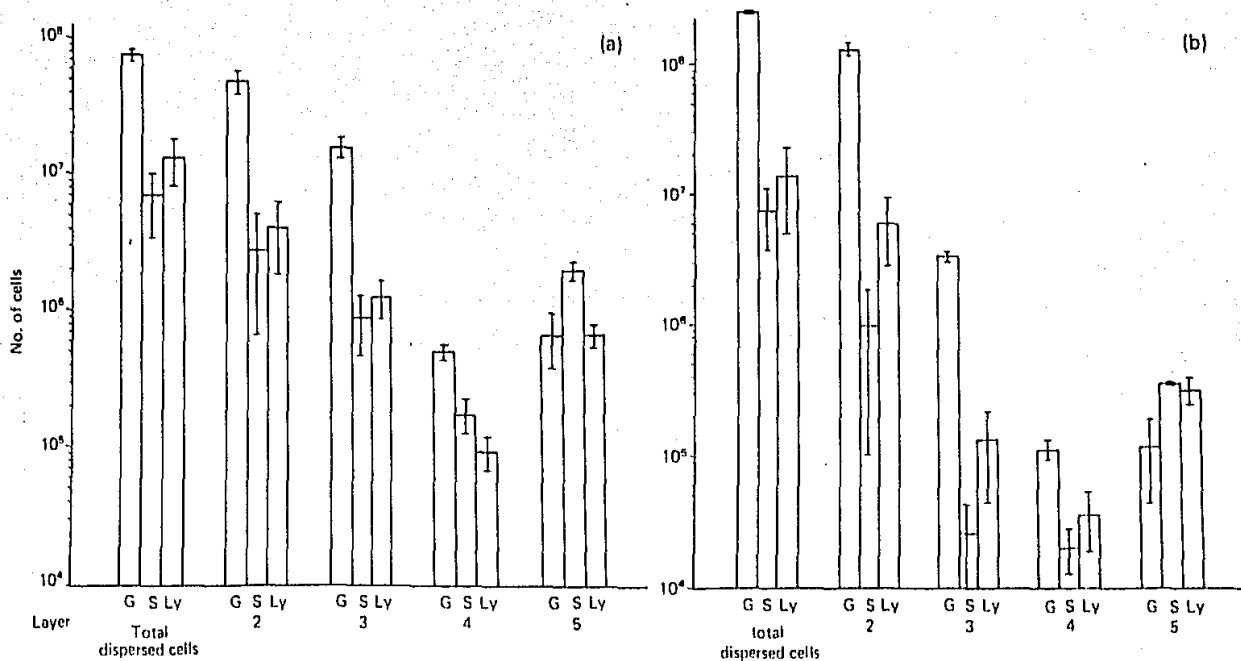
Results

Cell recoveries after the dispersion step are shown in Table 1. The yield per testis was 13 times lower in the younger rats, but it was possible to increase the yield to 29×10^7 cells/g tissue if the tubules were resuspended and centrifuged 8 times more with MEMS after the collagenase treatment.

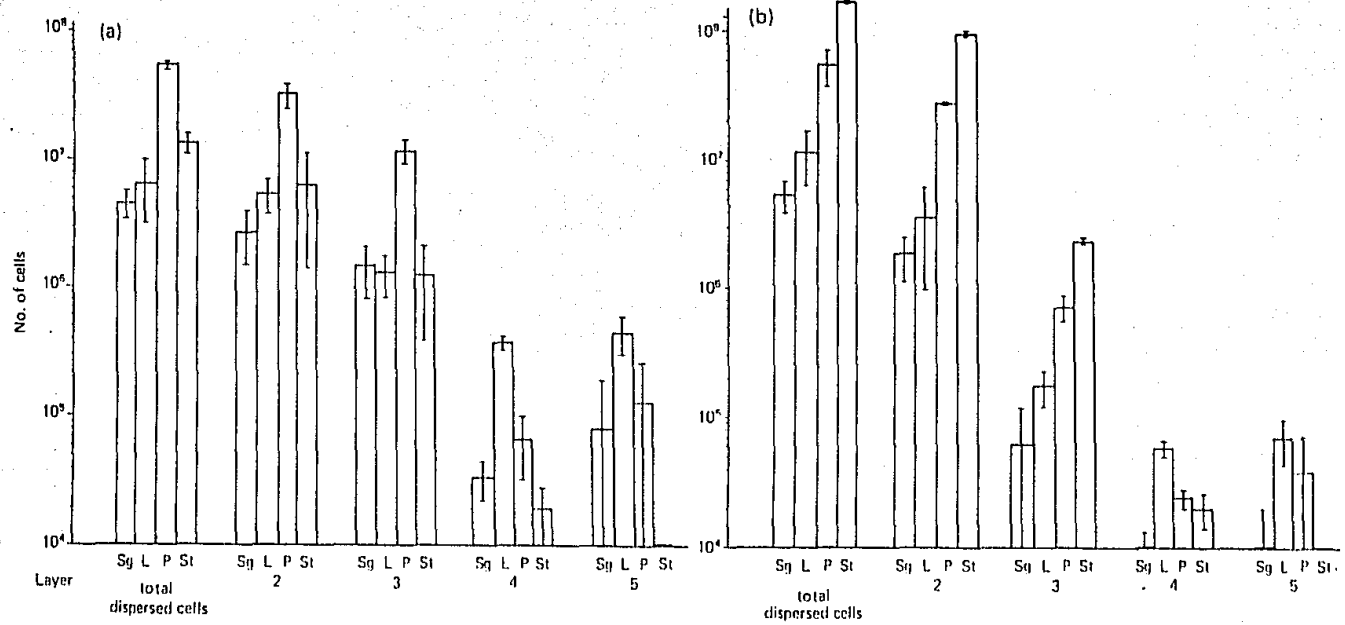
Table 1. Cell populations recovered from rat testes after dispersion

	Age of rat	
	23 days	38 days
Wet weight/testis (g)	0.23 ± 0.05	0.639 ± 0.08
No. of cells/testis	$1.37 \times 10^7 \pm 0.6 \times 10^7$	$17.24 \times 10^7 \pm 4.8 \times 10^7$
No. of cells/g testis wet weight	$5.8 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^7$	$29.5 \times 10^7 \pm 10.9 \times 10^7$

Values are the mean of 3–7 experiments \pm standard deviation.



Text-fig. 2. The proportions of germinal cells (G), Sertoli cells (S) and Leydig cells (Ly) in the total dispersed cell population and in the populations isolated from Layers 2-5 of the dextran discontinuous gradients for separation of cells from the testes of (a) 23-day-old and (b) 38-day-old rats. The values are expressed on a logarithmic scale with the s.d. for the mean of 4-6 experiments.



Text-fig. 3. The proportions of spermatogonia (Sg), spermatocytes at leptotene (L) and pachytene (P) and spermatids (St) in the total dispersed cell population and in the populations isolated from Layers 2-5 of the dextran discontinuous gradients for separation of cells from the testes of (a) 23-day-old and (b) 38-day-old rats. The values are expressed on logarithmic scale with the s.d. for the mean of 4-6 experiments.

Table 2. Summary of results after separation on discontinuous gradients of dextran of cells from the testes of 23- or 38-day-old rats

Layer	Cell no. $\times 10^7$		Cell recoveries (%)		Viability (%)		Protein (mg)	
	23 days	38 days	23 days	38 days	23 days	38 days	23 days	38 days
Total dispersed cells	9.695 \pm 3.5	27.403 \pm 9.9	100	100	93	95	11.055 \pm 3.0	26.86 \pm 9.6
2	5.377 \pm 1.06	13.66 \pm 2.3	55.5	50.0	100	98	7.101 \pm 0.38	15.68 \pm 0.51
3	1.915 \pm 0.44	0.341 \pm 0.17	19.7	1.2	93	98	2.366 \pm 0.71	0.75 \pm 0.17
4	0.077 \pm 0.05	0.017 \pm 0.002	0.8	0.6	100	97	0.2 \pm 0.1	0.09 \pm 0.01
5	0.338 \pm 0.04	0.079 \pm 0.00		3.5	100	97	0.357 \pm 0.09	0.25 \pm 0.07
Recovery %			79.55	51.18			90.67	62.31

Values are mean \pm s.d. for 4-6 experiments.

After the gradient separation, the pellet contained erythrocytes and cell nuclei from damaged cells and Layer 1 contained only a few cells. The details of the cells in the other layers are shown in Table 2. Cell recovery was higher in the 23- than in the 38-day-old rats and the cells were mainly distributed in Layers 2 and 3 (relative densities above 1.0598). Protein recovery was higher than cell recovery in both groups, but was again better in the younger animals. This observation is consistent with the reported fragility of certain germinal cells (André, 1962).

The recovered cells were metabolically active and total dispersed cells from testes of 38-day-old rats produced aerobically 53 ng lactate/h.mg protein⁻¹ compared with the value of 96 ng produced by whole tissue fragments.

EXPLANATION OF PLATES

PLATE 1

Photomicrographs of the typical cell populations obtained from the dextran gradients. PAS-haematoxylin.

Fig. 1. Cell population, mostly pachytene primary spermatocytes, from Layer 2 after separation of testis from a 21-day-old rat. $\times 875$.

Fig. 2. Early spermatids, Golgi phase (Stage 1) from Layer 3 after separation of a 38-day-old testis. $\times 3200$.

Fig. 3. Cell population from Layer 2 (38 days of age). P = primary spermatocytes. The other cells are mostly spermatids in different stages of development. $\times 850$.

Fig. 4. Sertoli cells from Layer 5 (21 days of age) showing the characteristic irregularity and indentation of the nuclei. $\times 3900$.

PLATE 2

Electron micrographs of the different cell types after separation to show the membrane preservation.

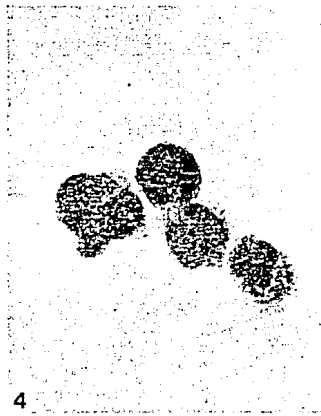
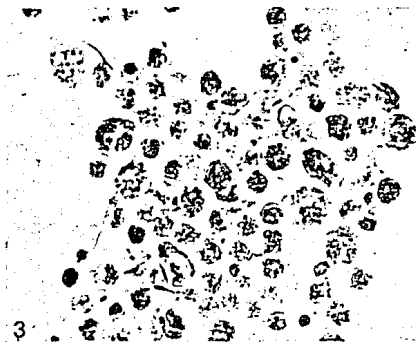
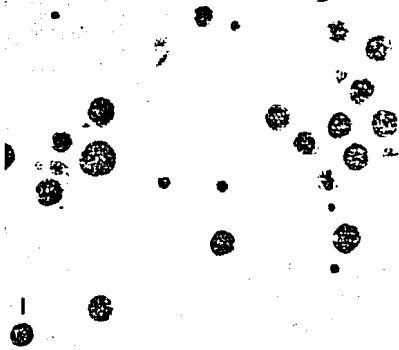
Fig. 5. Late leptotene primary spermatocyte. The nucleus (N) shows a uniform and homogeneous chromatin and chromosomal cores. Groups of mitochondria (M) are present in the cytoplasm. $\times 6630$.

Fig. 6. Pachytene primary spermatocyte. Note condensation of chromatin forming clumps (arrow). The cytoplasm shows groups of mitochondria (M). $\times 6450$.

Fig. 7. Step 1 spermatid. The prominent Golgi apparatus (G) has given rise to the pre-acrosomic granule (Pg). Mitochondria (M) are present near the plasma membrane. $\times 7850$.

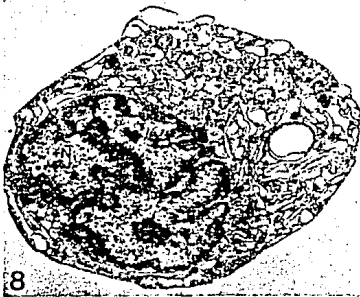
Fig. 8. Sertoli cell. Note irregularity and indentation of the nucleus (N). The cytoplasm shows numerous cisternae of smooth endoplasmic reticulum (SER). $\times 7950$.

Fig. 9. Leydig cell. In the nucleus (N) there are clumps of chromatin associated with the nuclear membrane. The cytoplasm shows numerous round to ovoid mitochondria (M) with a typical arrangement of cristae and vesicular smooth endoplasmic reticulum (arrow). $\times 8000$.



(Facing p. 72)

PLATE 2



Overall distribution of cells

The composition of the total dispersed cell populations and that of the cell populations isolated from the different gradient layers is shown in Text-figs 2(a) and 2(b). At 23 days of age most of the germinal cells were recovered in Layers 2 and 3 (80%). Sertoli cells were found mainly in Layers 2 and 5 and were considerably enriched (60%) in the latter. Leydig cells were found mainly in Layers 2, 3 and 5 but no particular enrichment was observed. At 38 days of age germinal cells were also found mainly in Layers 2 and 3 (51%) and these layers were particularly enriched in germinal cells (98%). Sertoli cells were present in Layer 5 but the number of cells recovered was one order of magnitude less than that for Layer 5 at 23 days of age. Leydig cells showed a pattern similar to that found in the younger animals.

Distribution of germinal cells

The distribution of germinal cells in the gradients are shown in Text-figs 3(a) and 3(b). At 23 days of age spermatogonia were mainly found in Layers 2 and 3 but no enrichment of this cell type was obtained. Spermatocytes at leptotene were found in all the layers, but Layer 4 was the most enriched (49%). Pachytene spermatocytes (and other primary spermatocytes further developed) were mainly found in Layers 2 and 3, which contained a 70% enriched population of cells at this stage of differentiation. Some of the 23-day-old rats in certain seasons of the year had early spermatids, but they could be completely avoided if 21-day-old rats were used with exactly the same technique; the enrichment of primary spermatocytes was then raised to 81%. In gradients from 38-day-old rats Layers 2 and 3 contained enriched populations of spermatids (75%). Primary spermatocytes had a pattern of distribution similar to that of the 23-day-old animals and spermatogonia were practically restricted to Layers 2 and 3.

Structural observations

Typical photomicrographs of some of the primary spermatocyte and spermatid populations obtained are shown in Pl. 1, Figs 1-4. The morphological characterization of the cells in the various cell populations was in accordance with their DNA content, as shown in Table 3. Electron micrographs showing the degree of membrane preservation of the cells are presented in Pl. 2, Figs 5-9. Total dispersed cell populations from 23- and 38-day-old rats showed 100% preservation of their membrane structures. Very few symplastic formations were observed. In the 23-day-old rats, 68 and 80.2% of the cells recovered from Layers 2 and 4 respectively had intact membrane structures. The value for Layer 4 in the 38-day-old rats was 87.6%; that for Layer 2 was lower, probably because of the known fragility of spermatids (André, 1962).

Table 3. DNA content (pg/cell) of rat testicular cells in the various gradient layers after separation

	Age (days)	Layer			
		2	3	4	5
Experimental	23	12.7	12.2	11.0	8.0
	38	5.0	7.0		
Theoretical	23	12.1	11.7	11.1	8.1
	38	4.1	6.7		

Experimental values: DNA/no. of cells recovered.

Theoretical values: calculated from the percentage of each cell type in the population recovered from the layer, assuming $n = 3.5$ pg DNA; and spermatids = n , spermatogonia, Sertoli cells and Leydig cells = $2n$ and spermatocytes = $4n$.

