

Estudios sobre la Síntesis de Proteínas y efecto de Hormonas en Oocitos de *Xenopus Laevis*



Rodrigo Bravo Mate de Luna

1 9 7 7

Estudios sobre la Síntesis de Proteínas y efecto de Hormonas en Oocitos de *Xenopus Laevis*

Rodrigo Bravo Mate de Luna

1 9 7 7

VCH-FC
DOC-B
B795

ESTUDIOS SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS Y EFECTO DE
HORMONAS EN OOCITOS DE XENODUS LAEVIS

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la
Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias
con mención en Biología

por

RODRIGO BRAVO MATE DE LUNA

Septiembre, 1977

Profesor patrocinante
Dr. Jorge F. Allende R.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

RODRIGO BRAVO MATE DE LUNA

ha sido aprobada por el Comité Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Septiembre de 1977.

Dr. Jorge Allende
Patrocinante de Tesis

Jorge E. Allende

Dr. Tito Ureta
Comisión Informante de Tesis

Tito Ureta

Dr. Arturo Yudelevich
Comisión Informante de Tesis

Arturo Yudelevich

Dra. Elisa Marusic
Comisión Informante de Tesis

Elisa Marusic

Dr. Luis Izquierdo
Comisión Informante de Tesis

Luis Izquierdo

Dr. Marco Ferretta
Comisión Informante de Tesis

Marco Ferretta

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en forma especial al Dr. Jorge E. Allende por haberme brindado la excelente oportunidad de realizar este trabajo bajo su eficaz y diligente dirección.

A Catherine Allende, con quién tuve el agrado de trabajar en repetidas ocasiones, mi gratitud por su constante apoyo moral y profesional, lo que ayudó en gran parte a la exitosa realización de este trabajo.

Deseo además expresar mi reconocimiento a todas aquellas personas que contribuyeron a la materialización de esta tesis. A riesgo de cometer alguna omisión involuntaria, quiero testimoniar en forma explícita mis agradecimientos:

A Adela Farradó, por su generoso aporte en la revisión inicial de esta tesis;

A Carmen González, por su gran dedicación en la revisión final de este escrito;

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo,

A Marta Arteaga, por su colaboración en la expedita transcripción del texto,

A José Mondaca, por su dedicación en la confección de las figuras.

A mis padres

RESUMEN

Se han estudiado las características de la síntesis de proteínas en oocitos de Xenopus laevis y Caudiverbera caudiverbera midiendo la incorporación de aminoácido radiactivo externo al material precipitable con ácido.

Se han observado grandes diferencias de incorporación a proteínas entre los distintos aminoácidos usados. Por ejemplo, se encontró que ácido aspártico o glutámico radiactivo se incorporaban levemente a concentraciones de 0,1 mM, mientras que los otros aminoácidos son rápidamente incorporados aún a concentraciones de 0,01 mM en el medio extracelular. Estas variaciones se deben principalmente a diferencias entre las constantes de transporte (K_m) y entre el tamaño de los "pools" de aminoácidos libres en el oocito, los cuales son muy grandes para los aminoácidos acídicos.

Se ha realizado también un estudio detallado sobre el sistema transportador de aminoácidos en oocitos de Xenopus laevis. Estas células son capaces de concentrar 2-5 veces la mayoría de los aminoácidos estudiados respecto al medio extracelular. Las velocidades iniciales de entrada para los distintos aminoácidos estudiados varía con la concentración usada de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten. Las constantes de transporte (K_m) encontradas varían entre 0,1 - 2,5 mM, dependiendo del aminoácido.

La captación de aminoácido por éstas células parece ser específica para grupos de aminoácidos análogos, como lo han demostrado los experimentos de competición. Estos grupos serían el de los aminoácidos aromáticos, alifáticos, ácidos y básicos.

Además se ha demostrado mediante el análisis de los "pooles" de aminoácido que éstas células son capaces de concentrarlos de la sangre de la hembra del Xenopus laevis como del medio de incubación.

La síntesis de proteínas de los oocitos de ambos anfibios dependen de la presencia del ión Mg^{++} , obteniéndose el máximo de incorporación a concentraciones de 1 mM de este ión.

Inhibidores de la síntesis de proteínas como puromicina, ácido fusídico y cicloheximida inhiben eficientemente la incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas en los dos tipos de oocitos, a concentraciones de 10^{-4} a 10^{-5} M.

También se ha estudiado el efecto de la temperatura, y se encontró que la temperatura óptima de incubación para los oocitos de ambas especies es de 20 a 24°.

Ambos tipos de oocitos difieren respecto a la sensibilidad al pH del medio de incubación ya que en los oocitos de Xenopus laevis la síntesis de proteínas es el doble a pH 8,5 que a pH 7,0 mientras que en los oocitos de Caudiverbera caudiverbera no se detecta diferencia a estos pH.

El otro tipo de estudios tiene que ver con los efectos hormonales sobre los oocitos de Xenopus laevis.

Se ha realizado un estudio de las condiciones que afectan la maduración de los oocitos inducida por diferentes hormonas. Las observaciones demuestran que existe una clara dependencia de temperatura y pH para inducir la maduración por gonadotropina coriónica humana, progesterona y testosterona.

De acuerdo con una serie de observaciones el cAMP estaría involucrado en el proceso de maduración. Los niveles de cAMP decrecen considerablemente una hora después de exponer los oocitos a progesterona $10^{-7}M$, recobrando los niveles normales después de 5 horas de la acción hormonal. Un resultado muy similar se ha encontrado con el ión lantano, que ha sido descrito como agente inductor de la maduración. En cambio la gonadotropina coriónica humana que también es capaz de producir la maduración en estas células, aumenta los niveles de cAMP en un 100 % al cabo de 1-2 horas después de ser agregada al medio, recuperando los niveles normales de nucleótido cíclico al cabo de 3 horas.

El otro tipo de observaciones que relaciona al cAMP con la maduración, es el hecho que teofilina $10^{-3}M$ y papaverina $10^{-4}M$, ambos inhibidores de la fosfodiesterasa de cAMP, sean capaces de bloquear la maduración inducida por gonadotropina coriónica humana o progesterona. La acción de estos

inhibidores, sin embargo, podría estar mediada por la síntesis de proteínas, ya que se ha observado que ambos compuestos, a las concentraciones que impiden la maduración, inhiben la síntesis de proteínas de estas células entre un 50-60 %.

Existe una complicación adicional por el hecho que altas concentraciones de ión Ca^{++} (5 mM) revierten el efecto de teofilina sobre la maduración y la síntesis de proteínas. Además se ha encontrado también que tanto gonadotropina coriónica humana como progesterona estimulan la entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ de los oocitos, y que este estímulo es impedido en la presencia de teofilina o papaverina.

Por último, se ha puesto en evidencia que la progesterona produce un estímulo en la fosforilación de proteínas nucleares y totales del oocito durante las primeras horas de su acción.

Se presentan además ciertas evidencias que progesterona y gonadotropina coriónica humana estimulan la síntesis de proteínas, pero que este estímulo es preferentemente de tipo cuantitativo y no cualitativo.

SUMMARY

Certain aspects of the mechanism of protein synthesis have been studied in isolated amphibian oocytes obtained from Xenopus laevis, the African clawed toad and Caudiverbera caudiverbera, a large Chilean frog. The principle method used was the incorporation of externally added radioactive amino acids into acid precipitable material.

Large differences were observed for the incorporation of the different amino acids tested into protein. For example, radioactive glutamic and aspartic acid are incorporated to a low degree at 0,1 mM whereas other amino acids such as threonine and phenylalanine are readily incorporated from the external medium even at 0.01 mM.

It was shown that these differences are a result of differences in the transport constants (K_T) and the size of the free amino acid pools in the oocyte. The pool size of the acidic amino acids is high.

The amino acid transport system in Xenopus laevis has been studied further. These oocytes are capable of concentrating two to five fold most of the amino acids present in the external medium. The initial rates of uptake of the different amino acids vary in proportion to the concentration used in accordance with Michaelis-Menten

kinetics. The transport (or uptake) constants (K_T) observed varied between 0.1 and 2.5 mM.

Competition experiments have shown that the uptake of amino acids in these cells is very specific for groups of amino acids with analogous structures. Four type-groups of behaviour were observed: aromatic, aliphatic, acidic and basic.

Measurement of the amino acid pool size showed that these cells are capable of concentrating amino acids from the blood supply as well as from the incubation medium.

Protein synthesis in oocytes obtained from both amphibians is dependent on the presence of magnesium ion, 1 mM being the concentration for maximum activity.

Puromycin, fusidic acid and cycloheximide effectively inhibit protein synthesis in both amphibians at 10^{-4} to 10^{-5} M. The optimum temperature in both systems is 20 to 24°. A difference in pH maxima for incorporation of amino acids into proteins was observed with the two types of oocytes. Using Xenopus laevis oocytes the incorporation at pH 8.5 is twice that measured at pH 7.0 while with Caudiverbera caudiverbera no difference in incorporation is seen in this pH range.

The effect of hormones on Xenopus laevis oocytes was also studied. The conditions which affect the maturation of oocytes were observed using different hormones.

The results show a clear dependence on temperature and pH with the hormones progesterone, testosterone and human gonadotropin hormone (hCG).

The role of cAMP in the maturation process was studied. The levels of cAMP decrease considerably after 1 hour after exposure of the oocytes to progesterone at 10^{-7} M. The levels return to normal after 5 hours of hormone action. A similar result was found with lanthanum ion which has been reported to be capable of inducing oocyte maturation. On the other hand, hCG, which also induces oocyte maturation, causes an increase in cAMP level of 100 % in 1 to 2 hours after its addition to the medium and again there is a return to normal cAMP levels after the third hour.

The relation between cAMP and the process of maturation is supported by the fact that theophylline at 10^{-3} M and papaverine at 10^{-4} M, both inhibitors of cAMP phosphodiesterase, are capable of blocking the induction of maturation using hCG or progesterone. The action of these inhibitors, however, could be mediated through the synthesis of proteins since it has been shown that both compounds, at the levels that they inhibit maturation, inhibit oocyte protein synthesis by 50 to 60 %.

There is an additional factor which enters into consideration. That is, high concentrations of calcium

ion (5 mM) reverse the effects of theophylline on both maturation and protein synthesis. The hormones hCG and progesterone stimulate the uptake of radioactive Ca^{++} ($^{45}\text{Ca}^{++}$) by the oocytes and the stimulus is not seen in the presence of theophylline and papaverine.

Finally it has been observed that progesterone produces a stimulation of phosphorylation of total and nuclear proteins of the oocyte during the first hours of exposure.

Evidence is also presented that hCG and progesterone stimulate protein synthesis but that this stimulation is of a quantitative nature rather than qualitative.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	vii
ABREVIATURAS	xv
LISTA DE TABLAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
INTRODUCCION	
I. Ventajas del sistema de oocitos de anfibio	1
II. Oocitos de anfibio como sistema traductor de RNA mensajeros microinyectados y medio de estudio del control de la traducción ...	6
III. Microinyección de núcleos a oocitos de anfibio como sistema para el estudio de control transcripcional	12
IV. Maduración de oocitos <u>in vitro</u>	17
Estudios efectuados en esta tesis	34
METODOS	
Obtención de oocitos	36
Análisis de incorporación de aminoácidos radiactivos a proteínas	37
Análisis de entrada de aminoácidos radiactivos al oocito	38
Obtención de núcleos o vesículas germinales ...	39
Detección de maduración	39
Separación mediante capa fina de aminoácidos ..	44
Determinación de la actividad fosfodiesterásica <u>in vitro</u>	45

Análisis de distribución intracelular de fosfodiesterasa	45
Análisis cromatográfico de fosfodiesterasas	46
Determinación de cAMP	47
Análisis de proteínas fosforiladas	48
Electroforesis en geles de poliacrilamida ..	49
Fluorografía	50
Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida	51
 FUENTE DE LOS MATERIALES	 54
RESULTADOS	
Capítulo Primero	
Condiciones que afectan la síntesis de proteínas en oocitos de anfibio	
A. Concentración externa de aminoácidos ...	57
B. Influencia de temperatura, pH y concentración de ión magnesio sobre la síntesis proteica y la captación de aminoácidos	65
C. Estabilidad de las células y degradación de las proteínas sintetizadas por el oocito	74
D. Entrada de aminoácidos y proteínas recién sintetizadas a la vesícula germinal	83
E. Entrada de diferentes aminoácidos en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	89
F. Influencia de la concentración de aminoácido en la entrada de aminoácido en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	94
G. Especificidad en la captación de aminoácidos	101

H. Pooles de aminoácidos en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	109
---	-----

Capítulo Segundo

Condiciones que afectan la maduración
meiótica en oocitos

A. Efecto de la temperatura	114
B. Influencia de pH	117
C. Estudio comparativo de la velocidad de maduración provocada por diferentes hormonas	120
D. Efecto de diferentes inhibidores sobre maduración de oocitos	124
E. Efecto de Papaverina y Teofilina sobre la síntesis de proteínas	143

Niveles de cAMP y maduración en oocitos	150
---	-----

Actividad fosfodiesterásica en oocitos durante la maduración	159
---	-----

A. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad fosfodiesterásica de oocitos	162
B. Influencia de la temperatura	165
C. Distribución de la actividad fosfodiest- terásica	
D. Especificidad de ambas fosfodiesterasas	170
E. Estudio cinético de la fosfodiesterasa de cAMP	173
F. Fraccionamiento en DEAF-celulosa de la actividad fosfodiesterásica de cAMP	176
G. La actividad fosfodiesterásica de cAMP en oocitos tratados con progesterona	181

Fosforilación de proteínas en oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	188
A. Efecto de progesterona sobre la fosforilación de proteínas en oocitos de <u>X. laevis</u>	202
Efecto de hormonas sobre síntesis de proteínas en oocitos de <u>X. laevis</u>	207
DISCUSION	227
BIBLIOGRAFIA	252

ABREVIATURAS

Bisacrilamida	N, N metilén bisacrilamida
Ci	Curie
DEAE	Dietyl amino etil
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Acido etilén diamino tetra acético
\underline{g}	Campo gravitacional (N° de veces la gravedad en el centro del tubo)
hCG	Gonadotropina coriónica humana
Hepes	Acido-N-2-hidroxietyl-piperazina N'-2 etano sulfónico
PEI	Polietylenimida
PPO	2,5 -difeniloxazol
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	Tetrametil etilén diamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
Tabla I	Incorporación de aminoácidos a proteína en oocitos de <u>X. laevis</u> y <u>C. caudiverbera</u>	63
Tabla II	Entrada de diferentes aminoácidos a oocitos de <u>X. laevis</u>	90
Tabla III	Valores de parámetros cinéticos de entrada para diferentes aminoácidos .	100
Tabla IV	Aminoácido libre en oocitos y sangre de <u>X. laevis</u>	110
Tabla V	Reversibilidad del efecto de distintos inhibidores de la maduración de oocitos de <u>X. laevis</u>	131
Tabla VI	Efecto de hormonas e inhibidores sobre permeabilidad del ión calcio en oocitos de <u>X. laevis</u>	133
Tabla VII	Efecto de teofilina y papaverina sobre la síntesis de proteínas en oocitos de <u>X. laevis</u>	144
Tabla VIII	Efecto de diversos compuestos sobre actividad fosfodiesterásica de cAMP de oocitos de <u>X. laevis</u>	163
Tabla IX	Efecto de diversos compuestos sobre la actividad fosfodiesterásica de cGMP en oocitos de <u>X. laevis</u>	164
Tabla X	Características de la incorporación de ³² P-ATP en núcleos aislados de oocitos de <u>X. laevis</u>	194

LISTA DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	Procedimiento de enucleación de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	40
Figura 2	Oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	42
Figura 3	Efecto de la concentración de aminoácido en la velocidad de incorporación en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	58
Figura 4	Efecto de la concentración de aminoácido en entrada e incorporación a proteínas en oocitos de anfibio	61
Figura 5	Efecto de temperatura en la entrada de aminoácidos e incorporación a proteínas en oocitos de anfibio	66
Figura 6	Efecto del pH en la entrada de aminoácido y síntesis de proteínas en oocitos	69
Figura 7	Efecto de la concentración del ión magnesio en la entrada de aminoácido y síntesis de proteínas en oocitos de anfibio	72
Figura 8	Efecto del cultivo de ovario en solución HF sobre la captación de aminoácidos y síntesis de proteínas	75
Figura 9	Degradación de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	78
Figura 10	Efecto de diferentes inhibidores en la síntesis de proteínas de oocitos	81
Figura 11	Entrada de ¹⁴ C-arginina y proteínas radiactivas a vesículas germinales de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	84
Figura 12	Entrada de proteínas recién sintetizadas a vesículas germinales de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	87

Figura 13	Efecto de inhibidores sobre la entrada de aminoácidos y síntesis de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	92
Figura 14	Efecto de oubaína, tratamiento con pronasa y ausencia de K ⁺ sobre la entrada de aminoácido y síntesis de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	95
Figura 15	Efecto de la concentración de aminoácido en las velocidades iniciales de entrada para distintos aminoácidos en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	98
Figura 16	Efecto de análogos estructurales sobre la entrada de aminoácido radiactivo e incorporación a proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	102
Figura 17	Efecto de análogos estructurales sobre la entrada e incorporación a proteínas de ¹⁴ C-alanina en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	104
Figura 18	Efecto de diferentes aminoácidos en la velocidad de entrada de ¹⁴ C-tirosina de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	107
Figura 19	Efecto de la temperatura en la maduración de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> inducida por hormonas	115
Figura 20	Influencia del pH sobre la maduración de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	118
Figura 21	Estudio comparativo de la velocidad de maduración de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> inducida por diferentes hormonas	121
Figura 22	Efecto de teofilina a diferentes concentraciones sobre la maduración de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> provocada por hormonas o ión lantano	126
Figura 23	Efecto de diferentes concentraciones de papaverina sobre la maduración de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> provocada por hormonas o ión lantano	128

Figura 24	Efecto de diferentes concentraciones de Ca^{++} sobre la inhibición de la maduración por teofilina y papaverina en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	135
Figura 25	Efecto de teofilina y papaverina sobre la maduración de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> a distintos tiempos después de la inducción hormonal	137
Figura 26	Efecto de distintos inhibidores sobre la maduración a distintos tiempos de agregada la hormona en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	141
Figura 27	Reversibilidad de la inhibición provocada por teofilina o papaverina sobre la síntesis de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	145
Figura 28	Influencia de Ca^{++} sobre la inhibición de síntesis de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u> provocada por teofilina y papaverina	148
Figura 29	Niveles de cAMP en oocitos y vesículas germinales	151
Figura 30	Variaciones en los niveles de cAMP provocados por diferentes agentes inductores de la maduración en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	154
Figura 31	Influencia de diferentes inhibidores de la maduración sobre los niveles de cAMP en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	157
Figura 32	Efecto de teofilina sobre los cambios de cAMP provocados por hormonas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	160
Figura 33	Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de nucleótidos cíclicos por homogeneizados de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	166
Figura 34	Distribución intracelular de la actividad fosfodiesterásica de cAMP y cGMP en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	168

Figura 35	Inhibición de la actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos por cAMP o cGMP	171
Figura 36	Velocidad de formación de 5'AMP a partir de cAMP en homogeneizados de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	174
Figura 37	Curva de progreso de la hidrólisis de cAMP por homogeneizados de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	177
Figura 38	Cromatografía en DE-52 celulosa de fosfodiesterasa de cAMP proveniente de ovario de <u>Xenopus laevis</u>	179
Figura 39	Actividad fosfodiesterásica de cAMP en fracciones celulares de oocitos antes y después de inducción de la maduración por progesterona	182
Figura 40	Actividad fosfodiesterásica y niveles de cAMP en oocitos a distintos tiempos de la acción de progesterona	185
Figura 41	Fosforilación de proteínas de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	189
Figura 42	Características de la reacción de fosforilación en vesículas germinales de oocitos de <u>Xenopus laevis in vitro</u>	192
Figura 43	Proteínas nucleares de <u>Xenopus laevis</u> fosforiladas <u>in vitro</u>	195
Figura 44	Relación entre síntesis y fosforilación de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	198
Figura 45	Relación entre síntesis y fosforilación de proteínas nucleares de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	200
Figura 46	Efecto de progesterona sobre la fosforilación de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	203
Figura 47	Efecto de progesterona sobre la fosforilación de proteínas nucleares de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	205

Figura 48	Efecto de la microinyección de cAMP y cGMP en la fosforilación de proteínas de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	208
Figura 49	Proteínas de vesículas germinales y oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	210
Figura 50	Efecto de progesterona sobre síntesis de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	214
Figura 51	Efecto de hCG sobre entrada e incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	216
Figura 52	Efecto de progesterona sobre síntesis de proteínas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	219
Figura 53	Proteínas de vesícula germinal y de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	222
Figura 54	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida de las proteínas radiactivas de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> sintetizadas antes y después del estímulo hormonal	224

2) Disponibilidad de células en distintas etapas de crecimiento.

En un ovario de anfibio, normalmente, se encuentran los oocitos en diferentes etapas de crecimiento, lo que permite estudiar las posibles regulaciones de la expresión génica a medida que las células se desarrollan.

Durante el crecimiento del oocito (oogénesis), existe una intensa actividad metabólica que le permite sintetizar los productos necesarios para su crecimiento, además de una gran cantidad de otras sustancias que se almacenan por semanas o meses, para ser utilizadas durante la embriogénesis temprana del anfibio. La mayoría, y tal vez todo el rRNA, tRNA y mRNA que se utiliza durante los primeros estados embrionarios, se sintetiza durante la oogénesis.

En los estados iniciales de la oogénesis se produce la amplificación del rDNA. Luego se produciría una activa síntesis de mRNA, de tRNA y RNA 5S. Más tarde, se sintetizaría, en gran cantidad, los rRNA 28S y 18S.

Es evidente, por lo tanto, que existe una

regulación en la expresión de ciertos genes del oocito durante su crecimiento, lo cual permitiría usarlo como modelo para estudiar el control de expresión génica.

3) Capacidad de responder a hormonas.

Una vez que los oocitos han alcanzado su crecimiento máximo, son capaces de responder a ciertas hormonas que los harían salir del largo período de profase de la primera división meiótica en el cual se encontraban durante toda la ovogénesis, y terminar el proceso de meiosis (maduración).

Esta propiedad hace de los oocitos un excelente sistema para estudiar el efecto de hormonas en células eucarióticas.

Debido a que numerosas hormonas son capaces de inducir la maduración de estas células (progesterona, hCG, testosterona, hidrocortisona, etc.) es posible realizar estudios comparativos sobre los mecanismos de acción de los diferentes inductores y establecer, así, una relación entre el fenómeno de maduración y los mecanismos por los cuales actuarían las distintas hormonas.

4) Posibilidad de ser microinyectadas.

Alguien que desee entender cómo ocurren y están organizados los procesos dentro de una célula viva, a menudo encuentra útil alterar el medio interno celular, simplemente, agregando al medio sustancias que puedan penetrar fácilmente la membrana plasmática. Esto se complica cuando los componentes a usarse son de gran tamaño, o impermeables a la célula. Un modo de ver el efecto de estos compuestos es romper la célula y estudiar el sistema in vitro. Esta metódica tiene el inconveniente de destruir la organización interna de la célula lo que puede influir en la actividad e interacción de los componentes en estudio. Otra manera de resolver el problema, por lo tanto, es el de introducir estas sustancias dentro de la célula, dejándola relativamente inalterada. Para esto último, las células germinales parecen ser las más adecuadas, ya que se piensa que su citoplasma tendría menos restricciones que los de una célula altamente especializada.

Entre las células germinales, las más aptas serían las de anfibio, ya que son de un tamaño suficientemente grande como para poder microinyectarlas,

con un volumen de alrededor de 100 nl, lo que equivale de un 10 % a un 20 % de su volumen, sin causar daño celular visible.

Es posible, por lo tanto, utilizando estas células, estudiar los efectos producidos por alteraciones en los niveles intracelulares de macromoléculas, nucleótidos, etc., mediante la técnica de microinyección.

Además, es interesante resaltar la posibilidad de estudiar en estas células la interacción existente entre núcleo y citoplasma, como control de la expresión génica, utilizando para ello los transplantes nucleares.

De los puntos anteriormente señalados, hemos escogido hacer una revisión bibliográfica más detallada sobre la microinyección de mRNA en oocitos de Xenopus laevis y sobre los conocimientos que se han acumulado acerca de la maduración de estas células gatillada por hormonas. Esta revisión tiene por finalidad exponer algunas de las posibilidades de investigación que presentan los oocitos de anfibio como sistema y ayudar en la comprensión de los problemas que se han enfrentado en el trabajo experimental de la tesis.

II Oocitos de anfibio como sistema traductor de RNA mensajeros microinyectados y medio de estudio del control de la traducción.

La microinyección permite introducir en oocitos grandes cantidades de macromoléculas, como RNA mensajero y estudiar su traducción, lo cual nos puede ayudar a investigar los controles existentes a este nivel.

Para identificar el producto de un RNA mensajero es necesario que éste codifique para una proteína característica. Si el mRNA va a ser microinyectado, es necesario, también, que la célula en la cual se introduzca no exprese o no posea la información para la proteína que codifica el mRNA introducido. Generalmente esto es fácil de lograr utilizando mRNA proveniente de una especie distinta a la de la célula germinal.

Hasta el momento, el oocito ha sido utilizado como sistema traductor de numerosos RNA mensajeros provenientes de diferentes fuentes. Los más utilizados han sido los de reticulocito de conejo, pato y rata, además de mRNA provenientes de células epiteliales de cristalino, mieloma, testículos, etc., y RNA proveniente de numerosos virus (1-18).

Algunos de los resultados experimentales que se han descrito en la literatura referente a la capacidad del oocito para traducir diferentes mensajeros

INTRODUCCION

I Ventajas del sistema de oocitos de anfibio

Las principales ventajas que ofrecen los oocitos de anfibio sobre otros sistemas son:

- 1) Rápida obtención, gran tamaño y facilidad de cultivo.

Una hembra adulta de Xenopus Laevis posee alrededor de 5000 a 10000 oocitos en su máximo crecimiento. Para poder obtenerlos en forma aislada sólo basta realizar un tratamiento con colagenasa durante una hora, después que el ovario se ha extraído del animal. Por lo tanto, el tiempo que se demora en obtener estas células, desde que se opera al animal, no supera las dos horas.

Los oocitos alcanzan un tamaño máximo de 1,1 - 1,3 mm, lo cual permite un fácil manejo y realizar experimentos de mediciones enzimáticas, aislamiento de compuestos y actividades biosintéticas con sólo 5-20 células. Además, estas células son capaces de ser cultivadas en un medio salino simple, y sobreviven en condiciones estériles por más de dos semanas.

se discutirán en los párrafos siguientes.

En oocitos que han sido microinyectados con RNA mensajero proveniente de una cepa de fibroblastos (3T6) de rata, que es productora de colágeno y cuya traducción se ha podido seguir midiendo la conversión de 5^3H -prolina a 5^3H -hidroxiprolina, se ha detectado que la razón de hidroxiprolina/prolina aumenta 5 veces al provenir el RNA de los polisomas (19). La cantidad de colágeno que se sintetiza representa sólo un 0,1 % de la síntesis de proteínas totales del oocito. Esto demuestra, claramente, la sensibilidad del sistema.

Con el objeto de realizar estudio de carácter cuantitativo, se ha determinado la relación existente entre la cantidad de mRNA inyectado y la cantidad de proteína nueva que se sintetiza en respuesta al RNA mensajero.

Todos los mRNA estudiados hasta el momento presentan el mismo comportamiento. Inicialmente el sistema responde en forma lineal a la cantidad de mRNA inyectado para luego llegar a un nivel de saturación. Según datos obtenidos con RNA mensajero de globina, el sistema de traducción del oocito se saturaría con aproximadamente 10 a 25 ng de mRNA (6). Se han encontrado variaciones con los distintos mRNA pero estas podrían deberse a problemas de degradación de esta macromolécula (4,20).

El RNA mensajero de globina es funcional aún después de 18 horas de haber sido microinyectado en el oocito

(2,20-22). Esto significaría que la sensibilidad del oocito, como sistema para detectar traducción de ciertos mensajeros, se debe a una síntesis muy eficiente de un producto estable (5) sobre un largo período.

Respecto a la fidelidad de la traducción del mRNA microinyectado en el oocito, ha sido posible comparar los productos sintetizados a partir de RNA 14S de cristalino inyectado en el oocito con la proteína 2A2 extraída directamente de las células del cristalino de ternero. La digestión triptica de estas proteínas no demuestran ninguna diferencia (19).

Resultados similares se han obtenido con mRNA de globina de pato y rata, y con RNA mensajero de la cadena liviana de inmunoglobina (10, 12, 23).

Hasta el momento, sigue en pie la pregunta si habrá mensajeros que no pueden ser traducidos por el oocito. Se ha descrito que ciertos RNA microinyectados no causan la síntesis de proteínas nuevas (RNA de f2, RNA del virus Rauscher, RNA de AMV, etc.) (19), pero no se ha demostrado fehacientemente que éstos RNA no se traducen y que los mRNA estarían en el oocito en forma funcional. Por lo tanto, se necesita más información para poder definir o establecer, en forma precisa, si existe alguna especialidad del sistema de traducción de estas células germinales con respecto a mRNA exógenos. Por otra parte, se ha encontrado

que el RNA mensajero de promelitina, que se prepara de glándulas de abejas reinas, puede ser traducido eficientemente en el oocito, lo cual sugiere que no habría barreras de carácter interespecífico y que, seguramente, éste sería capaz de traducir cualquier mRNA proveniente de otra especie animal (13).

Respecto a la posible capacidad del oocito para modificar o procesar los productos post-transcripcionalmente, se ha comprobado que este sistema es capaz, por ejemplo, de acetilar el grupo aminoterminal de la proteína 2A2 de cristalino traducida por un mRNA exógeno microinyectado. Se han encontrado resultados análogos para la fosforilación de protamina bajo la dirección de mensajero de trucha y para la hidroxilación de colágeno inyectado en oocitos crecidos de Xenopus laevis (19).

Evidencias de que el oocito no sólo es capaz de modificar el producto formado, sino que además, contiene sistemas enzimáticos que aparentemente, procesarían el producto a proteínas de menor peso molecular, han sido dadas por la microinyección de RNA mensajeros de mieloma K-14 de rata y de virus EMC. En el primer caso, se ha encontrado que el oocito sintetiza una cadena de inmunoglobulina liviana que es idéntica a la producida por la rata (4, 10). Esto no sucede si se realiza la traducción del mRNA de mieloma en un sistema libre de células; sólo se obtiene una proteína de

mayor peso molecular que, seguramente, sería el precursor de la cadena liviana de inmunoglobulina. En el caso del virus EMC, el sistema es aún más complejo. Se ha demostrado que este RNA viral sólo posee un sitio de iniciación y que codifica para 6 proteínas virales (34), las cuales estarían formando, inicialmente, una sola cadena polipeptídica. Este polipéptido debería ser, por lo tanto, cortado, para dar las proteínas maduras. Al microinyectar este RNA viral, el oocito es capaz de dar, como producto final, las 6 proteínas virales, que son idénticas a las provenientes de células infectadas con EMC. Así, el oocito es capaz de traducir el genoma completo de EMC y procesar el producto correctamente para dar las proteínas normales de este virus.

De los resultados obtenidos, hasta el momento, mediante el empleo de microinyección de mRNA, es posible llegar a las siguientes conclusiones respecto al sistema sintetizador de proteínas en oocitos:

- 1) El oocito posee todo lo necesario para la traducción de mRNA exógeno.
- 2) El oocito es capaz de traducir mRNA provenientes de tipos de células diferentes, y que no sería necesario otro factor de la célula dadora del mRNA para traducirlo en forma eficiente y fiel.
- 3) Si se requirieran factores específicos para la traducción de los mRNA estos factores existirían en el oocito, aunque es una célula que, normalmente, no sintetiza esas proteínas.

Los hechos anteriores harían pensar que si realmente el mRNA microinyectado usa el conducto normal para ser traducido, parecería, entonces, que todo mRNA accesible al sistema de traducción en la célula sería eficientemente traducido. Por lo tanto, podría existir un mecanismo de control que estaría impidiendo o permitiendo que los diferentes mRNA interactuaran con los componentes del sistema sintetizador de proteínas. Sin embargo, resultados muy recientes en los que se ha empleado mRNA de virus EMC y de globina permiten concluir que la cantidad de síntesis de proteínas en el oocito estaría, en parte, controlada por un componente polisomal, y no sólo por la disponibilidad de mRNA libre, ya que ambos RNA disminuyen la síntesis de proteínas endógenas del oocito en forma competitiva. Esto no sucede cuando los RNA mensajeros se inyectan como polisomas (25).

III Microinyección de núcleos a oocitos de anfibio como sistema para el estudio de control transcripcional.

Uno de los aspectos más interesantes en el control de la función génica es la inactividad constante de muchos genes en las células diferenciadas. Esto contrasta con las rápidas alteraciones en la actividad de los genes típicamente funcionales de dichas células.

La investigación del control que impide la expresión de una importante fracción de los genes en células diferenciadas podría ser ampliamente facilitado, si se pudieran inducir experimentalmente alteraciones predecibles en este mecanismo de regulación.

El trasplante nuclear parece ser una de las maneras de realizarlo y su aplicación, usando huevos de anfibios, es lo que se enfatizará en las próximas líneas.

El ejemplo más claro descrito en la literatura sobre alteraciones en la regulación génica, es el realizado con núcleos provenientes de epitelio intestinal. Oocitos maduros anucleados, inyectados con un núcleo proveniente de esas células, fueron capaces de dividirse y desarrollar anfibios adultos normales, en un 20 % de los casos estudiados (26). Estos datos indican, claramente, que el trasplante suprime las restricciones pre-existentes de la actividad potencial de los genes en los núcleos de células epiteliales de intestino. Se han realizado experimentos similares empleando núcleos provenientes de otras células (27-31).

Los resultados descritos anteriormente no permiten sin embargo, discernir si son el método de obtención de los núcleos o la exposición del núcleo a un nuevo ambiente citoplasmático, los causantes del cambio en su actividad nuclear.

En general, se han utilizado dos enfoques experimentales para abordar este problema: en un caso, se microinyectan numerosos núcleos en el huevo; y en el otro, sólo se introduce un núcleo al citoplasma. Con la primera técnica se impide que el huevo se divida, y es posible, por lo tanto, estudiar los cambios rápidos en la expresión del núcleo donado. En estos experimentos se han visto notables cambios en la estructura de la cromatina del núcleo inyectado y un gran aumento del tamaño nuclear (32, 33). Además, se detecta síntesis de DNA en huevos, aumento de síntesis de RNA en oocitos, etc. Estos efectos se detectan, claramente, una a dos horas después del trasplante nuclear (32).

Efectos similares se encuentran al microinyectar sólo un núcleo por célula. Al inyectar núcleo de néurula, que está en activa síntesis de RNA, después de 30' se inhibe la síntesis, desaparece el nucléolo, y se induce la síntesis de DNA. Horas después de la microinyección, el núcleo donado comienza a sintetizar las tres clases de RNA que se observan en el desarrollo normal de huevos fertilizados. Los experimentos anteriores y otros experimentos similares

han demostrado, claramente, que al cabo de tan sólo una a dos horas de encontrarse el núcleo inyectado en contacto con el citoplasma del huevo, es indistinguible en morfología y actividad con el núcleo de un huevo fertilizado (34, 35).

Los efectos específicos ejercidos por el citoplasma del huevo, no se restringen a núcleos provenientes de células de la misma especie, sino, también ocurren con núcleos obtenidos de especies distintas (36, 37).

Los cambios de actividad del núcleo transplantado pueden ser eventualmente explicados en términos de una interacción entre moléculas del citoplasma y el núcleo.

Actualmente existen claras evidencias que proteínas de origen citoplasmático entrarían al núcleo microinyectado, sugiriendo la posibilidad que este paso de proteínas citoplasmáticas al núcleo, estuviera relacionado con los cambios en la actividad del núcleo donado (38, 39).

Estudios más recientes empleando diversas proteínas purificadas y marcadas con ^{125}I , han demostrado que tanto el núcleo donado como la vesícula germinal del oocito poseen selectividad para el paso de proteínas a su interior. Algunas de éstas se distribuyen específicamente ya sea en el núcleo o en el citoplasma. Otras se localizarían indistintamente en el citoplasma y en el núcleo. Esta selectividad es independiente del tamaño de la proteína. Como dato, es interesante destacar que histonas marcadas con ^{125}I microinyectadas

en el oocito se encuentran 100 veces más concentradas en la vesícula germinal que en el citoplasma después de 24 horas de su inyección. Seroalbúmina de bovino inyectado bajo las mismas condiciones, se encuentra dos veces más concentrada en el citoplasma que en el núcleo.

Trabajos realizados recientemente por Gurdon y colaboradores usando microinyección de **núcleos** en oocitos de anfibios, han permitido mantener el núcleo inyectado en forma activa por más de 28 días. Estos investigadores han microinyectado núcleos de células HeLa y de mieloma de ratón y han demostrado que los núcleos inyectados aumentan su síntesis de RNA continuamente durante los 28 días de cultivo. El aumento en la síntesis de RNA está acompañada por un incremento en el tamaño nuclear y por una pérdida de las proteínas del núcleo inyectado. Además se produce una entrada de histonas y proteínas no histónicas del citoplasma del oocito. También es interesante resaltar que algunos de los RNA sintetizados por el núcleo inyectado son capaces de ser traducidos en proteínas idénticas a las de la célula de la cual provienen (43-46).

Resumiendo, se puede decir que los cambios estructurales y metabólicos que sufre un núcleo transplantado en oocitos, son los siguientes: a) alteración en la síntesis de DNA y RNA; b) rápido aumento de volumen; c) dispersión progresiva de la cromatina; y d) acumulación de algunas proteínas en forma selectiva.

Algunas interrogantes que podrían ser planteadas usando el sistema de transplante nuclear en oocitos son las siguientes:

- 1) ¿ Qué proteínas citoplasmáticas o nucleares son importantes en la regulación de la actividad génica?
- 2) ¿ Qué determina la asociación de éstas proteínas con los cromosomas? y
- 3) ¿ Cuándo se disociarían éstas proteínas de los cromosomas y por qué?

IV Maduración de oocitos in vitro.

Desde los primeros hallazgos en que se observó que los anfibios podían ovular por medio de inyecciones de preparaciones crudas de glándula pituitaria anterior (46), ésta técnica ha sido ampliamente usada para inducir la ovulación fuera de las estaciones normales.

En el transcurso de los años, numerosos trabajos han demostrado que los extractos de pituitaria son capaces de inducir la ovulación in vitro (47-49). Este proceso se analiza comúnmente con trozos de ovario o con oocitos aislados incubados en un medio salino adecuado al cual se le agrega la hormona, y se observa la capacidad de los oocitos para desprenderse de las células foliculares que los rodean. El hecho de desprenderse de esta capa celular que los rodea tanto en el ovario como cuando el folículo ha sido disectado manualmente, se denomina ovulación. Este proceso dura alrededor de 14 a 18 horas en oocitos de Xenopus laevis, y aproximadamente 24 a 28 horas en células de Rana pipiens.

La capacidad del extracto pituitárico o de otras hormonas para inducir la maduración se realiza en condiciones iguales a las de ovulación, pero se analiza la ruptura de la vesícula germinal después de 18 a 24 horas de la inducción hormonal. El fenómeno de maduración va acompañado también de un pequeño cambio morfológico externo, la aparición de una pequeña mancha blanca en el polo animal (color café).

Este fenómeno se observa después de 4 a 6 horas de agregada la hormona al medio de incubación. Esta mancha blanca estaría indicando la migración de la vesícula germinal hacia la parte superior del polo animal, como consecuencia del estímulo hormonal.

Mediante el uso de inhibidores de la síntesis de RNA (actinomicina D) ha sido posible determinar que se requiere la síntesis de RNA para la maduración provocada por hormonas pituitarias. Se ha demostrado que actinomicina D agregada simultáneamente con la hormona, o hasta 2 horas después del estímulo hormonal, inhibe totalmente la maduración. Si se agrega el inhibidor luego de 3 horas de agregada la hormona pituitaria al medio de incubación, no se afecta en nada la maduración de los oocitos (50-53). Estos resultados indicarían que el RNA necesario para la acción de las hormonas pituitarias se sintetizaría durante las dos horas iniciales del estímulo hormonal.

Inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida o puromicina) son también potentes inhibidores de la maduración provocada por las hormonas pituitarias (50, 52, 53).

Experimentos realizados para ver el posible rol de las células foliculares (células que están rodeando el oocito) en la maduración, demostraron que en ausencia de éstas células los oocitos pierden la capacidad de responder a los estímulos de las hormonas pituitaria o gonadotropina (54).

Esto indicaría que la acción de estas hormonas se realiza a través de algún tipo de interacción con las células foliculares que rodean al oocito.

Es importante hacer notar que se requiere la presencia continua de hormonas pituitarias para producir la maduración de los oocitos. Esta dependencia termina con la disolución de la vesícula germinal (52, 54).

En los últimos años numerosos trabajos han demostrado que no sólo las gonadotropinas pituitáricas son capaces de producir la maduración de oocitos in vitro, sino que una serie de hormonas esteroidales, como progesterona, testosterona, dihidrocortisona, etc., poseen también la capacidad de hacer madurar a los oocitos de anfibio en cultivo (52,56,60).

Estos datos, junto con el hecho que las gonadotropinas pituitáricas necesitan de la síntesis de RNA y de la presencia de las células foliculares llevaron a postular la posibilidad que las hormonas peptídicas actuaran a través de la síntesis de un producto esteroideal producido por las células foliculares. Se realizaron numerosas investigaciones con el fin de probar esta teoría, y sólo recientemente ha sido posible encontrar, e incluso aislar progesterona de tejido ovárico de anfibio, lo que hace muy probable que progesterona sea un intermediario en la acción de las Gonadotropinas (61). Además estudios citoquímicos han demostrado que el tejido ovárico de Xenopus laevis sintetiza estrógeno en el tejido folicular y que las gonadotropinas estimularían levemente la

producción de estos esteroides (62).

Experimentos realizados in vitro con progesterona demuestran claramente que esta hormona induce la maduración de los oocitos, pero no es capaz de provocar la ovulación (57, 63). En estudios posteriores realizados in vivo, inyectando progesterona a hembras adultas de Rana pipiens se vió que en las hembras no se inducía la ovulación, pero se encontró que todos los oocitos crecidos estaban maduros y eran capaces de ser activados partenogenéticamente (55), lo que indica que estaban en la segunda metafase meiótica. Estos datos apoyarían fuertemente la idea de que maduración y ovulación son procesos no interdependientes (48).

Contrariamente a lo obtenido para las hormonas pituitáricas, se ha visto que maduración causada por la acción de progesterona no se inhibe en presencia de actinomicina D, indicando que no es necesaria la síntesis de RNA nuevo para la acción de esta hormona esteroïdal (52, 53, 55).

Además aunque los oocitos sean disectados de sus células foliculares, siguen manteniendo la capacidad para responder a progesterona; por lo tanto esta hormona actuaría directamente sobre el oocito (56, 57, 64).

Los inhibidores de la síntesis de proteínas, igual que parala hormonas gonadotrópicas son capaces de inhibir la acción de la progesterona en la maduración de los oocitos (53).

Un hecho muy interesante es que la progesterona, al

ser microinyectada en el oocito en cantidad suficiente como para inducir la maduración, no es capaz de producirla. Esta observación sugiere que el esteroide debe interactuar primero con la membrana del oocito o algún componente de ella para inducir la maduración.

La dependencia de la presencia hormonal en la maduración provocada por progesterona es muy corta. Es suficiente que los fragmentos de ovario u oocitos aislados esten en contacto durante 15 minutos con la hormona para obtener un máximo de maduración.

La unión de ^3H -progesterona a oocitos de Xenopus laevis, detectada por radioautografía demuestra que la hormona se une principalmente a nivel de la membrana celular y citoplasmática adyacente. Esta unión es rápida y reversible y presenta una cinética de primer orden (65). El número de moléculas que es capaz de unir el oocito es cientos de veces mayor que la cantidad necesaria para provocar su maduración. Además ha sido posible aislar una fracción citoplasmática del oocito con un coeficiente de sedimentación de 15S a 18S que se une específicamente a la progesterona (66).

La interacción de progesterona con sus receptores celulares parece no requerir la intervención de cationes divalentes difundibles como Mg^{++} y Ca^{++} . Se ha descrito que la preincubación del oocito y la administración de esteroide en un medio carente de iones divalentes provoca una respuesta

normal si después de la interacción de la hormona con el oocito se agregan cationes divalentes tales como Ca^{++} y Mg^{++} . Estos cationes son totalmente necesarios para los eventos intracelulares que acontecen posteriormente hasta el rompimiento de la vesícula germinal. No es posible reemplazar la función de uno de ellos por el solo aumento de la concentración del otro; ambos son por lo tanto necesarios para el rompimiento de la vesícula germinal (67, 68).

Se ha demostrado además, que la maduración de los oocitos de Rana pipiens va acompañada de un aumento del contenido de calcio de la célula y de una redistribución intracelular (69).

Resultados más recientes han demostrado que no es necesario el intercambio de iones con el medio para que se produzca la maduración, lo que indicaría que son las distribuciones intracelulares las importantes para que se realice este fenómeno (70). La incubación de oocitos de Rana pipiens o de Xenopus laevis con progesterona radiactiva causa una acumulación de radiactividad en el oocito. El análisis de esta radiactividad indica que gran parte de la progesterona, al cabo de pocas horas, ha sido metabolizada dando principalmente compuestos más polares como 5α y 5β -pregnanediona. La remoción completa de las células foliculares no afecta la capacidad de metabolizar la progesterona, lo que indicaría que es el oocito el que posee la capacidad de convertir esta

hormona esteroideal en otros derivados. Además, progesterona microinyectada en oocitos es también metabolizada. Oocitos anucleados, a los cuales se les ha extraído la vesícula germinal antes de exponerlos a progesterona, también tienen la misma capacidad para convertirla en otros productos. Uno de los derivados de progesterona, que se produce en el oocito al metabolizarla, es la 5 α pregnanediona, que es tan efectiva como progesterona para inducir la maduración en el oocito (71, 72).

Evidencias relacionadas con el rol que cumplirían estos metabolitos derivados de la hormona, indicarían que el metabolismo "per se" no jugaría un rol importante en la maduración. Oocitos que no han sido capaces de responder al efecto de progesterona, pueden metabolizarla en forma normal (71).

Una función del metabolismo de pregnanediona en el oocito podría ser reducir los niveles efectivos de esteroide capaces de inducir rompimiento de la vesícula germinal.

Si el esteroide se combina con un receptor específico para poder actuar, entonces el hecho de que los isómeros 5 alfa y 5 beta de pregnanediona sean capaces de inducir el rompimiento de la vesícula germinal sugeriría que:

a) ambos isómeros se unen al mismo receptor; b) existen receptores separados; c) hay retroconversión de progesterona y/o d) existe una isomerasa en oocitos para convertir una forma en otra.

Investigando el mecanismo operante en la maduración de oocitos gatillada por progesterona se han realizado experimentos en los cuales se extrae una mezcla de cario-plasma y citoplasma de oocitos cuya vesícula germinal se ha destruido por acción de hormonas. Esta mezcla se inyecta en oocitos crecidos, se observa que los oocitos responden con una maduración normal (54). Más recientemente se ha demostrado que no es necesario que el oocito haya sufrido el rompimiento de su núcleo para inducir, mediante la inyección de su citoplasma, la maduración en otras células (73). El factor (o factores) contenido en el citoplasma de los oocitos donantes y que induce la maduración, recibe el nombre de "factor promotor de la maduración" (F.P.M.). En oocitos de Rana pipiens este factor aparece alrededor de 6 horas después de tratar el oocito con progesterona, alcanzando su máxima actividad entre las 12 y 18 horas (74). Después de completa la maduración, aproximadamente 40 horas después de tratar el oocito con progesterona, la actividad del F.P.M. se reduce. Sin embargo, algunos datos indican que todavía existen pequeñas cantidades de F.P.M. en el citoplasma de embriones en división. La enucleación de los oocitos dadores de citoplasma, antes del tratamiento con hormona, no altera los niveles de F.P.M. Lo anterior indicaría que este factor se forma directamente en el citoplasma del oocito, sin participación del núcleo (75,76). Este factor, también se ha detectado en oocitos de Xenopus laevis después de 15 minutos

de acción hormonal, alcanzando su máximo al cabo de 6 horas (77). Estas diferencias en la velocidad de aparición del F.P.M. en el citoplasma de oocitos de Rana pipiens y Xenopus laevis, estaría de acuerdo con las diferentes velocidades de maduración que presentan ambas especies de oocitos.

Es importante destacar, en relación con el F.P.M. que los oocitos inyectados con citoplasma de células pretratadas con hormona durante 5 horas, presentan rompimiento de vesícula germinal desde la primera hora después de la inyección; en cambio, en los oocitos tratados con progesterona se observa la disolución de la vesícula germinal solo 4 horas después de la exposición al esteroide. Esto sugiere, claramente, que existe más de una etapa durante el proceso de maduración inducida por progesterona (77).

Si se extrae citoplasma de un oocito tratado con hormona y se microinyecta a otro oocito, este último es capaz de realizar su maduración meiótica. Al extraer citoplasma del oocito inyectado y microinyectarlo a otra célula, nuevamente la célula aceptora es gatillada para continuar la meiosis. Al repetir esta operación 10 veces, lo que significa una dilución de 10^{-11} veces del citoplasma de la primera célula dadora, el oocito aceptor responde siempre con la misma eficiencia. De estos datos es posible postular que el F.P.M. posee una actividad autocatalítica (78, 79).

Al pretratar oocitos aceptores de citoplasma portador de F.P.M. con cicloheximida, se encuentra que éstos maduran en un 79 % de los casos. Si se inyecta citoplasma de estos

oocitos a células pretratadas con cicloheximida no se observa maduración. En cambio, oocitos no tratados con el inhibidor se comportan en forma normal. Estos datos indicarían que está involucrado el fenómeno de traducción en la autocatálisis de F.P.M., pero no en la inducción de maduración por este factor, ya que en la primera transferencia es capaz de inducir un 79% de maduración en oocitos pretratados con cicloheximida. Además, también se puede concluir que el F.P.M. es un paso intermedio en la maduración provocada por esteroides. Se han encontrado resultados similares usando hidrocortisona como hormona inductora de maduración.

Con el objeto de tratar de localizar el F.P.M. se ha extraído citoplasma de distintas zonas del oocito, y se ha logrado demostrar que, tanto oocitos normales como oocitos anucleados tratados con progesterona, poseen una mayor actividad promotora de la maduración en la región animal del citoplasma (75, 76).

Mediante el uso de centrifugación, se ha logrado producir ciertas estratificaciones dentro del oocito. Tomando muestras de los estratos formados, se ha detectado que la máxima actividad de F.P.M. se encuentra en el estrato hialino y que éste se encuentra normalmente en gran cantidad en el polo animal del oocito (75, 76).

Experimentos realizados con el fin de estudiar la

especificidad del F.P.M., utilizando para ello citoplasma de oocitos tratados con hormona de diferente origen a los oocitos receptores (Rana pipiens y Xenopus laevis, Rana clemitans y Axolote mexicanum) demostraron que el factor proveniente de cualquiera de estos oocitos hace madurar en forma tan eficiente al aceptor como si fuera citoplasma de la misma especie. Esto indicaría un gran grado de inespecificidad, ya que se trata de distintos sub-ordenes taxonómicos y aún de diferente orden (79). Huevos de Rana pipiens cuya ovulación ha sido inducida por inyección de hormona gonadotrófica coriónica humana (hCG) y extraídos de la cavidad corporal también presentan F.P.M. Por otra parte, oocitos que no responden a hormona, no poseen este factor. En oocitos de Xenopus laevis se conserva este factor hasta 48 horas después de la exposición a la hormona. De los datos presentados sobre el F.P.M. se puede llegar a las siguientes conclusiones: a) El F.P.M. aparece en el citoplasma de los oocitos después de ser tratados con cualquiera de las hormonas que inducen la maduración; b) La síntesis de este factor requiere de la síntesis de proteínas y es autocatalítico; c) No presenta especificidad en cuanto a las células dadoras o aceptoras de este factor.

Se ha encontrado en el citoplasma de oocitos otro factor que jugaría un rol inhibitorio en la mitosis y

división celular. Si se inyecta citoplasma de oocitos que están en maduración a blastómeros de huevos en división, estos blastómeros microinyectados cesan su división, mientras que los blastómeros vecinos continúan dividiéndose normalmente. El citoplasma de huevos activados no posee este factor. Esto nos indicaría que la división y la mitosis de los oocitos estarían inhibidas por la acción de un factor citoplasmático, el factor citostático (F.C.) (74).

Ha sido posible determinar en Rana pipiens, que el F.C. aparece después de 20 horas de tratamiento con progesterona. El nivel máximo de actividad se mantiene hasta el momento de la activación del oocito, bajando rápidamente después de la fertilización. Parece que esta capacidad de neutralizar el F.C. se conserva sólo hasta 90 minutos después de la activación del huevo, ya que si se inyecta F.C. después de este tiempo post-fertilización, se inhibe totalmente la división.

Los primeros datos referentes al posible rol de los componentes de la vesícula germinal, fueron obtenidos hace unos sesenta y cinco años por investigadores que realizaban estos estudios en huevos de erizos de mar, estrellas de mar y en nemertinos (80). Estos huevos se cortaban en dos fragmentos antes o después de la ruptura de la vesícula germinal. Cuando se bisectaban oocitos individuales después de la disolución de la vesícula germinal, ambas partes podían ser fertilizadas y dividirse. Si ellos eran activados partenogénicamente, la mitad que poseía el núcleo también era

capaz de dividirse, en cambio la otra mitad, que no contenía cromosomas, pero sí algo de material proveniente de la vesícula germinal, formaba numerosos radios. Cuando la operación se llevaba a cabo antes de la ruptura de la vesícula germinal, sólo la mitad que contenía la vesícula germinal podía posteriormente ser fertilizada o partenogénicamente activada. La otra parte del huevo no podía ser fertilizada o activada y el citoplasma apenas era capaz de formar radios. Estos resultados demostraron claramente que para lograr la madurez citoplasmática era necesaria la liberación de material nuclear al citoplasma.

