

UCH-FC  
DOC-B  
182  
C.1

1

ESTUDIO DE ACTIVIDADES DE ADENILIL-CICLASA EN OVARIO DE  
*Xenopus laevis*

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

Básicas y Farmacéuticas

por

Xavier Sergio Jordana de Buen

Noviembre, 1982

Profesor patrocinante: Dr. Jorge E. Allende

Facultad de Ciencias  
Básicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

I N F O R M E   D E   A P R O B A C I O N

T E S I S   D E   D O C T O R A D O

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

Xavier Sergio Jordana de Buen

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de octubre de 1982.

Patrocinante de Tesis:

Dr. Jorge E. Allende



Comisión Informante de Tesis:

Dr. Jaime Eyzaguirre

Dr. Luis Izquierdo

Dr. Hermann Niemeyer

Dr. Mario Sapag-Hagar



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (Norte) de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge Allende.

A Olguita y Miquel

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Jorge Allende y a la Dra. Catherine Connelly por haberme apoyado y guiado en el desarrollo de esta tesis, contribuyendo con ello a otra etapa de mi formación profesional.

Quiero expresar también mis agradecimientos al Dr. Héctor Torres, a la Dra. Mirtha Flawiá y al Dr. Alberto Kornblihtt por su importante ayuda, especialmente en las primeras etapas de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio, mi gratitud por su apoyo y su calidad humana.

A Carlos Otero, mi reconocimiento por su amistad y por su contribución a este trabajo.

A la Dra. Carmen González, mi agradecimiento por su dedicación en la corrección de esta tesis.

Quiero hacer extensivos mis agradecimientos:

Al Departamento de Bioquímica y a todos sus miembros por las facilidades que no dudaron en darme en todo momento.

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

## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xix
INTRODUCCION .....	1
EL cAMP Y LA MADURACION MEIOTICA DE LOS OOCITOS DE ANFIBIOS .....	1
<i>la maduración meiótica de los oocitos de anfibios</i> ....	1
<i>El cAMP y su relación con la maduración</i> .....	3
PROPIEDADES GENERALES DE LAS ADENILIL-CICLASAS DE TEJIDOS EUCARIOTICOS .....	7
<i>Componentes proteicos de la adenilil-ciclase sensible a hormonas</i> .....	12
<i>Interacción de los componentes proteicos de la adenilil-ciclase sensible a hormonas</i> .....	17
<i>Inhibición hormonal de la adenilil-ciclase</i> .....	20
MATERIALES Y METODOS .....	25
REACTIVOS Y ANIMALES .....	25
PREPARACION Y PURIFICACION DE [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] ATP .....	26
1. <i>Procedimiento de Flawiá y Torres</i> .....	27
2. <i>Procedimiento de Valseth y Johnson</i> .....	28
3. <i>Purificación del [<math>\alpha</math>-<sup>32</sup>P] ATP</i> .....	30
4. <i>Purificación del ATP no radiactivo</i> .....	32
PREPARACION DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD DE ADENILIL-CICLASA .....	34
1. <i>Obtención de ovario de Xenopus laevis</i> .....	34
2. <i>Obtención de folículos, oocitos y células foliculares</i> .....	34

	Pág.
a) Folículos .....	34
b) Oocitos y células foliculares .....	35
b.1 Procedimiento manual .....	35
b.2 Procedimiento enzimático .....	35
3. <i>Fraccionamiento celular</i> .....	37
a) Preparación de enzima de ovario .....	37
b) Preparación de enzima de folículos, oocitos y células foliculares obtenidos por el procedimiento manual .....	38
c) Preparación de enzima de oocitos y células foliculares obtenidos por el procedimiento enzimático .....	39
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL-CICLASA .....	40
TRATAMIENTO DE FRACCIONES PARTICULADAS CON TOXINA DEL COLERA .....	43
DETERMINACION DE PROTEINAS .....	44
RESULTADOS .....	45
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL-CICLASA OBTENIDA DE OVARIO .....	45
1. <i>Fraccionamiento celular</i> .....	45
2. <i>Efectos de fluoruro y GMP.P(NH)P</i> .....	45
a) Efectos de NaF y GMP.P(NH)P en la cinética de la reacción .....	47
b) Efecto de fluoruro en los parámetros cinéticos .....	47
c) Efecto de la concentración de fluoruro .....	50
d) Efecto de la concentración de GMP.P(NH)P .....	52
3. <i>Efecto de la toxina del cólera</i> .....	52
4. <i>Efectos de adenosina y NEM</i> .....	56
5. <i>Actividad de adenilil-ciclase en folículos de diferentes estados de la ovogénesis</i> .....	58
ACTIVIDAD DE ADENILIL-CICLASA EN OOCITOS Y EN CELULAS FOLICULARES .....	60
1. <i>Separación de oocitos y células foliculares por el procedimiento manual</i> .....	61
2. <i>Distribución de la actividad de adenilil-ciclase del folículo en los dos tipos de células</i> .....	68

	Pág.
3. Efectos de fluoruro y de $GMP_0P(NH)P$ en la adenilil-ciclase de células foliculares .....	68
4. Efectos de fluoruro y $GMP_0P(NH)P$ en la adenilil-ciclase de oocitos .....	72
5. Fraccionamiento subcelular de células foliculares y de oocitos .....	74
EFFECTO HORMONAL EN LA ADENILIL-CICLASE DE OOCITOS ...	77
1. Efecto de progesterona y de prostaglandina $E_1$ ...	77
2. Efecto de la concentración de progesterona y especificidad del tejido blanco .....	81
3. Efecto de la progesterona en la adenilil-ciclase de oocitos de diferentes estados de la oogénesis ..	84
CARACTERIZACION DE LA INHIBICION POR PROGESTERONA DE LA ADENILIL-CICLASE .....	91
1. Requerimiento de nucleótidos de guanosina .....	91
2. Efecto de la progesterona en la activación de la adenilil-ciclase por $GMP_0P(NH)P$ .....	95
a) Efecto de la progesterona en la cinética de activación por $GMP_0P(NH)P$ .....	95
b) Efecto de la progesterona en la activación de la adenilil-ciclase por concentraciones crecientes de $GMP_0P(NH)P$ .....	100
3. Efectos de $GDPBS$ en la activación por $GMP_0P(NH)P$ y en la inhibición por progesterona de la adenilil-ciclase de oocitos .....	106
EFFECTO DE DROGAS ANTISICOTICAS EN LA ADENILIL-CICLASE DE OOCITOS .....	113
1. Efecto de diferentes drogas antisicóticas .....	113
2. Efecto de la concentración de CAPP .....	115
3. Efecto de CAPP en la actividad de adenilil-ciclase medida en presencia de diferentes efectores ..	117
DISCUSION .....	119
CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ACTIVIDADES DE ADENILIL-CICLASE DE OVARIO DE <i>Xenopus laevis</i> .....	119
1. localización subcelular .....	119
2. Efectos de fluoruro y de $GMP_0P(NH)P$ .....	121
a) Efecto de fluoruro .....	121

	Pág.
b) Efecto de GMP.P(NH)P .....	122
3. Efecto de la toxina del cólera .....	124
4. Presencia de la subunidad reguladora G/F .....	125
EFFECTO HORMONAL EN LA ADENILIL-CICLASA DE OOCITOS .....	127
1. Inhibición por progesterona .....	127
2. Mecanismo de la inhibición por progesterona .....	129
a) Requerimiento de nucleótidos de guanosina .....	129
b) Efecto de la progesterona en la activación de la adenilil-ciclase por GMP.P(NH)P .....	132
c) Otros posibles mecanismos de inhibición de la adenilil-ciclase de oocitos por progesterona ....	137
i) Participación de adenosina .....	137
ii) Participación de calcio y calmodulina .....	139
3. Efecto de la progesterona en la adenilil-ciclase de oocitos de diferentes estados de la oogénesis .....	144
CONCLUSIONES .....	147
APENDICE .....	149
BIBLIOGRAFIA .....	152

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades de los componentes proteicos del sistema de adenilil ciclasa sensible a hormonas .....	14
Tabla 2. Actividad de adenilil ciclasa en diferentes fracciones obtenidas de ovario de <i>Xenopus laevis</i> .....	46
Tabla 3. Efecto de la toxina del cólera en la actividad de adenilil ciclasa .....	55
Tabla 4. Efectos de adenosina y NEM sobre la actividad de adenilil ciclasa .....	57
Tabla 5. Localización celular de la actividad de adenilil ciclasa .....	69
Tabla 6. Efecto de GMP.P(NH)P y NaF en la adenilil ciclasa de células foliculares .....	70
Tabla 7. Efecto de GMP.P(NH)P y NaF en la adenilil ciclasa de oocitos .....	73
Tabla 8. Distribución de las actividades de adenilil ciclasa de oocitos y de células foliculares en diferentes fracciones subcelulares .....	76
Tabla 9. Ausencia de efecto de Prostaglandina E <sub>1</sub> sobre la adenilil ciclasa de oocitos .....	80
Tabla 10. Efecto de la progesterona sobre la adenilil ciclasa de oocitos de diferentes estados de la oogénesis .....	86
Tabla 11. Requerimiento de nucleótidos de guanosina para la inhibición por progesterona de la adenilil ciclasa de oocitos .....	92
Tabla 12. Efecto de la toxina del cólera en la inhibición por progesterona de la adenilil ciclasa de oocitos .....	94

	Pág.
Tabla 13. Efecto de GDPβS en la activación por GMP <sub>o</sub> P(NH)P y en la inhibición por progesterona de la adenilil ciclasa de oocitos .....	107
Tabla 14. Efecto de GDPβS en la activación por GMP <sub>o</sub> P(NH)P y en la inhibición por progesterona de la adenilil ciclasa de oocitos .....	108
Tabla 15. Efecto de drogas antisicóticas en la adenilil ciclasa de oocitos .....	114
Tabla 16. Efecto de CAPP en la actividad de adenilil ciclasa de oocitos medida en presencia de diferentes efectores .....	118

## LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

		Pág.
Esquema I.	Modelo del mensajero intracelular, o segundo mensajero, en la acción hormonal ..	4
Esquema II.	Modelo propuesto por Cassel y Selinger para explicar la activación de la adenilil ciclasa por hormonas, GMP <sub>o</sub> P(NH)P y toxina del cólera .....	11
Esquema III.	Mecanismo general de regulación de la adenilil ciclasa .....	134
Figura 1.	<i>Cinética de la reacción de formación de cAMP.</i>	48
Figura 2.	<i>Efecto de fluoruro en los parámetros cinéticos .....</i>	49
Figura 3.	<i>Efecto de la concentración de fluoruro ....</i>	51
Figura 4.	<i>Efecto de la concentración de GMP<sub>o</sub>P(NH)P ..</i>	53
Figura 5.	<i>Actividad de adenilil ciclasa en folículos de diferentes estados de la ovogénesis .....</i>	59
Figura 6.	<i>Folículos controles .....</i>	62
Figura 7.	<i>Folículos tratados .....</i>	64
Figura 8.	<i>Oocitos desfoliculados .....</i>	66
Figura 9.	<i>Efecto de la concentración de GMP<sub>o</sub>P(NH)P en la adenilil ciclasa de células foliculares ..</i>	71
Figura 10.	<i>Efecto de la progesterona en la adenilil ciclasa de oocitos .....</i>	79
Figura 11.	<i>Efecto de la concentración de progesterona sobre las adenilil ciclasas de oocitos y de células foliculares .....</i>	82

	Pág.
Figura 12. Efecto de la concentración de progesterona sobre las adenilil ciclasas de oocitos de diferentes estados de la oogénesis .....	88
Figura 13. Efecto de la progesterona en la cinética de activación de la adenilil ciclase de oocitos por $GMP_0P(NH)P$ .....	97
Figura 14. Efecto de la progesterona sobre la adenilil ciclase de oocitos preactivada por $GMP_0P(NH)P$ .....	101
Figura 15. Efecto de la concentración de $GMP_0P(NH)P$ sobre la actividad de adenilil ciclase de oocitos .....	102
Figura 16. Efecto de la concentración de $GMP_0P(NH)P$ sobre la actividad en estado estacionario de la adenilil ciclase de oocitos .....	103
Figura 17. Efectos de $GDPBS$ y progesterona sobre la adenilil ciclase de oocitos .....	112
Figura 18. Efecto de la concentración de $CAPP$ en la actividad de adenilil ciclase de oocitos ..	116
Figura 19. los seis estados de la oogénesis en <i>Xenopus laevis</i> .....	150

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	:	Adenosina 5 <sup>1</sup> -difosfato
AMP o 5 <sup>1</sup> -AMP	:	Adenosina 5 <sup>1</sup> -monofosfato
3 <sup>1</sup> -AMP	:	Adenosina 3 <sup>1</sup> -monofosfato
AMP cíclico o cAMP	:	Adenosina 3 <sup>1</sup> ,5 <sup>1</sup> -monofosfato cíclico
ATP	:	Adenosina 5 <sup>1</sup> -trifosfato
ATPasa	:	ATP fosfohidrolasa
CAPP	:	2-cloro-10-(3-aminopropil)fenotiazina
cpm	:	cuentas por minuto
DTT	:	Ditiotreitol
EDTA	:	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	:	Acido etilenglicol-bis-(β-aminoetileter) N,N'-tetraacético
GDP	:	Guanosina 5 <sup>1</sup> -difosfato
GDPβS	:	Guanosina 5 <sup>1</sup> -[β-tio]difosfato
GMP·P(CH <sub>2</sub> )P	:	Guanosina 5 <sup>1</sup> -[β-γ-metilen] trifosfato
GMP·P(NH)P	:	Guanosina 5 <sup>1</sup> -[β-γ-imido] trifosfato
GTP	:	Guanosina 5 <sup>1</sup> -trifosfato
GTPasa	:	GTP-fosfohidrolasa
GTPβS	:	Guanosina 5 <sup>1</sup> -[β-tio]trifosfato
GTPγS	:	Guanosina 5 <sup>1</sup> -[γ-tio]trifosfato
IBMX	:	3-isobutil-1-metilxantina

NAD <sup>+</sup>	:	Nicotinamida adenina dinucleótido
NEM	:	N-etilmaleimida
PEP	:	Fosfoenolpiruvato
PGE <sub>1</sub>	:	Prostaglandina E <sub>1</sub>
Pi	:	Fosfato
POPOP	:	1,4-bis 2-(5-feniloxazolil)benceno
PPi	:	Pirofosfato
PPO	:	2,5-difeniloxazol
TCA	:	Acido tricloroacético
Tris	:	Tris-(hidroximetil)-aminometano

## RESUMEN

La progesterona induce la maduración meiótica de los oocitos de anfibios por un mecanismo que difiere en importantes aspectos del mecanismo general propuesto para la acción de las hormonas esteroidales. La progesterona actúa sobre la membrana externa del oocito, y sus efectos no requieren de activación génica. Además, se ha observado que la progesterona provoca una disminución de los niveles intracelulares de cAMP en el oocito, existiendo una buena correlación entre este hecho y la inducción de la maduración. Todos estos hechos sugieren que la hormona podría actuar sobre la adenilil-ciclase de los oocitos.

En este trabajo de tesis se caracterizó la actividad de adenilil-ciclase presente en el ovario de *Xenopus laevis*, y se estudiaron los efectos de progesterona sobre la enzima de los oocitos.

La actividad de adenilil-ciclase se encontró asociada a fracciones particuladas preparadas a partir de homogeneizados de ovario, células foliculares u oocitos de diferentes estados de la ovogénesis. La actividad obtenida de cualquiera de estas fuentes fue fuertemente estimulada por Naf y por GMP.P(NH)P (análogo del GTP resistente a la acción de GTPasas). La actividad enzimática de fracciones particuladas obtenidas de ovario y de oocitos fue también fuertemente estimulada por GTP cuando estas fracciones

fueron previamente tratadas con toxina del cólera en presencia de  $\text{NAD}^+$ . La actividad basal de adenilil-ciclase también aumentó cuando se reemplazó el  $\text{Mg}^{+2}$  por  $\text{Mn}^{+2}$ . Estas características de las adenilil-ciclasas del tejido ovárico de *Xenopus laevis* son similares a las de las adenilil-ciclasas de otros sistemas. Las adenilil-ciclasas de oocitos y de células foliculares poseerían una subunidad regulatoria funcionalmente equivalente a la subunidad G/F descrita en otros sistemas. Esta subunidad media las activaciones por fluoruro, toxina del cólera y nucleótidos de guanosina.

Se estudió el efecto de la progesterona en la adenilil-ciclase de oocitos, encontrándose que la hormona inhibe a la enzima en forma saturable y reversible. Este efecto es además esteroide-específico ya que sólo los análogos esteroidales que inducen la maduración fueron capaces de inhibir a la adenilil-ciclase de oocitos. La inhibición de esta enzima por progesterona es también tejido-específica ya que la adenilil-ciclase de las células foliculares no fue afectada por la progesterona.

Los estudios realizados para comprender el mecanismo de acción de la progesterona sobre la adenilil-ciclase de los oocitos indican que el efecto hormonal requiere de la presencia de nucleótidos de guanosina. La inhibición por progesterona se observó cuando la enzima fue activada por GTP o por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ , pero no cuando la enzima fue activada por fluoruro o  $\text{Mn}^{+2}$ . El hecho de que la progesterona inhibe a la adenilil-ciclase de oocitos en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  indicaría que la progesterona no actúa activando

a una GTPasa, como ha sido descrito en la inhibición de la adenilil-ciclase de otros sistemas por agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos y opiáceos. Al estudiar la activación de la adenilil-ciclase de oocitos por GMP.P(NH)P, se encontró que la activación ocurre después de un período inicial de latencia. La progesterona alargó esta latencia. Esto, unido al hecho de que la progesterona no inhibió la formación de cAMP cuando fue agregada una vez que la enzima estaba activada por GMP.P(NH)P, indica que la hormona actuaría inhibiendo la activación de la adenilil-ciclase por la subunidad G/F. La progesterona podría actuar dificultando el intercambio de GDP por GTP o GMP.P(NH)P en G/F. Esta hipótesis es compatible con los resultados que se obtuvieron al estudiar los efectos de GDPBS, un análogo de GDP, sobre la inhibición por progesterona de la adenilil-ciclase de oocitos. El efecto hormonal fue potenciado por GDPBS.

Las drogas antisicóticas (derivados de fenotiazina y de butirofenona) parecen afectar la regulación de la adenilil-ciclase de oocitos mediante la subunidad G/F. Estas drogas inhibieron la activación de la adenilil-ciclase por GMP.P(NH)P, y estimularon la activación de la enzima por fluoruro. Estos efectos resultaron ser independientes de  $Ca^{+2}$ . El efecto de estas drogas sería diferente del de la progesterona ya que ésta no afecta a la activación de la adenilil ciclase por fluoruro.

La adenosina inhibió la actividad de adenilil-ciclase obtenida de ovario, pero este efecto sería diferente del de la progesterona puesto que se observó en presencia de  $Mn^{+2}$ .

Al estudiar la adenilil-ciclasa de oocitos de diferentes estados de la oogénesis, se determinó que la actividad de adenilil-ciclasa del oocito aumenta considerablemente durante la oogénesis. Es interesante destacar que hay además un aumento de la respuesta de la enzima a GMP.P(NH)P. Los oocitos más pequeños, que no son capaces de madurar en presencia de progesterona, poseen una adenilil-ciclasa que es inhibida por las mismas concentraciones de progesterona que inhiben a la enzima de los oocitos crecidos. Sin embargo, el grado de inhibición máximo es menor en el caso de los oocitos pequeños.

Los resultados de esta tesis indican que la inhibición de la adenilil-ciclasa de los oocitos por progesterona es probablemente un evento necesario y de gran importancia en la compleja cascada de reacciones que llevan a la maduración de estas células.

## ABSTRACT

Progesterone induces the meiotic maturation of amphibian oocytes through a mechanism that differs in important aspects from the accepted model for steroid hormone action. Progesterone acts on the external oocyte membrane and its effects are not mediated by gene activation. These findings, together with the observation that a decrease in the intracellular concentration of cAMP follows progesterone treatment of oocytes and the correlation of the change in cyclic nucleotide levels with the induction of maturation, suggested that the hormone might be acting on oocyte adenylate cyclase.

This thesis describes the characterization of the adenylate cyclase present in the ovary of *Xenopus laevis* and studies the effects of progesterone on the enzyme obtained from the oocytes of this amphibian.

Adenylate cyclase activity was found in a particulate fraction of ovarian homogenates and also in similar preparations of follicle cells and of oocytes at different stages of oogenesis.

Enzyme from these sources was greatly stimulated by NaF and by GMP.P(NH)P, a GTPase resistant analog of GTP. The enzyme activity from ovary and oocytes was also stimulated by GTP when the membrane preparations had been previously treated with cholera

toxin in the presence of  $\text{NAD}^+$ . The basal activity of adenylate cyclase was also enhanced by replacing  $\text{Mn}^{+2}$  for  $\text{Mg}^{+2}$ . These characteristics indicate that the adenylate cyclase of ovarian tissues of *Xenopus laevis* is similar to the enzymes described from other sources and that the amphibian enzyme must have a regulatory subunit functionally similar to the G/F subunit described in other systems. This subunit is responsible for the stimulation by guanine nucleotides and fluoride ion and is the site of action of cholera toxin.

Progesterone inhibits the adenylate cyclase of oocytes in a saturable and reversible manner and this inhibition is hormone specific as it is only observed with steroid analogs that can induce maturation. Progesterone inhibition is also tissue specific as shown by the fact that the adenylate cyclase of the follicle cells which encircle the oocyte is not affected by the hormone.

Studies on the mechanism of inhibition of adenylate cyclase by progesterone indicate that the action of the hormone requires the presence of guanine nucleotides since it is observed with the enzyme stimulated by GTP or by  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  but not with the enzyme activated by fluoride or  $\text{Mn}^{+2}$ . The inhibition obtained in the presence of  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  indicates that progesterone does not act through an activation of GTPase as has been described for  $\alpha$ -adrenergic effectors and opiates which inhibit the adenylate cyclase of other systems. Progesterone causes a lengthening of the lag period observed in the reaction catalyzed by the enzyme in the

presence of  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . This effect, together with the observation that progesterone does not inhibit the formation of cAMP if it is added 10 minutes after the start of the reaction, indicate that the hormone probably acts by inhibiting the activation of adenylate cyclase by the G/F subunit. This inhibition may be a result of a lowering of the rate of exchange of GDP for GTP or its analog  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . Support for this idea is found in experiments that demonstrate that the GDP analog  $\text{GDP}\beta\text{S}$  potentiates the inhibition by progesterone.

Phenothiazine derivatives and other antipsychotics affect the regulation of oocyte adenylate cyclase by the G/F subunit as deduced from the fact that they inhibit the stimulation by  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  and stimulate the activation by fluoride. This effect is not mediated by  $\text{Ca}^{+2}$  and differs from the inhibition by progesterone which does not alter the fluoride activation.

Ovarian adenylate cyclase is also inhibited by adenosine but this inhibition is observed with  $\text{Mn}^{+2}$  and therefore is also different from the progesterone effect.

The activity of oocyte adenylate cyclase increases considerably during the different stages of oogenesis. It is interesting that this increase is accompanied by an increment in the response of the G/F subunit to  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . The smaller oocytes which cannot be induced to mature by progesterone have adenylate cyclase that can be inhibited by the same progesterone concentrations as that effective for full-grown oocytes. However,

the maximum inhibition obtained with the smaller oocytes is only of 30% while that of full-grown cells reaches 60%.

The findings described in this thesis indicate that the inhibition of adenylate cyclase by progesterone is probably a primary event in the complex cascade of reactions leading to the induction of meiotic maturation in these cells.

## INTRODUCCION

EL CAMP Y LA MADURACION MEIOTICA DE LOS OOCITOS DE ANFIBIOS.

*la maduración meiótica de los oocitos de anfibios.*

La maduración de los oocitos de *Xenopus laevis* y de otros anfibios ha sido utilizada como modelo para el estudio de la acción de hormonas y de la regulación post-transcripcional de la síntesis de proteínas. En anfibios, los oocitos entran en meiosis durante el desarrollo larval, pero antes de iniciarse el crecimiento de los oocitos la meiosis se detiene en la profase de la primera división meiótica. En el animal adulto, y después de un período de crecimiento, el oocito crecido puede madurar por acción de hormonas hipofisarias, transformándose en un huevo apto para ser fecundado. La maduración es entonces el proceso por el cual los oocitos avanzan desde la profase de la primera división meiótica hasta la metafase de la segunda división meiótica (ref.en Masui y Clarke, 1979). Puede ser inducida in vitro con folículos aislados incubados con extractos hipofisarios, gonadotrofina coriónica, hormona luteinizante, o también con algunas hormonas esteroidales como progesterona, desoxicorticosterona y testosterona (ref.en Masui y Clarke, 1979). El mecanismo molecular de la maduración no ha sido del todo esclarecido, pero las pruebas indican que las gonadotrofinas actuarían sobre las células foliculares que rodean al oocito, induciendo en ellas la síntesis de esteroides como la progesterona. La progesterona así formada

actuaría directamente sobre el oocito, induciendo su maduración (ref. en Masui y Clarke, 1979).

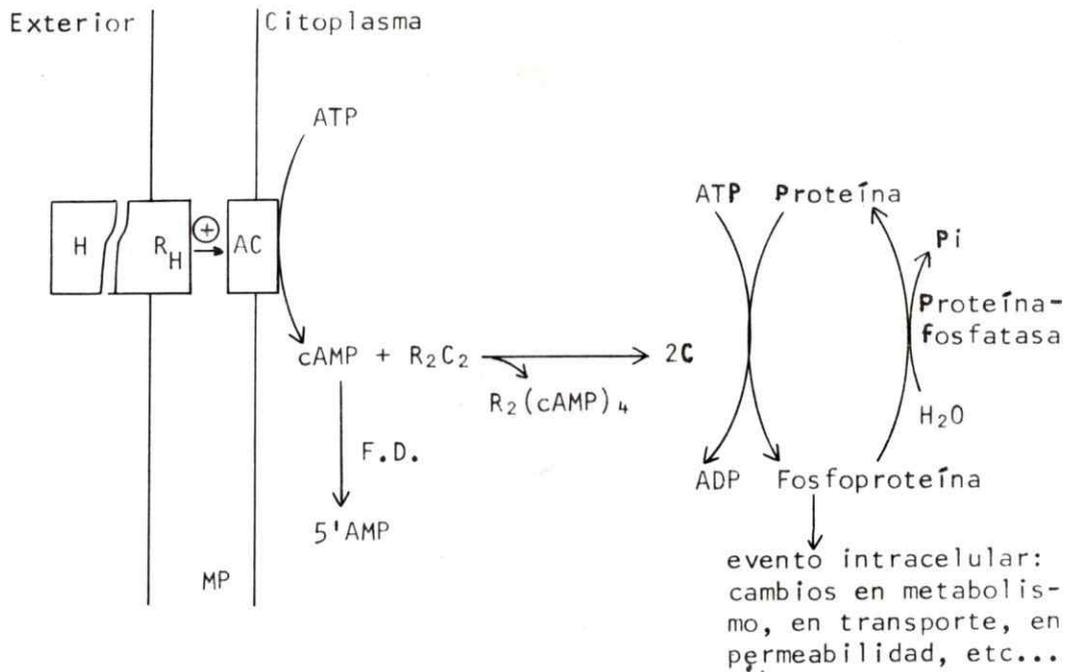
El mecanismo de acción de la progesterona en la inducción de la maduración de los oocitos de anfibios difiere en varios aspectos importantes del mecanismo general de acción propuesto para las hormonas esteroideas en otros tejidos (ref. en Yamamoto y Alberts, 1976). Este último comprende la entrada de la hormona esteroidal a la célula, su unión a un receptor citoplasmático específico, y la acción de este complejo hormona-receptor a nivel de la cromatina, modificando la transcripción de ciertos genes. Como primera diferencia, es necesario destacar que la maduración puede ser inducida por progesterona en presencia de inhibidores de la transcripción. Por otro lado se ha demostrado la aparición de muchas características bioquímicas y celulares de la maduración en oocitos anucleados tratados con progesterona, lo que confirma que la acción de esta hormona no requiere de expresión génica (ref. en Masui y Clarke, 1979). La segunda diferencia importante reside en el hecho de que la inducción de la maduración por progesterona requiere de la interacción de la hormona con la superficie del oocito, ya que se puede inducir la maduración con progesterona unida covalentemente a ciertos polímeros que le impiden penetrar en el oocito (Ishikawa y col., 1977; Baulieu y col., 1978; Goddeau y col., 1978). En cambio, si se microinyecta la hormona al oocito no se induce la maduración (Drury y Schorderet-Slatkine, 1975). Recientemente se ha descrito la unión por fotoafinidad de un análogo de progesterona a un receptor localizado en la superficie de los oocitos de *Xenopus laevis*, siendo las propiedades de este receptor

compatibles con su participación en la maduración (Sadler y Maller, 1982). El hecho, tan novedoso para una hormona esterooidal, de que ésta actúe por fuera, en la membrana externa de la célula blanco, hace necesaria la postulación de un mensajero intracelular capaz de mediar los efectos de la hormona. En los últimos años se han acumulado bastantes pruebas en favor de una participación del AMP cíclico (cAMP) en el proceso de maduración inducido por progesterona.

*El cAMP y su relación con la maduración.*

El cAMP es el mensajero intracelular que media los efectos biológicos de una serie de hormonas polipeptídicas y de tipo amina que interactúan con receptores específicos de la membrana plasmática de las células de diferentes tejidos. La mayoría de estas hormonas modifican la concentración intracelular de cAMP regulando la síntesis de cAMP (esquema 1).

El cAMP es sintetizado a partir de ATP en una reacción catalizada por la adenilil-ciclasa, y es degradado a AMP (5'AMP) por fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. Los efectos del cAMP en eucariontes están mediados por proteína-quinásas dependientes de cAMP. Estas enzimas transfieren el grupo fosfato terminal del ATP a los residuos serina o treonina de proteínas, alterando la función o actividad catalítica de éstas. Las proteína-quinásas dependientes de cAMP están constituidas por subunidades regulatorias y subunidades catalíticas, siendo la holoenzima inactiva. El cAMP activa a la enzima porque se une a las subunidades regulatorias y disocia a éstas de las subunidades catalíticas, las que libres son



Esquema 1. Modelo del mensajero intracelular, o segundo mensajero, en la acción hormonal.

H = hormona; R<sub>H</sub> = receptor; AC = adenilil-ciclasa; F.D. = fosfodiesterasa de cAMP; ⊕ = activación; R<sub>2</sub>C<sub>2</sub> = proteína-quinasa dependiente de cAMP (holoenzima), en que R es la subunidad regulatoria y C la subunidad catalítica; MP = membrana plasmática.

activas y catalizan la reacción de fosforilación de proteínas (esquema 1) (Rubin y Rosen, 1975; Beavo y col., 1975). La reversibilidad del proceso se produce por desfosforilación de las proteínas fosforiladas, reacción que es catalizada por fosfoproteína-fosfatasa.

Hay una serie de pruebas en favor de la participación del cAMP en la inducción de la maduración de los oocitos de anfibios por progesterona:

a) La progesterona produce una disminución transitoria en los niveles de cAMP de los oocitos poco después de iniciada la incubación con hormona (Speaker y Butcher, 1977; Morril y col., 1977; Bravo y col., 1978; Maller y col., 1979).

b) Inhibidores de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos agregados al medio de incubación inhiben la maduración de los oocitos inducida por progesterona, e impiden la disminución de los niveles de cAMP inducida por hormona (Morril y col., 1977; Marrot y col., 1977; Bravo y col., 1978).

c) El cAMP agregado al medio de incubación retarda la maduración inducida por progesterona (Bravo y col., 1978).

d) La toxina del cólera, conocido activador de la adenililciclase, produce un aumento de los niveles intracelulares de cAMP en el oocito e inhibe la maduración inducida por progesterona; esta inhibición ocurre sólo en las etapas tempranas de la maduración (Schorderet-Slatkine y col., 1978; Mulner y col., 1979; Maller y col., 1979).

e) La maduración es inducida, en ausencia de progesterona,

por la inyección al oocito de la subunidad regulatoria de las proteína-quinasa dependientes de cAMP o de un inhibidor termoestable de las proteína-quinasa que se combina con la subunidad catalítica, inactivándola (Maller y Krebs, 1977; Huchon y col., 1981); además, la maduración inducida por progesterona es inhibida si en etapas tempranas se inyecta la subunidad catalítica de las proteína-quinasa dependientes de cAMP (Maller y Krebs, 1977).

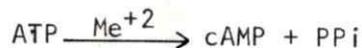
f) La maduración inducida por progesterona o por inyección del inhibidor termoestable de las proteína-quinasa es inhibida si se inyecta en etapas tempranas un inhibidor puro de una fosfoproteína-fosfatasa (fosfoproteína fosfatasa 1) (Huchon y col., 1981a).

Todas estas pruebas son compatibles con la hipótesis de que la maduración está asociada a un menor grado de fosforilación de una o más proteínas. La hormona gatillarfa la maduración induciendo una caída de los niveles de cAMP, lo que llevarfa a una reasociación de las subunidades regulatorias y catalíticas de las proteína-quinasa dependientes de cAMP. Esto tendrfa como consecuencia una disminución de la actividad fosforilante de éstas, lo que, de mantenerse las actividades fosfatásicas, resultaría en la disminución del grado de fosforilación de una o más proteínas (Bravo y col., 1978; Huchon y col., 1981b). Esta (s) proteína (s) fosforiladas mantendrfa bloqueada la síntesis de un factor promotor de maduración (MPF) a nivel traduccional, y su desfosforilación resultaría en la síntesis de MPF, el que por un mecanismo no conocido aún inducirfa la maduración del oocito (Bravo y col., 1978; Huchon y col., 1981).

De todo lo expuesto parece evidente la importancia del estudio de la relación entre las enzimas encargadas de la síntesis y degradación del cAMP, y el proceso de maduración. La actividad de fosfodiesterasa de cAMP ha sido estudiada in vivo e in vitro por el grupo de Allende (Allende y col., 1977), pero hasta el momento no se ha podido establecer una relación entre la actividad de estas enzimas y la inducción hormonal de la maduración. Estos resultados, unidos al hecho de que la progesterona actuaría en la superficie externa de la célula, y de que la adenilil-ciclase está generalmente localizada en la membrana plasmática de las células, hicieron pensar en que la progesterona podría actuar inhibiendo a la adenilil-ciclase. Los resultados de esta tesis (Jordana y col., 1981a; Jordana y col., 1981b; Jordana y col., 1982), así como los resultados de otros grupos (Mulner y col., 1979; Sadler y Maller, 1981; Finidori-Lepicard y col., 1981; Sadler y Maller, 1982), apoyan la idea de que la inhibición de la adenilil-ciclase por progesterona es al menos parte del mecanismo fisiológico por el cual la hormona induce la maduración de los oocitos.

#### PROPIEDADES GENERALES DE LAS ADENILIL-CICLASAS DE TEJIDOS EUCARIOTICOS.

La adenilil-ciclase (ATP: pirofosfato-liasa (ciclante) E.C.4.6.1.1) es la enzima que cataliza la síntesis de cAMP según la reacción:



Los sustratos de esta reacción pueden ser los complejos  $\text{Mg ATP}^{-2}$  o  $\text{Mn ATP}^{-2}$ , y los cationes divalentes  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  actúan como activadores de la misma (Bradham y Cheung, 1982).

Tres revisiones recientes resumen la mayor parte de las propiedades y características moleculares conocidas de la adenilil-ciclase (Ross y Gilman, 1980; Limbird, 1981; Bradham y Cheung, 1982).

La adenilil-ciclase de células eucarióticas está en general localizada en la membrana plasmática. Su actividad es regulada por hormonas u otros efectores que al unirse a receptores específicos de membrana la activan o la inhiben. Los efectos hormonales se observan también en membranas aisladas, son reversibles, saturables, y en general las concentraciones de hormona requeridas para modificar la actividad de adenilil-ciclase son similares a las necesarias para observar la respuesta fisiológica.

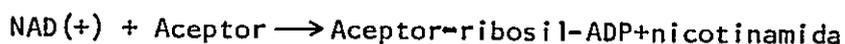
La actividad de la adenilil-ciclase es también afectada por los siguientes modificadores:

a) El ión fluoruro: a concentraciones entre 1 y 25 mM es un activador de casi todas las adenilil-ciclasas estudiadas; su efecto no está relacionado con su capacidad de inhibir ATPasas y su mecanismo de acción no es conocido.

b) Nucleótidos de guanosina: son indispensables para la estimulación o inhibición de la adenilil-ciclase por hormonas; análogos de GTP resistentes a la hidrólisis catalizada por GTPasas, tales como  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ ,  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , y  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{CH}_2)\text{P}$ , activan a la enzima en ausencia

de otros modificadores; la activación por estos análogos muestra latencia, y el estado activado es sólo lentamente reversible. Además, los nucleótidos de guanosina (GTP, GTPyS, GMP·P(NH)P) disminuyen la afinidad de las hormonas (agonistas), y no de los antagonistas, por sus receptores.

c) Toxina del cólera: es un activador potente de la enzima en células intactas y en preparaciones aisladas de membranas. Esta toxina (colerágeno) es secretada por *Vibrio cholerae* y es la responsable de los síntomas clínicos del cólera. El colerágeno es una proteína oligomérica, constituida por dos subunidades proteicas A y B. La subunidad B participa en la unión de la toxina a la membrana plasmática de la célula, la subunidad A se separa y se disocia por reducción de puentes disulfuro en dos polipéptidos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, siendo el péptido A<sub>2</sub> el que activa en definitiva a la adenilil-ciclase. Esta subunidad activa de la toxina tiene actividad de adenosina-difosfato ribosil-transferasa, es decir es capaz de catalizar la siguiente reacción (llamada comúnmente ADP-ribosilación):



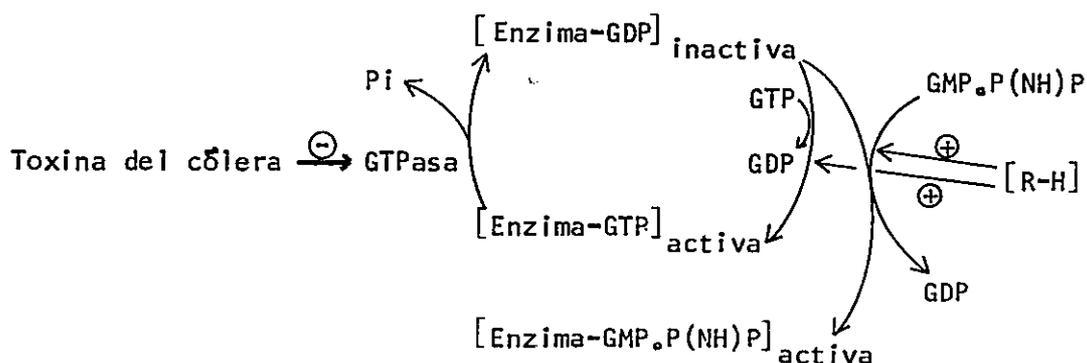
La activación de la adenilil-ciclase por la toxina del cólera en preparaciones aisladas de membranas requiere de la presencia de NAD(+), y hay una buena correlación entre el grado de ADP-ribosilación de un polipéptido de peso molecular entre 42.000 y 45.000, presente en las membranas de diversos tejidos, y el grado de activación de la adenilil-ciclase. Cuando las membranas son tratadas con toxina del cólera, la actividad basal de adenilil-ciclase de

estas membranas no se modifica (Birnbaumer y cols., 1980), pero la enzima es activada fuertemente por GTP, el que se hace a veces tan efectivo como sus análogos no hidrolizables.

