



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Regulación Endocrina del Metabolismo Testicular

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

Maricela Zurita Bocanegra

MEXICO, D. F.

1974



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

con cariño y agradecimiento

A mis hermanos

Beto

Alida

Sofía

Bob

Adela

Lalo

A mis amigos

*Con agradecimiento y admiración
al Dr. Adolfo Rosado García*

*Al Dr. Agustín Sosa R. por su
acertada y desinteresada di-
rección, sin la cual, la rea-
lización de esta tesis no hu-
biera sido posible.*

*Mi agradecimiento a las
autoridades del Departamento
de Investigación Científica
del IMSS por permitirme lle-
var a cabo esta tesis.*

*A todas las personas que han
contribuido en mi formación
como profesionalista y como persona*

Al H. Jurado

PRESIDENTE Prof. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
VOCAL Prof. ALEJANDRO BLANCO LABRA
SECRETARIO Prof. JOSE DE J. MANRIQUE ORTEGA
1er. SUPLENTE Prof. EDMUNDO CHAVEZ COSIO
2o. SUPLENTE Prof. LUIS SALINAS MADRIGAL

Sitio donde se desarrolló el tema.- Sección Bioquímica de la Reproducción, Departamento Investigación Científica, C.M.N. I.M.S.S.

Nombre completo del sustentante.- MARISELA ZURITA BOCANEGRA

Nombre completo del asesor del tema.-DR. JOSE DE J. MANRIQUE ORTEGA

Nombre completo del supervisor técnico.- DR. AGUSTIN SOSA ROMERO

C O N T E N I D O

Introducción

Material y Métodos

Resultados

Discusión y Conclusiones

INTRODUCCION

En la reproducción de los mamíferos, el testículo lleva a cabo, principalmente, dos funciones diferentes pero relacionadas entre sí. La función exócrina que consiste en la producción y almacenamiento de espermatozoides viables y la función endócrina en la producción y secreción de hormonas, principalmente andrógenos.

El esperma producido por el testículo es transportado por un sistema ductal dentro del saco escrotal. Los espermatozoides producidos deben tener la habilidad de transportar su material genético a través del tracto genital de la hembra, así como tener la capacidad de fertilizar al óvulo en el tiempo y lugar adecuados para la reproducción de las especies.

El testículo es un órgano bilateral formado por dos cuerpos ovoides. Cada uno de ellos está cubierto por una cápsula fibrosa llamada túnica albuginea. La masa testicular está compuesta predominantemente por túbulos seminíferos los cuales forman múltiples enlaces dando lugar a patrones de anastomosis completamente cerrados. Estos túbulos se unen en un segmento para pasar al rete testis y por medio de túbulos rectos, alcanzan posteriormente el epidídimo el cual es una estructura elongada que se encuentra en la superficie externa de cada testículo y se extiende del polo superior a la superficie posterolateral del testículo.

Entre los túbulos seminíferos se encuentran localizadas las células de Leydig o intersticiales junto con numerosas fibras de colágena y abundantes vasos sanguíneos y linfáticos. Estas cé-

lulas tienen como principal función la producción de andrógenos, existiendo cambios celulares en respuesta a la presencia de la hormona luteotrófica (HL) y la hormona gonadotrofina coriónica (HGC).

La arquitectura fundamental del epitelio seminífero esta basado en una célula de Sertoli central alrededor de la cual se encuentran dispuestas las células germinales. La célula de Sertoli representa un canal de comunicación de abastecimiento vascular a través de la membrana basal para todas las células germinales que le rodean.

Dentro de los túbulos seminíferos existe una gran actividad metabólica; en ellos se lleva a cabo el desarrollo y producción de espermatozoides por un proceso cinético ordenado y perfectamente definido. A este proceso se le ha llamado espermatocitogénesis, el cual no ocurre simultáneamente en todas las partes del testículo, ni aún en el mismo túbulo.

La espermatocitogénesis es iniciada con las células menos diferenciadas llamadas espermatogonias, las cuales estan situadas exáctamente sobre la membrana basal del túbulo junto con las células de Sertoli. Existen varios tipos de espermatogonias: las de tipo A, que se dividen mitóticamente para producir las espermatogonias de tipo B, siendo más diferenciadas que las A. Por una nueva división mitótica, la espermatogonia de tipo B produce una nueva generación celular, originándose los espermatocitos primarios; éstos posteriormente sufren la primera división meiótica de maduración para producir los espermatocitos de segundo orden. Durante este proceso el contenido cromosómico de cada espermatocito primario es reducido de número diploide a número haploide, el mate-

rial genético es redistribuido y los cromosomas X y Y son segregados.

Así el espermatocito secundario procede a la segunda división de maduración para dar origen a las espermátides. A partir de las espermátides se inicia el proceso de espermiogénesis (pasos 1-19), el cual se caracteriza por una continua diferenciación del núcleo y del citoplasma, sufriendo una serie de cambios específicos para dar lugar finalmente a los espermatozoides jóvenes.

Se ha observado que durante este proceso existen asociaciones celulares bien definidas, las cuales aparecen en una forma cíclica, por lo que se ha definido a la espermatogénesis como "el ciclo del epitelio seminífero", siendo este una secuencia de cambios que ocurren entre dos apariciones sucesivas de la misma asociación celular (6).

En la figura 1 se presentan gráficamente y con detalle las diferentes etapas de este complicado proceso en el testículo de la rata. Cada una de las columnas representa cada una de las asociaciones celulares encontradas en el epitelio y la secuencia horizontal muestra el progreso de la espermatocitogénesis desde la espermatogonia hasta el espermatozoide joven, en todas sus etapas (7), (explicación en la figura).

El testículo no puede llevar a cabo o mantener su función normal sin la participación de la glándula pituitaria. Los principales mediadores de esta contribución son las hormonas gonadotróficas.

El mecanismo de acción de las hormonas gonadotróficas sobre el testículo es extremadamente complejo, además de regular el cre-

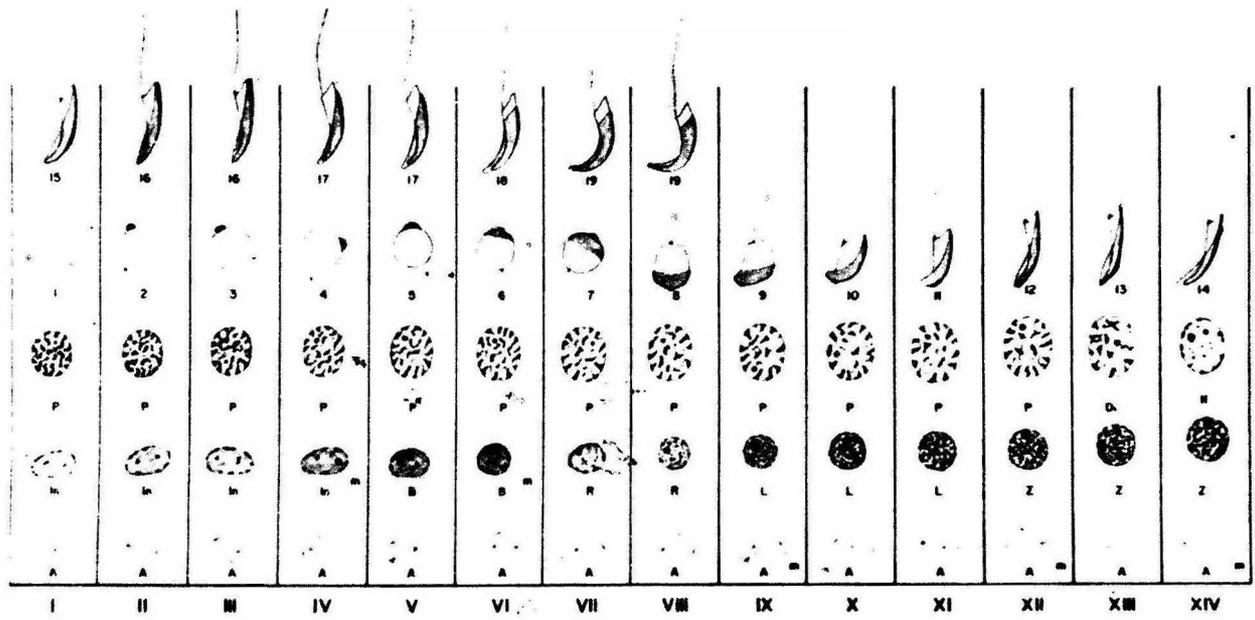


Fig.1 En esta figura se presenta el desarrollo de las células germinales en la rata. De izquierda a derecha, en la parte inferior se muestra la espermatogonia tipo A. Siempre que aparece la letra m se lleva a cabo una división mitótica. Siguiendo la última mitosis de la espermatogonia de tipo A (columna XIV) se forma la espermatogonia intermediaria (In) (2a. fila, Col. I), quedando algunas células tipo A para la repetición de la evolución. La célula intermediaria se divide (In^m) para producir la espermatogonia tipo B. Esta se vuelve a dividir (B^m) para producir el espermatocito primario en reposo (R). Este genera una profase meiotica a través de los pasos: leptoteno (L), zigoteno (Z), paquiteno (P) (3a. fila) y diacinesis (Di). Entonces la primera división de maduración produce el espermatocito secundario. Este realiza la segunda división de maduración y produce las espermátides jóvenes (1, 4a. fila, Col.I). Los diferentes pasos de la espermiogénesis estan numerados del 1 al 19. Después de llegar al paso 19 (espermatozoides jóvenes) son liberadas del epitelio seminífero para producir los espermatozoides. En esta figura las células estan dispuestas en columnas, cada columna da la composición de las asociaciones celulares encontradas en secciones de los tubulos seminíferos. Las asociaciones celulares fueron identificadas por medio de los pasos de espermiogénesis, dando 14 diferentes asociaciones localizadas en las columnas de la I a la XIV. Estas asociaciones celulares se suceden unas a otras en cualquier área dada del túbulo seminífero de acuerdo a la secuencia indicada en las columnas sucesivas del diagrama. Siguiendo la asociación celular marcada como XIV, la asociación celular marcada como I reaparece y la secuencia empieza nuevamente. Así el epitelio seminífero realiza una transformación cíclica, la cual ha sido denominada el "ciclo del epitelio seminífero". Las 14 asociaciones celulares caracterizan los 14 "pasos" de este ciclo.

cimiento, el desarrollo y la función de este órgano efector, constituido como ya se vió de diversos compartimentos y varios tipos celulares, estas hormonas también regulan la síntesis y secreción de hormonas esteroides que por sí, e individualmente pueden actuar sobre algunos de estos tipos celulares. Haciendo aún más complejo este mecanismo, la existencia de por lo menos dos tipos de gonadotrofinas hipofisiarias, provee que efectos sinérgicos o antagónicos sumamente complejos tengan lugar dentro de dicho órgano efector (8, 33).

Así a pesar de la intensa investigación a la que han sido sujetas las hormonas gonadotróficas y de que muchos de los procesos celulares y subcelulares son explicados por la acción de estas hormonas, el mecanismo de acción individual para cualquiera de ellas permanece por ser elucidado.

Siendo la espermatogénesis un proceso largo y elaborado que incluye varias clases de distintos tipos celulares, es obvio pensar en la necesidad de un abastecimiento contínuo de nutrientes y el aporte constante de energía.

La glucosa es el metabolito más importante para el testículo, ya que la vía glicolítica es la que aporta la mayor parte de la energía para el funcionamiento y mantenimiento de las estructuras testiculares (9, 10).

Las espermátides y espermatoцитos son las células que se encuentran en mayor cantidad en el testículo maduro de la mayoría de las especies, por lo que se pueden considerar como las principales responsables de las características metabólicas del testículo completo.

Sharma y Weinhouse, 1962 (11), demostraron que la glucosa-6-fosfato es el primer producto de fosforilación de la glucosa y

no la glucosa-1-fosfato como se pensaba. La hexocinasa (ATP:D-hexosa-6-fosfotransferasa 2.7.1.1.) es la enzima responsable de esta reacción, considerándose como un punto de control importante en el metabolismo glicolítico del testículo.

La heterogenicidad molecular de la hexocinasa (HC), fué reconocida inicialmente por Viñuela y Col en 1963 (12) y por Sharma y Col (13). Recientemente ha sido demostrado que por lo menos cuatro formas de HC estan presentes en hígado (14, 15) y dos o tres formas se presentan en los demás tejidos (16, 17). Es de especial interés que el testículo de rata normal (18) y el hombre (19) contienen una isoenzima diferente de hexocinasa que ha sido llamada S.T. (Sperm Type) por Katzen (20). Esta forma, la cual migra lentamente hacia el ánodo, ha sido también encontrada en el epidídimo (18) y en el espermatozoide humano y de rata (19).

Los cambios de las actividades enzimáticas en relación con la espermatocitogénesis ha sido estudiada por Sosa y Col, 1972 (21) quienes presentan la hipótesis de que la dependencia de glucosa de las formas avanzadas de las células espermatogénicas dependen de la presencia de la hexocinasa S.T. y también de que la inducción de esta enzima puede ser correlacionada con el inicio de una eficiente síntesis de testosterona en el testículo de la rata.

Viendo la importancia y la trascendencia de la hexocinasa en los procesos de diferenciación y adaptación metabólica, Sosa y Col (22) llevaron a cabo la determinación del ritmo circadiano de esta enzima junto con el ritmo circadiano del RNA. El comportamiento que presentaron estos ritmos circadianos nos hicieron pensar en la posible correlación de los picos presentados a las 10 hrs en hexocinasa y a las 22 hrs en el RNA como un fenómeno de

causa-efecto, habiendo una elevación en el contenido de RNA a las 22 hrs, pudiéndose explicar la elevación en la actividad de HC a las 10 hrs por un incremento en la concentración de proteínas.