Estudios similares se realizaron en oocitos de anfibios y éstos consistieron principalmente en eliminar las células foliculares y la vesícula germinal durante el período dependiente de hormonas. Estos oocitos eran incapaces de dividirse aún cuando se les transplantara un núcleo de células somáticas. Sólo eran capaces de ser activados aquellos que no se les extraía la vesícula germinal. Con estas evidencias los autores concluyeron que, tanto en oocitos de anfibio como de invertebrados, la maduración citoplasmática es posible sólo si el material de la vesícula germinal se dispersa en el citoplasma.

Investigaciones posteriores, realizadas en Rana pipiens y usando progesterona como estímulo hormonal demostraron claramente que oocitos anucleados previo al estímulo hormonal, eran capaces de responder a estímulos de activación (55, 64).

Los criterios de activación empleados fueron: elevación de la membrana vitelina, rotación del huevo dentro de la membrana, cambios en turgidez del huevo y modificaciones características en la superficie. Aquellos huevos anucleados que eran activados presentaban siempre surcos de división de tipo abortivo. Así, un criterio de maduración citoplasmática, es decir, la capacidad de responder a la penetración del espermio, o de ser activado partenogénéticamente no es impedido por la remoción de la vesícula germinal. Sin embargo, todos los oocitos anucleados son incapaces de dividirse en forma normal después de transplantarles núcleos de células somáticas, en cambio, todos los oocitos controles responden normalmente.

A través de los años se han ido acumulando evidencias de que el material de la vesícula germinal juega un rol muy importante tanto en la morfogénesis como en la maduración. Por ejemplo, estudios más recientes utilizando mutantes de axolote han dado clara demostración que el material de la vesícula germinal es importante en la gastrulación. Se ha descubierto un gen recesivo en el axolote que ejerce un efecto maternal modificando el citoplasma del oocito durante la oogénesis de tal modo que detiene el desarrollo en la etapa de gástrula. Esta deficiencia puede ser corregida inyectando citoplasma de oocitos normales en huevos mutantes fertilizados. Cabe destacar, sin embargo, que el componente

correctivo se acumula en el núcleo antes de inducir la maduración; aún más, la inyección de material de la vesícula germinal en oocitos mutantes es más efectiva para corregir el síndrome anteriormente expuesto (81).

Con respecto a la síntesis de macromoléculas durante la maduración se han visto ciertas variaciones en relación a la síntesis de RNA y proteínas.

Mediante la microinyección de precursores radioactivos específicos para detectar la síntesis de RNA, ha sido posible estudiar la capacidad de sintetizar RNA en oocitos, antes y después del estímulo hormonal. Los resultados han demostrado que el oocito sin tratamiento hormonal es capaz de sintetizar RNA y que oocitos estimulados por progesterona o gonadotropinas incorporan igual cantidad de precursor que los oocitos controles. Ha sido posible además, detectar el lugar de síntesis siendo preferentemente en los nucléolos (82-84).

El efecto de actinomicina D sobre la maduración inducida por hormonas pituitarias, hizo pensar que era indispensable la síntesis de un RNA específico para que el oocito pudiera realizar la maduración. Pero los resultados obtenidos con progesterona, en cuyo caso no se necesita la síntesis de RNA para inducir la maduración, han sugerido que las gonadotropinas necesitan síntesis de RNA para su acción sólo para producir un intermediario de tipo esteroideal que sería el

responsable de la maduración. Así, se piensa en estos momentos que en general, el RNA sintetizado durante la maduración jugaría un rol importante durante las primeras divisiones del embrión.

Con respecto a la síntesis de proteínas las evidencias que existen por los efectos hormonales no son muy claras.

Experimentos realizados mediante microinyección de aminoácido radiactivo en oocitos de Rana pipiens después del estímulo hormonal, muestran evidencias muy discutibles sobre un posible aumento en la síntesis de proteínas después de 24 horas de la acción hormonal (55). Por otra parte, experimentos realizados mediante pulsos de aminoácidos radiactivos agregados al medio de incubación durante 30 minutos, muestran claramente que existe un aumento de incorporación a proteínas en oocitos de Xenopus laevis después de 3 a 7 horas de agregada la hormona esteroideal (66).

Estudios realizados empleando electroforesis en geles de poliacrilamida no han logrado encontrar diferencias notables en las proteínas que se estarían sintetizando antes o durante el período de maduración. Los cambios importantes en el tipo de proteínas sintetizadas se producirían después de la fertilización del huevo (55, 85).

Recientemente ha aparecido en la literatura resultados obtenidos con oocitos provenientes de cerdo , ratón o erizo de mar respecto a las proteínas que se estarían sintetizando

durante la maduración o inmediatamente después de la fertilización (86-88). En todos los casos se ha utilizado la técnica de geles bidimensionales descrita por O'Farrell. Los datos presentados en estos trabajos demuestran que no existiría un cambio notable en las proteínas que se estarían sintetizando antes o durante la maduración de los oocitos. Pareciera ser que los cambios son mayormente de tipo cuantitativo que cualitativo.

Cualquier modelo para el mecanismo de la acción hormonal en la inducción de la maduración, debe ser capaz de reconciliar las numerosas evidencias experimentales existentes hasta el momento. Este modelo tendría que postular una interacción a nivel de la membrana, entre las gonadotropinas y las células foliculares, las cuales responderían con la formación de un esteroide (progesterona) y éste sería liberado por las células foliculares para interactuar con la membrana del oocito. Esta interacción produciría la aparición del factor de maduración (F.P.M.) en el citoplasma el cual sería capaz de producir la maduración.

Como se puede apreciar, prácticamente no existe explicación alguna sobre los mecanismos por los cuales las gonadotropinas o la progesterona realizan su acción, lo cual hace interesante estudiar los efectos hormonales en sus etapas inmediatas.

Recientemente, el concepto de que numerosas hormonas

actúan por un sistema de segundo mensajero, ha sido ampliamente demostrado. Este concepto involucra la regulación de los niveles intracelulares de AMP cíclico. El nivel de este nucleótido está preferentemente regulado por dos actividades enzimáticas, la adenilciclasa, que cataliza la conversión de ATP a AMP cíclico, y la fosfodiesterasa que cataliza la conversión de AMP cíclico a 5'AMP.

Durante el desarrollo de esta tesis han aparecido datos en la literatura que apoyarían la participación del AMP cíclico en la maduración de los oocitos. Así por ejemplo, ha sido descrito que la microinyección de la subunidad regulatoria de la proteína quinasa es capaz de inducir la maduración y además la subunidad catalítica inhibe este proceso (89),.

Por otra parte ha sido descrito que progesterona produce cambios en los niveles de cAMP durante la maduración (90) y además que inhibidores de la fosfodiesterasa, como teofilina, son capaces de bloquear la maduración (90).

Estudios efectuados en esta Tesis

La tesis se ha planteado dentro del contexto de la línea del laboratorio de utilizar el sistema de oocito para el estudio de la regulación de la expresión génica. Dentro del proceso de la expresión génica, la etapa de traducción

ocupa un importante lugar y, por lo que hemos visto, en la revisión de la bibliografía que antecede, parecería claro que existirían mecanismos regulatorios post-transcripcionales operativos en los oocitos de anfibios. Sin embargo, a pesar de que el oocito se ha estado usando en muchos laboratorios para la traducción de mRNA inyectados, como hemos visto anteriormente, no existía en la literatura un estudio detallado sobre las condiciones que afectan la incorporación de aminoácidos exógenos en las proteínas de estas células. La primera parte del trabajo de la tesis, por lo tanto, se dedicó al estudio de diferentes parámetros que afectan dicho proceso, haciéndose énfasis en las condiciones y mecanismos involucrados en la captación de aminoácidos exógenos.

Posteriormente, se atacó el problema de estudiar los eventos moleculares que se inducen por la acción de hormonas que causan la maduración del oocito. En estos estudios se partió de la hipótesis que el papel preponderante que aparentemente jugaría la interacción de la membrana externa con la hormona en el proceso de maduración posiblemente, indicaba la participación de AMP cíclico en las etapas tempranas del proceso. Los resultados obtenidos justificaban la hipótesis de trabajo e indican que podría haber una relación entre la función de los nucleótidos cíclicos y el mecanismo de traducción durante el proceso de maduración inducido por hormonas.

M E T O D O S

Se usan hembras adultas de Xenopus laevis provenientes de South African Snake Farm, Cape Province, Africa del Sur, que se mantienen en cautiverio durante varios días antes de utilizarse; se alimentan una vez por semana, con pequeños trozos de carne. También se usa la especie chilena Caudiverbera caudiverbera, proveniente de las vecindades de Santiago.

Obtención de oocitos

Las hembras se anestesian colocándolas en agua con hielo, a la cual se agrega una pequeña cantidad de tricaina metanosulfanato (anestésico para animales de sangre fría), y se les mantiene durante 30 minutos en esta solución. Enseguida se extrae un pequeño trozo de ovario, mediante una incisión en la parte ventral baja del animal. El trozo extraído se coloca en solución Holtfreter modificado (HF) que contiene NaCl 63 mM, KCl 1 mM, CaCl₂ 0,5 mM, MgCl₂ 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 penicilina y estreptomycin, 10 mg de cada una por ml. El animal se sutura y normalmente se puede volver a operar después de un mes. Es posible realizar 3-4 operaciones a un mismo animal. Los oocitos se separan manualmente del trozo de ovario, extraído y mantenido en solución HF; se realiza bajo lupa empleando para ello unas pinzas Dumont N°5. Normalmente se utilizaron sólo los oocitos totalmente crecidos estado VI según Dumont (92), los cuales tienen un diámetro

de 1,1 - 1,3 mm para Xenopus laevis y de 3,0 - 3,5 mm para C. caudiverbera. Cualquier oocito que presentara una pigmentación anormal era descartado.

Análisis de incorporación de aminoácidos radiactivos a proteínas.

Para el ensayo de síntesis de proteínas, grupos de 5 oocitos de Xenopus laevis se incuban en 50 ul de solución HF en presencia de ^{14}C - aminoácido a una concentración de 18 μM , a menos que se especifique otra cosa. La incubación se realiza a 21° y se detiene agregando 1 ml de TCA 5 % frío después de tiempos variables. Enseguida los oocitos se homogenizan con una varilla de vidrio, los homogeneizados se filtran a través de filtros de fibra de vidrio que se lavan 3 a 4 veces, con TCA 5 % frío. La radiactividad incorporada al material ácido insoluble se mide en un contador Mark I empleando una solución de tolueno y Omnifluor (4 g/l) de centelleo para muestras líquidas. La eficiencia para ^{14}C era de 75 %. Los resultados representan el promedio de determinaciones en duplicado, que en general difieren en no más de un 10 %. El procedimiento descrito es igual cuando se usan oocitos de C. caudiverbera excepto que se incuban en grupos de 3 oocitos en 100 ul de HF, en presencia de aminoácido radiactivo.

Análisis de entrada de aminoácidos radiactivos al oocito

Las incubaciones para el ensayo de la entrada de aminoácidos y la medición de la radiactividad se realizan exactamente como se describe en el párrafo anterior. La reacción se detiene mediante lavados sucesivos de los oocitos con solución HF y luego se transfieren las células intactas a filtros de fibra de vidrio, donde se lavan 4 veces con 10 ml de solución HF fría (este lavado demora aproximadamente 1-2 minutos). Enseguida los filtros se doblan y se aplastan para romper los oocitos, se secan y se mide la incorporación total de aminoácidos radiactivos.

Determinación del contenido de aminoácidos libres

Para poder analizar la concentración interna de aminoácidos en oocitos, se diseccionan manualmente 2.000 oocitos crecidos (estado VI); provenientes de diferentes animales y se colocan directamente en TCA 5 %. Las células se homogenizan en este ácido durante 3 a 5 minutos, mediante un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón, movido por un motor. El homogenizado se centrifuga a 30.000 g durante 30 minutos, y el sobrenadante obtenido se centrifuga nuevamente a 105.000 g, durante 60 minutos. El líquido sobrenadante final se extrae cuatro a cinco veces con éter etílico (hasta obtener una solución neutra) para eliminar el TCA. Luego se liofiliza y se suspende en 600 ul de HCl 0,01 N pH 2,2

Se toma 100 ul de esta suspensión, se diluye con un volumen igual de HCl 0,01 N y se coloca en un analizador de aminoácidos automático Beckman Modelo 120 C. El rendimiento de este proceso se calcula usando una solución patrón de aminoácidos que se trata igual que la muestra problema.

Obtención de núcleos o vesículas germinales

Para obtener vesículas germinales aisladas, se hace un pequeño orificio a los oocitos en el polo animal, con una pinza Dumont N°5. Enseguida se presiona suavemente con las pinzas la zona ecuatorial del oocito, y el núcleo sale espontáneamente. Las vesículas germinales así obtenidas tienen un diámetro de 0,3 mm en los oocitos crecidos, pueden lavarse fácilmente con solución H.F. usando una pipeta Pasteur, para ser utilizadas posteriormente (Figura 1).

Detección de maduración

Como método de análisis para ver maduración de oocitos, se usó la aparición de un punto blanco en el polo animal y la disolución de la vesícula germinal. El punto blanco se observa fácilmente bajo el microscopio, entre las 4 y 6 horas después de tratar con hormonas (Figura 2). La ausencia de núcleo se detecta fácilmente, después de 4 a 10 horas de la acción hormonal, pinchando el oocito en el polo animal bajo el microscopio.

Estos criterios de control de maduración, han sido usados por numerosos investigadores.

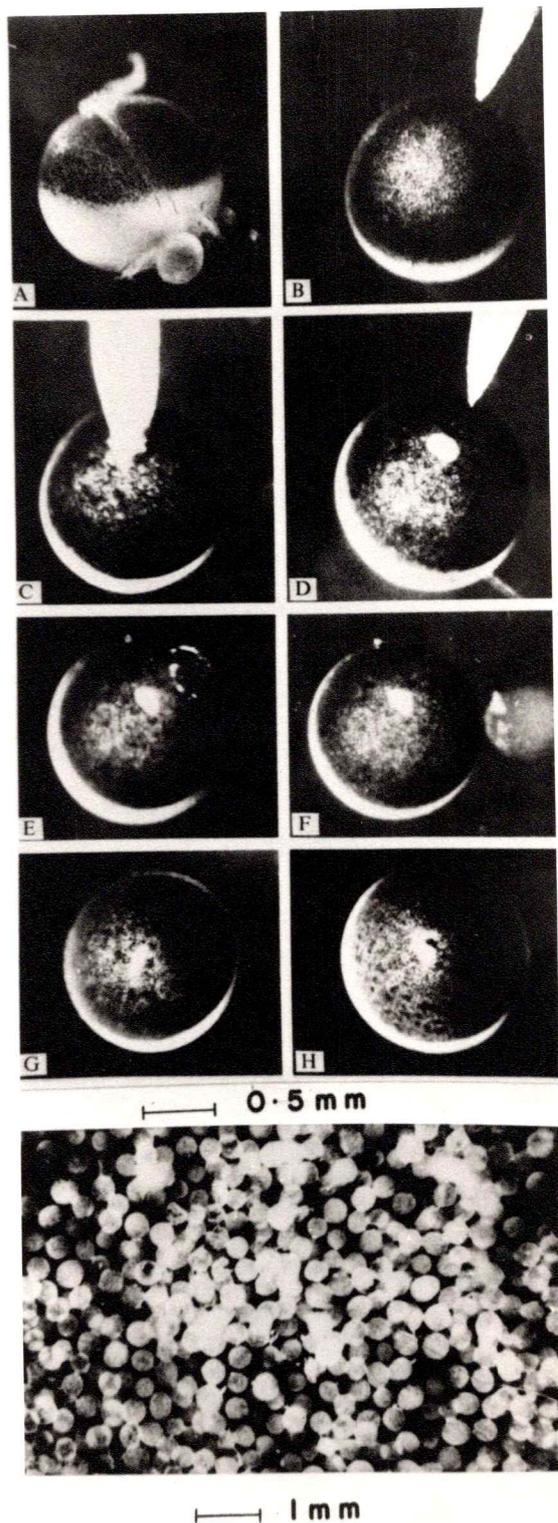


Figura 1

Figura 1

Procedimiento de enucleación de oocitos de Xenopus laevis

A) oocito crecido con las capas foliculares parcialmente removidas; B) y C) aproximación y penetración en el polo animal de una pinza Dumont N° 5; D) oocito con una incisión en el polo animal; E) vesícula germinal emergiendo a través de la incisión; F) oocito anucleado con la vesícula germinal a su lado; G) y H) oocito anucleado con la incisión parcial o totalmente cerrada.

En la parte inferior de la figura se muestra un conjunto de vesículas germinales obtenidas por enucleación manual de los oocitos.

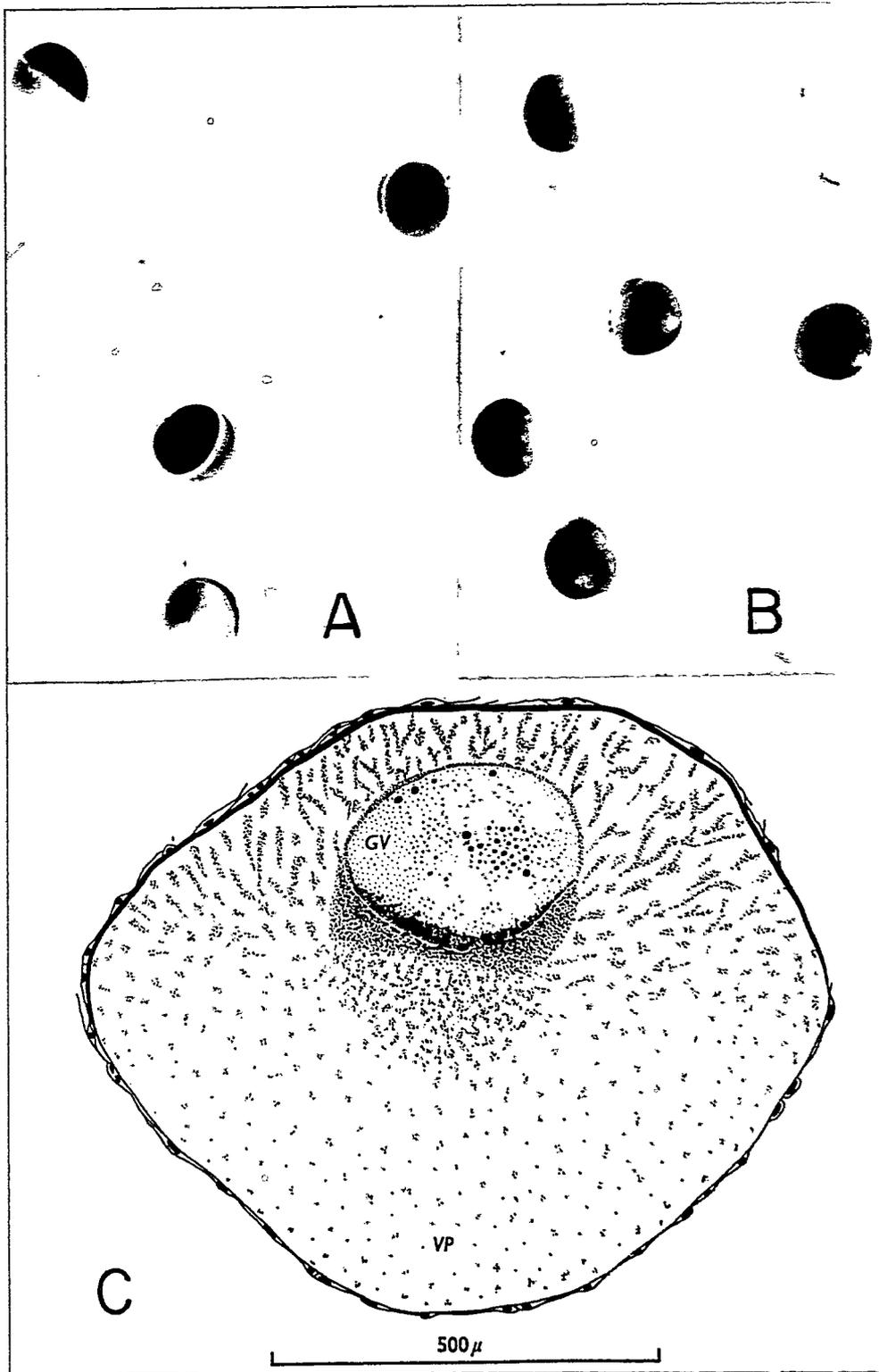


Figura 2

Figura 2

Oocitos de Xenopus laevis

En (A) oocitos crecidos (estado VI) presentando la típica banda ecuatorial; (B), oocitos estimulados con hormona con el punto blanco en el polo animal. En (C) se muestra un corte de oocito donde se puede apreciar el tamaño relativo y ubicación espacial de la vesícula germinal en esta célula; g.v. : vesícula germinal; v.p. : proteínas vitelínicas.

Separación mediante capa fina de aminoácidos

Para detectar interconversión del aminoácido radiactivo que entra al oocito, se utiliza cromatografía bidimensional en capa fina. Para esto se incuban 20 oocitos durante 5 horas con aminoácido radiactivo en solución HF. Una vez finalizada la incubación, se lavan repetidas veces con solución salina, para eliminar el aminoácido radiactivo externo, se homogenizan en 500 ul de HCl 0,1 N y enseguida el homogeneizado se centrifuga a 30.000 rpm por 60 minutos en una centrífuga Spinco, Modelo L, rotor 40. El líquido sobrenadante se liofiliza y resuspende en 15 ul de HCl 0,1 N. De esta solución se usan alícuotas de 5 ul para el corrimiento cromatográfico en Placas MN Poligram Cell 300 UV 254. Para el desarrollo de la cromatografía en la primera dimensión se usa una mezcla de n-butanol: acetona: dietilamina: agua (10: 10: 2: 5); ésto demora aproximadamente 3 horas. La placa se seca a temperatura ambiente y, luego, se hace la cromatografía en la 2a. dimensión usando una mezcla de isopropanol : ácido fórmico : agua (40: 2: 10) durante 3 horas. Enseguida la placa cromatográfica se seca y se pone en contacto con una placa radioautográfica RP X - OMAT, durante 7 días a -70° en la oscuridad. El revelado se hace según los procesos normales de revelado fotográfico.

Normalmente se usó aminoácido radiactivo para observar la ubicación de éste en la placa, como método de control.

Determinación de la actividad fosfodiesterásica in vitro

La actividad fosfodiesterásica se determinó a 21° a menos que se indique lo contrario, usando alícuotas del homogeneizado proveniente de 5 oocitos. La mezcla de reacción contiene los siguientes reactivos a concentración final: Hepes pH 7,0, 50 mM, MgCl₂ 0,1 mM y 0,2 uCi de ³H-cAMP o ³H-cGMP ; volumen final 50 ul. Al final del período de incubación se agregan 5 ul de HCl 0,1 N y se centrifuga la solución a 2.000 g durante 10 minutos. Se toman 5 ul del sobrenadante y se colocan sobre una placa de polietilenimida celulosa (PEI) para cromatografía en capa fina. La placa se desarrolla por cromatografía ascendente, usando como eluyente LiCl 0,5 M, durante 3 a 4 horas (93). En el caso de detección de fosfodiesterasa para cGMP la placa se precorre con Tritón 1 %, se seca y, a continuación, se pone en LiCl 0,5 M. Las áreas correspondientes a marcadores de cAMP o cGMP y 5'-AMP o 5'-GMP, según el caso, se usan para detectar la radiactividad usando Aquasol 2 como un sistema para contar muestras líquidas.

Análisis de distribución intracelular de fosfodiesterasas

Para poder estudiar la distribución intracelular de fosfodiesterasas, se utiliza el homogeneizado procedente de 120 oocitos (totalmente crecidos) en 0,5 ml de la mezcla de reacción descrita en el párrafo anterior. El homogeneizado

se centrifugó a 105.000 g. por 60 minutos. Se sacó el líquido sobrenadante y el precipitado se lava, centrifuga y resuspende en 0,5 ml de solución para el ensayo. La actividad del sobrenadante y precipitado se detecta en las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior.

Análisis cromatográfico de fosfodiesterasas

Se utilizan 3 gramos de ovario de una hembra adulta de Xenopus laevis que se homogenizan en 6 ml de una solución Hepes 0,05 M pH 6,8, Mg Cl₂ 5 mM, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 3 mM. El homogeneizado resultante se sonica durante 3 minutos en un sonicador Biosonic III y luego centrifuga durante 1 hora a 105.000 g. El líquido sobrenadante se pone en una columna de celulosa DE-52 (0,3 x 3 cm) que se lava con 3 ml de la solución empleada para la homogenización. La elución de la muestra se realiza utilizando una gradiente lineal de acetato de sodio entre 0 y 1 M en un volumen total de 5 ml del mismo tampón de homogenización. Se colectan fracciones de 50 ul. Para la detección de la actividad fosfodiesterásica se usa la fracción completa, adicionándole 1 ul de ³H-cAMP (0,2 uCi) a una concentración final de 0,1 mM. La incubación se realiza durante 30 minutos a 21°. La reacción se detiene mediante la adición de 5 ul de HCl 0,1 N. Fracciones de 5 ul se analizan por cromatografía en capa fina, como se describió anteriormente.

Determinación de cAMP

Para medir los niveles de cAMP en oocitos y vesículas germinales aisladas se usa el método de Gilman (94). Este método se basa en la especificidad para unir cAMP de una preparación semipurificada de músculo de vaca. Esta preparación es bastante estable a bajas temperaturas, lo cual permite conservarla durante 10 a 12 meses a -80° .

Para determinar los niveles de cAMP en los oocitos, se colocan grupos de 10 oocitos en HCl 0,01 N, y se homogenizan con una bagueta de vidrio. El homogeneizado se liofiliza hasta sequedad y se resuspende en 200 ul de tampón acetato de sodio 0,05 N pH 4,0. Se toman 100 ul de esta suspensión, se agregan 200 ul de acetato de sodio 0,05 N pH 4,0, 100 ul de H^3 -cAMP y la proteína específica para unir cAMP (15-25 ul). La mezcla se incuba durante 1 hora a 2° y la reacción se detiene agregando 1 ml de tampón fosfato 0,02 N pH 6,0 frío. Se agita y deja durante 15 minutos más a 2° . Enseguida se filtra a través de filtros miliporos lavando 5 veces con 2 ml del tampón fosfato frío cada vez. La radiactividad retenida en los filtros se detecta con un contador de centelleo líquido.

El procedimiento para medir los niveles de cAMP en núcleo es idéntico al descrito para oocitos con la única diferencia que se usan 20 núcleos por muestra analizando el volumen total. En todos los experimentos se realizan curvas

de calibración, usando diversas cantidades de cAMP frío para ver la linealidad de la determinación.

Análisis de proteínas fosforiladas

Con el objeto de detectar la fosforilación de proteínas totales en oocitos, se utiliza P^{32} -ATP como donador de grupos fosfato. Los oocitos se inyectan con 50 nl de P^{32} -ATP (2,0 uCi), y se incuban en solución HF a 21°. La reacción se detiene con 2 ml de TCA 10 % frío y luego se homogeniza en presencia de ATP 10^{-4} M (para disminuir al máximo los blancos). Se filtra por filtros miliporo y se lavan repetidas veces con TCA 10 % frío. Los filtros se secan y la radiactividad se mide en un contador para centelleo líquido. Los resultados representan el promedio de determinaciones en duplicado, que en general no difieren en más de un 10 %. Para analizar por electroforesis la radiactividad incorporada a proteínas se toman 10 a 15 oocitos y se homogenizan en la solución para electroforesis que se describirá posteriormente.

Para medir fosforilación de proteínas en vesículas germinales se incuban 10 v.g. en 100 ul de solución HF con 1 uCi de P^{32} -ATP a 21° y luego se procesan en forma idéntica a la descrita para oocitos, tanto para medir incorporación a proteínas totales como para separar las proteínas marcadas por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las proteínas radiactivas de los geles se determinan por fluorografía.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis se realiza en condiciones desnaturantes, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1 %. Se emplea electroforesis discontinua en geles de acrilamida al 9 % en placa de 20 x 20 cm por 1,6 mm de espesor (11). La acrilamida y bisacrilamida se recristalizan antes de usar empleando para ello cloroformo y acetona, respectivamente.

Se homogenizan 10 oocitos en 100 ul de una solución Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 Na₂ EDTA 0,01 M. El homogenizado se centrifuga a 5.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El líquido sobrenadante se separa cuidadosamente para evitar la capa lipídica, y se mezcla con 50 ul de una solución de mercaptoetanol 20 %, SDS 3,2 %, glicerol 20 % y azul de bromo fenol 0,002 %. Esta mezcla se calienta a 100° durante 5 minutos y se centrifuga a 5.000 g por 10 minutos. El volumen de muestra que se coloca en el gel no debe exceder de 75 ul. La composición del gel de concentración es acrilamida 3 %, bisacrilamida 0,15 %, TEMED 0,1 % y persulfato de amonio 0,2 %. El gel de resolución se compone de acrilamida 9 %, bisacrilamida 0,05 %, TEMED 0,05 %, persulfato de amonio 0,1 % y Tris-HCl 0,01 M, pH 8,8. La electroforesis se realiza a una intensidad de 50 mA, durante 4 a 5 horas, usando una fuente de poder de intensidad constante. El tampón de electroforesis es Tris-glicina 0,2.M, pH 8,8 con SDS 0,1 %.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se saca el gel y se tiñe por inmersión durante 2 horas en solución de azul de coomasie 0,1 % en ácido acético 7,5 % y metanol 45 %. El gel se saca de esta solución y se coloca en solución para desteñir, metanol 45 % y ácido acético 7,5 %, que se cambia frecuentemente para lograr un desteñido rápido, demorándose alrededor de 6 horas. Con el fin de detectar la radiactividad en las proteínas separadas por la electroforesis, se usa la técnica de fluorografía descrita a continuación.

Fluorografía

Este método descrito recientemente por Bonner y Laskey (95) y Laskey y Mills (96), tiene la gran ventaja de poder detectar muy pequeña cantidad de radiactividad incorporada a proteínas. Se basa principalmente en el uso de PPO, un centelleador en el cual se embebe el gel o cualquier otro soporte que contenga la muestra a analizar. Una vez embebido el soporte se seca y se coloca en contacto con una placa radiográfica de alta sensibilidad, a la oscuridad y a baja temperatura.

El procedimiento, en detalle, es el siguiente: inmediatamente después de finalizada la electroforesis o de la tinción del gel, este se sumerge durante 30 minutos en un volumen 20 veces mayor de dimetilsulfóxido; seguido de

una segunda inmersión de 30 minutos en dimetilsulfóxido fresco. Enseguida se coloca por 3 horas en 4 veces su volumen de PPO 20 % (p/p) en solución de DMSO 22,2 % (p/V). Luego se pone el gel en un volumen de agua 20 veces su volumen, durante 1 hora. Una vez terminada esta operación se procede a secar el gel al vacío, para lo cual el gel se coloca sobre papel Whatman N°3, se cubre con plástico y se coloca sobre una placa porosa dentro de una bolsa plástica al vacío sobre vapor de agua (este proceso de secado demora alrededor de 1 hora). Una vez seco el gel se pone en contacto con una placa de rayos X (RP Royal X-Omat) u otra equivalente y se guarda en la oscuridad a -70° , durante el tiempo necesario. Esto depende de la radiactividad de la muestra analizada; normalmente el tiempo usado para ^3H - proteínas es de 10 a 15 días, y para ^{14}C -proteínas entre 5 y 10 días.

El revelado de la placa se hace de acuerdo a los procesos fotográficos usuales. El registro densitométrico de la placa se hace a 540 nm en un densitómetro para geles Canalco.

Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida

Para poder resolver con mayor eficiencia las proteínas del oocito se usa la técnica descrita por O'Farrell (97), modificada por Gurdon y col. (98). Esta técnica consiste en

correr la muestra en la primera dimensión en un gel cilíndrico 13 cm x 2,5 mm de una concentración final de acrilamida 3,8 %, bisacrilamida 0,20 %, urea 9,2 %, TEMED 0,07 %, persulfato de amonio 0,01 % y anfolitos con un rango de pH de 3,5-10 y 5-8 al 2 %.

Los oocitos se homogenizan en 100 ul de una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, Mg Cl₂ 5 mM, RNasa y DNasa 100 mg/ml; el homogenizado se incuba durante 15 minutos a 0° y a 27° por otros 15 minutos. Luego se centrifuga a 3.000 g por 15 minutos, se separa el líquido sobrenadante al que se le agrega urea hasta una concentración final de 9 M. La muestra así obtenida se coloca sobre el gel que se ha corrido, previamente, durante 15 minutos a 200 volts/tubo, 30 minutos a 300 volts/tubo y 30 minutos a 400 volts/tubo. Los medios de electroforesis usados son NaOH 0,02 M y H₃ PO₄ 0,01 M. La electroforesis se realiza durante 18 horas a 400 volts/tubo. Una vez finalizada la corrida, el gel se sumerge durante 90 minutos en una solución de Tris-HCl 0,0265 M pH 6,8, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5 % y SDS 2,3 %. Este gel, así procesado, se coloca sobre un gel de resolución de placa de acrilamida 15 %, bisacrilamida 0,075 %, SDS 0,1 %, TEMED 0,05 %, persulfato de amonio 0,1 %, Tris-HCl 0,01 M pH 8.° El gel de concentración contiene acrilamida 5 %, bisacrilamida 0,25 %, TEMED 0,1 %, persulfato de amonio 0,2 %, SDS 0,1 %, pH 6,8. Se corre durante 4 a 5 horas a 50 mA. El procedimiento

posterior es idéntico al descrito para electroforesis en una dimensión.

FUENTE DE LOS MATERIALES

Acido Acético	Merck
Acido Clorhídrico	Merck
Acido Fosfórico	Calbiochem
Acido Perclórico	Merck
Acido Tricloroacético	Merck
Aminoácidos Radiactivos	New England Nuclear
Anfolitos	LKB
^{32}P - ATP	New England Nuclear
Bis-acrilamida	Sigma
Cicloheximida	Sigma
Cloruro de Calcio	Baker
Cloruro de Litio	Merck
Cloruro de Magnesio	Baker
Cloruro de Potasio	Baker
Cloruro de Sodio	Sigma
DEAE-celulosa	Sigma
Dimetil Sulfoóxido	Merck
2,4 - dinitrofenol	Merck
Dodecil-sulfato de sodio	Sigma
EDTA- Na_2	Sigma
Filtros de lana de vidrio	Whatman
Filtros de nitrocelulosa	Millipore
Fosfodiesterasa de veneno de serpiente	Sigma

Glicerol	Merck
Glicina	Sigma
Gonadotropina coriónica humana	Sigma
Hepes	Sigma
Hidróxido de sodio	Merck
L - aminoácidos	Sigma
2-Mercaptoetanol	Sigma
Metanol	Merck
³⁵ S - metionina	Amersham
Nitrato de lantano	Fischer
N,N,N,N, TEMED	Sigma
Nucleótidos	Sigma
Nucleótidos cíclicos	Sigma
Nucleótidos cíclicos radiactivos	New England Nuclear
Omnifluor	New England Nuclear
Ouabaina	Sigma
Papaverina	Sigma
Persulfato de amonio	Sigma
Placa fina de Poligram	Merck
Cel 300 PEI (polietileneimina)	
Poliacrilamida	Sigma
PPO	Sigma
Progesterona	Calbiochem
Pronasa	Sigma
Puromicina	Sigma
Sulfato de amonio	Sigma

Testosterona	Sigma
Tricafina metanosulfonato	Sigma
Tris (base)	Sigma
Tritón X-100	Sigma
Urea	Merck

- - - - -

Amersham	Amersham Searle Co., Illinois, U.S.A.
Baker	Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., U.S.A.
Calbiochem	Calbiochem, San Diego, California, U.S.A.
Fischer	Fischer Scientific Company, St. Louis, U.S.A.
LKB	LKB Produkter A.B. Stocolmo, Suecia
Merck	Merck, Darmstadt, Alemania
Millipore	Millipore, Bedford, Mass., U.S.A.
New England Nuclear	New England Nuclear, Boston, Mass. U.S.A..
Sigma	Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.
Whatman	Whatman, W. and R. Balston, Ltd., Inglaterra

RESULTADOS

Capítulo Primero

Condiciones que afectan la síntesis de proteínas en oocitos de anfibio

A. Concentración externa de aminoácido

La Figura 3 muestra la influencia directa de la concentración externa de aminoácido en su incorporación a proteínas en oocitos de X. laevis. Es claro, de estos resultados, que existen diferencias entre los aminoácidos estudiados. Tirosina a una concentración de 0,5 mM se incorpora a la máxima velocidad, mientras que treonina, a la misma concentración, sólo se incorpora a proteínas al 60 % de su velocidad máxima. Por otra parte, el ácido aspártico no se incorpora a la velocidad máxima aún a concentraciones de 3 mM. Este resultado demuestra que existe una relación directa entre la concentración de aminoácido en el medio externo y su incorporación a proteínas en un amplio rango de concentraciones. Dos factores principales podrían explicar los resultados obtenidos: a) la velocidad de entrada del aminoácido radiactivo al oocito y b) la posible dilución isotópica que el aminoácido experimentaría con los "pooles" internos de la célula.

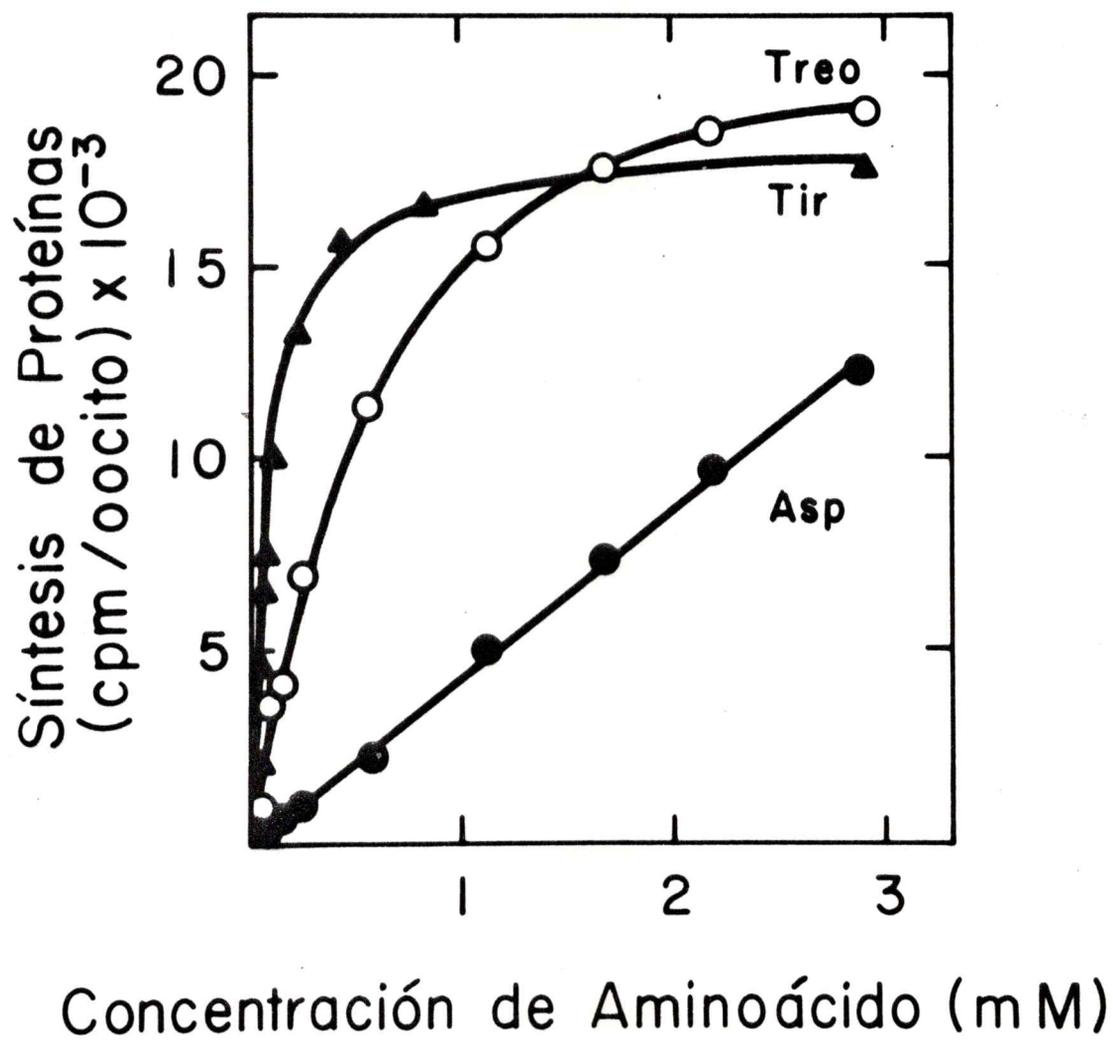


Figura 3

Figura 3

Efecto de la concentración de aminoácido en la velocidad de incorporación en oocitos de Xenopus laevis.

Grupos en duplicado de 5 oocitos se incubaron durante 2 horas a 20° en solución HF con los distintos aminoácidos. La incorporación de aminoácidos se determinó según lo descrito en Métodos. Cada punto representa el promedio de los duplicados. Los aminoácidos usados fueron ^{14}C -ácido aspártico (●), actividad específica 135 uCi/umol; ^{14}C -treonina (○), actividad específica 186 uCi/umol; y ^{14}C -tirosina (▲), actividad específica 476 uCi/umol.

Con el objeto de ver si el aumento de la concentración externa del aminoácido producía un estímulo en la entrada de éste y, por consiguiente, una mayor incorporación a proteínas, se realizó el experimento que se describe en la Figura 4. Se usó como aminoácido radiactivo ^{14}C -leucina a 3 concentraciones diferentes para ver el efecto en la cinética de entrada y síntesis de proteínas en oocitos de X. laevis (4A, 4B) y C. caudiverbera (4C, 4D). Se observa que existe una relación clara entre la concentración de aminoácido radiactivo en el medio externo, velocidad de entrada, e incorporación a proteínas en ambos tipos de oocitos usados.

En la Tabla I se compara la entrada de los diferentes aminoácidos, su incorporación a proteínas y los "pooles" de aminoácido libre encontrado en oocitos de X. laevis y C. caudiverbera con el fin de estudiar la posible dilución isotópica que experimentarían diferentes aminoácidos radiactivos dentro del oocito. Para realizar la determinación de los "pooles" de aminoácido en oocitos, se aislaron manualmente 2000 oocitos crecidos (estado VI) provenientes de 3 animales diferentes, y se procesaron como se describe en Métodos. Más adelante se discutirán estos resultados con respecto a la capacidad que poseen estas células para concentrar los aminoácidos respecto al medio externo.

En la última columna de la Tabla I se muestran los picomoles de aminoácido incorporado a proteína por oocito y por

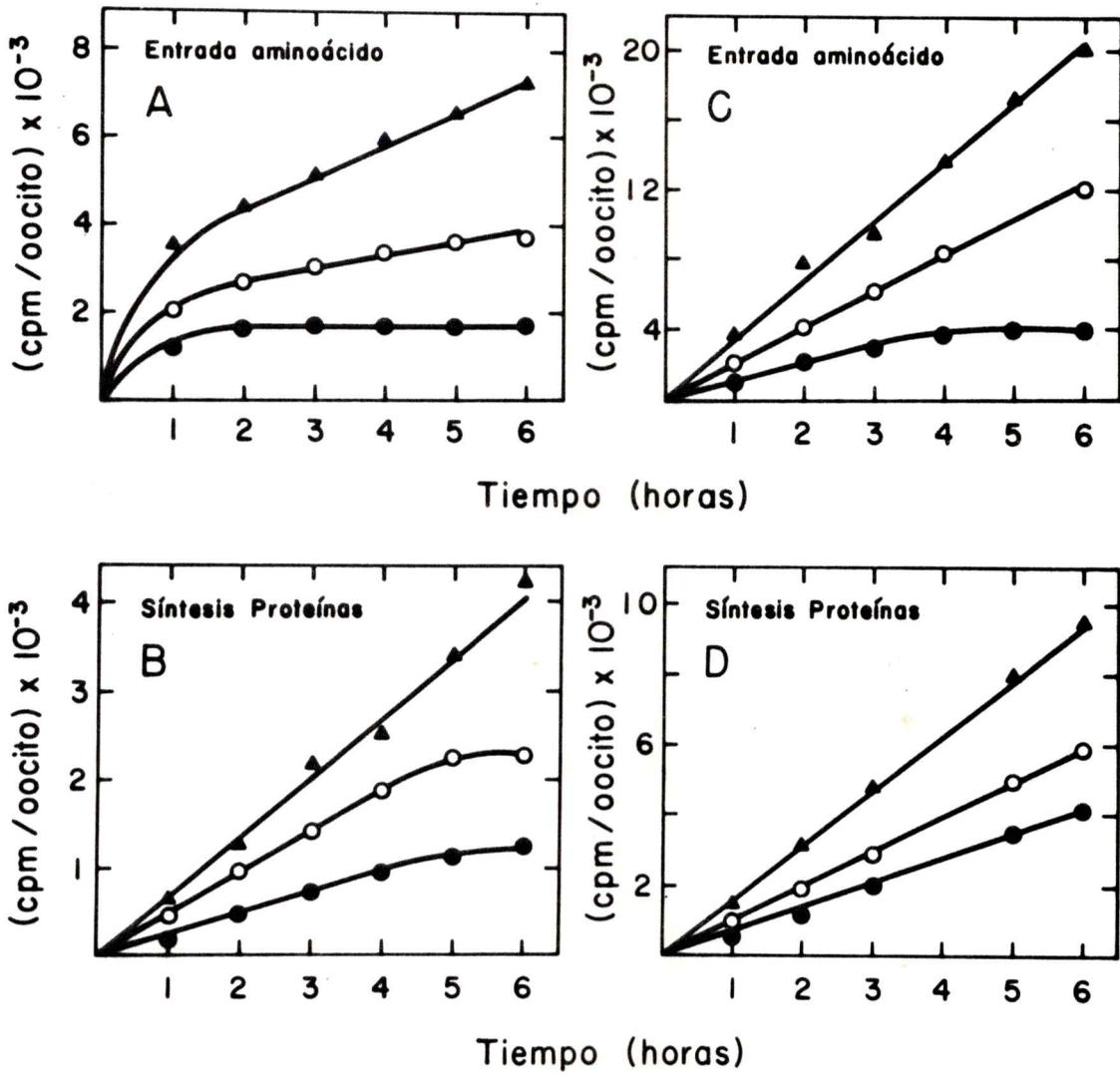


Figura 4

Figura 4

Efecto de la concentración de aminoácido en entrada e incorporación a proteínas en oocitos de anfibio.

Grupos en duplicado de 5 oocitos provenientes de Xenopus laevis, o de 3 oocitos provenientes de C. caudiverbera se incubaron a 20° en solución HF en presencia de ^{14}C -leucina a distintas concentraciones. (A) y (B), efecto de concentración de aminoácido en entrada e incorporación a proteínas en oocitos de X. laevis respectivamente. (C) y (D), efecto de concentración de aminoácido en entrada e incorporación a proteínas en oocitos de C. caudiverbera respectivamente. Concentraciones de aminoácido usadas : $0,9 \times 10^{-5}\text{M}$ (●); $1,8 \times 10^{-5}\text{M}$ (○) y $3,6 \times 10^{-5}\text{M}$ (▲). El análisis de entrada y síntesis de proteínas se realizó como se describe en Métodos.

TABLA I

Incorporación de aminoácidos a proteína
 en oocitos de X. laevis y C. caudiverbera

Oocitos	Aminoácidos	A a.e.	B cpm/ oocito	C cpm/ oocito	D pmol/ oocito	E pmol/hr. oocito
XENOPUS	Arginina	340	1.590	660	320	218
	Leucina	277	1.560	950	210	339
	Alanina	138	2.000	1.000	115	121
	Treonina	186	4.000	710	160	38
	Ac.Glutámico	273	720	20	2.200	-
	Prolina	227	9.000	1.370	24	8
	Ac.Aspártico	135	410	95	450	-
	Lisina	285	5.640	585	260	33
	Tirosina	476	3.000	1.400	53	45
Fenilalanina	465	2.010	1.110	60	70	
CAUDIVERBERA	Leucina	277	2.233	1.200	220	269
	Alanina	138	1.165	500	215	184
	Isoleucina	313	4.080	1.750	270	155
	Lisina	388	5.000	1.000	128	35
	Ac.Glutámico	203	330	20	6.124	-
	Tirosina	208	2.000	500	70	25

A actividad específica de los ¹⁴C-aminoácidos usados, expresada en uCi/umol. En B aparecen los valores de entrada del aminoácido. La columna C son los valores de incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas. En D aparecen los

(Cont. Tabla I)

valores de aminoácido libre en el oocito. La columna E es la cantidad de aminoácido incorporado a proteínas considerando la dilución isotópica del aminoácido radiactivo en el "pool" interno del oocito.

La entrada de aminoácido radiactivo y su incorporación a proteínas se analizó como se describe en Métodos. Los valores de aminoácido libre representan el promedio de 3 determinaciones realizadas según se describe en Métodos.

hora, fueron calculados suponiendo que el aminoácido radiactivo se diluye en el "pool" de aminoácido interno antes de incorporarse a proteínas. De esta tabla, es evidente que, tanto ácido glutámico como aspártico, tienen comportamiento diferente comparado al resto de los aminoácidos. Su entrada es muy baja y la incorporación a proteínas es aún menor, debido a los inmensos "pooles" internos de estos aminoácidos en los oocitos. Desde el punto de vista práctico, los resultados de la Tabla I indicarían qué aminoácidos debieran usarse, preferentemente, para obtener proteínas marcadas en oocitos. Pareciera ser que tirosina y fenilalanina fueran uno de los más indicados, ya que entran al oocito con gran facilidad y están presentes, en esta célula, en concentraciones relativamente bajas.

B. Influencia de temperatura, pH y concentración de ión magnesio sobre la síntesis proteica y la captación de aminoácidos.

En la Figura 5 se muestra el efecto de temperatura en la cinética de entrada de aminoácido y síntesis de proteína en oocitos de X. laevis y C. caudiverbera. Los resultados obtenidos para los oocitos de ambas especies es muy similar. La temperatura tiene un drástico efecto en ambos procesos. La temperatura óptima, después de 5 horas de incubación, resultó ser 20°. Sin embargo, los fenómenos de captación de aminoácido e incorporación a proteínas están claramente disociados, ya que al comienzo de la incubación (1 y 2 horas)

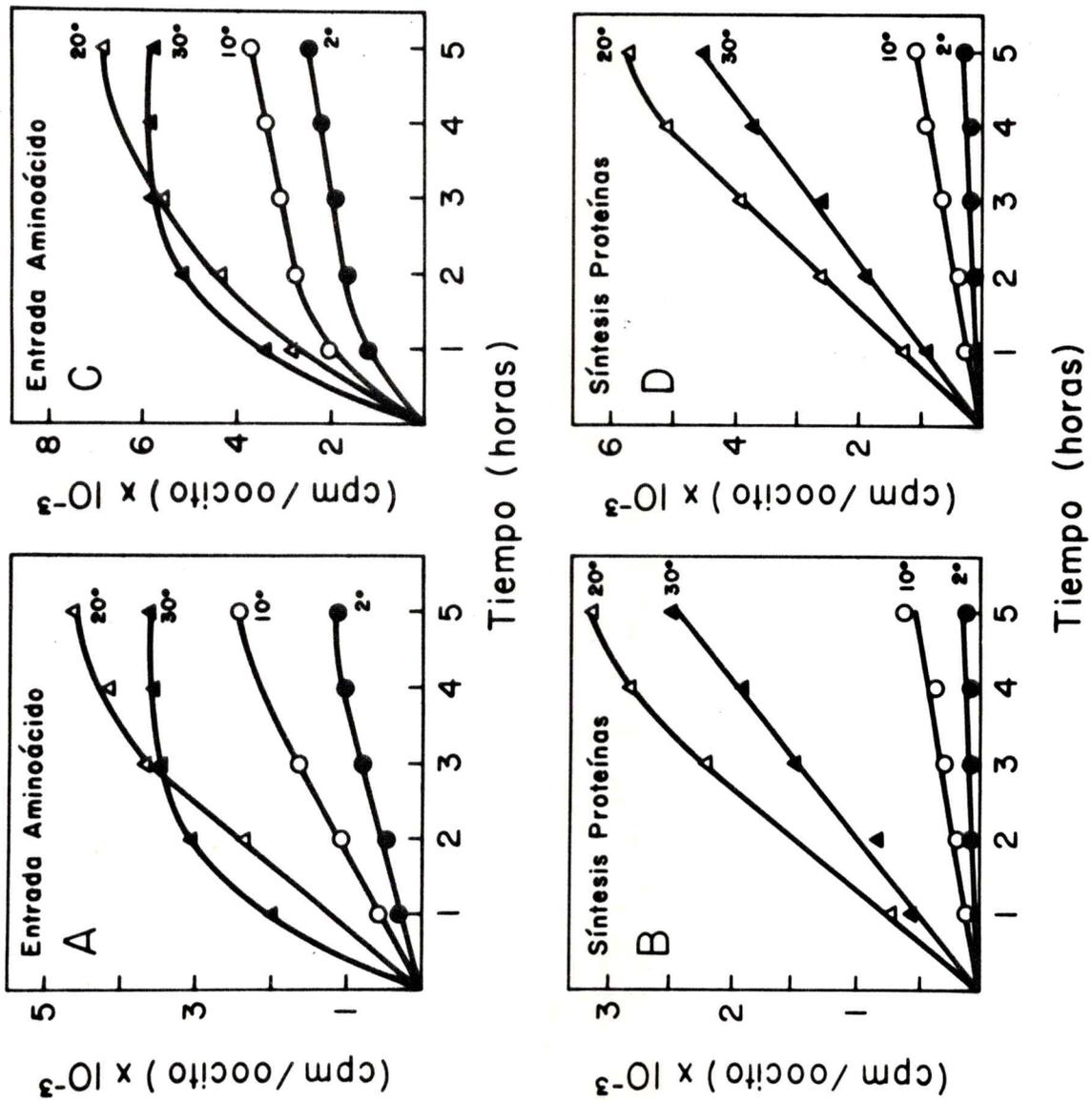


Figura 5

Figura 5

Efecto de temperatura en la entrada de aminoácidos e incorporación a proteínas en oocitos de anfibio.