When this work was almost completed dextran T-500 (Pharmacia, Uppsala) became available and was tested. Results were essentially identical under the same conditions, except that the gradients were centrifuged for 30 min (instead of 20 min) for testes from 38-day-old rats.

Discussion

The technique described here was developed to obtain enriched populations of spermatocytes and of spermatids in enough quantities and in a good enough condition of preservation to permit study of the metabolic differences between these two distinct stages of differentiation and advantage was taken of the chronological appearance of the different germinal cell types in rat testes during maturation. For example, at 21–23 days of age all types of primary spermatocytes are present and represent the main cell population, further enrichment occurring in Layers 2 and 3, and at 38 days, when spermiogenesis has attained stage 14 (Clermont, 1972), spermatids are obtained in the enriched populations. If older rats are used the flagella and the large numbers of spermatozoa prevent reproducible separation of the other cell types.

To perform metabolic studies on isolated cells both their number and integrity of cell structures are important factors. Previous cell separation methods described in the literature have resulted in some germinal cell populations with a lower contamination by other cell types (Meistrich & Trostle, 1975; Davis & Schuetz, 1975; Romrell *et al.*, 1976), but these cell populations are often highly diluted and/or the number of cells recovered is not high enough for particular metabolic studies. Electron microscopy of the germinal cell preparations has not always been included (Lam *et al.*, 1970; Go *et al.*, 1971; Meistrich, 1972; Meistrich *et al.*, 1973; Pretlow *et al.*, 1974; Meistrich & Trostle, 1975; Davis & Schuetz, 1975; Grabske *et al.*, 1975), and it is therefore difficult to compare the degree of preservation of the cellular structures with the various techniques.

Romrell *et al.* (1976), Bellvé, Millette, Bhatnagar & O'Brien (1977b) and Barcellona & Meistrich (1977) have examined the integrity of isolated mouse testicular cells. Their results seem comparable to those of the present study but no mention was made of the percentage of cells showing good membrane preservation. By our technique we could obtain, within 3 h, over 58×10^6 well preserved primary spermatocytes from a population of 72×10^6 cells (Layer 2 + Layer 3 of the gradients from 21–23-day-old rats) or 105×10^6 spermatids from a population of 140×10^6 cells (Layer 2 + Layer 3 of the gradients from 38-day-old rats).

The contamination of each cell population by the other cell types present was the most serious limitation of the technique and should be taken into consideration. Further purification of the germinal cell populations may perhaps be obtained by a combination with another sequential discontinuous gradient or with an elutriation centrifugation, such as that described by Grabske *et al.* (1975).

This work was partly supported by a grant from the Ford Foundation. We thank Mrs Elodia Cruz-Lavin for skillful technical assistance and Mrs L. Ponce de León and Mrs C. Garcia for secretarial help.

References

- ANDRÉ, J. (1962) Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse. *J. Ultrastruct. Res., Suppl.* 3, 1–185.
- BARCELLONA, W. J. & MEISTRICH, J.L. (1977) Ultrastructural integrity of mouse testicular cells separated by velocity sedimentation. *J. Reprod. Fert.* 50, 61–68.
- BELLVÉ, A.R., CAVICCHIA, J.C., MILLETTE, C.F., O'BRIEN, D.A., BHATNAGAR, Y.M. & DYM, M. (1977a) Spermatogenic cells of prepubertal mouse: isolation and morphological characterization. *J. Cell. Biol.* 74, 68–85.
- BELLVÉ, A.R., MILLETTE, C.F., BHATNAGAR, Y.M. & O'BRIEN, D.A. (1977b) Dissociation of mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 480–494.
- BISHOP, D.W. (1969) Testicular enzymes as fingerprints in the study of spermatogenesis. In *Reproduction and Sexual Behavior*, pp. 261–286. Ed. M. Diamond. Indiana University Press.
- BURGOS, M.H., VITALE-CALPE, R. & AOKI, A. (1970) Fine structure of the testis and its functional significance. In *The Testis*, Vol. 1, pp. 551–577. Eds A. D. Johnson, W. R. Gomes & N. L. VanDenMark. Academic Press, New York.
- CLERMONT, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52, 198–236.
- CLERMONT, Y. & PEREY, B. (1957) Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J. Anat.* 100, 241–267.

- DAVIS, J.C. & SCHUETZ, A.W. (1975) Separation of germinal cells from immature rat testes by sedimentation at unit gravity. *Expt Cell Res.* 91, 79-86.
- DELHUMEAU-ONGAY, G., TREJO-BAYONA, R. & LARA-VIVAS, L. (1973) Changes of (Ca^{2+} - Mg^{2+})-adenosine-triphosphatase activity in rat testis throughout maturation. *J. Repr. Fert.* 33, 513-517.
- DOOHER, G.B. & BENNETT, D. (1973) Fine structural observations on the development of the sperm head in the mouse. *Am. J. Anat.* 136, 339-361.
- FREE, M.J. (1970) Carbohydrate metabolism in the testis. In *The Testis*, Vol. II, pp. 125-192. Eds A.D. Johnson, W. R. Gomes & N. L. VanDemark. Academic Press, New York.
- GILES, K.W. & MYERS, A. (1965) An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature, Lond.* 206, 93.
- GLAUERT, A.M. & GLAUERT, R.H. (1958) Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 191-200.
- GO, V.L.W., VERNON, R.G. & FRITZ, I.B. (1971) Studies on spermatogenesis in rats. I. Application of sedimentation velocity technique to an investigation of spermatogenesis. *Can. J. Biochem.* 49, 753-760.
- GRABSKY, R.J., LAKF, S., GLEDHILL, B.L. & MEISTRICH, M.L. (1975) Centrifugal elutriation: separation of spermatogenic cells on the basis of sedimentation velocity. *J. cell. Physiol.* 86, 177-190.
- HARTREE, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.* 48, 422-427.
- LAM, D.M.K., FURRER, R. & BRUCE, W.R. (1970) The separation, physical characterization and differentiation kinetics of spermatogonial cells of the mouse. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 65, 192-199.
- LEBLOND, C.P. & CLERMONT, Y. (1952) Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.* 90, 167-215.
- LEIDERMAN, B. (1969) Consumo de oxígeno y producción de ácido láctico de células germinales aisladas "in vitro" de testículo de rata. *Revista Soc. argent. Biol.* 45, 57-63.
- LEIDERMAN, B. & MANCINI, R.E. (1968) Aerobic and anaerobic lactate production in the prepuberal and adult rat testis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 128, 818-821.
- LEYVA, A., JR & KELLEY, W.N. (1974) Measurement of DNA in cultured human cells. *Analyt. Biochem.* 62, 173-179.
- MEISTRICH, M.L. (1972) Separation of mouse spermatogenic cells by velocity sedimentation. *J. cell. Physiol.* 80, 299-312.
- MEISTRICH, M.L. & TROSTLE, P.K. (1975) Separation of mouse testis cells by equilibrium density centrifugation in renografin gradients. *Expt Cell Res.* 92, 231-244.
- MEISTRICH, M.L., BRUCE, W.R. & CLERMONT, Y. (1973) Cellular composition of fractions of mouse testis cells following velocity sedimentation separation. *Expt Cell Res.* 79, 213-227.
- PHETLOW, T.G., II, SCALISE, M.M. & WEIR, E.E. (1974) Separation of hamster testicular cells in successive stages of differentiation by velocity sedimentation in isokinetic gradient of ficoll in tissue culture medium. *Am. J. Path.* 74, 83-94.
- ROMRELL, L.J., BELLVÉ A.R. & FAWCETT, D.W. (1976) Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity: a morphological characterization. *Devl Biol* 49, 119-131.
- SHORTMAN, K. (1972) Physical procedures for the separation of animal cells. *A. Rev. Biophys. Bioeng.* 1, 93-130.
- SZARSKI, H. (1976) Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 44, 93-111.
- TEPPERMAN, H.M. & TEPPERMAN, J. (1950) Glucose utilization *in vitro* by normal adult, immature and cryptorchid testis. *Endocrinology* 47, 459.

Received 8 November 1977

CALMODULIN CONTENT AND LOCALIZATION IN MALE GERM
CELLS DURING MEIOTIC AND POSTMEIOTIC STAGES
AND EPIDIDYMAL MATURATION

Raquel Trejo Albarran¹,
Graciela-Delhumeau-Ongay

¹ Seccion de Crecimiento y Desarrollo. Unidad de Investigacion Biomedica del Centro Medico Nacional-IMSS. Apartado Postal 12-1184. 03020 Mexico, D.F. MEXICO.

John R. Dedman²

² University of Texas, Medical School, Houston, Div. Endocrinology. Houston, Texas. U.S.A.

INTRODUCTION

Evidence has been acquired showing that calmodulin is the primary calcium receptor in cells and has been suggested as a regulator of various cellular processes (Cheung, 1980; Means and Dedman, 1980; Means, 1981).

Developmental changes in calmodulin, measured by its effects on phosphodiesterase activity, have been reported in different rat tissues. Among them, adult rat testis showed the highest phosphodiesterase activator content and this level was reached between 20-30 days of age (Smoake, et al, 1974).

Due to the great variety in testicular cell types and their precise chronological appearance within the germinal epithelium (Clermont & Perey, 1957), we decided to study whether the observed changes in calmodulin activity were or not correlated to specific stages of spermatozoa differentiation. Emphasis was made on cells during meiosis because it has been shown that during oocyte meiotic maturation calmodulin level increased (Cartaud and Ozon, 1980).

The possibility to have available both monospecific antibodies against calmodulin (Dedman, et al, 1978) and germinal cell populations enriched at some stage of maturation (Aleman, et al, 1978) allowed us to determine calmodulin localization and content in:

a) Leptotene primary spermatocytes; b) Pachytene primary spermatocytes; c) Spermatids; d) Spermatozoa from caput, body and cauda of epididymis.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

-Minimum Essential Medium (MEM), was purchased from Gibco, buffered with 20 mM Hepes pH 7.2.

Dextran T-500 was from Pharmacia Fine Chemicals, previously purified to eliminate calcium ions.

Krebs-Hepes colution was constituted by 122 mM, NaCl; 6 mM, KCl; 20 mM, HEPES; 5 mM, NaH_2PO_4 ; 1 mM, MgCl_2 pH 7.15.

Glass material was presiliconized. Reagents and material were sterilized before use.

Antibodies

-Monospecific antibodies against rat testis calmodulin were produced, purified and characterized as previously described by Dedman et al (1978).

Isolated germ cells

Testicular cell populations enriched in Leptotene primary spermatocytes, in Pachytene primary spermatocytes or in Spermatids were obtained from male Sprague-Dowley rats at 12-15, 21 and 38 days of age, respectively, according to Alemán et al (1978).

Briefly, testicular cells were dispersed in MEM by a mechanical and collagenase treatment of small pieces of tissue. The supernatant fraction was filtered through nylon and silk cloths and centrifuged at 55 xg for 10 min. The pellet was resuspended in MEM and centrifuged onto a discontinuos Dextran T500-MEM gradient at 9220 xg 35 min at 20° C.

Cells were recovered from each layer and washed twice with MEM and with a Krebs-Hepes solution, pH 7.15.

Spermatozoa were isolated from body, caput and cauda of epididymis by ligation of the three sections and perfusion with Krebs-Hepes pH 7.15.

Indirect Immunofluorescence

We followed the procedure described by Fuller et al (1975). Enriched cell populations at the defined stage of maturation were fixed in 3% glutaraldehyde-Krebs-Hepes pH 7.15 for 30 min. Washed and resuspended with Krebs-Hepes in 0.5 ml. A small drop of cell suspension was smeared in precleaned 18x18 mm cover slips.

The cells were then postfixed in cold acetone at -20° C and rinsed with Krebs-Hepes at room temperature. Cells were incubated with 20 μ l of goat anti-rat calmodulin (0.2 mg prot/ml) for 60 min at room temperature. They were rinsed with Krebs-Hepes and treated with 20 μ l of fluorescein conjugated rabbit anti-goat IgG diluted 1:20 and incubated 30 min at room temperature. Cells were rinsed with Krebs-Hepes and mounted with Krebs-Hepes-glycerol 1:10 pH 8.5.

Cells were viewed and photographed in a Zeiss Photomicroscope II equipped for epifluorescence and with a 100 W Mercury lamp. Cells were viewed through a 63 x ^{oe1} objective (NA 1.4) and recorded on Kodak TRI-X film.

Calmodulin content

Quantitative calmodulin determination was performed by radio-

immunoassay as described by Chafouleas et al (1979).

Aliquots of isolated germ cell populations enriched in a defined stage of maturation were lyophilized and their calmodulin content was determined. The calmodulin content per cell was obtained by dividing the calmodulin observed content by the number of cells in each cell powder.

RESULTS

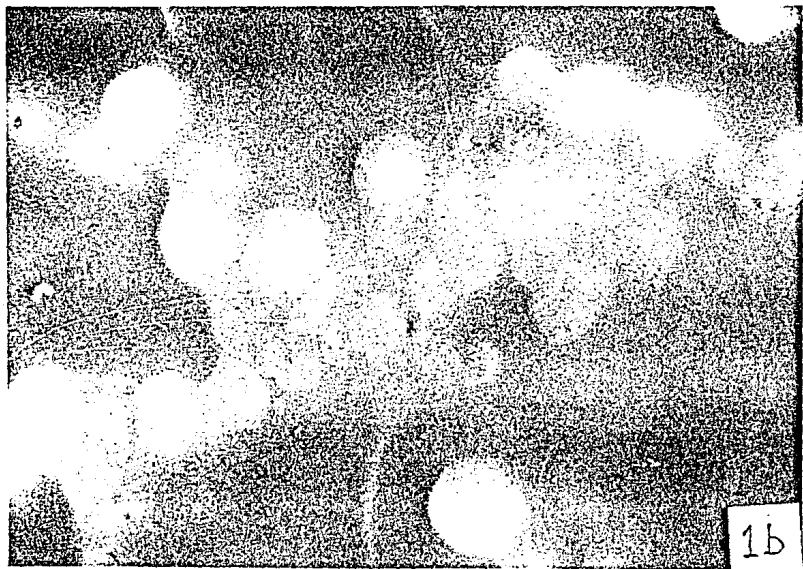
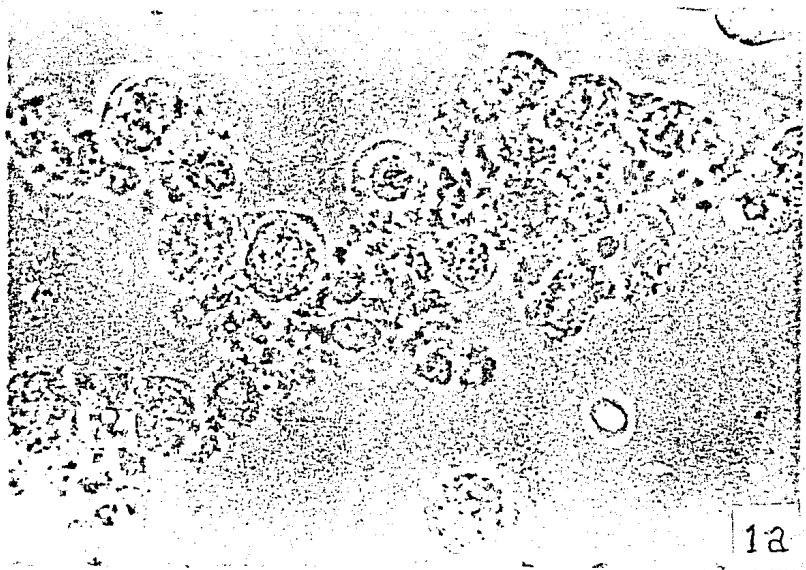
A positive calmodulin immunofluorescence reaction was observed in the four cellular populations of the germinal epithelium that were studied.