Muy importante para la comprensión del mecanismo de activación de la adenilil-ciclase por hormonas y toxina del cólera fue el descubrimiento en membranas de eritrocitos de pavo de una GTPasa asociada a la adenilil-ciclase. Esta GTPasa era inhibida por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  y por toxina del cólera (en presencia de  $\text{NAD}(+)$ ) en una forma en que la inhibición de la GTPasa se correlacionaba con la activación de la adenilil-ciclase y con la ADP-ribosilación del péptido de 42.000 de peso molecular (Cassel y Selinger, 1977; Gill y Meren, 1978).

El hecho de que el GTP es necesario para la estimulación hormonal, y de que tanto el  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  como la toxina del cólera activan a la adenilil-ciclase en forma estable, hizo postular a Cassel y Selinger (1977) un modelo en el cual el estado activo de la adenilil-ciclase es el complejo de ésta con GTP; la inactivación de la enzima se debería a la hidrólisis del nucleótido por una GTPasa asociada a la adenilil-ciclase. El complejo hormona-receptor activaría a la enzima acelerando el recambio del GDP por GTP (esquema II). El  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  y la toxina del cólera mantendrían a la enzima activa, ya que inhibirían la reacción de inactivación.

Se han descrito GTPasas asociadas a adenilil-ciclasas en eritrocitos de rana, en páncreas e hígado de rata, en células



Esquema II. Modelo propuesto por Cassel y Selinger para explicar la activación de la adenilil-ciclasa por hormonas, GMP·P(NH)P y toxina del cólera.

H=hormona; R=receptor; ⊕ es estimulación; ⊖ es inhibición.

mononucleares humanas, en un híbrido de neuroblastoma y glioma, y en plaquetas humanas (Lambert y col., 1979; Pike y Lefkowitz, 1980; Kimura y Shimada, 1980; Bitonti y col., 1980; Koski y Klee, 1981; Aktories y Jakobs, 1981).

Una serie de otras pruebas apoyan este modelo:

a) Si se incuban membranas de eritrocitos de pavo con  $[^3\text{H}]\text{-GTP}$ , el principal nucleótido liberado es  $[^3\text{H}]\text{-GDP}$ , y su liberación es facilitada por catecolaminas (Cassel y Selinger, 1977, 1978).

b) El GDPβS, análogo del GDP que no es degradado por nucleotidasas de membrana ni es fosforilado por los sistemas regeneradores de ATP usados en el ensayo de adenilil-ciclasa, es un inhibidor competitivo de la activación por GTP de diversas adenilil-ciclasas

(en algunos casos el GTP activa en ausencia de otros modificadores, en otros casos requiere de la presencia de hormona o de la preactivación de la adenilil-ciclase con toxina del cólera) (Eckstein y col., 1979; Svoboda y col., 1980; Ezra y Salomon, 1981). Además, en la adenilil-ciclase de ovario de rata se encontró que la hormona acelera la inhibición por GDPβS de la actividad medida en presencia de GTP, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que la hormona acelera el intercambio de nucleótidos de guanosina (Ezra y Salomon, 1981).

Entre las pruebas que apoyan el modelo del esquema II se citó el que los complejos Enzima-GMP.P(NH)P y Enzima-GTP (en membranas tratadas con toxina del cólera) son estables a la dilución y al lavado de las membranas. Sin embargo, esto no quiere decir que la formación de estos complejos sea irreversible. En el caso de la enzima tratada con toxina del cólera y activada por GTP, el GDP inhibe a la enzima (Birnbaumer y col., 1980); en el caso de la enzima preactivada con GMP.P(NH)P, la desactivación por GTP o GDP requiere de la presencia de hormona, lo que apoya también la idea de que la hormona promueve el intercambio de nucleótidos de guanosina (Limbird, 1981).

#### *Componentes proteicos de la adenilil-ciclase sensible a hormonas.*

Estudios realizados en los últimos años, y reunidos en una revisión del tema realizada por Ross y Gilman (1980), han demostrado que la adenilil-ciclase sensible a hormonas está compuesta al menos por tres subunidades proteicas: una subunidad catalítica (C)

que es relativamente inactiva y no presenta propiedades regulatorias; una proteína reguladora que une nucleótidos de guanosina (G/F) y media la acción del fluoruro y de estos nucleótidos en la enzima, y uno o más receptores hormonales (R). Estos componentes sólo pueden ser extraídos de la membrana con el uso de detergentes, y sus propiedades se resumen en la tabla 1.

La separación física del receptor y de la adenilil-ciclase fue lograda por primera vez en el sistema sensible a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos de eritrocitos de rana (Limbird y Lefkowitz, 1977). Estos autores separaron ambas entidades por cromatografía de exclusión molecular de un extracto de membranas preparado con digitonina. También se han separado los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de la adenilil-ciclase por centrifugación en gradientes de concentración de sacarosa y por cromatografía de afinidad para los receptores (Ross y Gilman, 1980). Otro receptor que ha sido al menos parcialmente resuelto de la adenilil-ciclase es el receptor hepático de glucagón (Welton y col., 1977).

La resolución de la proteína reguladora de nucleótidos de guanosina G/F y de la proteína catalítica C se ha obtenido por dos vías:

a) Resolución física: fue lograda por primera vez por el grupo de Pfeuffer. La adenilil-ciclase solubilizada de eritrocitos de paloma ya no responde a hormonas  $\beta$ -adrenérgicas pero es activada por fluoruro y  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . Pfeuffer (1977) pudo separar esta enzima solubilizada en dos fracciones por cromatografía

TABLA 1

Propiedades de los componentes proteicos de la adenilil-ciclase  
sensible a hormonas

---

Receptor hormonal (R):

- contiene el sitio de unión de la hormona en la cara extracelular de la membrana plasmática
- existen uno o más diferentes tipos de receptores por célula blanco

Proteína catalítica (C):

- su actividad con MgATP como sustrato es inferior al 10% de la actividad con MnATP como sustrato
- su actividad no es estimulada por hormonas, fluoruro, toxina del cólera o nucleótidos de guanosina
- está ausente en ciertos clones de un hepatoma (HTC)
- su actividad es sensible a calentamiento suave y a bajas concentraciones de reactivos para grupos sulfhidrilos (NEM)

Proteína reguladora (G/F):

- confiere a C la capacidad de usar MgATP como sustrato
- media la regulación de C por fluoruro, nucleótidos de guanosina, toxina del cólera, y por el complejo hormona-receptor
- une nucleótidos de guanosina y fluoruro
- contiene un péptido de peso molecular entre 42.000 y 45.000 cuya ADP-ribosilación es catalizada por la toxina del cólera
- está ausente en células de la variante AC- del linfoma S49
- es más estable al calor y a los reactivos para grupos sulfhidrilos que C.

de afinidad en agarosa sustituida con GTP. La fracción no retenida (C) poseía poca actividad de adenilil-ciclase, y no era estimulada por NaF o  $\text{GMP}_\bullet\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . La fracción retenida G/F podía ser eluida con  $\text{GMP}_\bullet\text{P}(\text{NH})\text{P}$  o GTP, no poseía actividad de adenilil-ciclase, pero al combinarse con la fracción no retenida le confería actividad en presencia de  $\text{GMP}_\bullet\text{P}(\text{NH})\text{P}$  o fluoruro. Además se encontró que el péptido de peso molecular 42,000, cuya ADP-ribosilación es catalizada por la toxina del cólera, se retenía también en la agarosa-GTP, y que este péptido era capaz de unir covalentemente un derivado de GTP fotoactivable (Pfeuffer, 1977; Cassel y Pfeuffer, 1978). G/F y C también han sido separados por otras métodos en preparaciones de cerebro bovino y de hígado de conejo (Strittmatter y Neer, 1980; Ross, 1981).

b) Resolución funcional: en células de un linfoma (S49), el aumento intracelular de cAMP producido por isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) o por toxina del cólera tiene un efecto citotóxico. Se han seleccionado variantes de estas células que son resistentes a los efectos citotóxicos de isoproterenol, y la adenilil-ciclase de algunas de estas variantes no responde a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. La variante  $\text{AC}^-$  (o  $\text{cyc}^-$ ) carece de actividad de adenilil-ciclase medida con MgATP como sustrato, posee actividad con MnATP como sustrato pero la actividad no es estimulada por fluoruro,  $\text{GMP}_\bullet\text{P}(\text{NH})\text{P}$ , toxina del cólera (tampoco hay ADP-ribosilación del péptido de peso molecular 42.000 mediada por esta toxina) o isoproterenol (a pesar de que hay receptores

$\beta$ -adrenérgicos). La actividad con MgATP como sustrato, así como la activación por fluoruro, GMP.P(NH)P, toxina del cólera e isoproterenol dependen de la presencia del componente G/F, ausente en las células AC<sup>-</sup>. La actividad dependiente de Mg, y las consiguientes activaciones, pueden ser reestablecidas si se suplementan las membranas de la variante AC<sup>-</sup> con extractos de membranas de células normales (células de linfoma S49, eritrocitos o células de hígado) solubilizadas con detergentes y en los que la actividad de adenilil-ciclase ha sido eliminada. Estos extractos aportarían el componente G/F al sistema de reconstitución, mientras que las membranas de la variante AC<sup>-</sup> aportarían el componente C. En el sistema reconstituido la toxina del cólera cataliza la ADP-ribosilación del péptido de peso molecular 42.000.

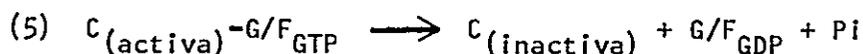
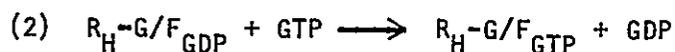
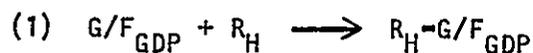
La proteína catalítica C no está bien caracterizada por cuanto es muy lábil una vez que ha sido solubilizada con detergentes. La proteína reguladora G/F ha sido purificada casi hasta homogeneidad a partir de membranas de hígado de conejo, confirmando que forma parte de ella el péptido cuya ADP-ribosilación es catalizada por la toxina del cólera (Northup y col., 1980; Sternweis y col., 1981). También se ha purificado bastante la proteína reguladora G/F de membranas de eritrocitos de pavo (Hansky y col., 1981). Es importante destacar que en estos estudios se ha demostrado que las proteínas reguladoras G/F de diferentes fuentes son funcionalmente equivalentes, y por lo tanto pueden ser intercambiadas.

*Interacción de los componentes proteicos de la adenilil-ciclase sensible a hormonas.*

La activación o inhibición de la adenilil-ciclase por hormonas supone la interacción del receptor hormonal con la adenilil-ciclase. Esta interacción podría ser permanente, pero es poco probable que así sea si se toma en cuenta el hecho de que por ejemplo en adipocitos ocho hormonas diferentes actúan sobre la misma adenilil-ciclase, y todas a través de sus receptores específicos.

Basándose en los conceptos de fluidez y naturaleza dinámica de las membranas celulares, se ha propuesto que el receptor y la adenilil-ciclase serían entidades móviles en la membrana, y que sería la hormona la que promovería su encuentro. En apoyo de esta hipótesis, Schramm y colaboradores demostraron que era posible acoplar receptores  $\beta$ -adrenérgicos de una célula con la adenilil-ciclase de otra célula por fusión de ambas células (Orly y Schramm, 1976; Schramm y col., 1977; Schulster y col., 1978).

A base del modelo de Cassel y Selinger ya descrito y a las pruebas en su favor, Pfeuffer (1979), Ross y Gilman (1980) y Limbird (1981) propusieron un modelo muy similar para la activación de la adenilil-ciclase por una hormona. Este modelo toma en consideración la resolución de los componentes proteicos de la adenilil-ciclase, la necesidad de la proteína reguladora G/F como factor de acoplamiento entre la hormona y la adenilil-ciclase, y las pruebas recientes de interacción entre el receptor y la proteína reguladora, y entre ésta y la proteína catalítica:



La hormona H (agonista  $\beta$ -adrenérgico) es capaz de promover en membranas de eritrocitos de rana y de reticulocitos de rata la formación de un complejo entre el receptor (R) y la proteína reguladora (G/F) (reacción 1) (Limbird y Lefkowitz, 1978; Limbird y col., 1980). Esto tendría como consecuencia el intercambio de GDP por GTP en el sitio del nucleótido en G/F (modelo de Cassel y Selinger, reacción 2) y la disociación del complejo entre R y G/F, que es promovida por GTP y GMP<sub>3</sub>P(NH)P (reacción 3) (Limbird y Lefkowitz, 1978; Limbird y col., 1980). El componente G/F con GTP unido se asociaría a la proteína catalítica inactiva (C), activándola (reacción 4), ya que Pfeuffer demostró que el GTP $\gamma$ S, y no el GDP, promueve la formación de un complejo activo estable entre G/F y C (Pfeuffer, 1979). Finalmente, la enzima sería inactivada por acción de la GTPasa, que al hidrolizar al GTP promovería además la disociación del complejo G/F-C (reacción 5).

Una serie de pruebas relativamente indirectas apoyaban la hipótesis de que la misma proteína reguladora G/F se unía al receptor y a la proteína catalítica, mediando los efectos de los

nucleótidos de guanosina en la unión de la hormona a su receptor y en la activación de la adenilil-ciclase. Esto fue directamente demostrado por Stadel y col. (1981), quienes encontraron que sólo formando el complejo R-G/F por incubación de las membranas con la hormona (reacción 1), es posible retener a G/F en una agarosa sustituida con aglutinina de germen de trigo (una glicoproteína, y por lo tanto al receptor  $\beta$ -adrenérgico, que tiene esta estructura). G/F puede ser eluido con GTP $\gamma$ S, que disocia al complejo G/F-R (reacciones 2 y 3), y el eluido activa a la proteína catalítica C (reacción 4). Por otra parte, Citri y Schramm (1980) demostraron que G/F de eritrocitos de pavo podía ser preactivado en presencia sólo del receptor, la hormona y GMP.P(NH)P (reacciones 1 a 3), y que este G/F preactivado era capaz a su vez de activar a C en ausencia de hormona (reacción 4).

Hay que destacar que la estequiometría de los componentes de la adenilil-ciclase no es conocida, y que el modelo propuesto descansa casi exclusivamente en el conocimiento de la adenilil-ciclase sensible a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos de eritrocitos, reticulocitos y células del linfoma S49. Tampoco está claro cuál es la etapa limitante en el proceso de activación hormonal de la adenilil-ciclase, habiéndose propuesto tanto la disociación del GDP o el intercambio de GDP por GTP (Cassel y Selinger, 1977; Ross y Gilman, 1980; Limbird, 1981), como una isomerización (cambio conformacional) posterior a la unión del nucleótido a su sitio (Birnbaumer y col., 1980; Iyengar y col., 1980a). Lo que sí parece claro es que la

etapa limitante es previa a la asociación entre la proteína reguladora activada y la proteína catalítica (Strittmatter y Neer, 1980).

En realidad, no es posible descartar el que los componentes moleculares de la adenilil-ciclase formen algún tipo de complejo en la membrana en ausencia de hormona, pero la adición de ésta debería en este caso estabilizar las interacciones en una secuencia similar a la descrita en las reacciones 1 a 5, haciéndolas resistentes a la solubilización de las membranas con detergentes.

#### *Inhibición hormonal de la adenilil-ciclase.*

Los sistemas de adenilil-ciclase que son inhibidos por hormonas o neurotransmisores han sido menos estudiados y están menos caracterizados que los sistemas estimulados por hormonas. Sin embargo, es un campo que está en rápido crecimiento y que ha sido abordado en revisiones recientes (Limbird, 1981; Cooper, 1982).

Algunos ejemplos de inhibición de adenilil-ciclase son: inhibición por opioides, agonistas colinérgicos muscarínicos y  $\alpha$ -adrenérgicos en células híbridas de neuroblastoma y glioma (NG 108-15); inhibición por adenosina, prostaglandina  $E_1$  ( $PGE_1$ ) y ácido nicotínico en adipocitos; inhibición por opioides en hipocampo y cuerpo estriado; inhibición por agonistas colinérgicos muscarínicos en miocardio de mamíferos, etc...

Las características generales de los sistemas de inhibición de adenilil-ciclase son (Limbird, 1981; Cooper, 1982):

a) Los ligandos inhibitorios, hormonas y neurotransmisores, disminuyen la actividad basal o estimulada por hormona de adenilil-

ciclase en un 40-60% (nunca la inhibición es total); cuando varios ligandos inhibitorios actúan en una misma célula, sus efectos en la adenilil-ciclase no son aditivos.

b) El GTP (y no el GDP) es requerido para la inhibición. Además el GTP reduce la afinidad del agonista inhibitorio por su receptor.

c) La inhibición de la adenilil-ciclase no es observada en presencia de  $\text{GMP}_\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  aunque éste afecta la unión del ligando inhibitorio a su receptor.

d) En algunos sistemas la inhibición de la adenilil-ciclase depende de la presencia de  $\text{Na}^+$ , pero en otros sistemas la inhibición es independiente de  $\text{Na}^+$  (Cooper, 1982); por ejemplo es necesaria su presencia en la inhibición por opioides, agonistas muscarínicos colinérgicos y  $\alpha$ -adrenérgicos de la enzima de células híbridas de neuroblastoma y glioma, pero no es requerido ni tiene efecto en la inhibición por agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos de la enzima de plaquetas humanas; sin embargo, parecería que este catión modifica la afinidad de los agonistas por su receptor en todos los sistemas estudiados.

e) La activación de la adenilil-ciclase por toxina del cólera impide en algunos casos, pero no en otros, la inhibición de la enzima por hormonas o neurotransmisores.

El mecanismo de la inhibición y la estructura molecular de estos sistemas de inhibición de la adenilil-ciclase no son conocidos.

En algunos casos, por ejemplo en adipocitos de rata, la adenilil-ciclase es regulada por GTP en forma bifásica; la actividad es estimulada a concentraciones bajas ( $10^{-7}M$ ) del nucleótido y es inhibida a concentraciones más altas ( $10^{-6}$  a  $10^{-5}M$ ). El ión  $Na^+$  revierte el efecto inhibitorio de GTP, y el efecto de ciertos ligandos inhibitorios (como adenosina por ejemplo) sólo se observa en presencia de GTP y  $Na^+$ . Cooper (1982) ha propuesto que los ligandos inhibitorios actuarían antagonizando el efecto estimulador de  $Na^+$  y permitiendo la expresión de la inhibición por GTP. También a base de la regulación bifásica de estos sistemas por GTP, se ha postulado la existencia de dos proteínas reguladoras diferentes dependientes de nucleótidos de guanosina: G/F, la que mediaría los efectos de las hormonas activadoras de la adenilil-ciclase, y G/Fi (Ni), la que mediaría los efectos de los ligandos inhibitorios (Cooper y col., 1979; Rodbell, 1980; Cooper, 1982). Las pruebas son sólo indirectas: a) ciertos tratamientos ( $Mn^{+2}$  en el ensayo, activación con toxina del cólera) eliminan la fase inhibitoria del GTP y la inhibición por adenosina de la adenilil-ciclase de adipocitos; b) un tratamiento con ácido p-hidroximercurifenilsulfónico elimina la fase estimuladora del GTP sin afectar la inhibición de la adenilil ciclase por GTP y adenosina (Cooper y col., 1979). Sin embargo, estas pruebas no son concluyentes, y bien podrían las diferencias deberse a la asociación de una misma proteína reguladora con diferentes receptores, o al comportamiento diferencial de la proteína reguladora frente a concentraciones de GTP diferentes (Limbird, 1981).

En otros sistemas la inhibición de adenilil-ciclase por hormonas o por neurotransmisores ocurre pese a que el GTP no es inhibitorio a ninguna concentración. Por ejemplo, en células del híbrido de neuroblastoma y glioma (NG 108-15) y en plaquetas humanas, la actividad de adenilil-ciclase estimulada por GTP en presencia de prostaglandina  $E_1$  es inhibida por opioides o agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos. En islotes de páncreas, la adenilil-ciclase es estimulada por GTP, y mientras mayor es este estímulo, mayor es la inhibición de la adenilil-ciclase por adrenalina (Katada y Ui, 1981). Estos resultados indican que al menos en estos sistemas los ligandos inhibitorios podrían afectar el acoplamiento del receptor, la proteína reguladora G/F, y la proteína catalítica C, sin necesidad de postular una proteína reguladora inhibitoria diferente (Ni).

Experimentos recientes parecen indicar que el mecanismo de inhibición de la adenilil-ciclase por ligandos unidos a receptores específicos consiste en una activación de la GTPasa asociada a la adenilil-ciclase, es decir, en una aceleración de la reacción de desactivación propuesta en el modelo de Cassel y Selinger. Además del hecho de que en presencia de GMP $\cdot$ P(NH)P no se observa inhibición hormonal de la adenilil-ciclase, Koski y Klee (1981) y Aktories y Jacobs (1981) observaron que las GTPasas de membranas de células NG 108-15 y de plaquetas humanas son activadas por opioides y epinefrina respectivamente, a través de los mismos receptores que median la inhibición de la adenilil-ciclase por estos ligandos. Además en las células NG 108-15 tanto la estimulación de

la GTPasa, como la inhibición de la adenilil-ciclasa, requieren la presencia de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, es difícil explicar de acuerdo con este mecanismo el que en algunos sistemas, incluidos el de plaquetas y el de NG 108-15, la toxina del cólera no elimine la inhibición producida por la hormona o el neurotransmisor (Cooper, 1982).

De acuerdo con todos los antecedentes expuestos, los objetivos principales de esta tesis fueron:

1. caracterizar las actividades de adenilil-ciclasa presentes en membranas de oocitos y de células foliculares del ovario de *Xenopus laevis*; estudiar el efecto de fluoruro, de nucleótidos de guanosina y de toxina del cólera sobre las actividades basales.
2. estudiar la regulación por progesterona de la adenilil-ciclasa de oocitos; medir el efecto de la progesterona sobre la actividad de adenilil-ciclasa determinada en presencia de diferentes modificadores de ésta; proponer un posible mecanismo de acción de la hormona; relacionar el efecto de la progesterona sobre la adenilil-ciclasa y la maduración de los oocitos inducida por la hormona.

## MATERIALES Y METODOS

### REACTIVOS Y ANIMALES.

Adenosina, AMP, 3<sup>1</sup>-AMP, cAMP, ADP, ATP, colagenasa (tipo Ia), dimetilsulfóxido, Dowex 50x4 (200-400 mallas), DTT, EDTA, EGTA, espermina, fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (de corazón bovino, 0,2 U/mg de proteína), fosfocreatina, fosfoenolpiruvato, α-D(+)-glucosa, GMP·P(NH)P, GTP, hexoquinasa (tipo C-302 de levadura), imidazol (grado I), 3-isobutil-1-metilxantina, 2<sup>1</sup>,3<sup>1</sup>-isopropilidén-adenosina, mioquinasa (grado V de músculo porcino), piruvato-quinasa (tipo II de músculo de conejo), POPOP, PPO, prostaglandina E<sub>1</sub> y toxina del cólera fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. 3-fosfogliceraldehído-deshidrogenasa (de levadura), L-α-fosfoglicerol-deshidrogenasa (de músculo de conejo), lactato-deshidrogenasa (de corazón porcino), piruvato-quinasa (de músculo de conejo) y fosfotriosa-isomerasa (de músculo de conejo) fueron obtenidas de Boehringer Manheim en forma de suspensiones en sulfato de amonio. También fueron obtenidos de Boehringer Manheim nucleasa P<sub>1</sub>, NAD<sup>+</sup> y GDPβS. L-α-fosfoglicerol (grado A), creatina-fosfoquinasa (grado A, de músculo de conejo), NEM (grado B), progesterona y seroalbúmina de bovino fueron adquiridos en Calbiochem Behring Corp. Glicerol y sacarosa fueron obtenidos de J.T. Baker Chemical Co.; acetonitrilo, tricloroacetonitrilo y trietilamina de Aldrich Co.; alúmina neutra para cromatografía,

ácido acético, etanol, metanol, ácido clorhídrico y placas cromatográficas de polietilén-iminocelulosa de E. Merck A.G. Darmstadt; DEAE-Sephadex A-25 de Pharmacia Fine Chemicals. Piruvato de sodio y polinucleótido-quinasa (de *E. Coli* infectada con fago T<sub>4</sub>) fueron obtenidos de PL-Biochemicals; papel cromatográfico de DEAE-celulosa (DE-81) fue adquirido en Whatman Biochemicals, y las sales inorgánicas se obtuvieron de Mallinckrodt, Merck, Baker, May & Baker y Sigma.

[2,8-<sup>3</sup>H] cAMP (32 Ci/mmol) y <sup>32</sup>Pi ("carrier free", en HCl diluido) fueron obtenidos de New England Nuclear o de The Radiochemical Center, Amersham.

CAPP fue recibida del Psychopharmacology Research Branch, National Institute of Mental Health, NIH, Bethesda, Md, USA; flufenazina y penfluridol fueron obtenidos respectivamente de Schering Co. y de Janssen Chemicalien.

Las hembras adultas de *Xenopus laevis* fueron adquiridas en South African Snake Farm., Cape Province, R.S.A., y mantenidas en tanques a 22° con períodos constantes de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

#### PREPARACION Y PURIFICACION DE [α-<sup>32</sup>P]ATP.

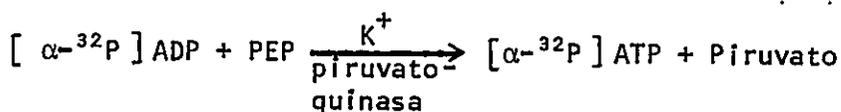
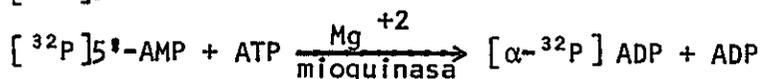
Inicialmente se usó el método de Flawiá y Torres (1972), que comprende la síntesis química de [<sup>32</sup>P]5'-AMP. Luego se usó el método de Walseth y Johnson (1979), en cuyo caso la síntesis de [α-<sup>32</sup>P] ATP comprende sólo etapas enzimáticas. Este método, descrito más recientemente en la literatura, tiene un mejor rendimiento.

1. Procedimiento de Flaviá y Torres (1972).

Involucra dos etapas principales:

a) Síntesis química de  $[^{32}\text{P}] 5^{\text{f}}\text{-AMP}$  por esterificación de la  $2^{\text{f}}, 3^{\text{f}}$ -isopropilidén-adenosina en el hidroxilo de la posición  $5^{\text{f}}$  con  $^{32}\text{Pi}$ , y posterior hidrólisis ácida del grupo isopropilideno.

b) Síntesis enzimática del  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$  a partir de  $[^{32}\text{P}] 5^{\text{f}}\text{-AMP}$ :



En primer lugar, se evaporaba a sequedad en un evaporador rotatorio la solución en ácido clorhídrico de  $\text{H}_3 \text{ } ^{32}\text{PO}_4$  (50 mCi); el residuo se disolvía en 3 ml de agua, agregándose 3  $\mu\text{moles}$  de ácido fosfórico no radiactivo, se volvía a evaporar a sequedad y a disolver el residuo en agua. Este procedimiento se repetía tres veces con el objeto de eliminar por completo el HCl en que viene el  $^{32}\text{Pi}$ . Después de la última evaporación se agregaban 20 mg de  $2^{\text{f}}, 3^{\text{f}}$ -isopropilidén-adenosina (70  $\mu\text{moles}$  aproximadamente), y el contenido se secaba con acetonitrilo en una línea de vacío (Greenless y Symons, 1966). Una vez obtenido un residuo totalmente seco se realizaba la síntesis química, para lo cual se agregaban 3,2 ml de dimetilsulfóxido (solvente), 20  $\mu\text{l}$  de tricloroacetonitrilo (agente condensante) y 25  $\mu\text{l}$  de trietilamina (catalizador). Se cerraba herméticamente el balón de reacción y se incubaba a  $37^{\circ}$  por 30 minutos. Luego se agregaban 5 ml de ácido acético 5N, y se calentaba a  $100^{\circ}$  por una hora el balón

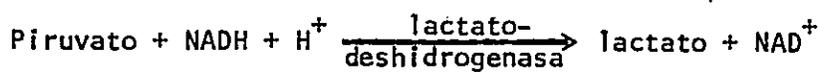
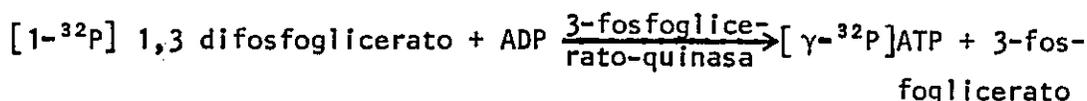
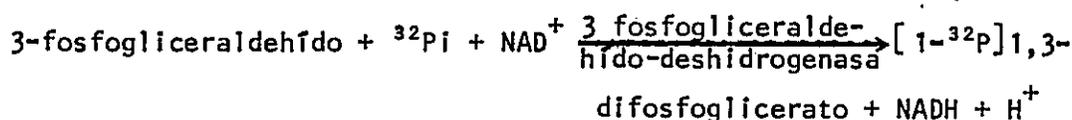
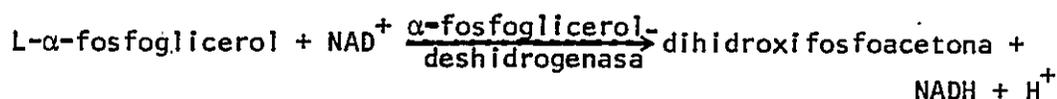
destapado. Al cabo de ese tiempo, el contenido del balón se evaporaba a sequedad, el residuo se resuspendía en 3 ml de agua y se evaporaba nuevamente a sequedad. Este último procedimiento se repetía cuatro veces. El sedimento, ( $[^{32}\text{P}]5^{\text{f}}\text{-AMP}$ ) se incubaba durante 30 minutos a  $37^{\circ}$  en una mezcla cuyo volumen total era de 3,2 ml, y que tenía la siguiente composición: amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7,4;  $\text{MgCl}_2$  15 mM; KCl 100 mM; ATP 0,16 mM; PEP 7,5 mM; piruvato-quinasa 60  $\mu\text{g/ml}$  (40 unidades) y mioquinasa 60  $\mu\text{g/ml}$  (250 unidades). La reacción se detenía por calentamiento a  $100^{\circ}$  durante tres minutos.

Con este método, alrededor de un 40% de la radiactividad se incorpora en ATP.

## 2. Procedimiento de Walseth y Johnson.

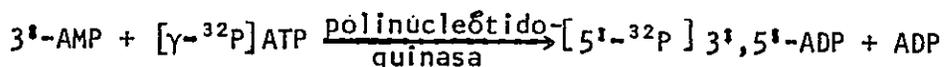
En este método tanto la síntesis de  $[^{32}\text{P}]5^{\text{f}}\text{-AMP}$  como su transformación en  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  son enzimáticas, de acuerdo con el siguiente esquema general de reacciones:

### a) Síntesis de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ :



b) Obtención de  $[^{32}\text{P}]5^{\prime}\text{-AMP}$ :

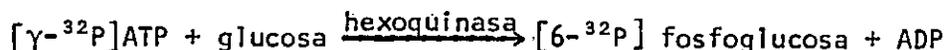
b.1. fosforilación del  $3^{\prime}\text{-AMP}$  en el hidroxilo de la posición  $5^{\prime}$ :



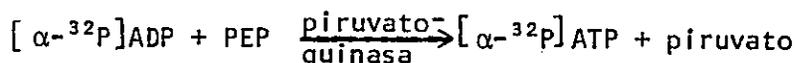
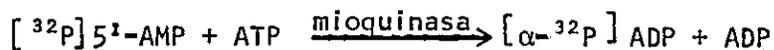
b.2. eliminación del grupo fosfato de la posición  $3^{\prime}$ :



b.3. eliminación del exceso de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  que no reaccionó en b.1.:



c) Síntesis de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ :



El procedimiento experimental era el siguiente: la solución en HCl de  $^{32}\text{P}_i$  (50 mCi) se neutralizaba con NaOH 2N. La etapa (a) de síntesis de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  se realizaba por incubación del  $^{32}\text{P}_i$  a  $30^{\circ}$  por una hora en un medio con la siguiente composición: Tris-HCl 80 mM; pH 9,0; DTT 10 mM;  $\alpha\text{-L}$ -fosfoglicerol 0,2 mM;  $\text{NAD}^+$  0,8 mM;  $\text{MgCl}_2$  20 mM; ADP 0,08 mM; piruvato de sodio 1,7 mM (recién preparado); fosfoglicerol-deshidrogenasa 14  $\mu\text{g/ml}$  (0,8 unidades); fosfotriosa-isomerasa 140  $\text{ng/ml}$  (0,7 unidades); 3-fosfogliceraldehído-deshidrogenasa 14  $\mu\text{g/ml}$  (1,1 unidades); 3-fosfoglicerato-quinasa 1,4  $\mu\text{g/ml}$  (0,6 unidades) y lactato-deshidrogenasa 7,0  $\mu\text{g/ml}$  (3,5 unidades). El volumen total era de 1,0 ml. Las enzimas, suspendidas en sulfato de amonio, se mezclaban previamente en la proporción adecuada, se centrifugaban a 1.000xg por diez minutos y el residuo se resuspendía en Tris-HCl 50 mM; pH 9,0; DTT 1 mM, y se agregaba a la mezcla de reacción.

La reacción se detenía por calentamiento a  $100^{\circ}$  durante dos minutos.

Luego se agregaban 40  $\mu$ l de espermina 0,1 M, 60  $\mu$ l de  $3^{\text{H}}$ -AMP 50 mM, 30 unidades de polinucleótido-quinasa (10  $\mu$ l) y se incubaba la mezcla por cuatro horas a  $35^{\circ}$  (etapa b.1). A continuación se agregaban 50  $\mu$ l de solución amortiguadora de acetato de sodio 1 M pH 5,5 y 50  $\mu$ l de nucleasa  $P_1$  (50 unidades), y se incubaba la mezcla por una hora a  $33^{\circ}$  (etapa b.2). La reacción se detenía por calentamiento a  $100^{\circ}$  durante dos minutos. Se agregaban luego 20  $\mu$ l de glucosa 60 mM y 6  $\mu$ l de hexoquinasa (2 unidades), y se incubaba a  $35^{\circ}$  por una hora (etapa b.3). Para la última etapa (c), se mezclaban 15 unidades de piruvato-quinasa y 120 unidades de mioquinasa, suspendidas ambas en sulfato de amonio, se centrifugaba a 1.000xg por diez minutos y el residuo se resuspendía en una mezcla que contenía 40  $\mu$ l de KCl 2M, 75  $\mu$ l de PEP 0,1 M, 2  $\mu$ l de ATP 40,8 mM, 75  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,4 y 100  $\mu$ l de agua bidestilada. Esta mezcla era agregada a la mezcla total de reacción, y se incubaba a  $35^{\circ}$  durante una hora más (etapa c). La reacción se detenía por calentamiento a  $100^{\circ}$  durante tres minutos.

Con este método alrededor de un 80 a 90% de la radiactividad se incorpora en ATP.

### 3. Purificación del $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.

El  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP sintetizado por cualquiera de los métodos descritos se purificaba por cromatografía en una columna de DEAE-Sephadex A-25 (9 cm de altura por 1 cm de diámetro) previamente equilibrada con  $\text{NaHCO}_3$  1 M y lavada con agua. La columna se eluía con un

gradiente continuo de bicarbonato de trietilamina, pH 7,5, entre 0 y 1M (volumen total de 200 ml). Se recogían fracciones de aproximadamente 7 ml y una alícuota de cada fracción se colocaba sobre un filtro de fibra de vidrio; los filtros se secaban y contaban en un contador de centelleo líquido con 3 ml de mezcla de centelleo (4g de PPO y 80 mg de POPOP por litro de tolueno). Se juntaban las fracciones correspondientes al último pico de radiactividad, que eran las que contenían al  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (este eluye a una concentración aproximada de bicarbonato de trietilamina de 0,60 a 0,75 M), y se llevaban a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo se resuspendía en 5 ml de metanol, y se llevaba nuevamente a sequedad. Esta operación se repetía dos veces y por último el  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  se resuspendía en un volumen apropiado de  $\text{H}_2\text{O}$ . En el producto final, alrededor de un 95% de la radiactividad está en ATP, siendo los principales contaminantes ADP (3 a 4%) y AMP (1%).

La determinación de la pureza radiactiva del  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , del rendimiento de la incorporación de radiactividad en ATP, y la caracterización del compuesto presente en cada uno de los picos radiactivos de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-25 se realizaban por uno de los dos métodos siguientes:

a) Cromatografía ascendente en papel de DEAE-celulosa (DE-81), usando como solvente formiato de amonio 0,6 M, pH 3,1. El largo de la corrida era de 20 cm.

b) Cromatografía ascendente en placas de polietilén-iminocelulosa: se realizaba una primera corrida hasta 6 cm del origen usando

como solvente formiato de sodio 2 M, pH 3,5, y luego una segunda corrida hasta 20 cm del origen, usando como solvente formiato de sodio 4 M, pH 3,5 (entre ambas corridas no es necesario secar las placas).

Las posiciones de patrones de AMP, ADP, ATP, 3'-AMP y 3',5'-ADP se determinaban mediante la absorción de luz ultravioleta de onda corta. La radiactividad asociada a cada trozo del cromatograma se analizaba colocando cada trozo seco en 3 ml de la mezcla de centelleo y usando un contador de centelleo. El método a) era más lento (corrida de aproximadamente 3 horas) pero la resolución que se obtenía era muy buena (Rf de aproximadamente 0,1 para el ATP, 0,4 para el ADP, 0,6 para el Pi y 0,7 para el AMP). El método b) era más rápido (corrida de aproximadamente 1,5 horas) pero los nucleótidos difundían, siendo sus posiciones menos definidas (Rf de aproximadamente 0,3 para el ATP, 0,4 a 0,5 para el ADP y el 3',5'-ADP, 0,6 para el 3'-AMP y 0,7 para el 5'-AMP).