Grupos en duplicado de 5 oocitos de X.laevis se incubaron en HF con ^{14}C -leucina, actividad específica ca 277 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ a una concentración de 18,5 μM a las temperaturas indicadas para ver entrada de aminoácidos (A) y síntesis de proteínas (B). Idénticas condiciones fueron usadas para ver la entrada de aminoácido (C) y síntesis de proteínas (D) en grupos en duplicado de 3 oocitos de C.caudiverbera. Los ensayos de entrada y síntesis de proteínas se realizaron según se describe en Métodos.

la entrada de aminoácido es más rápida a 30° que a 20°, mientras que la síntesis de proteínas es mayor a 20°. También la razón entre la velocidad de entrada a 20° y a 10° es 2,2, mientras que la razón a las mismas temperaturas para síntesis de proteínas es de 7,5. Este resultado es interesante por el hecho que, en general, en procariotes y en células de mamíferos las temperaturas óptimas de incubación para la síntesis de proteínas y división celular son mayores que 30°. Un interesante efecto se observa a bajas temperaturas (2°, Figura 5A). A esta temperatura las células son permeables a aminoácido, pero son incapaces de concentrarlo con respecto al medio externo.

Los resultados presentados en la Figura 6 muestran el efecto del pH en la entrada de aminoácido y su incorporación a proteínas en ambos tipos de oocitos de anfibio. En este caso, se observa una cierta diferencia en el comportamiento de los oocitos de las dos especies. No hay un efecto significativo del pH, en ninguno de los procesos, en los oocitos de C. caudiverbera (6C y 6D). Sin embargo, se pueden observar claros efectos del pH del medio en la síntesis de proteínas en oocitos de X. laevis (6B) y una influencia menor en la entrada de aminoácidos (6A). En los oocitos de X. laevis se observa más del doble de incorporación a proteínas a pH 8,5 que a pH 6,5 o 7,0. La diferencia entre estas especies puede deberse a la distinta capacidad de los

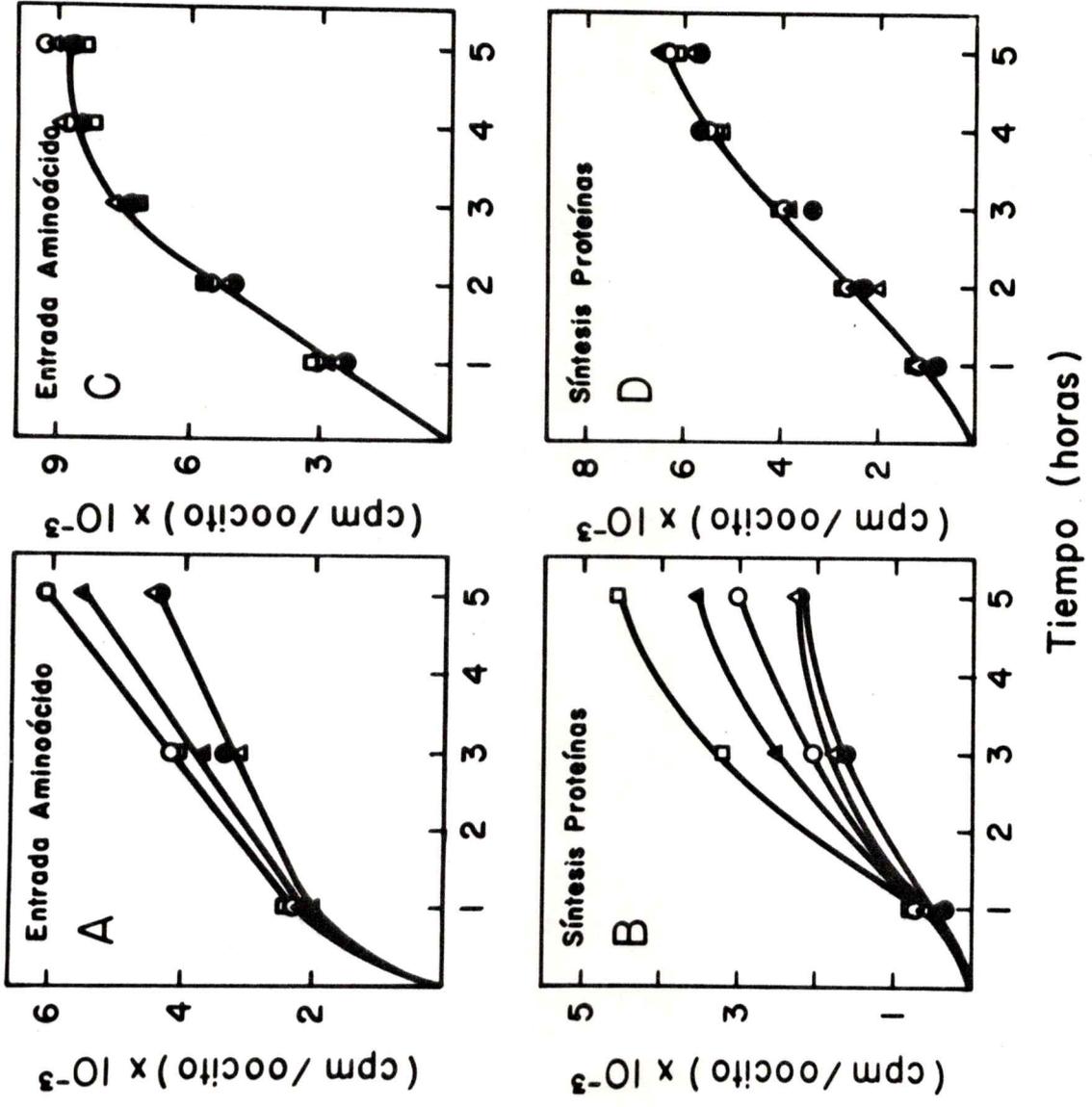


Figura 6

Figura 6

Efecto del pH en la entrada de aminoácido y síntesis de proteínas en oocitos.

Cinco oocitos de X. laevis se incubaron a 20° con ¹⁴C-leucina a una concentración de 18,5 uM durante los tiempos indicados y se midió la entrada (A) y síntesis de proteínas (B) según se describe en Métodos. Los oocitos fueron preincubados durante 2 horas a los diferentes pH antes de la adición del aminoácido radiactivo. Experimentos similares se realizaron con oocitos de C. caudiverbera usando ¹⁴C-isoleucina a una concentración 10 uM viendo la entrada del aminoácido (C) y la síntesis de proteínas (D). El medio de incubación estaba tamponado con N-2-hidroxietil-piperazima-N'2-etanosulfónico (Hepes) 20 mM pH 6,5 (●); pH 7,0 (△); pH 7,5 (○); pH 8,0 (▲); pH 8,5 (□).

dos tipos de oocitos para mantener el pH del medio intracelular.

El efecto de la concentración de ión magnesio en el medio de incubación sobre la entrada de aminoácido y síntesis de proteínas, se muestra en la Figura 7. Como se puede observar en la Figura 7A, la síntesis de proteínas en oocitos de X. laevis es fuertemente estimulada por el ión magnesio; esta estimulación es alrededor de 7 veces, entre el rango de 0,05 a 1 mM de ión magnesio.

En C. caudiverbera (Figura 7B) se observa un aumento de aproximadamente 2 veces dentro del mismo rango de concentración de Mg^{++} . Pareciera ser que estos oocitos no son tan dependientes de Mg^{++} , ya que aún a concentraciones de 0,02 mM de este ión, la incorporación del aminoácido a proteínas es bastante considerable. El aumento en la síntesis de proteínas, en oocitos de ambos tipos de anfibio, no se debe a un estímulo en la velocidad de entrada del aminoácido, ya que, como se demuestra en las figuras 7A y 7B ésta permanece constante en todo el rango de concentración de ión Mg^{++} estudiado.

Los resultados anteriores demostrarían que los oocitos de anfibio, especialmente los de X. laevis, son incapaces de mantener una concentración óptima de Mg^{++} , y serían, por lo tanto, fuertemente afectados por las variaciones en los niveles de Mg^{++} del medio externo que los rodea. Además, es interesante el hecho que el ión magnesio es indispensable para mantener

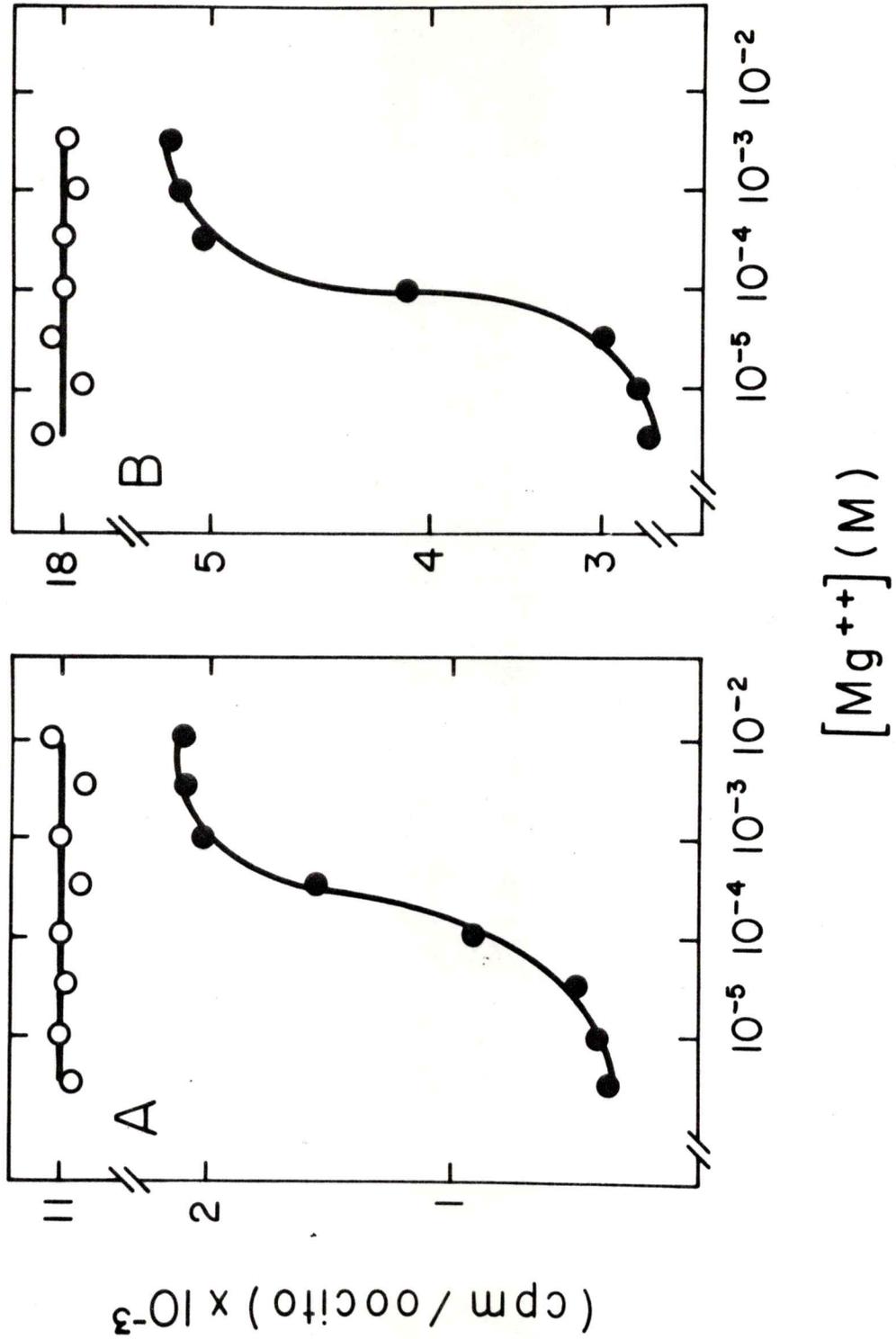


Figura 7

Figura 7

Efecto de la concentración del ión magnesio en la entrada de aminoácido y síntesis de proteínas en oocitos de anfibio.

Se usó ^{14}C -arginina, actividad específica 340 uCi/umol, a una concentración de 10 uM. (A), efecto de la concentración de magnesio en la entrada de aminoácido (○) y síntesis de proteínas (●) en oocitos X. laevis. (B), el mismo efecto en oocitos de C. caudiverbera. En ambos casos la incubación se realizó a 20° durante 3 horas. Todos los ensayos se realizaron como se describe en Métodos.

la estructura celular del oocito, ya que su ausencia en el medio de incubación produce una lisis celular, al cabo de corto tiempo.

C. Estabilidad de las células y degradación de las proteínas sintetizadas por el oocito.

Con los datos obtenidos anteriormente se quiso ver cuál sería el efecto de mantener in vitro trozos de ovario aislados, en las condiciones óptimas de incubación, sobre la entrada de aminoácido y síntesis de proteínas en oocitos. Las temperaturas escogidas para el cultivo del ovario fueron de 4° y 20° porque 20° es la temperatura óptima encontrada para síntesis de proteínas y 4° es la temperatura a la que la biosíntesis de proteínas está fuertemente disminuída, lo cual podría conservar, con mayor facilidad, a estas células en estado viable. Los oocitos se aislaron del ovario en cultivo a diferentes tiempos, y se incubaron durante 5 horas con ^{14}C -leucina, determinándose la entrada de aminoácido y síntesis de proteína (Figura 8). Se puede observar que la síntesis de proteínas (8A) en oocitos se mantiene en su nivel normal, sólo durante las primeras 24 horas de cultivo, tanto a 4° como a 20°. Algo muy similar acontece con la entrada de aminoácido (8B), la cual es prácticamente idéntica después de 24 horas de preincubación; pero cae bruscamente a las 48 horas, a ambas temperaturas.

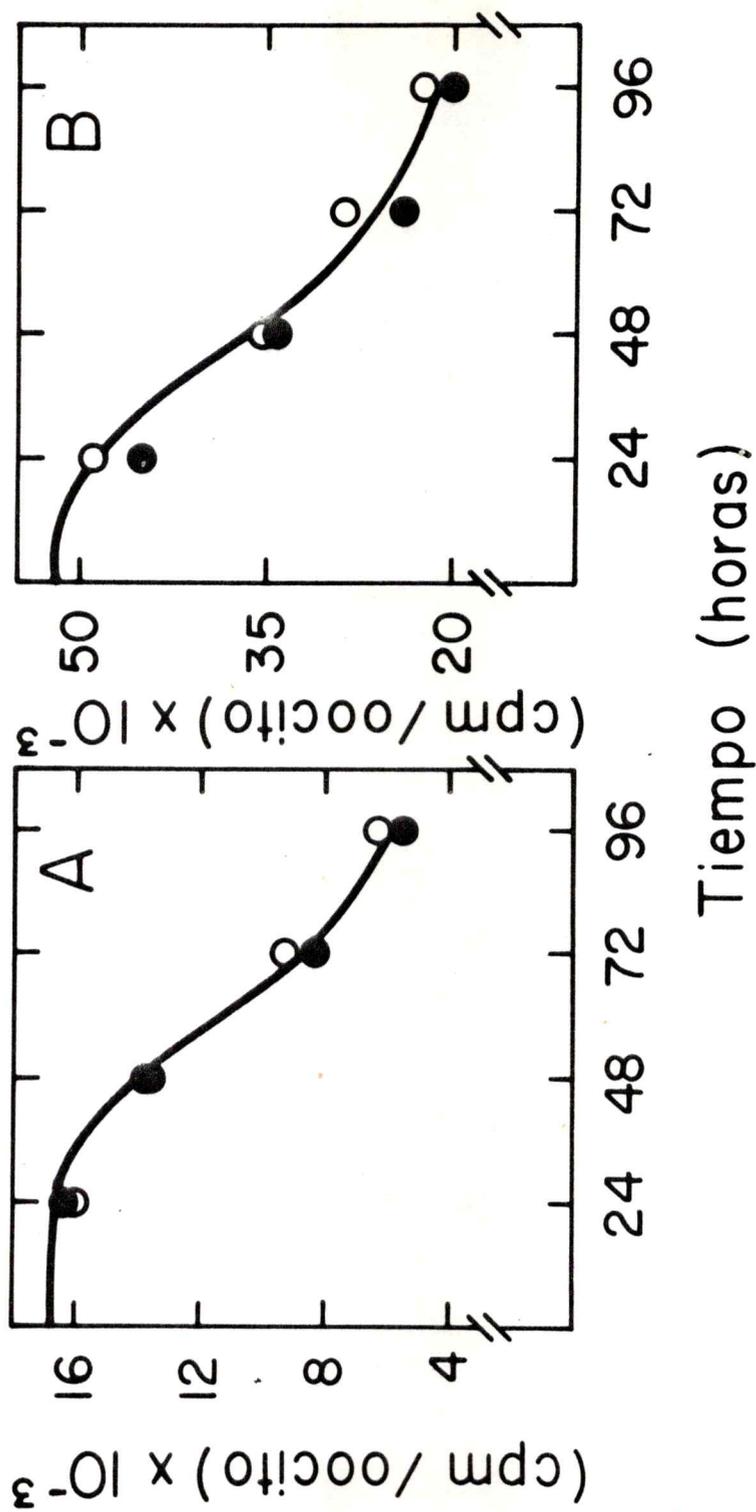


Figura 8

Figura 8

Efecto del cultivo de ovario en solución HF sobre la captación de aminoácidos y síntesis de proteínas.

Se usó ^{14}C -leucina, actividad específica 277 uCi/umol, a una concentración de 18 uM. Los oocitos se aislaron del ovario en solución HF en el tiempo indicado y se incubaron con ^{14}C -leucina durante 5 horas a 20°. En (A) se muestra la incorporación de radiactividad a proteínas de oocitos provenientes de ovarios mantenidos en solución HF a 4° (○) y a 20° (◉). En (B) se observa la entrada de aminoácido a 4° (○) y a 20° (◉). La síntesis de proteínas y entrada de aminoácido se analizó de acuerdo a lo descrito en Métodos.

Los resultados descritos indicarían que sólo es conveniente guardar trozos de ovario en solución HF hasta 24 horas después de extraídos del animal, ya que las capacidades de captación e incorporación de aminoácido a proteínas disminuye notablemente después de este período. Además, por el aspecto morfológico externo de las células, es más conveniente mantenerlos a 20° que a bajas temperaturas, aún cuando el efecto de la incubación sea el mismo a temperaturas más bajas.

Con el objeto de ver si el oocito estaría degradando en forma rápida sus proteínas al estar en cultivo, se incubaron estas células durante 14 horas en presencia de ^{14}C -leucina. Enseguida se lavaron repetidas veces en solución HF y se dejaron en un medio que contenía leucina 10^{-4}M no radiactiva, para evitar la posible reutilización del aminoácido radiactivo incorporado a proteínas, hasta un período de 42 horas (Figura 9). Como se observa en 9A el oocito sería incapaz de degradar las proteínas que se estarían sintetizando al menos durante 42 horas después de su síntesis. Para poder determinar si realmente no estaba ocurriendo una degradación específica de ciertas proteínas, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas radiactivas antes y después de 42 horas de incubación (Figuras 9B y 9C). Se puede ver, por el perfil densitométrico que no existiría una degradación notoria de alguna de las proteínas radiactivas,

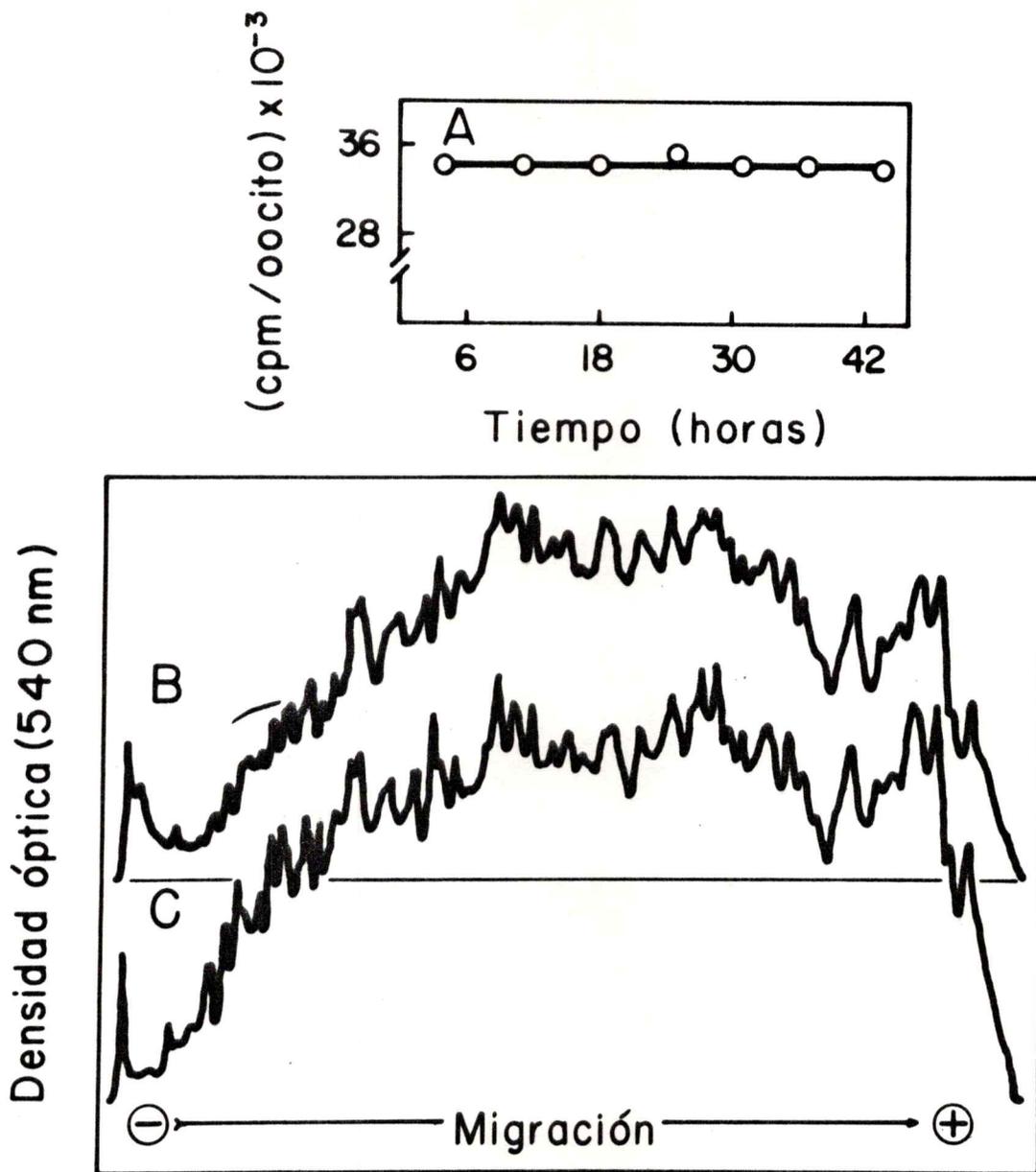


Figura 9

Figura 9

Degradación de proteínas en oocitos de Xenopus laevis

A) grupos de oocitos se incubaron a 20° con ^{14}C -leucina, actividad específica 277 uCi/umol a una concentración de 19 uM durante 14 horas. Luego se lavaron, exhaustivamente con solución HF y se dejaron incubando en presencia de leucina 10^{-4}M no radiactiva. La radiactividad incorporada a proteínas se detectó según se describe en Métodos; B) para realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida, se incubaron oocitos en las mismas condiciones anteriores, pero durante 24 horas. La muestra utilizada provenía de 10 oocitos procesados según se describe en Métodos. El trazado densitométrico pertenece a una placa de rayos X puesta en contacto con el gel durante 3 días a -20° (ver Métodos); y C) perfil densitométrico de una electroforesis de 10 oocitos incubados con ^{14}C -leucina durante 24 horas pero dejados posteriormente durante 42 horas en solución HF con leucina 10^{-4}M no radiactiva. La obtención de la muestra, corrimiento electroforético y procesamiento del gel, se realizó según lo descrito en Métodos.

aún después de 42 horas de ser sintetizadas.

Experimentos realizados con el mismo fin de detectar degradación de proteínas en oocitos se llevaron a cabo incubando células aisladas a 20° hasta por un período de 7 días en solución HF estéril. Análisis densitométrico de geles de poliacrilamida teñidos con azul de coomasie (ver Métodos) no detectaron ningún cambio en las bandas de proteínas solubles del oocito después del prolongado período de cultivo in vitro. Estos datos y los anteriormente señalados apoyarían fuertemente la idea que el recambio de las proteínas sintetizadas por la célula sería muy lento. Sin embargo, la mayor parte de las proteínas del oocito proviene del hígado y dan origen a la fosvitina y vitelina que serían proteínas de reserva. Estas proteínas podrían degradarse para mantener los "pooles" internos de aminoácidos.

La Figura 10 muestra los efectos de diferentes concentraciones de 4 inhibidores de la síntesis de proteínas en oocitos de X. laevis (A) y C. caudiverbera (B). De estos datos es claro que cicloheximida es el inhibidor más efectivo de la síntesis de proteína en estas células. Puromicina y ácido fusídico requieren concentraciones mucho mayores para inhibir en el mismo grado que cicloheximida. Cloramfenicol, que inhibe sólo la síntesis de proteínas en bacterias y organelos, es el menos efectivo de todos. La diferencia observada entre estos inhibidores podría deberse a una distinta permeabilidad de estos compuestos.

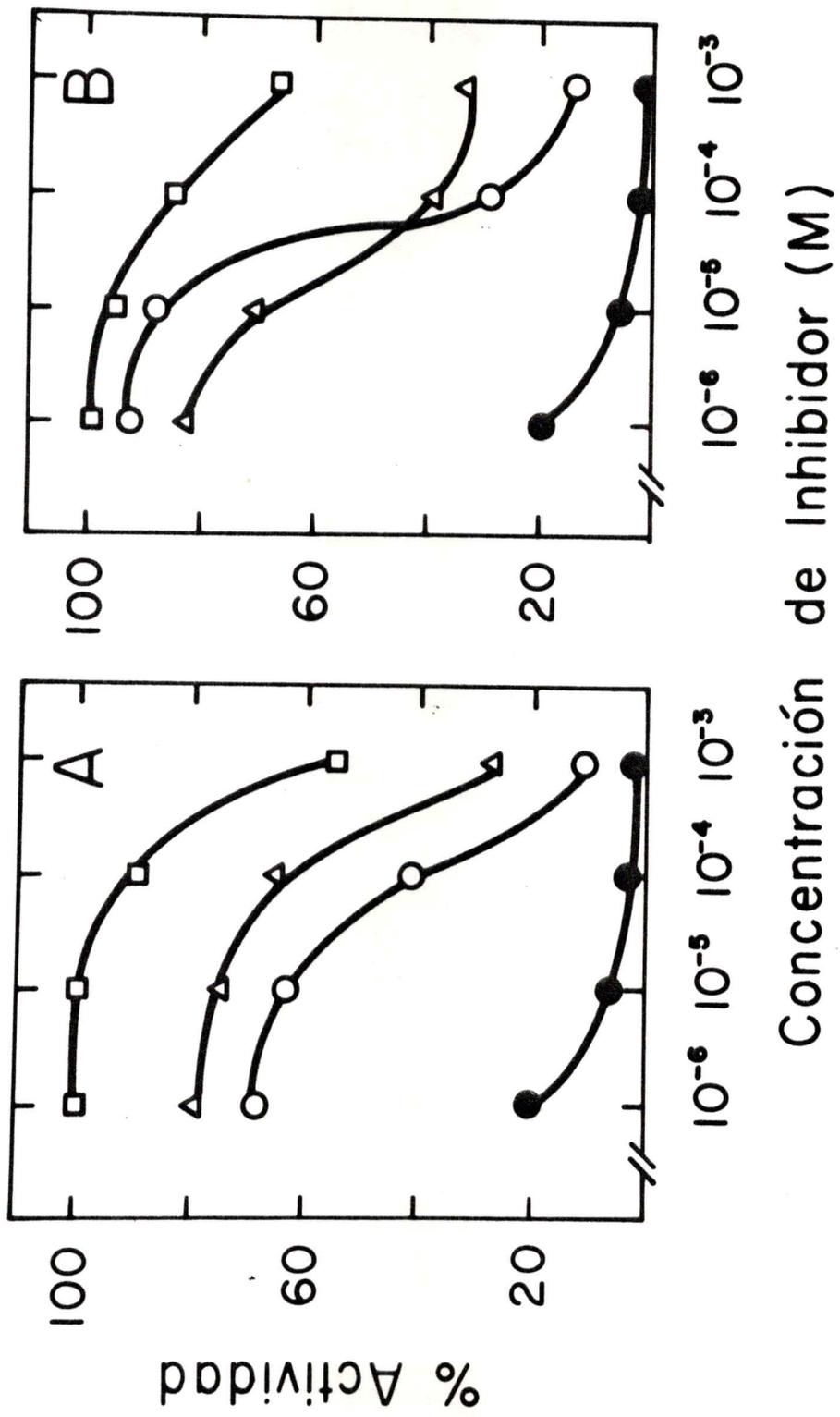


Figura 10

Figura 10

Efecto de diferentes inhibidores en la síntesis de proteínas de oocitos.

Grupos, en duplicado, de 5 oocitos provenientes de X. laevis o de 3 oocitos provenientes de C. caudiverbera se incubaron en solución HF a 20° con ^{14}C -lisina, actividad específica 227 uCi/umol a una concentración de 20 uM, en presencia de diversos inhibidores. (A), efecto en la incorporación de aminoácido a proteínas en oocitos de X. laevis. Experimento similar se muestra en (B) usando oocitos de C. caudiverbera. Los inhibidores usados fueron: cloramfenicol (□); ácido fusídico (△); puromicina (○); y cicloheximida (●). El análisis se realizó según lo descrito en Métodos.

D. Entrada de aminoácidos y proteínas recién sintetizadas a la vesícula germinal.

Se ha observado el movimiento de proteínas citoplasmáticas a núcleos inyectados en oocitos al cabo de pocas horas de la introducción a la célula. Además, ha sido posible ver, mediante microinyección de proteínas radiactivas, que aquellas que entrarían al núcleo serían seleccionadas específicamente por propiedades diferentes a su tamaño (41-42). El porcentaje de las proteínas que entraría al núcleo depende de sus propiedades; pero algunas de ellas, como las histonas, serían capaces de concentrarse en el núcleo hasta 20 veces respecto al citoplasma. Esto hacía interesante estudiar la entrada de aminoácidos y proteínas recién sintetizadas a vesículas germinales de oocitos de X. laevis. La vesícula germinal, debido a su gran tamaño, es fácilmente extraíble como se describió en Métodos. Es posible medir, por lo tanto, cuánto del aminoácido que entró a la célula o de la proteína sintetizada estaría entrando en el núcleo.

En la Figura 11 se muestra una cinética de entrada de aminoácido y síntesis de proteína en oocitos de X. laevis (A) y, en forma paralela, la aparición de aminoácido y proteína recién sintetizada en el núcleo de estas células (B). Se observa una considerable latencia en la entrada tanto de aminoácido como de proteínas a la vesícula germinal. Este resultado muestra que la radiactividad detectada en el núcleo

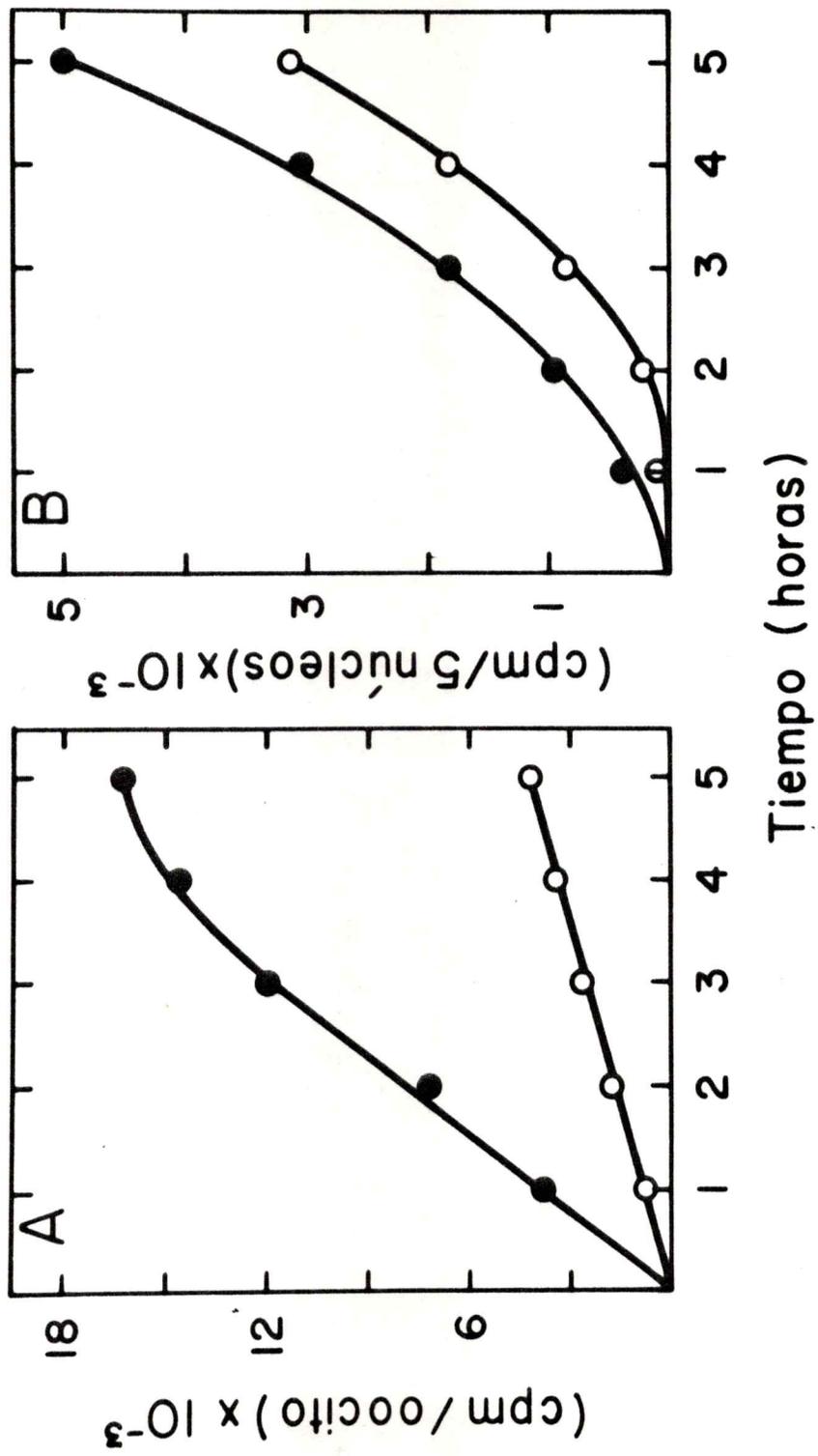


Figura 11

Figura 11

Entrada de ^{14}C -arginina y proteínas radiactivas a vesículas germinales de oocitos de Xenopus laevis.

Los oocitos se incubaron a 20° con ^{14}C -arginina, actividad específica 340 uCi/umol, a una concentración de 14 uM, por los tiempos indicados. (A), entrada de aminoácido (○) y aparición de proteína radiactiva (⊙) en oocito total. (B), radiactividad total (○) y radiactividad en proteínas (⊙) presente en vesículas germinales aisladas a los tiempos que se indican. En estos experimentos cada punto fue obtenido por duplicados usando 5 oocitos o 10 vesículas germinales, como se describe en Métodos.

no se debe a contaminación del organelo con la fracción citoplasmática.

Con el objeto de estudiar con más detalle la entrada de proteínas recién sintetizadas al núcleo, se realizó un experimento en el cual la síntesis de proteínas estuviera inhibida durante la entrada de radiactividad al núcleo. Para ésto, se preincubaron los oocitos durante 2 horas en presencia de ^{14}C -arginina 14 μM para permitir la marcación de ciertas proteínas citoplasmáticas; las cuales, debido a la latencia de entrada, no se encontrarían en cantidades apreciables en la vesícula germinal. En este momento, que es el tiempo 0 de la Figura 12 los oocitos se pusieron en un medio con arginina 0,1 mM no radiactiva, y puromicina 5×10^{-4} M. En la curva superior de la figura se muestra que, bajo estas condiciones, la síntesis de proteínas está inhibida. En la parte inferior se ve la cinética de entrada de las proteínas sintetizadas durante el período de preincubación al núcleo. La entrada de la proteína radiactiva al organelo prosigue durante 3 horas, y éstas permanecerían ahí aún después de 17 horas de incubación del oocito. La cantidad de proteínas que entra a la vesícula germinal constituye alrededor de un 20-25 % de la proteína que se está sintetizando en la célula. Como el núcleo representa el 10 % del volumen celular total; este resultado significaría que las proteínas que se están sintetizando en el oocito migran, preferencialmente, al núcleo de la célula.

Proteína Radiactiva
cpm x 10⁻³

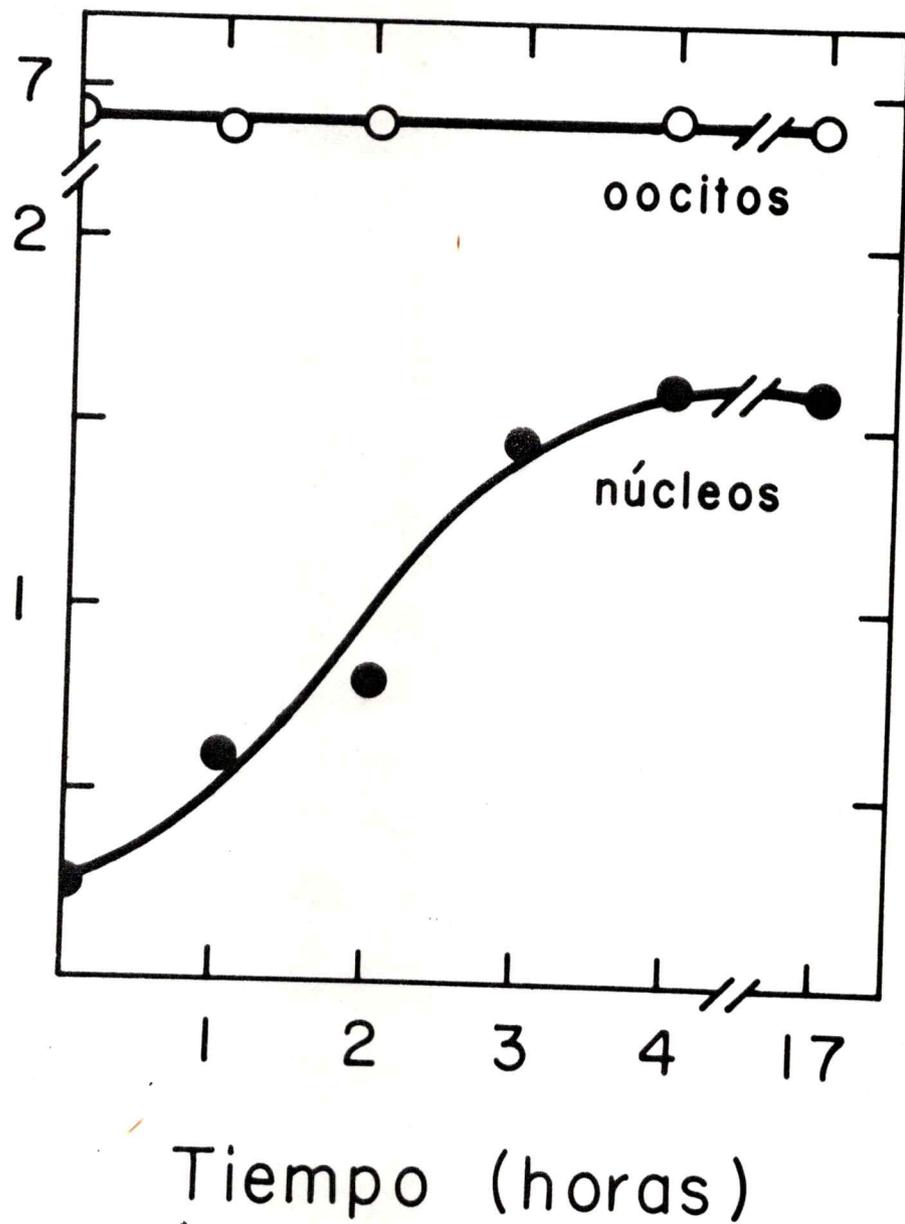


Figura 12

Figura 12

Entrada de proteínas recién sintetizadas a vesículas
germinales de oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 15 oocitos se preincubaron con ^{14}C -arginina, actividad específica 340 uCi/umol, a una concentración de 14 uM, por 2 horas a 20° y luego se lavaron exhaustivamente con solución HF libre de radiactividad. La incubación continuó en la presencia de puromicina 0,5 mM y arginina no radiactiva 0,1 mM. En los tiempos indicados oocitos (○) o núcleos (⊙) se aislaron y se determinó la radiactividad incorporada a proteínas, como se describe en Métodos.

Como se mencionó al principio, uno de los factores más importantes que pueden afectar la incorporación de aminoácidos exógenos a proteínas en oocitos es la capacidad de captarlos del medio o la facilidad con que los diferentes aminoácidos entran a la célula. Hasta el momento, sólo había una información muy limitada en la literatura respecto a este punto, e incluso, existía algunas discrepancias sobre el hecho de que los oocitos eran permeables a aminoácidos.

A continuación, se mostrarán evidencias que los oocitos de X. laevis poseen la capacidad no sólo de captar aminoácidos del medio, siguiendo una cinética de Michaelis-Menten, sino que, también, son capaces de concentrarlos varias veces con respecto al medio externo. Además, el sistema de captación es específico para grupos de aminoácidos.

E. Entrada de diferentes aminoácidos en oocitos de X.laevis

La incubación de oocitos con aminoácidos radiactivos resulta en la entrada de la radiactividad a estas células. En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos con diferentes aminoácidos al ser incubadas durante 6 horas.

Se observa que, en seis de los nueve casos estudiados, la cantidad de aminoácido radiactivo libre (restando la radiactividad incorporada a proteína) en las células es varias veces mayor que la cantidad de aminoácido radiactivo existente

TABLA II

Entrada de diferentes aminoácidos a oocitos de X.laevis

Aminoácido	Radiactividad en oocitos				Razón de D/A
	A medio extra-celular cpm/ul	B total cpm/ul	C proteína cpm/ul	D amino-ácido libre cpm/ul	
glutamina	14380	64000	10400	53600	3,7
arginina	8000	40000	7200	32800	4,1
leucina	4400	16000	4500	11500	2,6
alanina	7200	27200	4800	22400	3,1
treonina	5200	68800	20000	48800	9,4
ác. glutámico	5500	8000	600	7400	1,3
lisina	8900	63200	19200	44000	4,9
ác. aspártico	19050	6800	1760	5040	0,3
metionina	5200	6630	2980	3660	0,7

La radiactividad del medio extracelular se determinó al comienzo de la incubación. La entrada de aminoácidos e incorporación a proteínas se midió a las 6 horas de incubación a 22°. Los análisis se realizaron según lo descrito en Métodos. Todos los aminoácidos usados estaban marcados con ^{14}C y se agregaron a una concentración de 19 μM .

Para el cálculo de las columnas B, C y D se utilizó como volumen del oocito el valor de 0,8 ul.

en un volumen equivalente del medio de incubación. Las tres excepciones son: ácidos glutámico y aspártico, además de metionina.

La posible conversión metabólica de los aminoácidos captados por el oocito a otros productos diferentes a proteínas fué estudiada. Para ésto se realizó una cromatografía bidimensional en capa fina, 1^{era}. dimensión, n-butanol: acetona: dietilamina: agua (10:10:2:5) y 2^a. dimensión isopropanol: ácido fórmico: agua (20:1:5), de la radiactividad ácido soluble presente en oocitos preincubados durante 5 horas a 20° con ¹⁴C-leucina y, en forma separada, con ¹⁴C-arginina. La cromatografía se procesó y analizó según se describe en Métodos. El resultado obtenido demostró que un 90 % de la marca aún migraba como el aminoácido original. El resto de la radiactividad permaneció en el origen del cromatograma indicando su incorporación a oligopéptidos.

Con el objeto de caracterizar más el mecanismo por el cual el oocito es capaz de concentrar el aminoácido externo se trataron células con numerosos compuestos para ver el efecto de éstos sobre la entrada de aminoácido y, paralelamente se medía su incorporación a proteínas.

En la Figura 13 se muestra el efecto de puromicina, cicloheximida y 2,4-dinitrofenol sobre la entrada de aminoácido y la incorporación a proteínas. Es claro que los inhibidores de la síntesis de proteínas tienen muy poco efecto

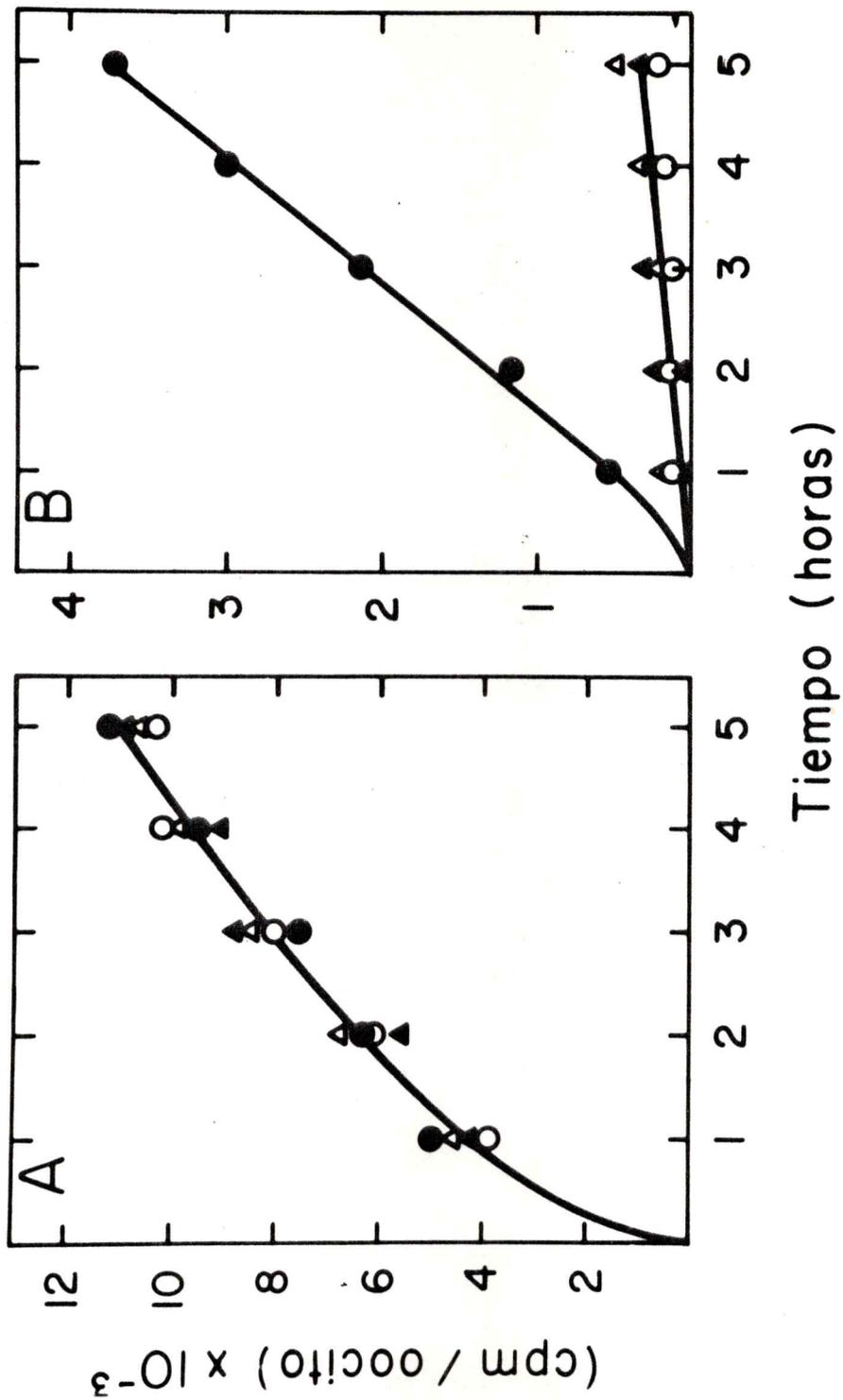


Figura 13

Figura 13

Efecto de inhibidores sobre la entrada de aminoácidos y
síntesis de proteínas en oocitos de Xenopus laevis

Oocitos en grupos de 5 se incubaron a 20° en solución HF en presencia de ^{14}C -arginina, actividad específica 340 uCi/umol, a una concentración 10 μM , para medir la entrada de aminoácido (A) y síntesis de proteína (B). Los inhibidores usados fueron puromicina 0,5 mM (Δ); cicloheximida 0,01 mM (O); 2,4 -dinitrofenol 0,1 mM (\blacktriangle). Control sin inhibidor (\bullet). Los ensayos se realizaron según Métodos.

sobre la entrada de aminoácido (13A), aún cuando la incorporación en proteína esté inhibida en cerca de un 90 % (13B). El desacoplador de la fosforilación oxidativa, aún cuando inhibe fuertemente la síntesis de proteínas, no afecta la entrada de aminoácido.

La Figura 14 muestra el efecto de tratamiento con pronasa, ouabaina y carencia de K^+ en el medio de incubación. El tratamiento con pronasa durante 3 minutos, que elimina la capa de células foliculares que están cubriendo al oocito, no tiene ningún efecto significativo sobre la entrada de aminoácidos y no afecta la incorporación a proteínas. Ouabaina, que es un inhibidor de la ATPasa dependiente de sodio y potasio, tampoco es capaz de afectar la entrada de aminoácidos y, a su vez no afecta la síntesis de proteínas. La ausencia de K^+ en el medio de incubación sólo afecta, en parte, la síntesis de proteínas, sin modificar la entrada del aminoácido.

La falta de efecto de los compuestos que inhiben la generación de ATP puede deberse al hecho de que estas células poseen un enorme "pool" de ATP interno (800 pmoles/oocito) (99).

F. Influencia de la concentración de aminoácido en la entrada de aminoácido en oocitos de *X. laevis*

Se describió, previamente, el efecto de diferentes concentraciones de leucina en la entrada e incorporación a proteínas (ver Figura 4). Experimentos similares, con siete

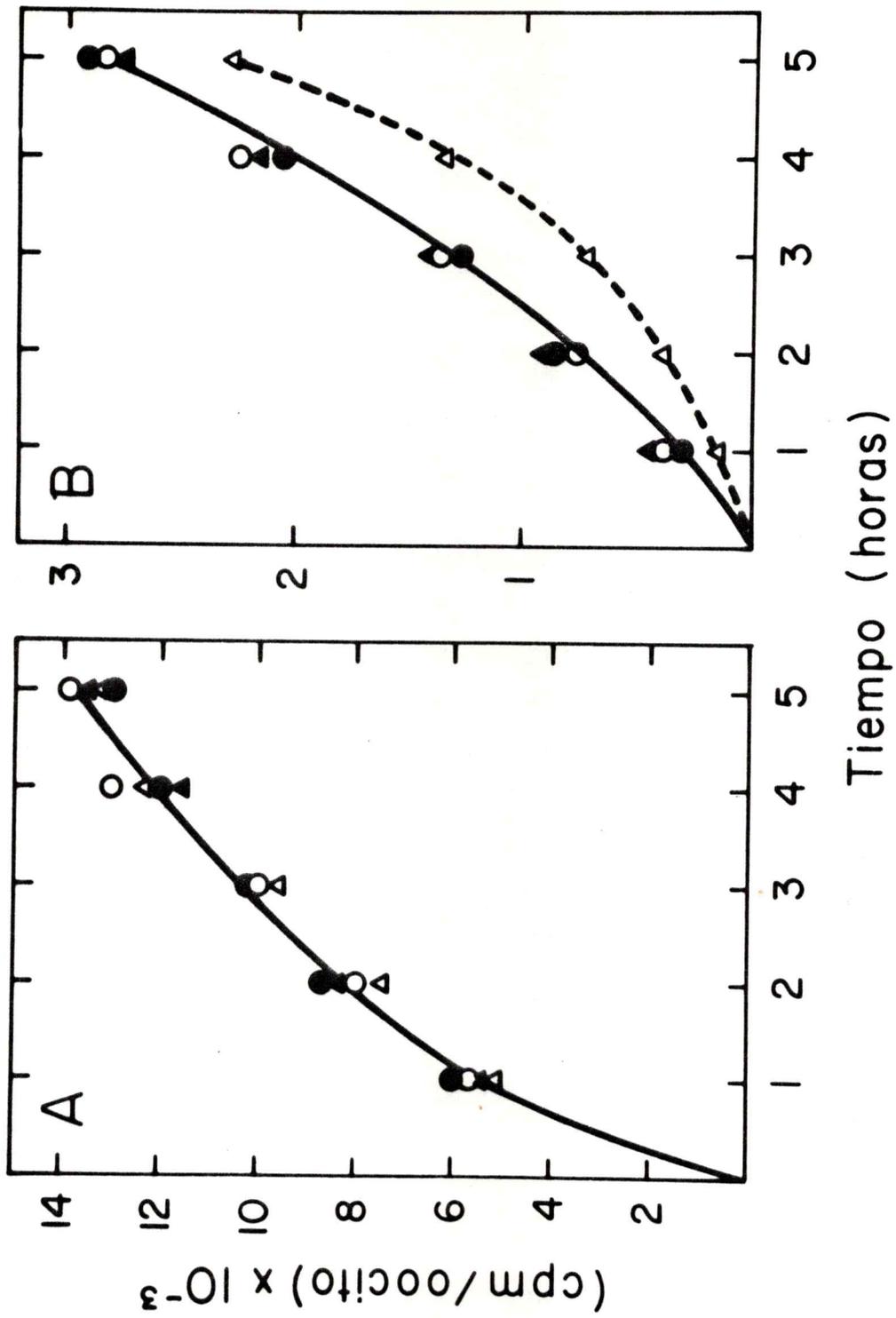


Figura 14

Figura 14

Efecto de oubaína, tratamiento con pronasa y ausencia de K^+ sobre la entrada de aminoácido y síntesis de proteínas en oocitos de Xenopus laevis.