La evidencia de que el ritmo circadiano de testosterona presentara un pico máximo a las 8-9 hrs (3), nos indujo a pensar en la posible regulación hormonal de estos parámetros por un efecto de la hormona luteotrófica (HL), ya sea activando la enzima, produciendo espermiación o induciendo síntesis de RNA y proteínas; o bien por un efecto indirecto de la hormona mediante síntesis de testosterona.

El objetivo de la elaboración de este trabajo ha sido el tratar de elucidar la influencia de la HL en el metabolismo y actividad biosintética del testículo.

MATERIAL Y METODOS

Animales.-

Ratas machos de la cepa Sprague Dawley de 70-75 días de edad, fueron utilizadas como material biológico. Desde su nacimiento estos animales fueron colocados bajo un estricto ritmo de luz-oscuridad, 14-10 hrs, con el fin de lograr la sincronización de aquellas funciones testiculares relacionadas con este parámetro físico. Especial cuidado fué puesto para mantener aislados estos animales tanto del contacto como de la presencia de ratas hembra.

Tratamiento de los animales.-

Para establecer la participación de la hormona luteotrófica hipofisiaria (HL) como un regulador de las funciones metabólicas y espermiogénicas del testículo de la rata, a cuatro grupos de 6-8 ratas se les administró intraperitonealmente 5 μ g de HL a las 0, 1, 2 y 4 horas antes de su sacrificio. En todos estos animales la actividad biosintética del testículo fué estudiada midiendo la incorporación de precursores marcados a RNA y proteínas. Para ello se utilizaron isoleucina-C¹⁴ y uridina-H³ con actividades específicas de 2 μ Ci/0.0076 μ moles y 20 μ Ci/0.1138 μ moles respectivamente, los cuales fueron administrados intraperitonealmente 60 min previos a su muerte.

Debido a la presencia de variaciones circadianas en algunos de los parámetros medidos, fué necesario sacrificar a los animales a las 10 a.m. específicamente.

Procesamiento de las muestras.-

Inmediatamente después de sacrificar a los animales por decapitación, se les abrió la cavidad abdominal y los testículos y epidídimos fueron rápidamente extraídos y colocados en un vaso de precipitados en hielo. Ambos órganos se limpiaron de tejido adherente y en el caso de los testículos, la capa albúginea fué removida.

Testículos y epidídimos de cada animal fueron homogenizados individualmente en un homogenizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón, en 2 y 4 veces, respectivamente, el volúmen de su peso en un amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.0 conteniendo mercaptoetanol y etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA) a una concentración final de 5×10^{-3} M.

El homogenizado obtenido fué dividido en dos partes; una de ellas fué utilizada para extraer y determinar DNA, RNA y proteínas, y medir la radioactividad incorporada en estos parámetros, y la segunda parte fué centrifugada a $105,000 \times g$ durante 60 minutos; el sobrenadante obtenido fué utilizado para medir proteínas y las actividades enzimáticas de hexocinasa (HC), fosfofructocinasa (FFC) y piruvatocinasa (PC).

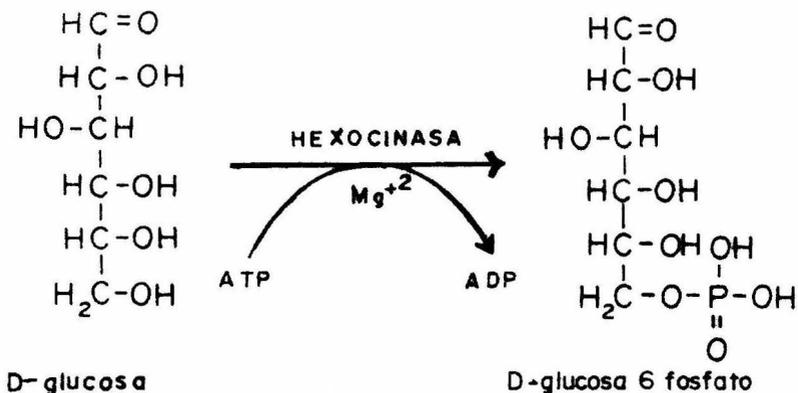
Determinación de actividades enzimáticas.-

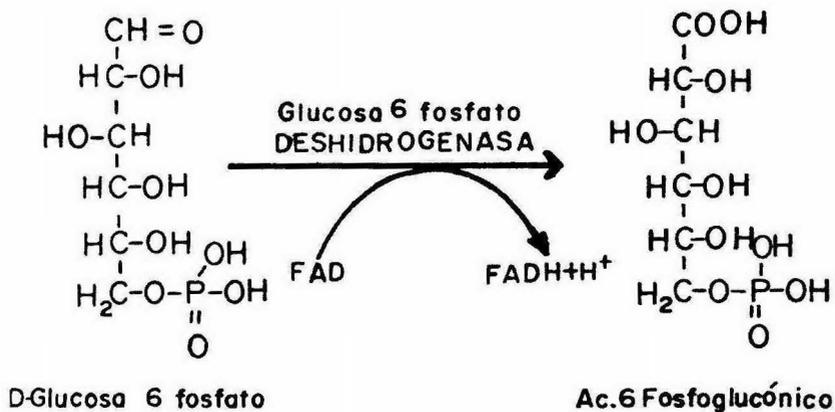
Los métodos utilizados en este trabajo para la determinación de las actividades enzimáticas, dependen de la oxidación o reducción estequiométrica de coenzimas de piridin-nucleótidos NAD/NADH+H o FAD/FADH cuando el sustrato es convertido por la enzima apropiada, registrándose el cambio en D.O. producido a 340 nm.

La mezcla de reactivos es preparada con una concentración apropiada de sustratos y cofactores a un pH óptimo y a una temperatura adecuada. Bajo estas condiciones, las reacciones enzimáticas *in vitro* son determinadas por la concentración y actividad de la enzima. En las reacciones acopladas a piridin-nucleótidos, las condiciones enzima-sustrato deberán ser establecidas de manera de obtener un cambio en la absorbancia de la luz de 0.02 - 0.05/min a 340 nm. La reacción producirá una función lineal por lo menos durante los primeros 2-3 minutos después de haber sido iniciada.

Determinación de la actividad de hexocinasa.-

La determinación de la actividad de hexocinasa se llevó a cabo de acuerdo al método elaborado por Di Pietro y Weinhouse (23) modificado por Grossbard y Schimke (24), el cual está basado en la siguiente reacción:





en la cual se mide el cambio de D.O. por la velocidad de producción del FADH + H⁺, el cual será proporcional a la actividad de la hexocinasa.

Reactivos.-

Buffer Tris-HCl 0.074 M pH 7.4 (Merck)

Conteniendo.-

MgCl ₂	-----	7.4 mM (Hopkin & Williams Ltd)
2-mercaptoetanol	-----	5 mM (Eastman)
Glucosa	-----	25 mM (Sigma)
FAD	-----	0.55 mM (Sigma)
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	--	55 Unidades (Sigma)
Adenosintrifosfato	----	192.4 mM (General Biochemical)

Preparación de la mezcla de reactivos.-

Se preparó inicialmente el buffer Tris-HCl 0.074 M, pH 7.4 conteniendo $MgCl_2$ 7.4 mM y mercaptoetanol 5 mM. Se pesaron 8.96 g de Tris (hidroximetilamino metano) y 1.504 g de $MgCl_2$. Estos se disolvieron en agua destilada y se ajustó el pH con una solución de HCl 4 N. Cuando el pH de la solución estuvo cerca de 7 fueron adicionados 400 μ l de 2-mercaptoetanol ajustándose finalmente el pH a 7.4. Posteriormente se aforó a un litro con agua destilada. De este buffer se tomaron 30 ml a los cuales se les adicionó 135.2 mg de glucosa, 15.2 mg de FAD y 20 μ l de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, obteniéndose así la mezcla de reactivos a las concentraciones deseadas.

Por separado se preparó una solución de ATP 192.4 mM pesando 119.4 mg de ATP por ml de buffer Tris-HCl 0.074 M, pH 7.4.

Procedimiento.-

La determinación de la actividad de la hexocinasa se llevó a cabo manteniendo la temperatura constante a 37°C. La reacción se inició adicionando 10 μ l de la solución de ATP, para obtener una concentración final en la celdilla de 3.7×10^{-3} M, a 500 μ l de la mezcla de reactivos a los cuales se les había adicionado

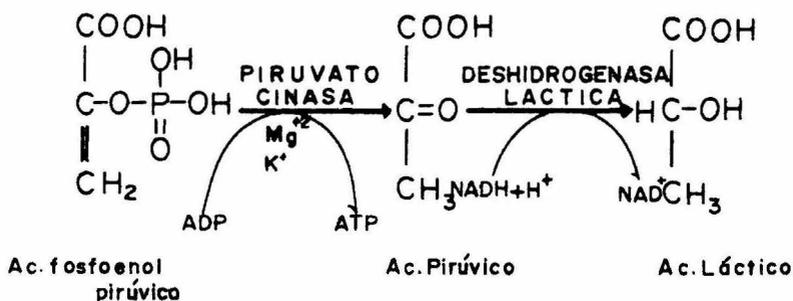
20 μ l del sobrenadante de 105,000 xg obtenido de los homogenizados de testículo y epidídimo para esta determinación.

Determinación de la Actividad de la piruvato cinasa (PC).-

La determinación de la actividad de la PC está basada en la disminución de la D.O. a 340 nm en la reacción acoplada con

deshidrogenasa láctica a temperatura ambiente, de acuerdo a las modificaciones del método de Bucher y Pfleiderer (20).

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



en la cual se mide el cambio de D.O. por la velocidad de producción del DPN^+ el cual será proporcional a la actividad de la piruvato cinasa.

Reactivos.-

- Buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 (Merck)
- Se pesaron 12.1 g de Tris y se disolvieron en agua destilada. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl 4 N y se aforó a un litro con agua destilada.
- Sulfato de Magnesio (MgSO_4) 0.2 M (Merck)
- Cloruro de Potasio (KCl) 2 N (Mallinckrodt)
- Nicotinamida 0.5 M (Eastman Organic Chemicals).
- $\text{NADH} + \text{H}^+$ (sal de sodio) 20 mM (Sigma)
- Se pesaron 14 mg de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y se disolvieron en 1 ml de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4.
- Albúmina de suero bovino (BSA) 10% (Hyland)
- De la solución original de BSA 30% se hizo una dilución 1:3 con buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4.

Fosfoenolpiruvato de sodio (PEP) 2 mM (concentración final en la celdilla) (Sigma)

Se pesaron 4.7 mg de PEP por cada 4.77 ml de mezcla de reactivos.

LDH (Deshidrogenasa láctica) Tipo II 4 mg/ml (Sigma)

Adenosin-difosfato (ADP) 50 mM (Sigma)

Se pesaron 25 mg de ADP por ml de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4.

Preparación de la mezcla de reactivos.-

Buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4	4 ml
MgSO ₄	0.2 M 0.20 ml
KCl	2 M 0.10 ml
Nicotinamida	0.5 M 0.20 ml
NADH + H ⁺	20 mM 0.05 ml
BSA 10%	0.03 ml
PEP	4.7 mg/4.77 ml de mezcla de reactivos para concentración final de 2 mM
LDH tipo II 4 mg/ml	0.01 ml

El volumen de la mezcla de reactivos se aforó a 4.77 ml con buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4.

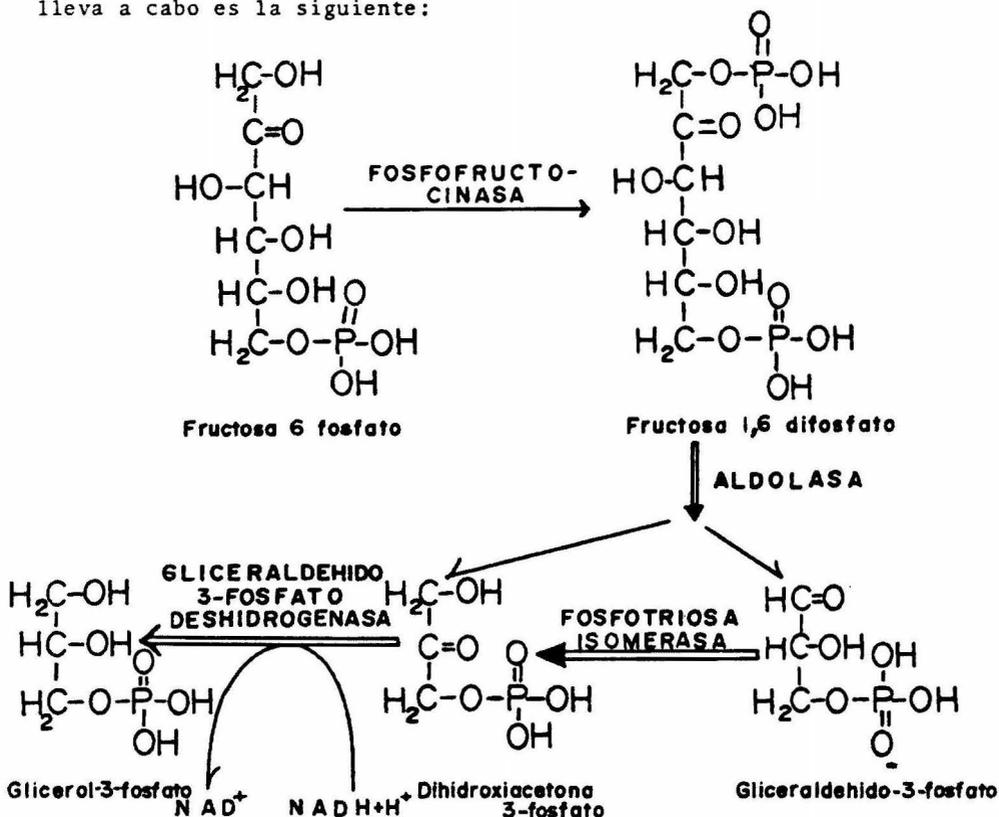
Procedimiento.-

La determinación de la actividad de piruvato cinasa se llevó a cabo a temperatura ambiente. La reacción se inició adicionando 5 μ l de la solución de ADP 50 mM a 500 μ l de la mezcla de reactivos a los cuales se les había adicionado previamente 10 μ l del sobrenadante de 105,000 x g obtenido de los

homogenizados de testículo y epidídimo para esta determinación. Por la alta concentración de esta enzima en los sobrenadantes fué necesario hacer diluciones 1:10.