#### 4. *Purificación del ATP no radiactivo.*

Los nucleótidos de guanosina, especialmente los trifosfatos, son requeridos tanto en la activación como en la inhibición de diferentes adenilil-ciclasas por hormonas o neurotransmisores. Este requerimiento ha sido demostrado en todos los casos en que se ha hecho un estudio cuidadoso, tomando las precauciones de purificar el ATP comercial y/o de eliminar nucleótidos de guanosina contaminantes en las preparaciones de membranas o en los sistemas regeneradores de

ATP (Kimura y Nagata, 1977; Birnbaumer y col., 1979, 1980; Iyengar y col., 1980b).

El ATP utilizado en la síntesis del  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, y en general, todo el ATP utilizado en este trabajo de tesis, fue purificado por cromatografía en DEAE-Sephadex A-25 como se describe a continuación (modificado de Birnbaumer y col., 1979). El ATP (100  $\mu$ moles, de músculo equino), se neutralizaba con NaOH 2N y se colocaba en una columna de DEAE-Sephadex A-25 (16 cm de altura por 1,7 cm de diámetro) previamente equilibrada con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  1 M y lavada con agua. El nucleótido se eluía con un gradiente de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  entre 0 y 1 M; se recogían fracciones de 7,7 ml y se determinaba en cada una de ellas la absorción a 260 nm. Las fracciones con una absorción mayor que 1,0 se juntaban y liofilizaban. El residuo seco se resuspendía en 10 ml de agua y se evaporaba hasta sequedad en un evaporador rotatorio. Esta operación se repetía 5 veces y finalmente el ATP purificado se resuspendía en 2 ml de agua. La concentración de ATP se determinaba espectrofotométricamente (coeficiente de extinción molar de  $15,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$  a pH 7,0).

Algunos autores han utilizado ATP obtenido por fosforilación de adenosina. Este producto (Sigma n°A3377) parece estar libre de contaminación con nucleótidos de guanosina.

## PREPARACION DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD DE ADENILIL-CICLASA.

Las diversas preparaciones en que se midió actividad de adenilil-ciclase fueron obtenidas de ovario de *Xenopus laevis*, ya sea de ovario completo, de folículos aislados del ovario, de oocitos desfoli-culados o de preparaciones de las células foliculares que rodean al oocito.

### 1. Obtención de ovario de *Xenopus laevis*.

El mismo día en que se realizaba la preparación de enzima, las hembras adultas se anestesiaban por hipotermia en un baño de agua y hielo. El ovario se extraía mediante una incisión en el abdomen y se cortaba en pequeños trozos (el ovario completo tiene un peso húmedo de alrededor de 20 gramos). Los trozos de ovario se lavaban con solución salina de Barth para anfibios y se mantenían en esta solución, que está compuesta por: Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; MgSO<sub>4</sub> 0,82 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,74 mM; KCl 1,0 mM; Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,33 mM; NaCl 88 mM; NaHCO<sub>3</sub> 2,4 mM, penicilina 0,1 mM y sulfato de estreptomicina 0,1 mM.

### 2. Obtención de folículos, oocitos y células foliculares.

a). Folículos. La obtención de folículos, esto es, oocitos rodeados de una capa de células foliculares, se realizaba por aislamiento manual de éstos del tejido ovárico mediante el uso de pinzas de Dumont n°5. Este procedimiento permite la eliminación de las dos capas más externas que rodean al oocito: epitelio peritoneal y teca, pero el oocito permanece rodeado de una capa de células foliculares (Wallace y col., 1981). Para algunos experimentos, se separaron

manualmente folículos de diferentes estados de desarrollo de acuerdo a los criterios de tamaño y morfología descritos por Dumont (1972) (Apéndice, Figura 19).

b) Oocitos y células foliculares. Los oocitos desfoliculados y las células foliculares se obtuvieron por dos procedimientos diferentes, manual y enzimático.

b.1) Procedimiento manual. Folículos crecidos de estado VI de la oogénesis (Dumont, 1972) se aislaban manualmente del ovario, y se incubaban con agitación suave por dos horas a 25° en una solución que contenía: Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; NaCl 116 mM; KCl 1,4 mM y EDTA 1 mM. Este tratamiento debilita la unión de las células foliculares al oocito, de manera que éstas pueden ser removidas en forma intacta con la ayuda de pinzas de relojero (Masui, 1967; Wasserman y Masui, 1975). Los oocitos y las células foliculares así obtenidos eran contados y devueltos a la solución salina de Barth.

En un experimento, folículos y oocitos desfoliculados por este método fueron fijados en una solución que contenía metanol (85%), formaldehído (10%) y ácido acético (5%). Se obtuvieron cortes de 5  $\mu$ m de espesor por el procedimiento descrito para folículos de *Xenopus laevis* por Seelenfreund (1981), y estos cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (Seelenfreund, 1981). La observación microscópica de los cortes teñidos obtenidos de oocitos desfoliculados mostró que no más de un 5% de la capa de células foliculares permanecía adherida a los oocitos (ver "Resultados").

b.2) Procedimiento enzimático. Este método se empleó para la obtención de oocitos desfoliculados de diferentes estados de la

oogénesis (Dumont, 1972) y de células foliculares. Con este método, las poblaciones celulares obtenidas no son tan homogéneas como en el caso de la defoliculación manual, pero es posible obtener grandes cantidades de oocitos defoliculados y de células foliculares (Masui, 1967; Dumont, 1972).

Trozos pequeños de ovario se incubaban con agitación suave a 25° durante tres horas en solución salina de Barth que contenía 2 mg/ml de colagenasa. Este tratamiento disocia al tejido del ovario dejando oocitos libres y una suspensión de capas de células foliculares. Los oocitos de distintos diámetros pueden ser separados con la ayuda de tamices constituidos por mallas de nylon (Nitex) (Burzio y Koide, 1977), para lo cual la solución salina de Barth que contenía los oocitos de diferentes tamaños separados por acción de la colagenasa se filtraba por una malla de nylon que retenía los oocitos de más de 700  $\mu\text{m}$  de diámetro (malla de 700  $\mu\text{m}$ ). Estos oocitos son los que corresponden a los estados IV, V y VI de Dumont (1972) (Apéndice, Figura 19), y se separaban manualmente los oocitos de estado IV (700 a 900  $\mu\text{m}$  de diámetro) de los oocitos de estados V y VI (1.000 a 1.300  $\mu\text{m}$  de diámetro).

En la mayoría de los experimentos sólo se utilizaron los oocitos de estados V y VI, pero en algunos se utilizaron también los oocitos de estados I, II, III y IV (Dumont, 1972) (Apéndice, Figura 19). La suspensión de los oocitos de estados I, II y III, que pasaban a través de la malla de 700  $\mu\text{m}$ , se filtraba por una malla de 500  $\mu\text{m}$ , y el filtrado obtenido se pasaba por una malla de 53  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se seleccionaban manualmente oocitos de estado III (450 a 600  $\mu\text{m}$  de diámetro) y oocitos'

de estados I y II (50 a 400  $\mu\text{m}$  de diámetro).

Las capas de células foliculares se removían principalmente de la suspensión inicial (que contenía a todos los oocitos) y del filtrado de la malla de 500  $\mu\text{m}$  (que contenía oocitos de estados I y II y células foliculares) por sedimentación, ya que sedimentan más lentamente que los oocitos. Luego las células foliculares se concentraban por centrifugación a 1.000xg por diez minutos.

### 3. *Fraccionamiento celular.*

Todas las manipulaciones se realizaban a 4°. En las preparaciones de enzima a partir de ovario, folículos u oocitos fue necesario utilizar en la homogeneización soluciones amortiguadoras de un pH mayor que 7,5 porque el material proveniente de los oocitos acidifica los extractos. De esta manera se obtenían homogeneizados cuyo pH era de aproximadamente 7,5.

a) Preparación de enzima de ovario. En una preparación tipo, se partía de un ovario (aproximadamente 20 g de peso húmedo) que se cortaba en pequeños trozos, que luego se homogeneizaban en 1 volumen de una solución que contenía: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; DTT 1 mM y sacarosa 0,88 M (solución de homogeneización, o solución A). La homogeneización se realizaba en un Omnimixer (Sorvall) a la máxima velocidad durante 30 segundos por 3 veces, enfriando entre una y otra vez. El homogeneizado se centrifugaba por 10 minutos en una centrifuga Sorvall a 1000xg. El sobrenadante ( $S_1$ ) se filtraba a través de lana de vidrio y se centrifugaba por 20 minutos en la misma centrifuga a 20.000xg. El sobrenadante ( $S_2$ ) se filtraba a través

de lana de vidrio y se centrifugaba por dos horas en una centrífuga Beckman a 105.000xg. Después de esta última centrifugación se obtenían 3 fracciones: un sedimento bien adherido al fondo del tubo ( $P_4$ ), una fracción turbia encima del sedimento ("fracción algodonosa",  $P_3$ ), y el sobrenadante propiamente tal, más translúcido ( $S_3$ ). La denominada "fracción algodonosa" o  $P_3$  se diluía a 0,22 M sacarosa con una solución que contenía: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; DTT 1 mM (solución de dilución o solución B), y se centrifugaba nuevamente por dos horas en una centrífuga Beckman a 105.000xg. En estas condiciones, se obtenía un sedimento bien adherido al fondo del tubo. Todos los sedimentos se resuspendían en una solución de sacarosa 0,22 M en solución B (solución de resuspensión o solución C). Las fracciones se guardaban a  $-80^\circ$  hasta su uso.

b) Preparación de enzima de folículos, oocitos y células foliculares obtenidos por el procedimiento manual. Cuando los folículos, oocitos y células foliculares se obtenían por los procedimientos manuales descritos, se utilizaban como fuente de enzima homogeneizados no fraccionados preparados de la siguiente manera:

- 30 a 130 folículos u oocitos se homogeneizaban en una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,7; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; sacarosa 0,44 M (0,15 a 0,20 ml de solución por cada 30 folículos u oocitos).
- 30 a 500 capas de células foliculares se homogeneizaban en una solución de sacarosa 0,44 M en solución B adicionada de 5 mg de seroalbúmina bovina por ml (0,2 ml de solución por cada 30 a 300 capas foliculares).

En ambos casos la homogeneización se llevaba a cabo en un homogeneizador de vidrio con un vástago también de vidrio.

c) Preparación de enzima de oocitos o células foliculares obtenidos por el método enzimático. Los oocitos se homogeneizaban en 1 volumen de la solución de homogeneización (solución A). La homogeneización se llevaba a cabo en un homogeneizador Dounce, con 10 pasadas del vástago A y 10 pasadas del vástago B. El homogeneizado se filtraba a través de lana de vidrio y se fraccionaba tal como se describió en el caso de ovario (centrifugaciones sucesivas a 1.000xg, 20.000xg y 105.000xg, y centrifugación nuevamente de la "fracción algodonosa" a 105.000xg). Los sedimentos se resuspendían en solución C. En el caso de la fracción denominada "algodonosa" (o P<sub>3</sub>), que fue utilizada en la mayor parte de los experimentos de esta tesis, el sedimento final se resuspendía a una concentración de proteínas de 15 a 20 mg/ml según la preparación. En algunos experimentos, se diluía la concentración de sacarosa del homogeneizado a 0,22 M con solución B, de manera que después de la primera centrifugación a 105.000xg la fracción "algodonosa" (P<sub>3</sub>) formaba parte del sedimento firmemente adherido al fondo del tubo (P<sub>4</sub>).

Las células foliculares obtenidas por tratamiento del ovario con colagenasa y recolectadas finalmente por centrifugación a 1.000xg se homogeneizaban en 10 volúmenes de una solución de sacarosa 0,88 M en solución B. La homogeneización se llevaba a cabo en un homogeneizador Dounce con 10 pasadas del vástago A seguidas de 10 pasadas del vástago B. El homogeneizado se centrifugaba por 15 minutos en una

centrífuga Sorvall a 1.000xg. El sobrenadante ( $S_1$ ) se diluía a una concentración de 0,44 M sacarosa con solución B y se centrifugaba por 20 minutos en una centrífuga Sorvall a 20.000xg. El sobrenadante ( $S_2$ ) se centrifugaba por 2 horas en una centrífuga Beckman a 105.000xg, obteniéndose un sedimento ( $P_4$ ) y un sobrenadante ( $S_3$ ) (en el caso de las células foliculares está ausente la fracción denominada "algodonosa" o  $P_3$ ). Los sedimentos se resuspendían en la solución C.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL-CICLASA.

La actividad de adenilil-ciclase se ensayaba en triplicado por el procedimiento descrito por Rodbell (1967). Este método consiste en medir la transformación de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ , catalizada por la adenilil-ciclase.

La actividad de diferentes fracciones se medía en una mezcla de reacción con un volumen final de 0,1 ml, que contenía: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5;  $\text{MgCl}_2$  o  $\text{MnCl}_2$  5 mM; cAMP 1 mM; DTT 1 mM; fosfocreatina 4 mM; creatina-fosfoquinasa 0,4 mg/ml (6,6 unidades); EDTA 0,3 o 0,5 mM; glicerol al 5% (v/v);  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  40 a 350  $\mu\text{M}$  (250 a 4.000 cpm/pmol). NaF, GMP.P(NH)P y progesterona se agregaban a las concentraciones indicadas en Resultados. En los experimentos en que se estudiaba el efecto de progesterona, ésta se preparaba en una solución de etanol y todas las incubaciones contenían la misma cantidad de etanol.

La reacción se iniciaba con la adición de las fracciones enzimáticas (5 a 400  $\mu\text{g}$  de proteínas), y las incubaciones se realizaban por 15 minutos a  $37^\circ$  o por 20 minutos a  $32^\circ$ , excepto en los casos

indicados en el capítulo de Resultados. La reacción se detenía con la adición de 0,1 ml de una solución de ATP 20 mM y [ $^3\text{H}$ ]cAMP 6,25 mM (con aproximadamente 20.000 cpm/ $\mu\text{mol}$ ), pH 7, seguida de un calentamiento a 100° durante 3 minutos.

El [ $^{32}\text{P}$ ]cAMP formado se purificaba siguiendo el procedimiento de cromatografía secuencial en columnas de Dowex 50 y alúmina neutra descrito por Salomon y col. (1974). Este método se basa en la propiedad del cAMP de tener un volumen de elución mayor que ATP, ADP, AMP, PPi y Pi en una resina de intercambio catiónico (Dowex 50). El cAMP es luego purificado en una columna de alúmina, que retiene al ATP que aún puede contaminarlo pero no al cAMP (la alúmina también retiene a ADP, AMP, PPi y Pi).

Para proceder, después de agregar 1 ml de agua a las muestras, éstas se colocaban en columnas de Dowex 50 X-4 (200-400 mallas, 4 cm de altura por 0,5 cm de diámetro) previamente lavadas con HCl y H<sub>2</sub>O. Luego se lavaban las columnas con 5 ml de H<sub>2</sub>O, (en dos etapas: 1 ml y luego 4 ml), descartándose los eluidos. En seguida se pasaban 6 ml de H<sub>2</sub>O, recogiendo los eluidos directamente sobre columnas de alúmina neutra (3 cm de altura por 0,5 cm de diámetro) previamente equilibradas con una solución de Imidazol-HCl 0,1 M, pH 7,5. Una vez pasados los 6 ml por la alúmina, y habiéndose desechado los eluidos correspondientes, las columnas se lavaban con 1,5 ml de la solución de imidazol-HCl 0,1 M, y luego el cAMP se eluía con 4 ml de la misma solución. Estos eluidos finales (4 ml) se recogían en frascos de centelleo líquido, y la radiactividad de  $^{32}\text{P}$  y de  $^3\text{H}$  se determinaba en

12 ml de una mezcla de centelleo líquido cuya composición era: 4 g de PPO; 80 mg de POPOP; 1 litro de tolueno; 0,5 litros de Tritón x-100; cantidad variable de metanol, para que según la temperatura ambiente la mezcla resultara homogénea.

El [ $^3\text{H}$ ]cAMP agregado al finalizar la incubación permitía calcular la recuperación del cAMP después de la pasada por las columnas de Dowex y alúmina (las recuperaciones oscilaban entre 45 y 75%). En cada experimento se determinaba además que parte del producto aislado por el procedimiento de cromatografía secuencial en Dowex 50 y alúmina neutra era realmente [ $^{32}\text{P}$ ]cAMP. Para ello, se trataba este producto con fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de corazón bovino, y sólo las cpm de  $^{32}\text{P}$  que desaparecían con este tratamiento eran consideradas como cpm de [ $^{32}\text{P}$ ]cAMP (esto equivale a usar, como blancos los tubos en que se realizaba el tratamiento con fosfodiesterasa). El tratamiento con fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos se realizaba de la siguiente manera: una vez finalizada la incubación y detenida la reacción de la adenilil-ciclase (como ya se describió), se agregaban 5  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 1 M, pH 7,5; 2,5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  0,1 M, y 5  $\mu\text{l}$  de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de corazón bovino 10 mg/ml (0,01 unidades), y se incubaba a 30° durante dos horas. La reacción se detenía en la misma forma en que se detenía la reacción de la adenilil-ciclase, se agregaban 0,9 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  a cada muestra, y éstas eran procesadas por Dowex 50 y alúmina neutra (como ya se describió).

Conociendo la actividad específica del [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP utilizado como sustrato, las cpm de [ $^{32}\text{P}$ ]cAMP, y la recuperación de [ $^3\text{H}$ ]cAMP en

cada una de las muestras, se calculaban los pmoles de cAMP formados.

En todos los experimentos de esta tesis se utilizaron en los ensayos de determinación de la actividad de adenilil-ciclase concentraciones de proteínas para las cuales la formación de cAMP era proporcional a la cantidad de enzima agregada. En algunos experimentos se incluyó en el medio de incubación para determinar la actividad de adenilil-ciclase 3-isobutil-1-metil-xantina 2 mM. Esta metil-xantina, inhibidora de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, inhibía la actividad de adenilil-ciclase (un 20% aproximadamente) sin alterar el efecto de diferentes modificadores de ella (NaF, GMP-P(NH)P, progesterona). Por ello, en la mayoría de los experimentos fue excluida de la mezcla de incubación.

Los resultados de las determinaciones de la actividad de adenilil-ciclase se expresan en general como promedio de triplicados con su desviación estándar (D.E. =  $\sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{N-1}}$ )

#### TRATAMIENTO DE FRACCIONES PARTICULADAS CON TOXINA DEL COLERA.

Este tratamiento consta de dos etapas: preactivación de la toxina del cólera con DTT, y activación de las fracciones particuladas con la toxina del cólera preactivada.

a) Preactivación de la toxina del cólera. Se incubaba a 33° durante 40 minutos una mezcla que contenía toxina del cólera 0,4 mg/ml; DTT 20 mM; seroalbúmina bovina 1 mg/ml; NaCl 180 mM; Tris-HCl 30 mM, pH 7,5; EDTA 0,4 mM. El volumen total era de 0,75 ml.

b) Activación de las fracciones particuladas. Las fracciones particuladas obtenidas por sedimentación a 105.000xg en presencia de sacarosa 0,22 M (fracción "algodonosa" P<sub>3</sub>) eran activadas por incubación a 33° durante 25 minutos en una mezcla que contenía: fracción particulada 2 a 5 mg de proteínas por ml; toxina del cólera preactivada 0,2 mg/ml; ATP 1 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0; NAD<sup>+</sup> 10 mM; DTT 10 mM; NaCl 90 mM; EDTA 0,2 mM; seroalbúmina bovina 0,5 mg/ml. El volumen total de reacción era de 1,5 ml. El fosfato de potasio se agregaba porque se ha descrito que a altas concentraciones favorece la ADP-ribosilación catalizada por la toxina del cólera (Kaslow y col., 1980). Una vez finalizada la incubación, se diluía con 1 volumen de solución B fría, y se centrifugaba por una hora en una centrífuga Beckman a 105.000xg a 4°. El sedimento se resuspendía en la solución C y en algunos casos se volvía a centrifugar a 105.000xg por dos horas antes de ser finalmente resuspendida en la solución C (a una concentración de proteínas de 10 a 15 mg/ml).

Las fracciones particuladas controles, no tratadas con toxina del cólera, se procesaban de la misma manera descrita más arriba pero en ausencia de toxina del cólera. En algunos experimentos se trataba la fracción particulada con toxina del cólera preactivada pero en ausencia de NAD<sup>+</sup>.

#### DETERMINACION DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas se determinaba por el método de Lowry y col. (1951), usando seroalbúmina bovina como estándar.

## RESULTADOS

### ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL-CICLASA OBTENIDA DE OVARIO.

#### 1. *Fraccionamiento celular.*

En cada preparación se homogeneizaba un ovario y se fraccionaba tal como se describe en Materiales y Métodos. Al medir la actividad de adenilil-ciclase en las diferentes fracciones de una preparación, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 2. La actividad de adenilil-ciclase se encontró principalmente asociada a la fracción particulada  $P_3$ , que fue también la fracción con mayor actividad específica. Esta fracción "algodonosa"  $P_3$  fue la fracción utilizada en la caracterización de la actividad de adenilil-ciclase de ovario.

Los resultados presentados en la Tabla 2 muestran también que la actividad de adenilil-ciclase de todas las fracciones es estimulada por la adición de fluoruro 10 mM, y que la actividad soluble es muy baja. La actividad de adenilil-ciclase obtenida de ovario parece entonces estar asociada a una fracción particulada, al igual que la mayoría de las adenilil-ciclasas de células eucarióticas (Bradham y Cheung, 1982).

#### 2. *Efectos de fluoruro y GMP.P(NH)P.*

El fluoruro y el GMP.P(NH)P activan a la mayoría de las adenilil-ciclasas de eucariontes, y ambas activaciones son mediadas por la subunidad G/F de las adenilil-ciclasas (Introducción). Con el fin de

TABLA 2

Actividad de adenilil-ciclase en diferentes fracciones obtenidas  
de ovario de *Xenopus laevis*

Fracción	Adenilil-ciclase			
	Actividad total (pmoles cAMP)		Actividad específica (pmoles cAMP/mg proteína)	
	sin NaF	con NaF	sin NaF	con NaF
Homogeneizado	6.810	139.620	1,6	32,2
Sedimento de 1.000xg (P <sub>1</sub> )	290	6.800	0,2	4,2
Sobrenadante de 1.000xg (S <sub>1</sub> )	4.710	85.850	8,2	150,1
Sedimento de 20.000xg (P <sub>2</sub> )	180	2.660	2,6	38,0
Sobrenadante de 20.000xg (S <sub>2</sub> )	3.600	72.770	9,1	184,7
Sedimento de 105.000xg (P <sub>4</sub> )	N.D.	660	-	10,2
Fracción "alga- donosa" (P <sub>3</sub> )	1.700	37.820	34,7	771,8
Sobrenadante de 105.000xg (S <sub>3</sub> )	N.D.	2.250	-	15,1

Se homogeneizaron 20 g de ovario, y el homogeneizado se fraccionó tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de adenilil-ciclase en las diferentes fracciones se determinó por el procedimiento estándar, a 37° por 15 minutos, en presencia de MnCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 0,073 mM (1.320 cpm/pmol) y en presencia y ausencia de NaF 10 mM (N.D.=no detectable).

caracterizar la actividad de adenilil-ciclasa de la fracción particu-  
da P<sub>3</sub> de ovario se estudiaron los efectos de NaF y GMP.P(NH)P en ella.

a) Efectos de NaF y GMP.P(NH)P en la cinética de la reacción.

Se estudió el efecto de fluoruro 10 mM y de GMP.P(NH)P 0,1 mM sobre la cinética de formación de cAMP. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1. Se observa que tanto el fluoruro como el GMP.P(NH)P activan fuertemente a la enzima. En el caso del fluoruro la velocidad de formación del cAMP fue 15 a 16 veces mayor que en ausencia de él. El GMP.P(NH)P activó después de un período de latencia de 1 a 2 minutos, y la velocidad de formación de cAMP en el estado estacionario fue 6 veces mayor que la observada en ausencia de GMP.P(NH)P y fluoruro. La existencia de un período de latencia en la activación por GMP.P(NH)P es también una característica común de la mayor parte de las adenilil-ciclasas (Introducción).

b) Efecto de fluoruro en los parámetros cinéticos de la reacción. Se determinó el efecto de fluoruro 10 mM en la K<sub>m</sub> aparente para ATP y en la V<sub>max</sub> aparente, utilizando para ello la fracción P<sub>3</sub> obtenida de ovario. Los resultados obtenidos se graficaron empleando la transformación lineal de Lineweaver-Burk (Lineweaver, y Burk, 1934). Las rectas se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose coeficientes de correlación de 0,99 tanto en ausencia como en presencia de fluoruro. La actividad de adenilil-ciclasa presentó un comportamiento Michaeliano con concentraciones de ATP entre 0,016 y 2 mM, y esto tanto en presencia como en ausencia de fluoruro. Estos resultados se muestran en la Figura 2, donde se puede apreciar que el

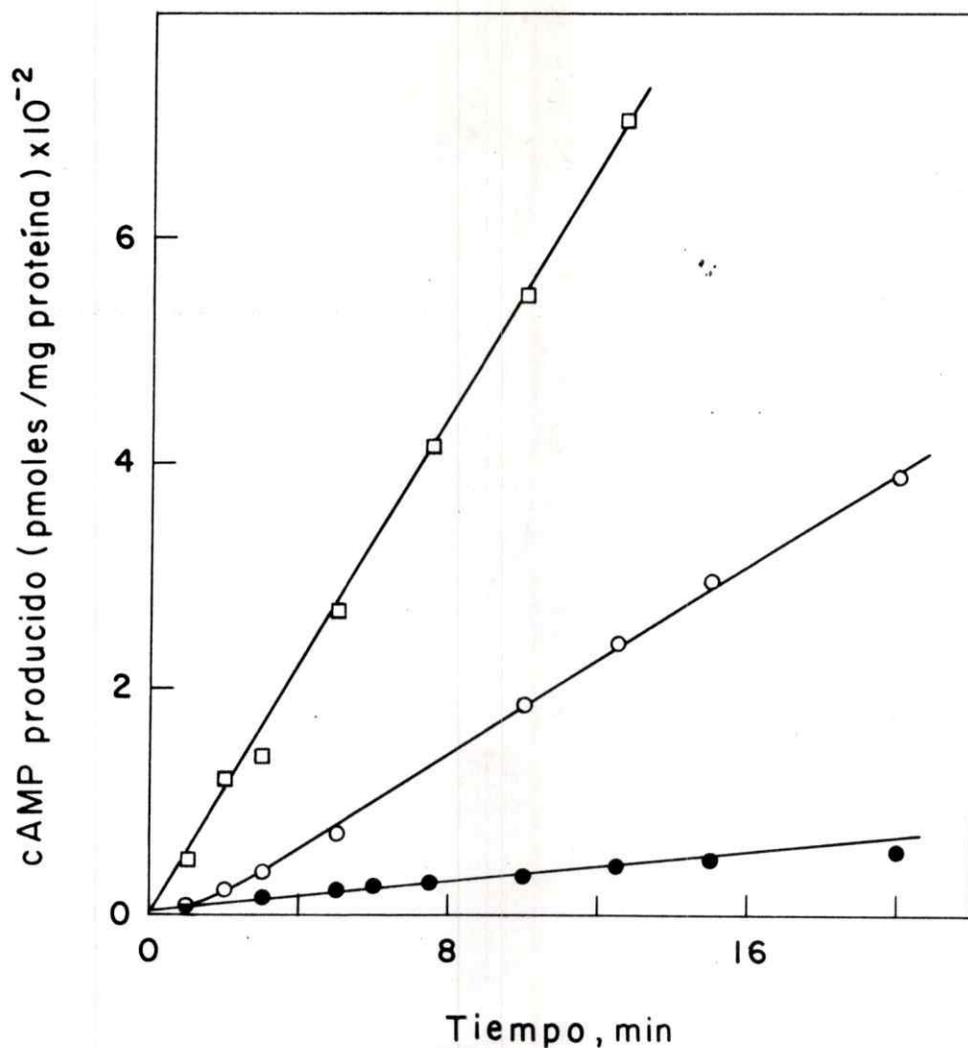


Figura 1. *Cinética de la reacción de formación de cAMP.* La formación de cAMP se midió en condiciones estándares, a 37°, con MnCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 0,156 mM (340 cpm/pmol), y sin otra adición (●) o en presencia de GMP.P(NH)P 0,1 mM (○) o NaF 10 mM (□). La reacción se inició con la adición de la enzima (4 mg de proteínas de la fracción P<sub>3</sub> por ml de medio de incubación), y a cada tiempo indicado se retiraron 0,1 ml de la mezcla de incubación y la reacción se detuvo tal como se describe en Materiales y Métodos.

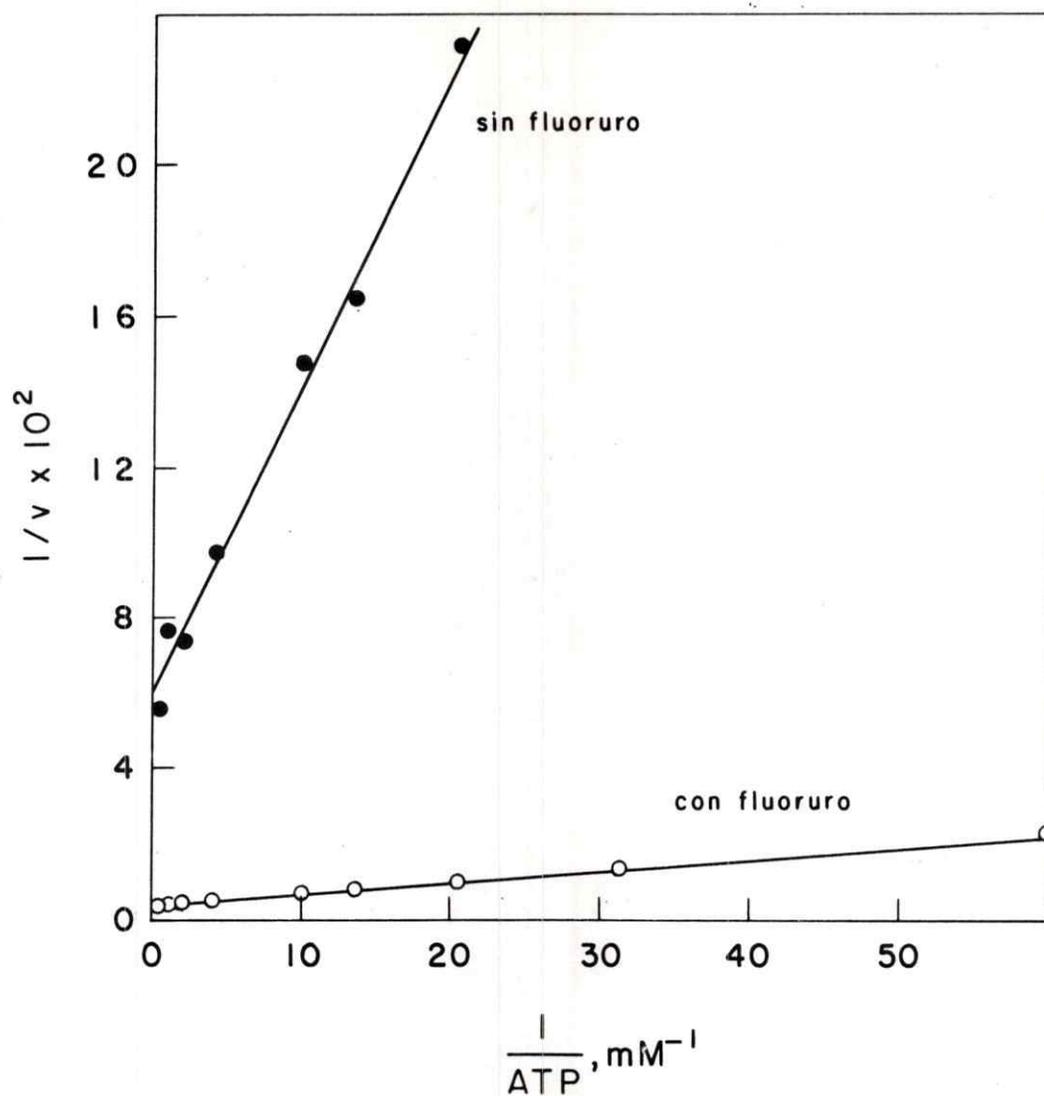


Figura 2. Efecto de fluoruro en los parámetros cinéticos. La actividad de adenilil-ciclasa se ensayó en triplicado a diferentes concentraciones de ATP (0,016 a 2,0 mM, 50 a 3.160 cpm/pmol), en presencia de MnCl<sub>2</sub> 5 mM y en ausencia (●) y presencia (○) de NaF 10 mM. Las incubaciones se realizaron a 37° por 15 minutos en las condiciones estándares. v está expresada en pmoles de cAMP formados en 15 minutos por mg de proteína.

fluoruro produce un aumento considerable de la  $V_{max}$  sin afectar en forma significativa a la  $K_m$  aparente para ATP. En el experimento ilustrado en la Figura 2, el aumento de la  $V_{max}$  fue de 16 veces (de 17 a 277 pmoles de cAMP/mg proteína/15 min), mientras que la  $K_m$  aparente sólo decreció en un 30 a 40% en presencia de fluoruro (de 0,137 a 0,088 mM). En otros sistemas también se ha demostrado que la activación producida por fluoruro se debe principalmente a un aumento de la  $V_{max}$  (Rasenick y Bitensky, 1980; Bradham y Cheung, 1982).

c) Efecto de la concentración de fluoruro. Se estudió el efecto de la concentración de fluoruro (1 a 20 mM) en la actividad de adenilil-ciclase de la fracción  $P_3$  obtenida de ovario. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3. La menor concentración de fluoruro utilizada (1 mM) fue capaz de activar a la enzima. La máxima activación (19 veces) se obtuvo con una concentración de fluoruro de 5 mM, y la actividad no mostró variaciones con concentraciones de fluoruro entre 5 y 20 mM. La mitad del efecto máximo se obtuvo con una concentración de NaF entre 1 y 3 mM. En la Figura 3 se puede apreciar también que el aumento de actividad en función de la concentración de fluoruro es sigmoideo. Estos resultados son similares a los obtenidos en la mayoría de los sistemas conocidos de adenilil-ciclasas (Rasenick y Bitensky, 1980; Bradham y Cheung, 1982).

En el experimento ilustrado en la Figura 3 se realizó un control con NaCl 20 mM (no se muestra). Esa concentración de NaCl no afectó a la actividad de adenilil-ciclase, demostrándose con ello que el efecto de NaF se debe al ión fluoruro.

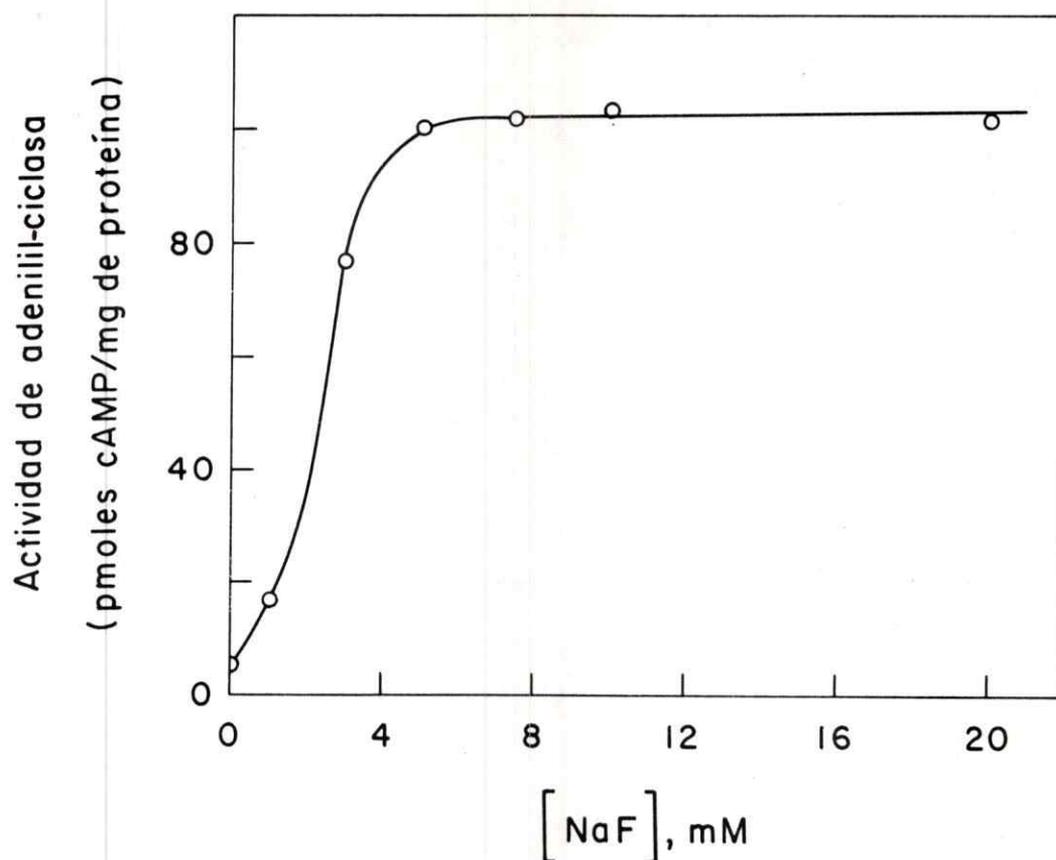


Figura 3. Efecto de la concentración de fluoruro. La actividad de adenilil-ciclasa se midió en triplicado en presencia de diferentes concentraciones de NaF. Se utilizó una fracción  $P_3$  obtenida de ovario (0,2 mg de proteína por ensayo) y las incubaciones se realizaron a  $37^\circ$  por 15 minutos, con  $MnCl_2$  5 mM y ATP 0,073 mM (1.080 cpm/pmol).

d) Efecto de la concentración de GMP.P(NH)P. Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de GMP.P(NH)P sobre la actividad de adenilil-ciclasa de la fracción "algodonosa" P<sub>3</sub> obtenida de ovario. Se puede apreciar en la Figura 4 que el GMP.P(NH)P a una concentración de 1 µM fue capaz de activar a la enzima en presencia de Mn<sup>+2</sup> o de Mg<sup>+2</sup>, y que el efecto máximo se alcanzó con concentraciones de GMP.P(NH)P cercanas a 25 µM. Con GMP.P(NH)P 0,5 mM se observó una inhibición de la actividad medida en presencia de Mn<sup>+2</sup>. Esta inhibición no tiene por ahora explicación.