Grupos de 5 oocitos en duplicado se incubaron a 20° con ^{14}C -arginina, actividad específica 340 uCi/umol, a una concentración de $10 \mu M$, para ver la entrada de aminoácido (A), y la síntesis de proteínas (B), en presencia de oubaína $0,1 \text{ mM}$ (○); tratamiento con pronasa ($0,1 \text{ mg/ml}$) durante 3 minutos (▲); ausencia de K^+ (△); control (●). Los análisis se realizaron de acuerdo a la técnica descrita en Métodos.

aminoácidos diferentes, demostraron que la cinética de entrada difiere considerablemente entre uno y otro. Esto se verá en detalle más adelante.

La Figura 15 muestra el efecto de la concentración de aminoácido en las velocidades iniciales de entrada de seis diferentes aminoácidos. En todos los casos, las gráficas de doble recíproco muestran una buena concordancia con una línea recta, indicando que este proceso se comporta con una cinética de tipo Michaelis-Menten y que el transporte de aminoácido está mediado, de algún modo, por un sistema saturable a altas concentraciones de aminoácido. Con estos resultados, es posible calcular una constante de transporte (K_T), que puede ser definida como la concentración a la cual la velocidad de transporte o entrada del aminoácido es la mitad de su velocidad máxima inicial. Del mismo modo que la K_m , esta constante es, con algunas limitaciones, una medida de afinidad del sistema transportador por el aminoácido.

La Tabla III incluye los valores de los K_T calculados para los seis aminoácidos estudiados. Diferencias de hasta un orden de magnitud se observan entre la constante para ácido aspártico y el K_T de los otros aminoácidos. Estos resultados explicarían el comportamiento anómalo obtenido con ácido aspártico en la Figura 3 y Tabla I. En la Tabla III se muestran, también, los valores de las velocidades de entrada de los aminoácidos a una concentración de 20 μM .

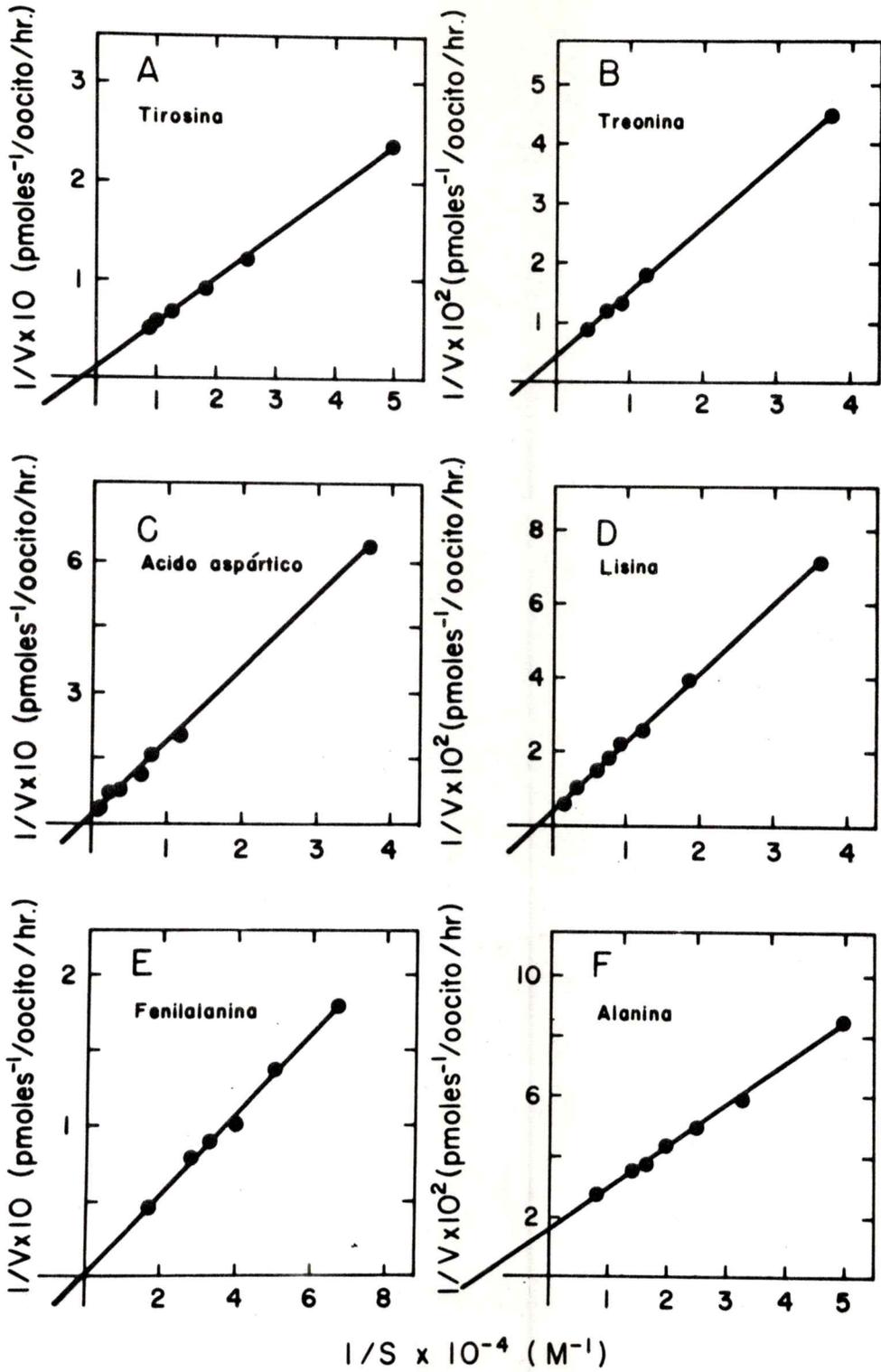


Figura 15

Figura 15

Efecto de la concentración de aminoácido en las velocidades iniciales de entrada para distintos aminoácidos en oocitos de Xenopus laevis

Se incubaron grupos de 5 oocitos en duplicado por 2 horas a 20° con diversas concentraciones de diferentes ¹⁴C-aminoácidos (A) tirosina; (B) treonina; (C) ácido aspártico; (D) fenilalanina; (E) lisina y (F) alanina. Los ensayos se realizaron según lo descrito en Métodos.

TABLA III

Valores de parámetros cinéticos de
 entrada para diferentes aminoácidos

Aminoácido	K_T (mM)	Velocidad de entrada 20 μ M (pmoles/ocito/hora)
Tirosina	0,4	3-4
Fenilalanina	0,6	6-7
Treonina	0,2	20-22
Ac. aspártico	2,5	1-2
Lisina	0,5	10-11
Alanina	0,1	8-9

K_T (mM) fueron calculados a partir de los datos de la Figura 15.

Nuevamente se observa que ácido aspártico tiene una velocidad de entrada muy lenta explicando, claramente, por qué se observó una marcación muy baja en los estudios realizados con síntesis de proteínas anteriormente como se demostró en la Figura 3.

G. Especificidad en la captación de aminoácidos

Con el fin de determinar la especificidad del sistema transportador de aminoácidos, se realizaron experimentos de entrada de aminoácidos radiactivos en presencia de diferentes aminoácidos no marcados.

Al incubar oocitos con ^{14}C -aminoácidos, en presencia de aminoácidos no marcados de estructura análoga, se obtienen los resultados que se muestran en la Figura 16. Es claro, de estas observaciones, que todas las entradas de aminoácidos radiactivos son inhibidas al estar presente en el medio de incubación, un análogo estructural no radiactivo. Esta baja en la captación de aminoácidos afecta, en forma paralela, la incorporación a proteínas.

En la Figura 17 se ilustra un estudio más detallado realizado específicamente con alanina radiactiva. Como se puede ver, la entrada de alanina marcada es inhibida sólo por la presencia de aminoácidos alifáticos no radiactivos (19A). De los tres aminoácidos estudiados, leucina es el inhibidor más potente, y glicina el más débil, mientras que

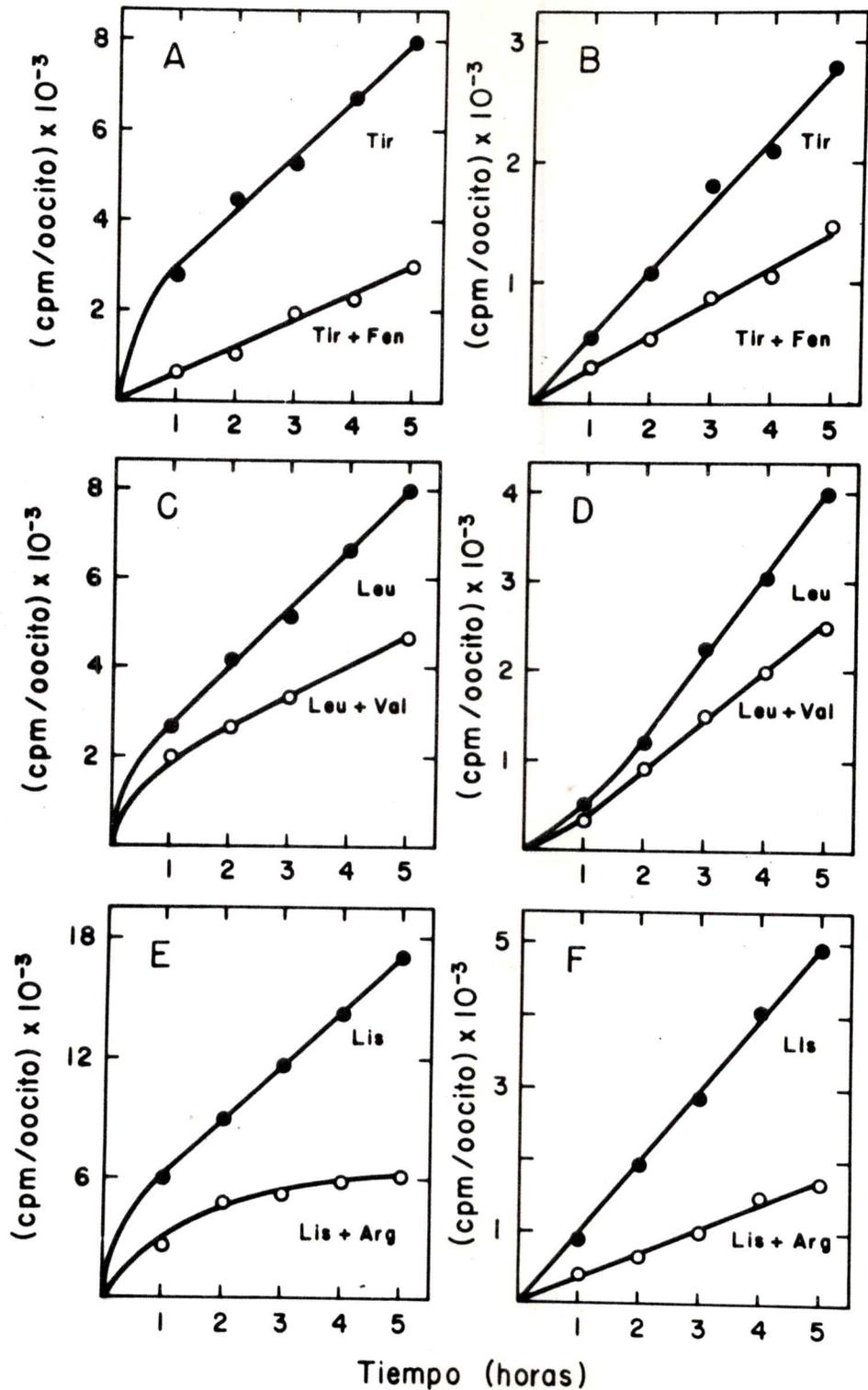


Figura 16

Figura 16

Efecto de análogos estructurales sobre la entrada de aminoácido radiactivo e incorporación a proteínas en oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 5 oocitos en duplicado se incubaron a 20° durante diferentes tiempos en solución HF con los siguientes aminoácidos radiactivos para detectar entrada (A,C,E) y síntesis de proteína (B,D,F); ^{14}C -tirosina, actividad específica 416 uCi/umol; ^{14}C -leucina, actividad específica 312 uCi/umol; ^{14}C -lisina, actividad específica 218 uCi/umol.
(A) y (B) ^{14}C -tirosina 10 uM (●); + fenilalanina 0,5 mM (○).
(C) y (D) ^{14}C -leucina 10 uM (●); + valina 0,5 mM (○).
(E) y (F) ^{14}C -lisina 20 uM (●); + arginina 1 mM (○).

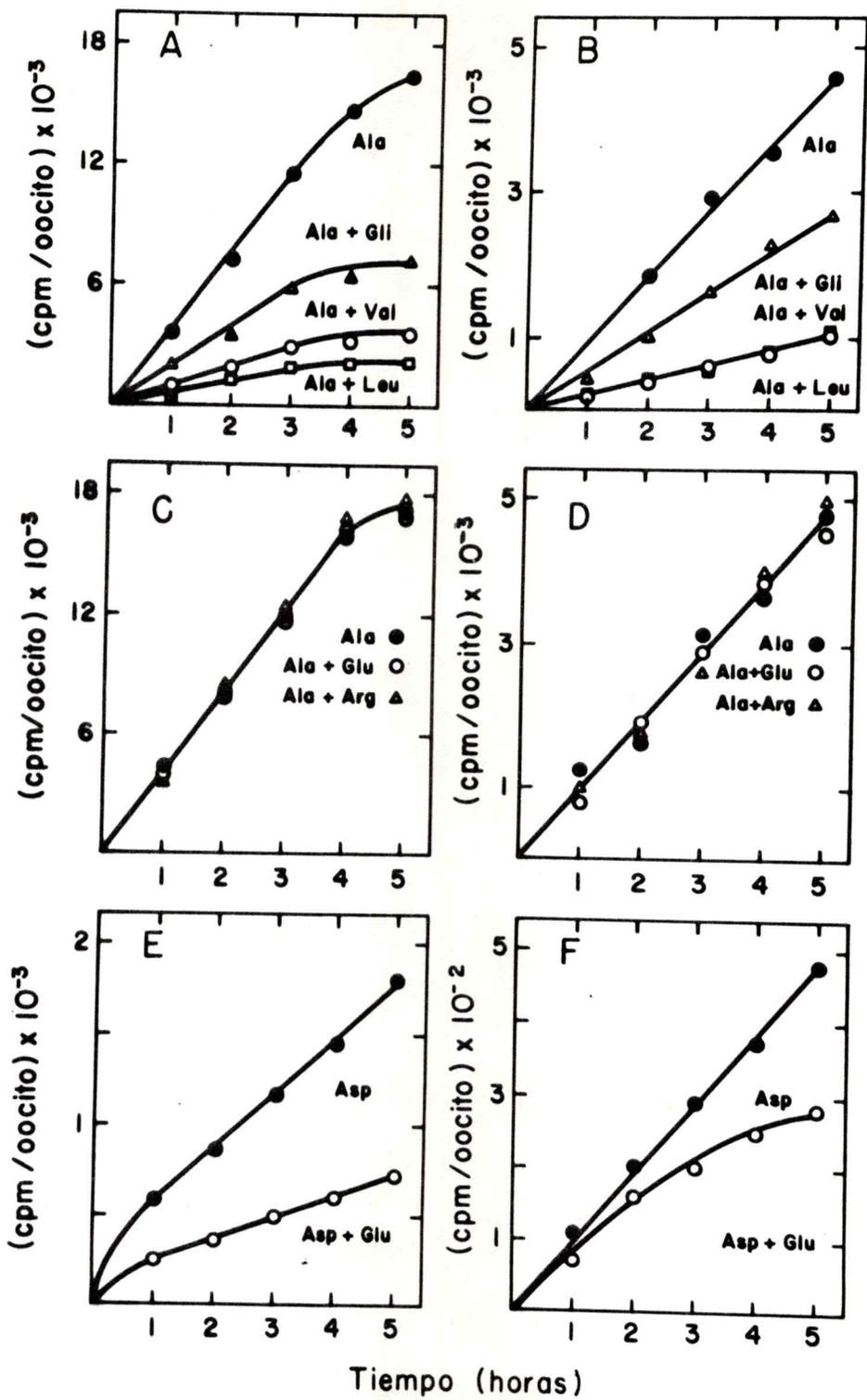


Figura 17

Figura 17

Efecto de análogos estructurales sobre la entrada e incorporación a proteínas de ^{14}C -alanina en oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 5 oocitos en duplicado se incubaron a 20° en solución HF en presencia de ^{14}C -alanina, actividad específica 156 uCi/umol, para ver la entrada (A,C,E) y la incorporación a proteínas (B,D,F). (A) y (B) ^{14}C -alanina 35 uM (●); + glicina 1,8 mM (Δ); + valina 1,8 mM (O); + leucina 1,8 mM (□). (C) y (D) ^{14}C -alanina 35 uM (●); + glutámico 1,8 uM (O) + arginina 1,8 mM (Δ). (E) y (F) ^{14}C -aspártico 80 uM (●); + glutámico 4 mM (O). La entrada y la incorporación a proteínas se analizaron según lo descrito previamente en Métodos.

valina es de tipo intermedio. La entrada de ^{14}C -alanina no es inhibida; sin embargo, por ácido glutámico ni arginina bajo idénticas condiciones (17C). También, para estos casos, se ve un efecto similar sobre la incorporación del aminoácido radiactivo a las proteínas (17B y 17D). En la Figura 17E y 17F se ve claramente que la entrada e incorporación a proteínas de ácido aspártico está disminuida por la presencia de ácido glutámico.

Con la idea de determinar qué tipo de inhibición era la que se producía en la entrada de un aminoácido al estar presente un análogo estructural, se estudió la velocidad de entrada de tirosina radiactiva en presencia de otros aminoácidos. La Figura 18 muestra una gráfica de doubles recíprocos del efecto producido sobre la velocidad de entrada al incubar oocitos con ^{14}C -tirosina en presencia de otros aminoácidos no radiactivos, a diferentes concentraciones. En la Figura 18A se observa que existe una inhibición muy pequeña al estar ácido aspártico o alanina presentes. Sin embargo, se observa una fuerte inhibición, de tipo competitivo, en presencia de un análogo estructural como fenilalanina (Figura 18B).

Es interesante notar además, que el análogo estructural D-fenilalanina es un inhibidor considerablemente más débil que el análogo natural L-fenilalanina; pero todavía tiene mayor efecto que los otros L-aminoácidos no aromáticos.

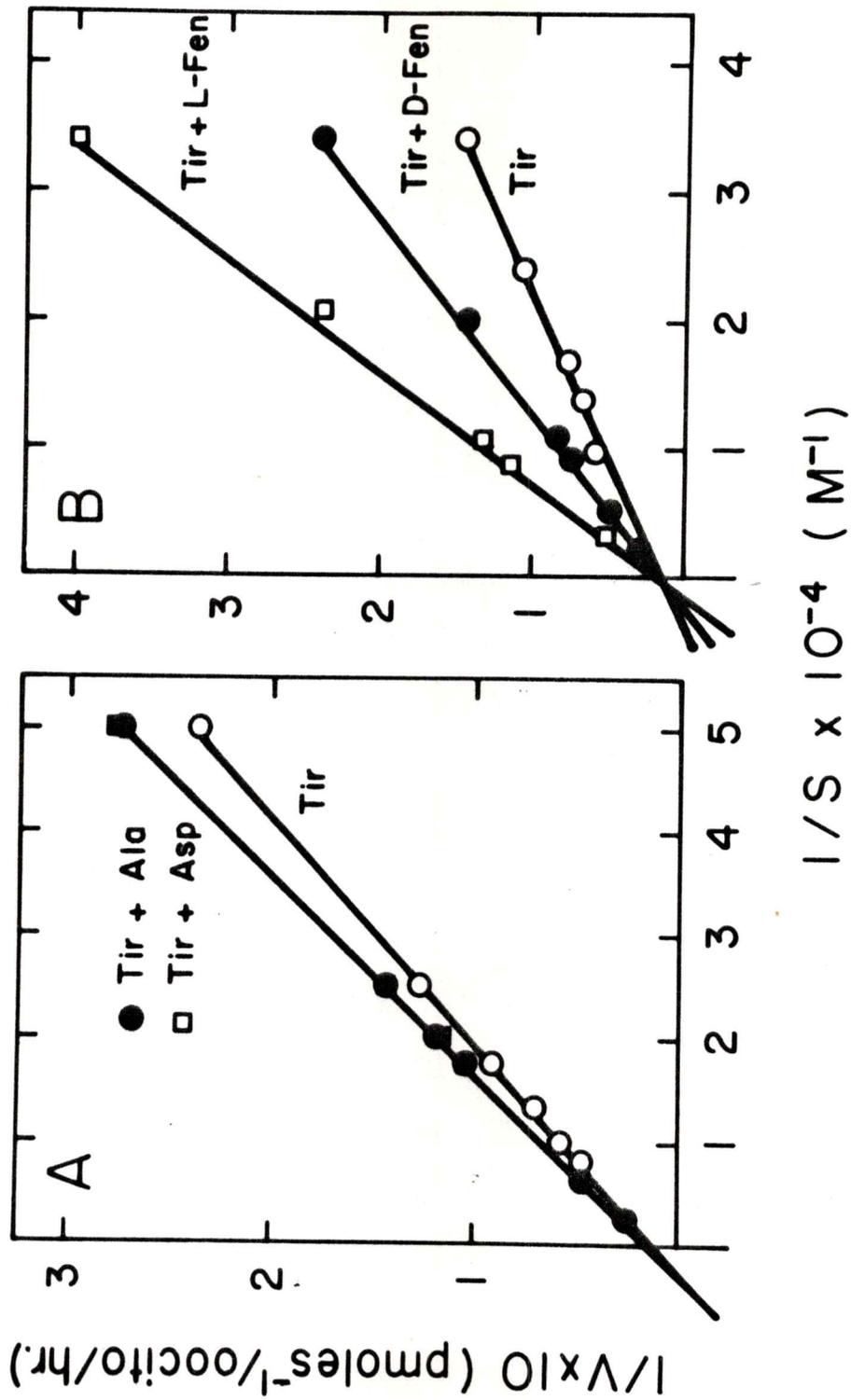


Figura 18

Figura 18

Efecto de diferentes aminoácidos en la velocidad de entrada de ^{14}C -tirosina a oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 5 oocitos en duplicado se incubaron durante 2 horas a 20° en solución HF. (A), efecto de alanina (●) y ácido aspártico (□) en la entrada de ^{14}C -tirosina; (B), efecto de L-fenilalanina (□); y D-fenilalanina (●). Entrada de ^{14}C -tirosina en ausencia de aminoácidos no radiactivos (○). La concentración de los aminoácidos no radiactivos fue de $5 \times 10^{-4}\text{M}$. Se usó ^{14}C -tirosina, actividad específica 460 uCi/umol, a una concentración de $1 \times 10^{-5}\text{M}$ para las incubaciones. El análisis de entrada se realizó según la técnica descrita en Métodos.

Resumiendo los resultados anteriores, es posible decir que:

- a) los oocitos poseen capacidad de concentrar aminoácido del medio, mediante un sistema de transporte facilitado y saturable;
- b) es específico para grupos de aminoácidos;
- c) es dependiente de temperatura, y
- d) es independiente de síntesis de proteínas.

H. Pooles de aminoácidos en oocitos de *Xenopus laevis*

Para tener más información sobre el papel fisiológico del transporte de aminoácidos como fuente interna de aminoácidos para los procesos biosintéticos de la célula pareció importante comparar los "pooles" de aminoácido libre de los oocitos recién disectados del ovario y después que las células han sido incubadas en presencia o ausencia de una solución con todos los aminoácidos presentes a una concentración $1 \times 10^{-5} M$ por 24 horas. Como se muestra en la Tabla IV, en la mayoría de los casos, se observa un importante aumento en el "pool" de aminoácidos libre en los oocitos incubados con aminoácidos exógenos. Es interesante hacer notar que los aminoácidos que no aumentan, o que sólo aumentan muy levemente, son los 5 aminoácidos que tienen la carga iónica mayor (lisina, arginina, histidina, y los ácidos aspártico y glutámico). La gran cantidad de ácido

TABLA IV

Aminoácido libre en oocitos y sangre de Xenopus laevis

Aminoácidos	O o c i t o s			Sangre	C/B	A/D
	A pmoles/ oocito	B pmoles/ oocito	C pmoles/ oocito	D pmoles/ 0,5 ul		
Lisina	260	210	524	48	2,5	1
Histidina	126	386	474	42	1,2	3
Arginina	320	993	926	—	0,9	-
Ac. aspártico	450	650	587	5	0,9	90
Treonina	160	340	1095	40	3,2	4
Serina	594	622	2205	67	3,5	9
Ac. glutámico	2200	1522	3000	8	2,0	261
Prolina	24	176	501	10	2,8	2
Glicina	125	195	680	10	3,5	12
Alanina	115	293	1139	45	3,9	2
Cistina (1/2)	59	99	528	—	5,9	—
Valina	122	111	450	25	4,1	5
Metionina	7	70	—	16	—	0,5
Isoleucina	180	290	1187	78	4,1	2
Leucina	210	185	871	—	4,7	—
Tirosina	53	135	530	4	3,9	13
Fenilalanina	60	66	470	6	7,1	10
Fosfoserina	—	58	—	—	—	—

El contenido de aminoácidos se determinó como se describe en Métodos. Los valores que se dan son promedios de 3 determinaciones separadas usando 2000 oocitos crecidos

(Cont. Tabla IV)

aislados manualmente de distintos animales. La columna A corresponde a los valores obtenidos en oocitos recién disectados, sin incubación. En la columna B se muestran los valores obtenidos de oocitos incubados en solución HF a 22° por 24 horas sin adición de aminoácidos. En C los oocitos fueron incubados en iguales condiciones pero agregando aminoácidos a una concentración de 10^{-5} M. En la columna D se muestran los valores promedios obtenidos del análisis de sangre de 3 hembras adultas de X. laevis. En C/B aparece la razón entre los valores obtenidos de oocitos incubados en presencia o ausencia de aminoácidos por 24 horas. A/D da la razón entre los valores obtenidos de células recién disectadas y los valores de la sangre de X. laevis.

Los valores de ácido aspártico y glutámico incluyen asparagina y glutamina respectivamente. La sangre se analizó después de la remoción de los glóbulos rojos y precipitación con TCA 5 %.

glutámico y glutamina encontrada en estos análisis concuerda con previas observaciones de otros investigadores (100, 101).

Es importante también, el hecho que los "pooles" de aminoácidos del oocito se mantengan, aún cuando las células se incuben durante 24 horas en ausencia de ellos. Eso podría deberse, simplemente, a que el oocito no estaría sintetizando proteínas durante este tiempo; pero resultados obtenidos y presentados previamente muestran, claramente, que estas células están incorporando aminoácido a proteínas durante las 24 horas de incubación. Cabe destacar que fosfoserina sólo se encuentra presente en las células que han sido incubadas 24 horas en ausencia de aminoácidos exógenos. Este aminoácido es un constituyente importante de las fosfoproteínas lo que haría pensar en un posible mecanismo de degradación de esta proteína cuando el oocito se encuentra en un medio carente de aminoácidos, con el fin de obtener los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas.

La Tabla IV también compara los análisis de "pooles" de aminoácidos de oocitos inmediatamente después de ser separados del ovario (columna A) con el contenido de aminoácidos libres en la sangre de hembra adulta de X.laevis (columna D). Se observan grandes diferencias entre las concentraciones intracelulares de la mayoría de los aminoácidos y su contenido en la sangre; las más sorprendentes

son las diferencias de los ácidos aspártico y glutámico, que se encuentran en concentración muy alta en el oocito y relativamente baja en la sangre dando cuocientes de 90 y 261 respectivamente.

Otro aminoácido que llama la atención es la metionina por su baja velocidad de captación, por estar en pequeñas cantidades como aminoácido libre y porque el oocito no es capaz de concentrarlo. Estos datos indujeron a pensar que este aminoácido podría estar regulando la síntesis de proteínas en el oocito, ya que es fundamental para la iniciación. Con el objeto de ver si realmente metionina, era un factor limitante en el proceso biosintético de proteínas, se incubaron células en presencia de metionina no radiactiva a una concentración de 10^{-4} M y 14 C-fenilalanina con el fin de ver si la incorporación de la radiactividad aumentaba con respecto a células controles. Los resultados demostraron que el aumento de metionina interna en el oocito no estimula la síntesis de proteínas en estas células.

Capítulo Segundo

Condiciones que afectan la maduración meiótica de oocitos

Los oocitos de anfibio que han completado su crecimiento poseen un gran núcleo con un número diploide de cromosomas, que se denomina vesícula germinal (v.g.). Por un largo período permanece en la profase de la primera división meiótica (estado de diplonema). El término "maduración nuclear" o simplemente "maduración" abarca los cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren en el oocito durante el período comprendido entre la profase de la primera división meiótica y la metafase de la segunda división meiótica.

El fenómeno de maduración in vitro se produce bajo la influencia de hormonas gonadotrópicas o esteroidales en condiciones adecuadas.

A. Efecto de la temperatura

Los datos obtenidos sobre el efecto de temperatura en la síntesis de proteínas en oocitos indican que la óptima temperatura de incubación de estas células es cercana a 20 °. Con el objeto de estudiar si esta temperatura es también la temperatura óptima para inducir la maduración, se incubaron grupos de 100 oocitos, a distintas temperaturas, en presencia de hCG, progesterona o testosterona, durante 18 horas (Figura 19). Como se puede observar de los datos presentados en la figura,

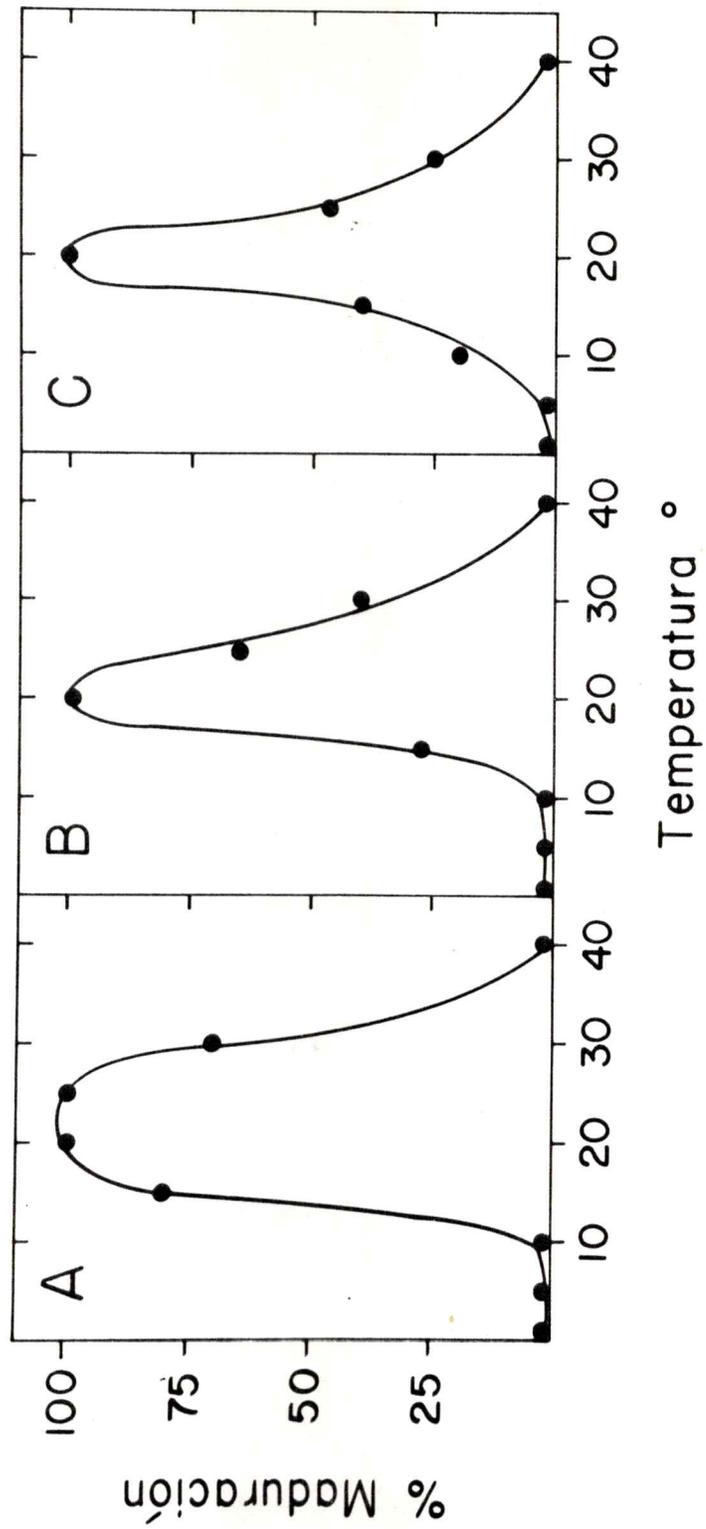


Figura 19

Figura 19

Efecto de la temperatura en la maduración de oocitos de Xenopus laevis inducida por hormonas.

Grupos de 100 oocitos provenientes del mismo animal se incubaron en solución HF durante 18 horas a la temperatura indicada en presencia de diversas hormonas: (A) hCG, 60 unidades/ml; (B), progesterona 10^{-7} M; (C), testosterona 10^{-7} M. Cada porcentaje de maduración se basa en el análisis de 100 oocitos (ver Métodos).

la maduración de los oocitos gatillada tanto por las hormonas esteroidales (progesterona y testosterona) como por hCG requiere un rango restringido de temperatura. Para ambas hormonas esteroidales, la temperatura óptima que permite el máximo de inducción de maduración fluctúa entre 18°-22°; mientras que para hCG el rango de temperatura óptima es un poco mayor, 19°- 26°. Los oocitos incubados a 40° durante sólo 8 horas ya presentaban un 20 % de lisis celular, lo cual indicaría la incapacidad de estas células para sobrevivir a temperaturas mayores de 30°, aún por tiempos relativamente cortos.

B. Influencia de pH

Los resultados que se presentan en la Figura 20 muestran el efecto del pH sobre la inducción de la maduración de oocitos de X. laevis, provocada por hCG o testosterona (Figura 20A) y progesterona o lantano (Figura 20B); el ión lantano es un agente no hormonal descrito recientemente como agente inductor de la maduración (102). Los oocitos, en grupos de 100, se incubaron durante 3 horas a los respectivos pH, antes de agregar el agente inductor para permitir establecer un equilibrio con el pH del medio. Progesterona y testosterona presentan una dependencia idéntica con respecto al pH. Lantano y hCG en cambio, presentan mayor sensibilidad a pH ácido,

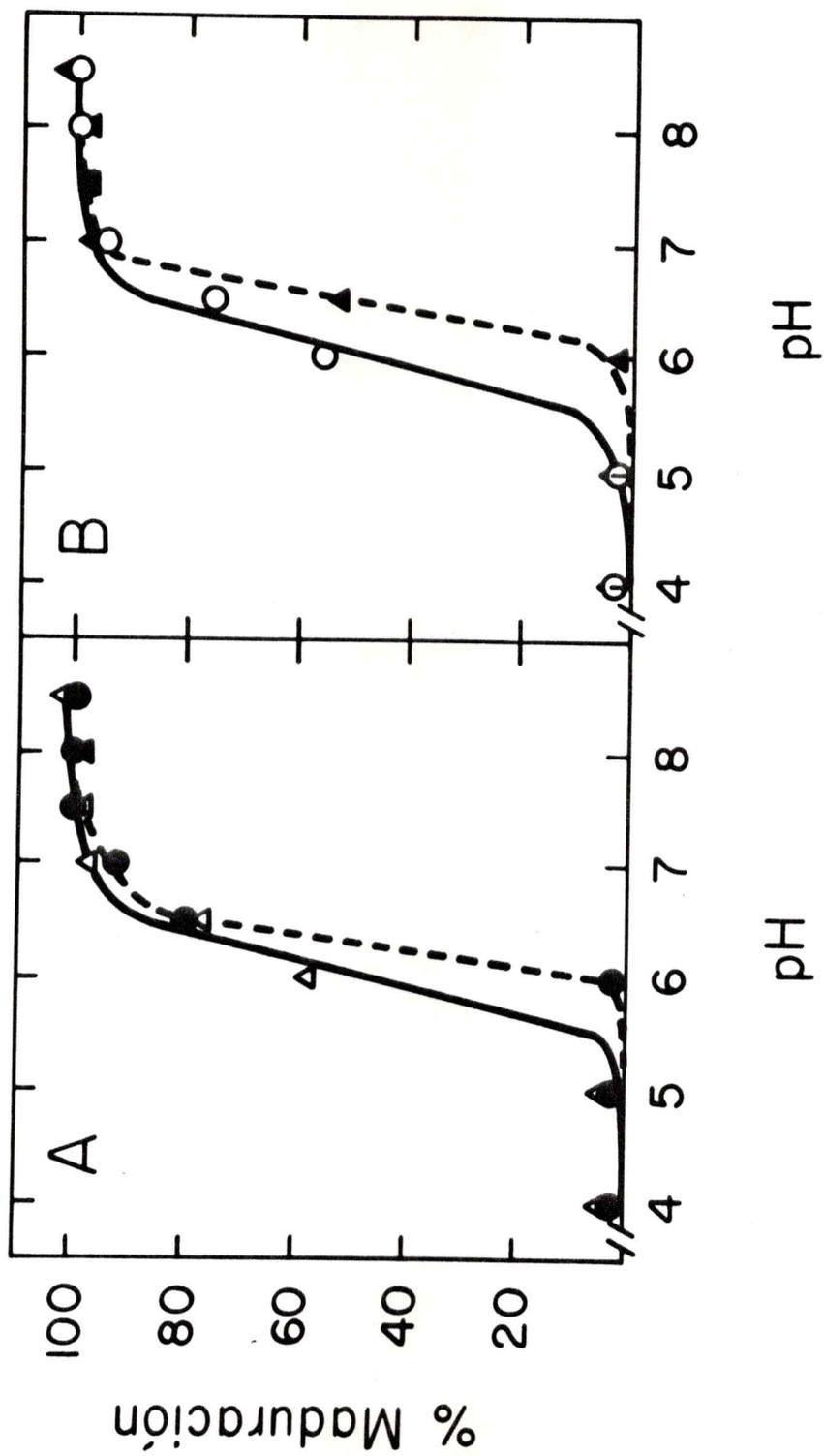


Figura 20

Figura 20

Influencia del pH sobre la maduración de oocitos de
Xenopus laevis

Oocitos, en grupos de 100, se preincubaron a 20° en solución HF durante 3 horas a diferentes pH, y luego se incubaron durante 18 horas con el agente inductor de la maduración. (A), hCG 60 unidades/ml (⊗) o testosterona 10^{-7} M (Δ); (B), progesterona 10^{-7} M (O) o lantano 10^{-2} M (\blacktriangle). El porcentaje de maduración se analizó como se describe en Métodos.

logrando una notable inducción de la maduración, sólo desde pH 6,5. Las hormonas esteroidales son capaces de provocar la maduración aún a pH 6,0. Tanto los inductores hormonales empleados, como el agente no hormonal (ión lantano) no se ven afectados en su capacidad para estimular la maduración en oocitos de X. laevis aún a pH 8,5. Los oocitos incubados bajo pH 5 presentan normalmente, daños morfológicos externos (ruptura de células foliculares o membrana del oocito).

Se estudió también el efecto de la concentración de NaCl sobre la maduración. Para esto se incubaron oocitos con solución salina, en presencia de diferentes hormonas y a distintas concentraciones de NaCl (0-100 mM). Los resultados demostraron que se obtenía un máximo de maduración inducida por hormonas esteroidales y hCG a concentraciones entre 63-80 mM de NaCl.

C. Estudio comparativo de la velocidad de maduración provocada por diferentes hormonas.

Para poder comparar la velocidad de maduración (rompimiento de vesículas germinales) inducida por diferentes hormonas, se incubaron oocitos en presencia de hCG, progesterona o testosterona, y se analizó el rompimiento de la vesícula germinal, a distintos tiempos, después de agregada la hormona (Figura 21). La figura muestra, claramente, que oocitos provenientes de un mismo ovario, reaccionan con

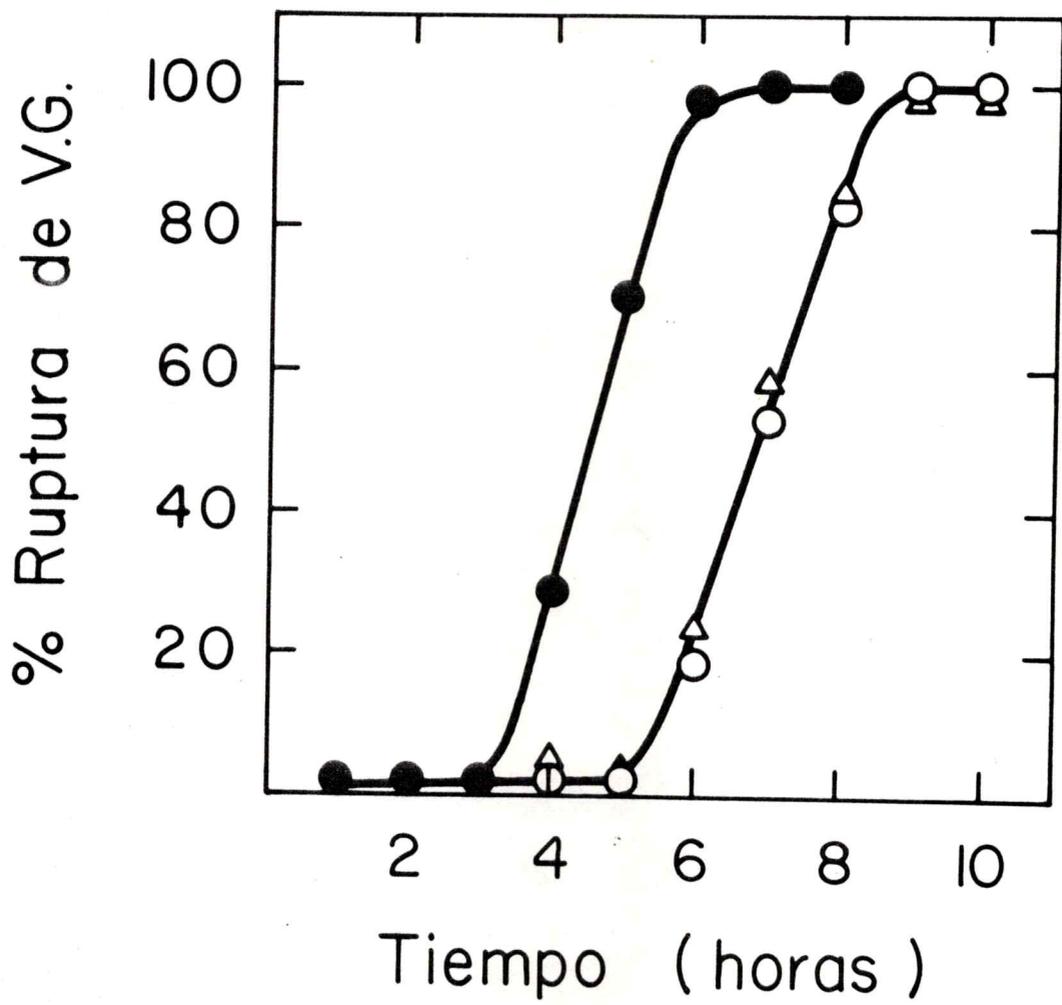


Figura 21

Figura 21

Estudio comparativo de la velocidad de maduración de oocitos de Xenopus laevis inducida por diferentes hormonas.

Oocitos provenientes de un mismo animal se incubaron en grupos de 100 en solución HF a 20° en presencia de (⊗) hCG, 60 unidades/ml; (Δ) progesterona 10^{-7} M o testosterona 10^{-7} M (○). A los tiempos indicados se observó en 100 oocitos la presencia o ausencia de vesícula germinal.

diferente velocidad frente al estímulo de hormonas esteroidales o polipeptídica. En este caso, hCG al cabo de 6 horas produce un 100 % de rompimiento de vesículas germinales, en cambio, las hormonas esteroidales, en este mismo tiempo, sólo han provocado un 20 % de disolución de la vesícula germinal y sólo después de 9 horas de la acción hormonal, se alcanza un 100 % de rompimiento del núcleo. La diferencia en la velocidad de inducción de la maduración entre hormonas esteroidales y hCG se ha detectado por lo menos en 4 experimentos usando oocitos provenientes de diferentes animales.

La velocidad de maduración inducida por una misma hormona varía entre oocitos provenientes de distintos animales. Por ejemplo: el rango de variación, de hCG para obtener un 100 % de rompimiento de vesícula germinal es entre 4-8 horas. En el caso de las hormonas esteroidales, también se observa gran variabilidad respecto a la velocidad del rompimiento de la vesícula germinal. El rango, en este caso, es entre 6-10 horas, después de agregada la hormona.

Los datos anteriores concuerdan con los de otros autores respecto a que las hormonas gonadotrópicas son más rápidas para inducir la maduración que las esteroidales. Además, se ha descrito que existen variaciones entre los oocitos de distintos animales y de tipo estacional para responder al estímulo hormonal (53).

Otros investigadores han demostrado que si se inyectan

hembras de X. laevis con hCG o con otras hormonas gonadotrópicas 3 a 4 días antes de extraerles el ovario, los oocitos provenientes de éstos son sensibles a concentraciones más bajas de esteroides y además la velocidad de rompimiento de la vesícula está francamente aumentada (103, 104).

D. Efecto de diferentes inhibidores sobre maduración de oocitos.

Es bien conocido el efecto de inhibidores de la síntesis de proteínas sobre la maduración inducida por hormonas esteroidales y hCG. Usando concentraciones de puromicina ($5 \times 10^{-4}M$) y cicloheximida ($1 \times 10^{-5}M$), a las cuales la síntesis de proteínas está inhibida sobre un 90 %, se observó un 100 % de inhibición de la maduración después de 18 horas de inducción hormonal, lo cual coincide con los datos de la literatura.

Pensando en una posible relación entre los niveles de cAMP del oocito y la maduración inducida por hormonas, se estudió el efecto de inhibidores de la fosfodiesterasa de cAMP, como teofilina y papaverina, sobre la maduración.

Se realizaron experimentos para ver si teofilina o papaverina interferían o ayudaban la acción de diferentes agentes inductores de la maduración. Para esto, se incubaron oocitos en grupos de 100, en presencia de los

diferentes agentes inductores de la maduración y teofilina o papaverina a las concentraciones indicadas en las Figuras 22 y 23. Como se puede apreciar de la Figura 22, todos los inductores de la maduración estudiados (hCG, progesterona, testosterona y ión lantano) son igualmente sensibles a la presencia de teofilina para producir su efecto. En la Figura 23 se puede ver que papaverina a una concentración 10^{-4} M es capaz de inhibir en un 100 % la maduración provocada por cualquiera de los agentes estudiados. En cambio, la concentración de teofilina necesaria para lograr una inhibición de un 100 % de la maduración es de 10^{-3} M. Esta diferencia de efectividad entre teofilina y papaverina podría deberse a un problema de permeabilidad entre ambos compuestos aún cuando existe una buena correlación con su capacidad inhibitoria de la fosfodiesterasa de cAMP (105).

Otro inhibidor que se estudió fue 2,4-dinitrofenol, pensando que sería indispensable el requerimiento de energía para la maduración. Los resultados obtenidos demuestran que con concentraciones de 2,4-dinitrofenol de 10^{-3} M, el oocito es incapaz de responder a hormonas en presencia de esa concentración de inhibidor. Análisis de la síntesis de proteínas bajo estas condiciones indican que se encuentra inhibida en más de un 90 %, lo cual explicaría el fenómeno observado. Esto impidió estudiar en más detalle el posible rol energético en la maduración.

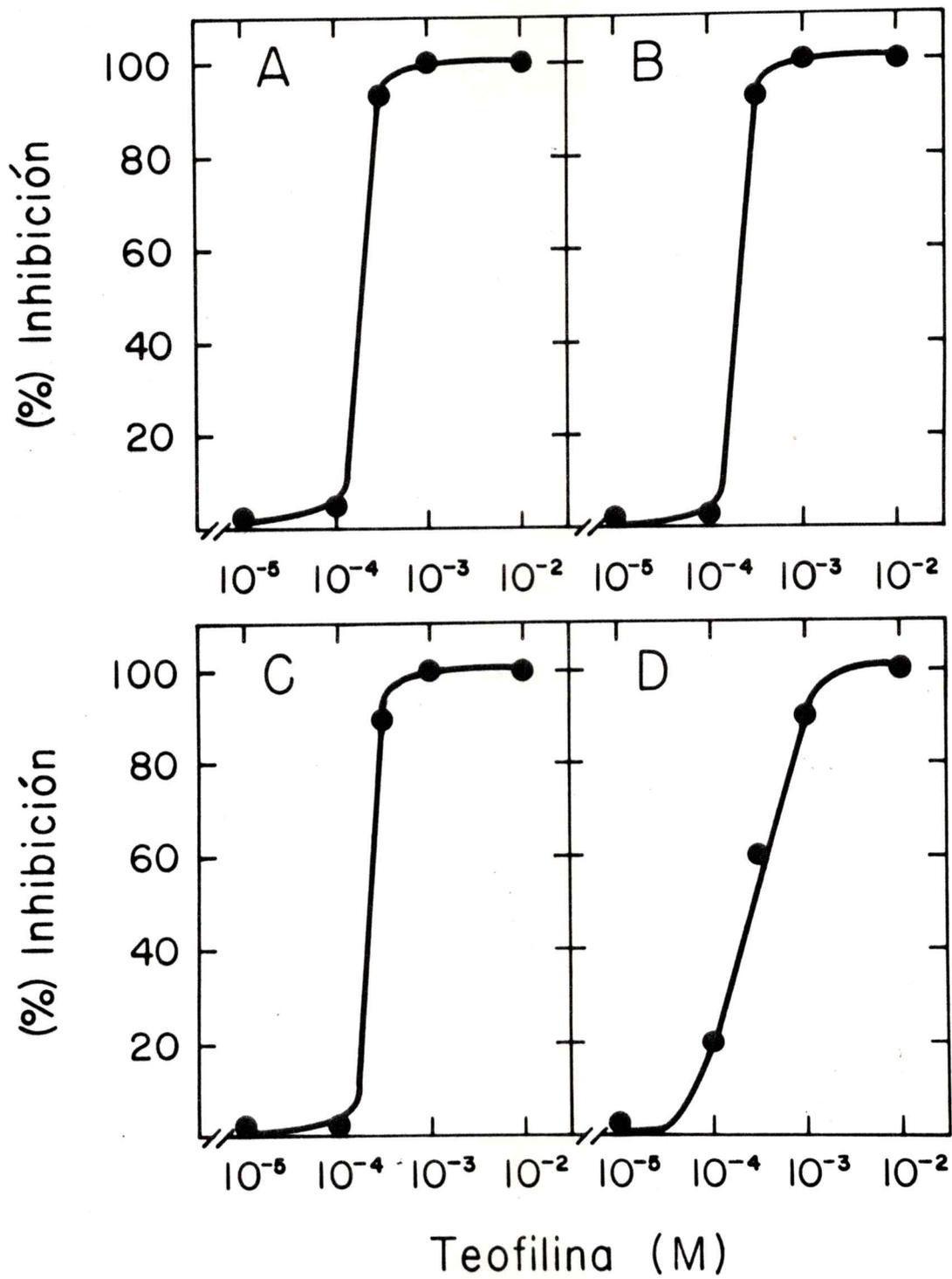


Figura 22

Figura 22

Efecto de teofilina a diferentes concentraciones sobre la maduración de oocitos de Xenopus laevis provocada por hormonas o ión lantano.

Los oocitos se incubaron en grupos de 100 en solución HF en presencia de teofilina y de los inductores de maduración, durante 18 horas a 22°. (A), hCG 60 unidades/ml; (B), progesterona 10^{-7} M; (C), testosterona 10^{-7} M; (D), lantano 10^{-2} M. Cada punto representa el análisis de 100 oocitos (ver Métodos).

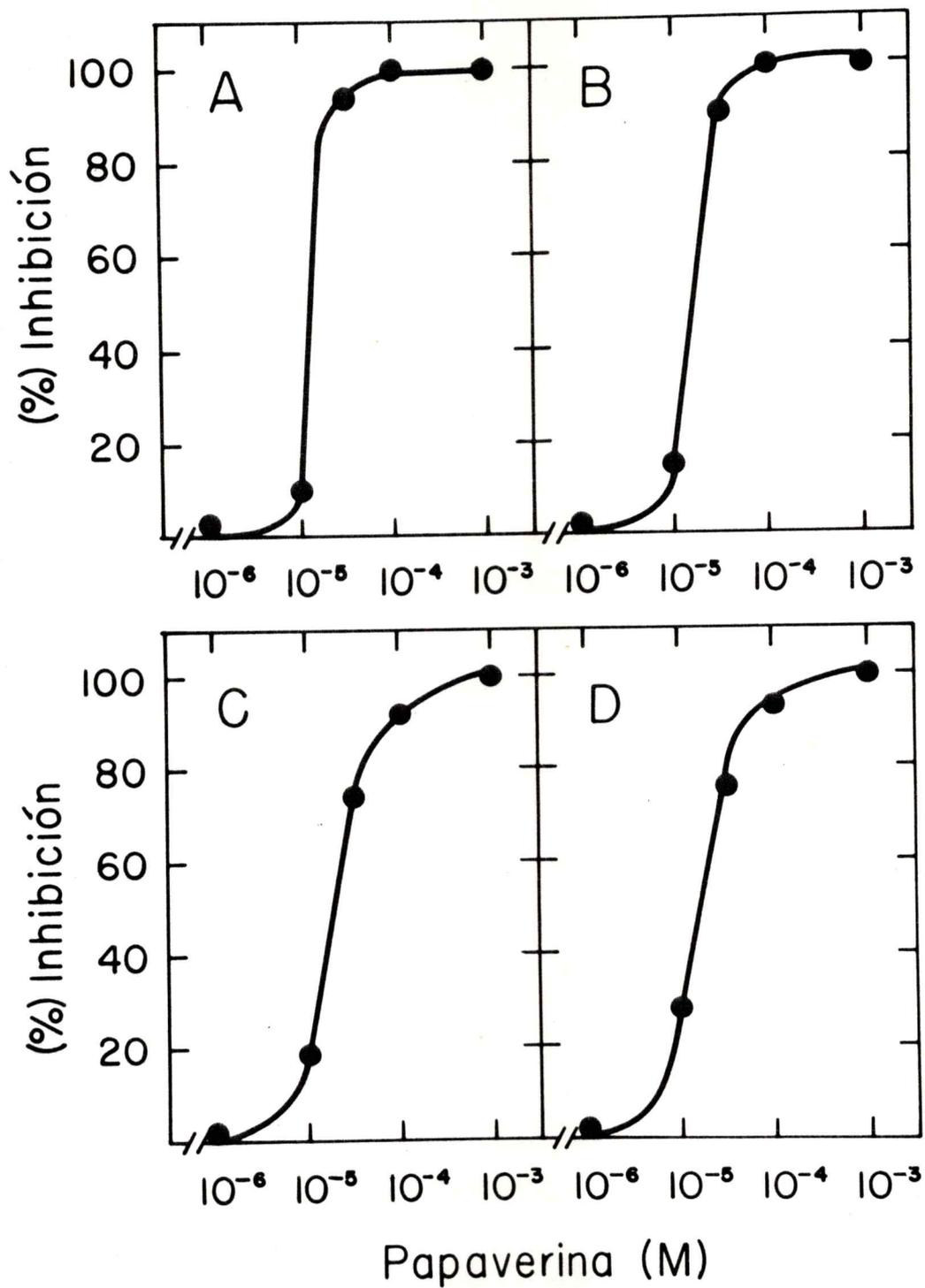


Figura 23

Figura 23

Efecto de diferentes concentraciones de papaverina sobre la maduración de oocitos de Xenopus laevis, provocada por hormonas o ión lantano.