Determinación de la Actividad de la fosfofructocinasa (FFC).-

La determinación de la actividad de la fosfofructocinasa se llevó a cabo de acuerdo al método de Kemp, R.G. (27), en la cual la fructosa 1,6 difosfato producida por la FFC, a partir de fructosa 6-fosfato, fué convertido por la aldolasa, triosafosfoisomerasa y glicerolfosfatodeshidrogenasa a glicerol fosfato, con la respectiva oxidación del $NADH + H^+$. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



en la cual se mide el cambio de D.O. a 340 nm por la velocidad de producción del NAD^+ , la cual será proporcional a la actividad de la fosfofructocinasa.

Reactivos.-

Buffer Glicil-glicina 25 mM pH 8.2 (NBC)

Conteniendo:

Glicerolfosfato de sodio	-----	25 mM (NBC)
Etilendiaminotetra-acetato de sodio (EDTA)	----	1 mM
Cloruro de Magnesio (MgCl_2)	----	6 mM (Mallinckrodt) (Hopkin)
Sulfato de amonio (NH_4) ₂ SO ₄	---	3 mM (Merck)
Ditiotreitol	-----	0.1 mM (Sigma)
NADH + H ⁺	-----	0.2 mM (NBC)
Fructosa 6-fosfato	-----	1 mM (Sigma)
Aldolasa	-----	10 Unidades/50 ml de M.R. (Sigma)
Triosafosfatoisomerasa	-----	5 Unidades/50 ml de M.R. (Sigma)
α -Glicerolfosfato deshidrogenasa		5 Unidades/50 ml de M.R. (Sigma)
Adenosintrifosfato (ATP)	-----	122 mM

Preparación de la mezcla de reactivos.-

Se pesaron 3.3025 g de glicilglicina, 0.3723 g de EDTA, 1.2198 g de glicerofosfato de sodio; se colocaron en un vaso de precipitados y se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH a 8.2 con una solución de HCl 4 N y posteriormente se aforó

a un litro con agua destilada.

De este buffer se tomaron 50 ml a los cuales se les adicionó 7.5 mg de NADH + H⁺, 18.27 mg de fructosa 6-fosfato, 2 µl de triosafosfatoisomerasa, 100 µl de aldolasa y 50 µl de α-glicerol-fosfato deshidrogenasa, obteniéndose así la mezcla de reactivos deseada para la determinación de FFC.

Por separado se preparó una solución de ATP 122 mM pesando 68 mg de ATP por ml de buffer de glicil-glicina 25 mM pH 8.2.

Procedimiento.-

La determinación de la actividad de FFC se llevó a cabo controlando la temperatura a 26°C.

La reacción se inició adicionando 25 µl de la solución de ATP 122 mM a 3 ml de la mezcla de reactivos, para obtener una concentración final de 1 mM, a la cual previamente se le adicionaron 20 µl del sobrenadante 105,000 x g obtenidos de los homogenizados de testículo y epidídimo, para esta determinación.

Con objeto de elucidar si la influencia de la HL sobre las actividades enzimáticas era en forma directa, todas las determinaciones enzimáticas se realizaron en presencia y ausencia de la HL, adicionando directamente a la mezcla de reactivos 10 µl de una solución de HL de 5 µg/ml.

Extracción y determinación de DNA, RNA y proteínas de homogenizado total de testículo y epidídimo.-

Todo el procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos fué realizado a 4°C. Para llevar a cabo estas extracciones se tomaron 300 µl de homogenizado de testículo y epidídimo. Este

volúmen se llevó a una concentración final de ácido perclórico (PCA) 0.2 M y se homogenizaron en un homogenizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón durante 2 minutos.

Se centrifugó a 5,000 r.p.m. durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con una solución de PCA 0.2 M. La presencia de grandes cantidades de material lipídico puede producir mezclas de reacción turbias, por lo que fué necesario someter al precipitado obtenido a una extracción de lípidos, previa a la extracción de los ácidos nucleicos (25). Para ello se adicionó 1 ml de una mezcla de cloroformo-etanol-eter (1:2:2) dejándose en contacto durante una hora, agitando cada 15 minutos; se centrifugó a 5,000 r.p.m. durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en un ml de una mezcla de eter etílico-eter de petróleo (3:1) y se centrifugó nuevamente descartándose el sobrenadante. El precipitado se colocó en un baño de agua a 37°C para la evaporación total de los solventes orgánicos. (Todos los reactivos utilizados fueron de la casa Merck).

Extracción de RNA, DNA y proteínas.-

El precipitado libre de lípidos se procesó para la extracción de RNA, DNA y proteínas de acuerdo a los métodos descritos por Schmidt-Thannhauser (28) y Schneider (29).

Reactivos.-

Hidróxido de Potasio (KOH)	-----	0.3 M (Mallinckrodt)
Acido Perclórico (PCA)	-----	0.2 M (Merck)
Acido Perclórico (PCA)	-----	3 M (merck)

Acido Perclórico (PCA) ----- 1 M (Merck)
Base fuerte 0.6 N en
tolueno (NCS) ----- (Amersham/Searle)

Extracción de RNA.-

Los precipitados de testículo y epidídimo libres de lípidos fueron resuspendidos en 1 ml de KOH 0.3 N y se incubaron a 37°C en un Temp-Block durante dos horas, agitándolos cada 15 min. Los tubos se colocaron en hielo y la suspensión potásica se neutralizó con 100 µl de PCA 3 M llevándose a una concentración final de PCA 0.2 M con 100 µl de PCA 2.4 M y se dejó precipitar en frío durante 24 hrs y después se centrifugó a 5,000 r.p.m. a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido (RNA hidrolizado) se separó en tubos pequeños para su posterior determinación y el precipitado se lavó dos veces con PCA 0.2 M.

Extracción de DNA.-

El precipitado residual se resuspendió en 1 ml de PCA 1 M y se incubó a 70°C en un temp-block durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido (DNA hidrolizado) después de centrifugar a 5,000 r.p.m. a 4°C durante 15 minutos fué separado en pequeños tubos para ser determinado posteriormente. El precipitado restante (proteínas) se lavó dos veces con PCA 0.2 M y se disolvieron en 2 ml de NCS para determinación de proteínas.

Determinación de DNA.-

De los métodos existentes para la determinación de DNA el más sencillo, sensible y específico es el publicado por Giles

y Myers (1965) (30), quienes utilizan la producción de un complejo colorido del DNA con la difenilamina y el acetaldehído en medio ácido, cuya intensidad de color varía directamente con la concentración de desoxiribosa presente.

Reactivos.-

Acido desoxiribonucleico (sal disódica de timo de ternera)	-----	(Sigma)
Acido Perclórico (PCA)	-----	1 M (Merck)
Acido Perclórico (PCA)	-----	2 M (Merck)
Acetaldehído*	-----	16 mg/ml (Backer)
Difenilamina (DPA) recristalizada)	----	al 4% en ácido acético glacial (Backer)

* Nota: El acetaldehído debe prepararse a bajas temperaturas (0-5°C) y debe mantenerse congelado hasta el momento de usarse, haciéndose una dilución de 1:10 con agua destilada para obtener una concentración 1.6 mg/ml.

Procedimiento.-

Curva estandar:

La solución stock de DNA para la curva estandar se preparó pesando 10 mg de DNA y se disolvieron en 5 ml de PCA 1 M. Se hidrolizó a 70°C durante 30 minutos en un Temp-block y se aforó a 10 ml para obtener una concentración de 1 mg/ml. La curva estandar se preparó de la siguiente manera:

1. Se tomaron alícuotas de la solución stock para obtener concentraciones de 5 a 50 µg de DNA
2. Se completó el volumen a 400 µl con PCA 1 M
3. Se adicionaron 400 µl de PCA 2 M
4. Se adicionaron 60 µl de acetaldehído (1:10)

5. Se adicionaron 500 μ l de DPA al 4%
6. Se mezclaron los reactivos perfectamente
7. Se preparó un blanco con todos los reactivos sustituyendo el DNA por PCA 1 M
8. Se colocaron los tubos en un baño María a 37°C durante 24 horas.
9. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro Coleman Jr. a 600 nm.
10. A todas las lecturas obtenidas se les restó el valor del blanco para obtener la concentración real de DNA presente.

En la Figura 2 se presenta la curva estandar obtenida para la cuantificación de DNA de acuerdo al método descrito. En las abscisas se grafica la concentración de DNA en μ g y en las ordenadas, D.O. La sensibilidad, reproducibilidad y especificidad del método fueron confirmados al llevar a cabo la elaboración de la curva estandar en varias ocasiones.

Para la determinación de la concentración de DNA en las muestras, se tomaron alícuotas de 100 μ l de cada una y se siguió el mismo procedimiento que en la curva estandar a partir del paso número dos. A las lecturas obtenidas se les restó el valor del blanco y se extrapolaron las lecturas a la curva estandar obteniéndose así la concentración de DNA en las muestras.

Todas las determinaciones llevadas a cabo se hicieron por duplicado.

Determinación de RNA.-

El método para la cuantificación de RNA (31) se basa en la reacción que utiliza orcinol en ácido clorhídrico, obteniéndose

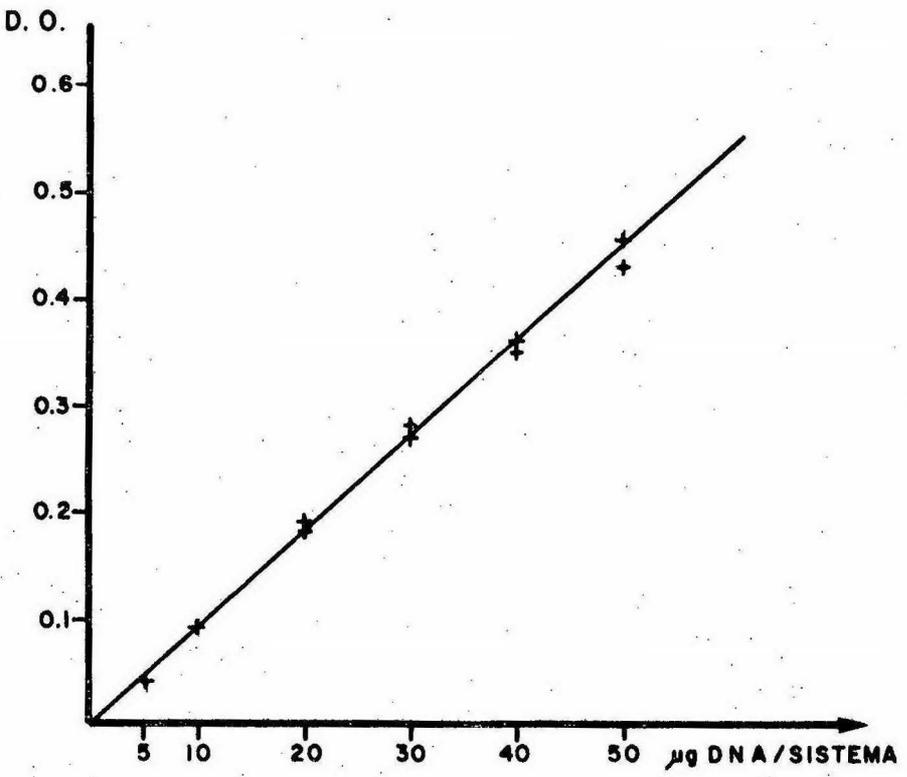


Fig.(2). Curva estándar para determinar la concentración de DNA en los homogenizados de testículo y epidídimo por el método de la difenilamina. En las coordenadas se establece la lectura en D.O. obtenida a 600 mμ y en las abscisas se establece la concentración en μg de DNA por sistema.

una coloración verde que sigue la ley de Lambert y Beer. La reacción se lleva a cabo entre la ribosa y el orcinol.

Reactivos.-

RNA de hígado de ternera tipo IV	(Sigma)
Acido Perclórico 0.2 M	(Merck)
Orcinol recristalizado	(Eastman)
Acido clorhídrico concentrado	(Mallinckrodt)
Cloruro Férrico	(Backer)

Preparación del reactivo de orcinol.-

Debe prepararse en el momento de usarse, disolviendo 100 mg de orcinol y 50 mg de cloruro férrico por cada 10 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Debe tenerse cuidado en escoger la marca del HCl, ya que si no está suficientemente puro, la reacción no se lleva a cabo.

Procedimiento.-

Curva estandar de RNA.-

Se preparó una solución stock de RNA, pesando 10 mg de RNA y disolviéndolos en 1 ml de KOH 0.3 M. Se hidrolizó a 37°C durante 2 horas. La solución potásica se neutralizó con 100 μ l de PCA 3 M y se dejó enfriar en hielo. Se llevó a concentración final de PCA 0.2 M con 100 μ l de PCA 2.4 M. Al ser enfriado se precipitó el $KClO_4$ formado en la reacción y éste se separó por centrifugación. En el momento de usarse se hizo una dilución 1:10 para obtener una concentración de 1 mg/ml.

La curva estandar se preparó de la siguiente manera:

1. Se tomaron alícuotas adecuadas de la solución de RNA de 1 mg/ml para obtener de 20 a 100 μg por sistema
2. Se completó el volúmen a 750 μl con PCA 0.2 M
3. Se adicionaron 750 μl del reactivo de orcinol
4. Se colocaron canicas a todos los tubos y se pusieron en un baño María a ebullición durante 20 minutos
5. Se pasaron los tubos a baño de hielo por 10 minutos
6. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 660 nm (IR).