Los resultados obtenidos muestran que el estímulo relativo causado por el GMP.P(NH)P es mayor con Mg<sup>+2</sup> que con Mn<sup>+2</sup>. En el experimento ilustrado en la Figura 4, el GMP.P(NH)P 0,1 mM activó 4 a 5 veces en presencia de Mn<sup>+2</sup>, y 15 a 16 veces en presencia de Mg<sup>+2</sup>. La concentración de GMP.P(NH)P necesaria para obtener la mitad de la activación máxima con Mg<sup>+2</sup> y con Mn<sup>+2</sup> fue similar: entre 2,5 y 5,0 µM. El hecho de que el GMP.P(NH)P active más en presencia de Mg<sup>+2</sup> se debe a que la actividad basal (medida en ausencia de GMP.P(NH)P) es mucho menor en presencia de este catión (5 veces en el experimento de la Figura 4). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros sistemas, en los que se ha observado que la subunidad catalítica C de la adenilil-ciclasa funciona mejor con MnATP<sup>-2</sup> como sustrato en ausencia de una subunidad G/F activa, pero que las propiedades regulatorias se observan mejor con MgATP<sup>-2</sup> como sustrato.

### 3. Efecto de la toxina del cólera.

La toxina del cólera activa a la mayoría de las adenilil-ciclasas de eucariontes (Introducción). Se estudió el efecto de un tratamiento

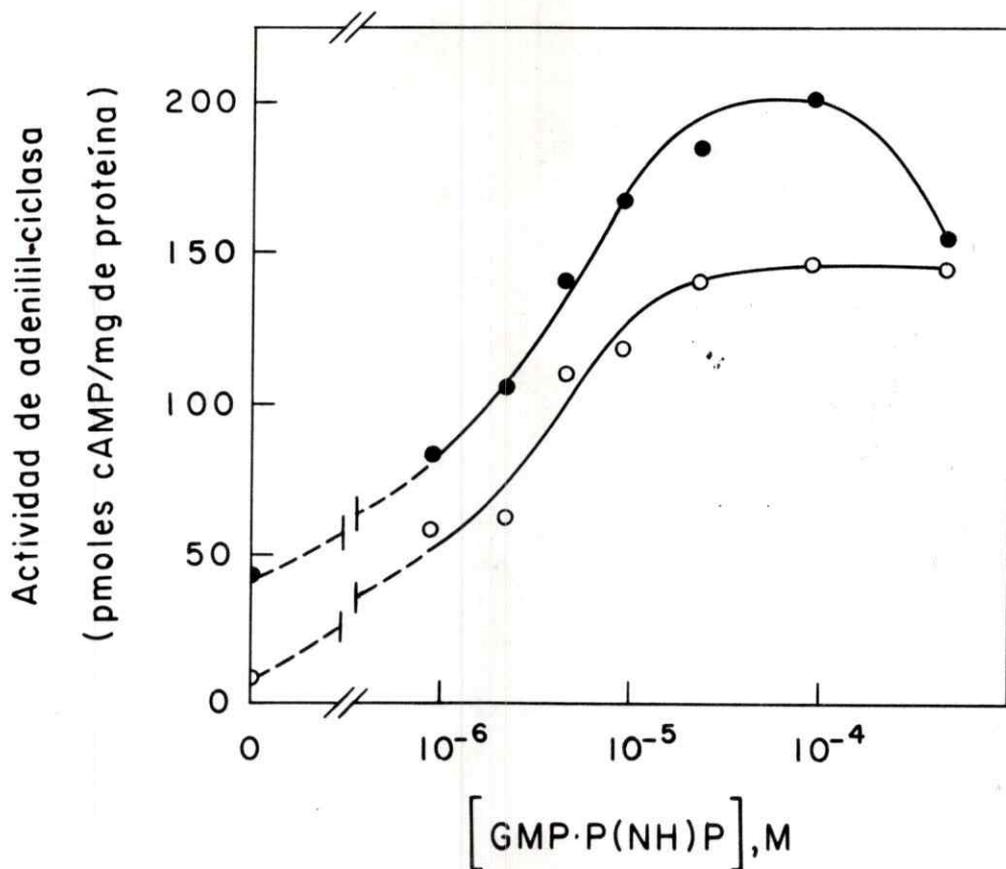


Figura 4. Efecto de la concentración de GMP·P(NH)P. La actividad de adenilil-ciclasa se midió en triplicado en presencia de diferentes concentraciones de GMP·P(NH)P. Se utilizó una fracción P<sub>3</sub> obtenida de ovario (65  $\mu$ g de proteína por ensayo), y las incubaciones se realizaron a 37° por 15 minutos, con ATP 0,158 mM (620 cpm/pmol) y con MnCl<sub>2</sub> 5 mM (●) o MgCl<sub>2</sub> 5 mM (○).

con toxina del cólera de la fracción P<sub>3</sub> obtenida de ovario sobre la actividad de adenilil-ciclase de esta fracción. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. Cuando la fracción particulada fue incubada en ausencia de toxina del cólera y de NAD<sup>+</sup>, y luego se ensayó su actividad de adenilil-ciclase, ésta presentó las mismas características de una enzima control (no tratada): una actividad basal baja que no es modificada significativamente por GTP, y una fuerte activación por fluoruro y por GMP.P(NH)P (49 y 12 veces respectivamente en el experimento ilustrado en la Tabla 3). Cuando la fracción particulada fue incubada con toxina del cólera, pero en ausencia de NAD<sup>+</sup>, los resultados fueron similares. Cuando la fracción particulada fue incubada con toxina del cólera y NAD<sup>+</sup>, no se modificó significativamente la actividad basal de adenilil-ciclase, pero la enzima adquirió la capacidad de ser estimulada fuertemente por GTP (6 veces). El tratamiento con toxina y NAD<sup>+</sup> tampoco tuvo un efecto notorio en la activación de la adenilil-ciclase por GMP.P(NH)P, pero sí redujo considerablemente la activación por fluoruro (de 49 veces en la incubación control a 19 veces en la fracción tratada con toxina y NAD<sup>+</sup>).

El requerimiento de NAD<sup>+</sup> indicaría que, como en otros sistemas, la toxina del cólera catalizaría la ADP-ribosilación de la subunidad G/F de la adenilil-ciclase obtenida de ovario. Esto inhibiría a la GTPasa que catalizaría la reacción de inactivación de la adenilil-ciclase (Introducción, Esquema II), explicando porqué el GTP se transforma en un buen activador. La reducción de la activación por fluoruro observada al tratar la fracción particulada obtenida de ovario con

TABLA 3

Efecto de la toxina del cólera en la actividad de adenilil-ciclasa

Pretratamiento de la fracción particulada	Adiciones en el ensayo	Actividad de adenilil-ciclasa
Incubación control	-	7,5± 1,9
	GTP 25 µM	9,2± 0,7
	GMP.P(NH)P 25 µM	92,0± 3,5
	NaF 5 mM	371,1±30,3
Toxina del cólera, sin NAD <sup>+</sup>	-	7,3± 1,5
	GTP 25 µM	11,4± 0,4
	GMP.P(NH)P 25 µM	98,6±13,6
	NaF 5 mM	-
Toxina del cólera, con NAD <sup>+</sup>	-	9,3± 0,8
	GTP 25 µM	55,0± 2,9
	GMP.P(NH)P 25 µM	115,3± 6,2
	NaF 5 mM	175,0± 7,8

Alícuotas de la fracción P<sub>3</sub> obtenida de ovario (2 mg/ml de proteínas) fueron tratadas con toxina del cólera 0,2 mg/ml en ausencia y en presencia de NAD<sup>+</sup> 10 mM, y luego fueron lavadas por sedimentación (Materiales y Métodos). En la incubación control, la fracción P<sub>3</sub> fue sometida al mismo tratamiento pero en ausencia de la toxina y de NAD<sup>+</sup>. Alícuotas de la fracción P<sub>3</sub> sometida a los diferentes tratamientos (0,1 mg de proteína por ensayo) se utilizaron para determinar en triplicado la actividad de adenilil-ciclasa. Las incubaciones se realizaron a 37° por 15 minutos, con las adiciones indicadas y en presencia de MgCl<sub>2</sub> 5 mM y ATP 0,139 mM (640 cpm/pmol). Las actividades se expresaron como pmoles de cAMP formados por mg de proteína, en 15 minutos.

toxina del cólera y  $\text{NAD}^+$  ha sido descrita en otros sistemas, pero su mecanismo no es conocido (Cassel y Pfeuffer, 1978; Lad y col., 1980a; Bradham y Cheung, 1982).

#### 4. Efectos de adenosina y NEM.

La adenosina modifica la actividad de las adenilil-ciclasas de numerosos tejidos (Londos y Wolff, 1977; Londos y col., 1978; Cooper y col., 1979; Lad y col., 1980b; Londos y col., 1980). Se determinó su efecto sobre la adenilil-ciclasa de la fracción  $\text{P}_3$  obtenida de ovario, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 4. Se puede apreciar que la adenosina inhibe significativamente (40 a 50%) la actividad de adenilil-ciclasa medida en presencia de  $\text{Mn}^{+2}$  y fluoruro. En el primer experimento, la inhibición fue de un 42%, en el segundo de un 47%. El efecto de la adenosina en la actividad de adenilil-ciclasa medida en ausencia de fluoruro no fue claro, aunque hubo en ambos experimentos una ligera inhibición. La inhibición por adenosina en presencia de  $\text{Mn}^{+2}$ , fluoruro y 3-isobutil-1-metilxantina es característica de un efecto de adenosina a nivel de un sitio P (purina intacta) (Londos y Wolff, 1977; Londos y col., 1978; Cooper y col., 1979; Londos y col., 1980; Lad y col., 1980b).

En la Tabla 4 se ilustra también el efecto de NEM sobre la actividad de adenilil-ciclasa de la fracción  $\text{P}_3$  obtenida de ovario. Cuando la fracción particulada fue preincubada con NEM, la enzima se inactivó, tal como ha sido descrito en otros sistemas (Ross y Gilman, 1980).

TABLA 4

Efectos de adenosina y NEM sobre la actividad de adenilil-ciclasa

		Actividad de adenilil-ciclasa	
		sin NaF	con NaF
Experimento 1	Control	7,4±0,2	93,1±21,4
	Adenosina 0,1 mM	5,6±0,6	54,4± 2,5
	Pretratamiento con NEM	0,4±0,2	1,4± 0,3
Experimento 2	Control	5,9±0,7	99,0± 4,3
	Adenosina 0,1 mM	5,0±0,2	52,3± 7,1

En el experimento 1, la fracción P<sub>3</sub> obtenida de ovario fue preincubada a 20° por 20 minutos en ausencia y en presencia de NEM 3 mM (10 mg/ml de proteínas). En el experimento 2, la fracción P<sub>3</sub> no fue preincubada. Alícuotas de la fracción P<sub>3</sub> preincubada o no (0,15 mg de proteína por ensayo) se utilizaron para determinar en triplicado la actividad de adenilil-ciclasa a 37° por 15 minutos, con MnCl<sub>2</sub> 5mM, 3-isobutil-1-metilxantina 2 mM y ATP 0,073 mM (970 y 770 cpm/pmol en los experimentos 1 y 2 respectivamente). En los casos en que se indica se agregó NaF 10 mM y/o adenosina 0,1 mM. En el experimento 1 se omitió el DTT. Las actividades se expresaron en pmoles de cAMP formados por mg de proteína en 15 minutos.

5. *Actividad de adenilil-ciclase en folículos de diferentes estados de la oogénesis.*

En el ovario de *Xenopus laevis* se encuentran folículos en diferentes estados de la oogénesis. Seis estados (I a VI) se han definido de acuerdo al tamaño y a la morfología del folículo (Dumont, 1972) (Apéndice, Figura 19). Los folículos, esto es, oocitos rodeados de una capa de células foliculares, pueden ser separados manualmente del resto del tejido ovárico. Estos folículos separados del ovario (estados II a VI) se homogeneizaron y se determinó la actividad de adenilil-ciclase en los homogeneizados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5. Se puede apreciar que la actividad de adenilil-ciclase expresada por folículo aumenta considerablemente durante la oogénesis. La actividad por folículo aumentó entre los estados II y VI alrededor de 15 veces cuando se midió en ausencia de fluoruro (Figura 5B). El mismo incremento se observó en presencia de fluoruro (alrededor de 13 veces, Figura 5A). No es posible saber con estos resultados si el aumento de actividad de adenilil-ciclase observado se debe a un aumento de la actividad presente en el oocito, en las células foliculares o en ambos.

En la Figura 5 se puede apreciar que la actividad específica de adenilil-ciclase en homogeneizados de folículos disminuye a medida que el folículo crece. Esto se debe probablemente al hecho de que el oocito empieza en el estado III a incorporar vitelogenina desde el torrente sanguíneo (Dumont, 1972), por lo que aumenta considerablemente su contenido de proteínas. Fue justamente en el estado III donde se observó una gran caída de la actividad específica de adenilil-ciclase

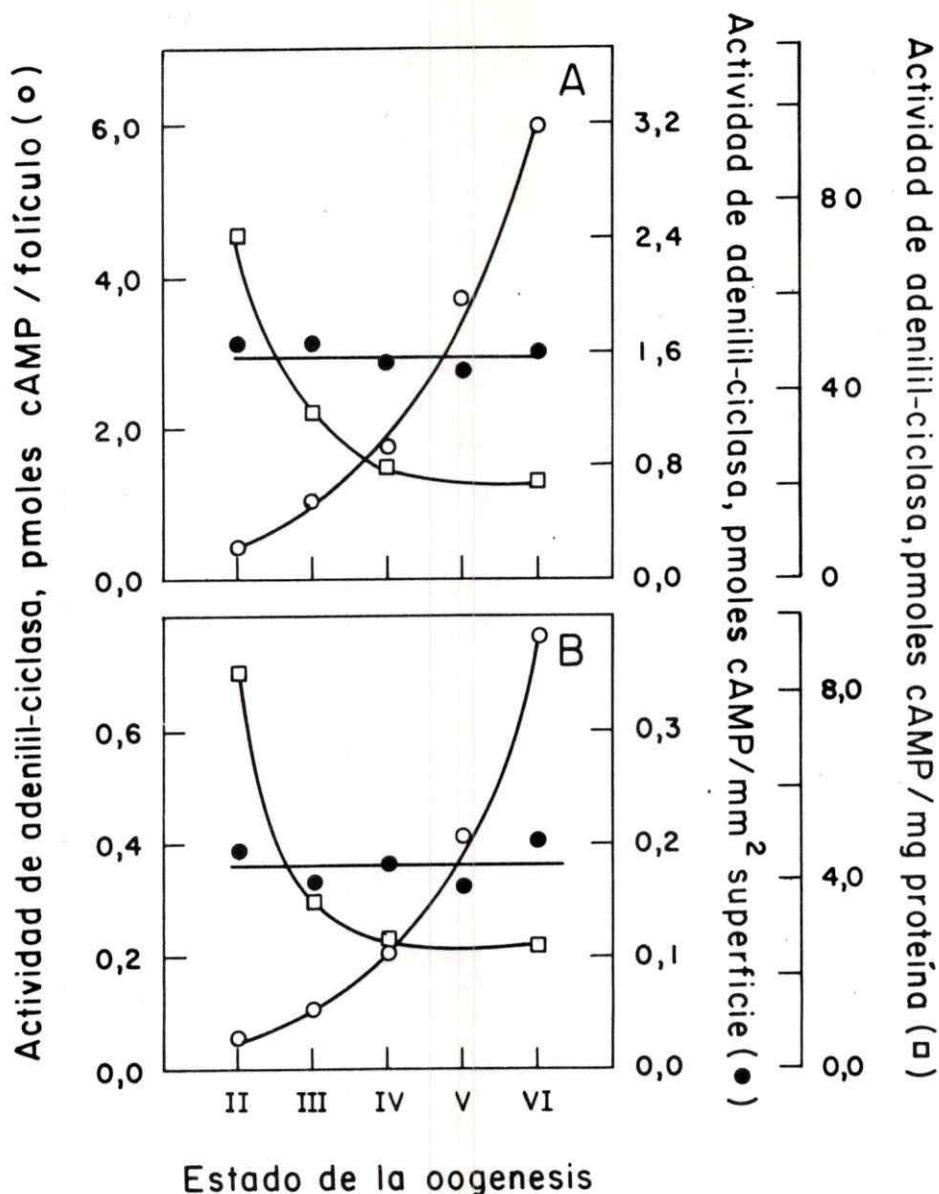


Figura 5. Actividad de adenilil-ciclasa en folículos de diferentes estados de la oogenesis. Los folículos de estados V a VI se aislaron manualmente y se homogeneizaron tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de adenilil-ciclasa se midió en presencia (A) y en ausencia (B) de NaF 10 mM en tres alícuotas de cada homogeneizado. Las incubaciones se realizaron a 37°, con MnCl<sub>2</sub> 5 mM y ATP 0,05 mM (990 cpm/pmol). La actividad se expresó como pmoles de cAMP producidos en 15 minutos por folículo (O), por mg de proteína (□) y por mm<sup>2</sup> de superficie del folículo, suponiendo que éstos son esferas (●).

(Figura 5). Cuando la actividad se expresó por unidad de superficie del folículo, suponiendo que éstos son esferas, se encontró que esta actividad permanecía constante durante la ovogénesis. Esto podría hacer pensar que existe una correlación entre la actividad total de la adenilil-ciclasa y la cantidad de membrana plasmática presente en un folículo. Sin embargo, el significado de este resultado no es claro, y debe tenerse cuidado en su interpretación, ya que las membranas plasmáticas de los oocitos y de las células foliculares poseen numerosos pliegues. Estos pliegues (vellosidades) varían en tamaño y número durante la ovogénesis (Dumont, 1972), por lo que la asimilación de los folículos a esferas puede ser una aproximación incorrecta.

La actividad de adenilil-ciclasa no pudo ser determinada en folículos de estado I ya que éstos no pueden ser aislados del ovario en cantidad suficiente debido a su tamaño muy reducido.

#### ACTIVIDADES DE ADENILIL-CICLASA EN OOCITOS Y EN CELULAS FOLICULARES.

Los experimentos que se han mostrado se realizaron con preparaciones de enzima obtenida de ovario o de folículos. En ambos casos la población celular es heterogénea, por lo que la actividad de adenilil-ciclasa medida puede representar una mezcla de adenilil-ciclasas de diferentes células. Por ello, se realizaron experimentos en los que se separaron células foliculares y oocitos, y se caracterizaron las actividades de adenilil-ciclasa presentes en ambos tipos de células.

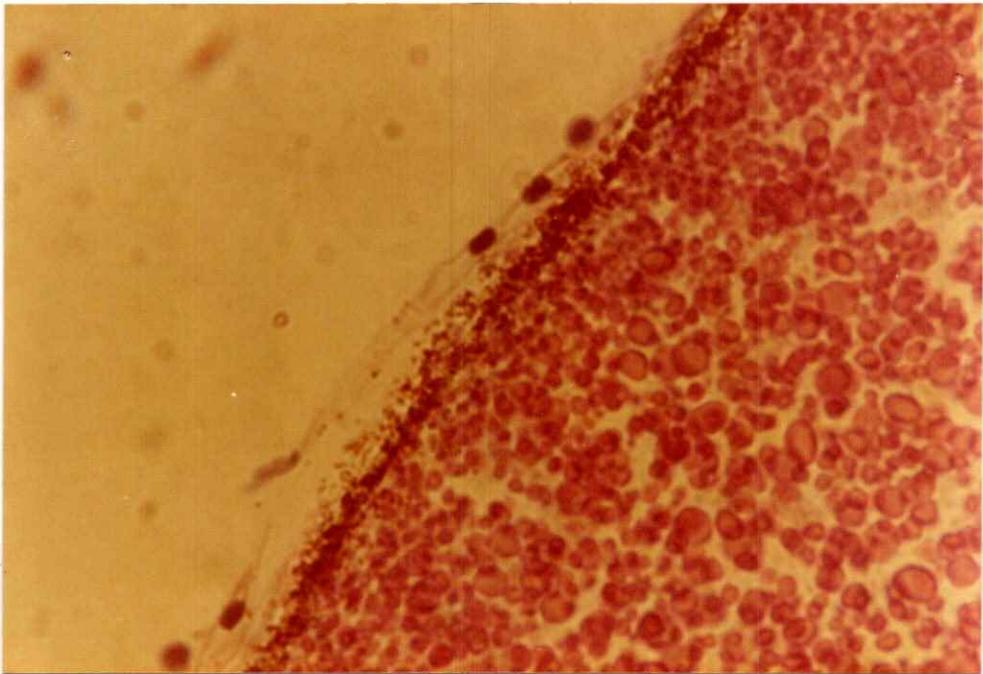
1. *Separación de oocitos y células foliculares por el procedimiento manual.*

Cuando los folículos se aíslan manualmente del ovario, el oocito permanece rodeado de una capa de células foliculares (Materiales y Métodos; Wallace y col., 1981). Se puede ver en la Figura 6 un folículo de estado VI que fue aislado del ovario y fijado tal como se describe en Materiales y Métodos. Se puede apreciar que el oocito se encuentra rodeado de una capa de células foliculares. Los oocitos se desfolicularon manualmente tal como se describe en Materiales y Métodos. Para ello, los folículos se incubaron en un medio hiperosmótico y que carece de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . Esta incubación debilita la unión de las células foliculares al oocito (Masui, 1967; Wasserman y Masui, 1975), pero estas células permanecen unidas al oocito (Figura 7). Después de este tratamiento, las células foliculares y el oocito pueden ser separados con la ayuda de pinzas de relojero, obteniéndose el oocito desfoliculado y una capa de células foliculares (Figura 8). Se determinó que los oocitos desfoliculados por este método no poseían nunca más de un 5% de la capa de células foliculares.

Este método permitió la obtención de poblaciones bastante homogéneas de oocitos y de células foliculares, las que se utilizaron en experimentos de caracterización de las actividades de adenilil-ciclase de ambos tipos de células. La desventaja del método manual de desfoliculación reside principalmente en el hecho de que no es posible obtener una cantidad apreciable de material.



A



B

Figura 6. *Foliculos controles.*

Figura 6. *Folículos controles*. Folículos de estado VI se separaron manualmente del ovario, se fijaron y se tiñeron tal como se describe en Materiales y Métodos. A. x 70 B. x 1.200. Se aprecian claramente los núcleos de las células foliculares que rodean en monocapa al oocito.

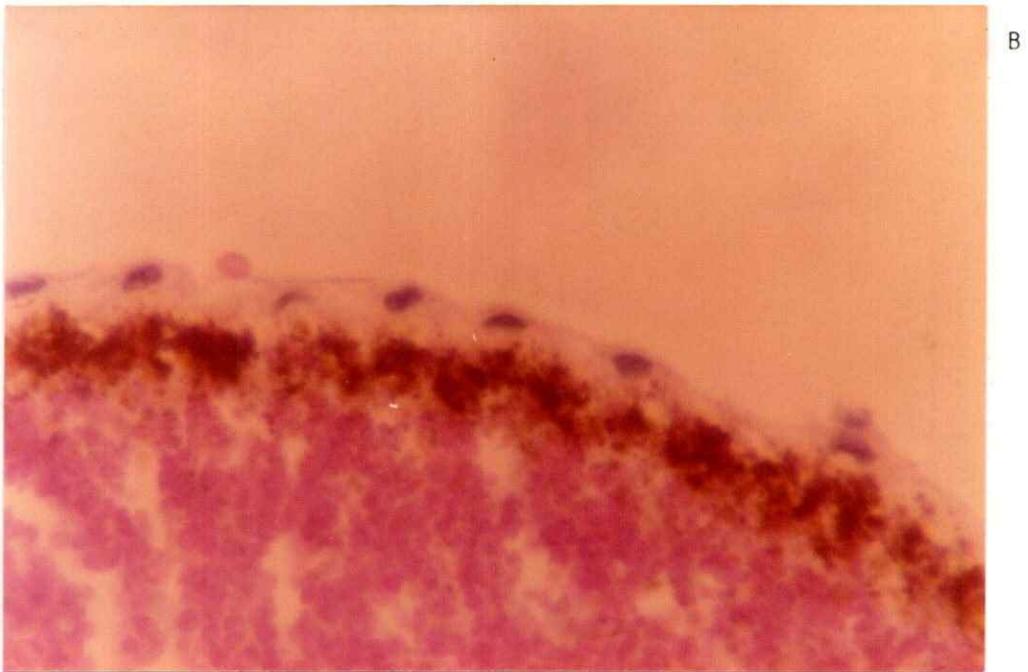
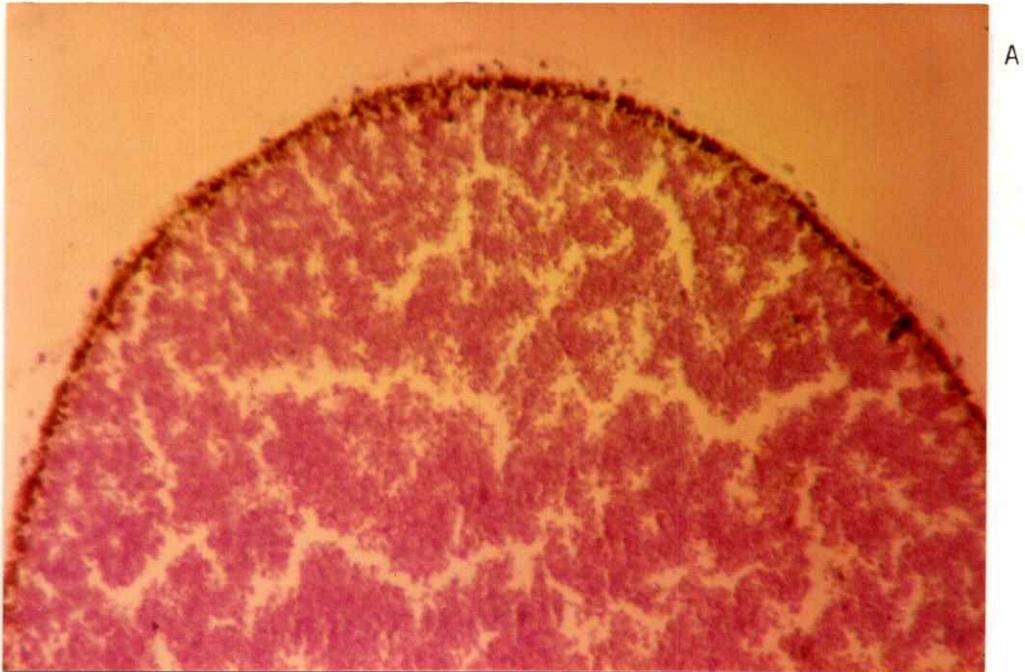


Figura 7. Folículos tratados.

Figura 7. *Folículos tratados*. Folículos de estado VI se separaron manualmente del ovario y se trataron tal como se describe en Materiales y Métodos para la defoliculación manual, pero los oocitos no se defolicularon. Los folículos así tratados fueron fijados y teñidos (Materiales y Métodos). A. x 300 B x 1.200

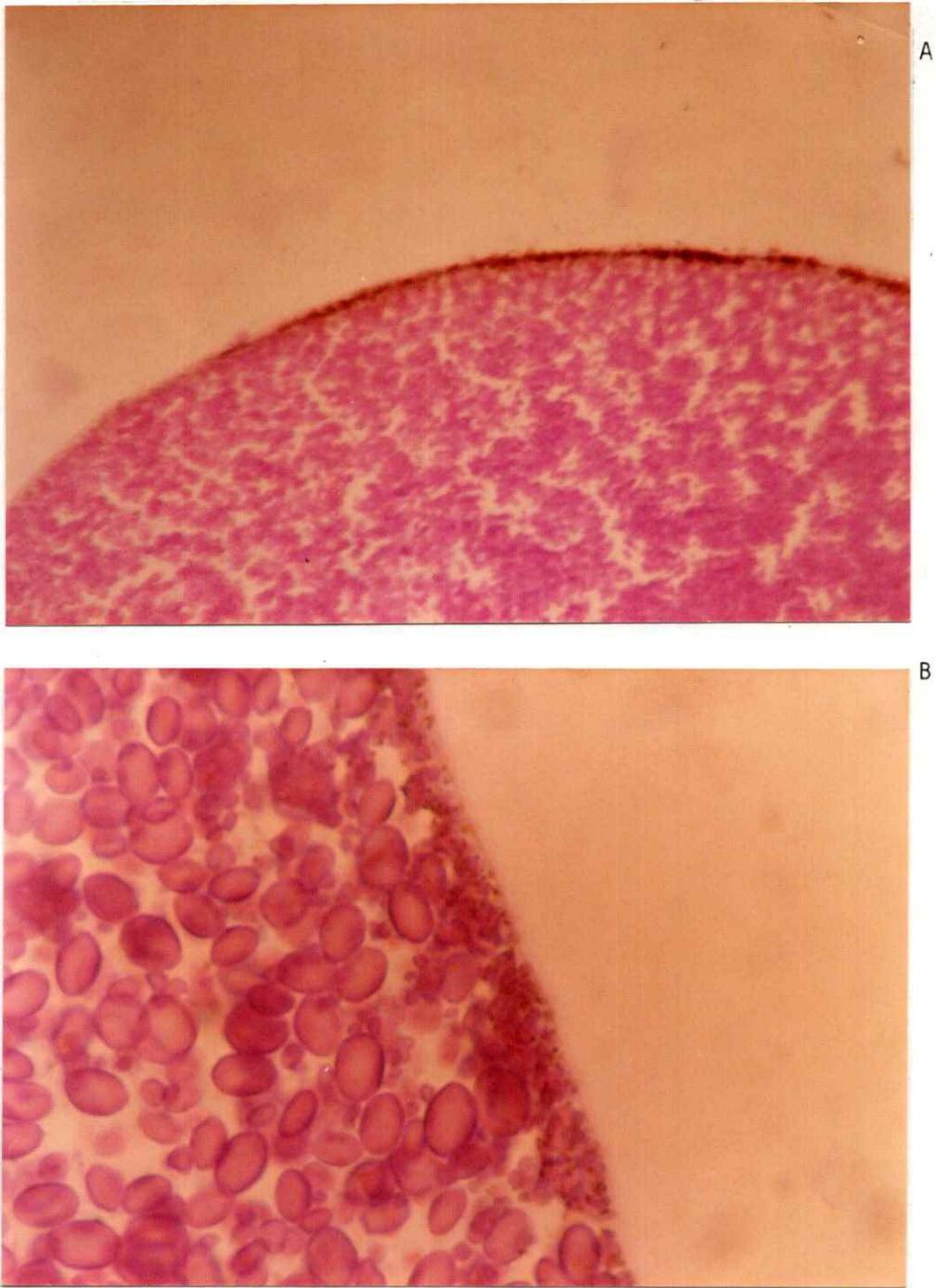


Figura 8. *Oocitos desfoliculados.*

Figura 8. *Oocitos desfoliculados*. Folículos de estado VI se trataron como en el caso de la figura 7, y luego los oocitos y las células foliculares se separaron con pinzas. Los oocitos desfoliculados se fijaron y tiñeron tal como se describe en Materiales y Métodos. A. x 300 B. x 1.200

## 2. *Distribución de la actividad de adenilil-ciclase del folículo en los dos tipos de células.*

La actividad de adenilil-ciclase se determinó en homogeneizados de oocitos y de células foliculares obtenidos manualmente por el procedimiento descrito en el párrafo anterior. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. El tratamiento con la solución para desfolicular no tuvo efecto sobre la actividad de adenilil-ciclase. Los resultados obtenidos muestran que aproximadamente la mitad de la actividad de adenilil-ciclase presente en el folículo de estado VI se encuentra en el oocito, y que la otra mitad se encuentra en las células foliculares. Estas actividades fueron medidas en presencia de fluoruro.

## 3. *Efectos de fluoruro y de GMP.P(NH)P en la adenilil-ciclase de células foliculares.*

Con el fin de caracterizar la actividad de adenilil-ciclase de las células foliculares que rodean al oocito, se estudió el efecto en ella del ión fluoruro y del GMP.P(NH)P. Para ello se utilizaron homogeneizados de células foliculares obtenidas por el procedimiento manual, y los resultados se muestran en la tabla 6 y en la figura 9. En la tabla 6 se puede apreciar que la actividad de adenilil-ciclase de las células foliculares es activada por fluoruro y por GMP.P(NH)P tanto en presencia de  $Mn^{+2}$  como de  $Mg^{+2}$ . Las estimulaciones obtenidas con ambos efectores fueron mayores en presencia de  $Mg^{+2}$  debido a que las actividades basales son menores con este catión. Estos resultados son similares a los obtenidos con la preparación de ovario (Figura 4, p.53)

En la figura 9 se muestra el efecto de la concentración de

TABLA 5

Localización celular de la actividad de adenilil-ciclase

Experimento n°	Actividad de adenilil-ciclase (pmoles cAMP/folículo, oocito o capa folicular)			
	folículos controles	folículos tratados	oocitos des- foliculados	células foliculares
1	17,9±1,9	14,6±1,4	7,1±0,3	—
2	21,4±2,8	20,8±2,1	10,5±1,4	—
3	—	12,7±1,9	—	7,6±0,8
4	7,2±1,5	7,4±0,5	3,7±0,6	3,5±0,1
5	—	8,2±0,3	4,8±0,4	4,6±0,4

Grupos de folículos de estado VI se incubaron en solución salina de Barth para anfibios (controles) o en solución hiperosmótica para desfolicular manualmente (tratados), tal como se describe en Materiales y Métodos. Los oocitos y las células foliculares de algunos de los folículos tratados se separaron manualmente, obteniéndose un oocito y una capa de células foliculares por folículo. Los folículos controles y los tratados, los oocitos desfoliculados y las capas de células foliculares se homogeneizaron tal como se describe en Materiales y Métodos. Alícuotas de los homogeneizados se utilizaron para medir la actividad de adenilil-ciclase a 37° por 15 minutos, en presencia de  $MnCl_2$  5 mM y NaF 10mM. La concentración de ATP fue de 0,1 mM (620 cpm/pmol) en el primer experimento, de 0,06 mM (1300 cpm/pmol) en el segundo, de 0,06 mM (1080 cpm/pmol) en el tercero, de 0,04mM (3930 cpm/pmol) en el cuarto, y de 0,07 mM (730 cpm/pmol) en el quinto. La actividad se expresó por folículo, oocito o capa de células foliculares, y cada experimento corresponde a una preparación y a un animal diferentes.

TABLA 6  
 Efecto de GMP.P(NH)P y NaF en la adenilil-ciclasa de células  
 foliculares

Experimento n°	cación presente en el ensayo	Actividad de adenilil-ciclasa (pmoles cAMP/capa folicular)		
		sin adición	con GMP.P(NH)P	con NaF
1	Mn <sup>+2</sup>	0,38±0,02	0,90±0,02	2,73±0,15
2	Mn <sup>+2</sup>	0,15±0,06	0,50±0,07	2,03±0,12
3	Mg <sup>+2</sup>	0,04±0,02	0,20±0,01	0,72±0,03
4	Mg <sup>+2</sup>	0,02±0,01	0,15±0,02	0,66±0,02

Las capas de células foliculares (cada capa proviene de un folículo) se obtuvieron por el procedimiento manual y se homogeneizaron tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de adenilil-ciclasa se midió en triplicado en alícuotas de los homogeneizados, con MnCl<sub>2</sub> o MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y en presencia o ausencia de GMP.P(NH)P 0,1 mM o NaF 10 mM. Las incubaciones se realizaron a 37° por 15 minutos, y las concentraciones de ATP fueron de 0,114 mM (1.010 cpm/pmol) en el experimento 1, de 0,068 mM (1870 cpm/pmol) en el experimento 2, de 0,1 mM (1.020 cpm/pmol) en el experimento 3, y de 0,312 mM (250 cpm/pmol) en el experimento 4. En cada experimento se utilizaron células foliculares provenientes de diferentes ovarios. Las actividades se expresaron como pmoles formados en 15 minutos por capa folicular.

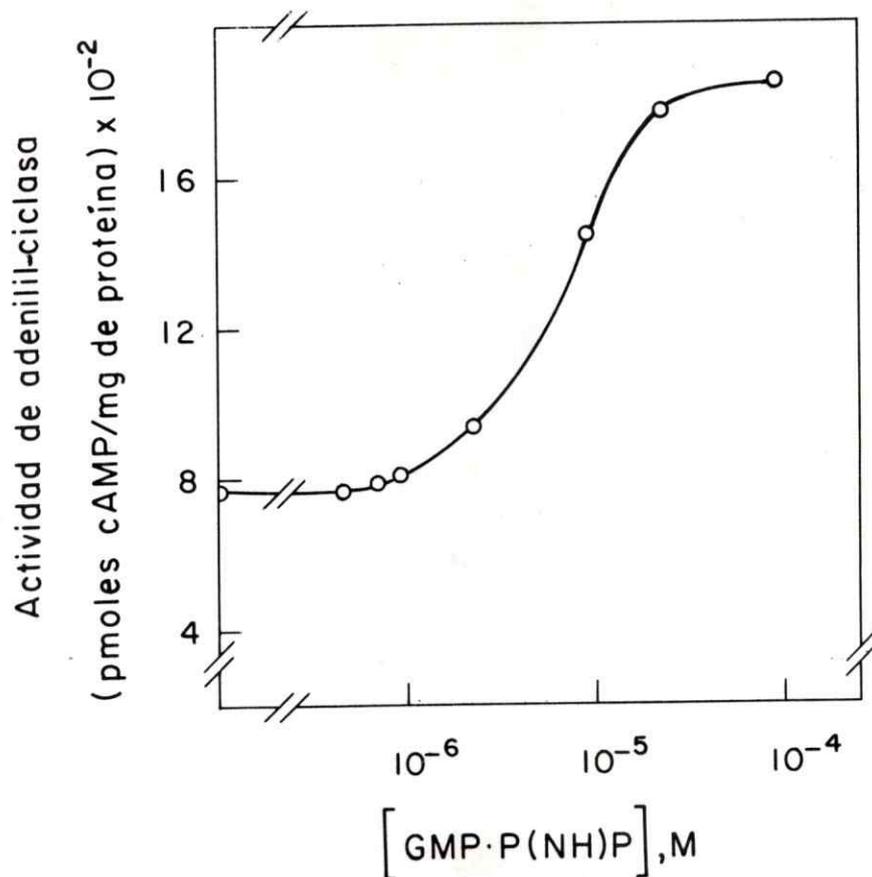


Figura 9. Efecto de la concentración de GMP·P(NH)P en la adenilil-ciclasa de células foliculares. Las células foliculares se obtuvieron por desfoliculación manual de los folículos y se homogeneizaron tal como se describe en Materiales y Métodos. Alícuotas del homogeneizado de células foliculares (7  $\mu$ g de proteína por ensayo) se utilizaron para medir en triplicado la actividad de adenilil-ciclasa a diferentes concentraciones de GMP·P(NH)P. Las incubaciones se realizaron a 37° por 15 minutos, con MnCl<sub>2</sub> 5 mM y con ATP 0,114 mM (1.010 cpm/pmol). Las actividades se expresaron como pmoles de cAMP formados en 15 minutos por mg de proteína.