Grupos de 100 oocitos se incubaron en solución HF en presencia de papaverina y de los diferentes inductores de la maduración durante 18 horas a 22°. Las concentraciones de hCG (A); progesterona (B); testosterona (C) y lantano (D) son idénticas a las de la figura anterior. Cada porcentaje de maduración se basa en el análisis de 100 oocitos (ver Métodos).

Con el objeto de estudiar la posible reversibilidad del efecto de los inhibidores mencionados, se hicieron los experimentos que se presentan en la Tabla V. Como se puede ver, el efecto de preincubar oocitos con teofilina 10^{-3} M durante 1 hora antes del tratamiento hormonal, no impide la maduración inducida ni por hCG, testosterona o progesterona. En cambio, el efecto de papaverina 10^{-4} M y cicloheximida 10^{-5} M sería irreversible, observándose inhibición de la maduración después de ser retirados del medio de incubación.

Existen evidencias en la literatura que teofilina y papaverina son antagonistas del transporte de Ca^{++} (106, 107). Además, hemos observado que los oocitos son incapaces de responder a hormona en ausencia de ión Ca^{++} . Estos hechos hicieron pensar en la posibilidad que los inhibidores, como teofilina y papaverina, estuvieran afectando el transporte de Ca^{++} en el oocito.

Para estudiar esta posibilidad se realizaron experimentos con el fin de detectar variaciones en la permeabilidad de Ca^{++} del oocito, cuando éste es expuesto a hormonas. Se utilizó para ello $^{45}\text{Ca}^{++}$ como ión radiactivo. Los oocitos se incubaron con hormona, en presencia o ausencia de teofilina o papaverina y $^{45}\text{Ca}^{++}$. Se detectó la radiactividad que había penetrado a las células en cada caso (Tabla 6) Como se muestra en la tabla, ambas hormonas, hCG y progesterona, producen un estímulo en la entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ de 4 y 2

TABLA V

Reversibilidad del efecto de distintos
inhibidores de la maduración de oocitos
de Xenopus laevis

Pretratamiento	Hormona	% Maduración
Control	hCG	100
+ papaverina 1×10^{-4} M	hCG	0
+ teofilina 1×10^{-3} M	hCG	84
+ cicloheximida 1×10^{-5} M	hCG	0
Control	Progesterona	100
+ papaverina 1×10^{-4} M	Progesterona	0
+ teofilina 1×10^{-3} M	Progesterona	93
+ cicloheximida 1×10^{-5} M	Progesterona	10
Control	Testosterona	100
+ papaverina 1×10^{-4} M	Testosterona	5
+ teofilina 1×10^{-3} M	Testosterona	100
+ cicloheximida 1×10^{-5} M	Testosterona	15

Los oocitos se incubaron, en grupos de 100, en solución HF a 20° en presencia de los inhibidores, papaverina 10^{-4} M; teofilina 10^{-3} M o cicloheximida 10^{-5} M, durante 1 hora. Luego, se lavaron exhaustivamente con solución HF y se les agregó la hormona. Las concentraciones de hormonas usadas fueron:

(Cont. Tabla V)

hCG, 60 unidades/ml; progesterona 10^{-7} M y testosterona 10^{-7} M. La maduración se analizó a las 18 horas de acción hormonal. El porcentaje de maduración se calculó del análisis de 100 oocitos.

TABLA VI

Efecto de hormonas e inhibidores sobre permeabilidad del ión calcio en oocitos de X.laevis

	Entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ (cpm/oocito)	% Control
Control	1579	100
+ teofilina 10^{-3}M	1670	106
+ papaverina 10^{-4}M	1397	89
hCG	6650	423
+ teofilina 10^{-3}M	3250	195
+ papaverina 10^{-4}M	2430	174
Progesterona	3132	199
+ teofilina 10^{-3}M	1476	89
+ papaverina 10^{-4}M	1550	110

$^{45}\text{Ca}^{++}$, actividad específica 900 uCi/umol, 0,5 uCi/ensayo, se agregó simultáneamente con la hormona y/o el inhibidor. La incubación fué de 2 horas en solución HF a 20°- 22°. La radiactividad total del oocito se analizó en forma idéntica a la de aminoácidos (ver texto y Métodos). hCG, 60 unidades/ml, progesterona 10^{-7}M . Controles de maduración indicaron que los oocitos respondieron un 90 % a la acción hormonal.

veces respectivamente, con respecto al control. Teofilina y papaverina no inhiben la entrada en los oocitos no tratados con hormonas. En cambio, producen una inhibición considerable del estímulo causado por las hormonas.

Por los resultados anteriormente expuestos, existiría la posibilidad que el efecto de estos inhibidores pudiera ser revertido por altas concentraciones de Ca^{++} en el medio de incubación.

La Figura 24 muestra los resultados obtenidos al variar la concentración de Ca^{++} sobre el efecto inhibitor de teofilina, el cual se revierte al ir aumentando la concentración externa de Ca^{++} . En cambio, la inhibición causada por papaverina no es revertida aún a concentraciones de Ca^{++} de 4 mM. Esto estaría en parte, de acuerdo con el hecho que el efecto de papaverina no se revierte si se saca este inhibidor del medio de incubación antes de agregar la hormona. Los datos anteriores muestran claramente, que sólo el efecto de teofilina es reversible, no así el de papaverina.

Para estudiar en más detalle el efecto de teofilina y papaverina sobre la maduración provocada por hormonas, se realizó un experimento en el cual se agregó el inhibidor, a distintos tiempos, después de adicionada la hormona al medio de incubación de los oocitos (Figura 25). En la parte A de la figura se ve que teofilina es capaz de inhibir la

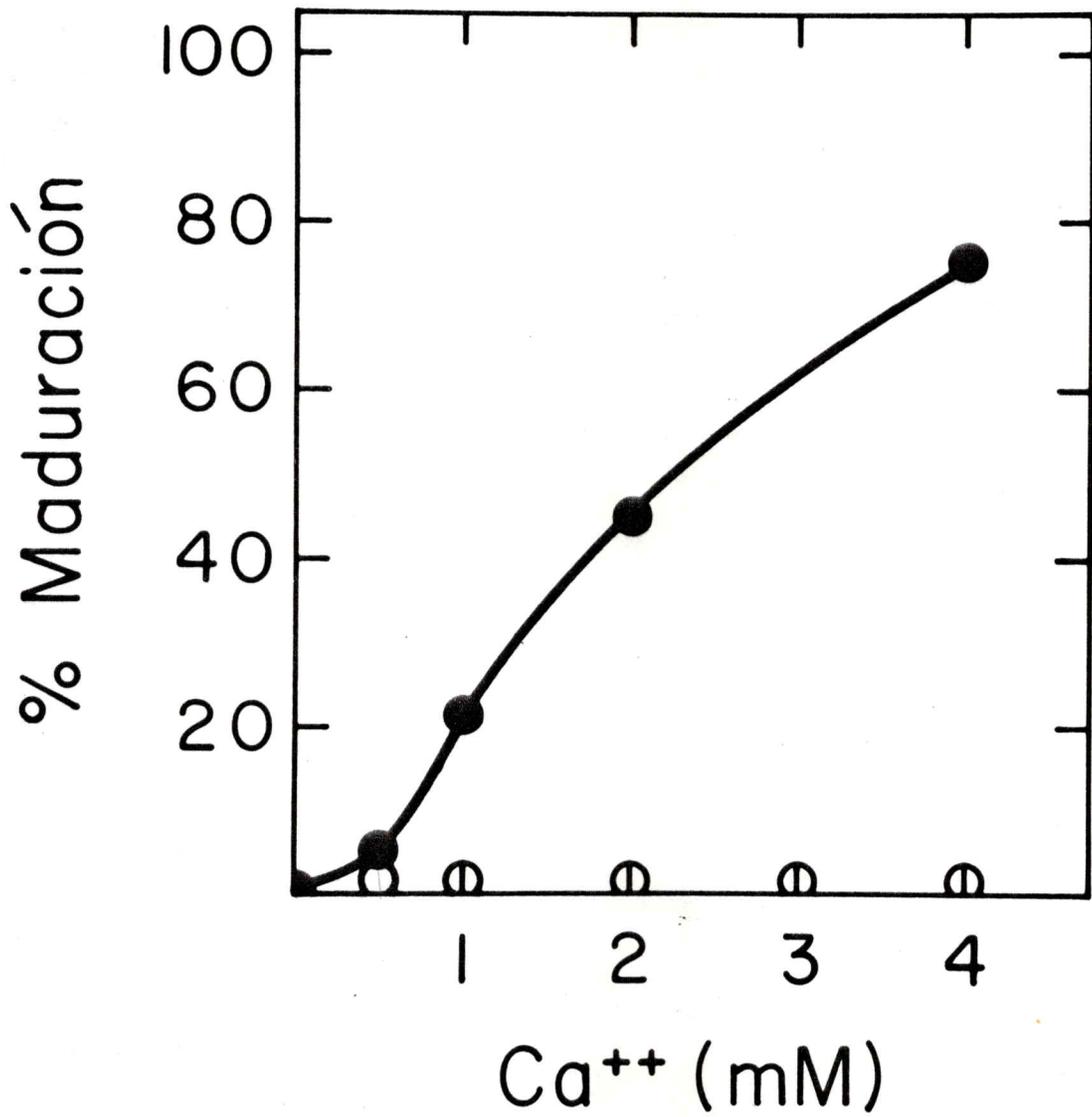


Figura 24

Figura 24

Efecto de diferentes concentraciones de Ca^{++} sobre la inhibición de maduración por teofilina y papaverina en oocitos de Xenopus laevis

Los oocitos en grupos de a 100 fueron preincubados durante dos horas a 20° en solución HF con las distintas concentraciones de Ca^{++} antes de agregar los inhibidores. Luego se agregó simultáneamente hCG 60 unidades/ml y teofilina 10^{-3} M (●) o papaverina 10^{-4} M (○). Cada punto representa el análisis de 100 oocitos después de 18 horas de incubación.

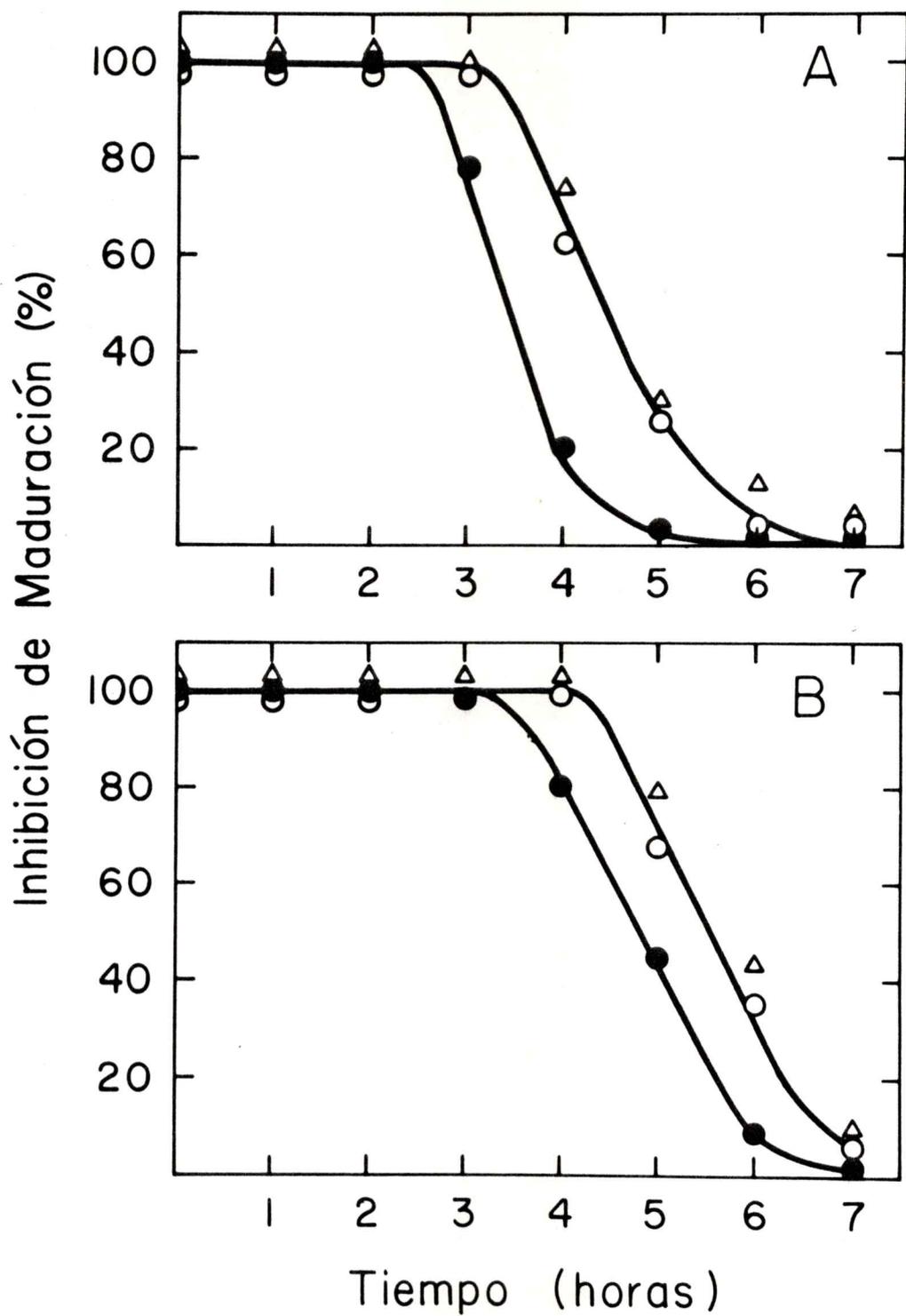


Figura 25

Figura 25

Efecto de teofilina y papaverina sobre la maduración de oocitos de Xenopus laevis a distintos tiempos después de la inducción hormonal.

Oocitos en grupos de 100 se incubaron en presencia de hCG, 60 unidades/ml (⊗), progesterona 10^{-7} M (○) o testosterona 10^{-7} M (△) y a los tiempos indicados se les agregó teofilina 10^{-3} M (A) o papaverina 10^{-4} M (B). Después de 18 horas de estímulo hormonal se analizó la maduración (ver Métodos). Los oocitos usados en (A) provienen de diferente animal que los usados en (B).

la maduración en más de un 80 % aún después de 3 horas de acción hormonal. La capacidad de inhibir la maduración provocada por las hormonas a diferentes tiempos está en relación con la velocidad en que éstas inducen el rompimiento de la vesícula germinal.

En la figura 25B, se muestra el efecto de papaverina adicionada a diferentes tiempos después de agregada la hormona. Los resultados obtenidos son muy similares a los descritos para teofilina.

Experimentos análogos a los anteriores pero usando cicloheximida como inhibidor, dieron resultados similares a los obtenidos con teofilina y papaverina. Este resultado es muy importante, porque indica que se necesitaría síntesis de proteínas durante varias horas después del estímulo hormonal para inducir la maduración.

Los datos presentados hasta el momento, dan cierto indicio de la acción de los inhibidores sobre las distintas hormonas inductoras de la maduración. Pero no dan información de la manera de actuar sobre la maduración inducida por una misma hormona.

Con el objeto de comparar si los inhibidores (teofilina, papaverina y cicloheximida) actuarían en la misma etapa post-inducción hormonal, se incubaron oocitos en presencia de testosterona o de hCG y se les agregó el inhibidor después de diferentes tiempos de la acción

hormonal (Figura 26). En forma paralela se analizó el rompimiento de la vesícula germinal a través del tiempo. Como es posible ver en la parte superior de la figura, existe una pequeña diferencia de los inhibidores en cuanto a su período de acción post-hormonal. En este caso, teofilina, después de 3 horas, sólo inhibe un 55 % la maduración, en cambio, cicloheximida y papaverina aún la inhiben en un 75 %. Esta diferencia puede deberse, también, a una diferencia en permeabilidad de estos compuestos.

Es importante destacar que los inhibidores de la fosfodiesterasa presentan una gran similitud en el mecanismo de acción con cicloheximida, ya que en ambos casos existe la misma capacidad de inhibir el rompimiento de la vesícula germinal después de agregada la hormona.

Estudios similares realizados con hCG se muestran en la parte inferior de la Figura 26; el efecto de inhibidores es idéntico al obtenido cuando se indujo la maduración con testosterona. En ambos casos, los inhibidores serían capaces de impedir la maduración hasta 1 hora antes de comenzar el rompimiento de la vesícula germinal. Este último hecho demuestra que se necesita, al menos, de la síntesis de proteínas hasta pocos momentos de disolverse la vesícula germinal para que pueda ocurrir este fenómeno.

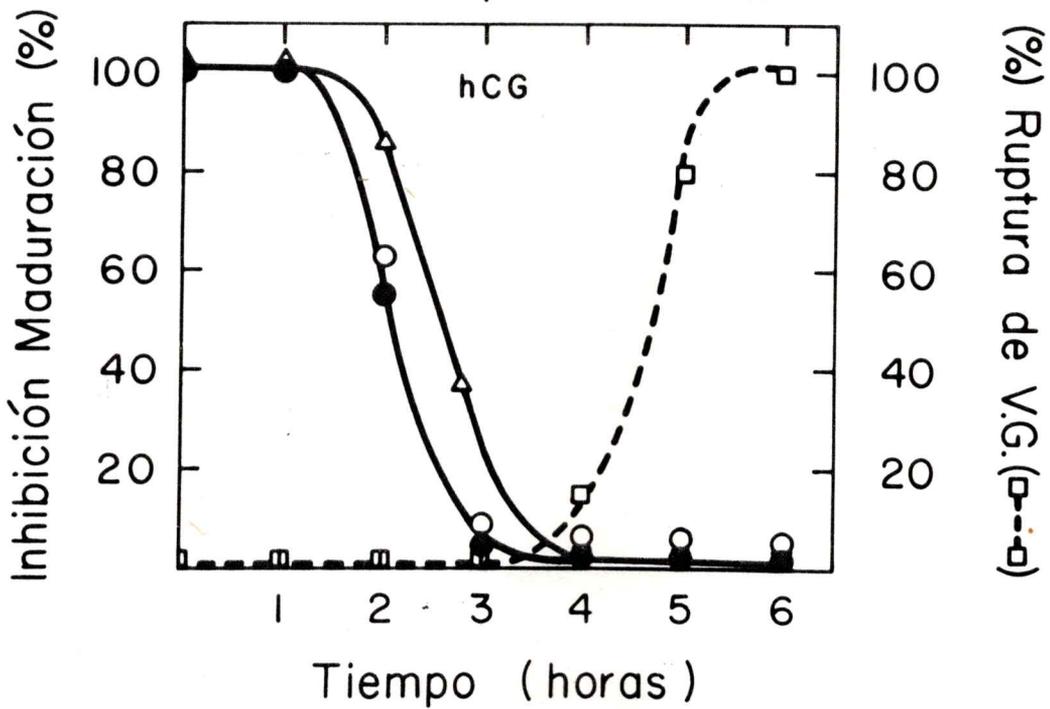
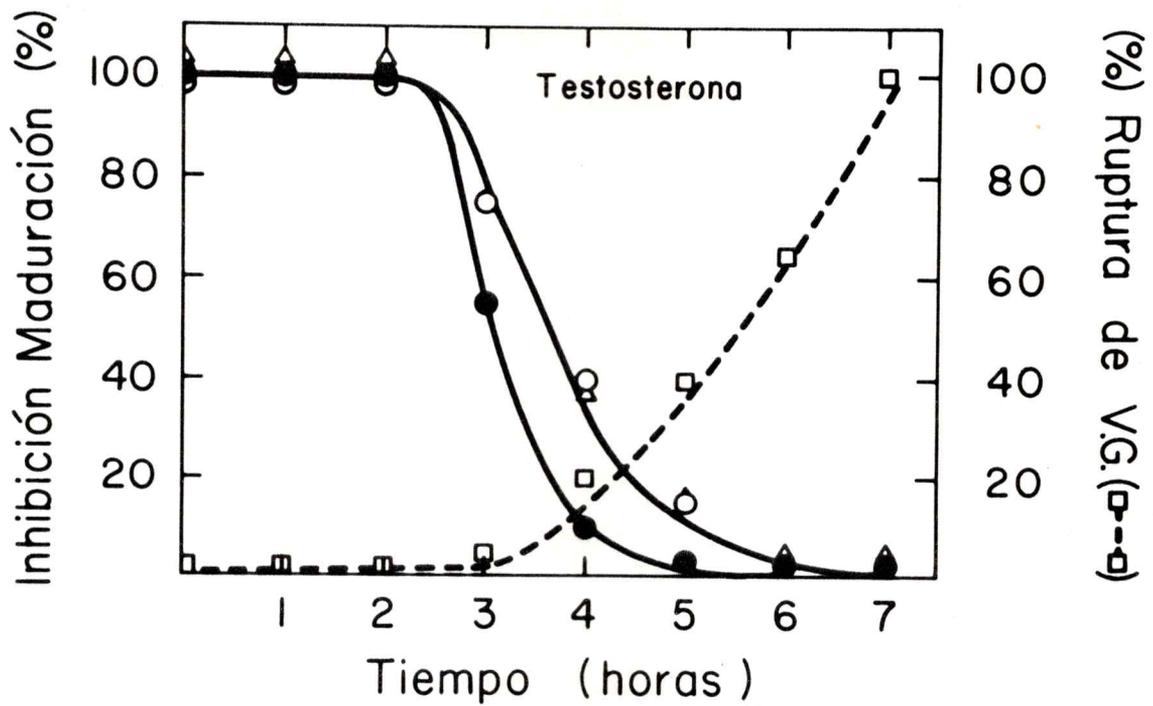


Figura 26

Figura 26

Efecto de distintos inhibidores sobre la maduración a distintos tiempos de agregada la hormona en oocitos de Xenopus laevis.

Las hormonas usadas fueron hCG, 60 unidades/ml, y testosterona 10^{-7} M. Los oocitos se incubaron en grupos de a 100 en presencia de hormona y se les agregó teofilina 10^{-3} M (●), cicloheximida 10^{-5} M (○), o papaverina 10^{-4} M (△). Los análisis de maduración se realizaron después de 18 horas de acción hormonal. El porcentaje de ruptura de vesículas germinales (□) de oocitos tratados solamente con hormonas se realizó a los tiempos indicados por análisis de 100 oocitos.

E. Efecto de Papaverina y Teofilina sobre la síntesis de proteínas.

Los resultados mostrados en la Figura 26 hicieron pensar en la posibilidad que teofilina y papaverina estuvieran inhibiendo, de alguna manera, la síntesis de proteínas. Para estudiar esta posibilidad se incubaron oocitos en presencia de teofilina 10^{-3} M o papaverina 10^{-4} M y se vió la incorporación de aminoácidos radiactivos en estas condiciones (Tabla VII). Como lo muestra la tabla, es claro que tanto papaverina 10^{-4} M como teofilina 10^{-3} M que son las concentraciones que bloquean la maduración de los oocitos, son capaces de inhibir un 50 % la síntesis de proteínas. En ambos casos, la entrada de aminoácido a la célula no se encuentra afectada.

Tratando, entonces, de relacionar el efecto de los inhibidores de la fosfodiesterasa sobre la maduración y la síntesis de proteínas, se estudió la reversibilidad de la inhibición de la síntesis de proteínas debido a la presencia de teofilina o papaverina.

Para ver la reversibilidad de esta inhibición, se incubaron oocitos en presencia de teofilina 10^{-3} M o papaverina 10^{-4} M durante 1 hora. Luego se lavaron extensamente con solución HF y se analizó la incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas adicionando el aminoácido a diferentes tiempos, después de haber retirado el inhibidor del medio de incubación (Figura 27). Los resultados

TABLA VII

Efecto de teofilina y papaverina
sobre la síntesis de proteínas en oocitos de *X.laevis*

	Radiactividad incorporada a proteínas cpm/5 oocitos	% Control
Control	10.540	100
+ teofilina 10^{-3} M	6.185	58
+ papaverina 10^{-4} M	6.382	59

Grupos de 5 oocitos en duplicado se preincubaron durante 1 hora en solución HF a 20° en presencia de teofilina 10^{-3} M o papaverina 10^{-4} M, antes de agregar el aminoácido radiactivo. Se incubaron durante 1 hora en presencia de 14 C-leucina, actividad específica 240 uCi/umol, a una concentración de 18 uM, para detectar incorporación a proteínas. El análisis de la radiactividad incorporada a proteínas se realizó como se describe en Métodos.

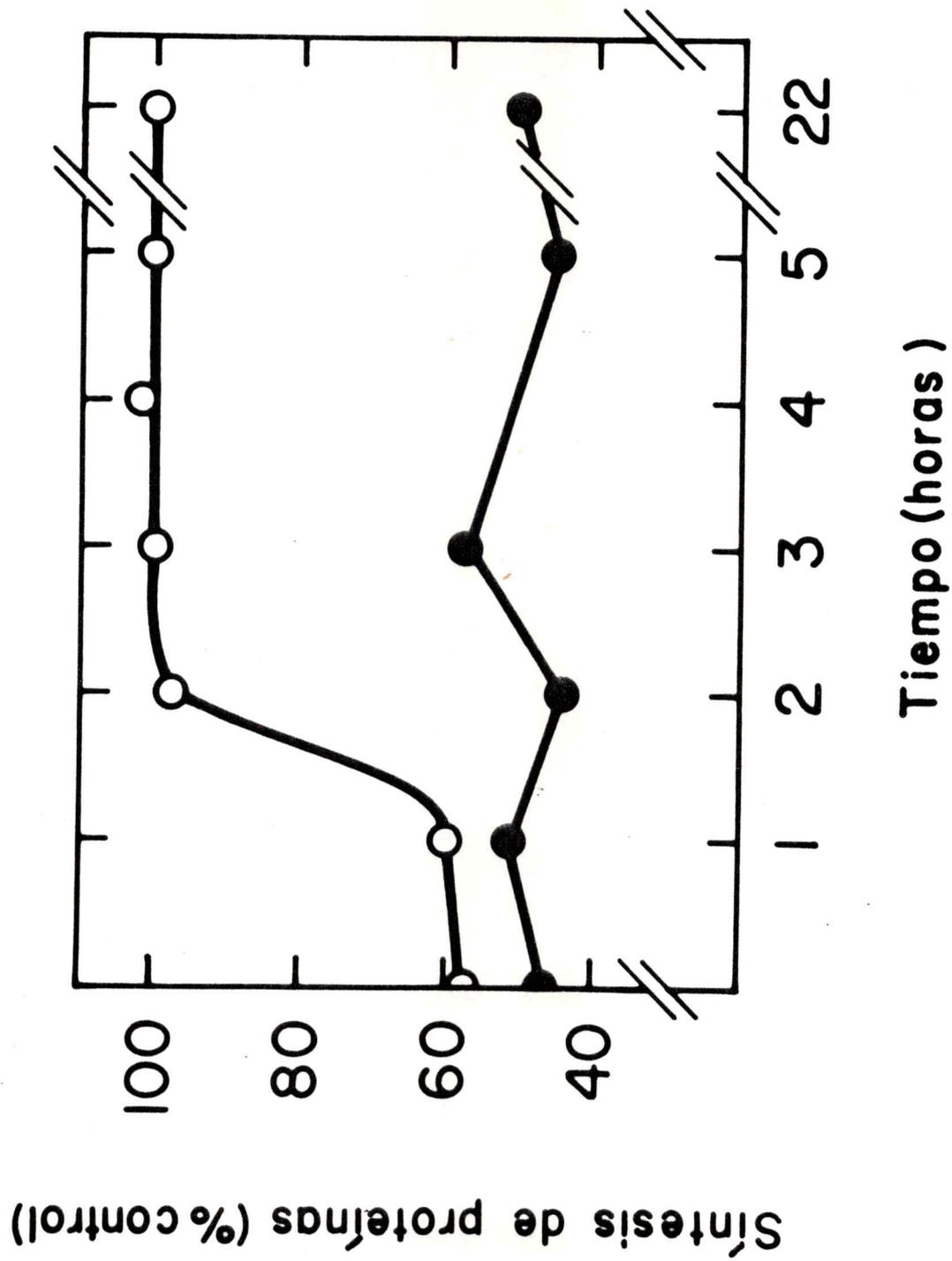


Figura 27

Figura 27

Reversibilidad de la inhibición provocada por teofilina o papaverina sobre la síntesis de proteínas en oocitos de Xenopus laevis

Los oocitos se preincubaron durante 1 hora a 22° en presencia de teofilina 10^{-3} M (O) o papaverina 10^{-4} (●). Luego se lavaron exhaustivamente con solución HF y se agregó 14 C-leucina, actividad específica 240 uCi/umol a los tiempos indicados en la figura. La incubación en presencia del aminoácido radiactivo fue de 1 hora a 22°. La incorporación de aminoácido a proteínas se analizó como se describe en Métodos.

mostrados en la figura, indican que el efecto de papaverina sobre la síntesis de proteínas no se revierte aún cuando se retire este inhibidor del medio de incubación. Aún después de 22 horas es capaz de inhibir en un 50 % la incorporación de aminoácidos a proteínas. En cambio, la teofilina pierde el efecto sobre la síntesis de proteínas después de 2 horas de haber sido retirado del medio de incubación.

Con el fin de relacionar aún más el efecto de teofilina y papaverina sobre la maduración y síntesis de proteínas, se estudió el efecto de concentraciones altas de Ca^{++} (5mM) sobre la inhibición causada por estos compuestos, ya que a esta concentración de Ca^{++} teofilina no es capaz de impedir la maduración, en cambio, la acción de papaverina no se afecta por la alta concentración de este ión divalente. Como se muestra en la Figura 28, al incubar los oocitos en presencia de teofilina 10^{-3}M y Ca^{++} $5 \times 10^{-3}\text{M}$ inicialmente se produce un 40 % de inhibición de síntesis de proteínas, pero vuelve a sus niveles normales después de 3 horas. En el caso de papaverina, en cambio, la presencia de Ca^{++} 5 mM no es capaz de revertir la inhibición causada por este compuesto. Cabe recordar que, en este caso tanto teofilina 10^{-3}M como papaverina 10^{-4}M están presentes durante toda la incubación.

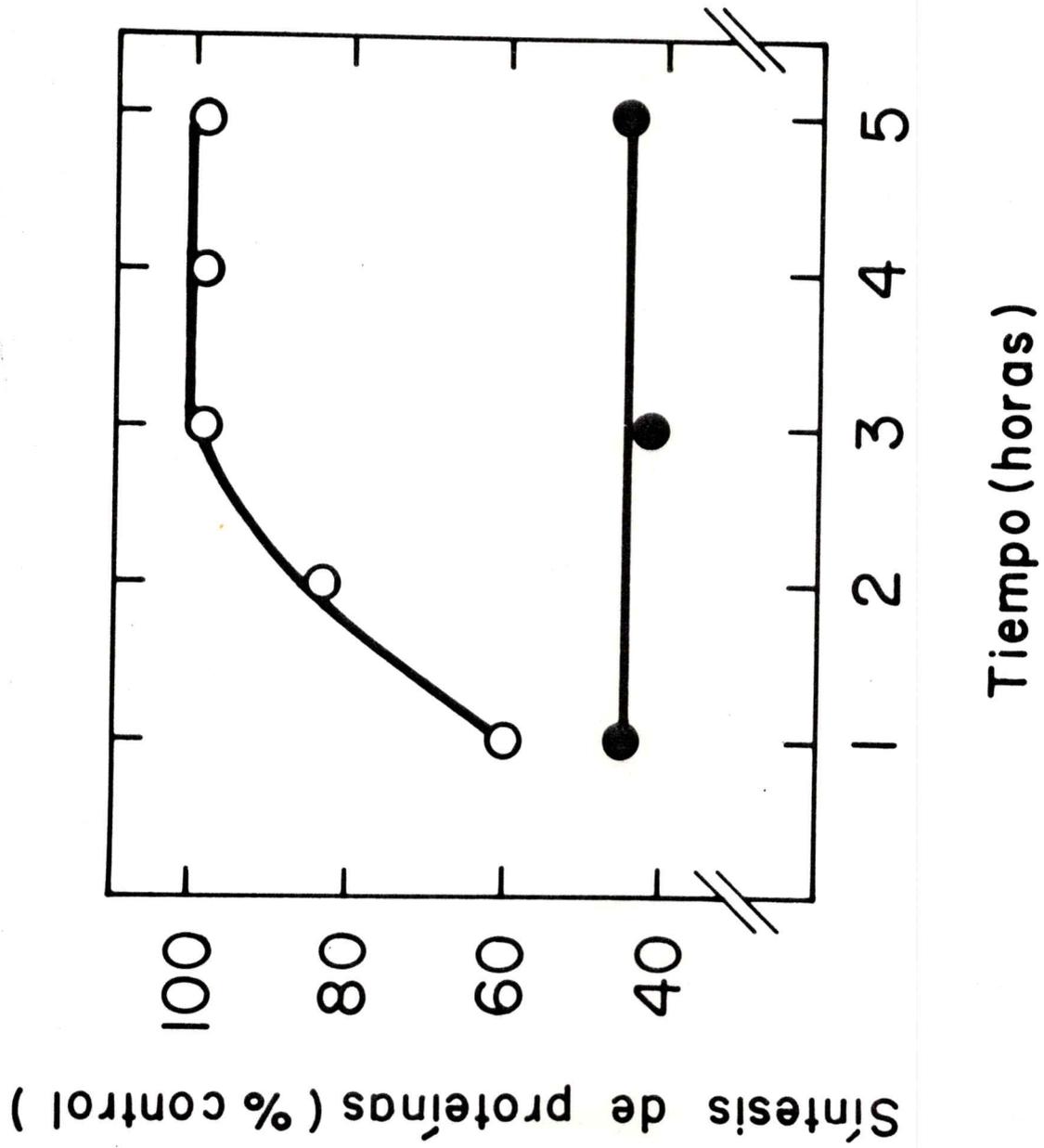


Figura 28

Figura 28

Influencia de Ca^{++} sobre la inhibición de síntesis de proteínas en oocitos de Xenopus laevis provocada por teofilina y papaverina.

Oocitos, en grupos de a 5 en duplicado, se incubaron en presencia de Ca^{++} $5 \times 10^{-3}\text{M}$ y teofilina 10^{-3}M o papaverina 10^{-4}M . A los tiempos indicados se agregó ^{14}C -leucina $1,8 \times 10^{-5}\text{M}$, actividad específica 240 uCi/umol, y las células se incubaron durante 1 hora más. La síntesis de proteínas se detectó como se describió en Métodos.

Niveles de cAMP y maduración de oocitos

El hecho de haber encontrado que teofilina y papaverina, inhibidores de la fosfodiesterasa de cAMP, fueran capaces de impedir la maduración de los oocitos, hizo pensar, seriamente, en la posibilidad que este nucleótido cíclico estuviera involucrado en el proceso de maduración.

En la Figura 29 se muestra una gráfica en que se puede ver la cantidad de cAMP que posee el oocito (29A) o que existe en la vesícula germinal (29B), expresado en pmoles. En (A) se observa que las concentraciones internas del oocito fluctuaron entre un rango de 1-5 pmoles, en las 60 determinaciones diferentes efectuadas. Si se toma el volumen del oocito como de 0,7 ul, ésto daría una concentración de 1-5 uM. Estos resultados concuerdan con los recientemente obtenidos por Brachet y col. (108). En el caso de la vesícula germinal, los valores fluctúan normalmente, entre 0,1-0,5 pmoles por v.g.. El diámetro de la vesícula germinal es, aproximadamente 0,3 mm, obteniéndose, por lo tanto, un volumen de 0,015 ul, aproximadamente. Con estos datos se obtiene que la concentración de cAMP dentro de la vesícula, es de 5-20 uM, lo cual es 5-20 veces la concentración en el oocito. Este hecho puede ser de gran importancia para un posible rol en la regulación de la expresión génica.

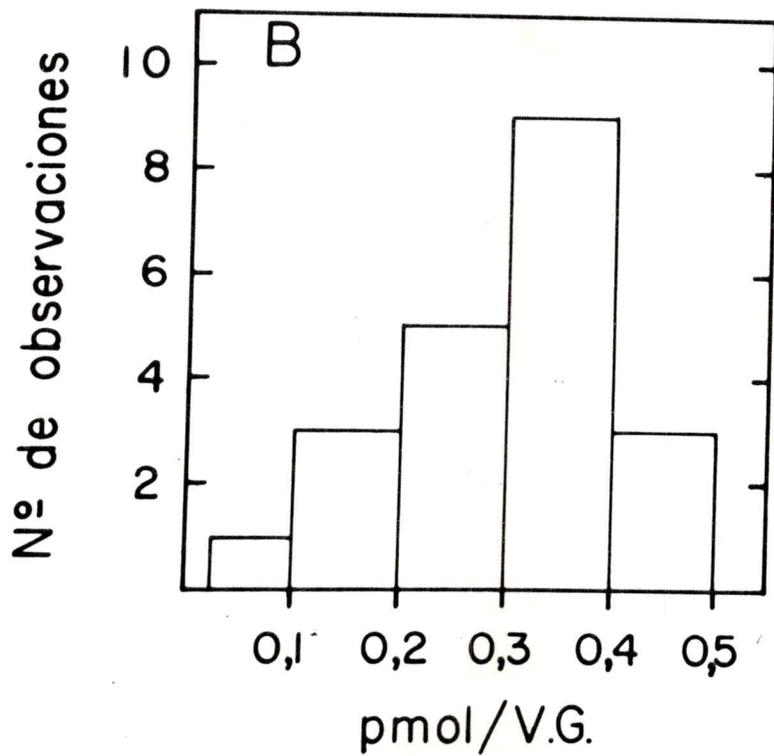
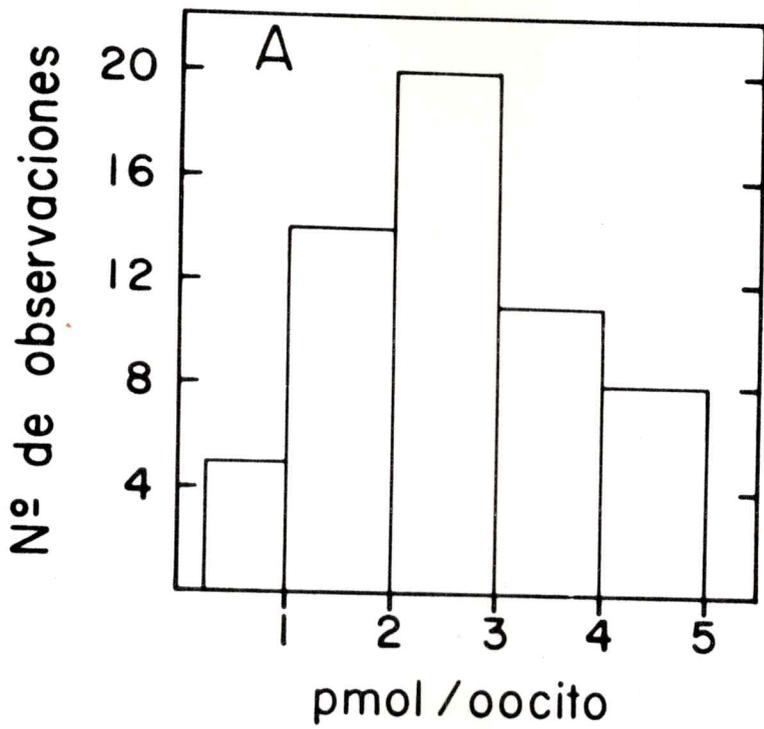


Figura 29

Figura 29

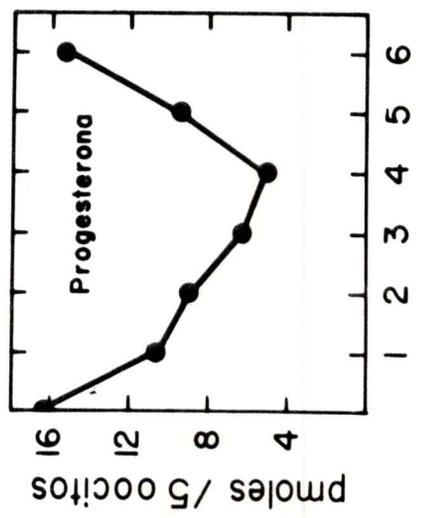
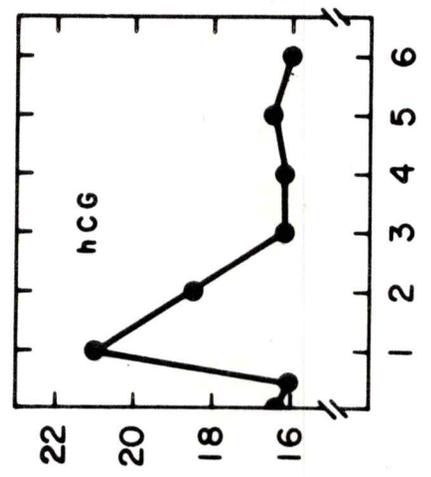
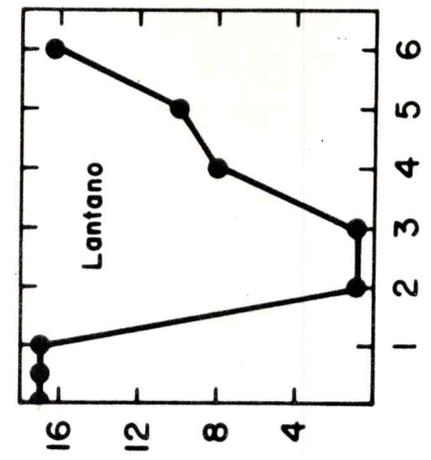
Niveles de cAMP en oocitos y vesículas germinales

Se utilizaron grupos en duplicado de 5 oocitos o 20 vesículas germinales para cada determinación. Cada análisis se realizó utilizando diferentes animales y en diferentes épocas del año. La extracción de la vesícula germinal y el análisis de cAMP se realizó como se describe en Métodos.

Las variaciones observadas en las determinaciones no serían un artefacto de técnica, sino que, a cambios de tipo estacional y variaciones individuales de los animales. Normalmente los oocitos de tamaños semejantes provenientes de una misma hembra poseen niveles de cAMP que no difieren más allá de un 10 %.

Para ver si realmente existía alguna relación entre la maduración y los niveles de cAMP en el oocito, se incubaron células en presencia y ausencia de agentes inductores de la maduración y, a diferentes tiempos después del estímulo, se analizaron los niveles de cAMP (Figura 30). En esta figura aparecen los cambios en los niveles de cAMP provocados por progesterona, hCG y ión lantano. Tanto la progesterona como el ión lantano bajan, inicialmente, los valores del nucleótido cíclico alcanzando un valor mínimo al cabo de 3-4 horas para el caso de progesterona y a las 2-3 horas para ión lantano. Luego, en ambos casos los niveles regresan a su valor normal a las 5-6 horas de agregado el agente inductor de la maduración.

Para el caso de hCG, el efecto es justamente el contrario, pues se produce un aumento en los niveles de cAMP llegando a un valor máximo entre las 2-3 horas para después retornar a los valores normales, entre las 3-4 horas de la acción hormonal. El aumento en los niveles de cAMP alcanza, a veces, valores de 5 veces el nivel inicial.



Tiempo (horas)

Figura 30

Figura 30

Variaciones en los niveles de cAMP provocados por diferentes agentes inductores de la maduración en oocitos de Xenopus laevis

Los agentes inductores de maduración usados fueron hCG, 60 unidades/ml, progesterona 10^{-7} M y lantano 10^{-2} M. Cada punto es el promedio de determinaciones en duplicado de 5 oocitos (ver Métodos). Estos datos son representativos de 4 experimentos similares.

En experimentos controles, en los cuales se incubaron oocitos sin agentes inductores, no se detectó variación de cAMP durante 6-8 horas de incubación. Análisis realizados en oocitos maduros (18 horas después de la acción hormonal) demostraron que el nivel del nucleótido cíclico, en este caso, era idéntico al de oocitos no tratados con hormonas.

Estradiol que no produce maduración, no fue capaz de alterar los niveles de cAMP aún a concentraciones de 10^{-7} M, durante 7 horas.

Con la idea de poder relacionar el efecto de teofilina y papaverina sobre la maduración y los cambios de cAMP producidos por hormonas, se realizaron, inicialmente, experimentos en los cuales se incubaron oocitos en presencia y ausencia de estos inhibidores y, además, cicloheximida, durante diferentes tiempos y se analizó el contenido de nucleótido cíclico presente en las células (Figura 31). Es claro que ninguno de los inhibidores estudiados produce alteraciones en el contenido de cAMP del oocito, aún después de 5 horas de incubación en presencia de ellos. Se muestra también en la figura que los niveles de cAMP de oocitos incubados en ausencia de inhibidor tampoco sufren modificaciones.

Como los resultados anteriores no explicaban la acción de teofilina y papaverina, se estudió el efecto de agregar estos inhibidores simultáneamente con las hormonas, para

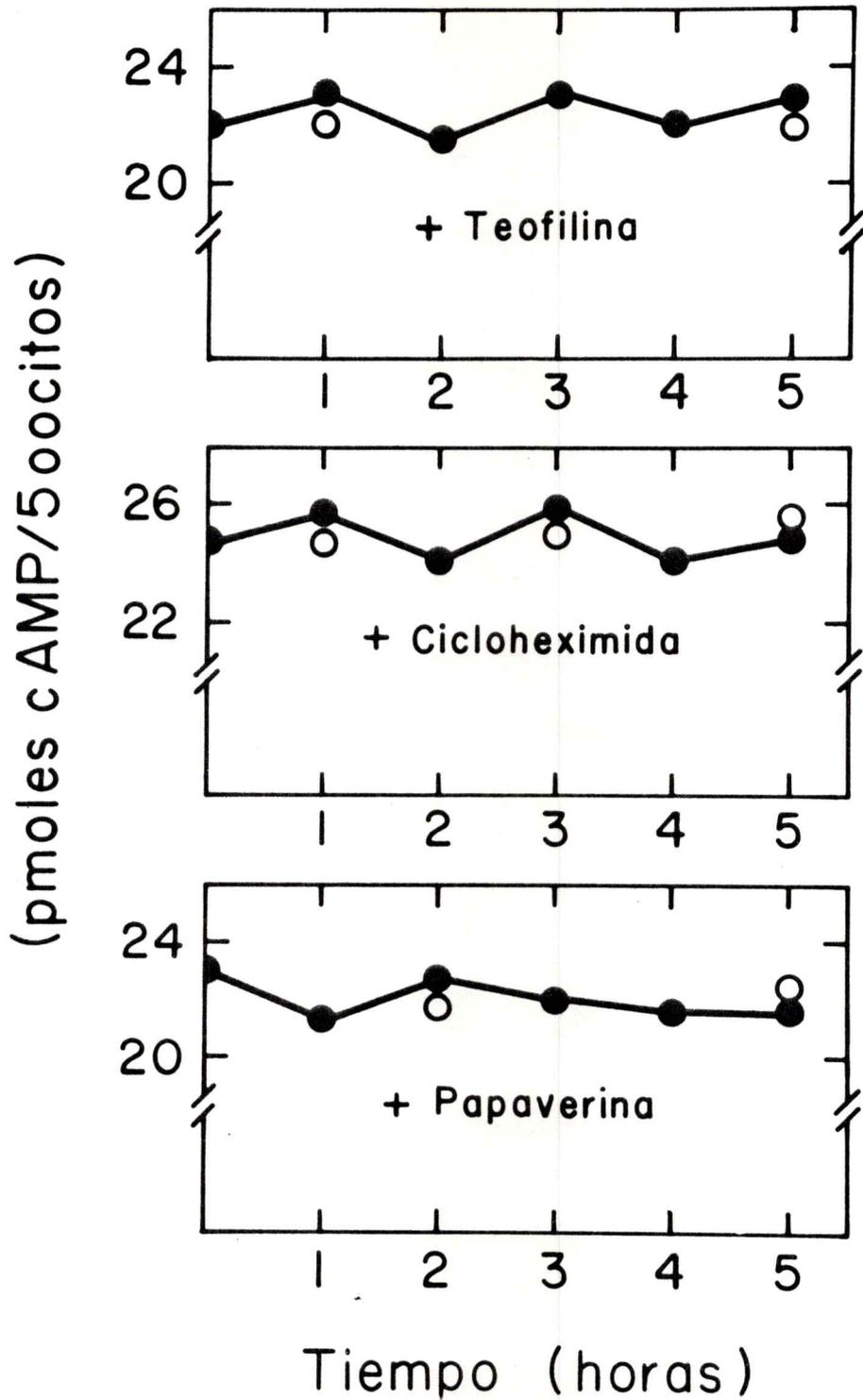


Figura 31

Figura 31

Influencia de diferentes inhibidores de la maduración sobre los niveles de cAMP en oocitos de X. laevis

Los inhibidores usados fueron papaverina 10^{-4} M, cicloheximida 10^{-5} M y teofilina 10^{-3} M. Los puntos (●) representan el análisis por duplicado de 5 oocitos en presencia de inhibidor. Controles en ausencia de inhibidor (○). Estos resultados son representativos de 5 análisis con oocitos provenientes de diferentes animales. Determinación de cAMP se hizo como se describe en Métodos.

ver si aún se modificaban los niveles de cAMP por el efecto hormonal.

Como se muestra en la Figura 32, tanto los cambios de cAMP producidos por progesterona como los inducidos por hCG son completamente inhibidos en presencia de teofilina. Efectos similares se obtuvieron con papaverina.

Resultados preliminares que no se muestran, en los cuales se vió el efecto de cicloheximida sobre los cambios de cAMP producidos por progesterona, demostraron que no había variación por la presencia de este inhibidor.

Los resultados anteriores harían pensar que, al menos, no se necesitaría de la síntesis de proteínas para producir los cambios de cAMP por hormonas, y que este fenómeno sería sólo uno de numerosos efectos de la acción hormonal sobre los oocitos en el proceso de maduración.

Actividad fosfodiesterásica en oocitos durante la maduración

Estudios realizados en el laboratorio mediante microinyección de cAMP radiactivo a oocitos, han demostrado la presencia de una gran actividad fosfodiesterásica capaz de hidrolizar este nucleótido cíclico dando 5'AMP. Se ha logrado caracterizar las propiedades cinéticas de esta enzima obteniéndose un valor de Km de 5×10^{-4} M y una V_{max} de

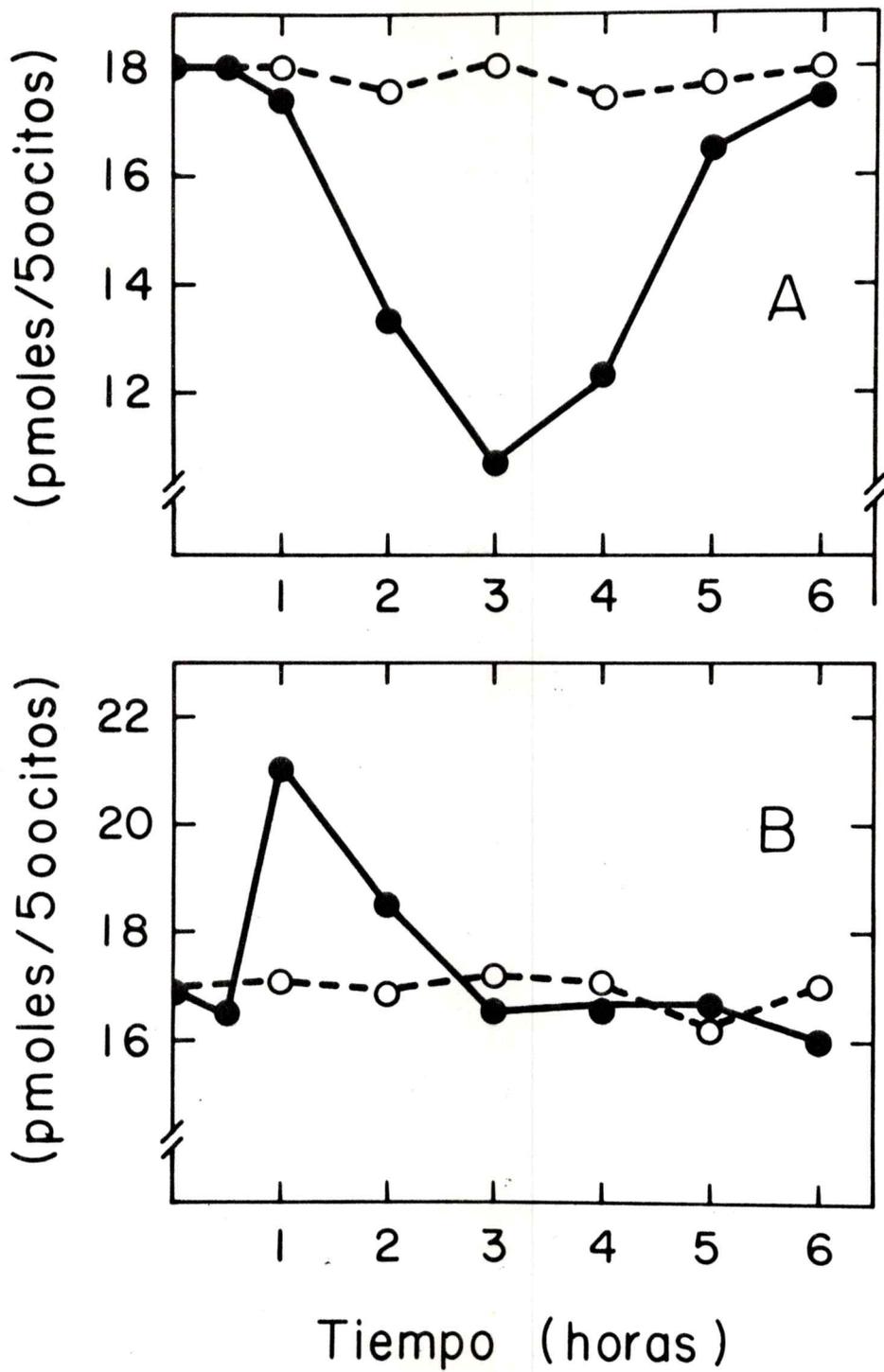


Figura 32

Figura 32

Efecto de teofilina sobre los cambios de cAMP provocados por hormonas en oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 5 oocitos, en duplicado, se usaron para la determinación de cAMP a los tiempos indicados en presencia de hormona sola o con teofilina. (A), progesterona 10^{-7} M (●); progesterona 10^{-7} M + teofilina 10^{-3} M (○); (B), hCG 60 unidades/ml (●); hCG 60 unidades/ml + teofilina 10^{-3} M (○). Estos resultados son representativos de 3 análisis realizados con oocitos de diferentes animales.

de 25 pmoles/min.