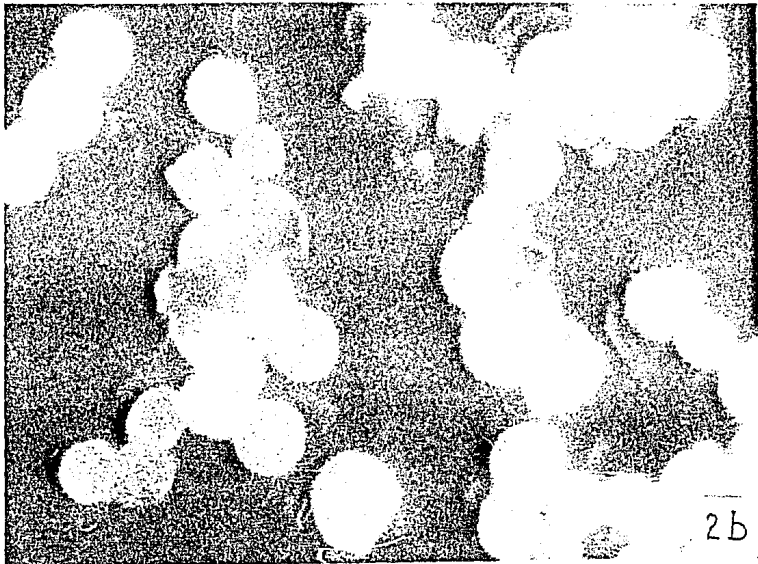
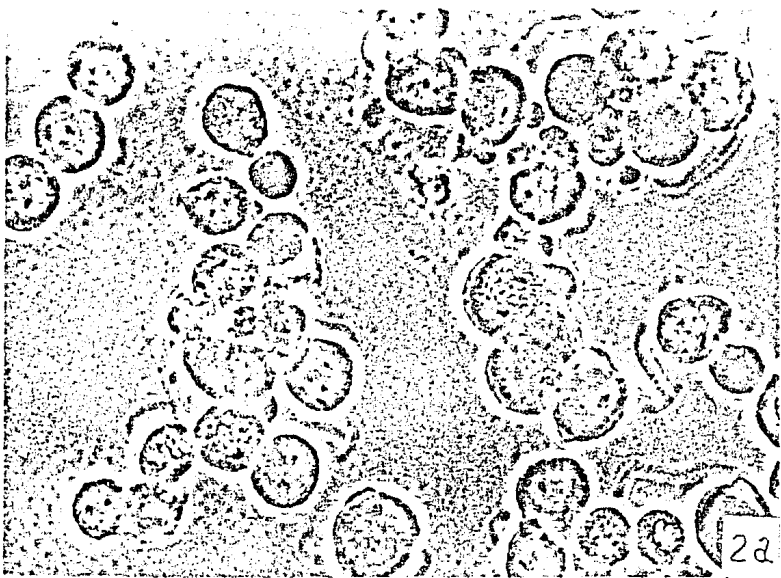
Leptotene primary spermatocytes showed a diffuse fluorescence in the whole cell. However they had the lowest intensity as compared with the other cell types. In fact it was so low that photographs could not be taken.

Primary spermatocytes at the Pachytene stage showed a similar fluorescence in the whole cell, but with a higher intensity. In Fig 1(a) we present a phase contrast photograph of the Pachytene primary spermatocyte enriched population and in Fig 1(b) the same cells viewed with an epifluorescence system.

During the first stages of spermiogenesis, Golgi phase, Fig 2 (a), calmodulin localization was similar to that showed by cells at the meiotic prophase. Immunofluorescence was localized in each whole cell Fig 2 (b). At later stages of spermatid maturation, acrosome phase Fig 3 (a), the fluorescence was seen in the cytoplasm and along the tail with a greater intensity at the junction region of the flagellum Fig 3 (b).

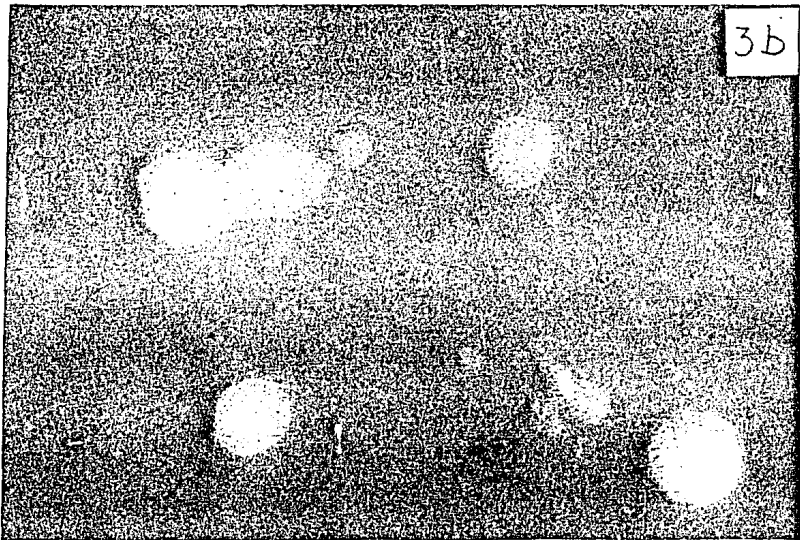
Spermatozoa from any section of Epididymis Fig 4 (a), showed fluorescence in the head and along the tail, with major intensity in the acrosome region and in the cytoplasmic droplet Fig 4 (b).







3a



3b

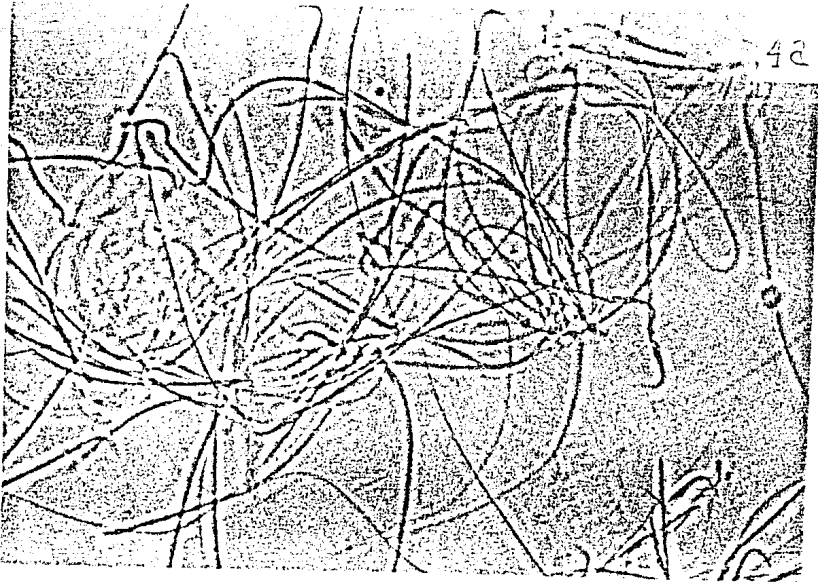


Table 1 summarizes the calmodulin content obtained in the isolated germ cell populations. At the beginning of the first meiotic prophase, leptotene stage, the cells showed the lowest calmodulin content, 0.030 pg/cell. We observed an abrupt change in calmodulin level when cells reached the next stages of the first meiotic prophase. From the pachytene stage the cells had more than twenty times calmodulin than at the leptotene stage. Spermatid enriched population showed almost the same calmodulin content per cell as the pachytene primary spermatocyte enriched population.

Table 1. CALMODULIN CONTENT IN ISOLATED GERM CELLS

AGE	CELL POPULATION	TOTAL CELL/ALIQOT	CALMODULIN pg/cell
15 days	Leptotene Primary Sperma- tocytes (60%)	9×10^6	0.03
21 days	Postleptotene Primary Spermatocytes (82%)	11×10^6	0.70
38 days	Spermatids (73%)	35×10^6	0.80

DISCUSSION

The development of monospecific antibodies against calmodulin had allowed to determine its cellular localization by indirect immunofluorescence and by immunoelectron microscopy in tissues and cultured cells at different stages of the cell cycle (Dedman et al, 1978; Lin et al, 1980).

In the present work we studied four rat germinal cell populations at the main stages of differentiation. Two of them were enriched in cells at different stages of the particularly slow first meiotic prophase. The third population studied was enriched in spermatids. These cells no longer divide but experiment profound morphologic and metabolic changes which culminate with the production of spermatozoa.

In these four populations we observed immunofluorescence against calmodulin. In cells during the first meiotic prophase we observed a diffuse fluorescence in the whole cell. We did not observe special immunofluorescence regions as it has been shown in the centriolar region during mitosis prophase (Welsh et al, 1979).

In spermatids at early stages (Golgi phase) we observed fluorescence in the whole cell, but at later stages (acrosome phase) we also observed a region of higher fluorescence intensity at the attachment region of the tail to the head. Jones et al (1980) found this specially fluorescent region in epididymal guinea pig spermatozoa.

Rat spermatozoa from any region of the epididymis showed fluorescence along the tail and in the head with a higher intensity at the acrosome.

We did not observe the higher fluorescence region at the junction of the flagellum as well as the band further down the head showed by Jones et al (1980).

The junction of the flagellum to the head is a critical process and the cellular structures involved reflect its complexity. Rat spermatozoa have distinctive features at this point, the two centrioles disappear but are present at spermatid stages. It is possible that calmodulin is present in these cells as a gradient around the centrioles, since this type of gradient has been observed in dividing cells (Welsh et al, 1979). Maybe this gradient is lost when centrioles disappear (Fawcett, 1975).

It has been reported that part of calmodulin in Tetrahymena is located in ciliary axonemes and is associated to a 14S dynein fraction (Jamieson et al, 1979). By using bovine brain calmodulin it has been shown that it binds to 14S and 30S dynein fractions (Blum et al, 1980).

These data could explain the fluorescence showed by us along the flagellum of rat epididymal spermatozoa.

We observed a fluorescence against calmodulin in the cytoplasmic droplet. It has been reported a ram seminal plasma extract that activates a $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase from spermatozoa flagellar membranes and a calmodulin-like activity in human seminal plasma (Forrester and Bradley, 1980 a, b).

It is possible that during spermiogenesis the reduction of cytoplasm involves a calmodulin loss. This remains to be proved.

The major contributors of testis calmodulin were the germinal cells. From the determinations of calmodulin in the enriched populations of primary spermatocytes at different stages of the first meiotic prophase and that one enriched in spermatids, we observed that the major increase in calmodulin level occurred during the first meiotic prophase. At the initial stage (leptotene), the cells showed a low calmodulin content. At the advanced stages (zygotene and pachytene) primary spermatocytes showed almost a 25 fold increase and this level was maintained during spermatid stages. However, the changes in cell volume during spermatogenesis as well as a possible compartmentation must be considered in order to define the actual calmodulin concentration changes.

During oocyte meiotic maturation, induced by progesterone treatment, Cartaud and Ozon (1980) have also observed an enhancement of the calmodulin level from 28 to 70%. In meiosis it could play an important role because a microinjection of this protein into oocytes induced a complete meiotic response (Maller and Krebs, 1978).

The large increase in calmodulin content after the leptotene stage could be part of the gene expression triggered at meiotic stages where specific testicular isoenzymes appear, particularly at the pachytene stage, such as x-lactic dehydrogenase (LDH-X) (Meistrich et al, 1977) carnitine acetyl transferase (Vernon et al, 1971), sorbitol dehydrogenase (Bishop, 1968) and sperm type hexokinase (Sosa et al, 1972).

In Table 2 we compared the reported values of calmodulin content in germinal cells determined by different techniques. Spermatozoa from various mammalian species had a similar number of calmodulin molecules (Jones et al, 1978).

These changes in calmodulin content throughout germ cell differentiation suggest changes in the functions to which it has been related and must be further investigated.

Figures 1-4

Calmodulin localization in male rat germinal cells. Phase contrast (a) and calmodulin indirect immunofluorescence photomicrographs (b). Final magnification x2520.

Fig. 1(a) and (b)

Postleptotene primary spermatocyte population (82%). Cells at Pachytene stages are shown, they represented 35% of the whole population.

Fig. 2(a) and (b)

Spermatid enriched population (73%). The photograph shows spermatids at Golgi phase, stages 1-4. They represented 58% of the total population.

Fig. 3(a) and (b)

Spermatids at acrosome phase. They constituted 15% of the spermatid population. A region of higher fluorescence intensity is observed in the junction region of the flagellum.

Fig. 4(a) and (b)

Spermatozoa from cauda of epididymis. Fluorescence in the whole cell is observed with a higher intensity in the middle of the flagellum which suggests rest of the cytoplasmic droplet.

Text Table 1

Calmodulin content was determined in lyophilized cell populations by Radioimmunoassay according to Chafouleas et al, (1979). Leptotene primary spermatocyte represented 60% of the cell population, Sertoli cells 20%, Spermatogonia 9%, Pachytene spermatocytes 4% and Leydig cells 6%. Postleptotene primary spermatocyte population was constituted by cells at Zygotene 14%, Pachytene 35%, Diplotene 16%, Secondary spermatocytes 18%. The contaminant cells were leptotene 3%, Spermatogonia 10%, Sertoli cells 2% and Leydig cells 2%. Spermatid enriched population was constituted by cells at Golgistages 58% and at acrosome stages 15%. The contaminant cells were leptotene 2%, Zygotene 7%, Pachytene 6%, Diplotene 7%, Secondary Spermatocytes 3%. Spermatogonia and Leydig cells 2%.

Table 2. CALMODULIN CONTENT IN DIFFERENT CELL TYPES

SOURCE	CELL	CALMODULIN CONTENT/CELL		METHOD	REFERENCES
		pg	molecules		
<u>Xenopus laevis</u>	Oocyte	130×10^3	4.57×10^{15}	Extraction & Purification	Cartaud and Ozon (1980)
Rat	Leptotene Primary Spermatoocytes	0.03	10.2×10^5	RIA	Present work
Rat	Postleptotene Primary Spermatoocytes	0.70	247.5×10^5	RIA	Present work
Rat	Spermatids	0.80	283.4×10^5	RIA	Present work
Hamster	Spermatozoa (Epididymis)	0.0037	1.0×10^5	Stimulation of PDE activity	Jones <u>et al</u> (1978)
Rabbit	Spermatozoa (ejaculated)	0.0014	0.49×10^5	Stimulation of PDE activity	Jones <u>et al</u> (1978)
Rooster	Spermatozoa (ejaculated)	0.0009	0.3×10^5	Stimulation of PDE activity	Jones <u>et al</u> (1978)
Human	Spermatozoa (ejaculated)	0.0035	1.2×10^5	Stimulation of PDE activity	Jones <u>et al</u> (1978)
Sea urchin	Spermatozoa	0.0001	0.034×10^5	Stimulation of PDE activity	Jones <u>et al</u> (1978)
Sea urchin	Spermatozoa	0.00083	0.29×10^5	Extraction & Purification	Garbers <u>et al</u> (1980)

REFERENCES

- Alemán, V., Trejo, R., Morales, E., Hernández-Jáuregui, P. and Delhumeau-Ongay, G. (1978). A simple and rapid technique to isolate enriched populations of spermatocytes and spermatids from the immature rat testis. *J. Reprod. Fert.* 54, 67-75.
- Bishop, D.K. (1968). Testicular enzymes as finger prints in the study of spermatogenesis. In "Reproduction and Sexual Behavior". Ed. M. Diamond. pp 261-268. Indiana University Press. Bloomington, Ind.
- Blum, J.J., Hayes, A., Jamieson, G.A.Jr. and Vanaman, T.C. (1980). Calmodulin confers calcium sensitivity on ciliary dynein ATPase. *J. Cell Biol.* 87, 386-397.
- Cartaud, A. & Ozon, René (1980). *Xenopus laevis* oocyte calmodulin in the process of meiotic maturation. *J. Biol. Chem.* 256, 9404-9408.
- Chafouleas, J.G., Dedman, J.R., Munjaal, R.P. and Means, A.R. (1979). Calmodulin. Development and application of a sensitive radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 254, 10262-10267.
- Cheung, W.Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207, 19-27.
- Clermont, Y. & Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* 100, 241-267.
- Dedman, J.R., Welsh, M.J. & Means, A.R. (1978). Ca^{2+} -dependent regulator. Production and characterization of a monospecific antibody. *J. Biol. Chem.* 253, 7515-7521.
- Fawcett, D.W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44, 394-456.
- Forrester, I.T. & Bradley, M.P. (1980a). Identification of calmodulin-like activity in human seminal plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 794-1001.
- Forrester, I.T. & Bradley, M.P. (1980b). A (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase in epididymal and ejaculated sperm flagellar plasma membranes: Possible modulation by extracellular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 356, 382-384.
- Fuller, G.M., Brinkley, B.R. and Boughter, J.M. (1975). Immunofluorescence of mitotic spindles by using monospecific antibody against bovine brain tubulin. *Science* 187, 948-950.
- Garbers, D.L., Hansbrough, J.R., Radany, E.W., Hyne, R.U. & Kopf, G.S. (1980). Purification and characterization of calmodulin from sea urchin spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 59, 377-381.