GMP.P(NH)P sobre la actividad de adenilil-ciclasa de homogeneizados de células foliculares. La activación máxima se obtuvo con una concentración de GMP.P(NH)P cercana a 25  $\mu$ M, y la concentración de GMP.P(NH)P necesaria para obtener la mitad de la activación máxima tuvo un valor entre 4 y 9  $\mu$ M. Estos resultados son similares a los que se obtuvieron con la enzima preparada de ovario (Figura 4).

De estos resultados puede concluirse que, al igual que la mayoría de las adenilil-ciclasas de eucariontes, la adenilil-ciclasa de las células foliculares poseería una subunidad regulatoria G/F que mediaría los efectos activadores de fluoruro y GMP.P(NH)P.

#### 4. Efectos de fluoruro y GMP.P(NH)P en la adenilil-ciclasa de oocitos.

Como se vio en la Introducción, la adenilil-ciclasa de oocitos podría estar involucrada en el mecanismo de la inducción de la maduración meiótica de los oocitos por progesterona (p.5-7). La caracterización de la actividad de adenilil-ciclasa de los oocitos (libre de contaminación con la enzima de células foliculares) es por lo tanto de gran interés. La separación manual de los oocitos y de las células foliculares que los rodean permitió estudiar el efecto de fluoruro y de GMP.P(NH)P en la adenilil-ciclasa de los oocitos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Se puede apreciar que la adenilil-ciclasa de oocitos es activada por fluoruro y por GMP.P(NH)P, al igual que la adenilil-ciclasa de células foliculares (Tabla 6). El GMP.P(NH)P activó 2,6 veces en un experimento y 6,6 veces en otro (en presencia de  $Mn^{+2}$ ). El fluoruro activó 10,8 en un experimento y 39 veces en el otro ( $Mn^{+2}$  en el ensayo). Las diferencias entre un experimento y otro se

TABLA 7

El efecto de GMP.P(NH)P y NaF en la adenilil-ciclasa de oocitos

Experimento n°	Actividad de adenilil-ciclasa (pmoles cAMP/oocito)		
	Sin adición	GMP.P(NH)P 0,1 mM	NaF 10 mM
1	0,66±0,08	1,69±0,12	7,11±0,25
2	0,27±0,02	1,77±0,09	10,52±0,42

Los oocitos desfoliculados se obtuvieron por el procedimiento manual y se homogeneizaron tal como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de adenilil-ciclasa se midió en triplicado en alícuotas del homogeneizado, con  $MnCl_2$  5 mM, y con las adiciones indicadas. Las incubaciones se realizaron a 37° por 15 minutos, y las concentraciones de ATP fueron de 0,1 mM (750 cpm/pmol) en el experimento 1, y de 0,114 mM (910 cpm/pmol) en el experimento 2. En cada experimento se utilizaron oocitos provenientes de ovarios diferentes. Las actividades se expresaron como pmoles de cAMP formados en 15 minutos por oocito.

deben probablemente a diferencias propias de cada animal, y a la gran diferencia existente en la actividad basal. Estas diferencias entre experimentos, observadas tanto para la adenilil-ciclase de oocitos como para la de células foliculares, hacen imposible el establecer con estos resultados si hay diferencias en la sensibilidad de ambas enzimas a la activación por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  y por fluoruro.

Si puede concluirse que la adenilil-ciclase de oocitos tiene características similares a las de la mayoría de las adenilil-ciclasas de eucariontes, y poseería la subunidad G/F que media los efectos activadores de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  y fluoruro. Esto es importante porque es la primera adenilil-ciclase de oocitos descrita y caracterizada.

Los efectos de la toxina del cólera y de la concentración de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  en la actividad de adenilil-ciclase de los oocitos se describen más adelante, en relación con los efectos de la progesterona sobre esta enzima.

##### 5. *Fraccionamiento subcelular de células foliculares y de oocitos.*

La separación manual de oocitos y de células foliculares permitió la obtención de poblaciones homogéneas de ambos tipos de células, y permitió también establecer sin lugar a dudas que ambas células poseen una adenilil-ciclase activada por NaF y  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . Sin embargo, la cantidad reducida de material que se puede obtener por este método limita los estudios de caracterización de las actividades de adenilil-ciclase. Por ello, se decidió utilizar el procedimiento enzimático (tratamiento con colagenasa) para obtener mayores cantidades de oocitos y de células foliculares. La desventaja de este

método es que la preparación de células foliculares puede estar contaminada en alguna medida con tejido conectivo, con células del epitelio peritoneal del ovario y con oocitos previtelogénicos (estado I), y la preparación de oocitos puede tener una pequeña contaminación con células foliculares no disociadas por el tratamiento con colagenasa (Masui, 1967; Dumont, 1972). Sin embargo, es posible limpiar bastante las preparaciones de oocitos y de células foliculares obtenidas por el método enzimático con una selección manual posterior bajo la lupa.

Inicialmente, se estudió con estas preparaciones la distribución de la actividad de adenilil-ciclase en diferentes fracciones subcelulares. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 8. Se puede apreciar que las actividades de adenilil-ciclase de oocitos de estados V y VI y de células foliculares se encuentran asociadas a fracciones particuladas, y que muy poca actividad permanece en el sobrenadante después de centrifugar a 105.000xg. En el caso de los oocitos, en el sobrenadante de 105.000xg se encontró solo un 1% del total de la actividad recuperada, mientras que en el caso de las células foliculares la actividad soluble constituyó sólo un 3% de la actividad total recuperada.

La actividad de adenilil-ciclase del oocito crecido (estados V y VI) se encontró principalmente asociada a la fracción "algodonosa" P<sub>3</sub> (60% del total recuperado) y al sedimento de 1.000xg (P<sub>1</sub>, 33% de la actividad total recuperada). Esta distribución es similar a la que se obtuvo en la preparación de ovario (Tabla 2), con la diferencia que en esta última la actividad asociada a P<sub>1</sub> era menor. Esta diferencia

TABLA 8

Distribución de las actividades de adenilil-ciclasa de oocitos y de células foliculares en diferentes fracciones subcelulares

Fracción	Actividad total de adenilil-ciclasa (pmoles cAMP)	
	oocitos	células foliculares
Sedimento de 1.000xg (P <sub>1</sub> )	7.644	885
Sedimento de 20.000xg (P <sub>2</sub> )	1.099	698
Sedimento de 105.000xg (P <sub>4</sub> )	515	104
Fracción "algodonosa" (P <sub>3</sub> )	13.856	-
Sobrenadante de 105.000xg (S <sub>3</sub> )	270	51

9 ml de oocitos de estados V y VI (aproximadamente 7.200 oocitos) y 0,1 ml de células foliculares se obtuvieron por el procedimiento enzimático y se homogeneizaron y fraccionaron tal como se describe en Materiales y Métodos. Tres alícuotas de cada una de las fracciones obtenidas de oocitos se utilizaron para la determinación de la actividad de adenilil-ciclasa a 37° por 15 minutos, en presencia de MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaF 5 mM y ATP 0,139 mM (500 cpm/pmol). Dos alícuotas de cada una de las fracciones obtenidas de células foliculares se utilizaron para medir la actividad de adenilil-ciclasa a 32° por 20 minutos, en presencia de MgCl<sub>2</sub> 5 mM, GMP.P(NH)P 25 µM y ATP 0,102 mM (440 cpm/pmol). Las actividades totales están expresadas como pmoles de cAMP formados en 15 minutos (oocitos) o en 20 minutos (células foliculares).

se debe probablemente a las condiciones de homogeneización, que fueron más drásticas en el caso del ovario (Materiales y Métodos).

La actividad de adenilil-ciclase de las células foliculares se encontró asociada principalmente a los sedimentos de 1.000xg ( $P_1$ , 51% del total de la actividad recuperada) y de 20.000xg ( $P_2$ , 40% del total de la actividad recuperada). Esta distribución es diferente de la obtenida en las preparaciones de oocitos y de ovario. Esto se debe probablemente a que las células foliculares son más resistentes que los oocitos a la homogeneización ya que las condiciones de homogeneización fueron las mismas en ambos casos. En la preparación de ovario ya se dijo que la homogeneización fue más drástica.

Las actividades de adenilil-ciclase de oocitos y de células foliculares son en gran parte particuladas. Las fracciones particuladas con mayor actividad se utilizaron para estudiar posibles efectos hormonales.

#### EFFECTO HORMONAL EN LA ADENILIL-CICLASA DE OOCITOS.

##### *1. Efecto de progesterona y de prostaglandina $E_1$ .*

La progesterona parece inducir la maduración de los oocitos de anfibios actuando sobre la superficie de éstos y provocando una caída de los niveles intracelulares de cAMP (Introducción). La adenilil-ciclase de los oocitos, que se encuentra en una fracción particulada, podría ser el blanco de la acción de la hormona. Es por ello que se estudió el efecto de la progesterona sobre la actividad de adenilil-ciclase de la fracción  $P_3$  de oocitos de estados V y VI.

En la figura 10 se observa el efecto de la progesterona sobre la adenilil-ciclase de oocitos. La actividad de adenilil-ciclase se midió en presencia de GMP.P(NH)P y resultó ser proporcional a la concentración de proteínas tanto en ausencia como en presencia de progesterona (hasta 0,36 mg de proteínas al menos). La progesterona a una concentración de  $10^{-6}$  M inhibió la actividad de adenilil-ciclase en un 40% aproximadamente. Esta concentración de progesterona induce un 100% de maduración en oocitos de estado VI. En el experimento de la figura 10 y en otros se demostró que la progesterona no inhibía a la adenilil-ciclase debido a un aumento de una actividad ATPásica que hidrolizara al  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP utilizado como sustrato. Para ello, alícuotas del medio de incubación del ensayo de adenilil-ciclase se analizaron después de terminada la reacción por cromatografía ascendente en papel de DEAE-celulosa (Materiales y Métodos). La hidrólisis del sustrato no sobrepasó nunca un 5%, y fue siempre igual en presencia y en ausencia de progesterona. Hay que recordar a este respecto que en el ensayo de adenilil-ciclase se utilizaba un sistema regenerador de ATP constituido por fosfocreatina y creatina-fosfoquinasa.

La única otra hormona probada fue la prostaglandina  $E_1$ , que activa por medio de receptores específicos a las adenilil-ciclasas de varios tejidos (plaquetas humanas, híbrido de neuroblastoma y glioma, eritrocitos de anfibios, tejido ovárico de mamíferos, etc...). Los resultados de la Tabla 9 muestran que la prostaglandina  $E_1$   $10 \mu\text{M}$  no afecta significativamente a la actividad de adenilil-ciclase de oocitos, ya sea medida ésta en ausencia de nucleótidos de guanosina o en

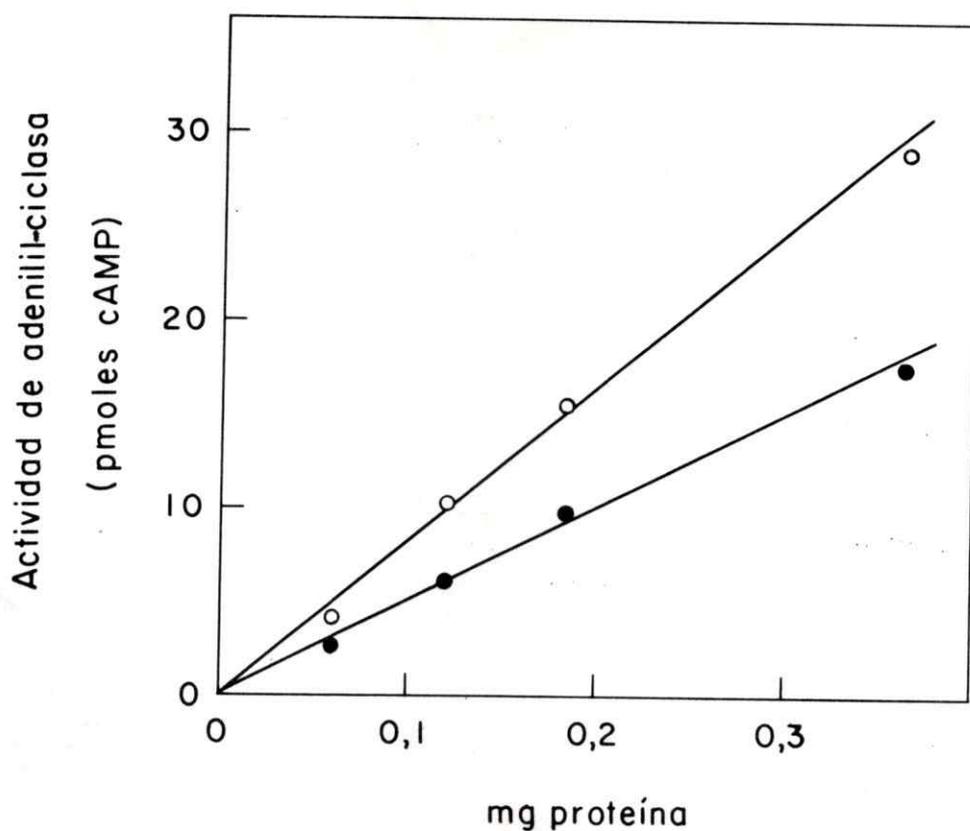


Figura 10. Efecto de la progesterona en la adenilil-ciclasa de oocitos. Los oocitos de estados V y VI se obtuvieron por el procedimiento enzimático, y los homogeneizados se prepararon y fraccionaron tal como se describe en Materiales y Métodos. Alícuotas de la fracción  $P_3$  se utilizaron para determinar en triplicado la actividad de adenilil-ciclasa en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$   $25\ \mu\text{M}$  y en presencia (●) o ausencia (O) de progesterona  $10^{-6}\ \text{M}$ . Las incubaciones se realizaron a  $32^\circ$  por 20 minutos, en presencia de  $\text{MgCl}_2$   $5\ \text{mM}$  y  $\text{ATP}$   $0,103\ \text{mM}$  ( $270\ \text{cpm/pmol}$ ). Las actividades se expresaron como pmoles de cAMP formados en 20 minutos.

TABLA 9

Ausencia de efecto de Prostaglandina E<sub>1</sub> sobre la adenilil-ciclase de oocitos

Adición al ensayo	Actividad de adenilil-ciclase (pmoles cAMP/mg de proteína)		
	sin PGE <sub>1</sub>	con PGE <sub>1</sub>	+PGE <sub>1</sub> /-PGE <sub>1</sub>
ninguna	11,5±1,2	10,9±0,9	0,95
GTP 25 μM	13,1±0,3	11,8±0,6	0,90
GMP.P(NH)P 25 μM	70,7±2,4	65,2±5,5	0,92

Oocitos de estados V y VI se obtuvieron por el método enzimático y los homogeneizados se prepararon y fraccionaron tal como se describe en Materiales y Métodos. Alícuotas de la fracción "algodonosa" P<sub>3</sub> (0,17 mg de proteína por ensayo) se utilizaron para determinar en triplicado la actividad de adenilil-ciclase en presencia o ausencia de GTP 25 μM, GMP.P(NH)P 25 μM y prostaglandina E<sub>1</sub> 10 μM. Las incubaciones se realizaron a 32° por 20 minutos, en presencia de MgCl<sub>2</sub> 5 mM y de ATP 0,102 mM (280 cpm/pmol). Las actividades se expresaron como pmoles de cAMP formados en 20 minutos por mg de proteína.

presencia de ellos. En otro experimento similar se determinó que la prostaglandina  $E_1$  a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  tampoco afectaba a la actividad de adenilil-ciclase medida en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ .

La posible relación entre la inhibición de la adenilil-ciclase de oocitos por progesterona y el proceso de maduración meiótica de los oocitos hizo necesaria una caracterización más detallada del efecto de la hormona en la adenilil-ciclase de estas células.

## *2. Efecto de la concentración de progesterona y especificidad del tejido blanco.*

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de progesterona sobre las actividades de adenilil-ciclase medidas en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  de las fracciones particuladas  $P_3$  y  $P_2$  de oocitos de estados V y VI y de células foliculares respectivamente. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 11. Se puede apreciar que la progesterona inhibe la actividad de adenilil-ciclase del oocito y no afecta a la adenilil-ciclase de las células foliculares. En el experimento ilustrado en la figura 11 la progesterona a una concentración de  $10^{-5}$  M inhibió la actividad de adenilil-ciclase de la fracción particulada de oocitos en un 50% en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$   $25 \mu\text{M}$  y en un 65% en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$   $3,3 \mu\text{M}$ . La inhibición de la adenilil-ciclase de oocitos parece además ser saturable: la inhibición máxima se obtuvo con concentraciones de progesterona entre  $10^{-6}$  M y  $10^{-5}$  M, tanto en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$   $25 \mu\text{M}$  como en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$   $3,3 \mu\text{M}$ . Aún aumentando las concentraciones de progesterona a  $3,3 \times 10^{-4}$  M la inhibición no fue diferente de la observada con progesterona  $10^{-5}$  M.

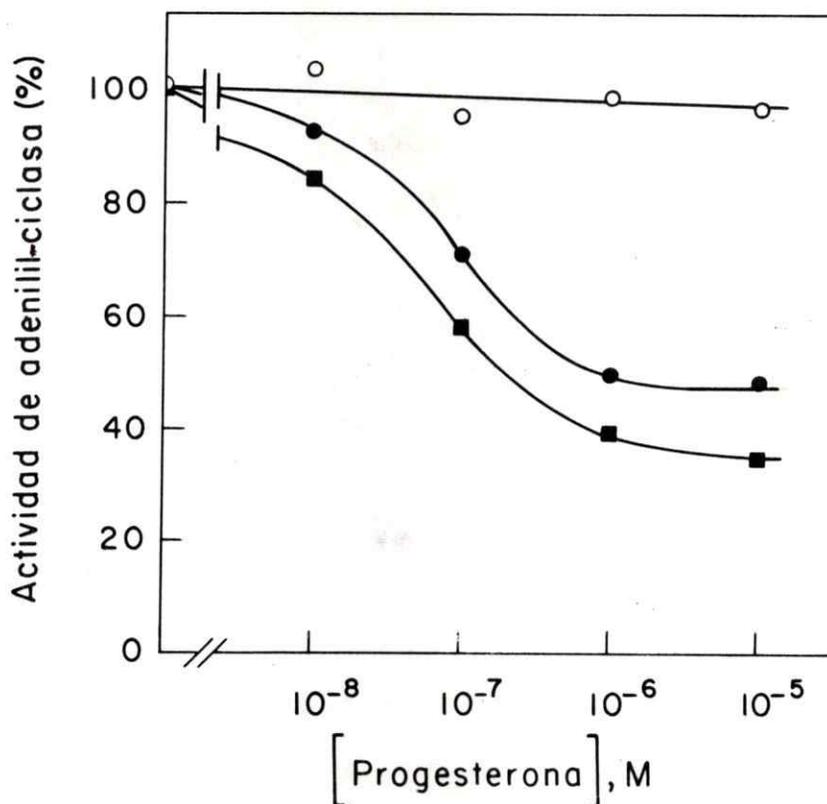


Figura 11. Efecto de la concentración de progesterona sobre las adenilil-ciclasas de oocitos y de células foliculares. Los oocitos de estados V y VI y las células foliculares se separaron por el método enzimático, y los homogeneizados se prepararon y fraccionaron tal como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades de adenilil-ciclasa de las fracciones particuladas P<sub>2</sub> de células foliculares (O; 8  $\mu$ g de proteína por ensayo) y P<sub>3</sub> de oocitos (●, ■; 0,17 mg de proteína por ensayo) se midieron en triplicado a diferentes concentraciones de progesterona. Las incubaciones se realizaron a 32° por 20 minutos, en presencia de GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M (●, O) o 3,3  $\mu$ M (■), MgCl<sub>2</sub> 5 mM y ATP 0,102 mM (240 cpm/pmol). Las actividades están expresadas como porcentajes de la actividad medida en ausencia de progesterona, la que fue de 1009 pmoles cAMP/mg de proteína/20 min en el caso de las células foliculares, y de 69,7 y 43,2 pmoles de cAMP/mg de proteína/20 min en el caso de los oocitos (GMP.P(NH)P 25 y 3,3  $\mu$ M respectivamente).

Por otro lado, la mitad de la inhibición máxima se obtuvo con concentraciones similares de progesterona (entre  $5$  y  $8 \times 10^{-8}$  M) en presencia de ambas concentraciones de GMP.P(NH)P. Esto indicaría que la progesterona inhibe en un mayor grado en presencia de concentraciones bajas de GMP.P(NH)P, pero la inhibición presenta la misma dependencia de la concentración de progesterona a distintas concentraciones de GMP.P(NH)P. Es importante además destacar que hay una buena correlación entre las concentraciones de progesterona que inhiben a la adenilil-ciclase de oocitos y las que inducen la maduración. Por ejemplo, Finidori-Lepicard y col. (1981) encontraron que una concentración de progesterona de  $10^{-7}$  M era capaz de inducir un 50% de maduración. Esta concentración es similar a la que produce un 50% de la inhibición máxima de la adenilil-ciclase (Figura 11). En el experimento de la figura 11 y en otros la inhibición de la adenilil-ciclase nunca fue total (40 a 70% en general). Esto es similar a lo que se ha observado en otros sistemas de adenilil-ciclase que son inhibidos por hormonas o neurotransmisores (Introducción).

La actividad de adenilil-ciclase de la fracción particulada  $P_2$  de células foliculares, medida en presencia de GMP.P(NH)P  $25 \mu\text{M}$ , no fue inhibida por ninguna concentración de progesterona (Figura 11). Además se determinó que las actividades de adenilil-ciclase presentes en las fracciones particuladas  $P_1$  y  $P_3$  de células foliculares no eran tampoco inhibidas por la hormona, mientras que la escasa actividad de adenilil-ciclase presente en la fracción  $P_2$  de oocitos (Tabla 8) era inhibida por concentraciones crecientes de progesterona en forma similar a lo que se observó con la fracción  $P_3$  (resultados que no se

muestran). Por último, la actividad de adenilil-ciclase de la fracción P<sub>2</sub> de células foliculares tampoco fue inhibida cuando se midió en presencia de GTP en lugar de GMP.P(NH)P (resultado que no se muestra).

Estos resultados demuestran que la progesterona es capaz de inhibir en forma saturable, y a concentraciones compatibles con el efecto fisiológico, a la adenilil-ciclase de la célula blanco, y no afecta a la adenilil-ciclase de otra célula del mismo ovario.

### 3. Efecto de la progesterona en la adenilil-ciclase de oocitos de diferentes estados de la oogénesis.

Los oocitos de diferentes estados (I a VI; Dumont, 1972) (Apéndice, Figura 19) pueden ser separados por tratamiento del ovario con colagenasa y posterior paso a través de mallas de distinto tamaño de poro (Materiales y Métodos). Por este método se obtuvieron en varios experimentos cuatro grupos de oocitos: oocitos de estados I y II, oocitos de estado III, oocitos de estado IV y oocitos de estados V y VI. En los experimentos en que se determinó que la progesterona inhibe a la adenilil-ciclase de oocitos (Figuras 10 y 11), se utilizó una mezcla de oocitos de estados V y VI. La progesterona sólo es capaz de inducir la maduración de los oocitos de estado VI en condiciones estándares (en solución de Barth para anfibios), y de los oocitos de estado V en ciertas condiciones, tales como incubación en un medio sin K<sup>+</sup> (Kofoid y col., 1979). Sin embargo, los oocitos más pequeños no son capaces de madurar en presencia de progesterona. Resultaba entonces interesante estudiar el efecto de la progesterona en la adenilil-ciclase de oocitos de diferentes estados de la oogénesis. Para ello, se prepararon fracciones particuladas de los

oocitos de diferentes estados, y en ellas se midió el efecto de GMP.P(NH)P y de progesterona sobre la actividad de adenilil-ciclase. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10 y en la figura 12. Se puede apreciar que la progesterona inhibe en forma significativa a la adenilil-ciclase de los oocitos de diferentes estados de la oogénesis. El grado de inhibición obtenido con progesterona  $10^{-6}$  M fue variable según la preparación (40-60% de inhibición en el caso de los oocitos de estados V y VI, 20-35% en el caso de los oocitos de estados I y II) pero consistentemente mayor en el caso de los oocitos de estados V y VI que en el caso de los oocitos que no maduran en presencia de progesterona (I a IV) (Tabla 10, Figura 12). Por otro lado, en el experimento 1 de la tabla 10 la efectividad de la progesterona en inhibir a la adenilil-ciclase fue similar en los oocitos de estados I a IV, y sólo aumentó notoriamente en el grupo de los oocitos que son capaces de madurar en presencia de progesterona. Esto podría indicar que hay una correlación entre el grado de inhibición de la adenilil-ciclase por progesterona y la capacidad de la progesterona de inducir la maduración. Se necesitarán estudios más detallados para establecer esta correlación.

El menor grado de inhibición observado con los oocitos de estados I a IV no se debe al parecer a una menor afinidad aparente de la progesterona por el sistema de adenilil-ciclase. En el experimento ilustrado en la figura 12 se determinó que la inhibición de la adenilil-ciclase de los oocitos de estados I y II es también saturable, y que la saturación se obtiene con las mismas concentraciones que en el

TABLA 10

Efecto de la progesterona sobre la adenilil-ciclasa de oocitos de diferentes estados de la oogénesis

Experi- mento n°	Estados de la oogénesis	Actividad de adenilil-ciclasa (pmoles cAMP/mg proteína)			
		basal	GMP.P(NH)P	GMP.P(NH)P y progesterona	% de inhibición por hormona
1	I y II	1,4±0,2	3,7±0,1	2,6±0,3	30
	III	1,4±0,2	9,0±0,3	6,1±0,4	32
	IV	1,0±0,1	12,7±0,4	9,7±1,4	24
	V y VI	1,1±0,1	34,5±3,4	17,2±0,8	50
2	I y II	4,1±0,5	22,0±1,0	16,4±1,1	25
	V y VI	5,7±1,8	65,1±2,5	38,3±2,3	41
3	I y II	3,7±0,5	20,3±0,7	13,7±1,4	33
	V y VI	4,1±1,2	60,8±3,5	26,4±1,9	57

TABLA 10

Los oocitos de diferentes estados de la oogénesis se separaron por tratamiento con colagenasa y paso a través de mallas (Materiales y Métodos). Los homogeneizados se prepararon y fraccionaron tal como se describe en Materiales y Métodos, pero con las siguientes modificaciones: los homogeneizados se diluyeron a 0,22 M sacarosa con solución B antes de ser centrifugados; en los experimentos 2 y 3 se omitió la centrifugación a 20.000xg en el caso de los oocitos de estados I y II. Para medir la actividad de adenilil-ciclasa se utilizaron los sedimentos de 105.000xg, que incluían: en el experimento 1, a las fracciones P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub>; en los experimentos 2 y 3, a las fracciones P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub> en el caso de los oocitos de estados V y VI, a las fracciones P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub> en el caso de los oocitos de estados I y II. La actividad se midió en triplicado, con MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 0,102 mM, y en ausencia (basal) y presencia de GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M, o de éste y progesterona 10<sup>-6</sup> M. Las incubaciones se realizaron a 32° por 20 minutos. Las actividades se expresaron como pmoles de cAMP formados en 20 minutos por mg de proteína.

Experimento 1: ATP 1.160 cpm/pmol; estados I y II: 0,22 mg de proteína por ensayo; III: 0,46 mg de proteína por ensayo; IV: 0,14 mg de proteína por ensayo; V y VI: 0,09 mg de proteína por ensayo.

Experimento 2: ATP 830 cpm/pmol; estados I y II: 0,2 mg de proteína por ensayo; V y VI: 0,2 mg de proteína por ensayo. Experimento 3: 755 cpm/pmol; estados V y VI: 0,23 mg de proteína por ensayo; I y II: 0,28 mg de proteína por ensayo.

El significado de las inhibiciones por progesterona fue: experimento 1,  $p < 0,0025$  para los estados I y II,  $p < 0,0005$  para el estado III,  $p < 0,0125$  para el estado IV y  $p < 0,0005$  para los estados V y VI; experimento 2:  $p < 0,0005$  para los estados I y II, y V y VI; experimento 3:  $p < 0,0025$  para los estados I y II, y  $p < 0,0005$  para los estados V y VI.

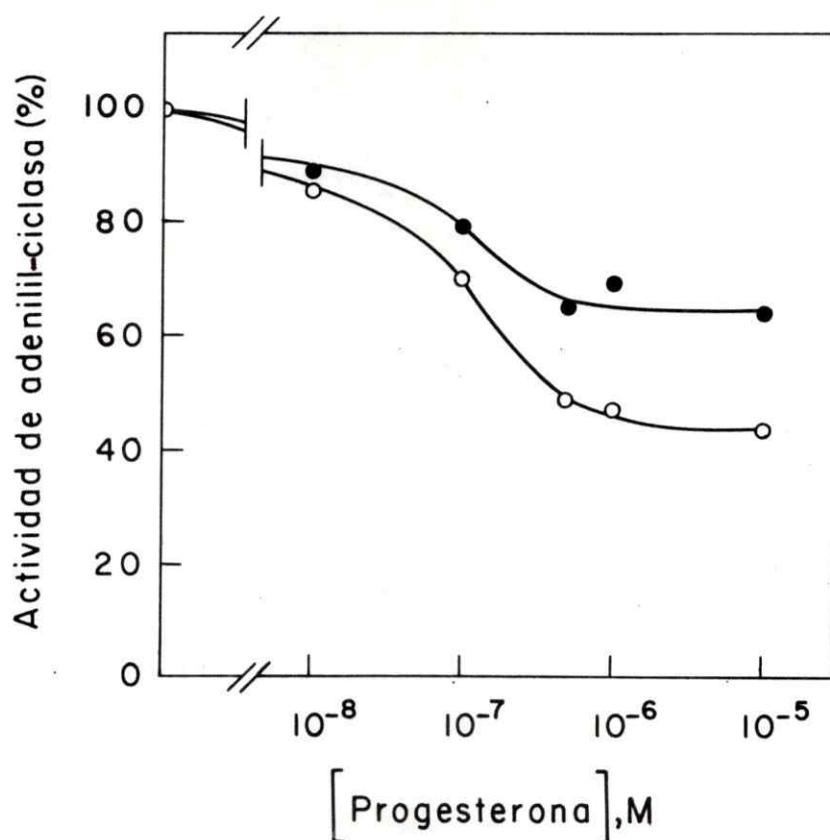


Figura 12. Efecto de la concentración de progesterona sobre las adenilil-ciclasas de oocitos de diferentes estados de la ovogénesis. Oocitos de estados I y II y de estados V y VI se separaron (método enzimático) y homogeneizaron tal como se describe en Materiales y Métodos. Alícuotas de la fracción particulada (0,28 mg de proteína por ensayo de una fracción que incluye a  $P_2$ ,  $P_3$  y  $P_4$  de oocitos de estados I y II; 0,23 mg de proteína por ensayo de una fracción que incluye a  $P_3$  y  $P_4$  de oocitos de estados V y VI) se utilizaron para medir en triplicado la actividad de adenilil-ciclasa a diferentes concentraciones de progesterona. Las incubaciones se realizaron a  $32^\circ$  por 20 minutos, en presencia de GMP.P(NH)P  $25 \mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $5 \text{ mM}$  y ATP  $0,102 \text{ mM}$  ( $755 \text{ cpm/pmol}$ ). Las actividades están expresadas como porcentajes de la actividad medida en ausencia de progesterona, la que fue de  $20,3 \text{ pmoles de cAMP/mg de proteína}$  en el caso de los oocitos de estados I y II, y de  $60,8 \text{ pmoles de cAMP/mg de proteína}$  en el caso de los oocitos de estados V y VI. ●, oocitos de estados I y II; ○, oocitos de estados V y VI.

caso de los oocitos de estados V y VI (alrededor de  $10^{-6}$  M) (Figura 12). La mitad de la inhibición máxima de las adenilil-ciclasas de ambos grupos de oocitos se obtuvo también con concentraciones similares de progesterona (alrededor de  $10^{-7}$  M). Puede concluirse entonces que las concentraciones de hormona requeridas para la inhibición son similares, pero que la inhibición máxima es mayor en los oocitos de estados V y VI.

En la tabla 10 se puede apreciar también que durante la ovogénesis parece aumentar la sensibilidad de la adenilil-ciclasa de los oocitos a la activación por GMP.P(NH)P  $25 \mu\text{M}$ . El grado de activación por GMP.P(NH)P resultó muy variable según el experimento, probablemente debido a diferencias entre animales y a la imprecisión en la determinación de la actividad basal (por ejemplo, la adenilil-ciclasa de los oocitos de estados V y VI fue activada por GMP.P(NH)P 31 veces, 11 veces, y 15 veces en los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente). Sin embargo, se observó consistentemente que la activación por GMP.P(NH)P aumenta notoriamente durante la ovogénesis (Tabla 10).

Si las actividades de adenilil-ciclasa de los experimentos 2 y 3 de la tabla 10 se expresan por oocito, se observa un gran aumento de la actividad de adenilil-ciclasa particulada durante la ovogénesis. En el experimento 2 la actividad basal aumentó 16 veces entre los estados I y II y los estados V y VI (de 3,2 a 52,2 fmoles de cAMP/oocito/20 min) y la actividad medida en presencia de GMP.P(NH)P aumentó 35 veces (de 17 a 601 fmoles de cAMP/oocito/20 min). En el experimento 3, la actividad basal aumentó 11 veces entre los estados I y II y los estados V

y VI (de 4,2 a 44,6 fmoles de cAMP/oocito/20 min), y la actividad medida en presencia de GMP.P(NH)P aumentó 29 veces (de 23 a 667 fmoles de cAMP/oocito/20 min). Hay que hacer notar que en el caso del experimento 1 no se pudieron estimar las actividades por oocito por cuanto se utilizaron fracciones particuladas que incluían sólo a P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub>. En oocitos de estados V y VI la actividad se encuentra asociada a la fracción P<sub>3</sub> en las condiciones de homogeneización y fraccionamiento utilizadas (Tabla 8), pero al menos en el caso de los oocitos de estados I y II gran parte de la actividad está asociada a la fracción P<sub>2</sub>. Esto explica porqué las actividades específicas de adenilil-ciclase de los oocitos de estados I y II fueron menores en el experimento 1. La presencia de actividad de adenilil-ciclase en la fracción P<sub>2</sub> de oocitos de estados I y II no se debe a contaminación de éstos con células foliculares ya que la observación microscópica de estos oocitos fijados con TCA al 5% en presencia de azul de Evans (0,5 mg/ml) mostró que habían sido bien desfoliculados por el tratamiento con colagenasa. La distribución diferente de la actividad de adenilil-ciclase de los oocitos de estados I y II se debe probablemente a una mayor resistencia de éstos a la homogeneización.

Aunque las estimaciones de la actividad por oocito en los experimentos 2 y 3 son sólo aproximadas, debido a que no se conoce la recuperación de la actividad total en las fracciones particuladas utilizadas, es posible afirmar que durante la oogénesis se produce un aumento de la actividad basal de adenilil-ciclase, un aumento de la activación por GMP.P(NH)P y un aumento de la inhibición por progesterona.

## CARACTERIZACION DE LA INHIBICION POR PROGESTERONA DE LA ADENILIL-CICLASA DE OOCITOS.

Los experimentos que se han mostrado sobre el efecto de la progesterona sobre la adenilil-ciclase de los oocitos se realizaron en presencia de  $GMP\cdot P(NH)P$ , un activador de la mayoría de las adenilil-ciclasas. Este hecho resulta por ahora ser único en los sistemas de inhibición de la adenilil-ciclase por hormonas o neurotransmisores. En efecto, en estos sistemas la inhibición no se observa en presencia de  $GMP\cdot P(NH)P$  (Introducción). Se decidió estudiar y caracterizar más en detalle la inhibición de la adenilil-ciclase de oocitos por progesterona en cuanto al posible mecanismo de acción de la hormona.

### 1. *Requerimiento de nucleótidos de guanosina.*

Se estudió el efecto de la progesterona sobre la actividad de adenilil-ciclase de la fracción particulada  $P_3$  de oocitos de estados V y VI medida en presencia de varios activadores. Los resultados se muestran en las tablas 11 y 12. Se puede apreciar en la tabla 11 que la actividad medida en presencia de  $MnCl_2$  es mayor que la actividad medida en presencia de  $MgCl_2$ , y que en presencia de éste último la adenilil-ciclase es estimulada por fluoruro,  $GMP\cdot P(NH)P$  y GTP (en menor grado). Todo esto no hace sino confirmar los resultados que se obtuvieron con preparaciones de ovarios y de oocitos defoliculados manualmente. Como ya se describió, la progesterona es capaz de inhibir claramente la actividad de adenilil-ciclase cuando ésta se mide en presencia de  $GMP\cdot P(NH)P$ . En los experimentos 1 y 2 ilustrados en la tabla 11 la progesterona inhibió en un 55 y en un 40% la actividad

TABLA 11

Requerimiento de nucleótidos de guanosina para la inhibición por progesterona de la adenilil-ciclase de oocitos

Experimento n°	Adición al ensayo	Actividad de adenilil-ciclase (pmoles cAMP/mg proteína)		
		sin pro- gesterona	con pro- gesterona	% inhibición por hormona
1	ninguna	1,7± 0,1	1,7±0,1	0
	MnCl <sub>2</sub> 5 mM	5,9± 0,1	6,4±1,4	0
	GTP 25 µM	2,7± 0,3	1,9±0,1	30
	GMP.P(NH)P 25 µM	31,3± 1,0	14,0±0,3	55
	NaF 5 mM	46,1± 4,4	49,2±3,5	0
2	ninguna	3,7± 1,2	3,1±0,6	16
	MnCl <sub>2</sub> 5 mM	15,5± 1,5	15,5±0,9	0
	GTP 25 µM	6,5± 0,6	4,4±0,2	32
	GMP.P(NH)P 25 µM	94,2±17,7	56,2±7,9	40
	NaF 5 mM	83,7± 9,7	82,1±5,7	0

Oocitos de estados V y VI se obtuvieron por el método enzimático. La fracción P<sub>3</sub> se preparó tal como se describe en Materiales y Métodos. Alícuotas de esta fracción (0,16 mg de proteína en el experimento 1; 0,09 mg de proteína en el experimento 2) se ensayaron en triplicado con las adiciones que se indican y en presencia de MgCl<sub>2</sub> 5 mM, excepto cuando se agregó MnCl<sub>2</sub> 5 mM. En el experimento 1, las incubaciones se realizaron a 37° por 15 minutos, con ATP 0,114 mM (1.150 cpm/pmol) y en presencia y en ausencia de progesterona 3,3 x 10<sup>-4</sup> M. En el experimento 2, las incubaciones se realizaron a 32° por 20 minutos, con ATP 0,102 mM (1.390 cpm/pmol) y en presencia y en ausencia de progesterona 10<sup>-6</sup> M. Los experimentos 1 y 2 corresponden a preparaciones provenientes de distintos ovarios. Las actividades se expresaron como pmoles de cAMP formados en 15 minutos (exp.1) o 20 minutos (exp.2) por mg de proteína.

medida en presencia de GMP.P(NH)P. La progesterona también fue capaz de inhibir a la adenilil-ciclasa medida en presencia de GTP. Los valores determinados para la inhibición deben ser considerados en este caso como aproximados, ya que las actividades medidas en presencia de GTP son bajas, y por lo tanto menos precisas. Sin embargo, las inhibiciones observadas en presencia de GTP fueron significativas ( $p < 0,01$  en el experimento 1;  $p < 0,005$  en el experimento 2) y se observaron consistentemente en estos y otros experimentos.