Trabajos similares, realizados con el fin de detectar hidrólisis de cGMP, han sido hasta el momento totalmente infructuosos.

Pensando en la posibilidad que los cambios de cAMP observados en el oocito después de la acción hormonal podrían deberse a variaciones en la actividad fosfodiesterásica para este nucleótido, se procedió a estudiar la existencia de este enzima en homogeneizados de oocitos.

A. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad fosfodiesterásica de oocitos

Con el objeto de caracterizar la actividad fosfodiesterásica de oocitos, se estudió la actividad de esta enzima en presencia de diferentes compuestos. Como se puede apreciar de las Tablas VIII y IX es claro que tanto teofilina $10^{-3}M$ como EDTA $10^{-3}M$ son capaces de inhibir la hidrólisis de 3H -cAMP y de 3H -cGMP. No se ve ningún efecto en cambio al agregar al medio de reacción $CaCl_2 10^{-3}M$ o $MgCl_2 10^{-3}M$. En cuanto a la especificidad de ambas fosfodiesterasas, pareciera que la actividad fosfodiesterásica de cAMP es específica para este nucleótido, ya que sólo la presencia de cAMP disminuye la hidrólisis de 3H -cAMP. En cambio para el caso de 3H -cGMP, su hidrólisis se ve afectada por la presencia de cAMP o cGMP no radiactivo.

TABLA VIII

Efecto de diversos compuestos sobre actividad
fosfodiesterásica de cAMP de oocitos de
Xenopus laevis

	% Hidrólisis	% Control
Control	15,1	100
+ teofilina	10,2	68
+ EDTA	8,9	59
+ NaF	15,8	104
+ MgCl ₂	14,3	95
+ CaCl ₂	15,3	101
+ cGMP	16,3	107
+ cAMP	4,5	30
+ cUMP	15,1	100
+ cCMP	15,0	99

Se homogeneizaron oocitos en grupos de a 5 en Hepes 50 mM, pH 7,4 y se agregaron 0,2 uCi de ³H-cAMP por ensayo. Las concentraciones finales de los diferentes compuestos fueron: EDTA, 1 mM, MgCl₂ 1 mM CaCl₂ 1 mM, teofilina 0,4 mM; NaF 10 mM; nucleótidos cíclicos no marcados 0,01 mM. La incubación se realizó durante 15 minutos a 20°-22°. El ensayo de la reacción se realizó como se describe en Métodos.

TABLA IX

Efecto de diversos compuestos sobre la actividad fosfodiesterásica de cGMP de oocitos de X.laevis

	% Hidrólisis	% Control
Control	19,0	100
+ teofilina	8,8	46
+ EDTA	3,7	19
+ NaF	18,5	97
+ MgCl ₂	18,2	96
+ CaCl ₂	21,6	113
+ cGMP	7,5	39
+ cAMP	12,2	64
+ cUMP	19,8	104
+ cCMP	19,9	104

A homogeneizados de 5 oocitos en Hepes 50 mM, pH 7,4 se les agregó 0,2 uCi de ³H-cGMP por ensayo. El tiempo de incubación fue de 15 minutos a 20°-22°. Los otros compuestos se usaron en la misma concentración que se indica en la tabla VIII. Para detalles del análisis, ver Métodos.

B. Influencia de la temperatura

Para ver el efecto de la temperatura, se homogeneizaron oocitos en grupos de a 5 y en duplicado, a los cuales se agregó nucleótido cíclico radiactivo y se incubó a las temperaturas indicadas durante diferentes tiempos (Figura 33). En esta figura se muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad fosfodiesterásica de cGMP (A) y de cAMP (B). Ambas actividades son igualmente sensibles a la temperatura, obteniéndose una mayor hidrólisis sólo inicialmente (10 min.) a 37°. Al cabo de 30 minutos prácticamente se obtiene la misma hidrólisis a 20°, 30° y 37°, para cAMP y algo menor a 20° para cGMP. Las incubaciones posteriores se realizaron normalmente a 20°-22°.

C. Distribución de la actividad fosfodiesterásica

La Figura 34 muestra los resultados obtenidos sobre distribución intracelular de las actividades fosfodiesterásicas de cAMP (34A) y de cGMP (34B). Un 65 % de la actividad fosfodiesterásica de cAMP se encuentra en la fracción soluble y un 20 %, en la fracción particulada. La diferencia entre la actividad total y la suma de actividad de las fracciones puede deberse, seguramente, a una pequeña inactivación por el procedimiento usado. En el caso de la actividad fosfodiesterásica para cGMP (B) es claro que toda la actividad se encuentra en la fracción soluble.

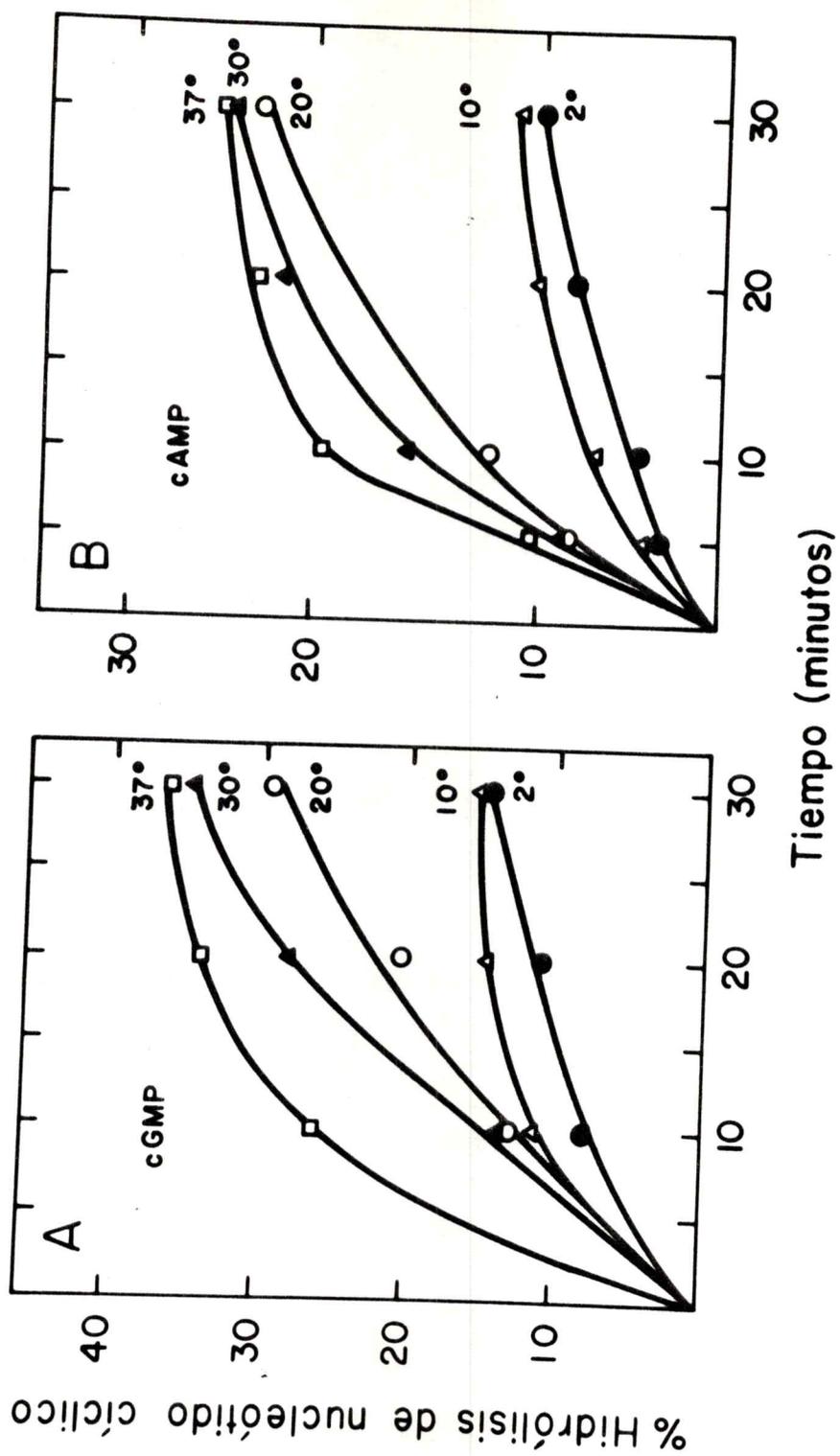


Figura 33

Figura 33

Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de nucleótidos cíclicos por homogeneizados de oocitos de Xenopus laevis.

La concentración de ^3H -cAMP fue de $2 \times 10^{-6}\text{M}$ y la de cGMP de $5 \times 10^{-6}\text{M}$. Los homogeneizados se preincubaron a las distintas temperaturas durante 10 minutos antes de agregar el nucleótido radiactivo. El porcentaje de hidrólisis se determinó según lo descrito en Métodos.

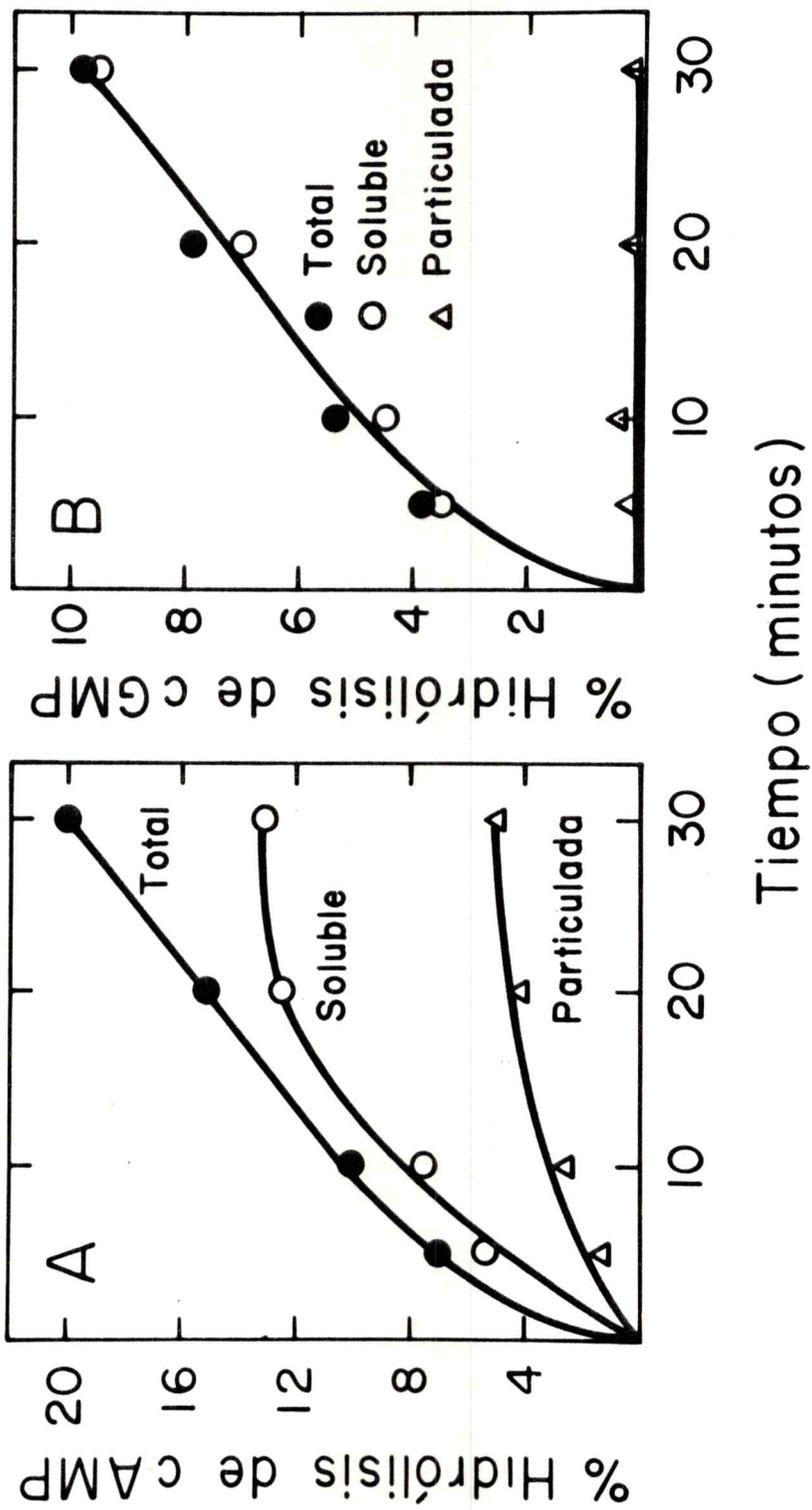


Figura 34

Figura 34

Distribución intracelular de la actividad fosfodiesterásica de cAMP y cGMP en oocitos de Xenopus laevis

Se utilizó una preparación proveniente de 120 oocitos, los cuales se procesaron como se describe en Métodos. (A), actividad fosfodiesterásica de cAMP, $^3\text{H-cAMP } 2 \times 10^{-6} \text{ M}$. (B), hidrólisis de $^3\text{H-cGMP } 5 \times 10^{-6} \text{ M}$. El ensayo de la reacción se realizó como se describe en Métodos, durante 15 minutos a 20°-22°.

Resultados obtenidos, que no se muestran, indicaron que la actividad fosfodiesterásica para cAMP es muy sensible al pH del medio. A pH 6,0 prácticamente es inhibida en un 80 % obteniéndose un máximo de hidrólisis de cAMP a pH 7,0-7,5. A pH más alcalino la actividad disminuye muy gradualmente obteniéndose un 70 % de la actividad máxima a pH 8,5.

D. Especificidad de ambas fosfodiesterasas

Para ver en más detalle la especificidad de ambas fosfodiesterasas, se realizó un experimento en el cual se incubaron homogeneizados de oocitos en presencia de ^3H -cAMP o ^3H -cGMP y con diferentes concentraciones de cAMP o cGMP no radiactivo (Figura 35). Como se observa en (A) la hidrólisis de ^3H -cAMP es fuertemente inhibida al agregar cantidades crecientes de cAMP no radiactivo, hasta llegar a un 30 % con cAMP 10^{-3}M . En cambio, la presencia de cGMP sólo afecta a concentraciones sobre 10^{-3}M obteniéndose una hidrólisis del 75 % del control en presencia de cGMP 10^{-2}M . En la Figura 35B se muestra que la hidrólisis de ^3H -cGMP es inhibida bruscamente (70%), a concentraciones de solamente 10^{-6}M de cGMP no radiactivo, obteniéndose sólo un 8 % de hidrólisis al agregar cGMP a una concentración de 10^{-5}M . La presencia de cAMP también afecta la hidrólisis de ^3H -cGMP, observándose un 22 % de inhibición a una concentración de sólo 10^{-4}M .

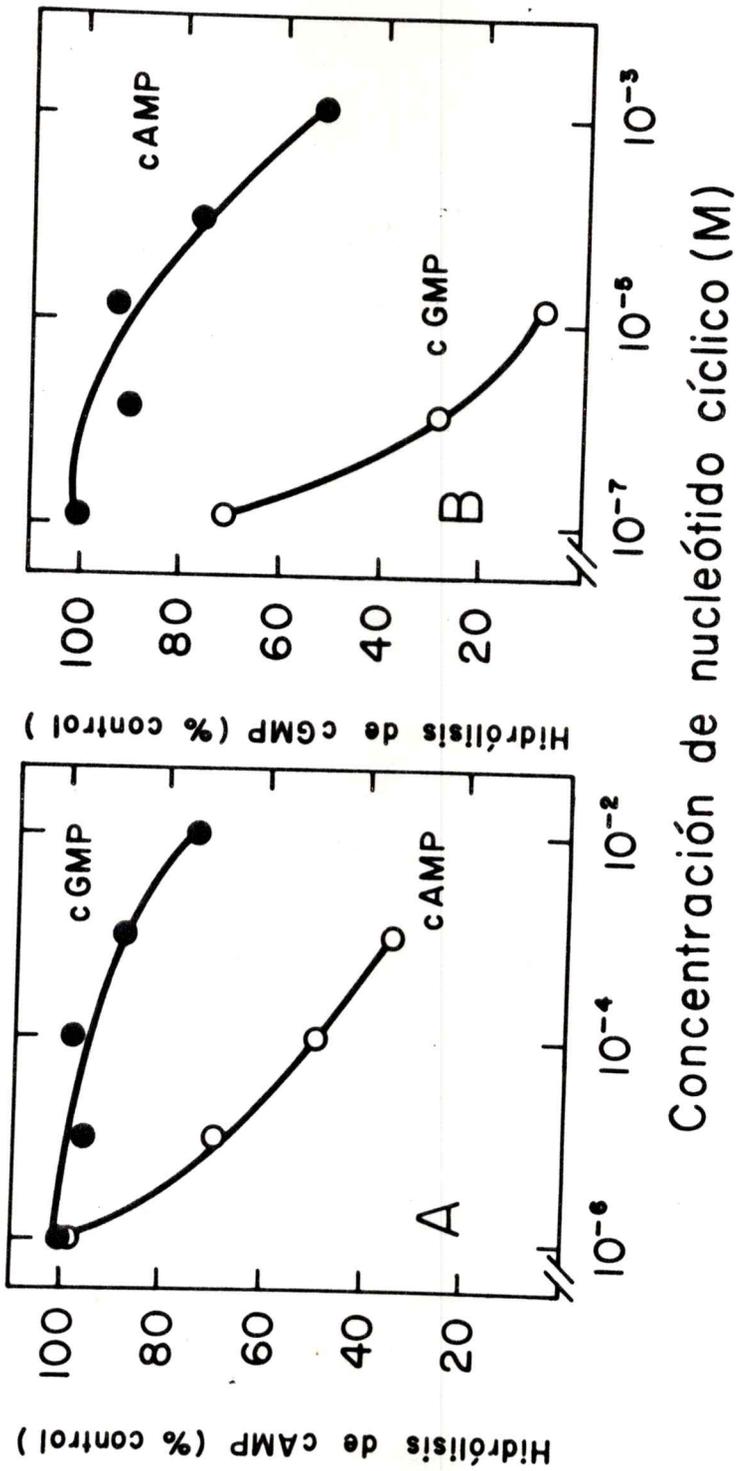


Figura 35

Figura 35

Inhibición de la actividad fosfodiesterásica de nucleótidos cíclicos por cAMP o cGMP

Se usaron homogeneizados de oocitos que se ensayaron como se describe en Métodos, con $^3\text{H-cAMP } 2 \times 10^{-6}\text{M}$, (A) y diferentes concentraciones de cGMP (●) o cAMP (○). B, $^3\text{H-cGMP } 5 \times 10^{-6}\text{M}$ y distintas concentraciones de cAMP (●) o cGMP (○). Las reacciones se incubaron a 20° durante 15 minutos.

Estos resultados apoyarían la idea que la actividad fosfodiesterásica de cAMP es específica para cAMP y que la actividad responsable de la hidrólisis del cGMP es menos específica siendo capaz de hidrolizar cAMP a altas concentraciones.

Varias fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, incluyendo las de eritrocitos de anfibios hidrolizan ambos nucleótidos cíclicos (109).

E. Estudio cinético de la fosfodiesterasa de cAMP

Estudios realizados recientemente en el laboratorio, mediante microinyección de ^3H -cAMP a oocitos, lograron caracterizar los parámetros cinéticos de esta enzima in vivo.

Con el objeto de ver si la enzima mantenía estas propiedades al homogeneizar los oocitos, se realizaron experimentos de hidrólisis de ^3H -cAMP con diferentes concentraciones de cAMP no radiactivo. En la Figura 36 se muestra un doble recíproco de estos resultados. Se puede observar que existen dos pendientes, lo que indicaría, seguramente, la presencia de más de una enzima con actividad fosfodiesterásica para cAMP.

Resultados muy similares se han obtenido en otros sistemas en los cuales se han encontrado dos fosfodiesterasas para cAMP con Km del orden de 10^{-6} y 10^{-4} M (105).

En este caso la extrapolación de los valores obtenidos

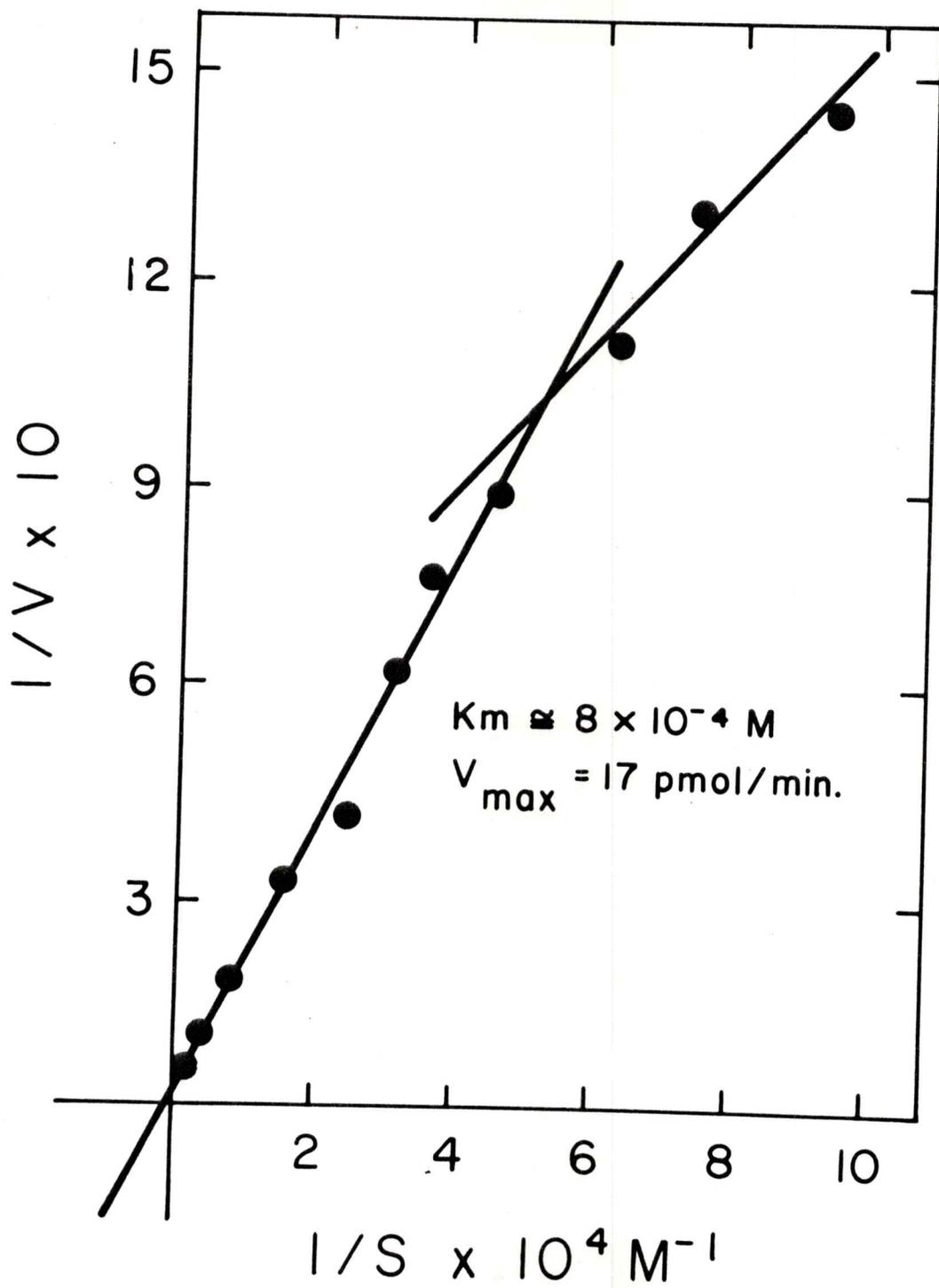


Figura 36

Figura 36

Velocidad de formación de 5' AMP a partir de cAMP en
homogeneizados de oocitos de Xenopus laevis

Homogeneizados de 5 oocitos en duplicado, se
utilizaron para cada determinación, incubándose durante
10 minutos a 20° con concentraciones variables de
³H-cAMP. Se determinó la cantidad de 5'AMP por cromatografía en capa fina como se describe en Métodos.

a las concentraciones mayores de cAMP dan una Km de $8 \times 10^{-4} \text{M}$ y una velocidad máxima de 17,0 pmoles/min que, coinciden perfectamente con los datos obtenidos previamente in vivo. En la Figura 37 se muestra una curva de progreso a concentraciones de cAMP de $5 \times 10^{-4} \text{M}$. Como se puede ver en la figura, la velocidad inicial in vitro es de aproximadamente 20 pmoles/min/ocito, lo que coincide perfectamente con datos obtenidos in vivo, mediante microinyección de ^3H -cAMP. Sin embargo, bajo las condiciones estudiadas, in vitro, la velocidad tiende a disminuir después de los primeros 10 minutos, un fenómeno que no se ha observado in vivo.

F. Fraccionamiento en DEAE-celulosa de la actividad fosfodiesterásica de cAMP

El homogeneizado proveniente de 3 g de ovario se procesó como se describe en Métodos, y se fraccionó por cromatografía en una columna de DEAE-celulosa (Figura 38). En esta figura se muestra la actividad fosfodiesterásica de las diferentes fracciones expresadas como producto formado. Se puede discernir tres actividades fosfodiesterásicas que difieren en su cantidad relativa. No es posible decir si provienen de la fracción soluble o particulada, ya que la muestra fue sonicada previamente para solubilizar en parte,

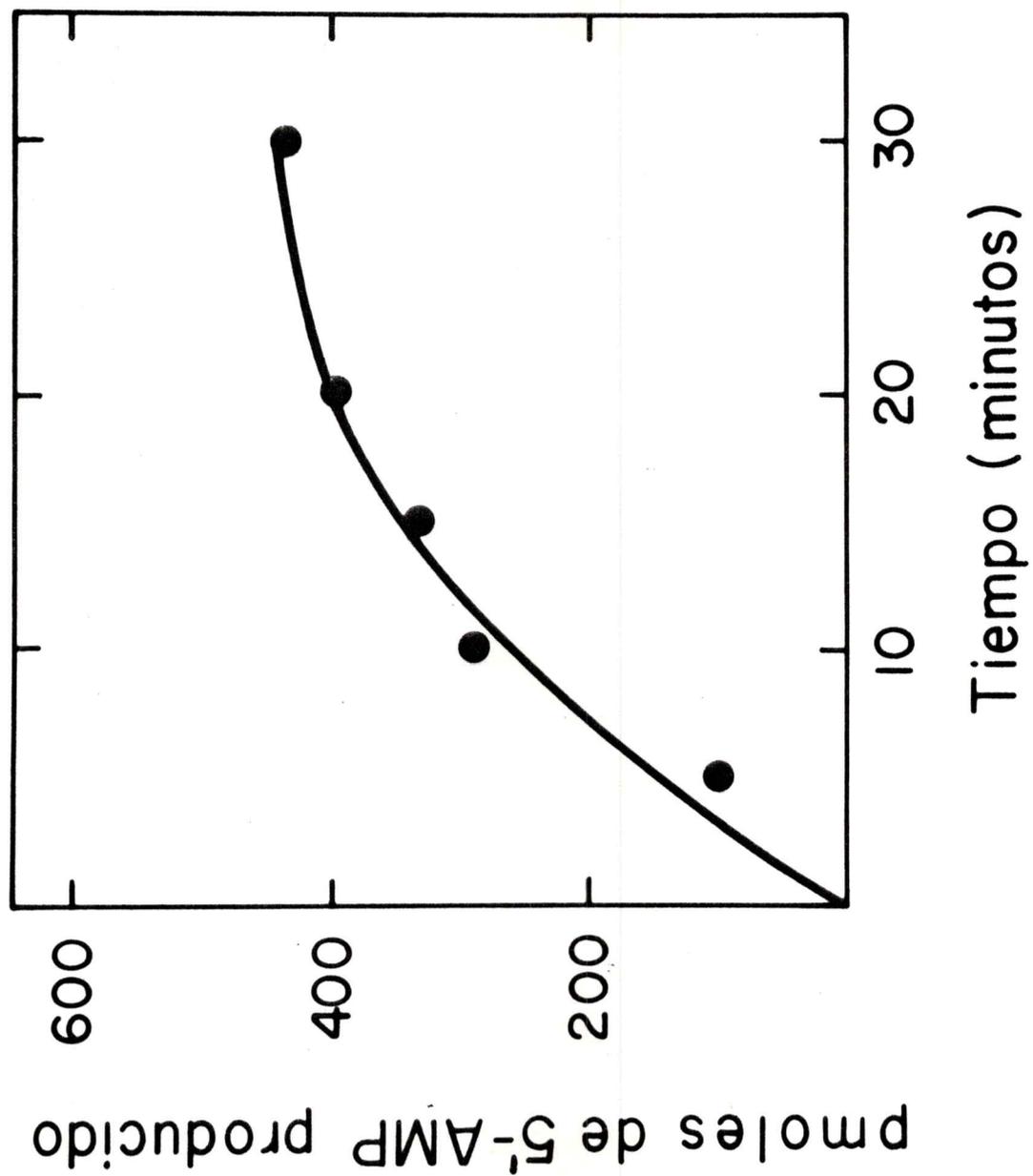


Figura 37

Figura 37

Curva de progreso de la hidrólisis de cAMP por
homogeneizados de oocitos de Xenopus laevis

Homogeneizados provenientes de 5 oocitos se incubaron a 20° en Hepes 20 mM y MgCl₂ 1mM en presencia de ³H-cAMP 10⁻⁴M durante distintos tiempos. A los tiempos indicados, la reacción se detuvo con HCl 0,1 N. El análisis del producto de hidrólisis se realizó como se describe en Métodos.

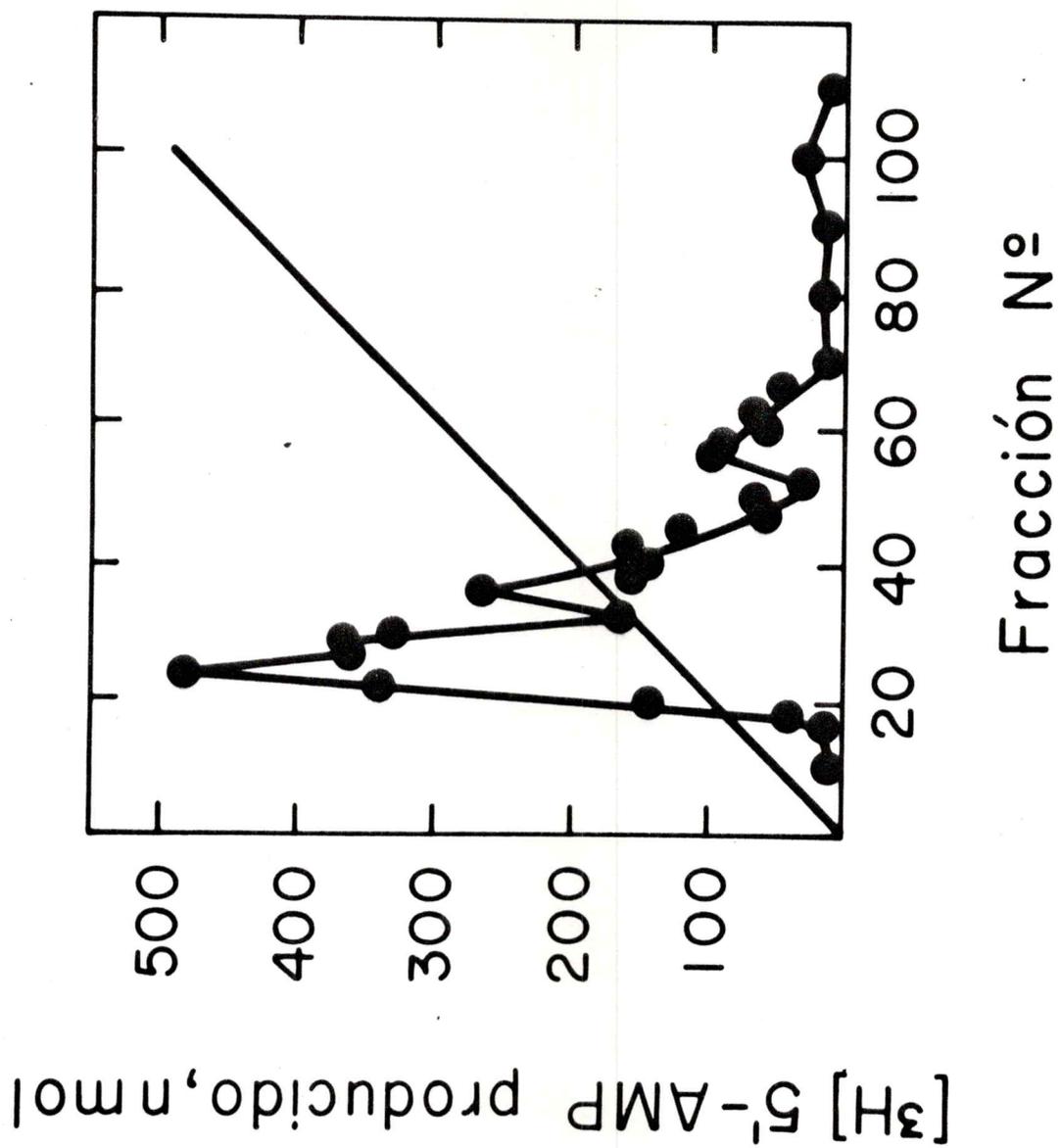


Figura 38

Figura 38

Cromatografía en DE-52 celulosa de fosfodiesterasa de
cAMP proveniente de ovario de X. laevis.

Se preparó un extracto crudo a partir de 3 gramos de ovario el que se fraccionó por cromatografía en una columna de celulosa DE-52 (0,3 x 3 cm). Las fracciones se eluyeron con una gradiente lineal de acetato de sodio (0-1 M) de 5 ml según se describe en Métodos. Se recolectaron fracciones de 50 ul que se ensayaron con $^3\text{H-cAMP } 10^{-4}\text{M}$. El tiempo de incubación fue de 30 minutos. La línea en diagonal representa la gradiente de sal.

la actividad asociada a membranas. Ha sido descrito en otros tejidos, el fraccionamiento de la actividad fosfodiesterásica en columna de celulosa DE-52 y también se ha encontrado 2 o 3 fracciones que poseen la capacidad de hidrolizar cAMP (105).

G. La actividad fosfodiesterásica de cAMP en oocitos tratados con progesterona.

Para ver el efecto de la maduración sobre la actividad de la fosfodiesterasa de cAMP se incubaron oocitos durante 2 horas con progesterona y se ensayó la actividad del homogeneizado durante 30 minutos (Figura 39). Pensando en la posibilidad que no hubiera un cambio en la actividad total del oocito, sino una modificación en la distribución de la actividad enzimática entre la fracción particulada y soluble, se hizo análisis de estas fracciones conjuntamente con la actividad total. En (A) se ve la actividad de los oocitos controles, y en (B) la de oocitos previamente tratados con progesterona. De los resultados mostrados en la figura es claro que la actividad total no se modifica después de 2 horas de tratamiento hormonal. Además, la distribución en las fracciones solubles y particulada tampoco es alterada. Cabe destacar que en este experimento los oocitos respondieron un 90 % frente al estímulo hormonal que como ya hemos visto antes, causa una apreciable baja en los niveles intracelulares de cAMP. Experimentos realizados in vivo, bajo

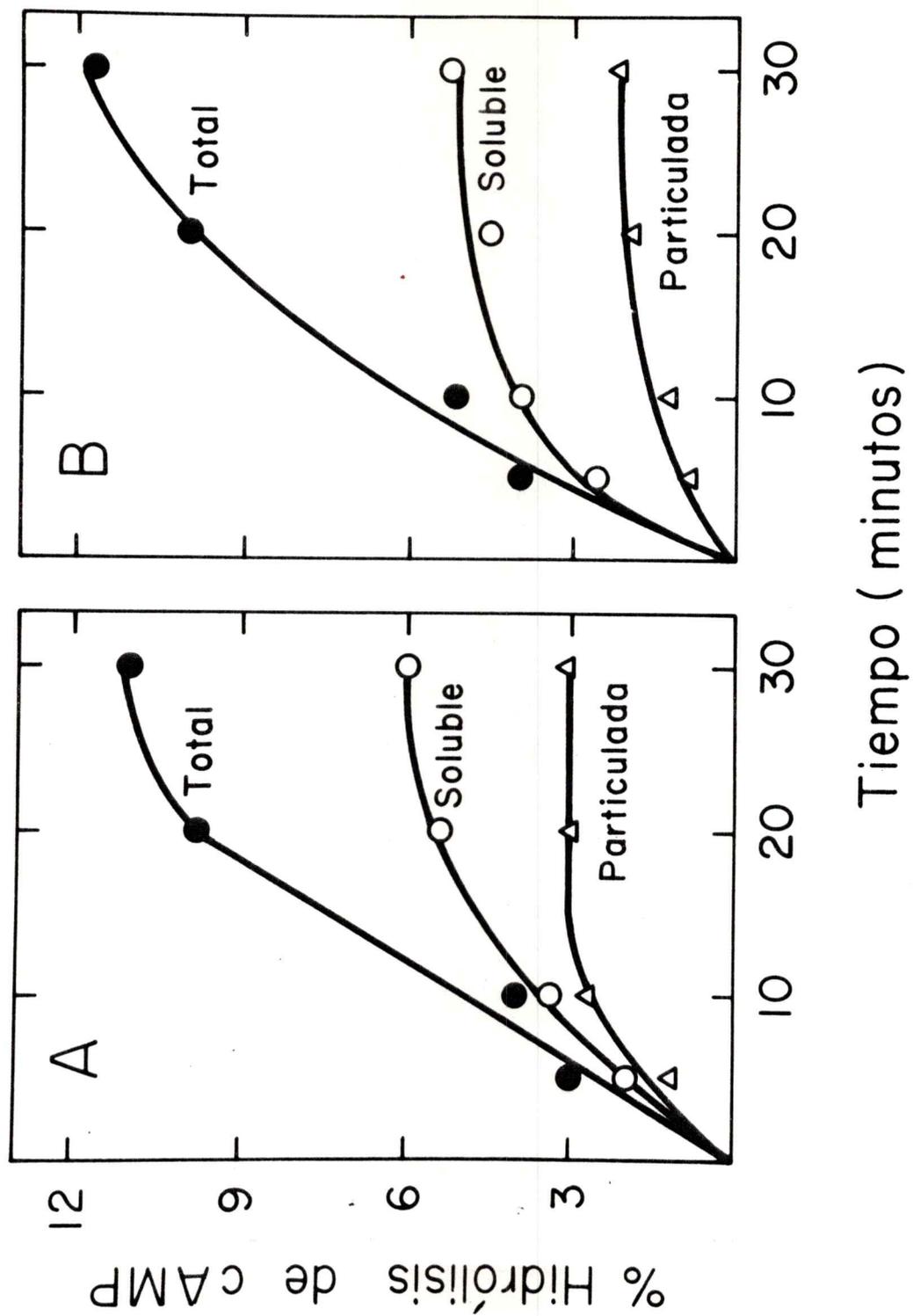


Figura 39

Figura 39

Actividad fosfodiesterásica de cAMP en fracciones celulares de oocitos antes y después de inducción de la maduración por progesterona.

Las fracciones solubles y particuladas de oocitos se obtuvieron a partir de 60 oocitos controles (A) y 60 tratados con progesterona 10^{-7} M durante 2 horas (B), según se describe en Métodos. $^3\text{H-cAMP}$ 2×10^{-6} M. El análisis de la actividad se realizó como se describe en Métodos.

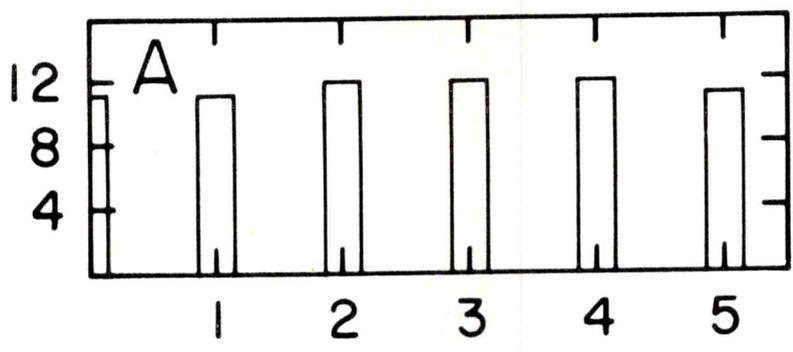
las mismas condiciones, tampoco detectaron cambios en la actividad total del oocito para hidrolizar cAMP.

Existiendo la posibilidad que los cambios en la actividad fosfodiesterásica causados por progesterona, se produjeran antes de las 2 horas, se realizó un estudio en el cual, en forma paralela se analizaron cada hora los niveles de cAMP y de la actividad fosfodiesterásica hasta 5 horas después del tratamiento con la progesterona.

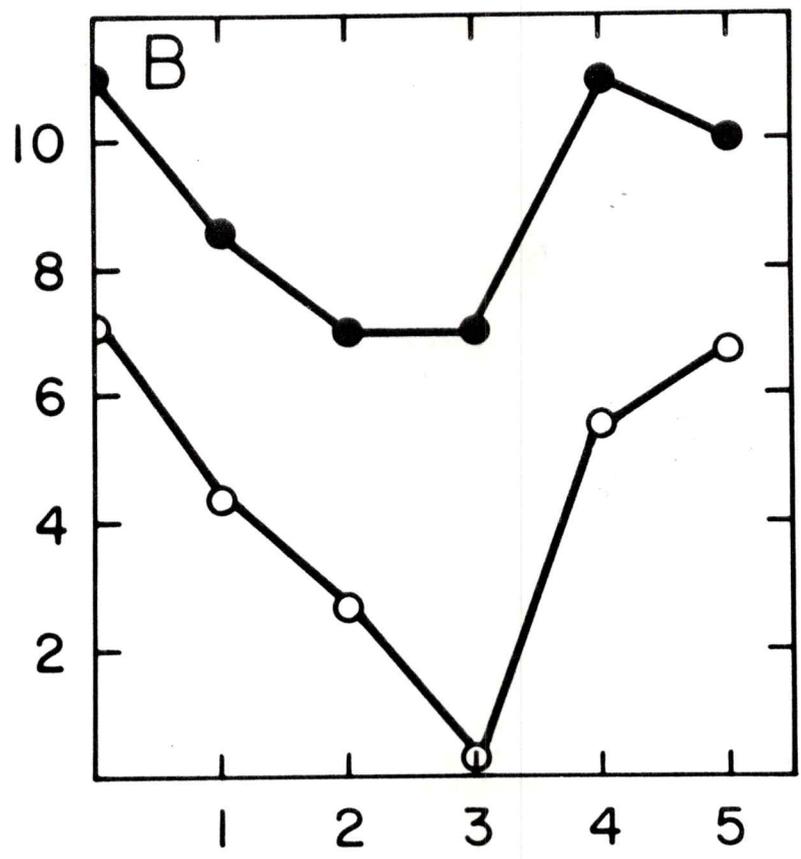
En la Figura 40 se muestran los resultados obtenidos. En (A) se muestra la actividad fosfodiesterásica a diferentes tiempos de la acción hormonal y en (B) se ven los cambios en los niveles de cAMP en el oocito y en la vesícula germinal. Es claro que la actividad fosfodiesterásica no se altera durante todo el tiempo estudiado. Es importante notar en (B) que los niveles de cAMP en la vesícula germinal disminuyen en forma paralela a la del oocito total, para retornar a los valores normales, al cabo de 4-5 horas. Según el proceso normal de maduración, esos núcleos se empiezan a romper una hora después de la última medición. Pareciera ser que la caída de cAMP en el núcleo es mayor que la total en el oocito. Esto podría tener cierta importancia, ya que, podría estar relacionado con los niveles de fosforilación de proteínas que se discute más adelante.

Es interesante el hecho que todos los esfuerzos realizados para detectar actividad fosfodiesterásica en vesículas

(pmoles/oocito/min.)



(pmoles/5oocitos)



(pmoles/20 VG)

Tiempo (horas)

Figura 40

Figura 40

Actividad fosfodiesterásica y niveles de cAMP en oocitos a distintos tiempos de la acción de progesterona

En (A) se muestra la actividad fosfodiesterásica a través del tiempo después del efecto hormonal. El análisis de la actividad se realizó según se describe en Métodos. En (B) se muestran las variaciones de cAMP en oocitos (●) o núcleos (○); grupos en duplicado de 5 oocitos o 20 núcleos se utilizaron para el análisis de cAMP (ver Métodos). La concentración de progesterona utilizada fue 10^{-7} M. Estos resultados son representativos de 6 animales estudiados, con una maduración de más de un 80 %.

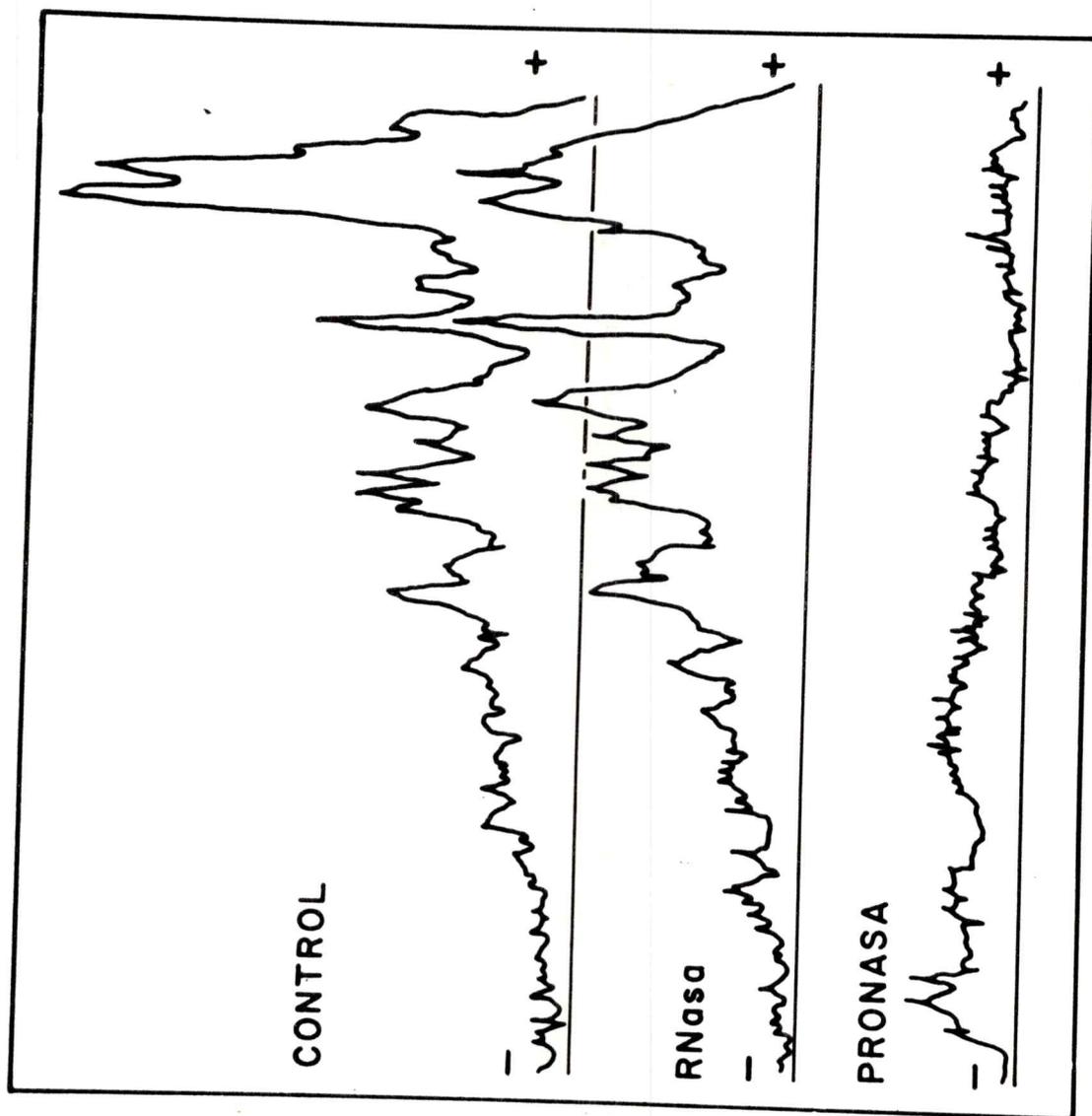
germinales antes y después de tratar los oocitos con progesterona hayan fracasado. Esto indicaría que, de algún modo, se tiene que producir una liberación del cAMP nuclear hacia el citoplasma, para explicar la disminución de este nucleótido cíclico en la vesícula germinal.

Fosforilación de proteínas en oocitos
de *Xenopus laevis*

Con las evidencias descritas anteriormente que el cAMP estaría, de algún modo, involucrado en el proceso de maduración, se pensó en la posibilidad que el cAMP produjere, a su vez, cambios en la fosforilación de proteínas en el oocito.

En primer lugar, se estudió la capacidad del oocito para fosforilar sus proteínas endógenas. Con este objeto, se microinyectó ^{32}P -ATP a estas células, y se incubaron durante 1 hora a 20°- 22°. Para ver la radiactividad total incorporada se homogeneizaron los oocitos en TCA 10 % frío y se filtró en filtros de fibra de vidrio. Los resultados demostraron la presencia de radiactividad incorporada a material ácido insoluble.

Para analizar las proteínas que se estarían fosforilando en el oocito, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas solubles de estas células, detectando la radiactividad por fluorografía (ver Métodos). En la Figura 41 se ve un perfil densitométrico de las proteínas solubles del oocito que estarían siendo fosforiladas. Además, se muestran evidencias que la radiactividad se estaría realmente incorporando a proteínas, ya que el tratamiento previo de la muestra con pronasa suprime, totalmente, la radiactividad detectada



Densidad óptica (540 nm)

Figura 41

Figura 41

Fosforilación de proteínas de oocitos de Xenopus laevis

Los oocitos se microinyectaron con ^{32}P -ATP, y se incubaron en solución HF durante 30 minutos a 20°. El procesamiento de la muestra y electroforesis se realizó según se describe en Métodos. Muestras provenientes de 10 oocitos se trataron con RNasa (0,2 mg/ml) o pronasa (0,1 mg/ml) durante 1 hora a 37°.

en la electroforesis; en cambio el tratamiento con RNasa no modifica el perfil.

Para ver qué proteínas se estarían fosforilando en el núcleo, se aislaron vesículas germinales y se caracterizó, previamente, la reacción de fosforilación de estos organelos in vitro (Figura 42). Como se puede observar, la velocidad de reacción depende directamente de la temperatura, hasta al menos los 37° (A). En B, se puede ver que la reacción alcanza el equilibrio a los 10 minutos de agregado el precursor radiactivo. Además, existe una relación lineal entre la radiactividad incorporada y la cantidad de vesículas germinales o ^{32}P -ATP agregados al medio de reacción (C y D).

En la Tabla X se muestra el efecto de diversos compuestos sobre la reacción de incorporación de ^{32}P -ATP en vesículas germinales aisladas. Es claro, a partir de estos resultados, que la fosforilación es a nivel de proteínas, y que la actividad enzimática es sensible al EDTA 5 mM y a la temperatura. También se observa que la presencia de AMP no afecta la incorporación de radiactividad, pero si es notoriamente disminuída al agregar ATP no radiactivo.