References....

- Sanjés, J.F., J. Vazquez, P.J. & Plum, J.C. (1979). Presence of calmodulin in Salpaxomene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6478-6482.
- Jones, H.P., Bradford, M.M., McKorie, R.A. and Cormier, M.J. (1978). High levels of a calcium-dependent modulator protein in spermatozoa and its similarity to brain modulator protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 1264-1272.
- Jones, H.P., Lentz, R.W., Palevitz, E.A. and Cormier, M.J. (1980). Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 2772-2776.
- Lin, C.T., Dedman, J.R., Brinkley, B.R. & Means, A.R. (1980). Localization of calmodulin in rat cerebellum by immunoelectron microscopy. J. Cell Biol. 85, 473-480.
- Maller, J.L. & Krebs, E.G. (1978) Intracellular cAMP levels and the initiation of meiosis in Xenopus oocytes. J. Cell Biol. 79, 180a.
- Means, A.R. (1981). Calmodulin: Properties intracellular localization and multiple roles in cell regulation. In Recent Progress in Hormone Research 37, 333-367.
- Means, A.R. and Dedman, J.R. (1980). Calmodulin an intracellular calcium receptor. Nature 285, 75-77.
- Meistrich, M.L., Trostle, P.K., Frapart, M. & Erickson, R.P. (1977). Biosynthesis and localization of lactate dehydrogenase X in pachytene spermatocytes and spermatids of mouse testis. Dev. Biol. 60, 428-441.
- Smoake, J.A., Song, S.Y. & Cheung, W.Y. (1974). Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Distribution and developmental changes of the enzyme and its protein activator in mammalian tissues and cells. Biochem. Biophys. Acta 341, 402-411.
- Sosa, A., Altamirano, E., Hernández, P. & Rosado, A. (1972). Developmental patterns of rat testis hexokinase. Life Sci. 11, 499-510.
- Vernon, R.G., Go, V.L.W. & Fritz, I.B. (1971). Studies on spermatogenesis in rats. II. Evidence that carnitine acetyl transferase is a marker enzyme for the investigation of germ cell differentiation. Canad. J. Biochem. 49, 761-767.
- Welsh, M.J., Dedman, J.R., Brinkley, B.R. & Means, A.R. (1979). Tubulin and calmodulin. Effects of microtubule and microfilament inhibitors on localization in the mitotic apparatus. J. Cell Biol. 81, 624-634.

IDENTIFICACION DE LA ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) EN CELULAS GERMINALES EN DISTINTOS ESTADIOS DE LA ESPERMATOGENESIS.

Introducción

En los trabajos previamente presentados como parte de esta tesis, habíamos definido que la capacidad de hidrólisis de ATP testicular se modificaba dependiendo del grado de desarrollo del epitelio germinal, mostrando un incremento durante la diferenciación de los espermatoцитos primarios y una disminución gradual conforme la espermiogénesis se realizaba.

Dicha actividad hidrolítica de ATP mostró no depender de Na⁺ ni de K⁺ y tampoco fue inhibida significativamente por ouabaina. La adición de Ca²⁺ y/o Mg²⁺ sí estimuló la producción de fosfato inorgánico a partir de ATP.

Estos resultados más el haber observado la presencia de calmodulina en las células germinales en todos los estadios de diferenciación, a niveles muy elevados en los espermatoцитos primarios postleptotenos y en espermátidas, llevaron a estudiar si existía relación entre el aumento en el contenido de calmodulina y el incremento en la actividad hidrolítica de ATP sensible a Ca²⁺ y/o Mg²⁺ durante la maduración de los espermatoцитos primarios tomando como modelo las observaciones informadas en eritrocitos.

Bond y Clough fueron los primeros autores en informar que el hemolizado de eritrocitos, dializado exhaustivamente y libre de membranas, era capaz de duplicar la actividad de la ATPasa dependiente de Ca²⁺ y Mg²⁺ membranal y que no tenía ningún efecto sobre la actividad de la ATPasa

dependiente de Na^+ y K^+ ni sobre la ATPasa dependiente de Mg^{2+} (52).

Posteriormente Luthra y colaboradores (53, 54) purificaron al activador y lo identificaron como una proteína, con un peso molecular mínimo de 16000 pero inferior a 50 000, cargada negativamente, con alto contenido en ácido glutámico (17%) y en ácido aspártico (14%), termoestable, que confería estimulación en la hidrólisis de ATP sólo en posición gama y en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} a membranas aisladas de eritrocito.

Las semejanzas fisicoquímicas entre la proteína activadora de la ATPasa- ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) y la proteína activadora de la fosfodiesterasa, sugirieron a Gopinath y Vincenzi (54) estudiar el efecto que estas dos proteínas tenían sobre la ATPasa- ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) de membrana de eritrocito y observaron que la magnitud del incremento en la actividad de esta enzima era igual con ambas proteínas.

Habiéndose informado que tanto la proteína activadora de la fosfodiesterasa como la activadora de la ATPasa dependían de Ca^{++} para producir su estimulación (55, 56), los mismos autores decidieron estudiar el efecto que producirían dos proteínas que unen calcio, la troponina C y la parvalbúmina, sobre la ATPasa- ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$), tomando en consideración que la troponina C y el activador de la fosfodiesterasa compartían muchas características estructurales, pero los incrementos observados fueron de la mitad y del 12% respectivamente, del producido por el activador de la fosfodiesterasa o del activador de la ATPasa (54).

Estos resultados llevaron al estudio del comportamiento de la ATPasa- ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) membranal con su activador o con el activador de la fos-

fodiesterasa, frente a diferentes concentraciones de Ca^{++} libre y se encontró igual actividad, con una constante de disociación aparente de 4.3×10^{-6} M en cualquiera de los dos casos.

Estas evidencias sugerían que el activador de la fosfodiesterasa y el activador de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ eran la misma proteína, con dos manifestaciones distintas. Estudios posteriores, con ambas proteínas aisladas y purificadas, demostraron que son idénticas y llevaron a reconocer que la misma proteína había recibido diferentes nombres de acuerdo con las funciones celulares con las que se le había encontrado relacionada y a partir de la proposición de Cheung (57) se designó como calmodulina.

La adición de calmodulina estimula las dos manifestaciones de la actividad de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$, tanto su capacidad de bombeo de Ca^{++} como su velocidad de hidrólisis de ATP, ya sea en membranas de eritrocitos obtenidas por choque osmótico, en vesículas membranales de polaridad invertida o en preparaciones con la enzima purificada de eritrocitos e incorporada a liposomas (58-63).

Aunque la mayoría de los estudios relacionados con esta enzima han sido realizados en eritrocitos, se ha demostrado su presencia en otros sistemas celulares como: en la fracción microsomal de cerebro de rata (64), en plaquetas (65), en membrana plasmática de miometrio de conejo (66). La regulación del bombeo de Ca^{++} por calmodulina ha sido reportada en médula adrenal (67), en la fracción microsomal de músculo liso de tráquea (68) y en vesículas de membranas vegetales (69).

En el presente modelo experimental se identificó la presencia de esta

ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺) tomando en consideración dos criterios:

- a) Incremento de la actividad de ATPasa en presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺ y su respuesta a la adición de calmodulina.
- b) Inhibición de la estimulación por calmodulina de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺) por la adición de trifluoroperazina, inhibidor altamente específico de la calmodulina (70).

Se determinó la actividad de ATPasa dependiente de Ca²⁺ y Mg²⁺ en las poblaciones de células germinales enriquecidas en espermatoцитos primarios leptotene, en espermatoцитos primarios postleptotene (82%), en espermátides (75%) y en espermatozoides de epidídimo (100%).

También se determinó la actividad de esta enzima en la fracción microsomal obtenida de testículo de rata a diferentes edades, cuyo epitelio germinal alcanzara el grado de desarrollo correspondiente a las poblaciones celulares estudiadas.

El activador empleado fue obtenido y parcialmente purificado de las mismas preparaciones a las cuales se les determinó la actividad de ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺).

Nuestros resultados señalan que la ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺) está presente en las células del epitelio germinal y que su actividad cambia durante su diferenciación y maduración en el epidídimo, observándose la máxima actividad en los espermatoцитos primarios postleptotenos.

Material y Métodos

I Soluciones empleadas

- a) Sol. Drebs-Hepes: NaCl, 122 mM; KCl, 6 mM; NaH₂PO₄, 5 mM; MgCl₂·6H₂O, 1 mM; Hepes, 20 mM, pH 7.2 . Esta solución se empleó para resuspender las poblaciones celulares recién obtenidas y eliminar los restos de Dextrán T 500 y MEM usados para separarlas. También se le utilizó para recibir y enjuagar el tejido testicular, después del sacrificio de la rata.
- b) Sol. hipotónica y de homogeneización. Se empleó la solución que recomiendan Shulman y Greengard (71), para la obtención de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de la fracción microsomal. Histidina, 3 mM; CaCl₂·2H₂O, 1 mM; MgCl₂·6H₂O, 2 mM; ATP·2Na, 0.2 mM, pH 7.2 .
- c) Sol. para la obtención de la fracción microsomal: NaCl, 155 mM; Histidina, 5 mM; Mercaptoetanol, 1 mM.
- d) Sol. para resuspender las membranas de la fracción microsomal y para resuspender y homogeneizar las poblaciones celulares: NaCl, 155 mM; Histidina, 3 mM pH 7.5 .
- e) Medio de incubación para la determinación de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) . Se utilizó el medio descrito por Gopinath y Vincenzi (55), modificado según Katz y colaboradores (72) para obtener Ca²⁺ libre a una concentración de 10⁻⁶M. ATP·2Na, 5 mM; MgCl₂·6H₂O, 5 mM; EGTA, 3.2mM; NaCl, 80mM; KCl, 15 mM; CaCl₂, 1 mM; Histidina, 18 mM; Imidazol, 18 mM, pH 7.2 .
- f) Inhibidores. Se empleó ouabaina 10⁻⁴M, para inhibir la ATPasa-(Na⁺ + K⁺). Rojo de rutenio, fracción purificada, 10⁻⁶M para inhibir la ATPasa mitocondrial. Trifluoroperazina, inhibidor de calmodulina, a diferen -

tes concentraciones, obsequio de los laboratorios Smith, Kline and French, S.A.

Fuente enzimática.- Poblaciones celulares enriquecidas en espermatozoides primarios leptoténos, espermatozoides primarios postleptoténos, espermátidas y en espermatozoides de cuerpo y cauda de epidídimo. Fracción microsomal de testículo de rata de 21 y 38 días de edad. Fueron adicionadas en un volumen de 0.1 ml al medio de incubación.

II Purificación parcial del activador de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de testículo de rata.

Se siguió la técnica que Dedman y colaboradores (73) diseñaron para separar y purificar la proteína activadora de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de testículo de rata adulta, aunque dada la pequeña cantidad de tejido disponible en el presente trabajo, se llegó solamente a una purificación parcial.

Los testículos de rata, de 21 o de 38 días de edad, fueron recibidos en la solución Krebs-Hepes a 4°C, liberados de la túnica albugínea y de los vasos sanguíneos. Se secaron suavemente en papel filtro y se pesaron. De 8 a 10g de tejido fueron homogeneizados, empleando un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, mediante tres ciclos de 1 min de homogeneización y 5 min de reposo en hielo, utilizando la solución hipotónica descrita y ajustando el volumen a 90 ml. Este homogeneizado se centrifugó a 64 000 x g durante 40 min a 4°C.

El sobrenadante fue dividido en alícuotas de 15 ml en tubos de vidrio grueso e incubados en baño María con agua hirviendo durante 5 min. Se les enfrió en acetona-hielo seco. Para eliminar las proteínas precipitadas, se centrifugó a 64 000 x g 40 min a 4°C. Se eliminó el

botón y al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio al 90% de saturación e imidazol a una concentración final de 10 mM y pH de 6.1.

Se mantuvo en agitación por dos horas a 4°C. Se recentrifugó a 64 000 x g 40 min a 4°C y el botón obtenido fue resuspendido en aproximadamente 3 ml de Imidazol 10 mM pH 6.1 y dializado por 36 horas contra el mismo amortiguador y pH. Después de este tratamiento, se le empleó como fuente del activador y se adicionó al medio de incubación empleado para medir la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en diferentes volúmenes.

III Obtención de la fracción microsomal de testículo de rata.

Una vez obtenido el homogeneizado testicular y centrifugado a 64 000 x g 40 min a 4°C, el botón resultante se resuspendió en la solución descrita y se sometió a una primera centrifugación a 600 g 10 min a 4°C, se eliminó el botón y el sobrenadante se recentrifugó a 5 200 g, 20 min y 4°C y el nuevo sobrenadante esrecentrifugado a 150 000 x g 90 min a 4°C. El botón obtenido se empleó como fuente enzimática.

IV Obtención de las poblaciones celulares.

Se siguió la técnica que se presenta como parte de esta tesis. La obtención de espermatoцитos primarios leptotene se hizo tomando como fuente las células dispersas de testículo de rata de 14 días de edad. Los espermatoцитos primarios en estadios de diferenciación posteriores al de leptotene, se obtuvieron de testículo de rata de 21 días de edad. Las espermátides, a partir de testículo de rata de 38 días de edad. Los espermatozoides fueron obtenidos por perfusión del epidídimo, previa separación por ligadura de sus tres regiones, caput, cuerpo y cauda.

V Determinación de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺).

La reacción enzimática fue iniciada por la incubación a 37°C y detenida por la adición de 2.5 ml de HClO₄ al 6% frío a 0, 15 y 30 min, después de iniciada la incubación. Se dejaron los tubos en hielo por 30 min más y se centrifugaron a 960 g 20 min a 4°C. Se determinó el fosfato producido en el sobrenadante por el método de Bonting y colaboradores (74). Las proteínas fueron determinadas por el método de Hartree (75).