En la figura 3 se presenta la curva estandar obtenida para la cuantificación de RNA por este método. En las abscisas se grafica la concentración de RNA en μg y en las ordenadas la D.O. La sensibilidad, reproducibilidad y especificidad del método fueron confirmadas al elaborar en varias ocasiones la curva estandar.

Para la determinación de RNA en las muestras se tomaron alícuotas de 200 μl para testículo y 400 μl para epidídimo y se siguió el mismo procedimiento que en la curva estandar a partir del paso No.2.

Se preparó un blanco con todos los reactivos, sustituyendo el RNA por PCA 0.2 M, cuya lectura a 600-nm se restó a las lecturas obtenidas en las muestras y estas se extrapolaron a la curva estandar, obteniéndose así la concentración de RNA en las muestras.

Determinación de proteínas.-

La determinación de proteínas, tanto de homogenizado to-

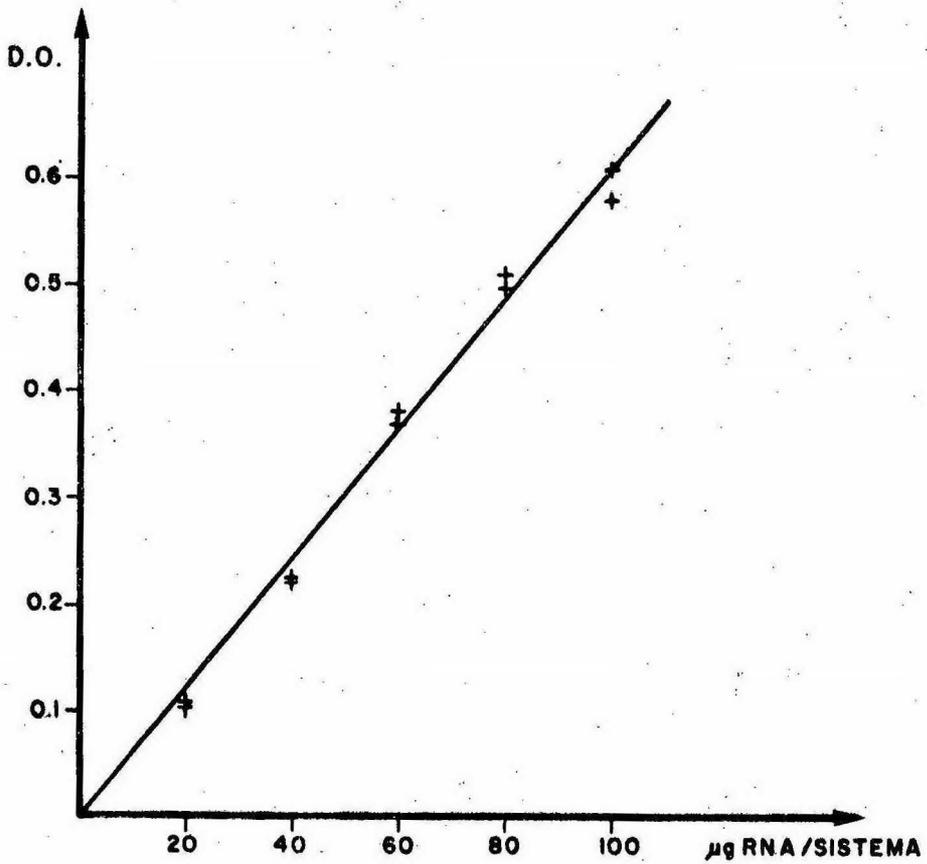


Fig. (3). Curva estándar para determinar la concentración de RNA en los homogenizados de testículo y epidídimo por el método del orcinol. En las ordenadas se expresan las lecturas obtenidas en D.O. a 650 m μ y en las abscisas la concentración de RNA en μ g por sistema.

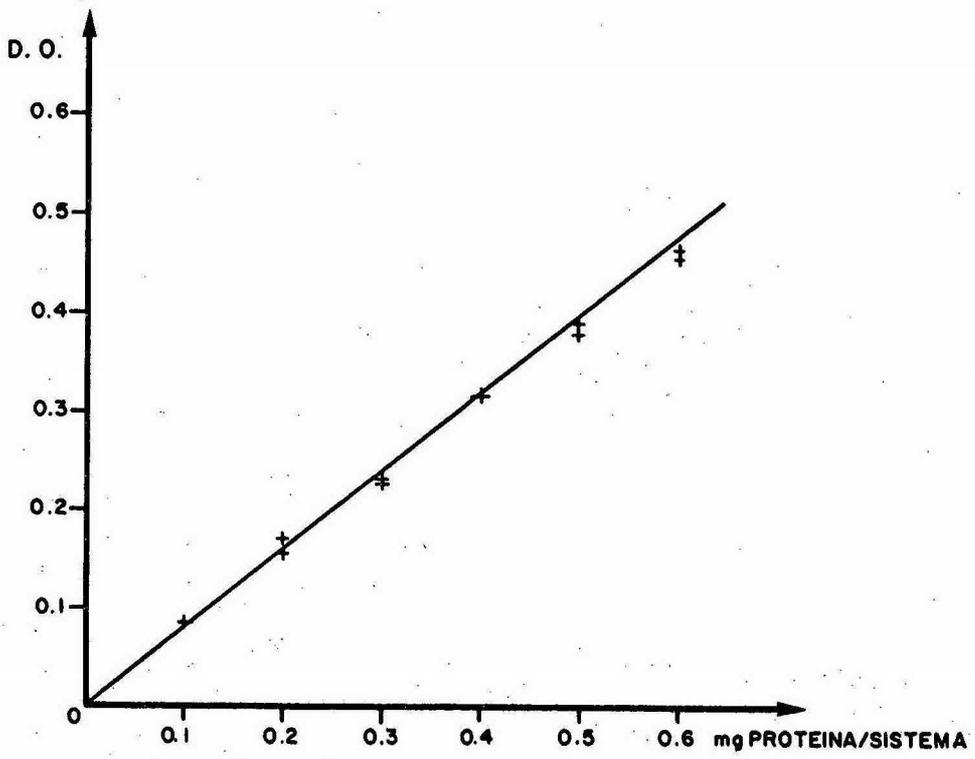


Fig. (4). Curva estándar para determinar la concentración de proteínas por el método de Biuret en sobrenadante y homogenizado total de testículo y epidídimo. En los ordenados se establecen las lecturas obtenidas en D.O. a 550 nm. En las abscisas se establecen las concentraciones de proteína expresadas en mg en el sistema

En la figura 4 se presenta la curva estandar obtenida por este método para la cuantificación de proteínas. En las abscisas se grafica la concentración de proteínas en mg y en las ordenadas la D.O. La sensibilidad, reproducibilidad y especificidad del método fueron confirmadas al elaborar repetidas veces la curva estandar.

Para la determinación de las proteínas en las muestras se tomaron las siguientes alícuotas:

- 400 µl de sobrenadante epidídimo
- 300 µl de sobrenadante de testículo
- 300 µl de homogenizado de testículo
- 300 µl de homogenizado de epidídimo,

se completaron a 1 ml con NaOH 1 N y se disolvieron a 37°C durante 15 minutos en un Temp-block y se procedió en la misma forma que en la curva estandar a partir del paso No.3.

La lectura obtenida del blanco se restó a todas las muestras y se extrapoló el valor a la curva estandar, obteniéndose así la concentración de proteína presente en cada muestra.

Todas las determinaciones tanto de la curva estandar como de las muestras se llevaron a cabo por duplicado.

Determinación de ^{14}C y ^3H .

La detección de incorporación de precursores radioactivos en las muestras se llevó a cabo en un contador de centelleo Nuclear Chicago, poniendo las muestras en contacto con líquido de centelleo, registrándose las emisiones β del material radioactivo en un fotomultiplicador, produciéndose una señal luminosa, la cual fué detectada y amplificada, registrándose en una escala el

número de emisiones por un tiempo determinado.

Reactivos.-

Tolueno	-----	Recién destilado (Baker)
Etanol	-----	(Merck)
2, 5 diphenyloxazole (PPO)	-----	(Amersham/Searle)
1, 4-bis [2-(4- methyl-5-phenyl- oxazolyl)] Benceno (POPOP)	-----	(Nuclear Chicago)
NCS		(Amersham/Searle)

Preparación de la mezcla de centelleo.-

Para un litro de solución se tomaron 600 ml de tolueno, 400 ml de etanol, a los cuales se les adicionaron 2 g de PPO y 0.4 g de POPOP.

Procedimiento.-

Se colocaron en los viales 100 μ l de los homogenizados totales de testículo y epidídimo, los cuales se disolvieron en 400 μ l de NCS; 200 μ l de RNA hidrolizado con KOH y 200 μ l de las proteínas disueltas en NCS.

A cada vial se le adicionaron 20 ml de la mezcla centelleante y se colocaron en el aparato para ser leídas dos veces durante 20 minutos cada muestra.

RESULTADOS

Actividades enzimáticas.-

Como se mencionó anteriormente, de todas las enzimas estudiadas se hizo un cuidadoso estudio cinético en cuanto a concentración óptima de sustratos, cofactores, pH y temperatura para poder asegurar de que en todos los casos la enzima se encontraba en condiciones óptimas y de que realmente se midió la velocidad inicial en cada una de las reacciones realizadas. Para mayor seguridad todas las determinaciones se hicieron por duplicado, utilizando volúmenes diferentes de sobrenadante. Aquellos casos en que los resultados obtenidos en el cambio de D.O. por este método no fueron directamente proporcionales a la cantidad de sobrenadante usado, la determinación se repitió utilizando alícuotas menores. En la figura 5 se presentan los resultados obtenidos al llevarse a cabo esta prueba de proporcionalidad de la concentración de la enzima, dando cambios equivalentes en la D.O. Se grafica en las abscisas μg de proteína, contra D.O. en las ordenadas.

De esta manera, se tiene la seguridad de que la enzima se encuentra siempre en condiciones óptimas y de que las variaciones observadas fueron debidas realmente a cambios en la concentración efectiva de la enzima.

Se describen a continuación algunos resultados de los estudios previos para obtener las condiciones óptimas bajo las cuales se hicieron todas las determinaciones enzimáticas.

En las figuras 6, 7 y 8 se presentan las curvas obtenidas de acuerdo a la cinética de Michaelis-Menten para hexocinasa,

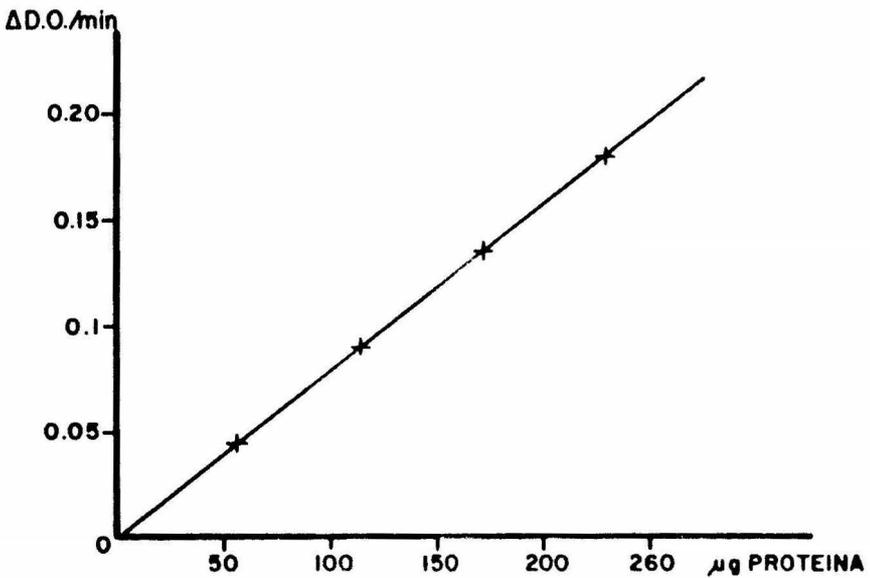
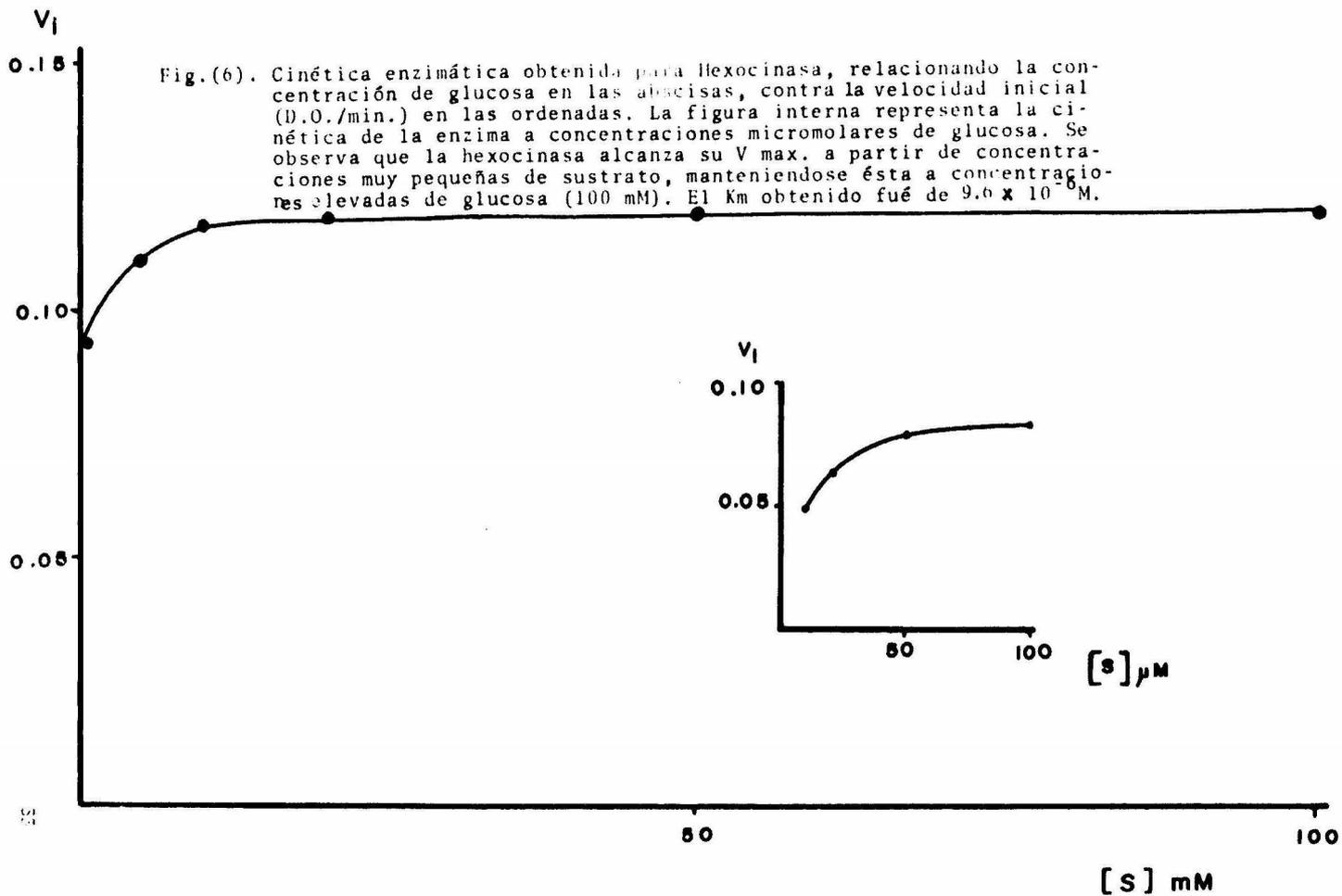


Fig. (5). Curva representativa de la proporcionalidad presentada en los sistemas utilizados para la determinación de las actividades enzimáticas a 340 mμ. En las ordenadas se presenta el cambio de D.O. y en las abscisas la concentración de enzima expresado como µg de proteína, en el sobrenadante.