En la Figura 43 se ve el perfil densitométrico de las proteínas de vesículas germinales fosforiladas in vitro. Como en el caso de los oocitos, se puede ver que se

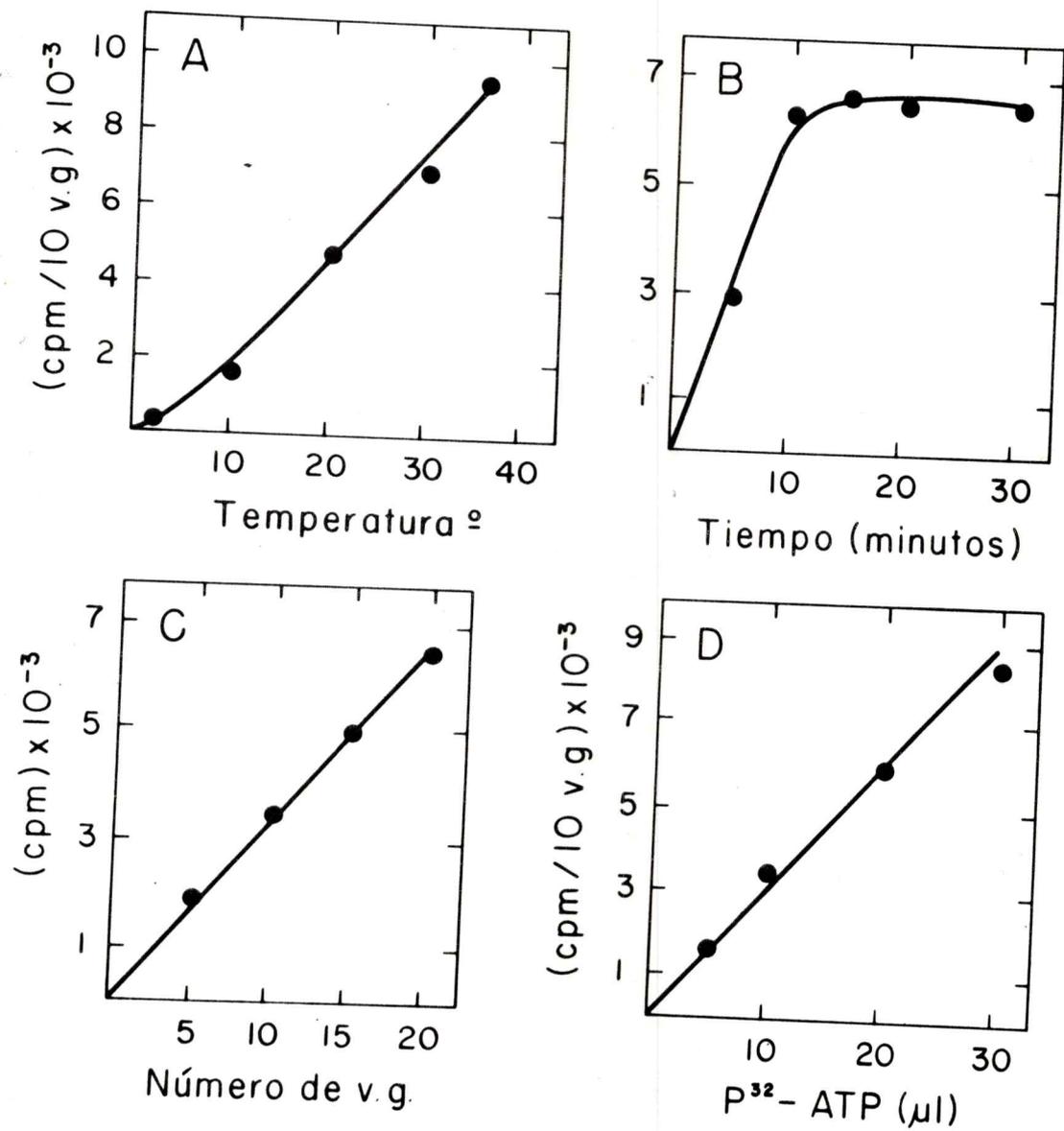


Figura 42

Figura 42

Características de la reacción de fosforilación en vesículas germinales de oocitos de Xenopus laevis in vitro

(A), Grupos de 10 vesículas germinales se incubaron en solución HF durante 30 minutos a las temperaturas indicadas en presencia de 1 uCi de ^{32}P -ATP. (B), grupos de 10 vesículas germinales se incubaron en solución HF a 20° durante diferentes tiempos en presencia de 1 uCi de ^{32}P -ATP. (C), distintos números de vesículas germinales se incubaron a 22° durante 30 minutos en condiciones similares a las anteriores. (D), grupos de 10 vesículas germinales se incubaron durante 30 minutos a 22° en solución HF en presencia de diferentes cantidades de ^{32}P -ATP (10 ul=1 uCi).

TABLA X

Características de la incorporación de ^{32}P -ATP en núcleos aislados de oocitos de Xenopus laevis.

	^{32}P -ATP incorporado cpm/10 V.G.	% Control
Control	11.122	100
t_0 + EDTA	445	4
t_0 100 x 5'	525	5
t_0 + ATP	3.214	29
t_0 + AMP	12.454	111
+ KOH (1 N)	1.158	10
+ HCL (1 N)	9.581	86
+ Pronasa	409	4
+ RNasa	10.475	94

Grupos de 10 vesículas germinales en duplicado, se incubaron en 100 ul de solución HF a 20° durante 30 minutos en presencia de ^{32}P -ATP (0,1 uCi) y de EDTA, 5 mM; ATP, 0,1 mM o de AMP 0,1 mM. En los otros casos se trataron las vesículas germinales después de la incubación con ^{32}P -ATP con pronasa (1 mg/ml); o RNasa (1 mg/ml); o KOH 1 N; o HCl 1 N, durante 1 hora a 37°. La incorporación de ^{32}P -ATP se analizó como se describe en Métodos.

Densidad óptica (540 nm)

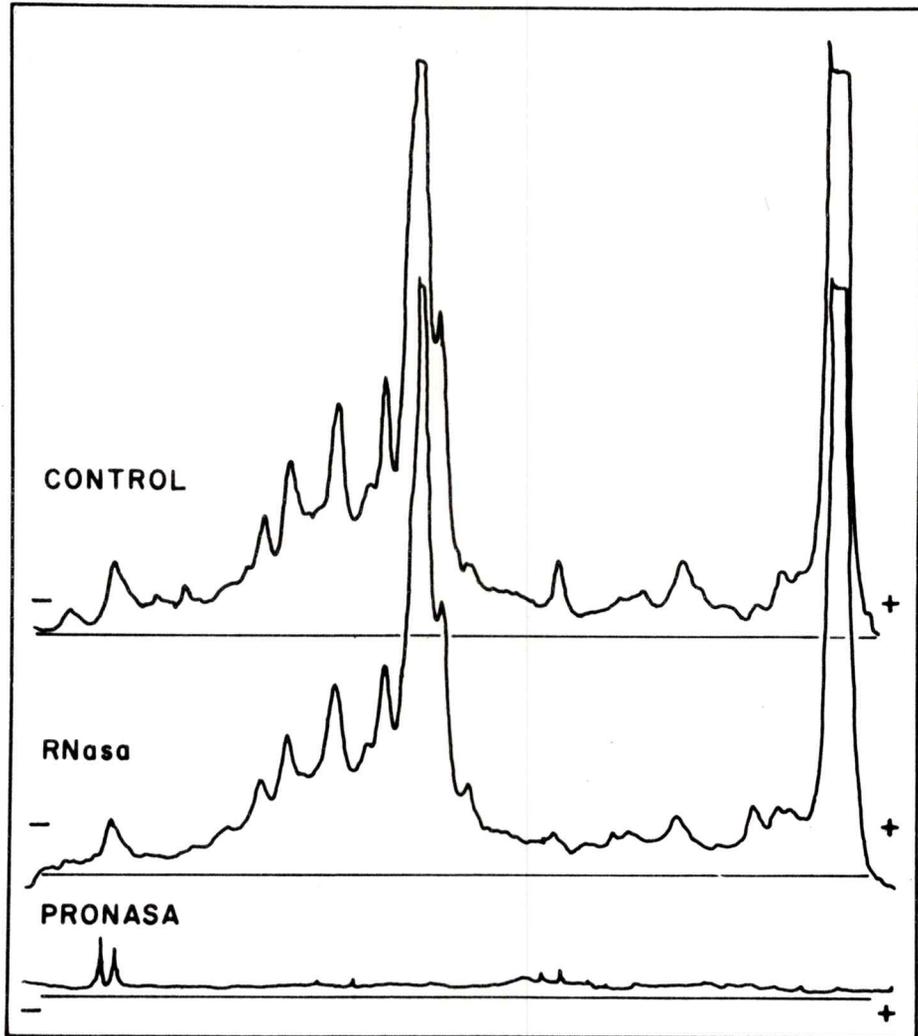


Figura 43

Figura 43

Proteínas nucleares de oocitos de Xenopus laevis
fosforiladas in vitro

Grupos de 10 vesículas germinales se incubaron en presencia de ^{32}P -ATP durante 30 minutos a 20° . Una de las muestras se trató con PNasa (0,1 mg/ml) y otra con pronasa (0,1 mg/ml) durante 1 hora a 37° . La obtención de la muestra y su posterior análisis electroforético en geles de poliacrilamida se realizó según lo descrito en Métodos.

fosforila un gran número de proteínas. Además, también es claro que la radiactividad estaría incorporada a proteínas ya que el tratamiento con pronasa elimina totalmente la radiactividad detectada en la electroforesis; en cambio el tratamiento con RNasa no modifica el perfil.

Con el objeto de encontrar alguna relación entre la fosforilación de proteínas y su velocidad de síntesis, se microinyectaron oocitos con ^{32}P -ATP y, en forma paralela, se incubaron otros oocitos en ^{35}S -metionina. Los oocitos se procesaron en forma separada y se analizó, simultáneamente, la radiactividad incorporada a proteínas proveniente de ^{32}P -ATP o ^{35}S -metionina por electroforesis en geles de poliacrilamida en placa (Figura 44). Como muestra la figura, la mayoría de las proteínas que están siendo sintetizadas en el oocito se estarían fosforilando, y existiría una estrecha relación entre la velocidad de síntesis y fosforilación de las diferentes proteínas.

Experimentos similares realizados con vesículas germinales se muestran en la Figura 45. En este caso, se incubaron oocitos en presencia de ^{35}S -metionina durante 18 horas y luego se les extrajo la vesícula germinal. Por otra parte, se incubaron núcleos en presencia de ^{32}P -ATP durante 1 hora. Las muestras provenientes de ambos tipos de incubaciones se procesaron y analizaron en geles de poliacrilamida en placa. En este caso, a diferencia de lo

Densidad óptica (540 nm)

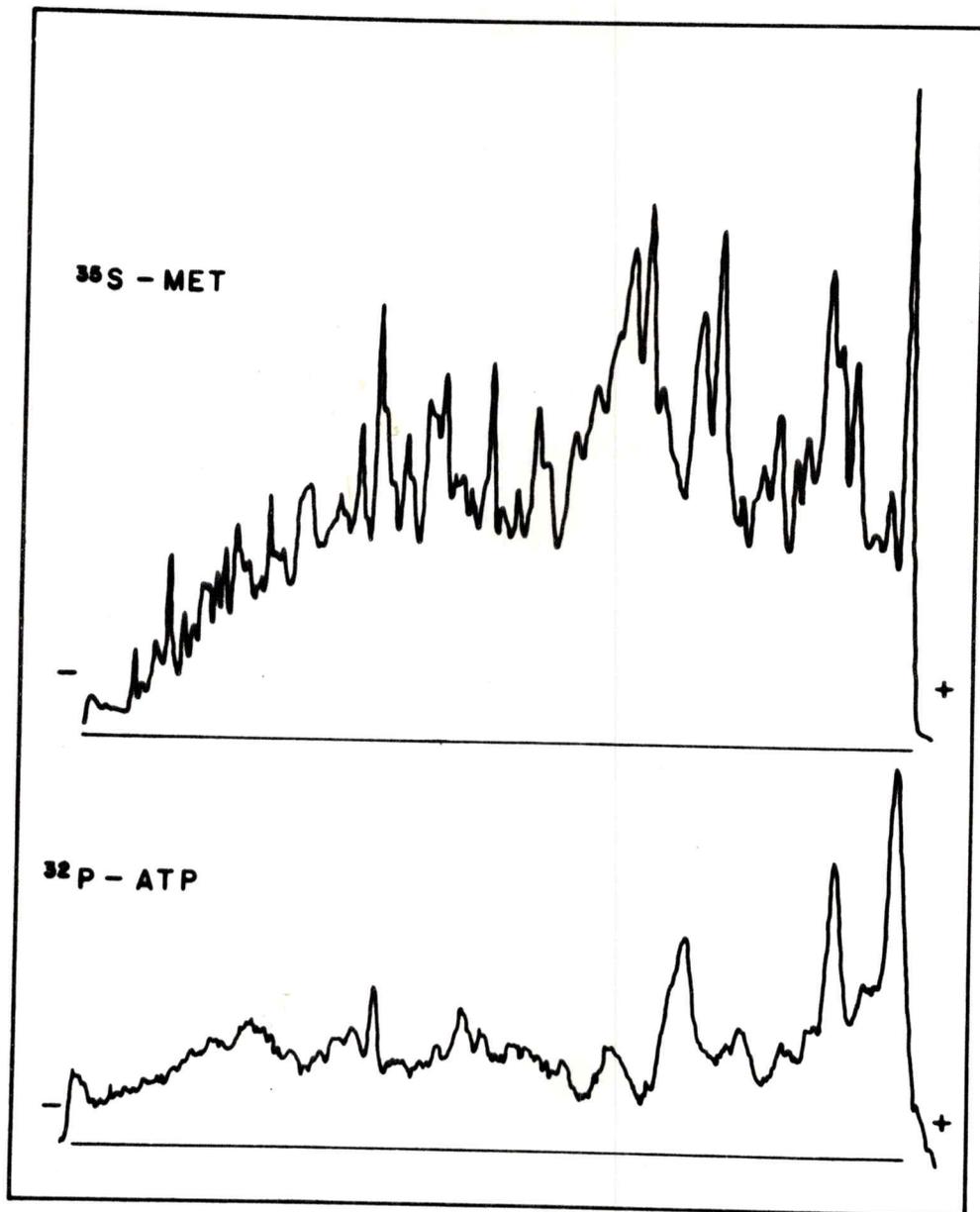


Figura 44

Figura 44

Relación entre síntesis y fosforilación de proteínas en oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 10 oocitos marcados con ^{35}S -metionina, actividad específica (1 Ci/umol), a una concentración de 1 uM durante 5 horas, o inyectados con ^{32}P -ATP (0,2 uCi) e incubados 1 hora a 20° se analizaron simultáneamente por electroforesis en geles de poliacrilamida. La radiactividad incorporada a proteínas se detectó mediante densitometría de las placas radiográficas utilizando el proceso fluorográfico (ver Métodos).

Densidad óptica (540 nm)

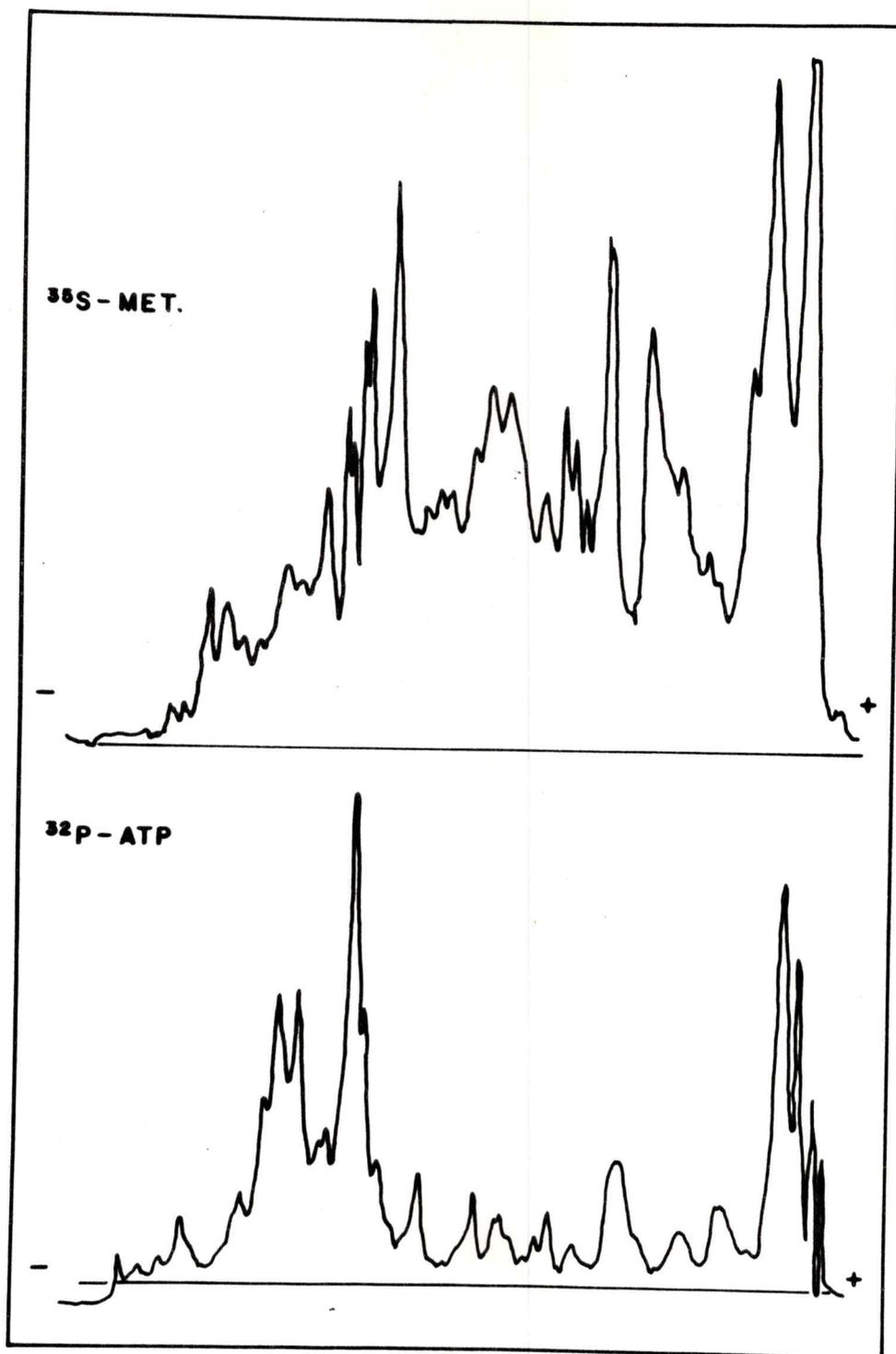


Figura 45

Figura 45

Relación entre síntesis y fosforilación de proteínas nucleares de oocitos de Xenopus laevis

Los oocitos se incubaron en solución HF adicionada con ^{35}S -metionina 1 μM durante 18 horas a 20° ; antes de extraer las vesículas germinales. Se utilizó un total de 20 vesículas germinales para analizar la radiactividad incorporada a proteínas. Para el análisis de la fosforilación de las proteínas nucleares se incubaron 10 vesículas germinales en solución HF, en presencia de ^{32}P -ATP 1 uCi durante 30 minutos a 20° .

La electroforesis en geles de poliacrilamida y la fluorografía se realizaron según lo descrito en Métodos.

observado en oocito total, se ve una mayor especificidad en la fosforilación de ciertas proteínas nucleares, aún cuando existe cierta relación entre velocidad de síntesis de proteínas y fosforilación.

A. Efecto de progesterona sobre la fosforilación de proteínas en oocitos de *Xenopus laevis*

Para estudiar el efecto de la maduración sobre la fosforilación de proteínas en oocitos, se incubaron éstos en presencia de progesterona $10^{-7}M$ y, a diferentes tiempos, se les microinyectó con ^{32}P -ATP (Figura 46). Como se muestra en la figura, existiría un aumento general en la fosforilación de proteínas en el oocito durante las primeras horas de la acción hormonal.

La Figura 47 muestra los resultados de experimentos similares realizados con vesículas germinales, extraídas de oocitos preincubados con progesterona $10^{-7}M$ durante tiempos variables; las vesículas germinales se incubaron con ^{32}P -ATP, se observa un aumento gradual de la fosforilación de las proteínas nucleares después del estímulo hormonal. Igual que en el caso de las proteínas totales del oocito, este fenómeno sería general para todas las proteínas.

Tratando de encontrar alguna relación entre los cambios de niveles de cAMP o de cGMP y la fosforilación de proteínas por ^{32}P -ATP, se realizó el experimento que se

Densidad óptica (540 nm)

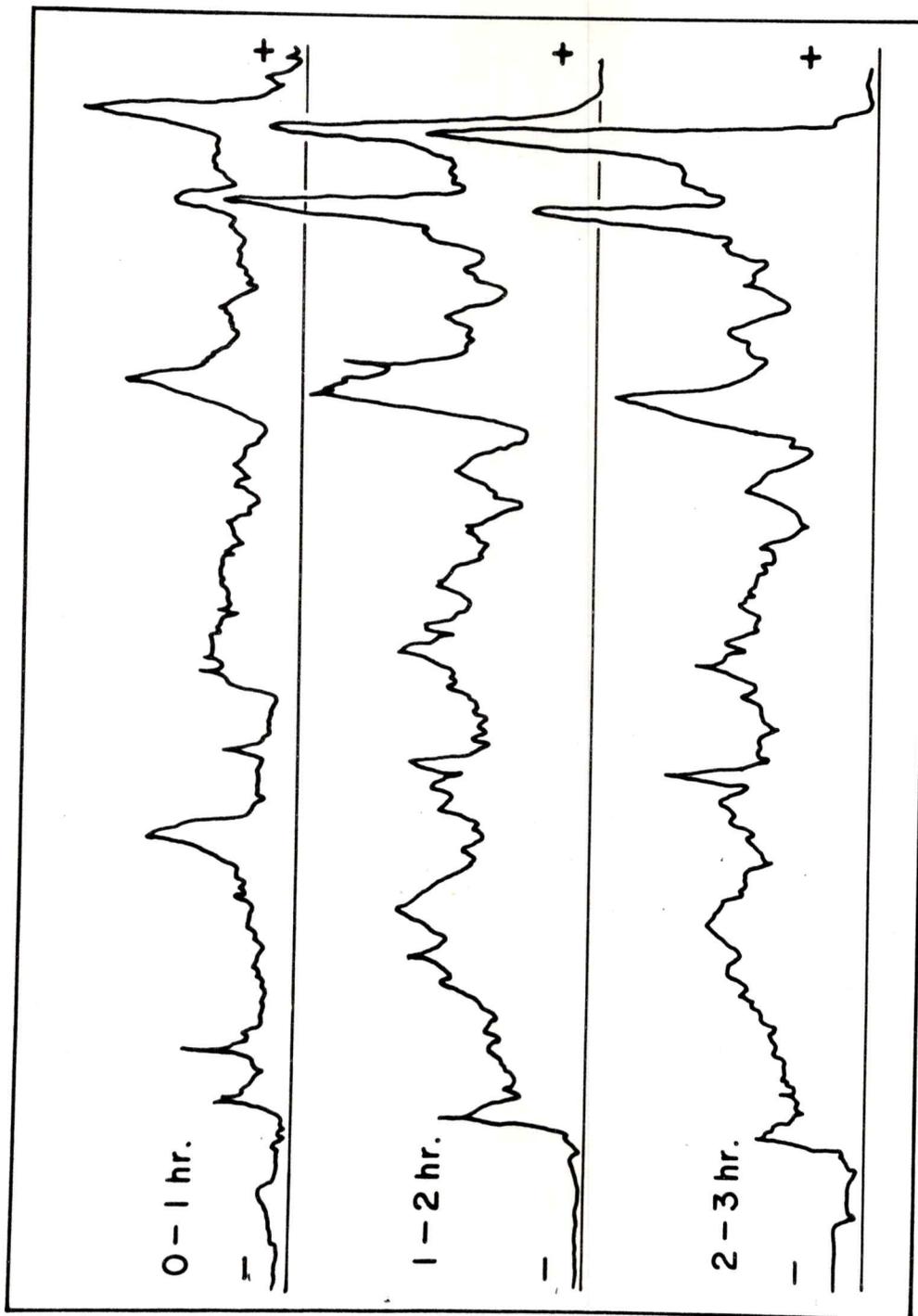


Figura 46

Figura 46

Efecto de progesterona sobre la fosforilación de proteínas en oocitos de Xenopus laevis

Los oocitos se preincubaron en solución HF a 20° en presencia de progesterona 10^{-7} M durante tiempos variables.

Grupos de 10 oocitos se microinyectaron con 32 P-ATP (0,2 uCi) a diferentes tiempos después de la acción hormonal, y se incubaron a 20° durante 1 hora en solución HF. Las proteínas solubles se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y la radiactividad se detectó por fluorografía (ver Métodos), indicando el perfil densitométrico a 540 nm en un densitómetro Canalco.

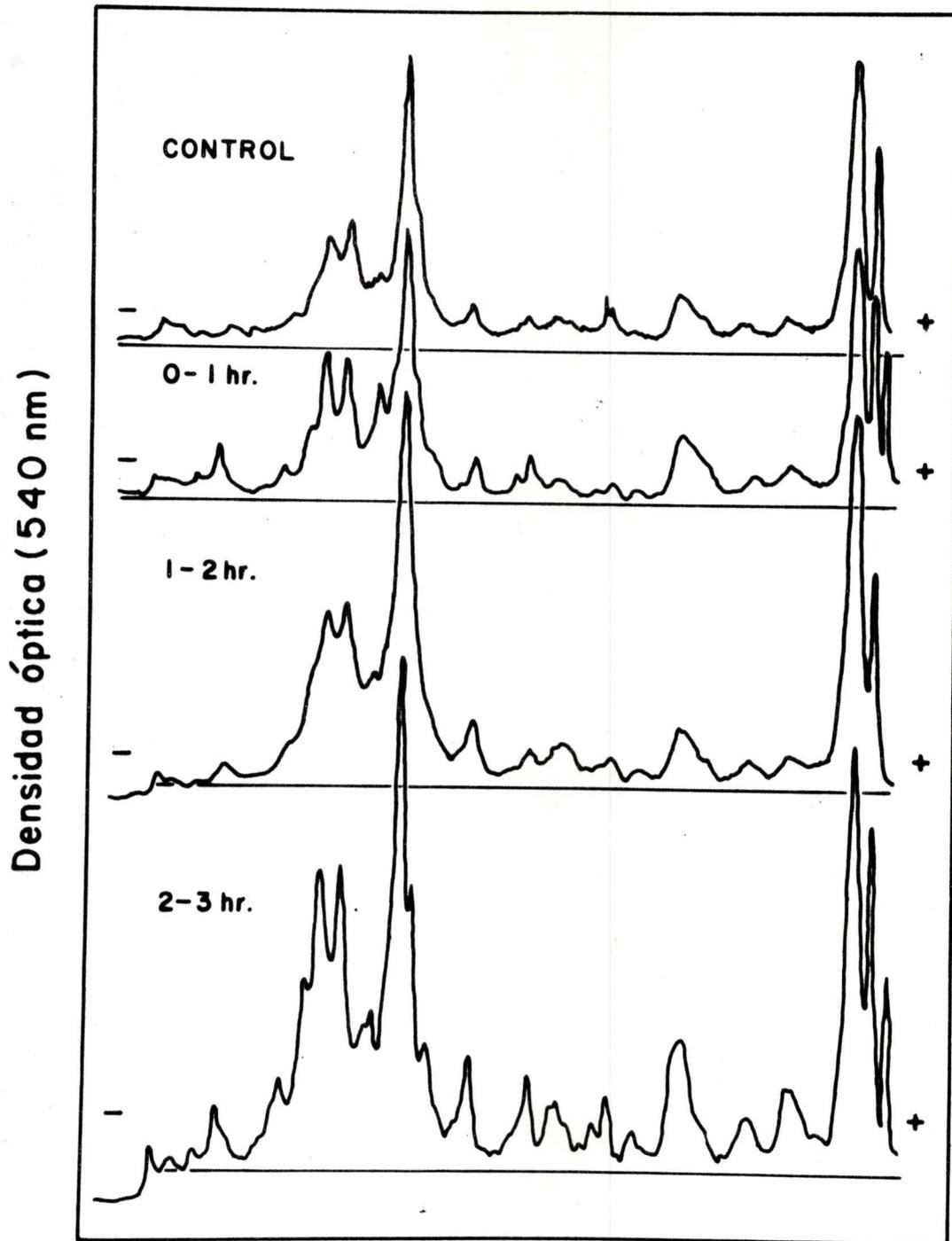


Figura 47

Figura 47

Efecto de progesterona sobre la fosforilación de proteínas nucleares de oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 10 vesículas germinales, provenientes de oocitos tratados o sin tratar con progesterona 10^{-7} M por tiempos variables, se incubaron durante 1 hora a 20° en presencia de ^{32}P -ATP (1 uCi). Las proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida, y la radiactividad se detectó por la técnica de fluorografía (ver Métodos), midiéndose el perfil densitométrico a 540 um.

muestra en la Figura 48. Los resultados obtenidos indican que el cAMP inhibe específicamente la fosforilación de una de las proteínas y activaría la de otra. En el caso de cGMP, se produciría sólo la activación de la fosforilación de dos proteínas, siendo una de ellas idéntica a la activada por cAMP.

Efecto de hormonas sobre síntesis de proteínas en oocitos de *Xenopus laevis*

Con el objeto de caracterizar las proteínas que sintetiza el oocito y las proteínas específicas de la vesícula germinal, se incubaron oocitos con ^{35}S -metionina durante 24 horas. Diez de estos oocitos se trataron según lo descrito en Métodos, y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida. En forma paralela se sacaron 20 vesículas germinales de las células incubadas durante 24 horas con aminoácido radiactivo, y se analizaron las proteínas en geles de poliacrilamida (Figura 49). La figura también muestra las proteínas de oocito detectadas por tinción (A).

Como se puede ver en la figura 49B, el oocito estaría sintetizando un gran número de proteínas, y la velocidad de síntesis de estas sería diferente para muchas de ellas. Todas las proteínas detectadas por tinción presentan

Densidad óptica (540 nm)

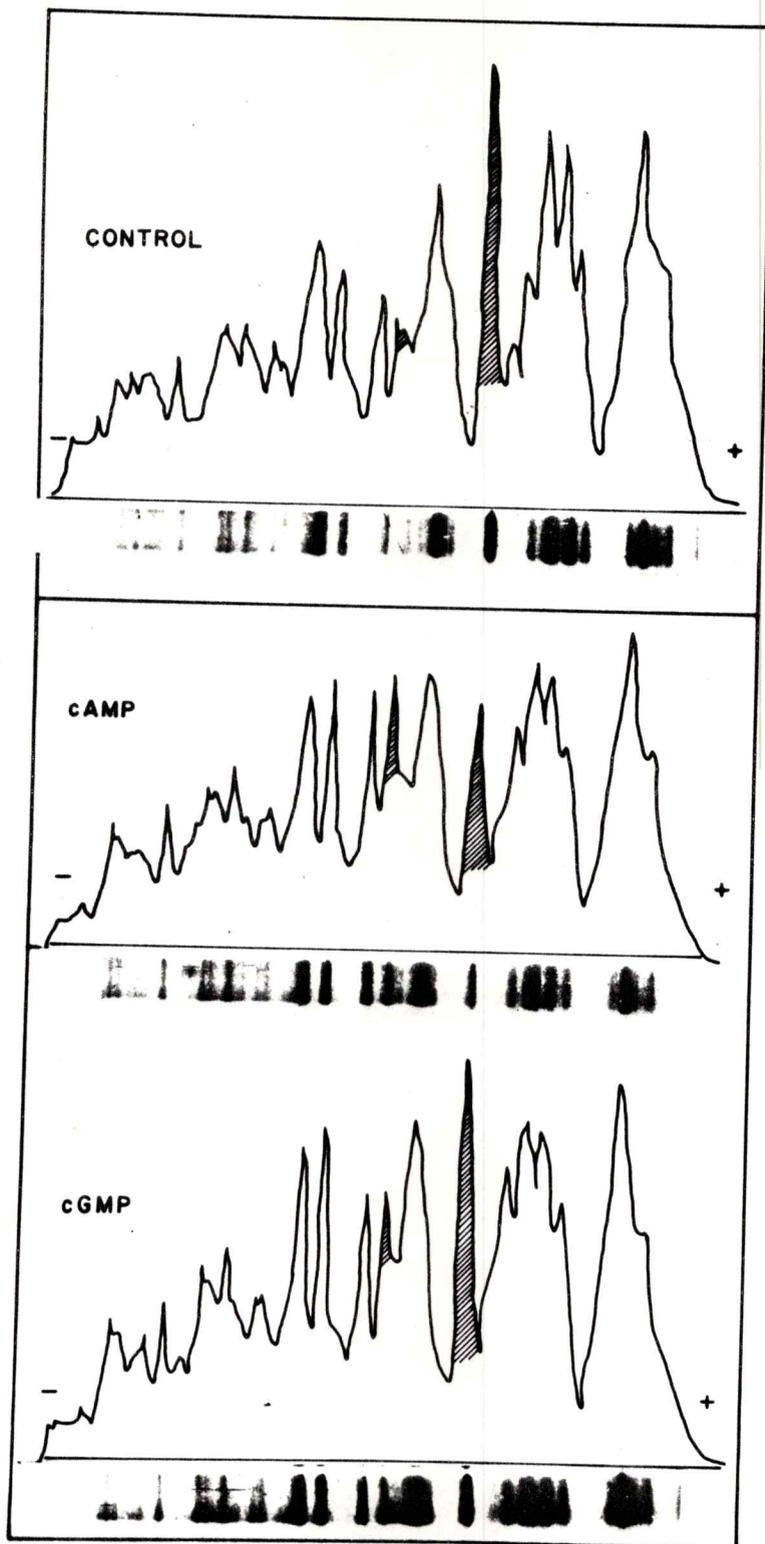


Figura 48

Figura 48

Efecto de la microinyección de cAMP y cGMP en la fosforilación de proteínas de oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 10 oocitos se microinyectaron con ^{32}P -ATP (0,1 uCi) y con cAMP o cGMP no radiactivos a una concentración final de $5 \times 10^{-5}\text{M}$, y se incubaron a 20° durante 30 minutos en solución HF. Las proteínas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida, y la radiactividad se detectó por la técnica de fluorografía (ver Métodos), midiéndose el perfil densitométrico a 540 um.

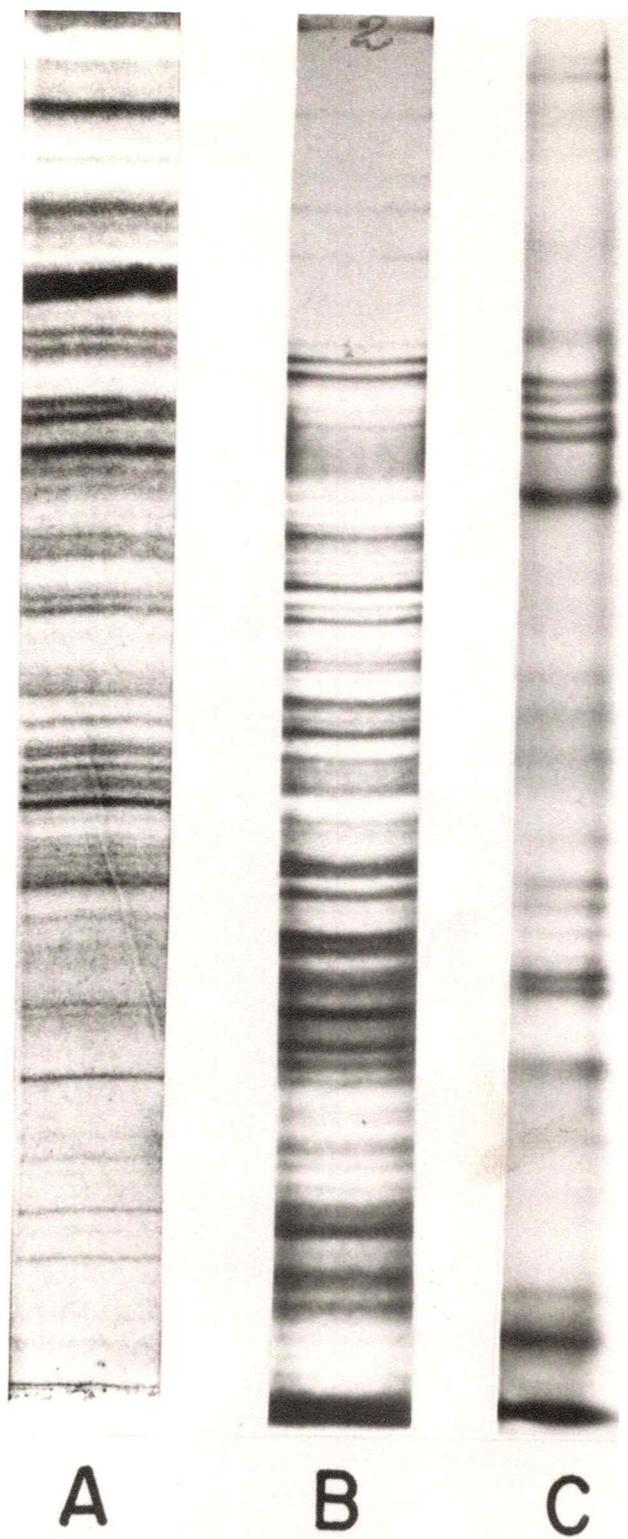


Figura 49

Figura 49

Proteínas de vesícula germinal y oocito de X. laevis

(A), Proteínas de 10 oocitos detectadas por tinción, en geles de poliacrilamida (ver Métodos); (B), proteínas radiactivas provenientes de oocitos incubados durante 24 horas en solución HF a 22° en presencia de ³⁵S-metionina, actividad específica 1 Ci/umol, a una concentración de 1 uM; detectadas por el método de fluorografía (ver Métodos); (C), proteínas radiactivas provenientes de 20 vesículas germinales extraídas de oocitos incubados en idénticas condiciones que en (B) y detectadas por la técnica de fluorografía.

incorporación de aminoácido radiactivo. El núcleo también posee numerosas proteínas, y algunas de ellas son sintetizadas preferentemente (C).

Resultados que no se muestran, obtenidos con oocitos anucleados, demostraron que las proteínas radiactivas provenientes de estas células separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, son idénticas a las de células controles.

Es importante resaltar que los análisis electroforéticos de proteínas de oocitos incubados con diferentes aminoácidos radiactivos, en geles de poliacrilamida, no presentan diferencias obvias.

Estudios realizados en oocitos de diferentes tamaños, desde el Estado I al Estado VI (92), empleando ^{14}C -leucina como aminoácido radiactivo, no revelaron diferencias significativas al ser analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida y fluorografía. Esto haría pensar que durante su crecimiento, el oocito estaría sintetizando esencialmente las mismas proteínas. En todo caso, para poder asegurar con más certeza este hecho, se necesita emplear técnicas de mayor resolución.

En primera instancia, para estudiar el efecto de hormonas sobre la síntesis de proteínas en oocitos, se incubaron estas células en presencia o ausencia de progesterona y aminoácido radiactivo durante diferentes tiempos.

En la Figura 50A se muestra el efecto de progesterona sobre la incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas totales mediante pulsos de 30 minutos, dados a diferentes tiempos después de agregada la hormona. De los resultados mostrados en la figura, es claro que esta hormona produce un aumento en la incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas desde las 3 horas para caer luego al nivel normal. Este resultado ha sido descrito también por otros investigadores (66).

Como se muestra en la Figura 50B no se detecta ninguna diferencia en la incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas en oocitos controles y tratados con progesterona. Análisis simultáneos de entrada de aminoácido no revelaron diferencia alguna.

Experimentos realizados con hCG y aminoácido radiactivo en el medio durante toda la incubación, demostraron que existe un gran aumento en la entrada de aminoácido (A) y en la incorporación a proteínas totales del oocito (B), corto tiempo después de agregada la hormona (Figura 51). Como se ve en la figura el aumento en la entrada de aminoácido antecede al de proteínas. Es interesante notar que el aumento en la síntesis de proteínas es mayor que el debido sólo al estímulo de la entrada de aminoácido radiactivo.

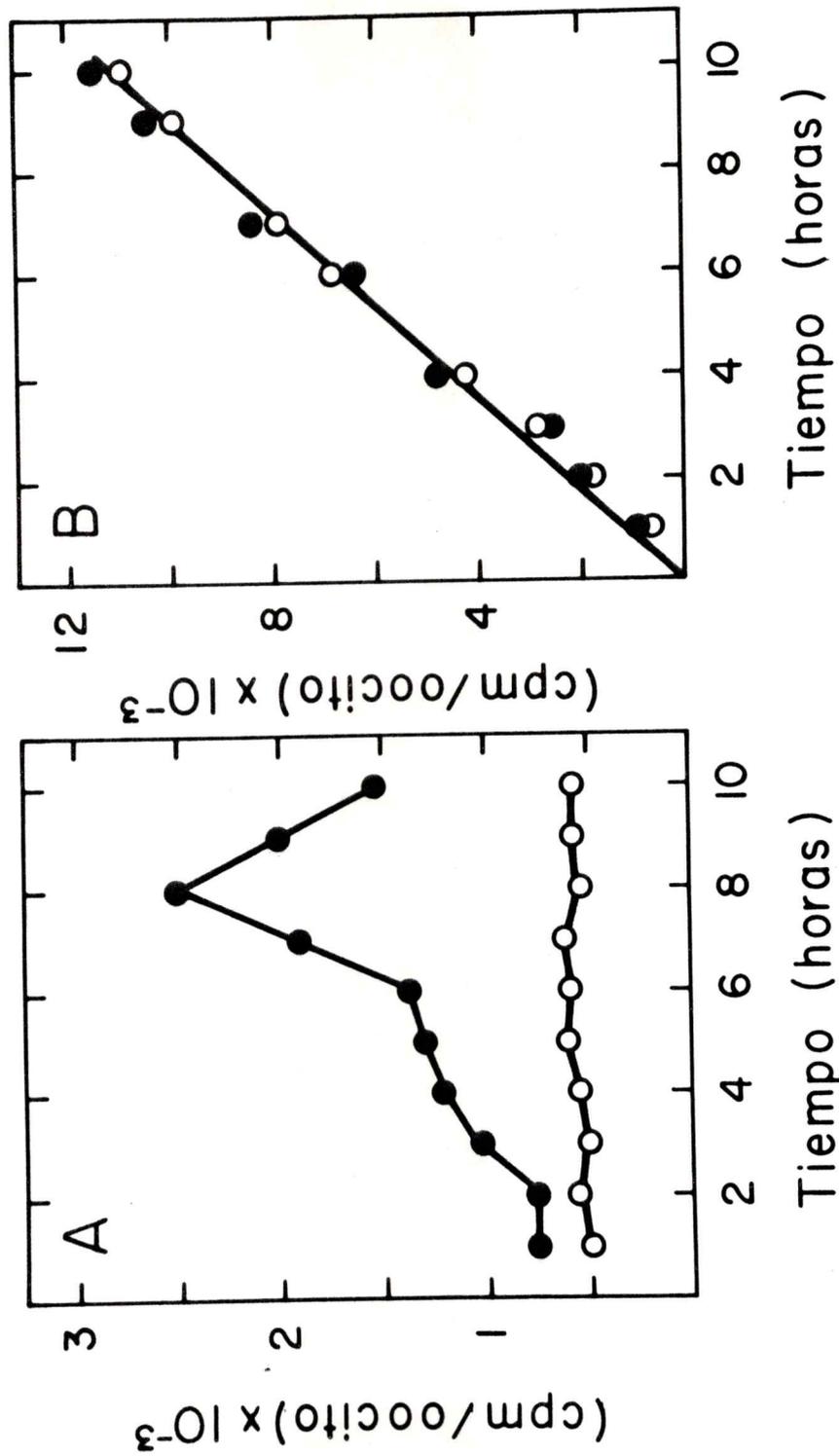


Figura 50

Figura 50

Efecto de progesterona sobre síntesis de proteínas en oocitos de Xenopus laevis

Oocitos, en grupos de a 5, se incubaron en solución HF a 20°, durante diferentes tiempos, en presencia de progesterona 10^{-7} M. Se midió la síntesis de proteínas usando en ambos casos, 14 C-leucina, actividad específica 240 uCi/umol, a una concentración de 18 uM. (A), se agregó el aminoácido radiactivo a los tiempos indicados y se continuó la incubación durante 30 minutos; (B), el aminoácido radiactivo estuvo presente durante toda la incubación. Control sin progesterona (O), con progesterona 10^{-7} M (●). La radiactividad incorporada a proteínas se detectó como se describe en Métodos.

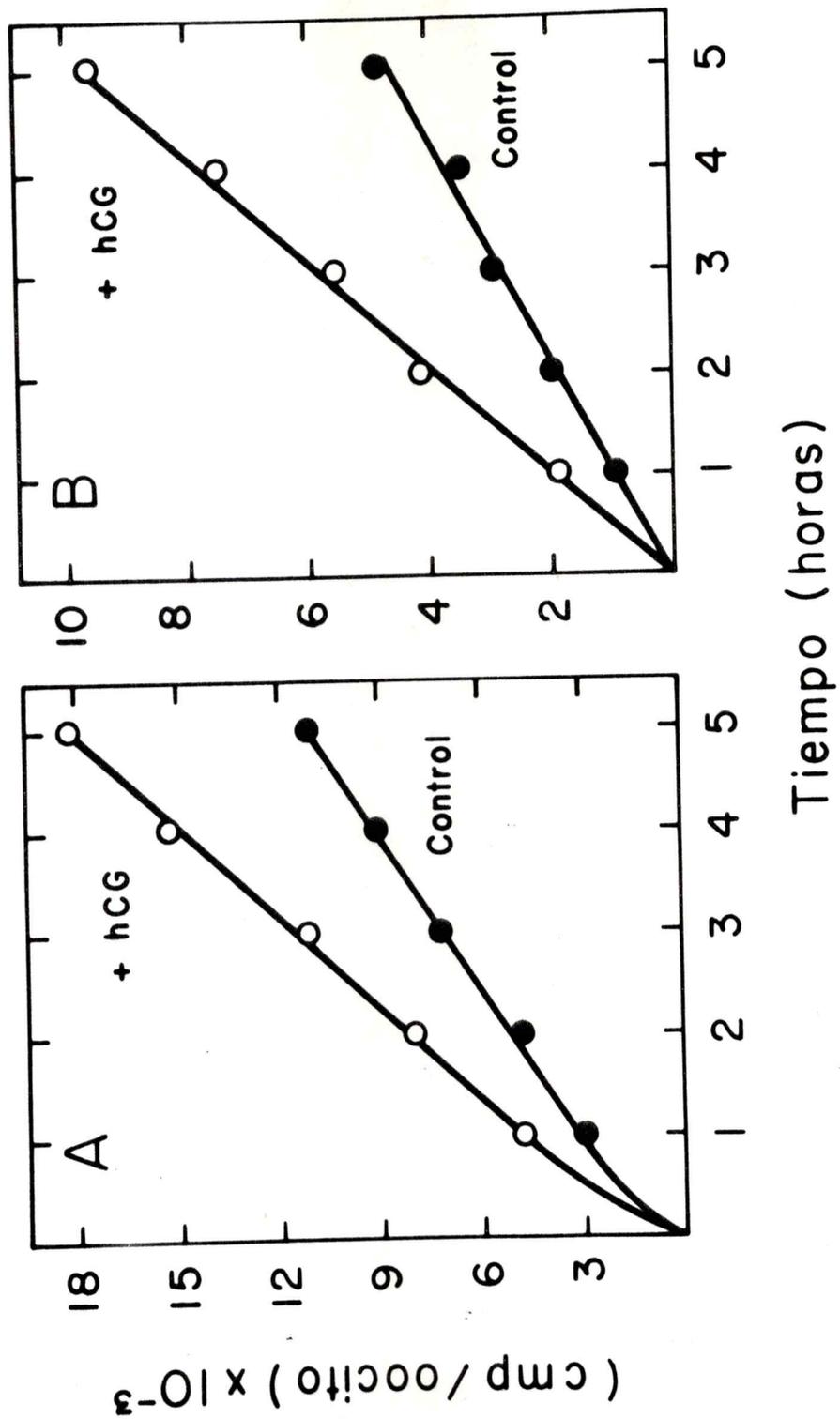


Figura 51

Figura 51

Efecto de hCG sobre entrada e incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas en oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 5 oocitos, en duplicado, se incubaron en solución HF a 20° con ^{14}C -leucina, actividad específica 240 uCi/umol, a una concentración de 18 uM, en presencia o ausencia de hormona, 60 unidades/ml. (A), entrada de aminoácidos en oocitos incubados con (○) y sin (●) hormona; (B), incorporación de radiactividad a proteínas de oocitos incubados con (○) o sin (●) hormona. Los análisis de radiactividad total e incorporada a proteínas se realizaron como se describe en Métodos.

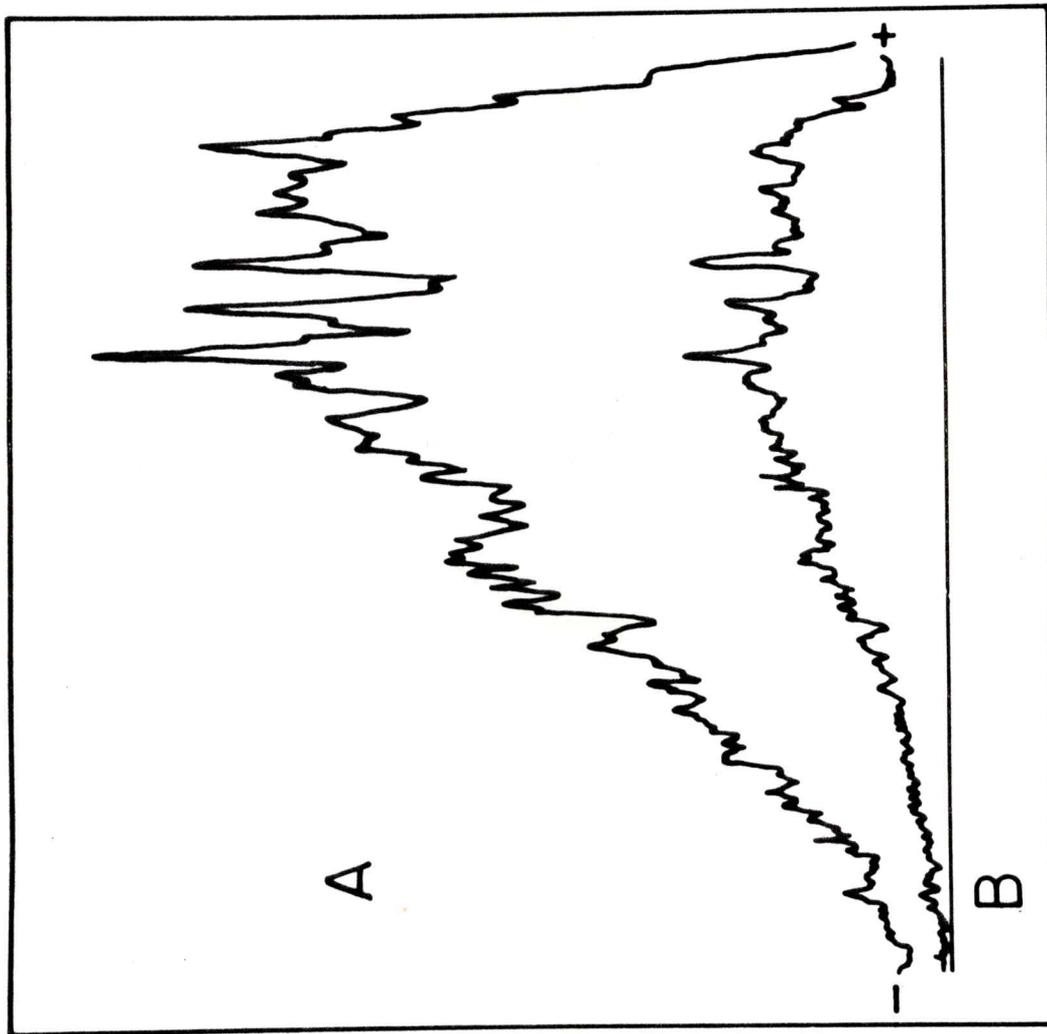
Estudios más detallados al respecto, realizados en el laboratorio (110), han demostrado que el estímulo en la entrada de aminoácido es independiente de la síntesis de proteínas y que éste se debe a una disminución de la constante de transporte (K_T) para los aminoácidos.

Se ha comprobado que el efecto de hCG sobre la entrada de aminoácidos exógenos sería un fenómeno general para todos los aminoácidos (110).

Para poder analizar las posibles diferencias entre las proteínas sintetizadas en el oocito antes y después del tratamiento hormonal, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (ver Métodos).

Inicialmente se analizaron proteínas radiactivas provenientes de oocitos tratados y sin tratar con progesterona incubados en presencia de aminoácido radiactivo durante todo el período de incubación. Los resultados obtenidos por electroforesis en gel y fluorografía no revelaron ninguna diferencia importante.

Debido a que no había sido posible encontrar diferencias en la incorporación de aminoácido radiactivo a proteínas, entre oocitos controles y tratados con progesterona al estar el aminoácido presente en forma permanente, se realizó un estudio con proteínas provenientes de oocitos tratados y sin tratar con hormonas incubados con un pulso de 30 minutos de ^{35}S -metionina. Como se ve en la Figura 52



Densidad óptica (540 nm)

Figura 52

Figura 52

Efecto de progesterona sobre síntesis de proteínas en oocitos de Xenopus laevis

Grupos de 10 oocitos preincubados a 20° durante 5 horas con progesterona 10^{-7} M o sin hormona, se incubaron a 20° durante 30 minutos con 35 S-metionina, 1×10^{-6} M (actividad específica 1 mCi/umol). Las proteínas radiactivas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida y fluorografía como se describe en Métodos. Perfil densitométrico de proteínas radiactivas de oocitos tratados con progesterona (A) o de oocitos controles (B).

no existe una diferencia notoria en el tipo de proteínas sintetizadas, sino principalmente es una diferencia de carácter cuantitativo.

Con el objeto de lograr una mayor resolución de las proteínas del oocito se usó electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. La primera dimensión es una isoelectroforesis en tubo y la segunda dimensión se realiza en placa en geles al 15 % en condiciones desnaturantes (SDS 1 %). (97).

En la Figura 53 se muestra una separación típica de proteínas totales de oocitos y de vesículas germinales, detectadas por tinción con azul de coomasie. Se observa, claramente, que el número de proteínas detectadas por esta técnica es muy superior al encontrado al usar electroforesis en una dimensión. Es interesante resaltar que varias de las proteínas detectadas en vesícula germinal están ausentes en el gel de proteínas totales y viceversa. No se ha detectado diferencia en las proteínas totales de controles y anucleados usando el método de tinción.