RESULTADOS

I Actividad basal de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en las células germinales aisladas en distintos estadios de diferenciación.

Como puede observarse en la Tabla 1 la actividad basal de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺), medida en presencia de ouabaina y rojo de rutenio, se modifica de acuerdo al grado de maduración alcanzado y confirma la observación previa, de que durante la diferenciación de los espermatoцитos primarios, en la primera profase meiótica, la actividad de esta enzima aumenta. En estas condiciones, con las poblaciones celulares aisladas, se observa un incremento en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) mayor a 6 veces, en contraste con el incremento de dos veces observado cuando se midió la actividad del homogeneizado total del testículo en estas etapas de desarrollo presentadas en las primeras dos partes de esta tesis.

También puede observarse que las espermátidas presentan niveles de actividad menores y comparables a los de los espermatoцитos primarios leptotenos y a los de los espermatozoides de cuerpo de epidídimo.

Resulta además interesante que durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo, la actividad de esta enzima también se modifique. Los espermatozoides de la cabeza y el cuerpo de este conducto, son más inmaduros, que los de la cola y el nivel de actividad de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) es mayor en los espermatozoides del cuerpo del epidídimo, por lo que en el máximo grado de diferenciación y maduración del espermatozoide se obtiene la actividad máxima.

Tabla 1. Actividad de ATPasa-(Ca²⁺ - Mg²⁺) en las poblaciones de células germinales en diferentes etapas de la espermatogénesis.

EDAD	Estadio de maduración	Actividad μmoles Pi mg prot ⁻¹ 30 min ⁻¹
14 días	Espermatogonias, espermatocitos leptotene y células de Sertoli	2.16 ± 0.23
21 días	Espermatocitos primarios post-leptotene, 82%	13.82 ± 1.13
38 días	Espermátides, 75%	3.21 ± 0.26
adulta	Espermatozoides de cuerpo de epidídimo, 100%	3.97 ± 1.13
adulta	Espermatozoides de cauda de epidídimo, 100%	1.22 ± 0.31

Las poblaciones celulares fueron aisladas según se describe en la técnica desarrollada por nosotros, integrante de esta Tesis. La actividad enzimática se midió en el medio constituido por ATP, 2Na, 5mM; MgCl₂, 5mM; NaCl, 80mM; KCl, 15mM; EGTA, 3.2mM; CaCl₂, 1mM; Histidina, 18mM; Imidazol, 18mM; Ouabaina, 0.1mM; Rojo de rutenio, 1μM, pH 7.2. La reacción se inició por incubación a 37°C.

II Inhibición de la trifluoroperazina sobre la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en las poblaciones celulares.

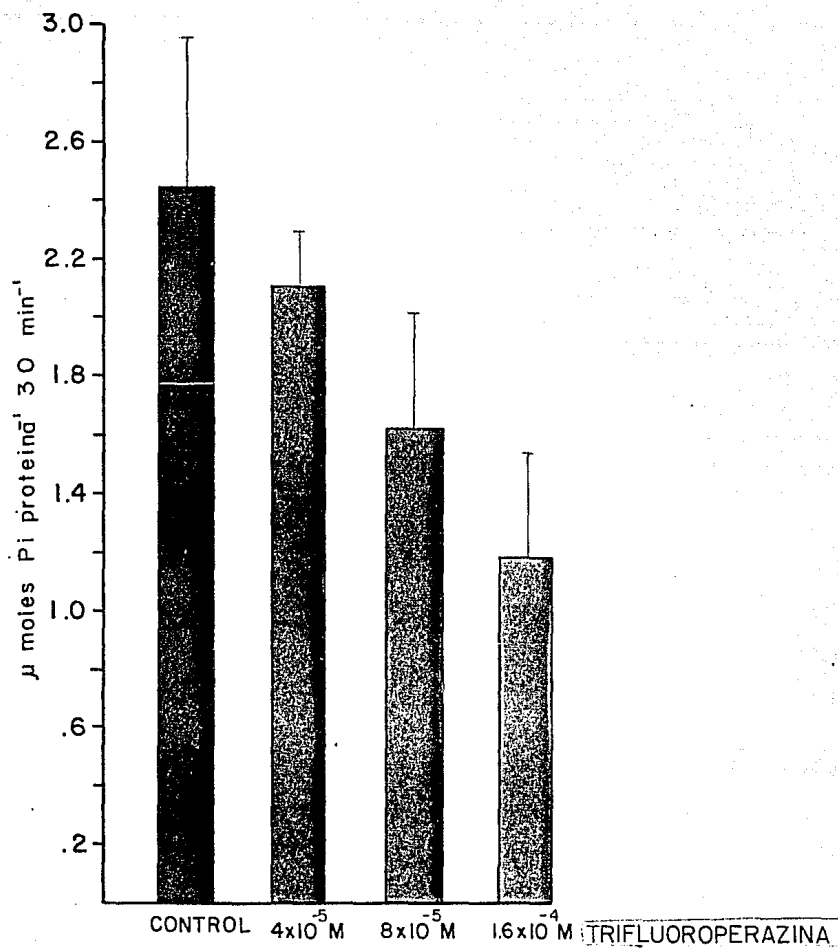
La adición del inhibidor de la calmodulina al medio de incubación produjo una disminución de la actividad enzimática en las cuatro poblaciones estudiadas. Como puede observarse en las gráficas 1 a 4, espermatoцитos primarios leptotene, espermatoцитos postleptotene, espermátides y espermatozoides, disminuyen su actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) ante diferentes concentraciones de trifluoroperazina. Es notorio el hecho de que la máxima inhibición se tiene en la población de los espermatoцитos primarios que presentan la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) más alta, en estadios postleptoteno, obtenidos a los 21 días de edad. En la población de espermátides y espermatozoides, aún a la concentración más alta del inhibidor, la actividad restante medida a 30 min, es aproximadamente el 30% de la total y en la población de espermatoцитos leptotene es del 50% (Gráfica 5).

III Efecto del sobrenadante soluble termoestable sobre la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de la fracción microsomal de testículo de rata de 21 a 38 días de edad.

Como puede observarse en las gráficas 6 y 7, la adición de cantidades diferentes del activador parcialmente purificado, presente en el sobrenadante soluble termoestable, incrementa la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) tanto en la fracción microsomal de testículo de rata de 21 días de edad (gráfica 6) como en la de 38 días de edad (gráfica 7). Aunque la activación es más claramente observada a los 21 días de edad y en ambos casos es bloqueada por trifluoroperazina. La ausencia de inhibición por trifluoroperazina 20 µM adicionada a la fracción microsomal de testículo de rata de 21 días de edad (gráfica 6) indica que

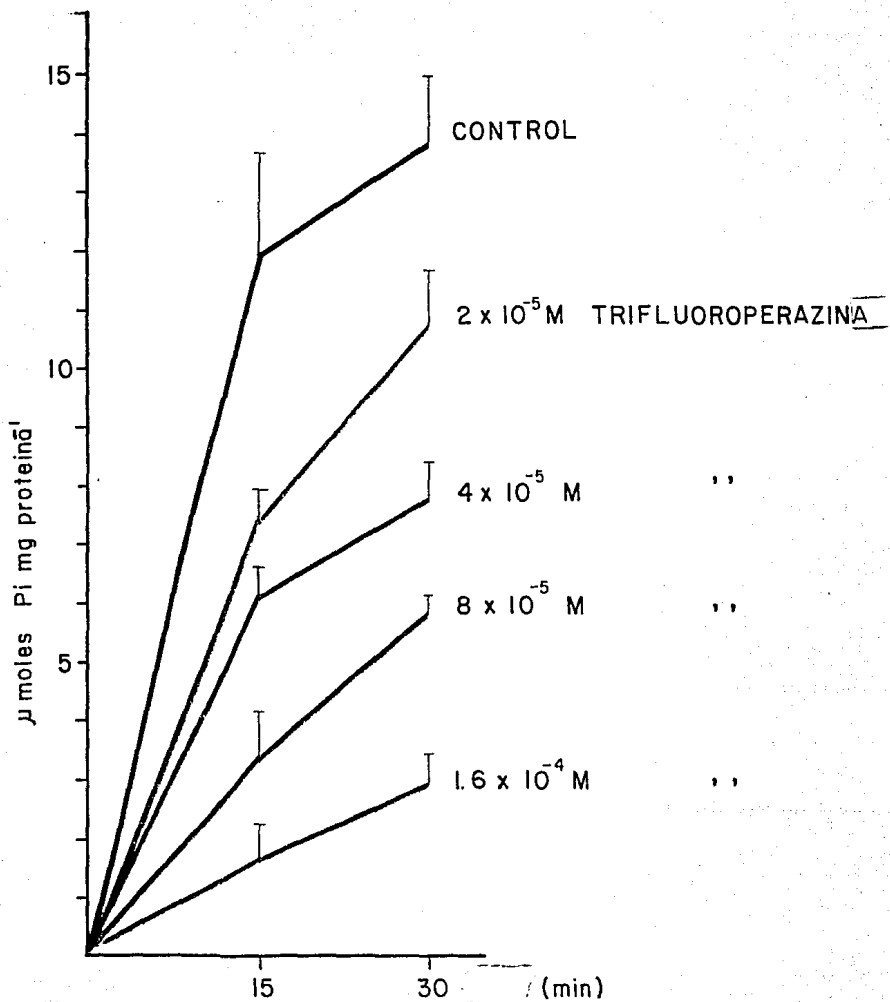
Gráfica 1

Efecto de trifluoroperazina sobre la actividad -
de ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺) en la población de Esper-
matogonias y espermatoцитos primarios leptotenos



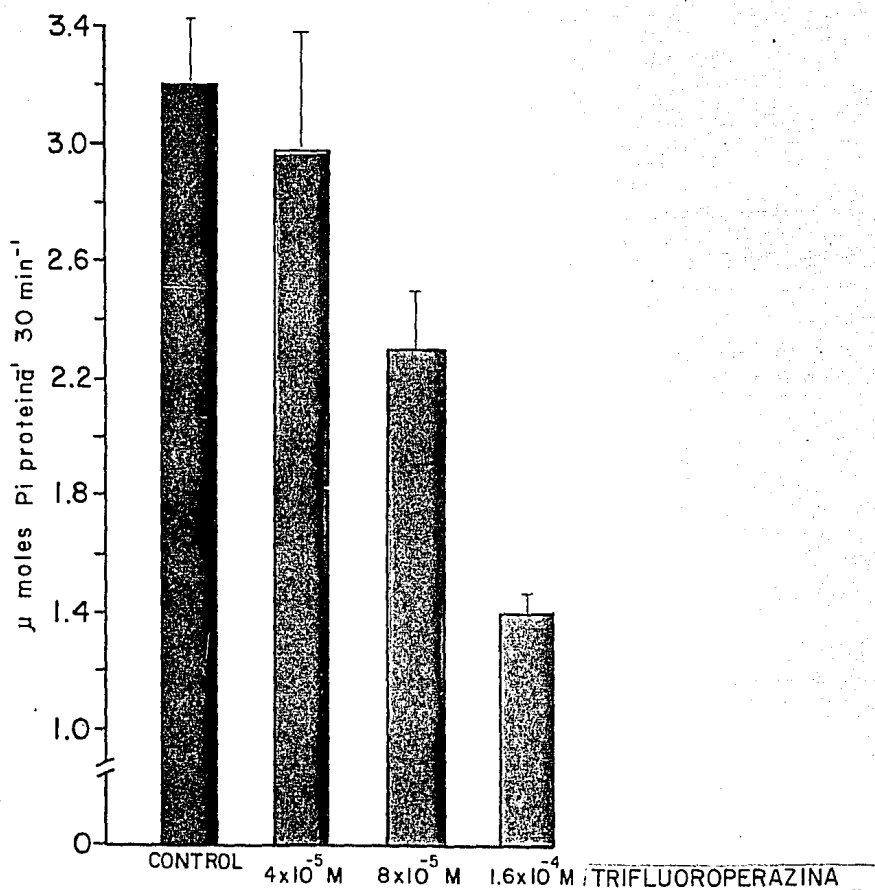
Gráfica 2

Efecto de trifluoroperazina sobre la actividad de la ATPasa-($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) en la población de espermatoцитos primarios post-leptotenos.



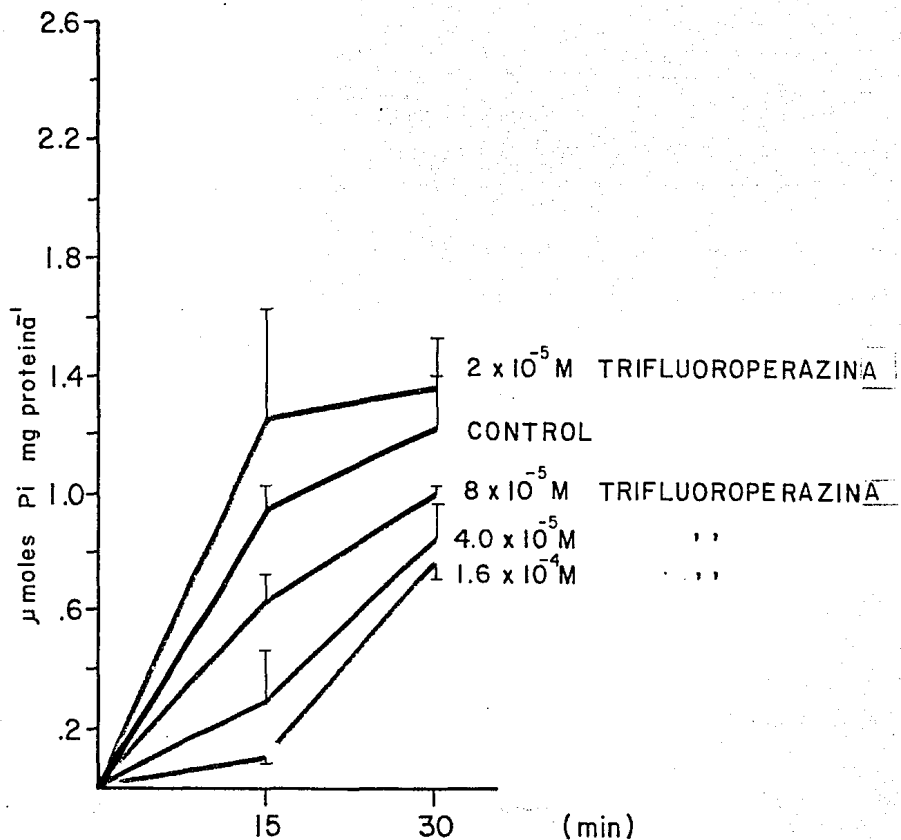
Gráfica 3

Efecto de trifluoroperazina sobre la actividad de ATPasa-($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) de la población de espermátidas.



Gráfica 4

Efecto de trifluoroperazina sobre la actividad de -
ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de los espermatozoides de cauda
de epidídimo.



Efecto de trifluoroperazina sobre la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ - Mg²⁺) en las poblaciones celulares en diferentes estadios de la espermatogénesis. Gráficas 1 a 4.