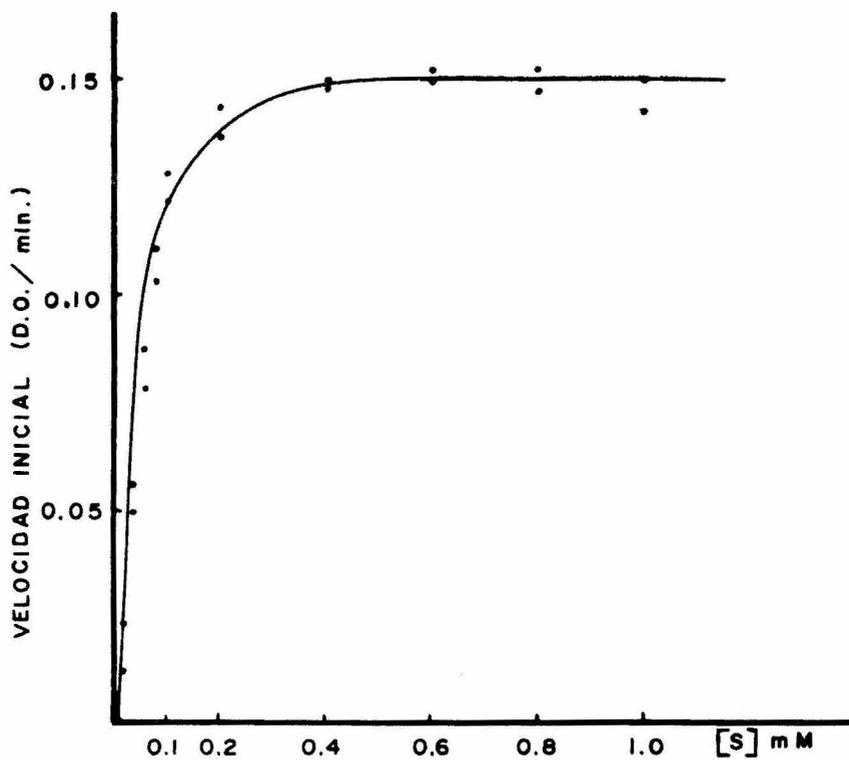


Fig.7

Cinética enzimática obtenida para fosfofructocinasa (FFC), relacionando la concentración de adenosintrifosfato en las abscisas contra la velocidad inicial (D.O./min) en las ordenadas. La FFC alcanza su V máxima a concentraciones 0.4 mM de sustrato. El K_m obtenido fué de 50×10^{-6} M.

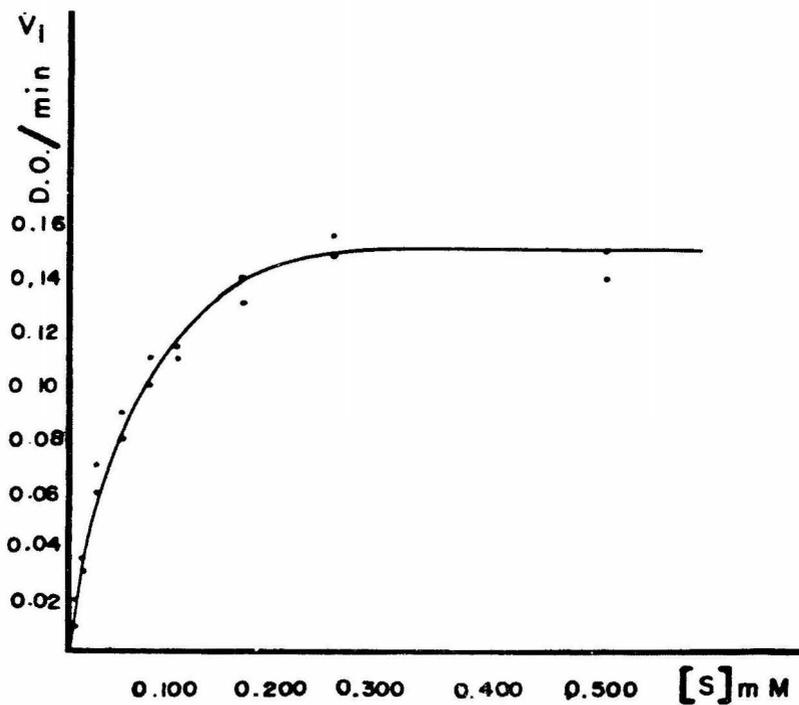


Fig.8

Cinética enzimática obtenida para piruvatocinasa (PC) relacionando la concentración de fosfoenolpirúvico (PEP) en las abscisas, contra la velocidad inicial (D.O./min) en las ordenadas. La velocidad máxima de la PC fué alcanzada a concentraciones de 0.300 mM de sustrato. El K_m obtenido fué 35×10^{-6} M.

fosfofructocinasa y piruvatocinasa respectivamente, en donde se presentan las variaciones de la velocidad inicial (D.O./min) con respecto a las concentraciones de sustrato. En las figuras 9, 10 y 11 se grafican las cinéticas enzimáticas expresadas de acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burk, para HC, PC y FFC respectivamente. En las abscisas se presenta el inverso de la concentración de sustrato $(\text{mM})^{-1}$ y en las ordenadas el inverso de la velocidad inicial $(\text{D.O./min})^{-1}$.

Para la hexocinasa puede observarse que esta alcanza prácticamente su velocidad máxima desde concentraciones de 100 μM de glucosa (Figura interna), conservando este valor a concentraciones 1,000 veces más elevadas de sustrato. El K_m obtenido para la hexocinasa fué de 9.6×10^{-6} M. Analizando estos datos, podemos pensar que la hexocinasa es una enzima con gran capacidad funcional, pues mantiene su máxima actividad en un rango muy amplio de concentración de sustrato.

En cuanto a la fosfofructocinasa se puede observar que la concentración de ATP necesaria para alcanzar su velocidad máxima fué de 0.4 mM obteniéndose un K_m de 50×10^{-6} M.

La piruvatocinasa presenta una cinética similar a las dos enzimas anteriores, alcanzando su velocidad máxima a una concentración de 300 mM de fosfoenolpiruvato de sodio, obteniéndose un K_m de 35×10^{-6} M.

Estudios similares fueron llevados a cabo para conocer las condiciones óptimas de pH y temperatura para cada reacción.

Con los resultados de estos estudios se calcularon las condiciones óptimas de sustratos y cofactores necesarios para llevar a cabo en condiciones óptimas las reacciones enzimáticas.

Fig.9 Cinética enzimática obtenida para la H₂O de acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burk, donde se relaciona el inverso de la concentración de glucosa (abscisas), con el inverso de la velocidad inicial (D.O./min)⁻¹ (ordenadas). El K_m calculado de la función lineal obtenida para esta enzima fué 9.6 x 10⁻⁵ M.

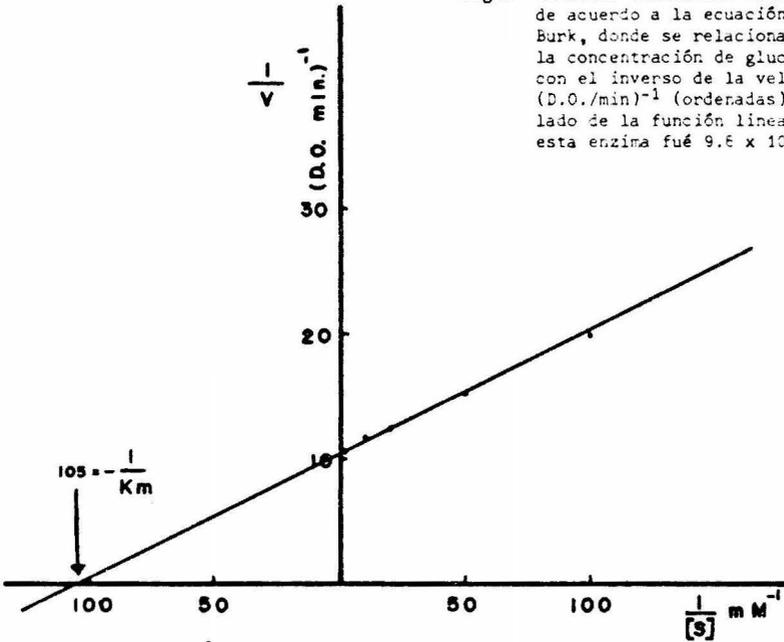


Fig.10 Cinética enzimática obtenida para PC de acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burk, donde se relaciona el inverso de la concentración de fosfoenolpiruvato (abscisas), con el inverso de la velocidad inicial (D.O./min)⁻¹ (ordenadas). El K_m calculado de la función lineal obtenida para esta enzima fué 35 x 10⁻⁶ M.

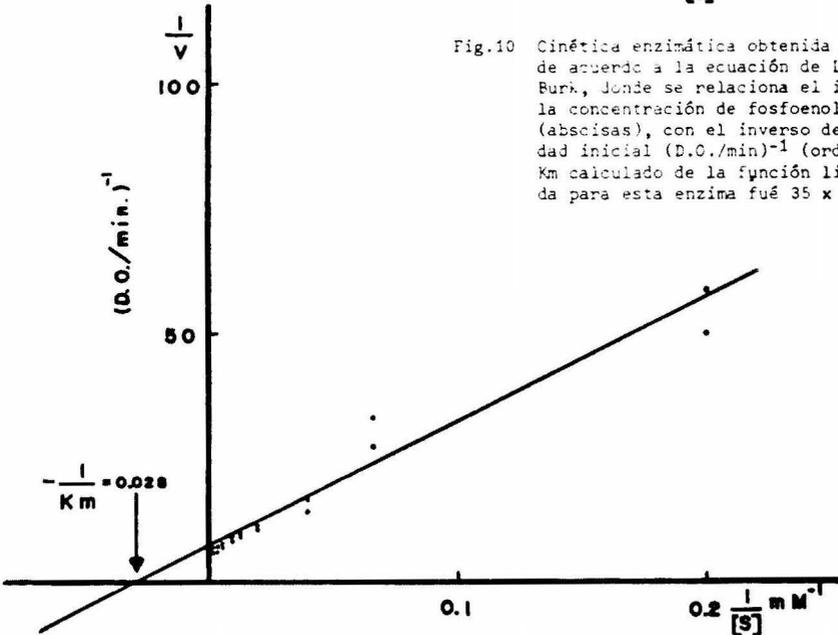
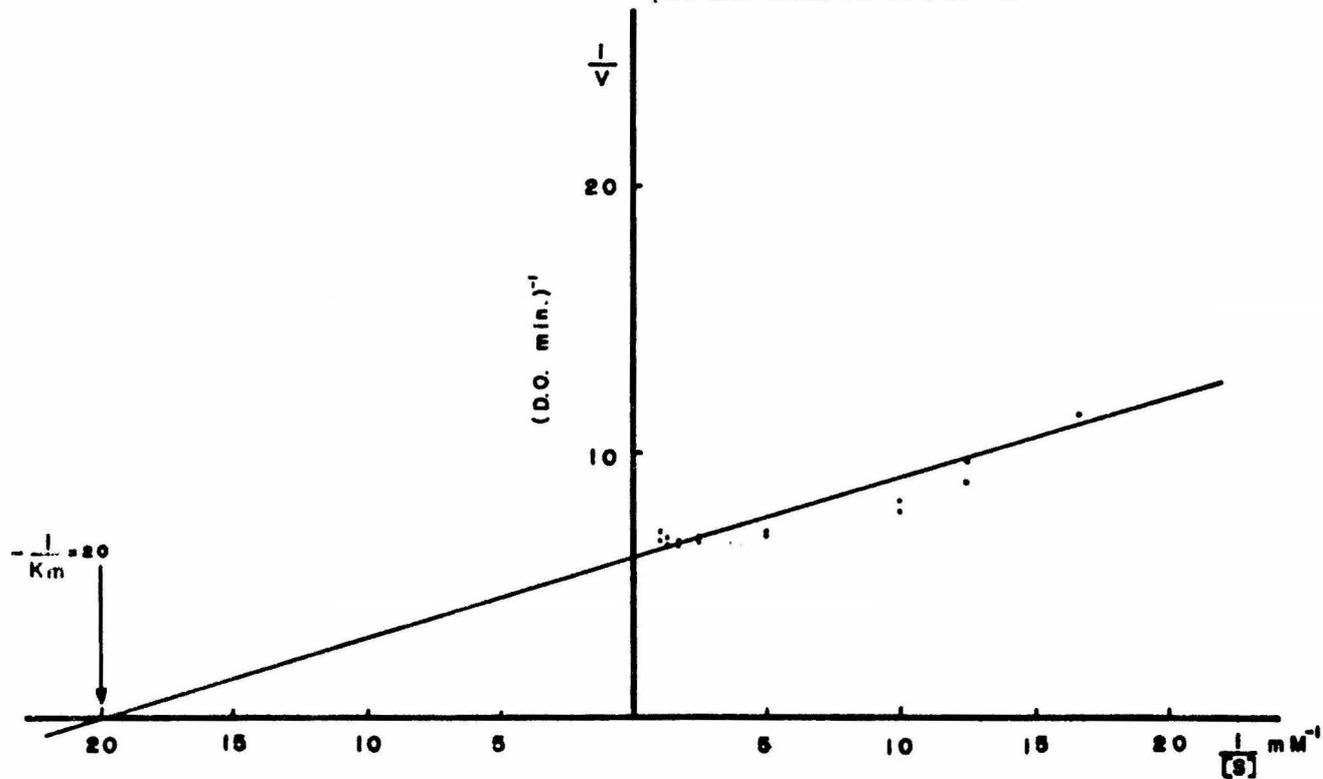