En contraste con el efecto inhibitorio de la progesterona observado en presencia de nucleótidos de guanosina (GMP.P(NH)P, GTP), la progesterona no tuvo efecto sobre la actividad de adenilil-ciclasa medida en presencia de  $MnCl_2$  o de fluoruro (Tabla 11). Los resultados obtenidos con la actividad basal ( $MgCl_2$ , en ausencia de activadores) fueron variables. Por ejemplo en el experimento 1 de la tabla 11 no se observó un efecto de la progesterona en la actividad basal. En el experimento 2 se observó una ligera inhibición, pero esta resultó no ser estadísticamente significativa. En algunos experimentos fue posible determinar efectos inhibitorios significativos de la progesterona en la actividad basal. Probablemente esto se deba a la presencia de nucleótidos de guanosina contaminantes en la fracción particulada de oocitos o en algún otro componente del ensayo de adenilil-ciclasa.

En la tabla 12 se muestran los resultados que se obtuvieron al incubar la fracción particulada  $P_3$  de oocitos con toxina del cólera y  $NAD^+$ . La actividad basal no pudo ser detectada en las condiciones del ensayo ni en membranas tratadas con toxina del cólera ni en membranas

TABLA 12

Efecto de la toxina del cólera en la inhibición por progesterona de la adenilil-ciclasa de oocitos

Tratamiento	Adición al ensayo	Actividad de adenilil-ciclasa (pmoles cAMP/mg proteína)		
		sin progesterona	con progesterona	% inhibición por hormona
Preincubación sin toxina	GTP 25 $\mu$ M	2,5 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 2,5	0
	GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	46,0 $\pm$ 1,0	14,7 $\pm$ 2,0	68
Preincubación con toxina	GTP 25 $\mu$ M	20,0 $\pm$ 0,0	6,6 $\pm$ 0,9	67
	GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	42,4 $\pm$ 1,3	22,6 $\pm$ 1,3	47

La fracción "algodonosa" P<sub>3</sub> de oocitos de estados V y VI se preparó de la manera descrita en la leyenda de la tabla 11. Esta fracción (5 mg de proteínas por ml) se incubó en presencia o en ausencia de toxina del cólera preactivada (0,2 mg/ml) tal como se describe en Materiales y Métodos, y se lavó por sedimentación a 105.000xg. La actividad de adenilil-ciclasa se midió en triplicado utilizando alícuotas de P<sub>3</sub> tratada con toxina del cólera (0,07 mg de proteínas por ensayo) y de P<sub>3</sub> preincubada en ausencia de la toxina (0,06 mg de proteínas por ensayo). Las incubaciones se realizaron a 37° por 15 minutos, con MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 0,102 mM (450 cpm/pmol), con las adiciones que se indican y con y sin progesterona 3,3 x 10<sup>-4</sup> M. Las actividades se expresaron en pmoles de cAMP formados durante la incubación por mg de proteína.

incubadas en ausencia de la toxina. En la fracción particulada tratada con toxina del cólera la actividad fue fuertemente estimulada por GTP, mientras que la activación por GMP.P(NH)P no se modificó significativamente. La aparición de una fuerte estimulación por GTP en la fracción particulada tratada con la toxina va acompañada de una inhibición clara de esta activación por progesterona. En el experimento de la tabla 12, la progesterona inhibió en un 67% la actividad de la fracción particulada tratada con toxina y medida en presencia de GTP. El tratamiento con la toxina parece disminuir el efecto inhibitorio de la progesterona en presencia de GMP.P(NH)P (la inhibición por progesterona disminuyó de 68 a 47%). Esta observación no tiene por ahora explicación.

De los resultados presentados en las tablas 11 y 12 se puede concluir que la inhibición de la adenilil-ciclase de oocitos por progesterona requiere de nucleótidos de guanosina, se observa en presencia de GMP.P(NH)P y en presencia de GTP, y también se observa en presencia de GTP en membranas tratadas con toxina del cólera. El hecho adicional de que la progesterona no afecta a la actividad medida en presencia de fluoruro indicaría que la hormona interfiere con la regulación de la función de G/F por los nucleótidos de guanosina.

## *2. Efecto de la progesterona en la activación de la adenilil-ciclase por GMP.P(NH)P.*

a) Efecto de la progesterona en la cinética de activación por GMP.P(NH)P. Como una manera de estudiar si la progesterona interfiere con la activación de la adenilil-ciclase de oocitos por nucleótidos de

guanosina, se determinó el efecto de la hormona en la cinética de activación de la enzima por este análogo no hidrolizable del GTP. Los resultados se muestran en la figura 13. Se puede apreciar que la activación de la adenilil-ciclase de oocitos por GMP.P(NH)P presenta un período inicial de latencia. La curva de progreso de la reacción es similar a la observada con la preparación de ovario (Figura 1) y en otros sistemas. Los períodos de latencia observados en ausencia de progesterona fueron variables según la preparación de fracción particulada utilizada y las condiciones de ensayo de la actividad. Sin embargo, la progesterona fue siempre capaz de alargar significativamente este período de latencia. Este efecto se observó con progesterona  $3,3 \times 10^{-4}M$  (Figura 13A) y progesterona  $10^{-6}M$  (Figura 13B), y en presencia de GMP.P(NH)P  $1\mu M$ ,  $3,3 \mu M$  (Figura 13B) o  $25 \mu M$  (Figura 13A). La progesterona parece entonces inhibir la reacción de activación de la adenilil-ciclase por GMP.P(NH)P.

En las figuras 13A y 13B se puede apreciar que la progesterona también disminuye la velocidad de formación de cAMP medida en el estado estacionario. Sin embargo, este efecto parece ser más importante a menores concentraciones de GMP.P(NH)P. En presencia de GMP.P(NH)P  $25 \mu M$ , la progesterona inhibió en un 17% la velocidad de la reacción en estado estacionario (Figura 13A), mientras que en presencia de GMP.P(NH)P  $1 \mu M$  y  $3,3 \mu M$  la disminución de la pendiente del estado estacionario fue de un 57% y de un 47% respectivamente (Figura 13B). La inhibición por progesterona observada en experimentos anteriores en presencia de GMP.P(NH)P  $25 \mu M$  se debía por lo tanto principalmente al efecto de la

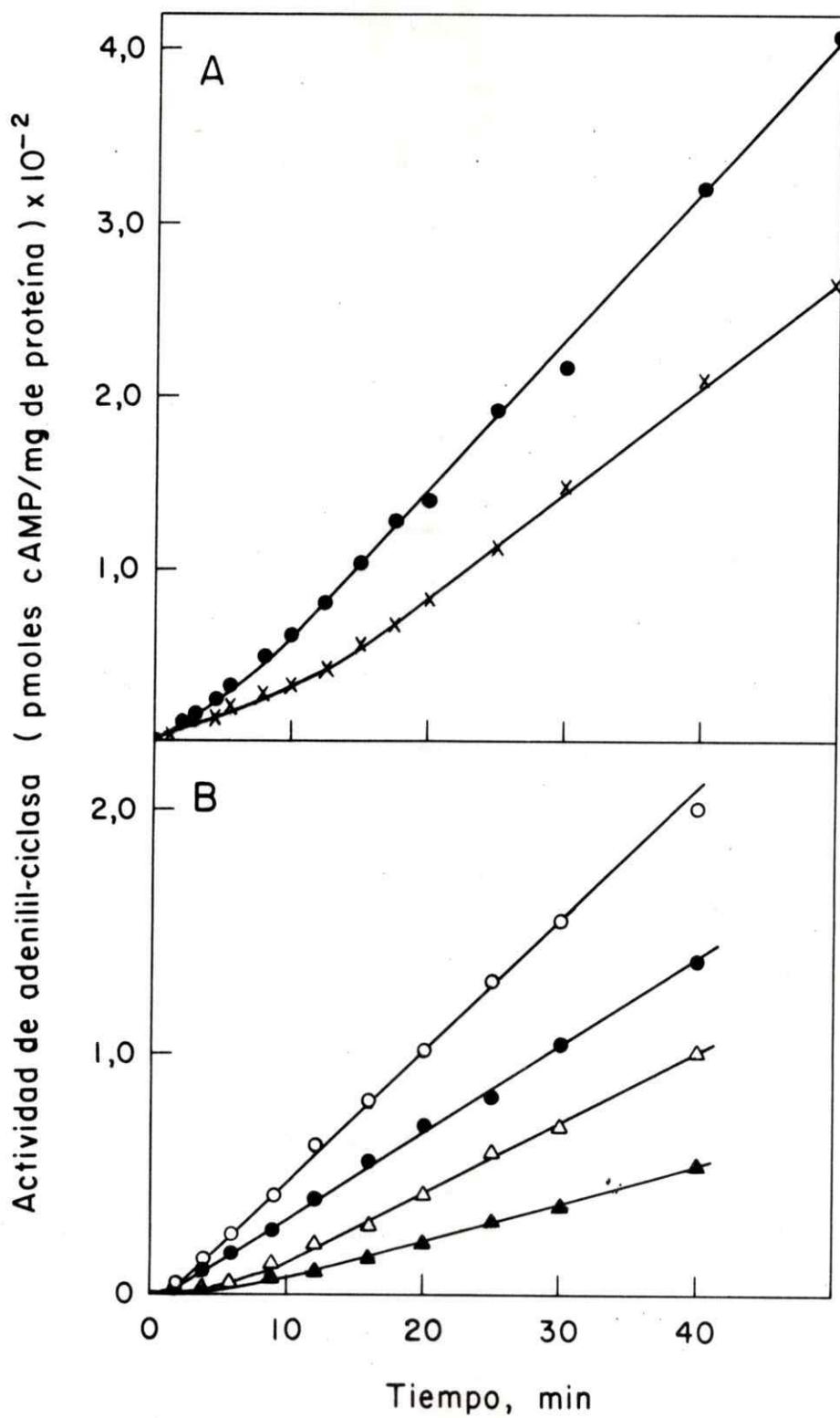


Figura 13. Efecto de la progesterona en la cinética de activación de la adenilil-ciclasa de oocitos por GMP.P(NH)P.

Figura 13. Efecto de la progesterona en la cinética de activación de la adenilil-ciclasa de oocitos por GMP.P(NH)P. La fracción se preparó de oocitos de estados V y VI obtenidos por el método enzimático. La formación de cAMP se midió en presencia de  $MgCl_2$  5 mM y la reacción se inició con la adición de la enzima (2 mg de proteínas/ml de medio de incubación en A; 1,9 mg de proteínas/ml de medio de incubación en B). A. Las incubaciones se realizaron a  $37^\circ$ , con ATP 0,102 mM (430 cpm/pmol), en presencia de GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M, y en presencia (X) y ausencia (●) de progesterona  $3,3 \times 10^{-4}$  M. B. Las incubaciones se realizaron a  $32^\circ$ , con ATP 0,102 mM (695 cpm/pmol), en presencia de GMP.P(NH)P 1  $\mu$ M (●, ▲) o 3,3  $\mu$ M (○, △), y en ausencia (○, ●) y presencia (△, ▲) de progesterona  $10^{-6}$  M. En ambos casos se retiraron alícuotas de 0,1 ml del medio de incubación a los tiempos indicados, y la reacción se detuvo tal como se describe en Materiales y Métodos. En A y B los oocitos utilizados provinieron de ovarios diferentes.

Progesterona sobre el período de latencia. Es así como el grado de inhibición por progesterona en un experimento dado va a depender del tiempo de incubación utilizado y de la duración del período de latencia en esa preparación de enzima. Por ejemplo en el experimento ilustrado en la figura 13B, la progesterona produjo una disminución del cAMP acumulado a los 4 minutos en presencia de GMP.P(NH)P  $1 \mu\text{M}$ , de aproximadamente un 80%, mientras que a los 40 minutos la disminución causada por progesterona fue de sólo un 62%.

En experimentos anteriores se observó que la progesterona no era capaz de inhibir a la adenilil-ciclase de células foliculares en presencia de GMP.P(NH)P  $25 \mu\text{M}$  (Figura 11) o de GTP (p. 84). En un experimento cuyos resultados no se muestran se encontró que la adenilil-ciclase de la fracción  $P_2$  obtenida de células foliculares era activada por GMP.P(NH)P  $3,3 \mu\text{M}$  después de un período de latencia de aproximadamente 6 minutos. La progesterona  $10^{-6}\text{M}$  no afectó ni al período de latencia ni a la velocidad de formación de cAMP en el estado estacionario, confirmándose de esta manera la especificidad de tejido blanco en la acción de la progesterona.

Hay que hacer notar que en los experimentos mostrados en que se determinó el efecto de la progesterona sobre la activación de la adenilil-ciclase por GMP.P(NH)P (Figuras 10, 11, 12 y 13; Tablas 10, 11 y 12), la progesterona y el GMP.P(NH)P entraban simultáneamente en contacto con la adenilil-ciclase porque la reacción se iniciaba con la adición de la enzima. En otro experimento, se investigó si la progesterona era capaz de inhibir a la adenilil-ciclase de los oocitos una vez que ésta

había sido activada por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . Los resultados de este experimento se muestran en la figura 14; se puede apreciar que la progesterona no es capaz de inhibir a la adenilil-ciclase de oocitos preactivada con  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . En efecto, la progesterona no inhibió a la adenilil-ciclase cuando fue agregada 10 minutos después de iniciada la reacción, es decir cuando el período de latencia había transcurrido y la adenilil-ciclase estaba ya activada. También se muestra en la figura 14 un control en que la misma preparación de adenilil-ciclase de oocitos sí fue inhibida por progesterona cuando la hormona fue agregada al medio de incubación antes de la enzima.

De estos resultados puede deducirse que la progesterona es capaz de inhibir la activación por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  de la adenilil-ciclase de oocitos, pero no afecta a la enzima después que ésta ha sido activada por el nucleótido.

b) Efecto de la progesterona en la activación de la adenilil-ciclase por concentraciones crecientes de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . Se estudió la activación de la adenilil-ciclase particulada de oocitos por concentraciones crecientes de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  en ausencia y en presencia de progesterona  $10^{-6}\text{M}$ . Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 15 y 16. En la figura 15 se incluyó el período de latencia en la medición de la actividad, mientras que en la figura 16 las actividades se determinaron en el estado estacionario. Se puede apreciar que la adenilil-ciclase de oocitos es activada por concentraciones crecientes de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  y que la dependencia de la concentración de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  es similar a la observada con las adenilil-ciclasas de células

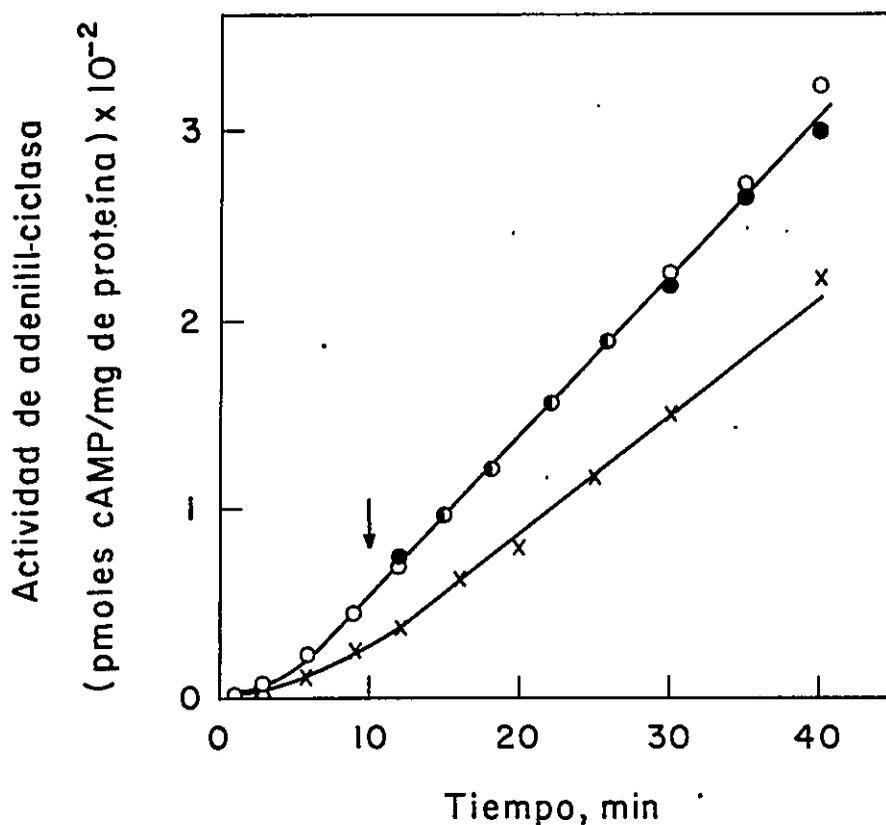


Figura 14. Efecto de la progesterona sobre la adenilil-ciclasa de oocitos preactivada por GMP.P(NH)P. La fracción P<sub>3</sub> se preparó de oocitos de estados V y VI obtenidos por el método enzimático. La formación de cAMP se midió a 32°, con MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 0,102 mM (1.060 cpm/pmol) y GMP.P(NH)P 25 μM. La reacción se inició (tiempo cero) con la adición de la enzima (1,1 mg de proteína por ml de medio de incubación). Alícuotas del medio de incubación (0,1 ml) se sacaron a los tiempos indicados y la reacción se detuvo tal como se describe en Materiales y Métodos. O, sin progesterona; ●, progesterona 10<sup>-6</sup> M agregada a los 10 minutos; X, progesterona 10<sup>-6</sup> M agregada antes de iniciar la reacción.

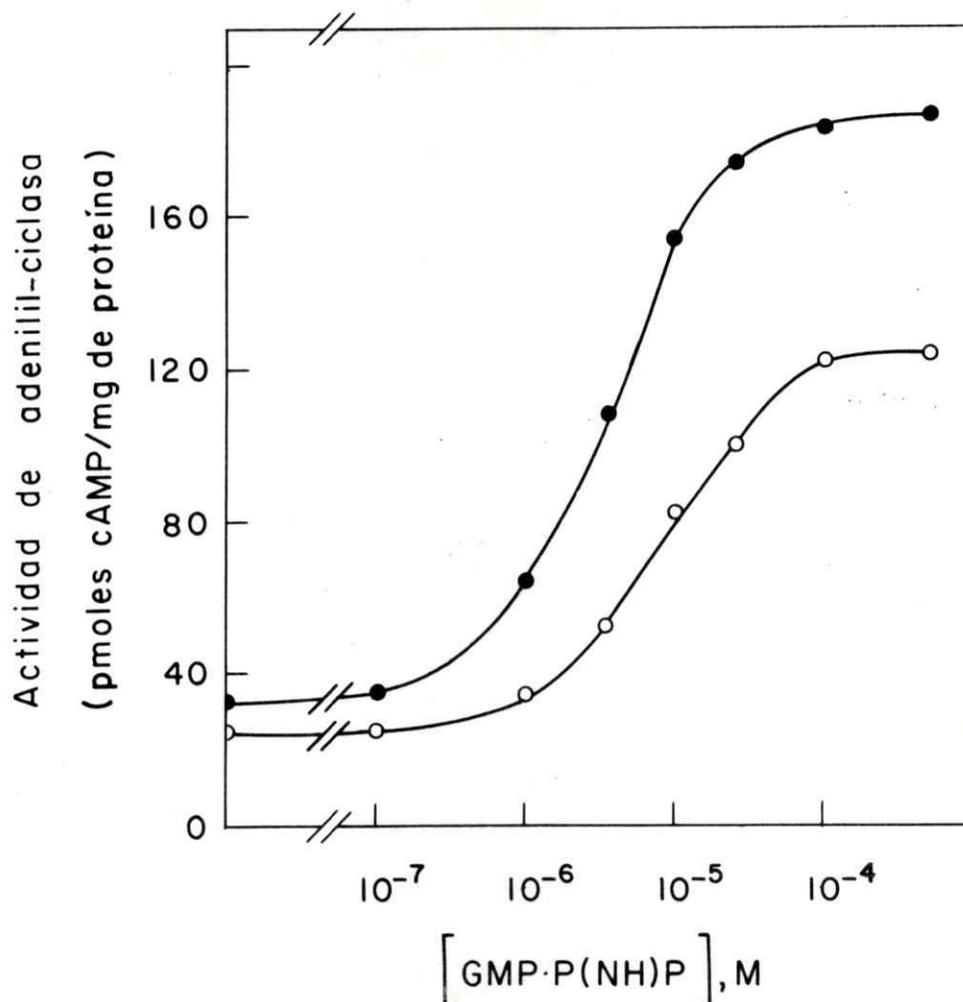


Figura 15. Efecto de la concentración de GMP·P(NH)P sobre la actividad de adenilil-ciclasa de oocitos. La fracción P<sub>3</sub> se preparó de oocitos de estados V y VI obtenidos por el método enzimático. La actividad de adenilil-ciclasa se midió en triplicado, en presencia de las concentraciones indicadas de GMP·P(NH)P, con (○) y sin (●) progesterona  $10^{-6}$  M, con ATP 0,104 mM (330 cpm/pmol) y con MgCl<sub>2</sub> 5 mM. La reacción se inició con la adición de la enzima (0,32 mg de proteína por ensayo) y las incubaciones fueron de 20 minutos a 32°. Las actividades determinadas incluyen por lo tanto el período de latencia, y se expresaron como pmoles de cAMP formados en 20 minutos por mg de proteína.

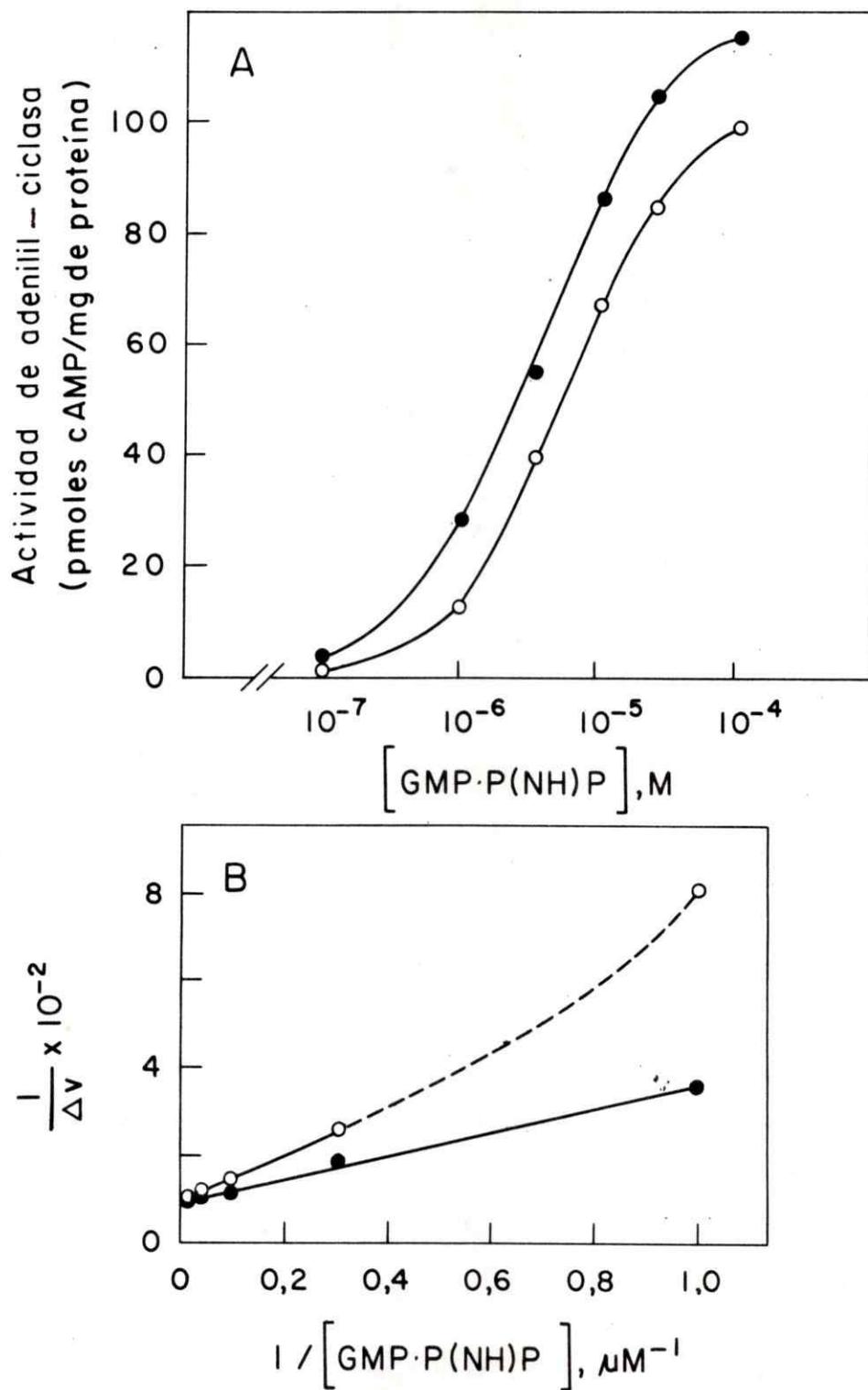


Figura 16. Efecto de la concentración de  $GMP \cdot P(NH)P$  sobre la actividad en estado estacionario de la adenilil-ciclasa de oocitos.

Figura 16. Efecto de la concentración de GMP.P(NH)P sobre la actividad en estado estacionario de la adenilil-ciclasa de oocitos. La fracción P<sub>3</sub> se preparó de oocitos de estados V y VI obtenidos por el método enzimático. Las actividades en el estado estacionario se midieron en triplicado en presencia de las concentraciones indicadas de GMP.P(NH)P, con (O) y sin (●) progesterona 10<sup>-6</sup> M, con ATP 0,102 mM (630 cpm/pmol) y con MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Para ello, la enzima (0,19 mg de proteína por ensayo) se preincubó durante 17 minutos a 32° en presencia de todos los componentes del ensayo, excepto el ATP radiactivo, y luego se agregó éste (tiempo cero) y se incubó durante 20 minutos a 32°. Las actividades se han expresado como actividades sobre la basal. En B, los resultados se graficaron empleando la transformación lineal de Lineweaver-Burk, y las rectas se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados (tomando en cuenta los puntos unidos por línea llena).  $\Delta v$  = actividad en presencia de GMP.P(NH)P - actividad en ausencia de GMP.P(NH)P. Las ( $\Delta v$ ) max fueron de 112 pmoles cAMP/mg de proteína/20 min y de 104 pmoles cAMP/mg de proteína/20 min en ausencia y en presencia de progesterona respectivamente.

foliculares (Figura 9) y de una preparación de ovario (Figura 4). De la comparación de los experimentos ilustrados en las figuras 15 y 16 resulta evidente que la inhibición de la actividad de adenilil-ciclasa por progesterona es mayor cuando se incluye el período de latencia. Esto es especialmente evidente a concentraciones saturantes de GMP.P(NH)P: la activación por una concentración saturante de GMP.P(NH)P fue inhibida por progesterona en aproximadamente un 35% cuando se incluyó la latencia (Figura 15) y sólo en un 8% cuando se determinaron las actividades en el estado estacionario (Figura 16). Estos resultados confirman la importancia del efecto de la progesterona en el período de latencia.

Los resultados de los experimentos de las figuras 15 y 16 muestran también que la progesterona inhibe más eficientemente la activación de la adenilil-ciclasa a bajas concentraciones de GMP.P(NH)P. Así, en el experimento de la figura 15 se observó que la progesterona bloqueaba casi totalmente la activación producida por GMP.P(NH)P 1  $\mu$ M. En el experimento en que se determinaron las actividades en el estado estacionario, la progesterona inhibió en un 56% la activación producida por GMP.P(NH)P 1  $\mu$ M, y sólo en un 12% la activación producida por GMP.P(NH)P 100  $\mu$ M.

La concentración de GMP.P(NH)P capaz de producir la mitad de la activación máxima ha sido utilizada por otros autores como una medida de la afinidad aparente del GMP.P(NH)P por la adenilil-ciclasa (Iyengar y col., 1980b). La progesterona no tuvo un efecto muy notorio en las concentraciones de GMP.P(NH)P que produjeron la mitad de la

activación máxima. En el experimento de la figura 15, la mitad de la activación máxima se obtuvo con concentraciones de GMP.P(NH)P de aproximadamente  $3 \mu\text{M}$  y  $8 \mu\text{M}$  en ausencia y en presencia de progesterona respectivamente. Este aumento de la concentración de GMP.P(NH)P necesaria para producir la mitad de la activación máxima se debe probablemente al alargamiento de la latencia producido por la progesterona. Es así como en el experimento en que se midieron las actividades en el estado estacionario (Figura 16) el efecto de la progesterona se redujo y las concentraciones de GMP.P(NH)P que produjeron la mitad de la activación máxima fueron de  $3,0 \mu\text{M}$  en ausencia de progesterona y de  $5,6 \mu\text{M}$  en presencia de progesterona, (determinadas en el gráfico de Lineweaver-Burk, Figura 16B).

### *3. Efectos de GDP $\beta$ S en la activación por GMP.P(NH)P y en la inhibición por progesterona de la adenilil-ciclasa de oocitos.*

El GDP $\beta$ S es un análogo del GDP que inhibe la activación de numerosas adenilil-ciclasas por GTP y por GMP.P(NH)P (Introducción). Como la progesterona parece interferir con la regulación de la función de la subunidad G/F por los nucleótidos de guanosina, se realizaron algunos experimentos para determinar el efecto de GDP $\beta$ S en la activación de la adenilil-ciclasa de oocitos por GMP.P(NH)P, y en la inhibición de esta actividad por progesterona. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 13 y 14 y en la figura 17. Los experimentos cuyos resultados se muestran en las tablas 13 y 14 se realizaron siguiendo un protocolo similar, siendo la diferencia importante el momento en que se agregó la progesterona. En el experimento

TABLA 13

Efecto de GDP $\beta$ S en la activación por GMP.P(NH)P y en la inhibición por progesterona de la adenilil-ciclase de oocitos

Nucleótidos presentes en		Actividad de adenilil-ciclase (pmoles cAMP/mg proteína)		
Preincubación	Ensayo	sin progesterona	con progesterona	% inhibición por hormona
ninguno	GMP.P(NH)P	71,4 $\pm$ 3,2	47,9 $\pm$ 1,9	33
ninguno	GMP.P(NH)P + GDP $\beta$ S	31,1 $\pm$ 1,5	17,2 $\pm$ 2,6	45
GMP.P(NH)P	GMP.P(NH)P	78,8 $\pm$ 0,8	80,2 $\pm$ 6,9	0
GMP.P(NH)P	GMP.P(NH)P + GDP $\beta$ S	55,6 $\pm$ 2,3	-	-

La fracción P<sub>3</sub> se preparó de oocitos de estados V y VI obtenidos por el método enzimático. Alícuotas de esta fracción (0,11 mg de proteína por ensayo) se preincubaron por 10 minutos a 32° en las condiciones estándares de ensayo de la adenilil-ciclase pero en ausencia del ATP radiactivo. Una vez finalizada esta preincubación, se agregó el ATP radiactivo (1.030 cpm/pmol) con y sin progesterona (concentración final de 10<sup>-6</sup> M) y se midió el cAMP formado después de incubar a 32° por 20 minutos. Los nucleótidos de guanosina estuvieron presentes a una concentración de 25  $\mu$ M en ambas incubaciones o sólo en la segunda. ATP 0,102 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y el resto de los componentes del ensayo de adenilil-ciclase estuvieron presentes en ambas incubaciones.

TABLA 14

Efecto de GDP $\beta$ S en la activaci3n por GMP.P(NH)P y en la inhibici3n por progesterona de la adenilil-ciclasa de oocitos

Nucle3tidos presentes en		Actividad de adenilil-ciclasa (pmoles cAMP/mg prote3na)		
Preincubaci3n	Ensayo	sin pro-gesterona	con pro-gesterona	% inhibici3n por hormona
n3nguno	GMP.P(NH)P	128,4 $\pm$ 5,8	79,0 $\pm$ 2,2	38
n3nguno	GMP.P(NH)P + GDP $\beta$ S	41,9 $\pm$ 5,1	19,1 $\pm$ 0,9	54
GMP.P(NH)P	GMP.P(NH)P	149,8 $\pm$ 1,7	112,9 $\pm$ 1,5	25
GMP.P(NH)P + GDP $\beta$ S	GMP.P(NH)P + GDP $\beta$ S	78,5 $\pm$ 3,8	42,9 $\pm$ 4,4	45

La fracci3n P<sub>3</sub> se prepar3 de oocitos de estados V y VI obtenidos por el m3todo enzim3tico. Al3cuotas de esta fracci3n (0,11 mg de prote3na por ensayo) se preincubaron por 16 minutos a 32° en presencia de todos los componentes del ensayo de adenilil-ciclasa excepto el ATP radiactivo. Una vez finalizada esta preincubaci3n, se agreg3 el ATP radiactivo (880 cpm/pmol finales) y se midi3 el cAMP formado despu3s de incubar a 32° por 20 minutos. Los nucle3tidos de guanosina (a una concentraci3n de 25  $\mu$ M) y la progesterona (10<sup>-6</sup> M final) estuvieron presentes en ambas incubaciones o s3lo en la segunda. Este protocolo es similar al del experimento de la tabla 13, con la 3nica e importante diferencia de que la progesterona fue agregada al mismo tiempo que los nucle3tidos de guanosina. ATP 0,102 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, y los dem3s componentes del ensayo de adenilil-ciclasa estuvieron presentes en ambas incubaciones.

ilustrado en la tabla 13, la hormona se agregó después de la preincubación, mientras que en el experimento de la tabla 14 la hormona se agregó al mismo tiempo que los nucleótidos de guanosina (al iniciarse la preincubación o la incubación posterior).

Puede apreciarse en ambas tablas que el GDP $\beta$ S inhibe la activación de la adenilil-ciclasa por GMP.P(NH)P (se usaron concentraciones equimolares de ambos nucleótidos). En ausencia de progesterona las inhibiciones por GDP $\beta$ S fueron de un 56% (Tabla 13) y de un 67% (Tabla 14) cuando las determinaciones de actividad incluyeron al período de latencia (GMP.P(NH)P y GDP $\beta$ S agregados simultáneamente en la segunda incubación). Estas inhibiciones causadas por GDP $\beta$ S fueron mayores en presencia de progesterona: 64 % (Tabla 13) y 76% (Tabla 14). Esto indicaría que la progesterona potenciaría el efecto inhibitor de GDP $\beta$ S. Lo inverso parece también ser cierto. En las mismas condiciones, es decir incluyendo la latencia en la determinación de actividad, la progesterona inhibió un 33% (Tabla 13) y un 38% (Tabla 14) en ausencia de GDP $\beta$ S, y un 45% (Tabla 13) y un 54% (Tabla 14) en presencia de GDP $\beta$ S. Los efectos inhibitorios de la progesterona y del GDP $\beta$ S parecen estar potenciándose mutuamente. Esto podría deberse a un efecto de ambos en el período de latencia, ya que al incluir a la latencia en la determinación de actividad cualquier alargamiento de ésta mejoraría las inhibiciones. Aunque no se midió el efecto de GDP $\beta$ S en el período de latencia de la activación por GMP.P(NH)P, los resultados son compatibles con un efecto del GDP $\beta$ S en el período de latencia. En efecto, en el experimento de la tabla 14 se encontró que el GDP $\beta$ S sólo

inhibía en un 48% la actividad en estado estacionario (preincubación en presencia de GMP.P(NH)P con y sin GDPβS), mientras que la inhibición por GDPβS era de un 67% cuando la determinación de actividad incluía la latencia (GMP.P(NH)P con y sin GDPβS agregados después de la preincubación).

Sin embargo, los resultados de la tabla 14 muestran también otro hecho importante: incluso cuando se miden las actividades en el estado estacionario los efectos inhibitorios de GDPβS y de progesterona se potencian. En efecto, la progesterona sola fue capaz de inhibir en un 25% la actividad en el estado estacionario (preincubación y ensayo en presencia de GMP.P(NH)P con y sin progesterona), y esta inhibición aumentó a un 45% en presencia de GDPβS (GMP.P(NH)P, GDPβS y progesterona presentes desde la preincubación). A su vez, el GDPβS inhibió la actividad en estado estacionario en un 48% en ausencia de progesterona, y esta inhibición por GDPβS subió a un 62% en presencia de progesterona (Tabla 14). Estos resultados indican que los efectos inhibitorios de progesterona y de GDPβS no sólo se potencian a través de un efecto común en la latencia. Podría especularse que la progesterona actuaría aumentando la afinidad de la enzima por los nucleótidos de guanosina inhibitorios, en este caso GDPβS (in vivo sería el GDP). Esto explicaría tanto el efecto de la progesterona en la latencia como el efecto de la hormona en la actividad medida en el estado estacionario. Se necesitarían estudios más detallados para establecer si esta hipótesis es válida.

Los efectos inhibitorios de GDPβS y progesterona presentan

algunas similitudes. No sólo se observaron mayores inhibiciones cuando se incluyó la latencia en la determinación de actividad, sino que la inhibición fue mucho menor cuando el GDP $\beta$ S o la progesterona se agregaron una vez que la enzima estaba activada por GMP.P(NH)P. El GDP $\beta$ S inhibió sólo un 29% en ese caso (Tabla 13, enzima preincubada con GMP.P(NH)P, GDP $\beta$ S agregado en el ensayo), mientras que la inhibición por progesterona fue nula (Tabla 13, enzima preincubada con GMP.P(NH)P, progesterona agregada en el ensayo); confirmando los resultados que se mostraron en la figura 14.