Las poblaciones de células germinales fueron obtenidas de acuerdo a la técnica desarrollada por nosotros, que se presenta como parte de esta Tesis. Una vez obtenidas, habiendo eliminado el exceso de MEM y dextrán T 500, fueron resuspendidas y homogeneizadas en NaCl, 155 mM; Histidina, 3 mM pH 7.5 y adicionadas en 0.1 ml al siguiente medio de incubación: ATP.2Na, 5mM; MgCl₂.6H₂O, 5 mM; EGTA, 3.2 mM; CaCl₂, 1 mM; NaCl, 80 mM; KCl, 15 mM; Histidina, 18 mM; Imidazol, 18 mM; Ouabaina, 1X10⁻⁴M; Rojo de rutenio, 1X10⁻⁶M, ajustado a un pH de 7.2. La concentración de Ca libre fue 1X10⁻⁶M. La trifluoroperazina fue adicionada en 0.02, 0.04 y 0.08 ml para obtener las concentraciones deseadas. El volumen final del medio de incubación fue de 0.5 ml. La reacción fue iniciada por incubación a 37°C y detenida por adición de 2.5 ml de HClO₄ al 6 % frío a 0, 15 y 30 min.

Gráfica 1.- Actividad de las células dispersas totales de testículo de rata de 14 días de edad. Espermatogonias, espermatocitos leptotene y células de Sertoli se encuentran presentes.

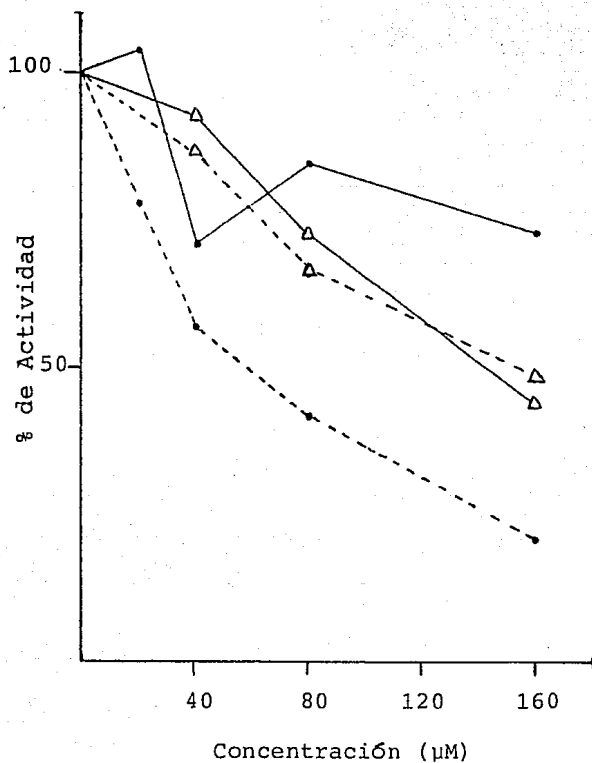
Gráfica 2.- Actividad de la población enriquecida en espermatocitos primarios en estadios posteriores a leptotene, 82 %.

Gráfica 3.- Actividad de la población enriquecida en espermátides, 75%.

Gráfica 4.- Actividad de los espermatozoides de la cauda de epidídimo, 100%.

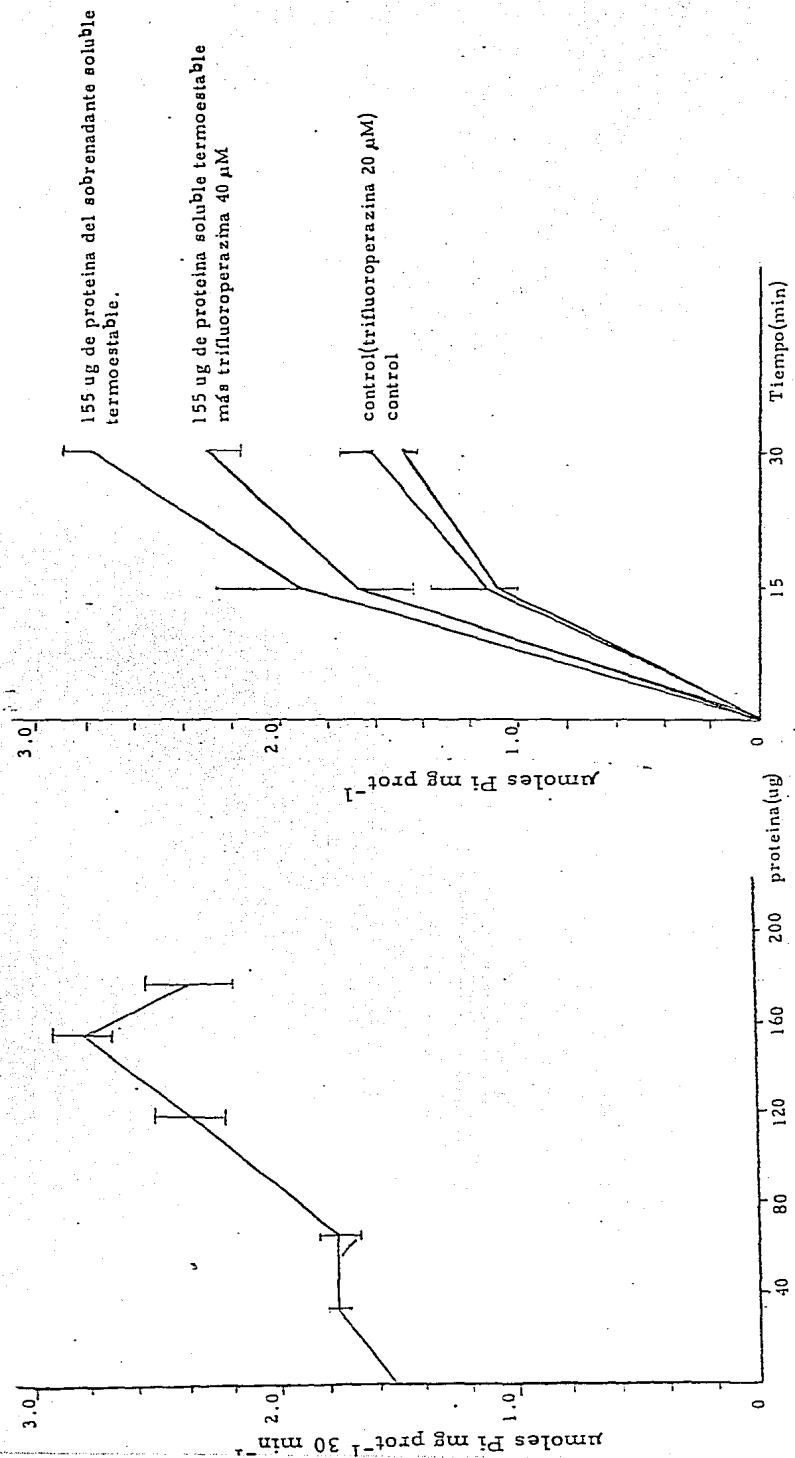
Gráfica 5

Comparación del efecto de trifluoroperazina sobre la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en las poblaciones de células germinales.



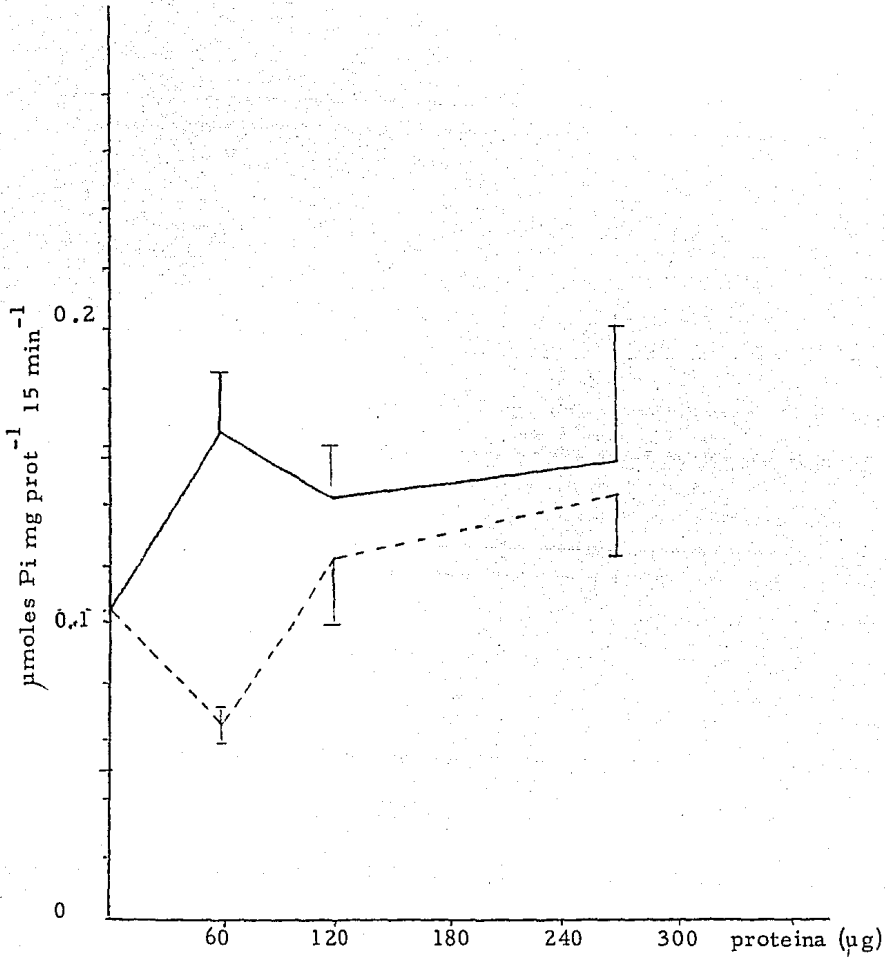
- espermatozoides de cauda de epidídimo
- △—△—△ espermátidas
- espermatoцитos primarios postleptotenos
- △---△--- espermatoцитos primarios leptotenos y espermatogonias

Gráfica 6. Efecto del sobrenadante soluble termoestable sobre la actividad de ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de la fracción microsomal de testículo de rata de 21 días de edad.



La fracción microsomal de testículo de rata fue obtenida según se describió en Material y Métodos. Al medio de incubación fueron añadidas diferentes cantidades de la fracción soluble termoestable, que contiene a la calmodulina parcialmente purificada.

Gráfica 7. Efecto del sobrenadante soluble termoestable sobre la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de la fracción mi-
crosomal de testículo de rata de 38 días de edad.



La actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días fue medida en presencia de diferentes cantidades de su propio sobrenadante soluble termoestable, que contiene a la calmodulina parcialmente purificada. La línea punteada representa la actividad obtenida en presencia de trifluoroperazina 20 µM.

existe bajo contenido de calmodulina asociada a esa fracción membranal.

Es importante mencionar que el activador obtenido de testículo de rata de 21 días o de 38 días de edad, es capaz de activar la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de la fracción microsomal testicular ya sea de 21 ó 38 días de edad.

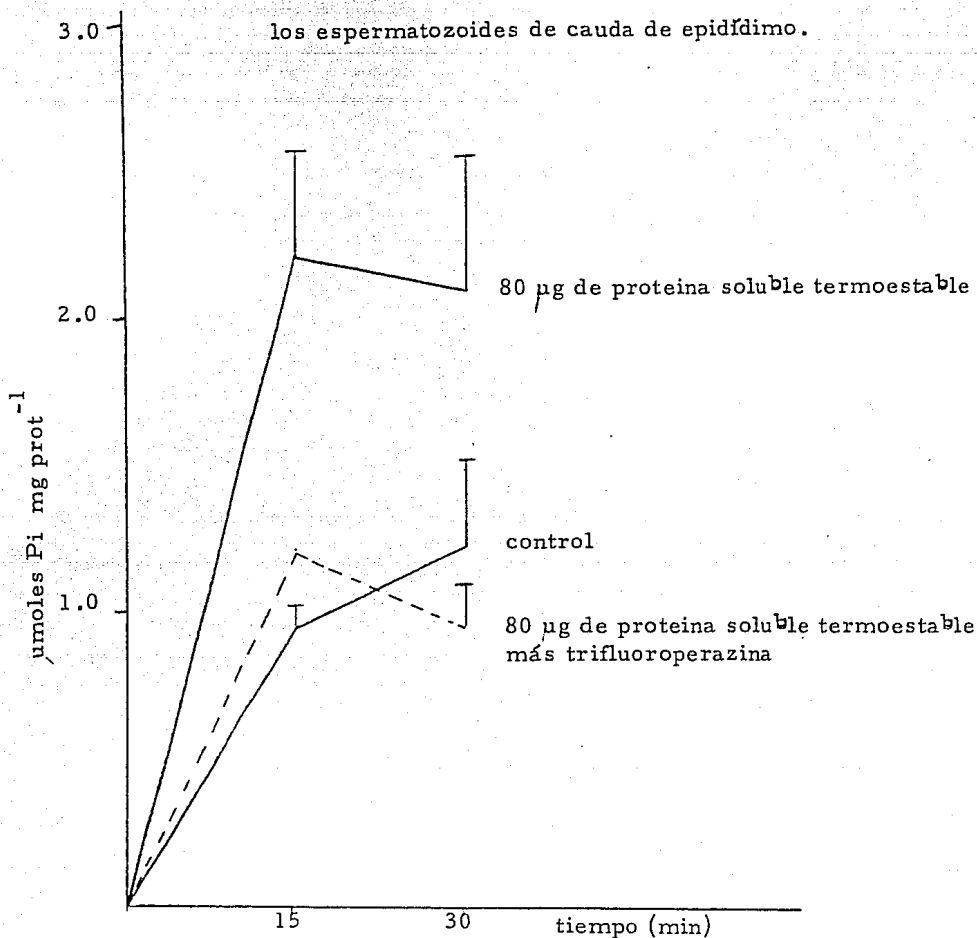
IV Efecto del sobrenadante soluble termoestable sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) de espermatozoides de cauda de epidídimo.

La gráfica 8 muestra que la adición del activador parcialmente purificado de testículo de rata de 21 días de edad, es capaz de incrementar más de dos veces la actividad de ATPasa de los espermatozoides de la cauda de epidídimo y que si se adiciona simultáneamente trifluoroperazina, esta activación no se realiza.

V Actividad de la ATPasa-(Na⁺ + K⁺) de la fracción microsomal de testículo de rata de 21 y 38 días de edad.

En experimentos anteriores realizados con homogeneizado total de testículo durante la diferenciación del epitelio germinal, se había observado que la actividad de ATPasa no dependía de la presencia de Na⁺ ni de K⁺ y que la adición de ouabaina no permitía distinguir la ATPasa dependiente de Na⁺ y de K⁺ de la total. Como puede observarse en las Tablas 2 y 3, en las presentes condiciones de trabajo la actividad de ATPasa-(Na⁺ + K⁺) en la fracción microsomal del testículo de rata, de 21 ó de 38 días de edad, no es sensible a ouabaina. Sin embargo, la adición de ouabaina y calcio al medio de incubación permite observar una clara inhibición de la actividad, pero solamente en la fracción microsomal de testículo de rata de 38 días de edad.

Gráfica 8. Efecto del sobrenadante soluble termoestable sobre la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ - Mg²⁺) de los espermatozoides de cauda de epidídimo.



La población de espermatozoides fue obtenida por perfusión de la cauda del epidídimo. Se resuspendieron y homogeneizaron en la sol. descrita. Su actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) fue medida con y sin la adición de la calmodulina parcialmente purificada de testículo de rata de 21 días de edad. La línea punteada representa la actividad en presencia del activador y de trifluoroperazina 1.6×10^{-4} M.