Para ver el efecto sobre la síntesis de proteínas causado por hCG se incubaron oocitos con esta hormona y aminoácido radiactivo, durante 3 horas (Figura 54). Se puede observar que no existen diferencias gruesas entre las proteínas sintetizadas por oocitos controles y tratados con la hormona. Esto afirmaría los resultados anteriores

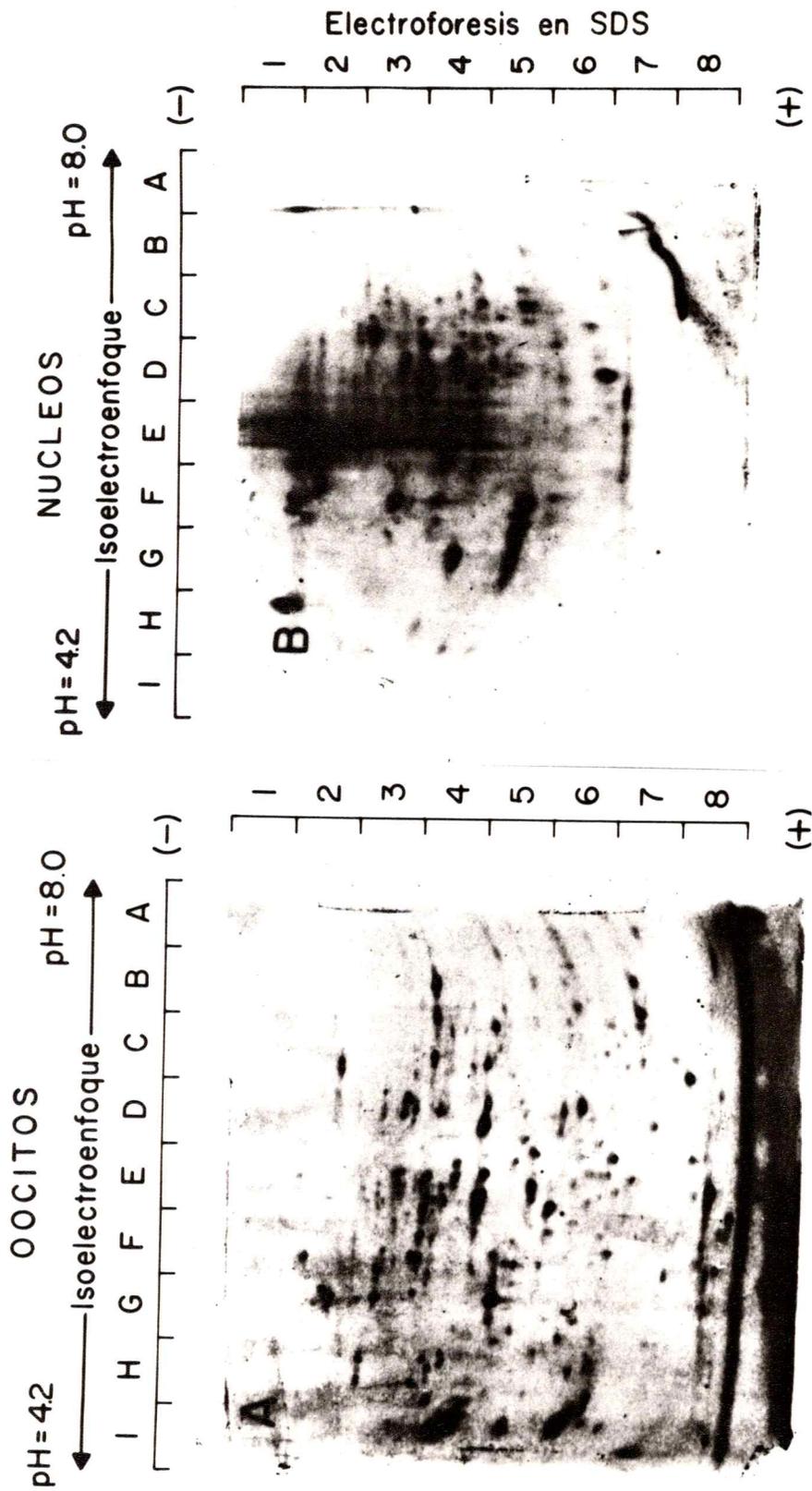


Figura 53

Figura 53

Proteínas de vesícula germinal y de oocitos de
Xenopus laevis

(A), proteínas totales de 10 oocitos analizados por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida y teñidos con azul de coomasie.

(B), proteínas provenientes de 400 vesículas germinales analizadas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, teñidos con azul de coomasie. La extracción, procesamiento y corrimiento electroforético se realizaron según lo descrito en Métodos.

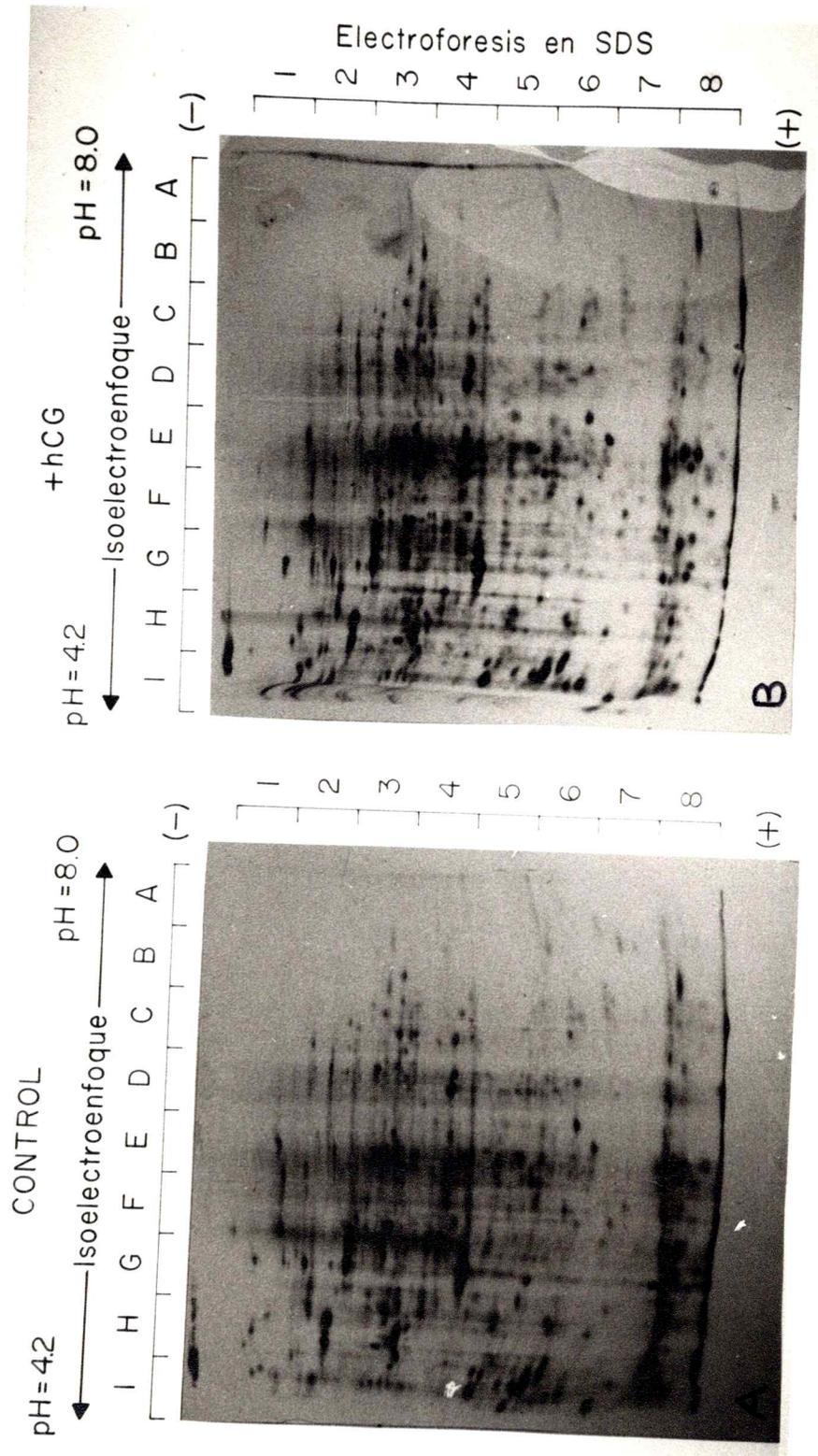


Figura 54

Figura 54

Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida de las proteínas radiactivas de oocitos de Xenopus laevis sintetizadas antes y después del estímulo hormonal.

Grupos de a 10 oocitos, se incubaron en solución HF a 20° con ³⁵S-metionina, actividad específica 1 mCi/umol, a una concentración de 1 uM, durante 3 horas en presencia (B) o ausencia (A) de hCG. Concentración de hCG, 60 unidades/ml. El procesamiento y análisis electroforético de las muestras se realizó como se describe en Métodos.

en que el cambio de síntesis de proteínas, después del tratamiento hormonal, pero antes del rompimiento de la vesícula germinal, es principalmente cuantitativo y no cualitativo (88).

DISCUSION

Al iniciar el trabajo de esta tesis se planteó un estudio sobre los cambios de la síntesis proteica de oocitos de anfibios durante la maduración de estas células gatillada por hormonas. Este planteamiento se basaba en los datos de la literatura mencionados en la introducción que apuntaban a una participación de la síntesis de proteínas en el proceso de maduración y a la aparición de una nueva entidad funcional - el factor de maduración - que también requería de la síntesis de nuevas proteínas.

Como se puede deducir de los resultados presentados anteriormente, el desarrollo de la tesis se desvió considerablemente de la intención original después de haber realizado la parte inicial sobre características de la síntesis proteica de oocitos que no habían sido tratados con hormonas. Esta desviación se debió principalmente al hecho que en los primeros estudios realizados tratando oocitos con progesterona no se observaron alteraciones notables en la síntesis total de proteínas de estas células. Solamente se observaron cambios significativos cuando se estudió la incorporación de aminoácidos con pulsos de radiactividad (Figura 50). Aún en dichos resultados la

estimulación máxima causada por el tratamiento con progesterona se obtuvo solo después de 7 a 8 horas de la exposición a la hormona, momento en el cual ya han ocurrido reacciones tan importantes como la inducción del factor de maduración y el rompimiento de la vesícula germinal.

Estos resultados nos llevaron al convencimiento que la acción hormonal seguramente afectaba solamente la síntesis de algunas pocas proteínas y que sería necesario profundizar en el estudio de algunos efectos tempranos de las hormonas sobre los oocitos antes de poder entender los mecanismos involucrados. La segunda parte de la tesis, por lo tanto, relata la búsqueda de efectos hormonales tempranos y su posible relación con la síntesis de proteínas de estas células.

A continuación pasaremos a discutir el detalle de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de la tesis.

El gatillamiento de la actividad biosintética que ocurre después de la fertilización ha llevado a muchos autores a considerar que el huevo y el oocito crecido serían células en estado latente con una actividad metabólica mínima. Los estudios realizados en la parte inicial de esta tesis prueban que este concepto está errado y que la biosíntesis proteica en el oocito crecido es considerable.

Los datos presentados indican que el oocito es capaz de sintetizar, aproximadamente, 1 μ g de proteína por día, y los geles bidimensionales que sirven para analizar las proteínas sintetizadas por estas células nos indican que son cientos de proteínas diferentes.

Resultados obtenidos por otros laboratorios en cuanto a la síntesis de RNA, demuestran que estas células también se encuentran en activa transcripción (24).

A pesar del uso de oocitos en muchos laboratorios para estudiar la traducción de diversos mRNA inyectados, existen pocos datos en la literatura referentes a las propiedades de la biosíntesis de proteínas endógenas de estas células. En este sentido, algunos estudios detallados en el Capítulo Primero son de especial interés. Se ha encontrado, por

ejemplo, que la temperatura afecta la síntesis de proteínas in vivo de una manera diferente que si se realiza in vitro. La temperatura óptima de la reacción en la célula viva está alrededor de la temperatura normal del habitat de estos animales, 20° a 22° . Sin embargo, según se ha observado en estudios realizados en el laboratorio, un sistema de biosíntesis proteica in vitro con componentes que provienen exclusivamente de oocitos de Xenopus laevis tiene un óptimo a 37° .

Sería interesante, en el futuro, indagar más profundamente en los mecanismos que inhiben la síntesis proteica in vivo a temperaturas por sobre los 22° , ya que se ha visto en el laboratorio que no se debe a una labilidad intrínseca de los componentes que intervienen en esta reacción.

Los estudios realizados sobre entrada de proteínas a la vesícula germinal (Figura 11), demuestran que no sólo se estarían sintetizando proteínas citoplasmáticas en el oocito sino que, además, habría una síntesis preferencial de proteínas nucleares, ya que estas constituirían, aproximadamente, el 20 % del total. Estudios recientes indicarían que el núcleo del oocito sería selectivo en cuanto a las proteínas que permite entrar y que ésto no dependería del tamaño de estas macromoléculas (41, 42). Estos datos apoyarían fuertemente, la evidencia que existe una síntesis preferencial de

proteínas nucleares en el oocito, ya que sólo entrarían a él las proteínas específicas para el núcleo que se están sintetizando en el citoplasma.

Mediante el uso de moléculas pequeñas radiactivas, como ^3H -sacarosa, ^3H -glicerol, o moléculas mayores como ^3H -inulina (P.M = 5.500) ha sido posible estudiar la permeabilidad del núcleo del oocito y la difusión de estas moléculas en el citoplasma (111-113). Además se ha podido calcular, de estos datos, la distribución de agua libre entre el núcleo y el citoplasma. Los resultados obtenidos por estos investigadores permiten concluir lo siguiente:

a) el núcleo del oocito posee un 36 % más de agua disponible que el citoplasma; b) la membrana nuclear frente a estas moléculas se comporta tan permeable como el citoplasma; c) no sólo la selectividad de la membrana nuclear sería importante para permitir asimetrías de los solutos en el citoplasma y núcleo, sino que serían importantes los procesos de unión a macromoléculas y la solubilidad diferencial en el agua componente del núcleo y citoplasma.

Los resultados obtenidos sobre la entrada de aminoácidos a oocitos demuestran que estas células son permeables a la mayoría de los aminoácidos estudiados, y que, además, poseen la capacidad de concentrarlos respecto al medio externo. La capacidad de concentrar aminoácidos no se

debería a una función realizada por las células foliculares ya que al ser sacadas éstas por tratamiento con pronasa, el oocito mantiene su capacidad de transporte. También es claro que la captación de aminoácidos es independiente de la síntesis de proteínas y que no necesita de ión K^+ para funcionar.

El hecho que 2,4 -dinitrofenol no sea capaz de inhibir la capacidad de concentrar los aminoácidos por el oocito, podría indicar que este sistema no necesita de energía pero no se puede excluir la posibilidad que dicha energía sea proporcionada por el "pool" de ATP presente en estas células.

El sistema transportador de aminoácidos es saturable y presenta una típica cinética micaeliana. La constante de transporte (K_m) parece ser característica para cada aminoácido. Además, este sistema demuestra ser específico para grupos de aminoácidos relacionados por la estructura de su cadena lateral

Resultados previos obtenidos en otros sistemas concuerdan con los datos aquí obtenidos.

Es interesante que los "pooles" de aminoácidos de los oocitos se mantengan aún después de incubar estas células durante 24 horas, en un medio que sólo contiene sales. Esto indicaría que esta célula es capaz de mantener los "pooles"

internos aún cuando se estén ocupando aminoácidos para la síntesis de sus proteínas endógenas. Seguramente el mecanismo que permite este fenómeno sería la degradación de las proteínas vitelogénicas presentes en gran abundancia. Una indicación en este sentido es la aparición de uno de sus constituyentes más abundantes, fosfoserina, en el interior del oocito, después de ser éstos incubados durante 24 horas en solución salina.

Los niveles de aminoácidos libres encontrados en los oocitos recién extraídos del animal, coinciden bastante bien con los descritos previamente por otros investigadores (100, 101).

El hecho que en oocitos incubados en solución salina, en presencia de todos los aminoácidos, no se detecte fosfoserina, sugeriría que estas células poseen un sistema de control que permitiría el uso de proteínas vitelogénicas, como fuente de aminoácidos solo cuando éstas se encuentran en un medio desprovisto de ellos. Desde luego que se necesitan muchas otras evidencias para poder establecer que un mecanismo con estas características sería funcional.

Otro dato que apoyaría que las proteínas vitelogénicas se degradarían para suministrar aminoácidos libres al "pool" celular es el hecho que la radiactividad incorporada a proteínas en el oocito no disminuye aún después de 12 días

de mantener estas células en condiciones de mínima reutilización del aminoácido radiactivo incorporado.

Es posible postular de los resultados anteriores que el oocito es una célula que estaría sintetizando activamente proteínas, pero que éstas serían degradadas muy lentamente o no lo serían del todo. Es lógico pensar así, ya que el oocito aumenta miles de veces su volumen en un período relativamente corto.

Los análisis de aminoácidos en la sangre de Xenopus laevis revelaron que su concentración es mucho menor que la existente en los oocitos, lo que indicaría que normalmente estas células estarían concentrando aminoácido del medio externo.

Los resultados obtenidos sobre entrada y "pooles" de aminoácidos de oocitos explicarían las diferencias observadas en incorporación a proteínas de los distintos aminoácidos radiactivos usados.

Estos resultados indicarían que es posible obtener una alta incorporación de aminoácidos radiactivos a proteínas endógenas del oocito, sin necesidad de microinyectarlos; pero existirían limitaciones con ciertos aminoácidos, como ácido aspártico y glutámico, debido a su lenta captación y gran dilución isotónica por los "pooles" internos que posee esta célula.

Meister (113 A) ha presentado recientemente una interesante hipótesis sobre el transporte de aminoácidos en que se postula un papel preponderante al glutatión y al ácido glutámico que forma parte de su estructura molecular. Sería interesante estudiar más directamente algunos aspectos de esta hipótesis utilizando oocitos de X. laevis ya que entre otras cosas se podría incrementar el contenido de glutatión en estas células por medio de la microinyección.

En la segunda parte de la tesis se han investigado algunos aspectos del proceso de maduración de los oocitos inducida por hormonas sexuales. En este trabajo la dificultad principal reside en el hecho que se ha dependido de un ensayo morfológico muy grosero para medir la maduración, ya que se observa la ruptura de la vesícula germinal. Este fenómeno involucra, sin duda, un complejo mecanismo a nivel molecular y por lo tanto nosotros estamos usando una etapa terminal de lo que es sin duda un largo proceso para tratar de adivinar lo que ocurre en las etapas iniciales. Este procedimiento es sin duda la causa de muchas de las aparentes discrepancias y dificultades con que nos encontramos en la interpretación de los datos obtenidos. Para el futuro avance en este campo sería

necesario establecer un criterio, de preferencia molecular, que refleje con mayor precisión los efectos tempranos del gatillamiento de la maduración.

Inicialmente fue necesario precisar algunos parámetros del proceso de maduración, tales como temperatura y pH óptimos.

El efecto de la temperatura sobre la maduración, indicaría que, tanto las hormonas esteroidales (progesterona y testosterona) como polipeptídicas (hCG), tendrían una temperatura óptima de inducción de la maduración cercana a los 20°. La disminución de la maduración inducida por hormonas observada a 30° no se debería al requerimiento de síntesis de proteínas para el proceso, ya que, a esa temperatura, se observa todavía una considerable incorporación de aminoácidos a proteínas. Es posible que este efecto inhibitorio esté relacionado con la interacción de la hormona con la membrana del oocito, impidiendo que ésta se pueda realizar normalmente. También sucedería algo

similar a temperaturas más bajas, como 10° .

La influencia del pH sobre la inducción hormonal de la maduración, también sería posiblemente, a nivel de la interacción hormona-receptor en la membrana de las células foliculares (hCG) o la membrana del oocito (hormonas esteroideas). Esto se puede deducir del hecho que las hormonas son incapaces de inducir 100 % de maduración a pH 6,5 , y a este pH la síntesis de proteínas es más de un 80 % de la obtenida a pH 7,5.

El estudio comparativo de la velocidad de maduración, inducida por distintas hormonas, dió un resultado algo inesperado. Se evidenció que las hormonas esteroideas tienen una velocidad de acción menor que hCG. Esto es inesperado, ya que se considera que progesterona sería el intermediario de la acción de hCG. Según la hipótesis más aceptada actualmente, la hormona polipeptídica estimularía la liberación de progesterona de las células foliculares, lo cual causaría la maduración del oocito (65).

Si la secuencia en los eventos gatillados por hCG fuera: hCG - progesterona - maduración, se esperaría que progesterona indujera la maduración más rápidamente que hCG. A pesar que parece claro, que hCG estimula la síntesis y liberación de progesterona en las células foliculares,

es posible que éste sea sólo uno de los varios efectos que hCG produce al interactuar con las células foliculares. Se ha visto en este laboratorio y también ha sido descrito por otros investigadores (114) que hCG produce un gran aumento en la captación de aminoácidos exógenos en los oocitos. Este efecto de hCG no requiere de síntesis de proteínas y no se observa en oocitos tratados con progesterona. Aún más, se ha descrito recientemente (115) que oocitos que están en proceso de maduración inducida por progesterona, sufrirían una inhibición de más de un 75 % en la entrada de ^{14}C -leucina.

Como se puede ver, existen diferencias notables en los efectos secundarios producidos por hCG y progesterona en el oocito.

El empleo de inhibidores de la fosfodiesterasa de cAMP dió como resultado que estos agentes (teofilina y papaverina) son capaces de inhibir la maduración de oocitos inducida por hCG, progesterona, testosterona y ión lantano. Las concentraciones necesarias para lograr un máximo de inhibición, son 10^{-3}M y 10^{-4}M para teofilina y papaverina respectivamente.

Estudios realizados con otros compuestos, como cAMP y adenosina, demostraron que éstos no impiden la maduración inducida por hCG. Otros autores han informado, sin embargo,

que cAMP inhibe la maduración de oocitos estimulada por progesterona (116).

El efecto de teofilina y papaverina sobre la maduración podría estar mediado por una acción inhibitoria de estas drogas sobre la síntesis de proteínas, ya que los resultados descritos anteriormente han demostrado que ambos compuestos, a las concentraciones que bloquean la maduración, causan una disminución del 50 % de la incorporación de aminoácidos en proteínas, sin alterar la captación de los aminoácidos en los oocitos.

De la misma manera se ha descrito previamente que, 2,4-dinitrofenol inhibía la maduración, y que éste se debería a que este proceso necesita de energía para llevarse a cabo (117). Los resultados obtenidos en esta tesis, con este inhibidor, demostraron que con la misma concentración usada por los otros autores, 10^{-3} M, se inhibe un 90 % la síntesis de proteínas, lo que lógicamente impide la maduración.

Hay otras evidencias que ligan la acción de los inhibidores de la fosfodiesterasa de cAMP sobre la maduración de oocitos a su efecto inhibitorio de la síntesis de proteínas. Hemos observado, por ejemplo, que la adición de teofilina y papaverina a diferentes tiempos después del tratamiento con la hormona, tiene un efecto inhibitorio sobre la

maduración, idéntico al que se obtiene con cicloheximida, conocido inhibidor de la síntesis proteica. También se ha observado que la reversión del efecto inhibitorio de teofilina sobre la maduración causado por la adición de iones de calcio, va acompañada de una reversión de la inhibición de la síntesis de proteínas causada por esta droga. También existe una correlación en el hecho que la inhibición de la maduración y de la síntesis de proteínas se revierte al eliminar del medio a la teofilina, mientras que ambos procesos siguen inhibidos al ser causados por papaverina después de 22 horas de haber retirado esta droga del medio de incubación.

Evidentemente, sin embargo, el mecanismo de acción de teofilina y papaverina al impedir la maduración de los oocitos debe ser muy complejo. El efecto de estas drogas en la síntesis de proteínas de estas células, podría explicarse en base a los recientes resultados de Ochoa y colaboradores (118) que han establecido la existencia de proteínas quinasas dependientes de cAMP que controlan la síntesis de proteínas en reticulocitos. Se podría pensar que las drogas causarían un aumento localizado de los niveles de cAMP en algún compartimiento del oocito y que dicho aumento podría activar una proteína quinasa capaz de fosforilar algún factor e inhibir la síntesis de proteínas requeridas para la maduración. Al mismo tiempo, debemos involucrar de alguna manera al ión calcio en el mecanismo, ya que, como hemos visto, este ión puede revertir la acción de teofilina.

Publicaciones recientes (119) confirman la importancia de Ca^{++} en la maduración, ya que demuestran la posibilidad de inducirla sólo con altas concentraciones de Ca^{++} (5 mM) en presencia de un ionóforo (A 23187), que estimularía el movimiento de Ca^{++} en las células. Además otros resultados más recientes muestran la capacidad del ión Ca^{++} , introducido electroforéticamente en el cortex del oocito, de producir la maduración en estas células (120).

Aparentemente hay también una estrecha relación entre el Ca^{++} y la función regulatoria ejercida por los nucleótidos cíclicos. La base más importante para esta relación estaría dada por el hallazgo de una proteína que une fuertemente el Ca^{++} y que es capaz de activar a la fosfodiesterasa de cAMP y la adenil ciclase (121).

El resultado obtenido en cuanto a la mayor velocidad de rompimiento de la vesícula germinal por hCG que el obtenido con las hormonas esteroidales, un poco inesperado si se supone a progesterona como intermediario de la acción de hCG, podría explicarse por el hecho que la gonadotropina estimula 4-5 veces la entrada de Ca^{++} y progesterona sólo estimula 2 veces la entrada de este ión. Si se necesitara una concentración mínima de Ca^{++} en ciertas zonas del oocito para iniciar la maduración, ésta se lograría antes en presencia de hCG que progesterona, así se explicaría por qué hCG produce el rompimiento de la vesícula germinal antes que progesterona

al ser agregadas, en forma simultánea, a distintos oocitos provenientes del mismo animal.

Los niveles de cAMP, después de la inducción de la maduración por hormonas, o por un agente como el ión lantano sufren drásticas variaciones durante las 4-5 primeras horas del proceso de maduración.

Progesterona y ión lantano parecen tener un efecto muy similar sobre los niveles de cAMP. Ambos compuestos producen una fuerte disminución de la concentración de este nucleótido, de 16 pmoles a 3 pmoles, en el oocito durante las 2-3 primeras horas, para volver a los niveles normales después de 5-6 horas del estímulo de maduración.

Por otra parte, hCG induce un aumento en los niveles de cAMP en las 2 primeras horas del efecto hormonal para volver a los valores normales después de 3-4 horas. El aumento de cAMP provocado por hormonas polipeptídicas ha sido descrito para un gran número de células y diferentes hormonas, lo que coincide muy bien con los datos obtenidos con hCG y los oocitos.

Los estudios realizados sobre los efectos de teofilina y papaverina en la actividad fosfodiesterásica y niveles de cAMP del oocito fueron muy claros en cuanto a que los niveles totales del nucleótido cíclico permanecen inalterables al incubar oocitos con concentraciones de papaverina 10^{-4} M y teofilina 10^{-3} M durante 5 horas. Estos datos permitirían postular que la actividad fosfodiesterásica del oocito no

se modifica al estar presentes estos compuestos en el medio de incubación. Sin embargo, resultados obtenidos en el laboratorio, mediante microinyección de ^3H -cAMP a oocitos tratados con teofilina 10^{-3}M , demostraron que la actividad fosfodiesterásica estaba inhibida en un 30 %.

Existiría, por los datos anteriores, una cierta discordancia entre los resultados obtenidos por la determinación de niveles de cAMP y actividad fosfodiesterásica en cuanto al efecto de teofilina o papaverina.

Explicación satisfactoria a este problema no existe; pero podría decirse que no se producen cambios en los niveles totales de cAMP por la presencia de teofilina o papaverina en el medio, porque se inhibe la actividad adenil ciclasa del oocito para compensar la disminución en la hidrólisis del nucleótido.

Al agregar teofilina o papaverina en forma simultánea con la hormona, ya sea hCG o progesterona, se vió que los niveles de cAMP no se alteraban; o sea, estos inhibidores estarían impidiendo que se produjeran los cambios de cAMP en el oocito y por lo tanto se puede concluir que de alguna manera estas drogas afectan el metabolismo de cAMP. También quedó establecido que cicloheximida no produce alteraciones en los niveles de cAMP del oocito.

Cicloheximida por otra parte, no produce modificaciones en el efecto causado por progesterona sobre los niveles de cAMP. Esto indicaría que no sería necesaria la síntesis

de una nueva proteína para que se produjera la disminución de cAMP causada por esta hormona esteroïdal.

El efecto de teofilina y papaverina, sería más claro si sólo fueran capaces de inhibir la maduración al agregarse al medio de incubación previo a que se produjeran los cambios en los niveles de cAMP; pero ésto no es así, ya que hasta 3 horas después de la acción hormonal son capaces de impedir totalmente la maduración.

Es difícil pensar que teofilina y papaverina estén inhibiendo maduración únicamente por efectos directos sobre la fosfodiesterasa de cAMP, ya que es imposible poder comprender que alteren o impidan los efectos producidos por hCG (aumento de cAMP) y los de progesterona (disminución de cAMP).

Los datos obtenidos de los análisis de actividad fosfodiesterásica en oocitos, revelaron que el homogeneizado de estas células posee la capacidad de hidrolizar cAMP y cGMP dando $5'$ -AMP y $5'$ -GMP respectivamente.

La actividad de la fosfodiesterasa tanto para hidrolizar cAMP como cGMP es inhibida por teofilina 0,4 mM en un 40 % y, también, por EDTA 1 mM. Esto último indica que requiere la presencia de Mg^{++} u otros cationes divalentes, aún cuando Mg^{++} o Ca^{++} agregados al homogeneizado no estimulan ninguna de las dos actividades.

Es interesante recordar que la actividad fosfodiesterásica para cGMP no se ha podido detectar in vivo al

inyectar $^3\text{H-cGMP}$. Esto podría indicar una comportamentalización de esta enzima en el oocito que la hace inaccesible al $^3\text{H-cGMP}$ inyectado.

Otro hecho relacionado es la evidencia que la vesícula germinal no posee ninguna de las dos actividades fosfodiesterásicas. Estas actividades se encontrarían en la fracción soluble (70 %) y particulada (25 %) para el caso de la fosfodiesterasa de cAMP; en cambio, la actividad para hidrolizar cGMP se encuentra sólo en la fracción soluble.

Otro dato interesante es que los parámetros cinéticos para la fosfodiesterasa de cAMP obtenidos in vitro ($K_m = 2 \times 10^{-4} \text{M}$, $V_{\text{máx}} = 17$, pmol/min) son prácticamente idénticos a los obtenidos in vivo mediante microinyección de cAMP radiactivo ($K_m = 5 \times 10^{-4} \text{M}$, $V_{\text{máx}} = 25$ pmol/min). En el estudio in vitro en este sistema, al igual que en muchos otros sistemas, se encontró también una actividad fosfodiesterásica de bajo K_m (10^{-6}M) la que no se pudo detectar in vitro ya que los niveles endógenos de cAMP estaban en ese rango de concentración.

El perfil cromatográfico de la columna de celulosa DE-52 demostró que estas células poseen, al menos, 3 tipos diferentes de fosfodiesterasas de cAMP. Aún cuando no se hicieron estudios para caracterizar los diferentes tipos de actividades por falta de material, es posible que los

parámetros cinéticos de estas formas enzimáticas sean diferentes, y cumplan algún rol en la regulación de los niveles de cAMP.

Un punto importante para futuros estudios sería el investigar si las fosfodiesterasas de cAMP en oocitos se inducen al inyectar altas concentraciones de cAMP en estas células.

Los experimentos realizados para detectar variaciones en la actividad total para hidrolizar cAMP en homogeneizados de oocitos tratados con progesterona durante 2 horas, no mostraron variaciones significativas. Aún más, los resultados obtenidos de las determinaciones de las actividades soluble y particulada después de la inducción hormonal, tampoco mostraron ninguna diferencia respecto a la distribución de estas actividades en los oocitos controles.

Los resultados obtenidos mediante microinyección de cAMP radiactivo a oocitos pretratados con progesterona, tampoco fueron capaces de encontrar diferencias en la actividad fosfodiesterásica hasta 5 horas después del tratamiento hormonal. En estos casos, debemos recordar, que sólo se está midiendo la fosfodiesterasa de cAMP de alto K_m , y por lo tanto podrían ocurrir variaciones en la enzima de bajo K_m sin ser detectados.

La disminución de cAMP nuclear, que acompaña a la caída de cAMP total de oocitos tratados con progesterona,

es muy importante por el posible rol que el cAMP pueda desempeñar en la regulación de la expresión génica durante las primeras horas del estímulo hormonal.

Datos recientes de la literatura (89), indican que la microinyección de subunidades regulatorias de proteína quinasa purificadas, inducen la maduración, con todas las características de un proceso inducido por hormonas. Es interesante que esta subunidad se une fuertemente al cAMP, formando una unión muy estable, lo que produciría artificialmente una baja en los niveles de cAMP libre en el oocito, semejando el efecto causado por progesterona.

Los datos presentados sobre fosforilación son claros en el sentido que el oocito estaría fosforilando activamente una gran proporción de las proteínas endógenas. Además los resultados obtenidos con vesículas germinales aisladas, muestran que este organelo es capaz de fosforilar sus proteínas al agregar al medio $^{32}\text{P-ATP}$.

Al comparar el perfil densitométrico de las proteínas que se están sintetizando en el oocito, y aquellas que estarían siendo fosforiladas, se observó que la gran mayoría de las proteínas sintetizadas por el oocito estarían a su vez siendo fosforiladas. Lógicamente, este hecho no era lo esperado, ya que se pensaba encontrar una cierta especificidad en cuanto a las proteínas fosforiladas.

Resultados similares se encontraron con vesículas

germinales aisladas, aún cuando pareciera que habrían algunas proteínas en este caso que se fosforilarían preferentemente.

El tratamiento de oocitos con progesterona demostró que producía un aumento general de la fosforilación, tanto en oocitos totales como en vesículas germinales provenientes de células tratadas con hormona. Se alcanzaría un máximo de aumento después de 3 horas de la acción hormonal, lo que coincide con el nivel mínimo de cAMP después del tratamiento con hormona. Podría existir quizás alguna relación entre ambos efectos, pero esto requiere de estudios más detallados y con técnicas de mayor resolución.

Una de las maneras futuras de abordar este fenómeno será el de usar la técnica de electroforesis en geles bidimensionales y además inyectar el nucleótido radiactivo directamente al núcleo, con el objeto de ver los cambios en la fosforilación de estas proteínas in situ.

Los resultados obtenidos con hormonas sobre la síntesis de proteínas y permeabilidad demuestran que existe una gran diferencia en las respuestas de los oocitos si se induce la maduración con hCG o progesterona.

En la literatura se ha descrito que existiría un aumento en la síntesis de proteínas en oocitos de Rana pipiens (55); pero a diferencia de nuestros experimentos, estos resultados se obtuvieron microinyectando el

aminoácido a diferentes tiempos después de la acción de progesterona.

Lo anterior se asemejaría más al experimento realizado en la Figura 50, en el cual se incuban los oocitos por sólo 30 minutos, con aminoácido radiactivo, después de tiempos variables de la acción hormonal. Este resultado demostró que la síntesis de proteínas aumenta alcanzando un máximo a las 7-8 horas después de la acción de progesterona. Experimentos similares han sido descritos recientemente en la literatura y concuerdan plenamente con los resultados aquí mostrados. (66)

El fenómeno anterior no se debería a un aumento en la entrada de aminoácido a la célula causado por progesterona, ya que en numerosos experimentos en que se observó un 100 % de maduración de los oocitos, no hubo un aumento en la radiactividad total del oocito al incubarlo 30 minutos con aminoácido radiactivo después de diferentes tiempos de la acción hormonal.

El análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida no reveló diferencias notables entre las proteínas sintetizadas por oocitos controles o tratados con progesterona a diferentes tiempos de la acción hormonal. Sólo se encontraron diferencias cuantitativas en aquellas electroforesis realizadas con oocitos tratados con hormona, incubados sólo 30 minutos en aminoácido radiactivo.

Resultados que no se muestran, obtenidos en geles de poliacrilamida, revelaron que la marcación de proteínas disminuía notablemente después de 6-8 horas de la acción de progesterona. Esto permitiría suponer una posible inhibición de la síntesis de proteínas después del rompimiento de la vesícula germinal; pero resultados recientes, descritos en la literatura (115) demostraron que, después del rompimiento de la vesícula germinal inducida por la acción de progesterona, se produce una gran disminución de la captación de aminoácido del medio y, por consiguiente, una disminución de su incorporación a proteínas.

Resultados obtenidos a tiempos más tardíos después del tratamiento con hormonas, muestran que los oocitos recuperan la permeabilidad a aminoácidos después de 10-12 horas de la acción de progesterona. Además aparecen notorias diferencias en la velocidad de síntesis de 3-4 proteínas en el oocito después de 18 horas de la acción de esta hormona esteroideal.

En los experimentos realizados con el fin de ver el efecto del núcleo sobre la síntesis de proteínas, se vió que los oocitos anucleados incorporaban el aminoácido radiactivo a las mismas proteínas y con igual velocidad que las células controles. Esto demostraría que, al menos durante 5-6 horas después de la enucleación de los oocitos, éstos mantienen la capacidad total de sintetizar las diferentes proteínas.

Los efectos producidos por hCG son bastante diferentes a los de progesterona en relación a la síntesis de proteínas y entrada de aminoácido. Como se mostró en la Figura 51, esta hormona produce un fuerte estímulo en la entrada de aminoácido que se mantiene al menos por 5 horas. El estímulo de la síntesis de proteínas provocado por hCG es proporcionalmente mayor que el estímulo de captación de aminoácidos, lo que estaría hablando a favor de un estímulo neto de la síntesis de proteínas.

El aumento en la permeabilidad es independiente de síntesis de proteínas, lo que haría pensar que no se requiere de una proteína nueva para producirlo, sino que se debería a la interacción de hCG con las células foliculares. La eliminación de esta capa celular, previa a la adición de la hormona, impide el incremento en la permeabilidad del oocito a aminoácidos.

Las electroforesis realizadas, tanto en geles monodimensionales, demostraron que, igual que con progesterona, hCG produciría sólo un aumento cuantitativo de la síntesis de proteínas en oocitos durante las primeras horas de su acción.

Los datos presentados y discutidos más arriba sobre los cambios moleculares que acompañan la acción hormonal son sin duda incompletos y el tema requiere esclarecer una serie de importantes detalles. De todas maneras los resultados obtenidos en esta tesis y en otros laboratorios nos indican que habrían por lo menos 4 componentes que jugarían papeles fundamentales en el gatillamiento de la maduración: el cAMP, la fosforilación de proteínas, el ión calcio y la síntesis de nuevas proteínas.

Tomando como base lo que se sabe de estos componentes en otros sistemas se podría proponer un modelo en el cual los cuatro componentes estarían relacionados. El modelo postularía que en oocitos crecidos existiría un mRNA que codificaría para una proteína capaz de gatillar la maduración (el factor de maduración o una proteína capaz de inducirlo). Este mRNA no se traduciría espontáneamente porque la maquinaria traductora que estaría en sus inmediaciones (factores de iniciación, ribosomas, etc.) estaría inhibida por la fosforilación de uno de sus componentes en la forma como ocurre en un sistema de reticulocitos en ausencia de hemina según Ochoa (118). La proteína quinasa que bloquearía la traducción de dicho mensajero por su actividad fosforilante, requeriría la constante presencia de niveles altos de cAMP para que su actividad se sobreponga a la acción antagónica de una proteína fosfatasa

que tiende a desfosforilar y por ende a activar la traducción del mRNA en cuestión.

Este esquema postularía que cualquier agente que reduzca los niveles de cAMP en contacto con dicha quinasa, la inhiba o active a la proteína fosfatasa, resultaría en la maduración del oocito.

Algunos de los datos obtenidos calzan con este esquema. Por ejemplo, la reducción de los niveles de cAMP en presencia de progesterona o lantano causan maduración. La inyección de subunidad reguladora que inhibe las proteínas quinasas induce maduración mientras que el aumento de la fosforilación de proteínas por medio de la introducción de subunidad catalítica bloquea la maduración. Se podría explicar que el calcio activaría las fosfodiesterasas de cAMP por medio de la proteína moduladora que liga Ca^{+2} y por lo tanto bajaría los niveles de cAMP lo que favorecería la maduración. Bloqueadores de la fosfodiesterasa de cAMP como la teofilina y papaverina mantienen o elevan los niveles de cAMP y por lo tanto impedirían la maduración e inhibirían la síntesis de proteínas. Obviamente la inhibición de la síntesis proteica bloquearía la maduración aún en presencia de bajas concentraciones de cAMP.

Hay algunos datos sin embargo, que no calzan con el

esquema propuesto y que demuestran que todavía nos falta conocer una serie de variables y de detalles para poder llegar a un modelo coherente sobre el gatillamiento de la maduración. Obviamente la elevación de los niveles de cAMP causados por hCG, hormona que también es capaz de inducir la maduración y según se demostró aún más eficientemente que la progesterona, no apoyan al postulado presentado para explicarlo en este contexto. Habríamos de agregar complicaciones como la separación física o funcional entre el mRNA y su sistema traductor y los sitios del oocito donde el cAMP aumenta a causa del hCG o una activación de la fosfatasa proteica por medio de una fosforilación. Tampoco calzan bien en el esquema el hecho que teofilina y papaverina no resultan en un aumento de la concentración del cAMP total de la célula y sin embargo, impidan la maduración e inhiban el 50 % de la síntesis proteica. Otro detalle que no entra en el esquema es el aumento de la fosforilación que se observa entre las 3 y 5 horas después de la progesterona, período en el cual los niveles de cAMP todavía están bajos. Tendría que postularse que esta fosforilación no sería dependiente de cAMP o un desplazamiento o activación de las proteínas quinasas que estarían presentes en el núcleo. El modelo propuesto podría servir como hipótesis de trabajo para estudios futuros sobre la maduración de los oocitos.

BIBLIOGRAFIA

1. Lane, C.D., Marbaix, G. y Gurdon, J.B. (1971)
J. Mol. Biol. 61, 73
2. Marbaix, G. y Lane, C.D. (1972)
J. Mol. Biol. 67, 517
3. Berns, A.J.M., Kraaikamp, M., Bloemendal, H. y Lane, C.D. (1972)
Proc. Nat. Acad. Sci. 69 1606
4. Stevens, R. y Williamson, A. (1972)
Nature 239, 143
5. Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. y Marbaix, C., (1971)
Nature 233, 177
6. Moar, V.A., Gurdon, J.B., Lane, C.D. y Marbaix, G. (1971)
J. Mol. Biol. 61, 93
7. Laskey, R.A., Gurdon, J.B. y Crawford, L.V. (1972)
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 3665
8. Vassart, G., Lecocq, R.E., Brocas, H. y Dumont, J.E. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 353, 261
9. Vassart, G., Brocas, H., Nokin, P. y Dumont, J.E. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 324, 575
10. Smith, M., Stavnezer, J., Huang, R.C., Gurdon, J.B. y Lane, C.D. (1973)
J. Mol. Biol. 80, 553
11. Knowland, J., (1974) Genetics 78, 383
12. Lane, C.D., Gregory, C.M. y Morel, C. (1973)
Eur. J. Biochem. 34, 219
13. Kindas-Mugge, I., Lane, C.D. y Kreil, G. (1974)
J. Mol. Biol. 87, 451
14. Yip, C.C., Hew, C.L. y Hsu, H. (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 4777
15. Reynolds, F.H., Premkumar, E. y Pitha, P.M. (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 4881

16. Salden, M., Asselberg, F. y Bloemendal, H. (1976)
Nature 259, 696
17. Lanclos, K.D. y Hamilton, T.H. (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3934
18. Vassart, G., Refetoff, S., Brocas, H., Dinsart, C. y
Dumont, J.E. (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3829
19. Lane, C.D. y Knowland, J. (1975)
Biochemistry of Animal Development, Vol. III p. 145-181
Academic Press, Inc. San Francisco
20. Lane, C.D., Morel, C. y Gregory, C.M. (1973)
Eur. J. Biochem. 34, 219
21. Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Leclercq, M., Nudel, V.,
Soreq, H., Salomon, R., Lebleu, B., Revel, M. y
Littauer, V.Z. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3143
22. Marbaix, G., Huez, G., Burny, A., Clenter, Y., Hubert, E.,
Leclercq, M., Chantrenne, H., Soreq, H., Nudel, U. y
Littauer, U.Z. (1975)
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3065
23. Gurdon, J.B., Lingrel, J.B. y Marbaix, G. (1973)
J. Mol. Biol. 80, 539
24. Butterworth, B.E., Hall, L., Stoltzfus, C., y Rueckert, R.R.
(1971)
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 3083
25. Laskey, R.A., Mills, A.D. y Gurdon, J.B. (1976)
EMBO Workshop on Cytoplasmic Control of Eukaryotic Protein
Synthesis, Kings College, Cambridge, England
26. Gurdon, J.B., (1962)
J. Embryol. Exp. Morph. 10, 622
27. Briggs, R., Signoret, J. y Humphrey, R.R. (1964)
Dev. Biol. 10, 233
28. Laskey, R.A. y Gurdon, J.B. (1970)
Nature, 228, 1332
29. Simnett, J.D. (1964)
Dev. Biol. 10, 467
30. McKinnell, R.G., Deggins, B.A. y Labat, D.D. (1969)
Science 165, 394

31. Gurdon, J.B., Laskey, R.A. y Reeves. O.R. (1975)
J. Embryol. Exp. Morph. 34, 93
32. Graham, C.F., Arms, K. y Gurdon, J.B. (1966)
Dev. Biol. 14, 349
33. Gurdon, J.B. (1968)
J. Embryol. Exp. Morph. 20, 401
34. Gurdon, J.B., Borwn, D.D. (1965)
J. Mol. Biol. 12, 27
35. Gurdon, J.B. y Woodland, H.R. (1969)
Proc. Roy. Soc. Lon. B 173, 99
36. Woodland, H.R. y Gurdon, J.B. (1969)
Dev. Biol. 20, 89
37. Brun, R. (1973)
Nature (N.B.) 243, 26
38. Arms, K. (1968)
J. Embryol. Exp. Morph. 20, 367
39. Merriam, R.W. (1969)
J. Cell Sci. 5, 333
40. Gurdon, J.B. (1970)
Proc. Roy. Soc. Lon. B. 176, 303
41. Bonner, W.M. (1975)
J. Cell Biol. 64, 421
42. Bonner, W.M. (1975)
J. Cell Biol. 64, 431
43. Gurdon, J.B., De Robertis, E.M. y Partington, G. (1976)
Nature, 260, 116
44. Gurdon, J.B., Partington, G.A. y De Robertis, E.M. (1976)
J. Embryol. Exp. Morph. 36, 541
45. Gurdon, J.B. (1976)
J. Embryol. Exp. Morph. 36, 523
46. Rugh, R. (1935)
J. Exp. Zool. 71, 149
47. Heilbrunn, L.V., Daugherty, K y Wilbur, K.M. (1939)
Physiol. Zool. 12, 97

48. Ryan, F.J. y Grant, R. (1940)
Physiol. Zool. 13, 383
49. Wright, P.A. (1945)
J. Exp. Zool. 100, 565
50. Dettlaff, T.A. (1966)
J. Embryol. Exp. Morph. 16, 183
51. Brachet, J. (1967)
Exp. Cell Res. 48, 233
52. Schuetz, A.W. (1967)
J. Exp. Zool. 166, 347
53. Merriam, R.W. (1972)
J. Exp. Zool. 180, 421
54. Dettlaff, T.A., Nikitina, A. y Stroeveva, O.G. (1964)
J. Embryol. Exp. Morph. 12, 851
55. Smith, L.D. y Ecker, R.E. (1970)
Current Topics in Dev. Biol. 5, 1
56. Masui, Y. (1967)
J. Exp. Zool. 166, 365
57. Smith, L.D., Ecker, R.E. y Subtelny, S. (1968)
Dev. Biol. 17, 627
58. Schuetz, A.W. (1967)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124, 1307
59. Horton, K.M. (1969)
Amer. Zool. 9, 601
60. Brachet, J., Hanocq, F. y Van Gansen, P. (1970)
Dev. Biol. 21, 157
61. Chieffi, G. y Lupo, C. (1963)
Gen. Com. Endocrinol. 3, 149
62. Redshaw, M.R. y Nicholls, T.J. (1971)
Gen. Com. Endocrinol. 16, 85
63. Subtelny, S., Smith, L.D. y Ecker, R.E. (1968)
J. Exp. Zool. 168, 39
64. Smith, L.D. y Ecker, R.E. (1969)
Dev. Biol. 19, 281

65. Smith, L.D. y Ecker, R.E. (1971)
Dev. Biol. 25, 232
66. Brachet, J., Baltus, E., De Schutter, A., Hanocq, F.,
Hanocq-Quertier, J., Hubert, E., Iacobelli, S. y Steinert, G.
(1974)
Mol. Cell. Biochem. 3, 189
67. Merriam, R.W. (1971)
Exp. Cell Res. 68, 75
68. Ecker, R.E. y Smith, L.D. (1971)
J. Cell Physiol. 77, 61
69. Morrill, G.A. (1965)
Exp. Cell Res. 40, 664
70. Merriam, R.W. (1971)
Exp. Cell Res. 68, 81
71. Reynhout, J.K. y Smith, L.D. (1973)
Dev. Biol. 30, 392
72. Schatz, F. y Morrill, G.A. (1975)
Biol. Reprod. 13, 408
73. Masui, Y. y Markert, C.L. (1971)
J. Exp. Zool. 177, 129
74. Masui, Y. y Markert, C.L. (1971)
J. Exp. Zool. 177, 153
75. Masui, Y. (1973)
Soviet J. Dev. Biol. 3, 484
76. Masui, Y. (1972)
J. Exp. Zool. 179, 365
77. Schorderet-Slatkine y Drury, K.C. (1973)
Cell Differentiation 2, 247
78. Drury, K.C. y Schorderet-Slatkine, S. (1975)
Cell, 4, 259
79. Reynhout, J.K. y Smith, L.D. (1974)
Dev. Biol. 38, 394
80. Briggs, R.T. y King, T.J. (1959)
En "The Cell" (Brachet, J. y Mirsky, eds) Vol. 1, pp 537-
619, Academic Press, New York.

81. Briggs, R.W. y Cassens, G. (1966)
Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 1103
82. Brown, D.D. y Littna, E. (1964)
J. Mol. Biol. 8, 669
83. Brown, D.D. y Littna, E. (1966)
J. Mol. Biol. 20, 81
84. La Marca, M.J., Strobel, M.C., Smith, L.D. y Keem, K. (1975)
Dev. Biol. 47, 384
85. Ecker, R.E. y Smith, L.D. (1971)
Dev. Biol. 24, 559
86. Mc Gaughey, R.W. y Blerkom, J. (1977)
Dev. Biol. 56, 241
87. Brandhorst, B.P. (1976)
Dev. Biol. 52, 310
88. Schultz, R.M. y Wassarman, P.M. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 538
89. Maller, J.L. y Krebs, E.G. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 1712
90. Speaker, M.G. y Butcher, F.R. (1977)
Nature, 267, 848
91. O'Connor, C.M. y Smith, L.D. (1976)
Dev. Biol. 52, 318
92. Dumont, J.N. (1972)
J. Morph. 136, 153
93. Bohme, E. y Schultz, G. (1974)
Methods in Enzymology, Vol. XXXVIII, Hormone Action,
Part C. (Hardman, J.G. y O'Malley) pp. 27-41
94. Gilman, A. (1970)
Proc. Nat. Acad. Sci. . 67, 305
95. Bonner, W.M. y Laskey, R.A. (1974)
Eur. J. Biochem. 46, 83
96. Laskey, R.A. y Mills, A.D. (1975)
Eur. J. Biochem. 56, 335
97. O'Farrell, P.H. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 4007

98. Gurdon, J.B., De Robertis, E.M. y Partington, G. (1976)
Nature, 260, 176
99. Woodland, H.R. y Pestell, R.Q.W. (1972)
Biochem. J. 127, 597
100. Eppig, J.J. y Dumont, J. N. (1972)
Dev. Biol. 28, 531
101. Ecker, R.E. y Smith, L.D. (1968)
Dev. Biol. 18, 232
102. Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M. y Baulieu, E.E.
(1976)
Nature, 262, 289
103. Reynhout, J.K., Taddel, C., Smith, L.D. y La Marca, M.J.
(1975)
Dev. Biol. 44, 375
104. Thronton, V.F. (1971)
Gen. Com. Endocrinol. 16, 599
105. Appleman, M.M., Thompson, W.J. y Russell, T.R. (1973)
Advances in Cyclic Nucleotid Research, Vol. 3 pp. 65
(Greengard, P. y Robinson, P.A., editores)
Raven Press, New York
106. Imai, S. y Takeda, K. (1967)
J. Physiol. 190, 155
107. Busis, N.A. y Weight, F.F. (1976)
Nature, 263, 436
108. Pays-De Schutter, A., Kram, R., Hubert, E., y Brachet, J.
(1975)
Exp. Cell Res. 96, 7
109. Rosen, D. (1970)
Arch. Biochem. Biophys. 137, 435
110. Otero, C., Bravo, R., Paz, B., Rodriguez, C., y
Allende, J.E. (1977)
Dev. Biol. en prensa
111. Horowitz, S.B. y Moore, L.C. (1974)
J. Cell Biol. 60, 405
112. Horowitz, S.B. (1972)
Biol. 54, 600

- 113A. Meister, J. (1973) Science 180, 110
113. Horowitz, S.B. y Fenichel, I.P. (1968)
J. Gen. Physiol. 51, 703-
114. Hallberg, R.L. y Smith, D.C. (1976)
Dev. Biol. 48, 308-
115. Bellé, R., Marot, J. y Ozon, R. (1976)
Biochim. Biophys. Acta. 419, 342
116. Schatz, F. y Morrill, G.A. (1973)
Fifth Int. Congr. Pharm. (Abstract) (Kerger, Basel)
117. Brachet, J., De Schutter, A. y Hubert, F. (1973)
C.R. Acad. Sc. Paris, 277, 2785
118. Datta, A., Haro, C., Sierra, J.M. y Ochoa, S. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 1463
119. Moreau, M., Doree, M. y Perre, G. (1976)
J. Exp. Zool. 197, 443
120. Wasserman, W.J. y Masui, Y. (1975)
J. Exp. Zool. 193, 369
121. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Venishi, K.
y Miyamoto, E. (1975)
Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol. 5
(Drummond, G. y Greengard, P. eds) pág. 163
Raven Press, New York