La adenilil-ciclase de oocitos previamente activada por GMP.P(NH)P 25  $\mu$ M es resistente a la inhibición por progesterona y es menos inhibida por GDP $\beta$ S. Se pensó en la posibilidad de que la progesterona pudiera potenciar la inhibición por GDP $\beta$ S de la enzima preactivada por GMP.P(NH)P. Se estudió el efecto de la adición de GDP $\beta$ S con y sin progesterona a una enzima preactivada por GMP.P(NH)P. Los resultados se muestran en la figura 17. Se puede apreciar que el GDP $\beta$ S inhibió sólo en un 26% la actividad de adenilil-ciclase de los oocitos cuando fue agregado a los 10 minutos, estando ya la enzima activada por GMP.P(NH)P; la adición de progesterona, también a los 10 minutos, no tuvo ningún efecto. Puede decirse entonces que una vez que la adenilil-ciclase de oocitos ha sido activada por GMP.P(NH)P, la progesterona no es capaz de inhibirla ni de potenciar la pequeña inhibición provocada por el GDP $\beta$ S.

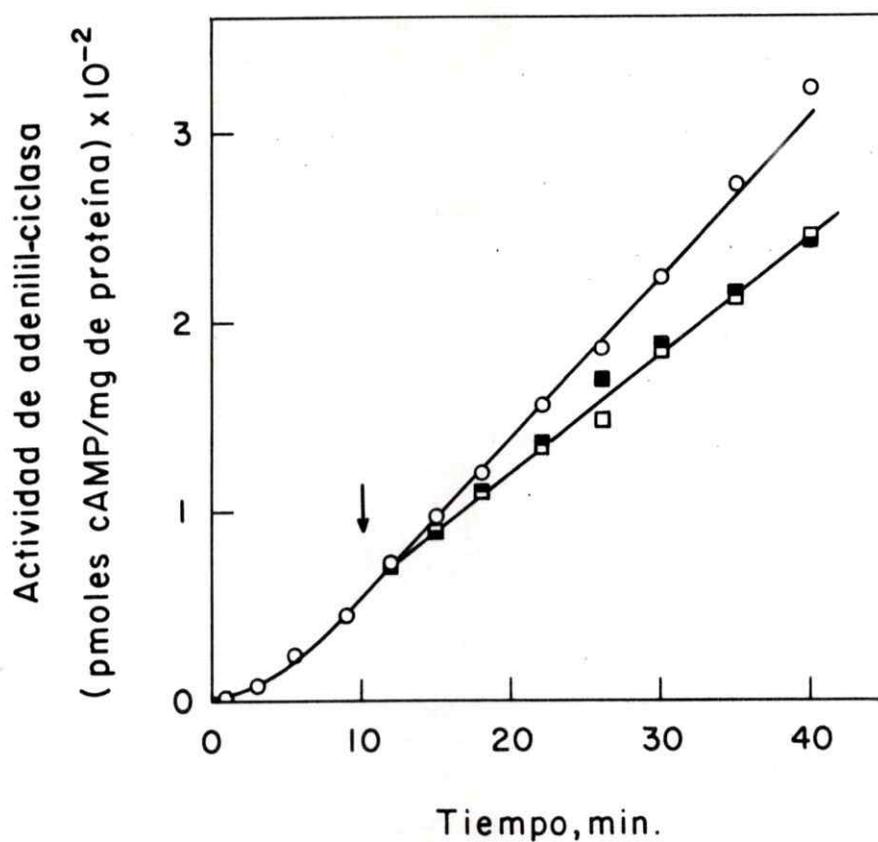


Figura 17. Efectos de GDPBS y progesterona sobre la adenilil-ciclasa de oocitos. Este experimento es el mismo del de la figura 14 (p. 101). ○, sin progesterona, sin GDPBS; □, GDPBS 25  $\mu$ M agregado a los 10 minutos; ■, GDPBS 25  $\mu$ M y progesterona  $10^{-6}$ M agregados a los 10 minutos.

## EFFECTO DE DROGAS ANTISICÓTICAS EN LA ADENILIL-CICLASA DE OOCITOS.

Las drogas antisicóticas (fenotiazinas por ejemplo) bloquean los efectos de calmodulina y  $Ca^{+2}$  en numerosas enzimas activadas por estos moduladores, tales como adenilil-ciclasas, fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, proteína-quinasa, etc... (Weiss y Wallace, 1980). Se ha demostrado que estas drogas se unen a la calmodulina en una forma dependiente de  $Ca^{+2}$  (Weiss y Wallace, 1980). Algunos autores han postulado que la calmodulina participaría en el proceso de maduración de los oocitos de *Xenopus laevis* a base de resultados obtenidos con estas drogas. Cartaud y col. (1981) encontraron por ejemplo que una fenotiazina aceleraba la maduración a bajas concentraciones y la inhibía a concentraciones más altas.

Se estudió el efecto de algunas drogas antisicóticas en la actividad de adenilil-ciclase particulada de oocitos.

### 1. Efecto de diferentes drogas antisicóticas.

Se determinó el efecto de dos fenotiazinas (CAPP y flufenazina) y de una butirofenona (penfluridol) en la adenilil-ciclase de la fracción  $P_3$  de oocitos de estados V y VI. Los resultados se muestran en la tabla 15. Se puede apreciar que las tres drogas a una concentración de 0,1 mM inhiben significativamente la actividad de adenilil-ciclase. La más efectiva fue el penfluridol, que inhibió en un 68%, y la menos efectiva la flufenazina, que inhibió en un 50% la actividad enzimática. Es importante destacar que el experimento de la tabla 15 se realizó en presencia de EGTA, y que la fracción  $P_3$  fue preparada

TABLA 15

Efecto de drogas antisicóticas en la adenilil-ciclase de oocitos

Adición al ensayo	Actividad de adenilil-ciclase	% del control
ninguna	151,2±4,0	100
CAPP 0,1 mM	58,2±1,0	38
Flufenazina 0,1 mM	75,0±1,9	50
Penfluridol 0,1 mM	48,3±1,0	32
Progesterona 10 <sup>-6</sup> M	101,4±9,9	67
Progesterona 10 <sup>-6</sup> M + CAPP 0,1 mM	48,3±3,0	32

Los oocitos de estados V y VI se obtuvieron por el método enzimático. La fracción P<sub>3</sub> se preparó tal como se describe en Materiales y Métodos pero en presencia de EGTA 1 mM (en lugar de EDTA). Alícuotas de esta fracción (0,06 mg de proteína por ensayo) se utilizaron para determinar la actividad de adenilil-ciclase en triplicado. Las incubaciones se realizaron a 32° por 20 minutos, en presencia de GMP.P(NH)P 25 μM, EGTA 0,5 mM (en lugar de EDTA), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 0,102 mM (445 cpm/pmol), y con las adiciones indicadas. Las actividades se expresaron en pmoles de cAMP formados en 20 minutos por mg de proteína.

en presencia de EGTA. Esto indica que la inhibición de la adenilil-ciclasa por las fenotiazinas y el penfluridol es independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ . También en la tabla 15 se puede apreciar que la progesterona inhibe a la adenilil-ciclasa de oocitos en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$ . En ese experimento la inhibición fue de un 33%. En experimentos cuyos resultados no se muestran, se demostró no sólo que la progesterona inhibe a la adenilil-ciclasa de oocitos en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$ , sino que además el porcentaje de inhibición causado por progesterona no es afectado por la adición de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Las inhibiciones de la adenilil-ciclasa de oocitos por progesterona y por drogas antisicóticas parecen ser independientes de  $\text{Ca}^{+2}$ .

## 2. Efecto de la concentración de CAPP.

Se determinó el efecto de la concentración de una de las drogas antisicóticas, el CAPP, sobre la actividad de adenilil-ciclasa de la fracción  $\text{P}_3$  de oocitos de estados V y VI. Los resultados se muestran en la figura 18. Se observa que la adenilil-ciclasa de oocitos es inhibida por concentraciones crecientes de esta fenotiazina. En el experimento mostrado, el CAPP inhibió totalmente la actividad de adenilil-ciclasa a una concentración de 0,5 mM. La mitad de la inhibición máxima se obtuvo con una concentración de CAPP de aproximadamente  $5$  a  $7 \times 10^{-5}$  M. Estas concentraciones son similares a las que inhiben la activación de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos de oocitos por calmodulina (Echeverría y col., 1981), pero a diferencia de lo observado por estos autores, la inhibición de la adenilil-ciclasa es independiente de  $\text{Ca}^{+2}$  (tanto en el experimento

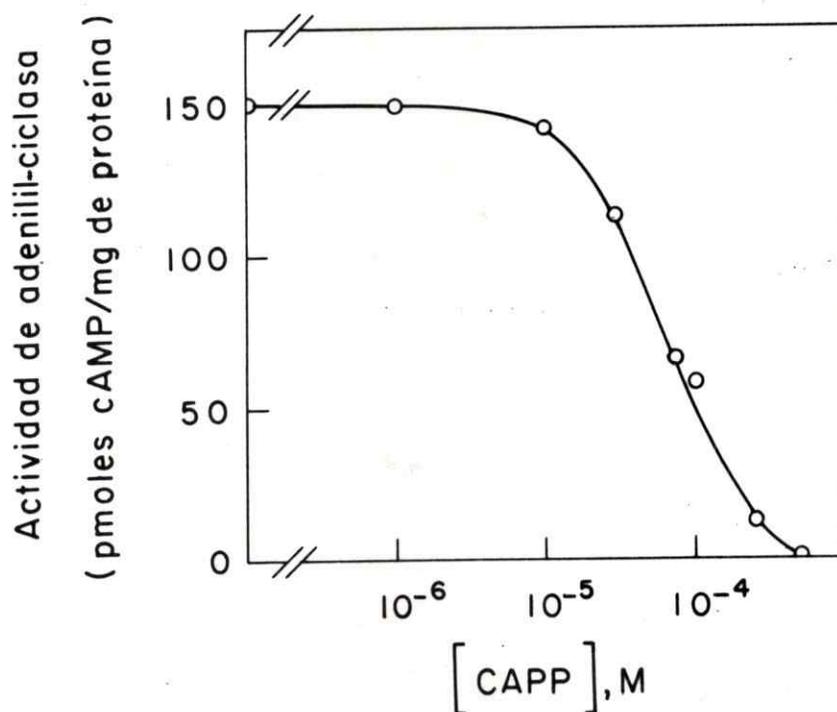


Figura 18. Efecto de la concentración de CAPP en la actividad de adenilil-ciclasa de oocitos. La actividad de adenilil-ciclasa se midió en las mismas condiciones y con la misma fracción P<sub>3</sub> (0,06 mg de proteína por ensayo) utilizadas en el experimento de la tabla 15. El CAPP estuvo presente a las concentraciones indicadas.

anterior como en éste, la fracción particulada fue preparada y ensayada en presencia de EGTA). Además, en experimentos cuyos resultados no se muestran, se demostró que la inhibición de la adenilil-ciclase por una concentración de CAPP era similar en ausencia y en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$ .

### 3. Efecto de CAPP en la actividad de adenilil-ciclase medida en presencia de diferentes efectores.

Los experimentos descritos de inhibición de la actividad de adenilil-ciclase de oocitos por drogas antisicóticas fueron hechos en presencia de GMP.P(NH)P (Tabla 15, Figura 18). Con el objeto de caracterizar un poco más el efecto de CAPP en la adenilil-ciclase de oocitos, se determinó el efecto de esta fenotiazina en la actividad de adenilil-ciclase medida en diferentes condiciones. Los resultados se muestran en la tabla 16. Se puede apreciar que el CAPP inhibe en presencia de GMP.P(NH)P, activa en presencia de fluoruro, y no afecta a la actividad en presencia de  $\text{MnCl}_2$ . La inhibición observada en presencia de GMP.P(NH)P fue de un 62%, mientras que la activación observada en presencia de fluoruro fue de un 44%. Esto indicaría que el CAPP afectaría de alguna manera la función de la subunidad G/F, puesto que es ésta la que media los efectos de GMP.P(NH)P y fluoruro en las adenilil-ciclasas (Introducción).

TABLA 16

Efecto de CAPP en la actividad de adenilil-ciclase de oocitos  
medida en presencia de diferentes efectores

Adición al ensayo	Actividad de adenilil-ciclase (pmoles cAMP/mg proteína)		
	sin. CAPP	con CAPP	+CAPP/-CAPP
GMP.P(NH)P 25 $\mu$ M	151,2 $\pm$ 4,0	58,2 $\pm$ 1,0	0,38
NaF 5 mM	133,8 $\pm$ 5,0	192,0 $\pm$ 14,9	1,43
MnCl <sub>2</sub> 5 mM	17,4 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 1,0	1,00

Alícuotas de la misma fracción utilizada en los experimentos anteriores (Tabla 15, Figura 18) (0,06 mg de proteína por ensayo) se usaron para determinar la actividad de adenilil-ciclase en triplicado. Las incubaciones se realizaron a 32° por 20 minutos, con las adiciones que se indican, y en presencia de ATP 0,102 mM (435 cpm/pmol), EGTA 0,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM (excepto cuando se agregó MnCl<sub>2</sub>). La concentración final de CAPP en el ensayo fue de 10<sup>-4</sup> M. Las actividades se expresaron en pmoles de cAMP formados en 20 minutos por mg de proteína.

## DISCUSION

### CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ACTIVIDADES DE ADENILIL-CICLASA DE OVARIO DE *Xenopus laevis*.

#### 1. Localización subcelular.

La mayor parte de la actividad de adenilil-ciclase obtenida de ovario, de células foliculares y de oocitos de *Xenopus laevis* está presente en fracciones particuladas (Tablas 2 y 8). El tipo de célula y el método de homogeneización utilizados fueron determinantes con respecto a la distribución de la actividad de adenilil-ciclase en diferentes fracciones particuladas obtenidas por centrifugación diferencial. Es así como la mayor parte de la actividad de adenilil-ciclase de los oocitos de estados V y VI se encontró en el sedimento "algodonoso" de 105.000xg (fracción P<sub>3</sub>), mientras que la mayor parte de las actividades de adenilil-ciclase de oocitos de estados I a IV y de células foliculares sedimentó a 20.000xg. Una homogeneización más suave de los oocitos de estados V y VI hace predominar la actividad en la fracción P<sub>2</sub> que sedimenta a 20.000xg (Finidori-Lepicard y col., 1981). Cuando la enzima se preparó a partir de ovario, las condiciones de homogeneización fueron drásticas, por lo que la mayor parte de la actividad se encontró asociada a la fracción "algodonosa" P<sub>3</sub>.

Es así como se establece la existencia de una adenilil-

ciclase particulada en oocitos de *Xenopus laevis*. Las fracciones con actividad se encontrarían enriquecidas en membrana plasmática de acuerdo a criterios de microscopía electrónica y de distribución de una enzima marcadora, la 5'nucleotidasa (Finidori-Lepicard y col., 1981). Además, Sadler y Maller (1981) midieron la actividad de adenilil-ciclase en complejos de la membrana plasmática y de la envoltura vitelínica obtenidos por ruptura del oocito con pinzas y remoción del contenido celular.

La adenilil-ciclase de oocitos de *Xenopus laevis* es la primera adenilil-ciclase de la línea germinal femenina en ser caracterizada, y su localización particulada es diferente de la de la adenilil-ciclase de las células germinales masculinas, que se encuentra en la fracción soluble (Adamo y col., 1980). Los resultados que se obtuvieron en este trabajo de tesis muestran que la actividad soluble de adenilil-ciclase de oocitos es muy baja (Tabla 8). Estos resultados no concuerdan con los del grupo de Baulieu (Finidori-Lepicard y col., 1981) que indican que más del 50% de la actividad de adenilil-ciclase de oocitos sería soluble. Esta discrepancia puede tener dos explicaciones:

i) El grupo de Baulieu no determinó por tratamiento con fosfodiesterasa de cAMP si el producto formado en el ensayo de adenilil-ciclase era cAMP. En experimentos controles realizados en esta tesis se encontró que la fracción soluble cataliza la formación de un producto que copurifica con cAMP en el procedimiento de cromatografía secuencial en Dowex 50 y alúmina pero que no es degradado por

fosfodiesterasa de cAMP.

ii) Es posible que la actividad soluble de adenilil-ciclase sea más estable en las condiciones de homogeneización y fraccionamiento utilizadas por Finidori-Lepicard y col. (1981).

## 2. Efectos de fluoruro y de GMP.P(NH)P.

a) Efecto de fluoruro. Los experimentos realizados demuestran que las adenilil-ciclasas de oocitos y de células foliculares son activadas por el ión fluoruro, al igual que la mayoría de las adenilil-ciclasas de eucariontes (Bradham y Cheung, 1982).

Las concentraciones de NaF requeridas para la activación de la adenilil-ciclase en una preparación de ovario son similares a las requeridas en otros tejidos (Rasenick y Bitensky, 1980; Bradham y Cheung, 1982). El grado de activación que se obtuvo resultó muy variable (7 a 40 veces según el experimento). Estas variaciones se deben principalmente a diferencias en las actividades basales de las distintas preparaciones, al catión presente en el ensayo ( $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ ) y a la temperatura del ensayo (32 o 37°). En otros sistemas se ha demostrado que el efecto de fluoruro es muy dependiente de la temperatura, y que en presencia de  $Mn^{+2}$  el efecto de fluoruro y de otros efectores disminuye debido a un aumento de la actividad basal (Bradham y Cheung, 1982). En esta tesis se observó que la activación por fluoruro es mayor a 37° y en presencia de  $Mg^{+2}$ .

El mecanismo de activación de adenilil-ciclasas por fluoruro no es conocido, sabiéndose sólo que su acción está mediada por la

subunidad regulatoria G/F de la enzima. Utilizando diferentes concentraciones de ATP se demostró que el ión fluoruro produce un aumento considerable de la  $V_{max}$  de la reacción y afecta poco a la  $K_m$  aparente para el sustrato.

b) Efecto de GMP.P(NH)P. El GMP.P(NH)P ha sido utilizado en el estudio de numerosas adenilil-ciclasas como un análogo del GTP resistente a la acción de fosfohidrolasas. Este nucleótido activa a las adenilil-ciclasas en concentraciones micromolares y lo hace en general después de un período de latencia (Bradham y Cheung, 1982).

El efecto de GMP.P(NH)P se estudió en preparaciones de adenilil-ciclasa de ovario, de oocitos, y de células foliculares:

- En todos los casos, la cinética de activación muestra un período de latencia (Figuras 1, 13; p.99 ).
- La concentración de GMP.P(NH)P que produce la activación máxima es de aproximadamente 25  $\mu\text{M}$  en todos los casos, y la mitad de la activación máxima se obtiene con una concentración de GMP.P(NH)P que está comprendida entre 2 y 7  $\mu\text{M}$  (Figuras 4, 9, 15 y 16).

En estos experimentos no se determinó si GMP.P(NH)P afecta la  $V_{max}$  o la  $K_m$  aparente para el ATP. Sin embargo, es probable que el GMP.P(NH)P afecte, como en otros sistemas, a la  $V_{max}$ , ya que se obtuvieron grandes activaciones pese a que la concentración de ATP utilizada fue en general similar a la  $K_m$ .

El grado de activación por GMP.P(NH)P resultó muy variable según el experimento (3 a 30 veces), debido principalmente a la

variabilidad de la actividad basal en diferentes preparaciones enzimáticas y al catión presente en el ensayo ( $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ ). El GMP.P(NH)P produce una mayor activación de la enzima en presencia de  $Mg^{+2}$ , debido a que el  $Mn^{+2}$  produce un aumento de la actividad basal pero la enzima es menos sensible al efecto de moduladores positivos, tal como se ha descrito en otros sistemas (Figura 4, Tabla 6, Bradham y Cheung, 1982).

Al medir la actividad de adenilil-ciclasa de la fracción particulada  $P_3$  de oocitos crecidos en presencia de GMP.P(NH)P 25  $\mu M$ , se obtuvieron actividades específicas de  $106 \pm 46$  pmoles cAMP/mg de proteína/20 minutos (a  $32^\circ$ ). Estas actividades son del mismo orden de magnitud que las que obtuvieron Finidori-Lepicard y col., (1981), pese a las diferencias en la preparación enzimática y en las condiciones de ensayo de la actividad. Las actividades específicas basales (en ausencia de modificadores) obtenidas en esta tesis fueron muy variables (1,1 a 10,8 pmoles cAMP/mg proteína/20 minutos en la fracción  $P_3$ ) y menores que las obtenidas por Finidori-Lepicard y col. (1981). Sin embargo, en las condiciones utilizadas por estos autores, los datos de actividad basal deben ser considerados como aproximados y sujetos a mucho error, por cuanto las cpm de [ $^{32}P$ ] cAMP formado fueron muy bajas en sus ensayos. En el caso de las actividades medidas en presencia de fluoruro, los valores que se obtuvieron en esta tesis son similares a los obtenidos por Finidori-Lepicard y col. (1981) (del orden de los 100 pmoles cAMP/mg de proteína/20 minutos, a  $32^\circ$ ). Sadler y Maller (1981) obtuvieron

actividades específicas basales, con GMP.P(NH)P, y con fluoruro, inferiores a las obtenidas en este trabajo de tesis y en los experimentos de Finidori-Lepicard y col. (1981). Probablemente ello se debe a la forma diferente en que estos autores prepararon la fracción de membranas del oocito crecido (no hay una homogeneización).

No es posible hacer una comparación rigurosa entre la actividad de adenilil-ciclase del oocito medida in vitro, y la actividad de adenilil-ciclase medida in vivo por inyección de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP, ya que en este caso se desconoce la actividad específica del ATP radiactivo disponible a nivel de la enzima en la célula intacta (Mulner y col., 1979). Sólo suponiendo que el ATP endógeno está uniformemente distribuido en el oocito, que su concentración es de 1,7 mM (Maller y col., 1977), que el ATP radiactivo inyectado se equilibra rápidamente con el endógeno y no es hidrolizado, y que el [ $^{32}$ P]cAMP formado no es degradado, puede estimarse la actividad in vivo en 0,10 a 0,15 pmoles de cAMP formados por oocito en 20 minutos (a 21°). Este valor es del mismo orden de magnitud que el obtenido al medir la actividad in vitro en presencia de Mg $^{+2}$  y GTP: 0,05 a 0,30 pmoles de cAMP formados por oocito en 20 minutos (a 32°).

### 3. Efecto de la toxina del cólera.

La toxina del cólera es un activador potente de la mayoría de las adenilil-ciclasas de células eucarióticas, tanto en células intactas como en preparaciones de membranas. En experimentos de esta tesis se demostró que la toxina del cólera activa a las adenilil-ciclasas preparadas de ovario y de oocitos. Las características de

esta activación son compatibles con el mecanismo propuesto para la acción de esta toxina en otras adenilil-ciclasas:

- se requiere  $\text{NAD}^+$
- la actividad basal (en ausencia de nucleótidos de guanosina y de fluoruro) y la actividad medida en presencia de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  sólo se modifican ligeramente
- el GTP activa considerablemente a la adenilil-ciclasa de una fracción tratada previamente con la toxina y  $\text{NAD}^+$
- la actividad medida en presencia de fluoruro se inhibe cuando la fracción particulada ha sido tratada con la toxina y  $\text{NAD}^+$ .

La adenilil-ciclasa de oocitos se activa también cuando los oocitos intactos son tratados con toxina del cólera (Finidori-Lepicard y col., 1981; Sadler y Maller, 1981). Esto explica el aumento del cAMP intracelular provocado por la toxina y la consiguiente inhibición de la maduración inducida por progesterona (Schorderet-Slatkine y col., 1978; Mulner y col., 1979; Maller y col., 1979).

#### 4. *Presencia de la subunidad regulatoria G/F.*

Los resultados que hasta ahora se han discutido muestran que las actividades particuladas de adenilil-ciclasa de oocitos y de células foliculares son activadas por fluoruro y por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ , y que la adenilil-ciclasa de oocitos es activada también por toxina del cólera. Esto indicaría que una subunidad equivalente a G/F está presente y activa en las adenilil-ciclasas de oocitos y de células foliculares, ya que en los diferentes sistemas de adenilil-ciclasa se ha demostrado que es esta subunidad la que media los efectos

activadores de fluoruro, GMP.P(NH)P y toxina del cólera.

La presencia de la subunidad G/F en la adenilil-ciclase de células foliculares no es extraña, puesto que se han descrito adenilil-ciclasas activadas por fluoruro y gonadotrofinas en tejido folicular de mamíferos (Conti y col., 1976; Birnbaumer y col., 1976; Hunzicker-Dunn, 1981), y tanto en mamíferos como en anfibios las gonadotrofinas tienen un efecto esteroideogénico en el tejido folicular que rodea al oocito (Masui y Clarke, 1979).

La presencia de la subunidad G/F en la adenilil-ciclase de oocitos es de interés porque esta enzima parece ser diferente de la que se encuentra en la línea germinal masculina. La adenilil-ciclase de la línea germinal masculina es soluble en los estados tempranos de la diferenciación (espermátocitos y espermátides) y particulada en los espermios maduros, pero carece siempre de la subunidad G/F (Braun y Dods, 1975; Herman y col., 1976; Adamo y col., 1980; Stengel y Hanoune, 1981). Adenilil-ciclasas que no poseen G/F han sido descritas también en variantes del linfoma S49 y en eucariontes inferiores tales como *Nevrospora crassa* (Flawiá y Torres, 1972). Estas adenilil-ciclasas son dependientes de  $Mn^{+2}$  (con  $Mg^{+2}$  no funcionan) y no son activadas por fluoruro, GMP.P(NH)P o toxina del cólera. Sin embargo, la actividad dependiente de  $Mg^{+2}$  y las propiedades regulatorias aparecen si la subunidad catalítica C de estas enzimas se complementa con G/F de otras fuentes (Introducción, Stengel y Hanoune, 1981).

El hecho de que la subunidad catalítica utilice mejor como

sustrato  $MnATP^{-2}$  en ausencia de G/F explica porqué se observó que las actividades de adenilil-ciclase de oocitos y de células foliculares eran mayores cuando el  $Mg^{+2}$  era sustituido por  $Mn^{+2}$  en ausencia de otros efectores (fluoruro,  $GMP.P(NH)P$ ).

Estudios futuros deberán tratar de identificar directamente al componente G/F de la adenilil-ciclase de oocitos por marcación con  $[^{32}P]NAD^{+}$  en presencia de toxina del cólera. Esto facilitaría también la purificación y caracterización de esta subunidad, que puede ser también ensayada por complementación de una adenilil-ciclase que sólo posee la subunidad catalítica (como por ejemplo la enzima de *Neurospora crassa*).

#### EFFECTO HORMONAL EN LA ADENILIL-CICLASE DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

##### 1. Inhibición por progesterona.

En experimentos realizados en esta tesis (Jordana y col., 1981b), e independientemente por los grupos de Baulieu (Finidori-Lepicard y col., 1981) y de Maller (Sadler y Maller, 1981), se demostró que la adenilil-ciclase particulada de oocitos es inhibida por progesterona in vitro (Figuras 10 y 11). De esta manera se cumple con uno de los criterios que Sutherland enunció para establecer que la acción de una hormona es mediada por cAMP, esto es, que el efecto hormonal en la adenilil-ciclase pueda ser reproducido in vitro en un sistema libre de células. Los demás criterios de Sutherland también se cumplen en el caso de la maduración de los oocitos inducida por progesterona, tal como ha sido expuesto en la

Introducción. Puede entonces afirmarse que la progesterona induce la maduración de los oocitos por un mecanismo que incluiría una inhibición de la adenilil-ciclase y una disminución de los niveles intracelulares de cAMP.

Para que el efecto hormonal pueda ser considerado de relevancia fisiológica debe mostrar las siguientes propiedades: debe ser saturable y reversible, debe haber una correlación entre las concentraciones de hormona que alteran la actividad de adenilil-ciclase y las que inducen el efecto fisiológico, y debe haber especificidad hormonal y de tejido blanco.

Estas características se cumplen en la inhibición de la adenilil-ciclase particulada de oocitos por progesterona:

a) La progesterona inhibe a la adenilil-ciclase en una forma saturable (Figuras 11 y 12; Finidori-Lepicard y col., 1981), alcanzándose inhibiciones máximas de 40 a 70% en presencia de progesterona  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M.

b) La progesterona inhibe a la adenilil-ciclase en forma reversible ya que la actividad se recupera por lavado de las membranas (Finidori-Lepicard y col., 1981).

c) Las concentraciones de progesterona que inducen la maduración son similares a las que inhiben a la adenilil-ciclase (Figuras 11 y 12; Mulner y col., 1979; Finidori-Lepicard y col., 1981; Sadler y Maller, 1981).

d) La progesterona inhibe a la adenilil-ciclase de la célula blanco, el oocito, y no a la adenilil-ciclase de otro tejido,

las células foliculares (Figura 11; Jordana y col., 1982).

e) Hay una buena correlación entre la potencia de diferentes esteroides como inductores de la maduración y como inhibidores de la adenilil-ciclase (Finidori-Lepicard y col., 1981), mientras que la única hormona no esteroidea probada, la prostaglandina E<sub>1</sub>, no afecta a la adenilil-ciclase de oocitos (Tabla 9).

El grupo de Baulieu demostró que la inhibición de la adenilil-ciclase de los oocitos por progesterona se debe a una disminución de la V<sub>max</sub>, sin que la hormona afecte a la K<sub>m</sub> aparente de la enzima para ATP (Finidori-Lepicard y col., 1981).

## 2. Mecanismo de la inhibición por progesterona.

a) Requerimiento de nucleótidos de guanosina. Los nucleótidos de guanosina, especialmente los trifosfatos, son requeridos tanto en la activación como en la inhibición de diferentes sistemas de adenilil-ciclase por hormonas o neurotransmisores. Este requerimiento ha sido demostrado en todos los casos en que se ha hecho un estudio cuidadoso, tomando las precauciones de purificar el ATP comercial y de eliminar nucleótidos de guanosina contaminantes en las preparaciones de membranas (Kimura y Nagata, 1977; Iyengar y col., 1980b; Limbird, 1981).

En los experimentos realizados en esta tesis (Jordana y col., 1981b) se utilizó un ATP purificado, encontrándose que la actividad de adenilil-ciclase de oocitos es inhibida por progesterona cuando se mide en presencia de nucleótidos de guanosina (GTP, GMP·P(NH)P), pero no cuando se mide en presencia de Mn<sup>+2</sup> o de fluoruro (Tablas 11

y 12). Las inhibiciones más claras se observaron en presencia de GMP.P(NH)P, o en presencia de GTP cuando la enzima se activó previamente con toxina del cólera. Sin embargo, también se observó consistentemente en presencia de GTP una inhibición de la adenilil-ciclase de la fracción particulada no tratada con toxina del cólera. La actividad basal (en presencia de  $Mg^{+2}$  y en ausencia de GTP o de otros modificadores) no fue inhibida por progesterona en algunos casos, y sí lo fue en otros. Esta inhibición de la actividad basal se debe probablemente a la presencia de nucleótidos de guanosa en algunas preparaciones de membranas (el oocito tendría una concentración intracelular de GTP de 0,2 mM a 0,3 mM según Maller y col., 1977). Sadler y Maller (1981) también encontraron que la actividad medida en presencia de GTP 0,15 mM era inhibida por progesterona, mientras que Finidori-Lepicard y col. (1981) encontraron que en ausencia de GTP la actividad basal era inhibida por progesterona. Esto podría deberse a la presencia de GTP en su preparación de membranas o en el ATP utilizado como sustrato (estos autores utilizaron una alta concentración de ATP en el ensayo, y no precisaron si lo habían purificado).

Cuando se usa  $MnATP^{-2}$  como sustrato se mide la actividad de la subunidad catalítica de la adenilil-ciclase (Ross y Gilman, 1980; Larner y Ross, 1981; Bradham y Cheung, 1982). Nuestros resultados (Tabla 11) y los de Sadler y Maller (1981) muestran que la progesterona no es capaz de inhibir a la adenilil-ciclase de oocitos en presencia de  $Mn^{+2}$ , lo que indicaría que la hormona no afectaría directamente a la subunidad catalítica de la adenilil-ciclase. Esto,

unido al hecho de que la progesterona inhibe la activación de la enzima por GMP.P(NH)P o por GTP, indicaría que la hormona actuaría a nivel de la subunidad G/F. La subunidad G/F media los efectos de los nucleótidos de guanosina y del fluoruro en las adenilil-ciclasas. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la actividad de adenilil-ciclasa de oocitos no es afectada por progesterona cuando se la mide en presencia de fluoruro (Tabla 11), lo que indicaría que la progesterona sólo altera la regulación de la función de G/F por los nucleótidos de guanosina. Nuestros resultados discrepan a este respecto de los de Finidori-Lepicard y col. (1981) y de los de Sadler y Maller (1981). Estos autores encontraron que la progesterona inhibía a la adenilil-ciclasa en presencia de fluoruro, probablemente debido a la presencia de GTP en el ensayo de la adenilil-ciclasa.

El hecho de que la adenilil-ciclasa de oocitos sea inhibida por progesterona en presencia de GMP.P(NH)P indicaría que el mecanismo de acción de la progesterona sería diferente del de otras hormonas y efectores inhibitorios previamente descritos, ya que éstos parecen actuar aumentando la actividad GTPásica asociada a las adenilil-ciclasas, acelerando así la reacción de inactivación de la adenilil-ciclasa (esquema II de la Introducción). Por el contrario, la progesterona es capaz de inhibir a la adenilil-ciclasa de oocitos aún en condiciones en que la GTPasa debería estar inactiva: en presencia de GMP.P(NH)P y en membranas tratadas con toxina del cólera.

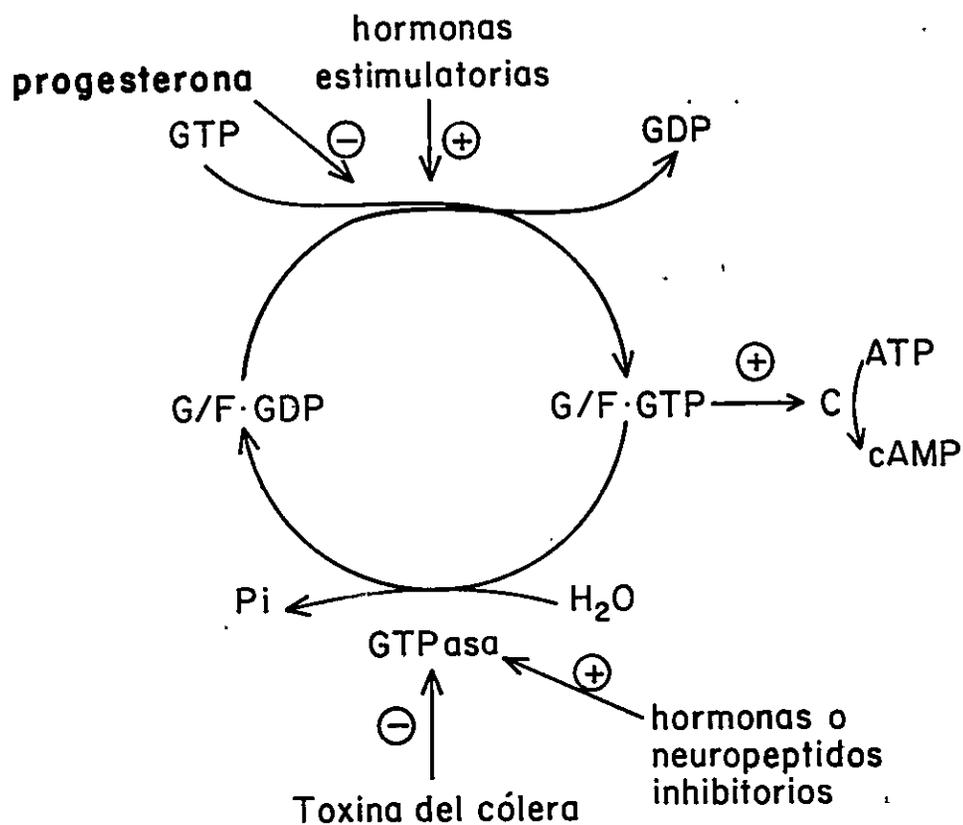
Puede entonces postularse que la progesterona actuaría inhibiendo la reacción de activación de la adenilil-ciclase de oocitos por los nucleótidos de guanosina. Los resultados que se discuten a continuación son congruentes con esta hipótesis.

b) Efecto de la progesterona en la activación de la adenilil-ciclase por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ . La activación de las adenilil-ciclasas por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  y otros análogos de GTP resistentes a la acción de  $\text{GTPa}$ -sas ocurre después de un período inicial de latencia que puede observarse en la curva de progreso de la síntesis de cAMP. El período de latencia ha sido considerado como una manifestación de la etapa limitante en la activación de la adenilil-ciclase por estos análogos, y se ha demostrado que las hormonas que activan a las adenilil-ciclasas acortan el período de latencia. Esto ha sido interpretado como evidencia de que estas hormonas acelerarían la reacción de activación de las adenilil-ciclasas, ya sea promoviendo el intercambio de GDP por GTP o  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  (Cassel y Selinger, 1977; Ross y Gilman, 1980; Limbird, 1981), ya sea acelerando una isomerización posterior al intercambio de nucleótidos de guanosina (Birnbaumer y col., 1980; Iyengar y col., 1980a) (tanto la reacción de isomerización como la reacción de intercambio de nucleótidos han sido propuestas como etapas limitantes en la activación de las adenilil-ciclasas).

Los resultados de esta tesis muestran que la progesterona alarga el período de latencia con el que  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  activa a la adenilil-ciclase de oocitos y no afecta a la latencia con la que el mismo nucleótido activa a la enzima de células foliculares (Figura 13 y

p. 99). La progesterona inhibiría por lo tanto la reacción de activación de la adenilil-ciclase de oocitos, dificultando el intercambio de nucleótidos de guanosina o la reacción de isomerización de la enzima desde una forma inactiva a una forma activa (Esquema III). La importancia del efecto de la progesterona en el período de latencia queda de manifiesto si se analizan los resultados que se obtuvieron al medir el efecto de la concentración de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  en la actividad de la adenilil-ciclase de oocitos. Cuando se determinaron las velocidades de formación de cAMP en el estado estacionario, se observó una menor inhibición por progesterona (Figura 16) que la observada cuando se incluyó la latencia en la medición de actividad (Figura 15). Esto es especialmente evidente a altas concentraciones de  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$ .

La interpretación de los resultados de activación de la adenilil-ciclase por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  en términos de posibles cambios en la afinidad por el nucleótido trifosfato se ve complicada por el hecho de que el  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  activa a la enzima en una forma aparentemente irreversible o de lenta reversión. Esto ha sido demostrado en otros sistemas (Eckstein y col., 1979; Birnbaumer y col., 1980; Strittmatter y Neer, 1980; Krall y col., 1981; Krall y Korenman, 1982) y parece también ser cierto en el caso de la adenilil-ciclase de oocitos. En efecto, parece importante destacar que la progesterona no es capaz de inhibir a la adenilil-ciclase de oocitos una vez que ésta ha sido activada por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  (Figura 14, Tabla 13), siendo también la enzima preactivada por  $\text{GMP}\cdot\text{P}(\text{NH})\text{P}$  más resistente a la inhibición



Esquema III. Mecanismo general de regulación de la adenilil-ciclasa.