ACTIVIDAD DE ATPasa DE LA FRACCION MICROSOMAL
DE TESTICULO DE RATA DE 21 DIAS DE EDAD

IONES	Ca ⁺⁺	INHIBIDORES	ACTIVIDAD micromoles Pi 30 min ⁻¹ mg prot ⁻¹
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	--	--	2.3972 ± 0.04
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	--	Ouabaina 100 μM	2.1839 ± 0.10
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	1 μM	Ouabaina 100 μM	1.9441 ± 0.14
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	1 μM	Ouabaina 100 μM + Rojo Rutenio 1 μM	2.1163 ± 0.01

ACTIVIDAD DE ATPasa DE LA
FRACCION MICROSOMAL DE TESTICULO DE RATA DE 38 DIAS DE EDAD

IONES	Ca ⁺⁺	INHIBIDORES	A C T I V I D A D micromoles Pi 30 min ⁻¹ mg prot ⁻¹
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	--	--	0.2252 ± 0.016
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	--	Ouabaina 100 µM	0.2304 ± 0.036
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	1 µM	Ouabaina 100 µM	0.1341 ± 0.033
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	1 µM	Ouabaina 100 µM + Rojo Rutenio 1 µM	0.1579 ± 0.042 0.2708 ± 0.071*
Na ⁺ K ⁺ Mg ⁺⁺	1 µM	Ouabaina 100 µM + Rojo Rutenio 1 µM + Trifluoroperazine 20 µM	0.1832 ± 0.032 0.1494 ± 0.004*

* Adición de 60 µgproteína soluble termoestable

DISCUSION

Este es el primer trabajo donde se identifica la presencia de la ATPasa- $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ en las células germinales del testículo de la rata durante su diferenciación, así como, durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo.

La técnica desarrollada por nosotros para aislar las poblaciones de células germinales, previamente descrita en esta tesis, ha permitido estudiar la evolución de la actividad de la ATPasa- $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ a través de la espermatogénesis, desde la aparición de los espermatoцитos leptotenos hasta la maduración de los espermatozoides en la cauda del epidídimo.

Los resultados obtenidos muestran que la ATPasa- $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$, activada por calmodulina parcialmente purificada e inhibida por trifluoroperazina, está presente en todas las poblaciones celulares estudiadas, observándose la mayor actividad en los espermatoцитos primarios postleptotenos.

El incremento tan marcado en la actividad de esta enzima durante la diferenciación de los espermatoцитos primarios en la primera profase meiótica, puede estar relacionado con el aumento en el nivel de calmodulina. Los espermatoцитos leptotenos, con baja actividad de esta enzima, tienen menos de la vigésima parte del nivel de calmodulina que presentan los espermatoцитos en estadios posteriores, zigoteno y paquiteno, con la mayor actividad de esta ATPasa- $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$. Esta situación podría aclararse adicionando más activador a la preparación de espermatoцитos leptotenos, también a la fracción microsomal de testículo de rata de 14 días de edad y ver si su actividad de ATPasa- $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ se incrementa en la misma forma que en los espermatoцитos primarios más desa-

rrollados.

Cuando se observa que la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺) de la población de espermátidas es comparable en magnitud a la de los espermatozoides leptotenos no podemos sugerir que pueda deberse al diferente contenido de calmodulina, ya que la población de espermátidas presentó alto contenido de esta proteína, casi igual al de la población de los espermatozoides primarios postleptotenos.

Como recientemente se ha descrito que el citosol de testículo de rata adulta posee dos proteínas que unen a la calmodulina, una de peso molecular de 88 000, termoestable y otra de peso molecular de 410 000, termolábil(76) y también ha sido descrita una tercera proteína que une a calmodulina, recuperable en la fracción membranal de testículo de rata adulta, obtenida por centrifugación a 105 000x g (77) y se desconoce la relación que puedan tener estas proteínas en las funciones mediadas por calmodulina ni si están presentes en el testículo a lo largo de su desarrollo, no es posible sugerir una relación simple causa-efecto entre el contenido de calmodulina y actividad de ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺).

Asimismo, se ha descrito la presencia de un inhibidor endógeno de la ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺) en eritrocito (78), pero desconocemos si el testículo lo presenta también. Si éste fuera el caso, podría pensarse que haría su aparición en el transcurso de la diferenciación de las espermátidas.

La actividad basal de la ATPasa-(Ca²⁺+ Mg²⁺) de los espermatozoides aislados de dos regiones del epidídimo, cuerpo y cauda, es mayor en los más inmaduros, los de la región del cuerpo. Se ha demostrado que durante el paso de los espermatozoides por las tres regiones de este conducto, caput, cuerpo y cauda, terminan su maduración y adquieren

movilidad coordinada y progresiva, indispensable para la fecundación. Desconocemos si la actividad de esta enzima tenga relación con la movilidad del flagelo, pero se sabe que la movilidad de los espermatozoides va en aumento, en la cabeza es menor que en el cuerpo y mayor en la cauda del epidídimo y que requiere de Ca^{2+} extracelular.

Forrester y Bradley (79) han informado que vesículas de membrana plasmática de la región del flagelo de espermatozoides de epidídimo y eyaculados, muestran actividad de $\text{ATPasa}-(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$, aunque su nivel y estimulabilidad son distintas. La ATPasa de los espermatozoides de epidídimo, es menos activa pero más sensible a la estimulación por una proteína semejante a calmodulina presente en el plasma seminal. Esta observación, aunada a la nuestra, de menor actividad en los espermatozoides de cauda de epidídimo y su evidente estimulación por el activador obtenido de testículo de rata de 21 días de edad, sugieren que durante la reducción citoplásmica tan importante que sufren las espermátidas en su transformación a espermatozoides y durante el proceso de maduración en el epidídimo, se libera parte de la calmodulina al fluido seminal. De ahí la importancia de conocer si el contenido de calmodulina de los espermatozoides es diferente del de las espermátidas y si se modifica durante su maduración en el epidídimo.

Sin embargo, hay que hacer notar que la dineína, ATPasa del flagelo, es dependiente de Ca^{2+} y es estimulada por calmodulina (80). En este trabajo no se puede distinguir cuál es la contribución de la ATPasa flagelar en la actividad total medida como $\text{ATPasa}-(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$, estimulada por calmodulina e inhibida por trifluoroperazina, porque ambas comparten estas características. Será posible resolver este problema utilizando vanadato, inhibidor de la dineína, a las concentraciones que

han demostrado no inhibir a otras ATPasa (81, 82).

Las implicaciones fisiológicas de los cambios en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) durante la diferenciación y maduración de las células germinales, pueden estar relacionadas con el papel que esta enzima juega en mantener los niveles de Ca²⁺ libre intracitoplásmicos, como se ha observado en eritrocito (83) y en otros tipos de células (84, 85).

Se sabe que el aumento en la concentración de Ca²⁺ libre intracelular, es la señal que dispara y regula muchos procesos celulares, entre ellos la división celular, la progresión de la meiosis, la comunicación intercelular (86-89), todos ellos juegan un papel muy importante en el modelo experimental empleado.

Como se mencionó, se ha observado que las células germinales se diferencian en grupos sincrónicos (17) y se piensa que esto pueda ser debido a la comunicación que establecen entre sí y con las células de Sertoli (16). Además el testículo es un sistema con divisiones celulares, por mitosis y meiosis, cíclicas muy importantes para la producción de espermatozoides.

Por otra parte, se ha propuesto que durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo y hasta que es eyaculado, la impermeabilidad al Ca²⁺ aumenta (79), quizá la eficiencia en el bombeo de Ca²⁺ por la ATPasa adquiera mayor importancia, ya que el aumento en la concentración de Ca²⁺ libre en el citoplasma del espermatozoide, podría disparar la reacción acrosomal mucho antes de que entrara en contacto con el gameto femenino.

La relación que exista entre el incremento de la actividad de esta ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) y la observación de otros autores (44) y en este trabajo, acerca de la dificultad para distinguir la ATPasa dependiente de

$\text{Na}^+ + \text{K}^+$ en el testículo de la rata, es oscura pero podrían estar relacionadas.

Un argumento que sugeriría que existe poca entrada de K^+ o aumento en su salida e inhibición de la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) en las células del epitelio germinal, es la concentración que estos iones tienen en el fluido recuperado de los túbulos seminíferos, donde el K^+ alcanza niveles de 50 mM y el Na^+ tiene una concentración menor a 100 mM (21).

En eritrocitos se ha demostrado que si el Ca^{2+} libre intracelular aumenta, se incrementa la salida de K^+ y aumenta la entrada de Na^+ a la célula, con la estimulación paralela en la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ (90-92).

Aunque desconocemos la concentración que el Ca^{2+} libre alcance en cada uno de los estadios de la espermatogénesis, quizá esta concentración sea mayor en los espermatocitos primarios postleptotenos.

Si se analizan los datos de la actividad de la ATPasa ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) de la fracción microsomal de testículo de rata de 21 y de 38 días de edad, se observa que en ésta última, sí puede verse la actividad de la bomba de sodio, empleando ouabaina y Ca^{2+} , llegándose a una inhibición del 42%, que no se observa en la fracción microsomal de testículo de rata de 21 días de edad, donde la actividad de la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) es máxima.

Desde el punto de vista metabólico, el mantener a un nivel adecuado la concentración de Ca^{2+} libre intracitoplásmico es también muy importante. Se sabe que el Ca^{2+} regula la actividad de enzimas glicolíticas (93,94), que como se describió, es una vía metabólica importante en las células germinales testiculares.

Estas consideraciones conducen a profundizar el estudio de la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) en las células germinales durante sus diferentes etapas

de maduración para definir su localización, su capacidad de bombeo de Ca^{2+} en cada una de ellas y la relación que pueda tener con los fenómenos testiculares antes discutidos.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se midió la actividad de hidrólisis de ATP testicular durante la diferenciación del epitelio germinal, tomando como fuente enzimática el homogeneizado total del órgano a diferentes edades.

En este primer enfoque, nuestros resultados indicaron que esta actividad se duplicaba durante la diferenciación de los espermátocitos primarios y que descendía gradualmente durante la maduración de las espermátidas hasta alcanzar niveles basales con la aparición de los espermatozoides y que se mantenía constante durante la edad adulta.

El segundo criterio fué medir la actividad de ATPasa de testículo a dulto cuyo epitelio germinal se encontrara en involución, inducida por tres métodos diferentes: hipofisectomía, criptorquidia y tratamiento con fluoroacetamida.

Estos dos modelos de experimentación señalaron que la actividad de hidrólisis de ATP testicular es máxima cuando los espermátocitos primarios son los principales constituyentes del epitelio germinal.

Sin embargo, ya que el criterio de actividad hidrolítica total de ATP en homogeneizados del testículo en las distintas condiciones en sayadas, no permitía discriminar si la actividad efectivamente era preponderante en un tipo de células o si la presencia de diferentes tipos celulares, en los diversos estadios de maduración, causaba la dilución de la actividad total o bien que existieren factores inhibidores y/o estimulantes de la actividad ligados a las células en estadios de diferenciación definidos, nos condujo a desarrollar una metodología que permitiera la obtención de células en las principales etapas de la espermatogénesis en condiciones de alta viabilidad y en

número suficiente para la medición de su actividad enzimática.

Basándonos nuevamente en la aparición cronológica de los distintos tipos celulares en el epitelio germinal testicular, tomamos testículo de rata de 12 días de edad para obtener espermátocitos leptoténos y espermatogonias, de 21 días de edad para aislar espermátocitos paquítenos y zigoténos y de 38 días de edad para obtener la población de espermátidas. Los espermatozoides fueron aislados de las tres regiones del epidídimo, caput, cuerpo y cauda, por perfusión de este conducto con solución salina.

Una vez obtenidas las poblaciones celulares enriquecidas en los distintos estadios de la espermatogénesis, decidimos medir su actividad de ATPasa.

Ya que desde los primeros experimentos sabíamos que la hidrólisis de ATP testicular era estimulada por Ca^{2+} y/o Mg^{2+} y que de testículo de rata adulta se había aislado, purificado y caracterizado a la calmodulina, proteína activadora de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$, decidimos investigar si esta proteína estaba presente en todas las células del epitelio germinal y en qué cantidad. Inicialmente se definió su presencia y localización mediante el uso de anticuerpos fluorescentes y posteriormente se cuantificó por radioinmunoensayo en cada una de las poblaciones de células enriquecidas en los estadios de diferenciación ya señalados.

Los resultados indicaron que todos los estadios de maduración de los espermátocitos primarios, todas las fases de la espermiogénesis y los espermatozoides contenían calmodulina, la reacción inmunofluorescente

se presentó en todas. La cuantificación del contenido de calmodulina en las poblaciones celulares, mostró que durante la profase meiótica, después del estadio de leptoteno, los espermatocitos primarios multiplican más de veinte veces su contenido de calmodulina y que las espermátidas tienen niveles prácticamente iguales al de los espermatocitos postleptotenos.

La correlación entre la fase de mayor actividad de hidrólisis de ATP dependiente de Ca^{2+} y/o Mg^{2+} y de la elevación en el contenido de calmodulina, ambas durante la profase meiótica, nos llevó a identificar si la ATPasa-($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) descrita en membrana plasmática de eritrocito y activada por calmodulina pura o presente en el hemolizado de estas células, estaba presente en las células del epitelio germinal y si su actividad se modificaba durante la espermatogénesis.

Para cumplir con este objetivo, decidimos medir la actividad de ATPasa en presencia de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ de la fracción microsomal de testículo de rata a diferentes edades y adicionar su propia calmodulina parcialmente purificada. También se midió la actividad en presencia de trifluoroperazina, inhibidor de la calmodulina, a diferentes concentraciones en presencia del activador parcialmente purificado.

Ya que estos experimentos indicaron que efectivamente la fracción microsomal tenía actividad de ATPasa-($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$), con capacidad de estimularse por su activador y sensible a trifluoroperazina, decidimos estudiar si esta actividad se modificaba según el grado de desarrollo de las células germinales.

Se midió la actividad de ATPasa-($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) en las poblaciones celulares enriquecidas en espermatocitos leptotenos y espermatogonias, en

espermatozoides, en espermátidas y en los espermatozoides de la cauda y cuerpo del epidídimo en condiciones basales y en presencia de calmodulina parcialmente purificada y de su inhibidor, la trifluoroperazina a diferentes concentraciones.

Nuestros resultados indican que la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) se modifica durante la diferenciación de las células germinales. El incremento de la actividad de esta enzima se presenta en los espermatozoides postleptotene, su ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) es seis veces más alta que la de espermatozoides leptotenos y espermatozonias y que la de espermátidas y espermatozoides.

Otro aspecto de interés fue el hecho de que también la actividad de esta enzima en los espermatozoides disminuye con el grado de maduración alcanzado por ellos en el tracto epididimario, a mayor maduración menor actividad de esta enzima.

Se discute el posible significado fisiológico de los cambios en la actividad de esta enzima así como su regulación.