Fig.11

Cinética enzimática obtenida para la FFC de acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burk, donde se relaciona el inverso de la concentración de adenosintrifosfato (abscisas), con el inverso de la velocidad inicial (D.O./min)⁻¹ (ordenadas). El Km calculado de la función lineal obtenida para esta enzima fué 50 x 10⁻⁶ M.



En la figura 12 se muestra la función lineal obtenida por el graficador del aparato al llevarse a cabo las reacciones enzimáticas. De ellas se calculó la velocidad inicial de la reacción (generalmente 0-60 segundos después de iniciada la reacción) de acuerdo al cambio de D.O./minuto (ΔE). Puede observarse que antes de adicionar el iniciador de la reacción (ADP, ATP, etc) el cambio en D.O. es cero, dando como resultado los puntos iniciales de la curva. El cambio en la D.O. se observa inmediatamente después de adicionar el iniciador de la reacción.

Los cálculos necesarios para obtener las actividades enzimáticas expresadas en $\mu\text{moles/mg}$ de proteína/hora fueron realizados de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\frac{\Delta E}{6.22} \times 60 \times \frac{V_t}{A} \times \frac{1}{\text{Prot}} \times D = \text{Actividad específica}$$

donde:

ΔE = cambio de D.O. por minuto, a 340 nm

V_t = volúmen total de la celdilla

A = alícuota de sobrenadante

D = dilución del sobrenadante

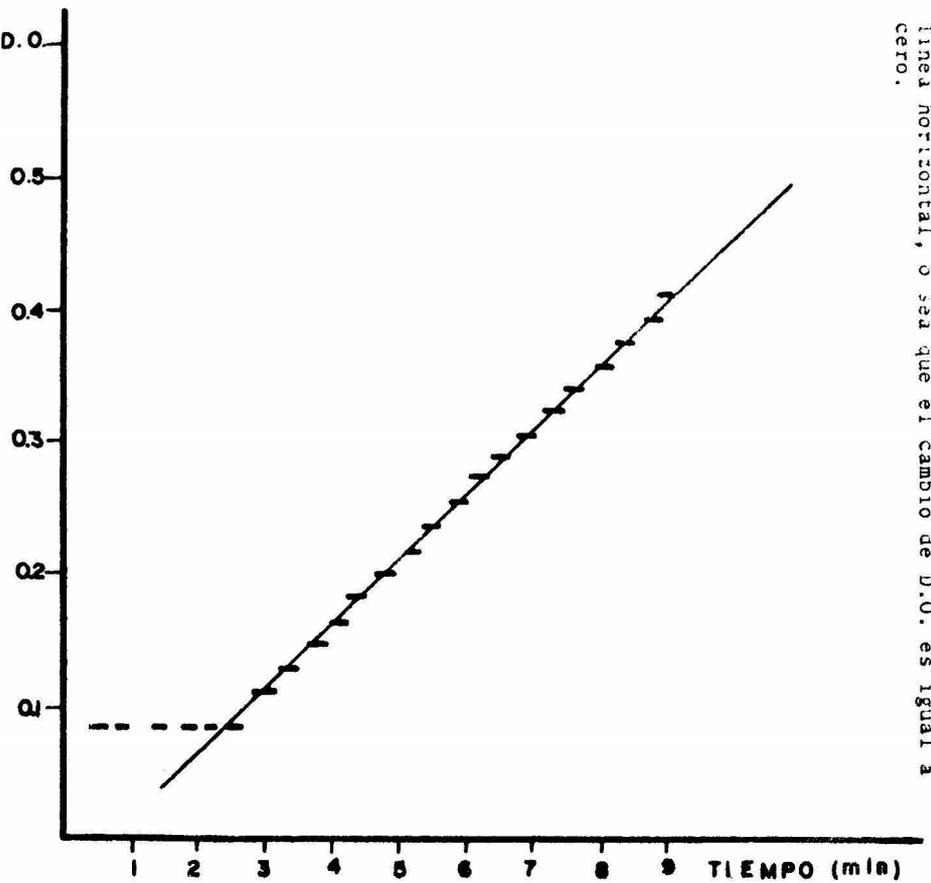
Prot = concentración de proteínas en mg del sobrenadante

6.22 = coeficiente de extinción molar de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y $\text{FADH} + \text{H}^+$ a 340 nm con un paso de luz de 1 cm

60 = número por el que se multiplica para obtener el resultado expresado por hora.

Los resultados de las variaciones obtenidas en las acti-

Fig. 12. Ejemplo de las curvas trazadas por el graficador del aparato a 340 nm. En las ordenadas se presenta la D.O. y en las abscisas en tiempo. Las rayas horizontales son marcadas por el aparato y la línea continua se traza como promedio de todos los puntos, pudiéndose obtener la pendiente de la recta o sea D.O./min. = ΔE . En ausencia del iniciador de la reacción se presenta una línea horizontal, o sea que el cambio de D.O. es igual a cero.



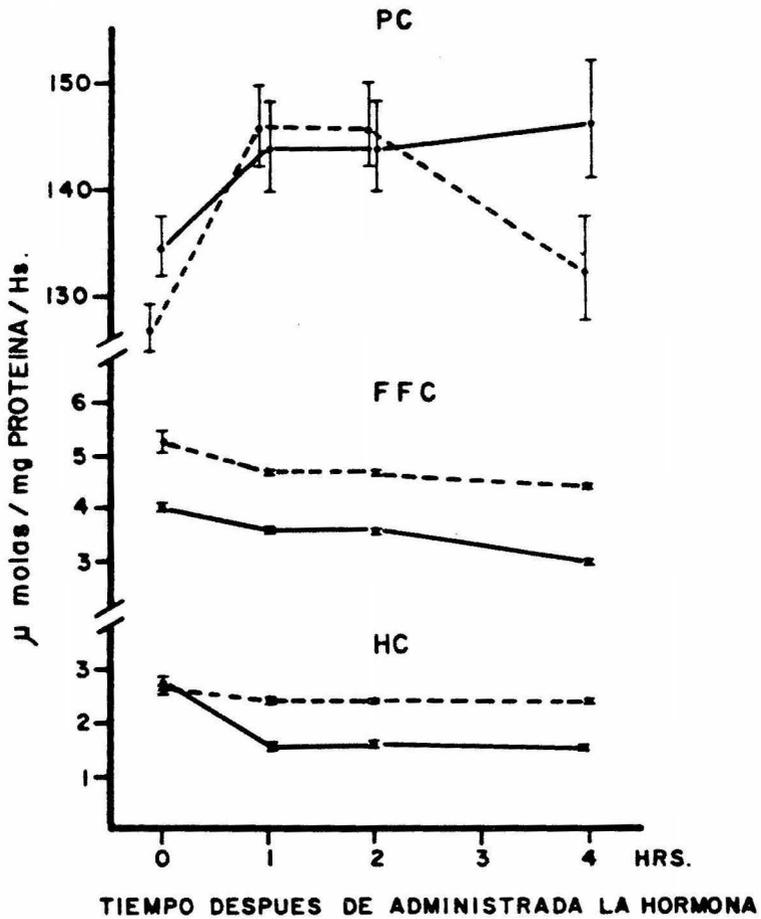
vidades de PC, FFC y HC a las diferentes horas después de administrada la hormona, tanto en testículo como en epidídimo se graficaron en la figura 13. La actividad específica de cada enzima, expresadas en $\mu\text{moles/mg proteína/hora}$, se presentan en las ordenadas y en las abscisas el tiempo en horas después de la administración de la hormona. Cada uno de los puntos en la figura representa el promedio de 4 o 5 casos \pm la desviación estandar, excepto para la piruvatocinasa, donde fué necesario calcular el error estandar (e.s.) por haber presentado una desviación estandar muy grande. Las líneas contínuas representan las actividades enzimáticas de testículo y las líneas punteadas corresponden a las de epidídimo.

Analizando las gráficas obtenidas de las actividades enzimáticas, a primera vista parecen presentarse dos hechos importantes:

- 1o. Que la hexocinasa es la enzima que presenta la más baja actividad, confirmándose el hecho de que es la enzima paso limitante de la glicólisis testicular y epididimaria, y
- 2o. que, cambios estadísticamente significativos se presentan en las actividades enzimáticas de PC, HC y FFC, una hora después de haber sido administrada la hormona.

Haciendo un análisis más detallado e individual de las curvas de cada enzima, se observa que la piruvatocinasa en el testículo presenta una tendencia a aumentar su actividad hasta las 4 horas después de inyectada la hormona, no así en epidídimo donde hay una marcada elevación a la hora y ésta tiende a volver a su valor normal a las 4 horas.

Fig. 13 Actividades enzimáticas de Piruvato cinasa (PC); Fosfofructocinasa (FFC) y Hexocinasa (HC), expresadas en $\mu\text{mol}/\text{mg Proteína}/\text{hora}$ en los diferentes tiempos después de administrada la hormona. Los trazos — corresponden a testículo y los - - - - a epidídimo.



En cuanto a la fosfofructocinasa y la hexocinasa, vemos que el comportamiento de sus actividades, después de administrada la hormona, se ven afectadas en forma similar, presentándose a la hora una disminución estadísticamente significativa, tanto en testículo como en epidídimo, manteniéndose estos valores hasta las 4 horas para hexocinasa ($p < 0.01$), mientras que para fosfofructocinasa ($p < 0.05$) sigue disminuyendo su actividad.

DNA, RNA y proteínas.-

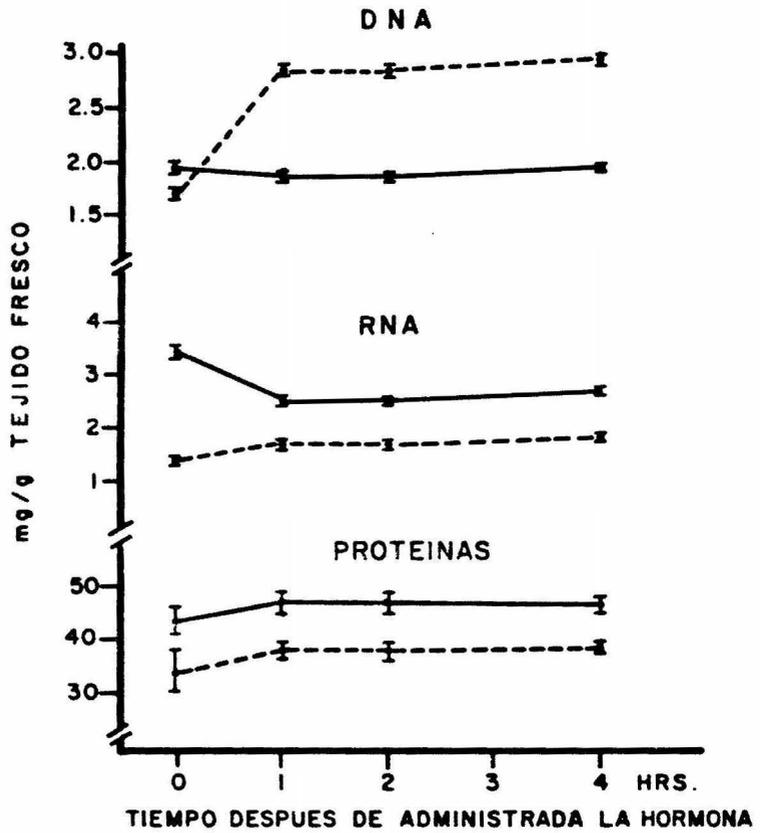
Para comprender en forma más adecuada el comportamiento enzimático, fué necesario determinar algunos parámetros bioquímicos relacionados con las actividades enzimáticas como son el DNA, RNA y proteínas.

Los resultados obtenidos de las concentraciones de DNA, RNA y proteínas de testículo y epidídimo a las diferentes horas después de administrada la hormona luteotrófica, se presentan en la figura 14, expresándose en las ordenadas las concentraciones en mg/gr de tejido fresco y en las abscisas el tiempo en horas considerándose el tiempo cero como control. Cada punto en la gráfica representa el promedio de 4 o 5 casos \pm la desviación estandar. Las líneas continuas corresponden a testículo y las punteadas a epidídimo.