Este es el primer trabajo donde se identifica y estudia la evolución del contenido de calmodulina y de la actividad de ATPasa-(Ca²⁺ + Mg²⁺) en las células germinales en distintos estadios de la espermatogénesis.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Burgos, M.H., Vitale-Calpe, R. & Aoki, A. (1970). Fine structure of the testis and its functional significance. En "The Testis", Vol. I Cap. 9 p. 551-649. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes & N.L. VanDemark, Academic Press.
- 2- Steinberger, E. & Steinberger, A. (1972). The Testis: Growth versus function. En "Regulation of organ and tissue growth". Cap. 17 p. 299-314. Academic Press.
- 3- Clermont, Y. & Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. Am. J. Anat. 100, 241.
- 4- Courot, M., Hochereau-de Reviers, M.T. & Ortavant, R. (1970). Spermatogenesis. En "The Testis" Vol. I Cap. 6 p. 339-432. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes & N.L. VanDemark. Academic Press.
- 5- Mills, N.C. & Means, A.R. (1972). Sorbitol dehydrogenase of rat testis: changes of activity during development, after hypophysectomy and following gonadotropic hormone administration. Endocrinology 91, 147.
- 6- Vernon, R.E., Go, V.L.W. & Fritz, I.B. (1971). Studies on spermatogenesis in rats. II Evidence that carnitine acetyltransferase is a marker enzyme for the investigation of germ cell differentiation. Can. J. Biochem. 49, 761.
- 7- Delhumeau-Ongay, G., Trejo, R., Alonso, R. & Hernández-Montes, H. (1982). Differential gene expression of mitochondrial enzymes in isolated leptotene and postleptotene rat testis germ cells. Manuscrito enviado a publicación.
- 8- Meistrich, M.L., Trostle, P.K., Frapart, M. & Erickson, R.P. (1971). Biosynthesis and localization of lactate dehydrogenase X in pachy-

- tene spermatocytes and spermatids of mouse testis. *Dev. Biol.* 60, 428.
- 9- Kim, I.Ch. (1980). Isolation and properties of somatic and testicular cytochromes c from rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 519.
- 10- Leblond, C.P. & Clermont, Y. (1952). Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid fuchsin sulfuric acid technique. *Am. J. Anat.* 90, 167.
- 11- Fawcett, D.W. (1979). The cell biology of gametogenesis in the male. *Perspectives Biol. & Med.* 22, S56.
- 12- Nagy, F. (1972). Cell division kinetics and DNA synthesis in immature Sertoli cells of the rat testis. *J. Reprod. Fert.* 28, 389.
- 13- Vitale, R., Fawcett, D.W. & Dym, M. (1973). The normal development of the blood testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. *Anat. Rec.* 176, 333.
- 14- Ross, M.H. (1970). The Sertoli cell and the blood-testis barrier: an electron microscopic study. *Adv. Androl.* 1, 83.
- 15- Fawcett, D.W., Leak, L.V. & Heidger, P.M. (1970). Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 10, 105.
- 16- Fawcett, D.W. (1974). Interactions between Sertoli cells and germ cells. In "Male fertility and sterility" p. 13-36, Eds. R.E. Mancini & L. Martini. Academic Press.
- 17- Perey, B., Clermont, Y. & Leblond, C.P. (1961). The wave of the seminiferous epithelium of the rat. *Am. J. Anat.* 108, 47.
- 18- Lebond, C.P. & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55, 548.

- 19- Setchell, B.P. (1970). Testicular blood supply, lymphatic drainage and secretion of fluid. En "The Testis" Vol.I. Cap. 3 p. 101-239. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes & N.L.VanDemark. Academic Press.
- 20- Setchell, B.P. (1974). The entry of substances into the seminiferous tubules. En "Male fertility and sterility" p 35-57. Eds. R.E. Mancini & L. Martini. Academic Press.
- 21- Setchell, B.P. (1980). The functional significance of blood-testis barrier. J. Andrology 1, 3.
- 22- Setchell, B.P., Davies, R.V. & Main, S.J. (1977). Inhibin. En "The Testis" Vol. IV, Cap. 6 p. 189-232. Eds. A.D. Johnson & W.R. Gomes. Academic Press.
- 23- Free, M.J. (1970). Carbohydrate metabolism in the testis. En "The Testis" Vol. II Cap. 3 p. 125-192. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes & N.L. VanDemark. Academic Press.
- 24- Dickens, F. & Simer, F. (1930). The metabolism of normal and tumour tissue. II The respiratory quocient and the relationship of respiration to glycolysis. Biochem. J. 24, 1301.
- 25- Dickens, F. & Greville, G.D. (1933). Metabolism of normal and tumour tissue VIII. Respiration in fructose and in sugar-free media. Biochem. J. 27, 1123.
- 26.- Means, A.R. & Hall, P.F. (1968). Protein biosynthesis in the testis. II Role of adenosinetriphosphate. Endocrinology, 83, 86.
- 27- Tepperman, J., Tepperman, H.M. & Orck, H.J. (1949). A study of the metabolism of rat testis in vitro. Endocrinology, 45, 491.
- 28- Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumor. Biochem. J. 23, 536.
- 29- Free, M.J. & VanDemark, N.L. (1969). Radiorespirometric studies on glucose metabolism in the testis tissue from rat, rabbit and chi-

cken.Comp. Biochem. Physiol. 30, 323.

- 30- Leiderman, B. & Mancini, R.E. (1968). Aerobic and anaerobic lactate production in the prepuberal and adult rat testis. Proc. Soc. Biol. Med. 128, 818.
- 31- Valadez, A., Trejo, R. y Delhumeau de Ongay, G. (1977). Participación de la(s) adenosín trifosfatasa(s) ATPasa(s), en la regulación de la glicólisis en el testículo de la rata. XVII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. Acapulco, Gro. p. 71.
- 32- Voglmayr, J.K., Waites, G.M.H. & Setchell, B.P. (1966). Studies on spermatozoa and fluid collected directly from the testis of the conscious ram. Nature, 210, 861.
- 33- Johnson, A.D. (1970). Testicular lipids. En "The Testis". Vol.II Cap. 4 p. 193-258. Eds. A.D. Johnson, W.R. Gomes & N.L. VanDemark. Academic Press.
- 34- Ewing, L.L., Means, A.R., Beames, C.G. Jr. & Montgomery, R.D. (1966). Biochemical changes in rat testis during postnatal maturation. J. Reprod. Fert. 13.213.
- 35- Williams, H.H., Galbraith, H., Kaucher, M., Moyer, E.Z., Richards, A.J. & Macy, I.G. (1945). The effect of growth on the lipid composition of rat tissues. J. biol. Chem. 161, 478.
- 36- Davis, J.T., Bridges, R.B. & Coniglio, M.P. (1965). Testicular lipids of the maturing rat. Fed. Proc. 24, 663.
- 37- Oshima, M. & Carpenter, M.P. (1968). The lipid composition of the prepubertal and adult rat testes. Biochem. Biophys. Acta, 152,479.
- 38- Lin, C.H. & Fritz, I.B. (1972). Studies on spermatogenesis in rats. IV Rates of oxidation of palmitate and pyruvate by various testicular cell populations. Can. J. Biochem.,50, 963.

- 39- Johnson, A.D., VeraCruz, N.C. & Gomes, W.R. (1967). Synthesis and utilization of cholesterol by sperm. *J. Animal Sci.*, 26, 946.
- 40- Atkinson, D.E. & Walton, G.M. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. *J. Biol. Chem.* 242, 3239.
- 41- Hollinger, M.A. (1971). Metabolism of ATP by testis mitochondria of 25-day-old rats. *J. Reprod. Fert.* 25, 443.
- 42- Tice, L.W. & Barnett, R.J. (1963). The fine structural localization of some testicular phosphatases. *Anat. Rec.* 147, 443.
- 43- Vanha-Perttula, T. & Nikkanen, V. (1973). Acid phosphatases of the rat testis in experimental conditions. *Acta Endocrinol.* 72, 376.
- 44- Setchell, B.P., Smith, M.W. & Munn, E.A. (1972). The stimulation by bicarbonate of adenosinetriphosphatase activity in the seminiferous tubules of rodents and the lack of effect of ouabain. *J. Reprod. Fert.* 28, 413.
- 45- Burgos, M.H. & Vitale-Calpe, R. (1967). Gonadotrophic control of spermiation. En "Progress in Endocrinology" p. 1030. Ed. C. Gual. Excerpta Med. Fdn. Amsterdam.
- 46- André, J. (1962). Contribution á la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenese. *J. Ultrastruct. Res. Suppl.* 3, 1.
- 47- Clermont, Y. & Morgentaler, H. (1955). Quantitative study of spermatogenesis in hypohysectomized rats. *Endocrinol.* 57, 369.
- 48- Nelson, W.O. (1951). Mammalian spermatogenesis. Effect of experimental cryptorchidism in the rat and nondescent of the testis in man. *Recent Pror. Hormone Res.* 6, 29.
- 49- Steinberger, E. & Dixon, W.J. (1959). Some observations on the effect of heat on the testicular germinal epithelium. *Fert. & Steril.* 10, 578.

- 50- Steinberger, E. & Sud, B.N. (1970). Specific effect of fluoroacetamide on spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 2, 369.
- 51- Dedman, J.R., Jackson, R.L., Schreider, W.E. & Means, A.R. (1978). Sequence homology of the Ca^{2+} dependent regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat testis with other Ca^{2+} -binding proteins. *J. Biol. Chem.* 253, 343.
- 52- Bond, G. H. & Clough, D.L. (1973). A soluble protein activator of $(\text{Mg}^{2+} - \text{Ca}^{2+})$ -dependent ATPase in human red cell membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 323, 592.
- 53- Luthra, M.G., Hildenbrandt, G.R. & Hanahan, D.J. (1976). Studies on an activator of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* 419, 164.
- 54- Luthra, M.G., Au, K.S. & Hanahan, D.J. (1977). Purification of an activator of human erythrocyte membrane $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 678.
- 55- Gopinath, R.M. & Vincenzi, F.F. (1977). Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 1203
- 56- Cheung, W.Y. (1971). Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Evidence for and properties of a protein activator. *J. Biol. Chem.* 246, 2859.
- 57- Cheung, W.Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation, *Science* 207, 19.
- 58- Hinds, T.R., Larsen, F.L. & Vincenzi, F.F. (1978). Plasma membrane Ca^{2+} transport: Stimulation by soluble proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 455.
- 59- Vincenzi, F.F. & Larsen, F.L. (1980). The plasma membrane calcium pump: regulation by soluble Ca^{2+} -binding protein. *Fed. Proc.* 39

2427.

- 60- Hanahan, D.J., Taverna, R.D., Flynn, D.D. & Ekholm, J.E. (1978). The interaction of Ca^{2+} / Mg^{2+} ATPase activator protein and Ca^{2+} with human erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 1009.
- 61- Sarkadi, B., MacIntyre, J.D. & Gardos, G. (1978). Kinetics of active calcium transport in inside-out red cell membrane vesicles. *FEBS Letters* 89, 78.
- 62- Larsen, F.L & Vincenzi, F.F. (1979). Calcium transport across the plasma membrane: stimulation by calmodulin. *Science* 204, 306.
- 63- Haaker, H. & Racker, E. (1979). Purification and reconstitution of the Ca^{2+} -ATPase from plasma membrane of pg erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 254, 6598.
- 64- Robinson, J.D. (1976). $(\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+})$ -stimulated ATPase activity of rat brain microsomal preparation. *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 366.
- 65- Kaser-Glanzmann, R., Jakábová, M., George, J.N. & Leischer, E.F. (1978). Further characterization of calcium accumulation vesicles from human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 512, 1.
- 66- Åkerman, K.E. & Wikstrom, M.K.F. (1979). $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -stimulated ATPase activity of rabbit myometrium plasma membrane is blocked by oxytocin. *FEBS Letters* 97, 283.
- 67- Leslie, S.W. & Borowitz, J.L. (1975). Evidence for a plasma membrane calcium pump in bovine adrenal medulla but not adrenal cortex. *Biochim. Biophys. Acta* 394, 227.
- 68- Hogaboom, K.G. & Fedan, J.S. (1980). Stimulation by calmodulin of Ca^{2+} transport and $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity in canine tracheal smooth muscle microsomal preparation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 356, 387.

- 69- Gross, J. & Marme, D. (1978). ATP-dependent Ca^{2+} uptake into plant membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1232.
- 70- Levin, R.M. & Weiss, B. (1979). Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. J. Pharmacol. Exp. Ther. 208, 454.
- 71- Schulman, H. & Greengard, P. (1978). Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues and its activation by "calcium dependent regulator". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5432.
- 72- Katz, A.M., Repke, D.I., Upshaw, J.E. & Palascek, M.A. (1970). Characterization of dog cardiac microsomes. Use of zonal centrifugation to fractionate fragmented sarcoplasmic reticulum, $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -activated ATPase and mitochondrial fragments. Biochim. Biophys. Acta 205, 473.
- 73- Dedman, J.R., Potter, J.D., Jackson, R.L., Johnson, D. & Means, A. R. (1977). Physicochemical properties of rat testis Ca^{2+} -dependent regulator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase. J. Biol. Chem. 252, 3415.
- 74- Bonting, S.L., Simon, K.A. & Hawkins, N.M. (1961). Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase I: Quantitative distribution in several tissues of the cat. Arch. Biochem. Biophys. 95, 416.
- 75- Hartree, E.F. (1972). Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48, 422.
- 76- Sobue, K. & Kakiuchi, S. (1980). Modulator binding proteins of the testis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 850.

- 77- Sobue, K., Muramoto, Y., Yamazaki, R. & Kakiuchi, S. (1979). Distribution in rat tissues of modulator binding protein of particulate nature. *FEBS Letters* 105, 105.
- 78- Au, K.S. (1978). An endogenous inhibitor of erythrocyte membrane $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase. *Int. J. Biochem.* 9, 477.
- 79- Forrester, I.T. & Bradley, M.P. (1980). A $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase in epididymal and ejaculated sperm flagellar plasma membrane: possible modulation by extracellular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 356, 382.
- 80- Blum, J.J., Hayes, A., Jamieson, G.A. Jr. & Vanaman, T.C. (1980). Calmodulin confers calcium sensitivity on ciliary dynein ATPase. *J. Cell Biol.* 87, 386.
- 81- Gibbons, I.R., Cosson, M.P., Evans, J.A., Gibbons, B.H., Houck, B., Martinson, K.H., Sale, W.S. & Tanf, W.Y. (1978). Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2220.
- 82- Kobayashi, T., Martensen, T., Nath, J. & Flavin, M. (1978). Inhibition of dynein ATPase by vanadate and its possible use as a probe for the role of dynein in cytoplasmic motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1313.
- 83- Schatzman, H.J. & Vincenzi, F.F. (1969). Calcium movements across the membrane of human red cells. *J. Physiol.* 201, 369.
- 84- Dipolo, R. & Beaugé, L. (1979). Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axon. *Nature* 278, 271.
- 85- Dipolo, R. (1978). Ca^{2+} pump driven by ATP in squid axons. *Nature* 274, 390.
- 86- Perris, A.D., Whitefield, J.F. & Tolg, P.K. (1968). Role of cal-

- cium in the control of growth and cell division. *Nature* 219, 527.
- 87- Baulieu, E.E., Godeau, F., Schorderet, M. & Schorderet-Slatkine, S. (1978). Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes: surface and calcium. *Nature* 275, 593.
- 88- Rasmussen, H. (1970). Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 170, 404.
- 89- Rose, B. & Lowenstein, W.R. (1975). Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity. *Nature* 254, 250.
- 90- Davis, P.W. & Vincenzi, F.F. (1971). Ca^{2+} -ATPase activation and $\text{Na}^{+} + \text{K}^{+}$ -ATPase inhibition as a function of calcium concentration in human red cell membranes. *Life Sci*, 10, 401.
- 91- Dunn, M.J. (1974). Red blood cell calcium and magnesium: effects upon sodium and potassium transport and cellular morphology. *Biochim. Biophys. Acta* 352, 97.
- 92- Simons, T.J.B. (1976). Calcium-dependent potassium exchange in human red cell ghosts. *J. Physiol.* 256, 227-244.
- 93- Bygrave, F.L. (1967). The ionic environment and metabolic control. *Nature* 214, 667.
- 94- Brox, D., Petermann, B., Frunder, H. (1977). The effects of calcium on glycolysis and ATP concentration in complete and membrane poor hemolysates of human erythrocytes. *Acta Biol. Med. Germ.* 36 611.