Puede observarse claramente que los cambios significativos en estos parámetros, en la misma forma que las actividades enzimáticas, se presentan a la hora después de haber sido administradas a la hormona.

Analizando en primer término las concentraciones de DNA, en el testículo se presenta una ligera disminución a la hora

Fig. (14). Concentraciones de DNA, RNA y Proteínas, expresadas en mg/g de tejido fresco, a los diferentes tiempos después de administrada la hormona luteotrófica.
 Los trazos ——— corresponden a testículo y los trazos - - - - - a epidídimo.



después de administrada la hormona, volviendo a su concentración original a las 4 horas. Sin embargo el comportamiento del DNA en epidídimo es diferente, observándose una marcada elevación a la hora después de administrada la hormona, manteniéndose esta concentración a las 4 horas.

En cuanto a las variaciones presentadas en las concentraciones de RNA durante el experimento, se observa que en testículo éste presenta una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.01$) permaneciendo esta concentración hasta las 4 horas. En epidídimo la concentración de RNA se vé ligeramente aumentada a la hora después de administrada la hormona, conservándose este valor hasta las 4 horas.

El cambio en la concentración de las proteínas aunque aparentemente presentan una tendencia a aumentar después de una hora, al hacer un análisis estadístico de sus valores, se vió que este incremento no era significativo, por lo que se puede pensar que las proteínas no se ven afectadas por la presencia de la LH. permaneciendo constantes durante el experimento.

Incorporación de precursores marcados.-

La presencia de precursores marcados en cualquiera de las muestras seleccionadas fué detectada por el número de cuentas por minuto (c.p.m.) obtenidas en el contador de centelleo en los canales A y C para C^{14} y B y C para H^3 . De estas lecturas se calcularon las relaciones A/C y B/C para isoleucina- C^{14} y uridina- H^3 respectivamente. Estas relaciones fueron extrapoladas a curvas de eficiencia de conteo obtenidas con soluciones estandar de C^{14} y H^3 , con el fin de calcular el % de eficiencia con el que fueron contadas estas muestras. Este cálculo nos permitió obte-

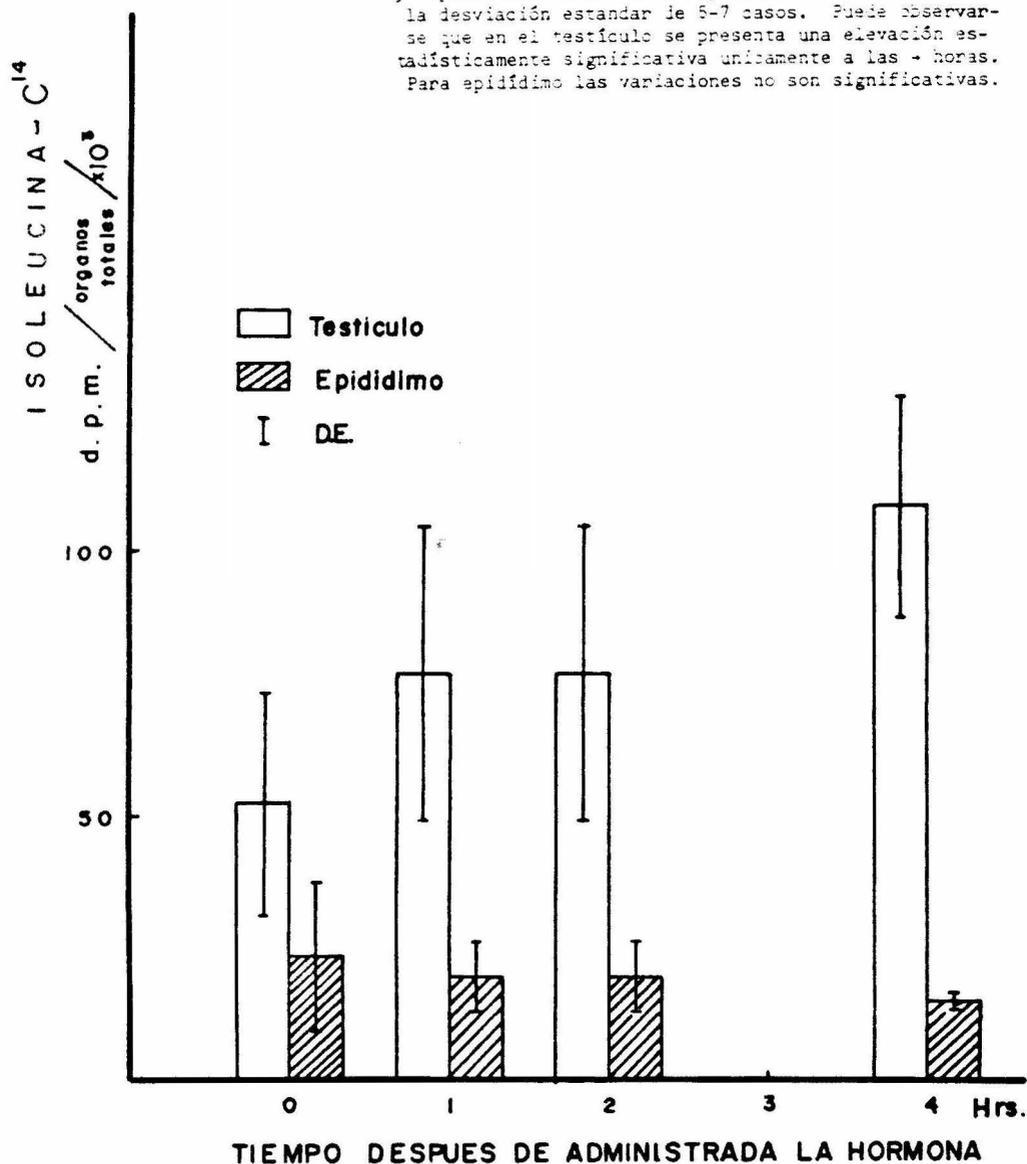
ner, al relacionar a 100% de eficiencia, las desintegraciones por minuto (d.p.m.).

Con el fin de determinar si la administración de los precursores fue la adecuada o no, se determinó la presencia de estos en el homogenizado total de testículo y de epidídimo. Ninguna radiación procedente de uridina- H^3 fué detectada en los homogenizados de testículo y epidídimo ni en el hidrolizado del RNA total aislado, lo que indica que dicho precursor no llegó al testículo. Esto fué debido posiblemente, a que la uridina, siendo un precursor ampliamente utilizado por todo el organismo, pudo haber sido absorbido y metabolizado más rápidamente por otros tejidos, metabólicamente más activos, como por ejemplo el hígado, evitándosele así su llegada al testículo.

Los resultados obtenidos en los homogenizados de testículo y epidídimo para isoleucina- C^{14} , se presentan en la figura 15, graficándose en las ordenadas el promedio \pm la desviación estandar de las d.p.m. por órganos totales y en las abscisas el tiempo en horas después de administrada la hormona. Se puede observar que en el testículo se presenta un aumento en el número de d.p.m. en el transcurso del experimento; sin embargo, este aumento unicamente es estadísticamente significativo a las 4 horas ($p < 0.01$) después de inyectada la hormona. El papel que la hormona desempeña en este incremento, requiere de un estudio mucho más pormenorizado a fin de delucidar el mecanismo por el cual se efectúa éste, o se facilita la permeabilidad o concentración de este sustrato.

Para epidídimo se presenta una disminución progresiva en la cantidad de d.p.m. hasta las 4 horas, pero esta disminución

Fig. 15 Resultados obtenidos al llevar a cabo la detección de isoleucina C^{14} en los homogenizados de testículo y epididimo. Cada barra representa el promedio \pm la desviación estandar de 5-7 casos. Puede observarse que en el testículo se presenta una elevación estadísticamente significativa únicamente a las 4 horas. Para epididimo las variaciones no son significativas.



no es significativa estadísticamente.

En las proteínas aisladas y solubilizadas en NCS no se detectaron radiaciones procedentes de isoleucina-C¹⁴ que nos hablaran de su incorporación a proteínas.

La presencia de isoleucina-C¹⁴ en homogenizado total y la ausencia de ésta en proteínas solubilizadas en NCS, nos han llevado a pensar que el aminoácido llegó al testículo y epidídimo, permaneciendo en la poza de aminoácidos sin haber una incorporación a proteínas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A pesar de la intensa investigación realizada en las últimas décadas, los procesos involucrados en la espermatogénesis y sus mecanismos de regulación permanecen insuficientemente conocidos. Una de las principales dificultades para su investigación radica en la falta de utilización de marcadores que caractericen, rápida, eficaz y sencillamente a los diferentes pasos de la maduración germinal. La espermatogénesis es un proceso largo y elaborado que incluye varias clases de distintas células -- que a su vez pueden ser de distintos tipos -- las cuales coexisten en el testículo de una manera que no es fácil de determinar a partir de cortes histológicos. Si a esto se agrega que la distinción entre unas y otras especies celulares es a veces imposible, se podrá estimar la dificultad de basar en la pura imagen visual, conclusiones sobre la espermatogénesis, y de que sea indispensable el contar con trazadores bioquímicos específicos.

Se ha postulado que la diferenciación celular, en cada segmento dado del epitelio seminífero, se haya controlada por un mecanismo regulador en el cual la actividad secretora de las células de Sertoli desempeñan un papel muy importante (Johnsen, 1964) (34).

Dos tipos de mecanismos de control podrían ser sugeridos:

- a) La producción de hormonas específicas por las células de Sertoli, y
- b) la producción de un mecanismo de retroalimentación intratubular a nivel celular.

El primer mecanismo estaría basado en la observación de que existe una relación muy íntima entre la espermatogénesis y la secreción de gonadotrofinas, habiéndose demostrado que fallas en el proceso de la espermatogénesis se acompañan de cambios hipofisiarios semejantes a los observados post-castración y de aumento en los niveles periféricos de gonadotrofinas.

La hipótesis más adecuada es la de la existencia de una hormona, "la inhibina", propuesta por Johnsen en 1970 (35), en la cual él plantea una inhibición endócrina de la hipófisis, existiendo un mecanismo real de retro-regulación hormonal de manera que durante la espermatogénesis se libera una sustancia que deprime la producción de la hormona folículo estimulante (HFE). Johnsen también propone que el estimulante de la espermatogénesis es la HFE que penetra a los tubulos. Puesto que el inhibidor de la secreción de HFE es probablemente un estrógeno, producido por las células de Leydig, la estimulación previa de estas células por la HL es indispensable. Aisladamente las células de Sertoli tienen una producción mínima del inhibidor de la HFE y requieren del contacto de células germinales maduras, sea exclusivamente a través de modificaciones estructurales, o tal vez por la fagocitosis del llamado cuerpo residual. El factor regulador final sería pues, el número de espermatozoides producidos por unidad de tiempo.

Basados en los resultados obtenidos por la medición histoquímica y con microscopía electrónica de la actividad de enzimas hidrolíticas en el testículo durante la espermatogénesis, Posalaki y Col (1968) (36) postulan la hipótesis de que existe

una interacción estrecha entre las células de Sertoli y las espermátides, lo cual podría reflejar la presencia de un mecanismo de retroregulación in situ, a nivel tubular, que controlara la espermatogénesis.

Debido a la importancia que la glicólisis tiene para el testículo, se ha considerado de particular interés el estudio del comportamiento de las enzimas involucradas en esta vía metabólica. Así Blanco y Zinkham en 1963 y Goldberg en 1963 (37, 38) han demostrado que el testículo presenta una forma de deshidrogenasa láctica (DHL) electroforética y cinéticamente específica, la cual ha sido llamada isoenzima DHL-X. En la rata, que posee dos bandas electroforéticas de la DHL-X, estas isoenzimas aparecen entre los 20 y los 30 días de edad, lo cual corresponde a la aparición de las células de Leydig y a la maduración de los espermatoцитos primarios. Sin embargo su papel fisiológico dentro de la espermatogénesis no se ha podido determinar, debido posiblemente a la posición metabólica terminal del ácido láctico y de la DHL.

Rosado (19) presenta la evidencia de que otras enzimas del esquema glicolítico, tales como la hexocinasa, aldolasa, piruvato-cinasa en el espermatozoide o testículo de varias especies, presentan caracteres cinéticos o movilidad electroforética distintos de los señalados para las mismas enzimas en otros tejidos, lo cual podría considerarse como demostraciones de la existencia de múltiples isoenzimas específicas de los espermatozoides y testículo en la vía de Embden-Meyerhoff.

Siendo la hexocinasa la primera enzima de la vía glicolítica, se le ha considerado de particular interés por ser la enzima paso-limitante de la glicólisis testicular y epididimaria, hecho

que se confirma al observar los resultados de las actividades enzimáticas que hemos obtenido (Fig.13), donde la hexocinasa presenta la más baja actividad. Si además se toma en cuenta el requerimiento indispensable de glucosa para la síntesis de proteínas de las células espermatogénicas más avanzadas que el espermatocito primario (Davis y Firlit, 1963) (39) se comprenderá la importancia del hallazgo de la isoenzima de la hexocinasa específica de testículo (ST) (Katzen, 1967) (18), (Rosado, 1969) (40) que ha sido también demostrada en el espermatozoide humano (Rosado, 1970) (19) y de la rata (Sosa y Col, 1972) (21).

La importancia y la trascendencia de esta isoenzima en los procesos de diferenciación y adaptación metabólica originaron estudios de su ritmo circadiano y sobre la correlación entre su aparición o desaparición y la presencia de estirpes celulares específicas en el testículo.

En el testículo en desarrollo, la presencia de la hexocinasa ST empieza a ser observada alrededor de los 20 días de edad, y coincide con la aparición de espermatocitos de segundo orden. Su actividad a partir de este momento, se vé aumentada conforme el número de células espermatogénicas de etapas más avanzadas es incrementado (21).

En el testículo criptorquídico y en el tratado con estradiol, la misma reciprocidad puede ser establecida al correlacionar los patrones electroforéticos con las imágenes histológicas obtenidas. Pudo ser observado que su desaparición concuerda con la ausencia de espermatocitos de segundo orden a pesar de que células germinales inferiores a esta etapa aún están presentes (Sosa y Col 1971) (41).

Los datos anteriores han permitido postular (21) que la presencia de la isoenzima ST de la hexocinasa, podría explicar el porqué las células germinales más avanzadas que el espermatocito primario dependen de la presencia de la glucosa para realizar adecuadamente su metabolismo energético y particularmente la síntesis de proteínas (39).

Es interesante señalar que un cambio análogo al encontrado por Sosa y Col es observado en la actividad de la enzima 17-hidroxisteroide deshidrogenasa (Inano y Tamaoki, 1966; Inano y Tamaoki, 1967) (42, 43), la enzima que cataliza la síntesis de testosterona a partir de androstenediona en el tejido intersticial del testículo de la rata. Esta enzima aparece entre los días 20-30 de edad de la rata, aumenta proporcionalmente su actividad hasta el día 40 y posteriormente aumenta rápidamente hasta el día 60. La elevación de esta actividad, junto a la progresiva disminución de las actividades enzimáticas relacionadas con el catabolismo de la testosterona, permiten en la rata en desarrollo una eficiente síntesis de testosterona.

Así, es posible especular que la síntesis eficiente de testosterona puede ser correlacionada con la inducción de la actividad de la hexocinasa específica de testículo.

Sosa y Col, 1972 han reportado que la actividad de la hexocinasa presenta un ritmo circadiano perfectamente definido, con picos máximos a las 10 y 18 horas, que al ser correlacionado con las variaciones reportadas en la liberación de gonadotrofinas, dieron origen a la elaboración de este trabajo, sugiriéndose la participación de la HL en este ritmo metabólico a través de la estimulación de la síntesis de RNA y proteínas; a través de su in-

fluencia sobre la eliminación de los espermatozoides de las células de Sertoli, llamada espermiación (Vitale-Calpe y Burgos) (44, 45), puesto que una acción directa de esta hormona sobre la actividad enzimática ha sido excluida (Brown y Col, 1966) (47); o también por una influencia indirecta mediante la síntesis de testosterona.

Al tratar de elucidar en este trabajo la participación de la hormona luteotrófica en el metabolismo testicular especialmente sobre la vía glicolítica, se observó que el comportamiento de la piruvato cinasa, después de administrada la hormona, sugiere la inducción del fenómeno de espermiación producido por la presencia de la HL, en el cual se efectúa el paso de espermatozoides a epidídimo debido a la contracción de la cápsula testicular, provocando que la actividad enzimática estuviera más elevada en epidídimo que en testículo. Sin embargo esta hipótesis no correlacionó con el comportamiento de las actividades enzimáticas de fosfofructocinasa y hexocinasa, las cuales presentaron una disminución tanto en testículo como en epidídimo una hora después de haber sido administrada la hormona, manteniéndose en ese valor hasta 4 horas después de la aplicación de la gonadotrofina.

Si la presencia de la HL desencadenó la espermiación, el estudio del contenido de DNA y RNA en testículo y en epidídimo durante el experimento deben reflejar el paso de células de un órgano al otro, además de ciertas características que nos ayuden a confirmar si este hecho ha sido realmente efectuado.

Analizando los resultados obtenidos en la concentración de DNA y RNA después de administrada la hormona, vemos que efectivamente concuerdan con un fenómeno de espermiación, donde existe una

marcada elevación del contenido de DNA en epidídimo y una ligera disminución en testículo a la hora después de inyectada la HL. En forma similar el RNA presentó el mismo comportamiento habiendo una disminución en el testículo a la hora y un ligero aumento en epidídimo.

Dewsbury (1970) (46) ha mostrado que la copulación se lleva a cabo tan pronto como obscurece. Es sabido que la copulación produce una liberación de HL y que los niveles periféricos de esta hormona son más altos durante los períodos de copulación (Taleisnik, Caligaris y Astrada. 1966) (48). La disminución de la actividad de la hexocinasa, la cual ocurre durante el período de obscuridad (Sosa y Col, 1972) (22), puede ser debido a un fenómeno de espermiación inducido por los altos niveles de HL (Vitale-Calpe, 1970) (44, 45) más que una acción inhibitoria de esta hormona en la actividad de hexocinasa.

El hecho de haber realizado en este trabajo la determinación de actividades enzimáticas en presencia directa de la HL sin observarse modificación alguna en la actividad, descarta la posibilidad de una acción directa sobre la actividad enzimática, confirmando la idea de Brown y Col, 1966 (47).

Sin embargo, durante nuestro experimento observamos que las actividades enzimáticas de fosfofructocinasa y hexocinasa se ven disminuídas tanto en testículo como en epidídimo, una hora después de administrada la hormona.

La marcada disminución en el contenido de RNA testicular, la cual es mayor que el aumento en epidídimo (Fig.14) nos ha hecho pensar en un posible efecto inhibitorio específico, directo o indirecto, de la HL a nivel de síntesis de RNA, el cual podría afectar

específicamente las actividades enzimáticas de FFC y HC, pudiéndose explicar así la disminución de su actividad durante el experimento tanto en testículo como en epidídimo.

El no haber encontrado precursor radioactivo incorporado a proteína, a pesar de haberse detectado un incremento estadísticamente significativo en el contenido de material radioactivo en testículo (Fig.15), explica en parte el comportamiento de las proteínas durante el experimento, las cuales permanecen prácticamente constantes. Esta evidencia nos ha hecho pensar que efectivamente se trata de un fenómeno inhibitorio, posiblemente a nivel de RNA.

Se puede concluir que las variaciones observadas en los parámetros observados se deben a un fenómeno de espermiación por influencia directa de la HL o indirecta de la misma, posiblemente vía síntesis de testosterona, manifestándose mediante una inhibición a nivel de síntesis de RNA y por lo tanto de proteínas tales como hexocinasa, fosfofructocinasa y otras no medidas.

Todas las enzimas específicas de testículo, cuya información genética parece activarse en momentos claves de la diferenciación espermatogénica, pueden ser utilizadas como marcadores bioquímicos en el estudio del desarrollo de la espermatogénesis, así para precisar el punto en que este evento se detiene en los procesos patológicos o bajo tratamientos quimioterápicos o medicamentos específicos; así mismo ofrecen un sistema invariable para el estudio de las transiciones hormono-dependientes de la espermatogénesis de sus mecanismos específicos de acción.

BIBLIOGRAFIA

1. The Testis.
Johnson, A.D., Gomes, W.R., y Vandermark, N.L.
Vols. I, II y III.
Academic Press, New York and London (1970).
2. Physiology of Reproduction
William D. Odell, M.D. Ph. D. and Dean L. Moyer, M.D.
The C. V. Mosby Company
Saint Louis (1971).
3. Biological Rhythms in Human and Animal Physiology
Gay Gaer Luce
Capítulo X, pag.129
Dover Publications, Inc. New York (1971)
4. The Endocrine Function of the Human Testis
James, U.H.T., Serio, M., Martini, L.
Vol. I (1973)
Academic Press, New York and London
5. Reproductive Biology
Howard Balin, Stanley Glasser
Excerpta Medica-Amsterdam (1972)
6. Clermont, Y.
The Cycle of the Seminiferous epithelium in man
Amer. J. Anat. 112, 35 (1963)
7. Perey, B., Clermont, Y., y Leblond, C.P.
The Wave of the seminiferous epithelium in the rat
Amer. J. Anat. 108: 47 (1961)
8. Woods, Marion, C., y Simpson, Miriam E.
Pituitary Control of the Testis of the Hypophysectomized rat

- Endocrinology 69, 91-125 (1961)
9. Means, A.R. y Hall, P.F.
Endocrinology 82, 597 (1968)
 10. Means, A.R., y Hall, P.F.
Protein Biosynthesis in the Testis: II. Role of Adenosine Triphosphate (ATP) in Stimulation by Glucose
Endocrinology 83, No.1, July,(1968)
 11. Sharma, C., y Weinhouse, S.
P.S.E.B.M. 110, 522 (1962)
 12. Viñuela, E., Salas, M., y Sols, A.
J. Biol. Chem. 238, 1175 (1963)
 13. Sharma, C., Manjeshwar, R., y Weinhouse, S.
Advances in Enzyme Regulation 2, 189 (1963)
 14. Gonzales, C., Ureta, T., Sanchez, R., y Neimeyer, H.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 347 (1964)
 15. Katzen, H.M., Soderman, D.D., y Nitowsky, H.M.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 377 (1965)
 16. Katzen, H.M., y Schimke, R.T.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 1218 (1965)
 17. Grossbard, L., y Schimke, R.T.
J. Biol. Chem. 241,(15) 3546 (1966)
 18. Katzen, H.M.
Advances in Enzyme Regulation 5, 335 (1967)
 19. Rosado, A.
Tesis para obtener título de Maestro en Ciencias Médicas
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México
México, D. F. (1970)
 20. Katzen, M.H., Soderman, D.D., y Wiley, Ch.E. (1970)

Multiple Forms of Hexokinase

- J. Biol. Chem. 245, 4081
21. Sosa, A., Altamirano, E. Hernández, P., y Rosado, A.
Developmental Pattern of rat Testis Hexokinase
Life Sciences Vol.II, Part. II, pp.499-510 (1972)
 22. Sosa, A., Altamirano, E. Hernández, P., y Rosado, A.
Subcellular Distribution and Circadian Rhythms of some
Glycolytic enzymes in the rat testis.
J. Reprod. Fert. 28, 447-450 (1972)
 23. Di Pietro, D.L., y Weinhouse, S. (1960)
Hepatic glucokinase in the fed, fasted and alloxen
diabetic rat
J. Biol. Chem. 235, 2542
 24. Grossbard, L., y Schimke, R.T.
Multiple hexokinase of rat tissues
J. Biol. Chem. 241, 3546 (1966)
 25. Methods in Enzymology
Vol.III, p.451
 26. Bucher, Th., y Pfleiderer, G. (1955)
Pyruvate kinase from muscle
Methods of Enzymology, Vol.I p.435
Eds. S.P. Colowick and N.O. Kaplan
 27. Kemp, R.G.
Rabbit Liver Phosphofructokinase. Comparison of some
properties with those of Muscle phosphofructokinase
J. Biol. Chem 246, (1), 245-252 (1971)
 28. Schmidt, G., y Tannhauser, S.J.
A Method for the Determination of DNA and RNA and

- phosphoprotein in animal tissue
J. Biol. Chemistry 161, 83 (1945)
29. Schneider, W.C.
Extraction and estimation of deoxipentose nucleic
acid of pentose nucleic acid
J. Biol. Chemistry 161, 293 (1945)
30. Giles, K.W., y Myers, A.
An Improved DPA method for the estimation of DNA
Nature 206, 93 (1965)
31. Mejbaum, W.Z.
Physiol. Chem. 258, 117 (1939).
32. Gornall, A.G. Bardaviell, Ch.J., y David, M.M.
Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction
J. Biol. Chem 177, 751-776 (1949)
33. Vernon L. Gay, y Nancy W. Dever
Effects of Testosterone Propionate and Estradiol Benzoate
Alone or in combination on serum LH and FSH in Orchidectomized
rats
Endocrinology 89, 161 (1971)
34. Johnsen, S.G.
Acta Endocr. 45 suppl. 90, 99 (1964)
35. Johnsen, S.G. In "The Human Testis", (1970)
ed. Rosemberg, E., y Paulsen, C.A.
Plenuns Press, New York, p.231
36. Posalaki, Z., Szabó, D., Bácsi, E., y Okros, I.
J. Histochem. Cytochem. 16, 249 (1968)
37. Blanco, A., y Zinkham, W.H.
Sci. 139, 601 (1963)

38. Goldberg, E.
Sci. 139, 602 (1963)
39. Davis, J.R., y Firlit, C.F.
Amer. J. Physiol. 209, 425 (1965)
40. Rosado, A., Morris, H.P., y Weinhouse, S.
Cancer Res. 29, 1673 (1969)
41. Sosa, A., Altamirano, E., Mercado, E., Reyes, A., y Rosado, A.
Observaciones no publicadas (1971)
42. Inano, H., y Tamaoki, B.
Endocrinol. 79, 579 (1966)
43. Inano, H., Hori, Y., y Tamaoki, B.
Ciba Found. Colloq. Endocrinol. 16, 105 (1967)
44. Vitale-Calpe, R., y Burgos, M.H.
The Mechanism of Spermiation in the Hamster.I.
Ultrastructure of Spontaneous Spermiation
J. Ultrastructure Research 31, 381-393 (1970)
45. Vitale-Calpe, R., y Burgos, M.H.
The Mechanism of Spermiation in the Hamster.II. The
Ultrastructural effects of coitus and of LH administration
J. Ultrastructure Research 31, 394-406 (1970)
46. Dewsbury, D.A. (1970)
Copulatory behaviour
Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory animals
Vol. I, p.123
Ed. E.S.E. Hafez Lea y Febiger, Philadelphia
47. Brown, J., McLean, P., y Greenbaum, A.L.
Biochem. J. 101, 197 (1966)

48. Taleisnik, S., Caligaris, L., y Astrada, J.J.
Effects of copulation on the release of pituitary
gonadotrophins in male and female rats.
Endocrinology 79, 125 (1966)
49. Domingo V. Ramírez y S.M. McCann.
Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH)
Secretion in Inmature and Adult Rats.
Endocrinology 72, 452-464 (1963)
50. Renwick, A.G.C.
Metabolism and Function of Ovarian and Testicular Hormones
J. Reprod. Fert. Suppl. 12 (1970) 55-64
51. Yves Clermont
Kinetics of Spermatogenesis in Mammals. Seminiferous
Epithelium cycle and Spermatogonial Renewal
Physiological Reviews
Vol.52, No.1, january (1972)