G/F y C son respectivamente las subunidades reguladora y catalítica de la adenilil-ciclasa; ⊕ es estimulación ⊖ es inhibición.

por GDP $\beta$ S (Tabla 13, Figura 17).

El problema del efecto de la progesterona en la afinidad de los nucleótidos no está resuelto. Por un lado, las concentraciones de GMP.P(NH)P a las que se obtiene la mitad de la activación máxima son similares en ausencia y en presencia de progesterona ( $3,0 \times 10^{-6}$  y  $5,6 \times 10^{-6}$  M respectivamente, Figura 16), lo que indicaría que la progesterona no afectaría la afinidad aparente de la enzima por GMP.P(NH)P. Sin embargo, se observó consistentemente que a bajas concentraciones de GMP.P(NH)P la progesterona inhibe en mayor grado a la adenilil-ciclase, o, lo mismo, que en presencia de progesterona bajas concentraciones de GMP.P(NH)P activan mucho menos (Figuras 15 y 16). Además se observó que a bajas concentraciones del nucleótido la hormona disminuye apreciablemente la velocidad de formación de cAMP en el estado estacionario, cosa que no ocurre a altas concentraciones de GMP.P(NH)P (Figura 16). Estos resultados sugieren que la progesterona podría estar disminuyendo la afinidad de la adenilil-ciclase de oocitos por los nucleótidos de guanosina que la activan (GTP, GMP.P(NH)P) o aumentando la afinidad de la enzima por los que la inhiben (GDP, GDP $\beta$ S). Un mecanismo similar, pero con efectos inversos de la hormona, ha sido propuesto para la activación hormonal de diferentes sistemas de adenilil-ciclase (Ross y Gilman, 1980; Limbird, 1981). En la adenilil-ciclase de oocitos, la progesterona podría alargar la latencia aumentando la afinidad de la enzima por GDP endógeno, o disminuyendo la afinidad de la enzima por GMP.P(NH)P. Los resultados que se obtuvieron al estudiar el efecto

inhibitorio de combinaciones de progesterona y GDP $\beta$ S en la adenilil-ciclase de oocitos concordarían con esta hipótesis, ya que los efectos inhibitorios de ambos se potencian mutuamente (Tablas 13 y 14). Además, las inhibiciones por progesterona y GDP $\beta$ S presentan algunas similitudes: son mayores cuando se incluye la latencia en la determinación de actividad, intermedias cuando se determinan las actividades en el estado estacionario, y menores cuando la enzima ha sido preactivada (la inhibición es nula en el caso de la progesterona) (Tablas 13 y 14; Figuras 13, 14, 15, 16 y 17).

Aunque parece claro que la progesterona inhibiría a la adenilil-ciclase de oocitos dificultando la reacción de activación de la enzima, estudios más detallados son necesarios para establecer si hay efectos de la progesterona en la afinidad de la enzima por los nucleótidos de guanosina. Entre otros, pueden proponerse los siguientes experimentos:

- Estudiar en presencia y en ausencia de progesterona la activación por concentraciones crecientes de GTP de la enzima tratada con toxina del cólera; esto tiene la ventaja de que en general la activación por GTP no presenta un período de latencia, y el estado activado es fácilmente reversible (Birnbaumer y col., 1980).
- Estudiar el efecto de la progesterona en la unión de [ $^3$ H]GMP.P(NH)P o de [ $^3$ H]GTP a la fracción particulada de oocitos, y en la liberación de [ $^3$ H]GMP.P(NH)P o [ $^3$ H]GDP desde la fracción particulada de oocitos (Cassel y Selinger, 1978; Dufau y col., 1978; Pike y Lefkowitz, 1981).

Así como se ha postulado que las hormonas modificarían la

afinidad de la enzima por los nucleótidos de guanosina, también se ha postulado y demostrado que los nucleótidos de guanosina modifican la afinidad aparente con la que las hormonas activan a las adenilil-ciclasas (Schramm y Rodbell, 1975; Ross y col., 1977; Iyengar y col., 1980a). En el sistema de oocitos, no fue posible comparar el efecto de la concentración de progesterona en ausencia y en presencia de GTP o GMP.P(NH)P porque las actividades basal y con GTP son muy bajas. Por ello, se determinó el efecto de la concentración de progesterona en presencia de dos concentraciones de GMP.P(NH)P, no encontrándose diferencias claras en la concentración de progesterona requerida para producir la mitad de la inhibición máxima. Pero una vez más, los resultados mostraron que la progesterona inhibe en mayor grado en presencia de bajas concentraciones de GMP.P(NH)P (Figura 11).

c) Otros posibles mecanismos de inhibición de la adenilil-ciclasa de oocitos por progesterona.

i) Participación de adenosina. La adenosina y derivados de ella modifican la actividad de adenilil-ciclasa de numerosos tejidos a través de dos tipos de sitios, P y R (Londos y Wolff, 1977; Londos y col., 1978; Cooper y col., 1979; Lad y col., 1980b; Londos y col., 1980).

El sitio P se encuentra en casi todas las adenilil-ciclasas estudiadas y media siempre una inhibición de la adenilil-ciclasa por adenosina. Esta inhibición se observa sólo en sistemas libres de células, es independiente de nucleótidos de guanosina, no es

bloqueada por metilxantinas, y se observa mejor en presencia de  $Mn^{+2}$  o de una hormona activadora de la adenilil-ciclasa.

El sitio R media la activación de algunas adenilil-ciclasas y la inhibición de otras. Ambos efectos parecen estar mediados por receptores de membrana plasmática, se observan tanto en células intactas como in vitro, y parecen tener al menos en algunos casos relevancia fisiológica. Se requieren nucleótidos de guanosina (GTP o GMP.P(NH)P cuando hay activación, sólo GTP cuando hay inhibición), y los efectos mediados por este tipo de sitios son bloqueados por metilxantinas y no se observan en presencia de  $Mn^{+2}$ .

El efecto de la progesterona en la adenilil-ciclasa de oocitos no estaría mediado por un sitio R porque se observa en presencia de GMP.P(NH)P y de 3-isobutil-1-metilxantina. Tampoco estaría mediado por un sitio P porque no se observa en presencia de  $Mn^{+2}$  o de fluoruro (condiciones óptimas para una acción de adenosina a nivel de sitio P). Además, el efecto de la progesterona se observa en presencia de adenosina-desaminasa, lo que indicaría que la adenosina no media el efecto hormonal (Finidori-Lepicard y col., 1981).

En una preparación obtenida de ovario se observó que la adenosina es capaz de inhibir significativamente la actividad de adenilil-ciclasa medida en presencia de  $Mn^{+2}$ , fluoruro, y 3-isobutil-1-metilxantina. Esto indicaría que esta inhibición, al igual que la observada por Finidori-Lepicard y col. (1981), está mediada por un sitio P. Estos autores observaron además que las inhibiciones por adenosina y por progesterona eran aditivas, lo que indicaría que

los mecanismos de inhibición por adenosina (sitio P) y por progesterona son diferentes.

Hemos obtenido resultados, no incluidos en esta tesis, que confirman la idea de que la acción de la progesterona no sería mediada por adenosina: adenosina y adenosina-desaminasa no son capaces de inducir la maduración de los oocitos en ausencia de progesterona, y tampoco afectan la maduración inducida por progesterona.

ii) Participación de calcio y calmodulina. Hay una serie de pruebas que indican que el  $Ca^{+2}$  podría participar en la inducción de la maduración por progesterona (Moreau y col., 1976b; Schorderet-Slatkine y col., 1976; Bravo y col., 1978; Masui y Clarke, 1979; Kostellow y col., 1980; Wasserman y col., 1980; Morril y col., 1980, 1981). Por ejemplo, se ha descrito que la progesterona provoca un aumento transitorio de  $Ca^{+2}$  libre intracelular, y se ha observado que  $Ca^{+2}$  inyectado en el cortex del oocito (y no en el citoplasma) induce la maduración en ausencia de progesterona.

La calmodulina es una proteína que al unir  $Ca^{+2}$  modifica la actividad de numerosas enzimas, entre ellas algunas adenilil-ciclasas (de cerebro, de páncreas), fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y proteína-quinásas (Valverde y col., 1979; Cheung, 1980). En el caso de las adenilil-ciclasas que son reguladas por calmodulina, esta última activa a la enzima en presencia de  $Ca^{+2}$ . La calmodulina parece actuar directamente sobre la subunidad catalítica de la adenilil-ciclasa, sin afectar la función de G/F, ni requerir de la presencia de G/F o de nucleótidos de guanosina (Salter y col.,

1981; Heideman y col., 1982).

Se ha demostrado la presencia de calmodulina en oocitos de *Xenopus laevis* (Cartaud y col., 1980; Wasserman y Smith, 1981), y algunas evidencias indican que la calmodulina podría participar en la maduración inducida por progesterona (Huchon y col., 1981; Wasserman y Smith, 1981; Cartaud y col., 1981). A base de estas pruebas y a las que indican que la progesterona inhibe a la adenilil-ciclasa, algunos autores han postulado que la adenilil-ciclasa de oocitos estaría en su estado basal activada por calmodulina y  $Ca^{+2}$ , y que la progesterona inhibiría esta activación (Cartaud y col., 1981). Sin embargo, este modelo no explica algunas de las observaciones experimentales, tales como la inducción de la maduración por inyección de  $Ca^{+2}$  en el cortex, o de calmodulina y  $Ca^{+2}$ .

Los estudios incluidos en esta tesis demuestran que la inhibición de la adenilil-ciclasa de oocitos por progesterona no requiere de la presencia de  $Ca^{+2}$  ya que se observa en membranas preparadas y ensayadas en presencia de EGTA (Tabla 15). Por otro lado, el  $Ca^{+2}$  es capaz de inhibir a la adenilil-ciclasa de oocitos, pero esta inhibición y la de progesterona son aditivas (Finidori-Lepicard y col., 1981), lo que sugiere que los mecanismos de acción son diferentes. Sin embargo, no puede descartarse que en la célula intacta la progesterona inhiba a la adenilil-ciclasa en una forma directa e independiente de  $Ca^{+2}$ , y en una forma indirecta a través de cambios en la concentración o distribución de  $Ca^{+2}$  (Baulieu y col., 1978; Cartaud y col., 1981; Morril y col., 1981). Esta inhibición de la

adenilil-ciclase de oocitos por  $Ca^{+2}$  podría explicar la inducción de la maduración por inyección de  $Ca^{+2}$  en el cortex y por drogas que se supone liberarían  $Ca^{+2}$  de sitios de la membrana (Baulieu y col., 1978).

En experimentos realizados en esta tesis, se determinó que dos fenotiazinas (CAPP, flufenazina) y una butirofenona (penfluridol) inhiben a la adenilil-ciclase de oocitos cuando ésta se mide en presencia de GMP.P(NH)P (Tabla 15). Estas drogas antipsicóticas inhiben el efecto de calmodulina y  $Ca^{+2}$  en adenilil-ciclasas, fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, proteína-quinasa, etc., porque se unen a la calmodulina en presencia de  $Ca^{+2}$  (Weiss y Wallace, 1980). Sin embargo, la inhibición de la adenilil-ciclase de oocitos por CAPP, flufenazina y penfluridol es independiente de  $Ca^{+2}$ , lo que indicaría que no es mediada por calmodulina (Tabla 15, Figura 18). Por otro lado, la misma droga que inhibe la actividad de adenilil-ciclase medida en presencia de GMP.P(NH)P, la activa en presencia de fluoruro, y no tiene efecto sobre la actividad medida con  $Mn^{+2}$  como catión (Tabla 16). Es posible entonces que las drogas antipsicóticas alteren directa o indirectamente la función de la subunidad G/F, puesto que es ésta la que media las activaciones de las adenilil-ciclasas por fluoruro y por GMP.P(NH)P. Esto también apoya la idea de que el efecto de estas drogas en la adenilil-ciclase de oocitos no sería mediado por calmodulina, puesto que, como ya se dijo, en otros sistemas la calmodulina activa directamente a la subunidad catalítica C, sin alterar la función de G/F. Estos datos

indican además que los efectos de fluoruro y de GMP.P(NH)P en la subunidad G/F son diferentes a pesar de que ambos modificadores le confieren a G/F la capacidad de activar a la subunidad catalítica.

Wolff y Jones (1970) habían obtenido resultados similares, informando que la activación de la adenilil-ciclase de diversos tejidos por hormonas es inhibida por fenotiazinas, mientras que la activación de las mismas por fluoruro es aumentada por las drogas. Estos autores atribuyeron estos resultados al carácter hidrofóbico de estas drogas y a un efecto inespecífico de ellas en la estructura de la membrana. Numerosos son los datos de la literatura que muestran efectos de drogas antisicóticas, en células intactas y en membranas, que no parecen ser mediados por calmodulina (Iversen, 1975; Norman y col., 1979; Watling y Dowling, 1981; Landry y col., 1981; Litosch y col., 1982; Corps y col., 1982).

Todo ello demuestra que debe tenerse precaución al interpretar efectos de drogas antisicóticas como pruebas de la participación de calmodulina en un proceso determinado. Así, la aceleración de la maduración inducida por progesterona en presencia de una fenotiazina (Cartaud y col., 1981) no es una prueba de la participación de calmodulina en el proceso, y bien podría deberse a un efecto inhibitorio directo de la droga en la adenilil-ciclase.

Aunque tanto la progesterona como las drogas antisicóticas parecen afectar a la subunidad G/F, los mecanismos de acción serían diferentes ya que:

- CAPP inhibe en un grado similar a la adenilil-ciclase de oocitos

medida en ausencia o en presencia de una concentración saturante de progesterona (Tabla 15).

- CAPP afecta la activación de la adenilil-ciclase de oocitos por fluoruro, en cambio la progesterona no la afecta.
- El efecto de la progesterona en la adenilil-ciclase de oocitos es tejido-específico (Figura 11), mientras que el efecto de fenotiazinas en adenilil-ciclasas parece no mostrar especificidad de tejido (Wolff y Jones, 1970).
- CAPP inhibe totalmente la actividad de adenilil-ciclase de oocitos medida en presencia de GMP.P(NH)P (Figura 18), mientras que la progesterona sólo la inhibe parcialmente (Figuras 11 y 12).

Puede entonces concluirse que la progesterona inhibiría a la adenilil-ciclase de oocitos independientemente de  $Ca^{+2}$ , y que drogas antisicóticas inhiben también a la enzima en una forma aparentemente independiente de calmodulina y  $Ca^{+2}$ . Deberá estudiarse con mayor acuciosidad un posible efecto de calmodulina exógena en la adenilil-ciclase de oocitos, al igual que la posible existencia de una calmodulina intrínseca en la fracción particulada de oocitos. Debería también profundizarse el estudio del mecanismo de acción de las drogas antisicóticas en la adenilil-ciclase, determinándose la reversibilidad del efecto, su especificidad (con otras enzimas de la fracción particulada de oocitos y con la adenilil-ciclase de otras células). También parece de interés investigar el efecto de estas drogas sobre la activación de la enzima por concentraciones crecientes de GMP.P(NH)P, y sobre el período de latencia descrito en la curva de

progreso de la reacción (en presencia de GMP.P(NH)P). Además, se deberá estudiar el efecto de estas drogas en la enzima solubilizada con detergentes.

### 3. Efecto de la progesterona en la adenilil-ciclase de oocitos de diferentes estados de la oogénesis.

En el ovario de *Xenopus laevis* se encuentran oocitos en diferentes estados de la oogénesis. Seis estados (I al VI) han sido definidos de acuerdo a criterios de tamaño y morfología (Dumont, 1972) (Apéndice, Figura 19).

La actividad de adenilil-ciclase por folículo (Figura 5) o por oocito (p. 89) aumenta considerablemente durante la oogénesis. Sin embargo, una comparación cuantitativa entre los resultados obtenidos con folículos (13 a 15 veces aumentó la actividad entre los estados II y VI) y con oocitos (11 a 16 veces aumentó la actividad en los estados I-II y V-VI) no es posible debido a las siguientes razones:

- En el folículo existen dos poblaciones celulares: oocitos y células foliculares. No es posible entonces saber con precisión qué parte del aumento de actividad observado durante la oogénesis en folículos corresponde al oocito, y cual a las células foliculares, ya que sólo en el estado VI se conoce la distribución aproximada de actividad en ambas poblaciones celulares (Tabla 5).
- Las condiciones de ensayo y las fracciones utilizadas fueron muy diferentes. En folículos, la actividad se midió en homogeneizados, en presencia de  $Mn^{+2}$ , y en presencia o ausencia de fluoruro. En

oocitos, la actividad se midió en presencia de  $Mg^{+2}$  y en fracciones particuladas, desconociéndose además en este caso la recuperación de actividad en las diferentes fracciones.

Además del aumento de la actividad total, se pudo determinar que a medida que el oocito crece, la adenilil-ciclase se hace más sensible a la activación por GMP.P(NH)P. Por ejemplo, en los experimentos mostrados en la tabla 10 (experimentos 2 y 3), la actividad basal aumentó 11 y 16 veces al pasar de estados I y II a estados V y VI, mientras que la actividad medida en presencia de GMP.P(NH)P aumentó 29 y 35 veces (p.89 y 90). Aunque el grado de activación por GMP.P(NH)P varió de una preparación a otra, siempre fue mucho mayor en la adenilil-ciclase de la fracción particulada de oocitos de estados V y VI que en la enzima de oocitos de estados I a IV (Tabla 10).

También es muy significativa la observación de que la adenilil-ciclase de oocitos de estados I a IV es inhibida por progesterona pese a que estos oocitos no maduran en presencia de la hormona (Tabla 10, Figura 12). La inhibición de la adenilil-ciclase de oocitos de estados I y II muestra una dependencia de la concentración de progesterona similar a la observada en la enzima de los oocitos de estados V y VI, pero el grado de inhibición por concentraciones saturantes de hormona es menor en el caso de las enzimas de oocitos de estados I a IV (Figura 12, Tabla 10). No se sabe si hay una relación entre el menor grado de inhibición de la adenilil-ciclase y la incapacidad de los oocitos de estados I a IV de madurar en presencia de progesterona, o si la inhibición de la adenilil-ciclase por

progesterona es necesaria pero no suficiente para que se induzca la maduración. De todas maneras, el hecho de que la adenilil-ciclase de los oocitos que no maduran responda a progesterona indicaría que estos oocitos poseen receptores para la hormona. Otras evidencias indican también que al menos los oocitos de estados IV y V poseen receptores de progesterona, ya que la hormona es capaz de inducir su maduración si son incubados en medios sin potasio (Kofoid y col., 1979). Una regulación negativa de la maduración por otros factores podría explicar porqué la progesterona no es capaz de inducir maduración de los oocitos de estados I a V pese a ser capaz de inhibir a la adenilil-ciclase de estos oocitos. Por ejemplo, se ha descrito que en mamíferos la maduración del oocito es inhibida por un componente del líquido folicular (Tsafriri y col., 1977), y que en anfibios la defoliculación facilita la maduración inducida por progesterona (Reynhout y col., 1975; Mulner y Ozon, 1981). Es posible entonces que sólo los oocitos crecidos puedan madurar en presencia de progesterona debido a la disminución o desaparición en ellos de un control negativo ejercido por las células foliculares.

Como ya se dijo, se produce durante la ovogénesis un aumento de la actividad basal de adenilil-ciclase del oocito, y un aumento de las respuestas a GMP, P(NH)P y a progesterona. La ovogénesis en *Xenopus laevis* puede constituir por lo tanto un buen modelo de estudio de la expresión coordinada en una célula del receptor hormonal y de las subunidades regulatoria y catalítica de la adenilil-ciclase. Estudios similares han sido realizados en dos casos: la

transformación de reticulocitos de rata en eritrocitos (Limbird y col., 1980; Larner y Ross, 1981) y la diferenciación de preadipocitos en adipocitos, inducida por dexametasona e isobutil-metilxantina (Lai y col., 1981). En la maduración de los reticulocitos de rata, la actividad basal de adenilil-ciclase disminuye, y también la enzima se hace menos sensible a la activación por nucleótidos de guanosina, toxina del cólera y catecolaminas. Esto se debería a una disminución coordinada de las concentraciones del receptor y de las subunidades catalítica y regulatoria, y también a alteraciones en la interacción de estos componentes, probablemente debidas a cambios en las propiedades de G/F (Limbird y col., 1980; Larner y Ross, 1981). En la diferenciación de preadipocitos a adipocitos la actividad basal de adenilil-ciclase no varía significativamente, pero la enzima se hace más sensible a la activación por GMP.P(NH)P y por catecolaminas. Esto se debería a la aparición de un mayor número de receptores hormonales y a un aumento en la concentración y cambio en las propiedades de la subunidad regulatoria G/F (Lai y col., 1981). La oogénesis en oocitos de *Xenopus laevis* podría ser también un buen modelo de estudio de cambios en la concentración y propiedades de los componentes de la adenilil-ciclase durante un proceso de desarrollo.

#### CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes de este trabajo de tesis son:

1. Existe actividad de adenilil-ciclase en fracciones particuladas de oocitos y de células foliculares de *Xenopus laevis*; ambas

actividades son estimuladas por fluoruro y por GMP.P(NH)P. La adenilil-ciclase de oocitos es también activada por toxina del cólera. Todo ello indica que las adenilil-ciclasas de oocitos y de células foliculares poseen una subunidad reguladora G/F funcionalmente activa.

2. La adenilil-ciclase de oocitos es inhibida por progesterona en una forma saturable, reversible, esteroide-específica y tejido-específica. Hay una buena correlación entre las concentraciones de progesterona que inducen la maduración y aquellas que inhiben a la adenilil-ciclase. Esto sugiere que el mecanismo por el cual la progesterona induce la maduración de los oocitos in vivo incluye al menos la inhibición de la adenilil-ciclase por la hormona, lo que explicaría la disminución de los niveles intracelulares de cAMP que se observa en presencia de la hormona.

3. La inhibición de la adenilil-ciclase de oocitos por progesterona requiere de la presencia de nucleótidos de guanosina. La hormona parece inhibir la reacción de activación de la adenilil-ciclase por estos nucleótidos. La inhibición de la adenilil-ciclase por progesterona no requiere de la presencia de  $Ca^{+2}$  ni es mediada por adenosina o por los receptores de ésta. Algunas drogas antisicóticas son capaces de inhibir a la adenilil-ciclase de oocitos, pero su mecanismo parece ser diferente del de la progesterona y no estaría mediado por calmodulina y calcio.

4. Durante la ovogénesis, la actividad de adenilil-ciclase de un oocito aumenta, y también aumentan el grado de activación de la enzima por GMP.P(NH)P y el grado de inhibición de la enzima por progesterona.

## APENDICE

### LA OOGENESIS EN *Xenopus laevis*.

En el ovario de *Xenopus laevis* se encuentran oocitos en diferentes estados de la oogénesis. Seis estados (I a VI) se han definido de acuerdo al tamaño y la morfología del oocito (Dumont, 1972).

En la figura 19 se reproduce un esquema de Dumont (1972, Figura 7) en el que se ilustran las características de los diferentes estados de la oogénesis. Los oocitos de estado I son transparentes, siendo su gran núcleo y su masa mitocondrial claramente visibles. Los oocitos de estado II son blancos y opacos. Los oocitos de estados I y II son previtelogénicos. La síntesis de pigmento y la vitelogenénesis (acumulación de vitelo) comienzan en el estado III. La vitelogenénesis y el crecimiento continúan, y en el estado IV se diferencian los hemisferios animal (oscuro) y vegetativo (claro). En el estado V los oocitos han casi alcanzado su tamaño máximo y la acumulación de vitelo cesa. Los oocitos de estado VI se caracterizan por la aparición de una banda ecuatorial no pigmentada entre ambos hemisferios.

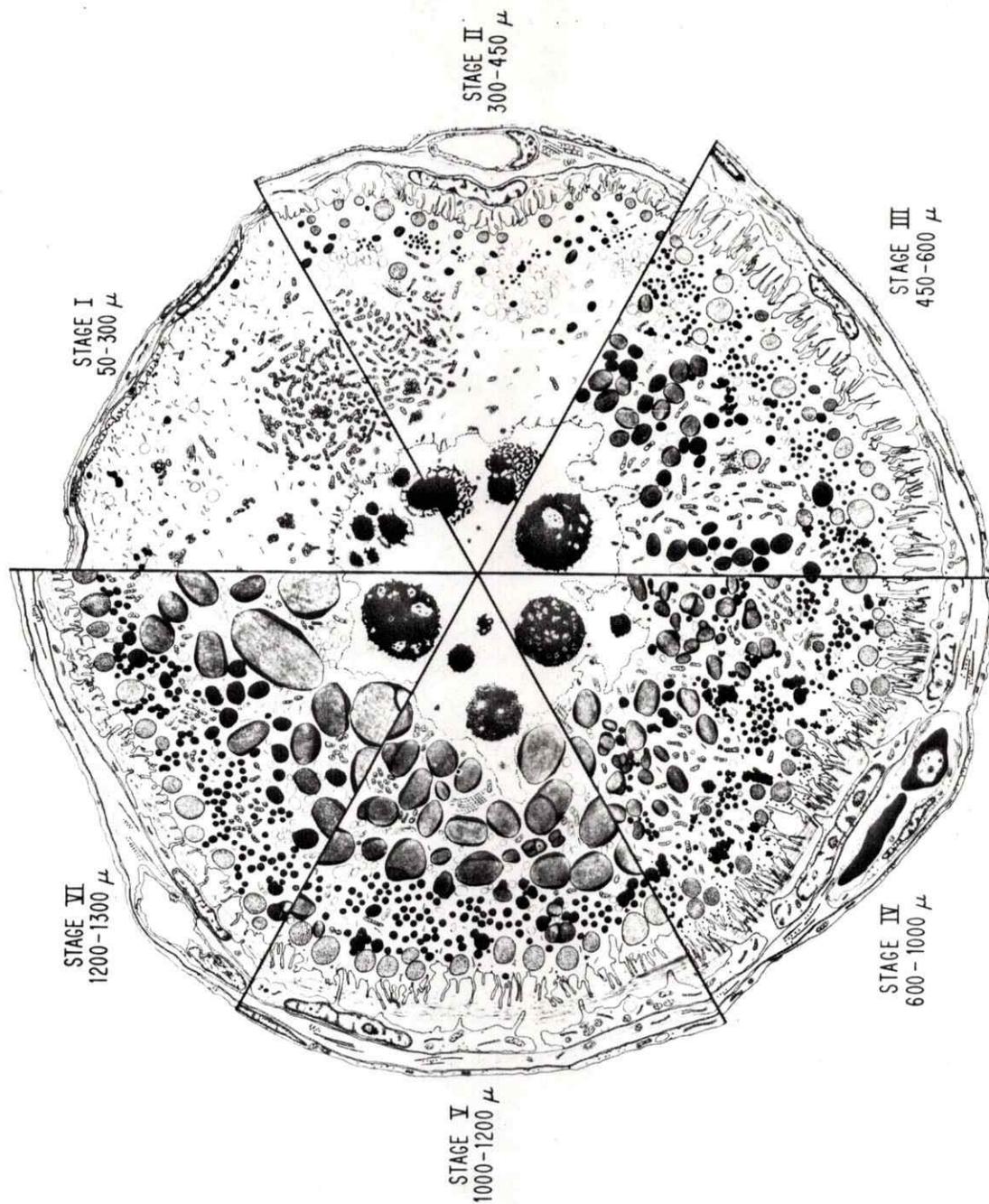


Figura 19. los seis estados de la oogénesis en *Xenopus laevis*.

Figura 19. *los seis estados de la oogénesis en Xenopus laevis*. Los oocitos de estado I están rodeados de una capa muy delgada de células foliculares y poseen una gran masa de mitocondrias, pocas gotas de lípidos y pequeños complejos de Golgi. En el estado II aumenta el grosor de las células foliculares. La capa de células foliculares se arquea sobre la superficie del oocito, y esta última adquiere microvellosidades. La membrana vitelínica comienza a formarse entre las células foliculares y el oocito. Aparecen en este estado los gránulos corticales, los premelanosomas (esferas oscuras y pequeñas) y algo de vitelo. La vitelogénesis comienza en el estado III, el que se caracteriza también por un aumento del pigmento (melanosomas) y de los gránulos corticales. La membrana vitelínica forma una capa continua sobre la superficie del oocito. En el estado IV se encuentran plaquetas de vitelo de forma irregular en la periferia del citoplasma. Las microvellosidades son grandes y numerosas. En el estado V la acumulación de vitelo disminuye paulatinamente y las microvellosidades se acortan y se reducen en número. En el estado VI muchas microvellosidades han desaparecido y la capa de células foliculares se ha adelgazado (reproducido de Dumont, 1972, Figura 7). En la figura aparecen los diámetros de los oocitos de los diferentes estados.

## BIBLIOGRAFIA

- Adamo, S., Conti, M., Geremia, R. y Monesi, V. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 97, 607-613.
- Aktories, K. y Jakobs, K.H. (1981). *FEBS Lett.* 130, 235-238.
- Allende, C.C., Bravo, R. y Allende, J.E. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 4662-4666.
- Baulieu, E.E., Godeau, F., Schorderet, M. y Schorderet-Slatkine, S. (1978). *Nature* 275, 593-598.
- Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1975). *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 5, 241-251.
- Birnbaumer, L., Yang, P.C., Hunzicker-Dunn, M., Bockaert, J. y Durán, J.M. (1976). *Endocrinology* 99, 163-184.
- Birnbaumer, L., Torres, H.N., Flawiá, M.M. y Fricke, R.F. (1979). *Anal. Biochem.* 93, 124-133.
- Birnbaumer, L., Swartz, T.L., Abramowitz, J., Mintz, P.W. e Iyengar, R. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 3542-3551.
- Bitonti, A., Moss, J., Tandon, N.N. y Vaughan, M. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 2026-2029.
- Bradham, L.S. y Cheung, W.Y. (1982). *Progress in Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 27, 189-231.
- Braun, T. y Dods, R.F. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 72, 1097-1101.
- Bravo, R., Otero, C., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 75, 1242-1246.
- Burzio, L.O. y Koide, S.S. (1977). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286, 398-407.
- Cartaud, A., Ozon, R., Walsh, M.P., Haeich, J. y Demaille, J.G. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 9404-9408.
- Cartaud, A., Huchon, D., Marot, J., Ozon, R. y Demaille, J.G. (1981). *Cell Differentiation* 10, 357-363.

- Cassel, D. y Selinger, Z. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 74, 3307-3311.
- Cassel, D. y Selinger, Z. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 75, 4155-4159.
- Cassel, D. y Pfeuffer, T. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 75, 2669-2673.
- Citri, Y. y Schramm, M. (1980). *Nature* 287, 297-300.
- Conti, M., Harwood, J.P., Hsueh, A.J.W., Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 7729-7731.
- Cooper, D.M.F., Schlegel, W., Lin, M.C. y Rodbell, M. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 8927-8931.
- Cooper, D.M.F. (1982). *FEBS Lett.* 138, 157-163.
- Corps, A.N., Hesketh, R. y Metcalfe, J.C. (1982). *FEBS Lett.* 138, 280-284.
- Cheung, W.J. (1980). *Science* 207, 19-27.
- Drury, K.C. y Schorderet-Slatkine, S. (1975). *Cell* 4, 269-274.
- Dufau, M.L., Baukal, A.J. y Catt, K.J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 77, 5837-5841.
- Dumont, J.N. (1972). *J. Morph.* 136, 153-180.
- Eckstein, F., Cassel, D., Levkovitz, H., Lowe, M. y Selinger, Z. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 9829-9834.
- Echeverría, M., Orellana, O., Jedlicki, E., Plaza, M., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1981). *Biochemistry International* 2, 539-545.
- Ezra, E. y Salomon, Y. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 5377-5382.
- Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Slatkine, S., Hanoune, J. y Baulieu, E.E. (1981). *Nature* 292, 255-257.
- Flawiã, M.M. y Torres, H.N. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 6837-6879.
- Gill, D.M. y Meren, R. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 75, 3050-3054.
- Godeau, J.F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P. y Baulieu, E.E. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 75, 2353-2357.

- Greenless, A.W. y Symons, R.H. (1966). *Biochim. Biophys. Acta* 119, 241-248.
- Hanski, E., Sternweis, P.C., Northup, J.K., Dromerick, A.W. y Gilman, A.G. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 12911-12919.
- Heideman, W., Wierman, B.M. y Storm, D.R. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 79, 1462-1465.
- Herman, C.A., Zahler, W.L., Doak, G.A. y Campbell, B.J. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 622-629.
- Huchon, D., Ozon, R. y Demaille, J.G. (1981a). *Nature* 294, 358-359.
- Huchon, D., Ozon, R., Fischer, E.H. y Demaille, J.G. (1981b). *Mol. Cell. Endocrinol.* 22, 211-222.
- Hunzicker-Dunn, M. (1981). *Biol. Reprod.* 24, 267-278.
- Ishikawa, K., Hanaoka, Y., Kondo, Y. e Imai, K. (1977). *Mol. Cell. Endocrinol.* 9, 91-100.
- Iversen, L.L. (1975). *Science* 188, 1084-1089.
- Iyengar, R., Abramowitz, J., Bordelon-Riser, M. y Birnbaumer, L. (1980a). *J. Biol. Chem.* 255, 3558-3564.
- Iyengar, R., Abramowitz, J., Bordelon-Riser, M., Blume, A.J. y Birnbaumer, L. (1980b). *J. Biol. Chem.* 255, 10312-10321.
- Jordana, X., Otero, C., Allende, C.C., Allende, J.E., Flawiã, M.M., Kornblihtt, A.R. y Torres, H.N. (1981a). *Mol. Cell. Biochemistry* 40, 87-93.
- Jordana, X., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1981b). *Biochemistry International* 3, 527-532.
- Jordana, X., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1982). *FEBS Lett.* 143, 124-128.
- Kaslow, H.R., Johnson, G.L., Brothers, V.M. y Bourne, H.R. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 3736-3741.
- Katada, T. y Ui, M. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 8310-8317.
- Kimura, N. y Nagata, N. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 3829-3835.
- Kimura, N. y Shimada, N. (1980). *FEBS Lett.* 117, 172-174.
- Kofoid, E.C., Knauber, D.C. y Allende, J.E. (1979). *Dev. Biol.* 72, 374-380.

- Koski, G. y Klee, W.A. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 78, 4185-4189.
- Kostellow, A.B., Ziegler, D. y Morrill, G.A. (1980). *J. Cyclic Nucl. Res.* 6, 347-358.
- Krall, J.F., Leshon, S.C., Frolich, M. y Korenman, S.G. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 5436-5442.
- Krall, J.F. y Korenman, S.G. (1982). *Arch. Biochem. Biophys.* 213, 585-589.
- Lad, P.M., Nielsen, T.B., Preston, M.S. y Rodbell, M. (1980a). *J. Biol. Chem.* 255, 988-995.
- Lad, P.M., Nielsen, T.B., Londos, C., Preston, M.S. y Rodbell, M. (1980b). *J. Biol. Chem.* 255, 10841-10846.
- Lai, E., Rosen, O.M. y Rubin, C.S. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 12866-12874.
- Lambert, M., Svoboda, M. y Cristophe, J. (1979). *FEBS Lett.* 99, 303-307.
- Landry, Y., Amellal, M. y Ruckstuhl, M. (1981). *Biochem. Pharmacol.* 30, 2031-2032.
- Larnér, A.C. y Ross, E.M. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 9551-9557.
- Limbird, L.E. y Lefkowitz, R.J. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 799-802.
- Limbird, L.E. y Lefkowitz, R.J. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 75, 228-232.
- Limbird, L.E., Hickey, A.R. y Lefkowitz, R.J. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 2677-2683.
- Limbird, L.E., Gill, D.M. y Lefkowitz, R.J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 77, 775-779.
- Limbird, L.E., Gill, D.M., Stadel, J.M., Hickey, A.R. y Lefkowitz, R.J. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 1854-1861.
- Limbird, L.E. (1981). *Biochem. J.* 195, 1-13.
- Lineweaver, H. y Burk, D. (1934). *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658-666.
- Litosch, I., Fradin, M., Kasaiian, M., Lee, H.S. y Fain, J.N. (1982). *Biochem. J.* 204, 153-159.

- Londos, C. y Wolff, J. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 74, 5482-5486.
- Londos, C., Cooper, D. M.F., Schlegel, W. y Rodbell, M. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 75, 5362-5368.
- Londos, C., Cooper, D.M.F. y Wolff, J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 77, 2551-2554.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maller, J.L. y Krebs, E.G. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 1712-1718.
- Maller, J.L., Wu, M. y Gerhart, J.C. (1977). *Dev. Biol.* 58, 295-312.
- Maller, J.L., Butcher, F.R. y Krebs, E.G. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 579-582.
- Marot, J., Bellé, R. y Ozon, R. (1977). *Dev. Biol.* 59, 91-95.
- Masui, Y. (1967). *J. Exp. Zool.* 166, 365-376.
- Masui, Y. y Clarke, H.J. (1979). *Int. Rev. Cytology* 57, 185-282.
- Moreau, M., Dorée, M. y Guerrier, P. (1976). *J. Exp. Zool.* 197, 443-449.
- Morrill, G.A., Schatz, F., Kostellow, A.B. y Poupko, J.M. (1977). *Differentiation* 8, 97-104.
- Morrill, G.A., Ziegler, D.H. y Kostellow, A.B. (1980). *Cell Calcium* 1, 359-370.
- Morrill, G.A., Ziegler, D.H. y Kostellow, A.B. (1981). *Life Sci.* 29, 1821-1835.
- Mulner, O., Huchon, D., Thibier, C. y Ozon, R. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 582, 179-184.
- Mulner, O. y Ozon, R. (1981). *Gen. Comp. Endocrinol.* 44, 335-343.
- Norman, J.A., Drummond, A.H. y Moser, P. (1979). *Mol. Pharmacol.* 16, 1089-1094.
- Northup, J.K., Sternweis, P.C., Smigel, M.D., Schleifer, L.S., Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 77, 6516-6520.

- Orly, J. y Schramm, M. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 73, 4410-4414.
- Pfeuffer, T. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 7224-7234.
- Pfeuffer, T. (1979). *FEBS lett.* 101, 85-89.
- Pike, L.J. y Lefkowitz, R.J. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 6860-6867.
- Pike, L.J. y Lefkowitz, R.J. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 2207-2212.
- Rasenick, M.M. y Bitensky, M.W. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 77, 4628-4632.
- Reynhout, J.K., Taddei, C., Smith, L.D. y La Marca, M.J. (1975). *Dev. Biol.* 44, 375-379.
- Rodbell, M. (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 5744-5750.
- Rodbell, M. (1980). *Nature* 284, 17-22.
- Ross, E.M., Maguire, M.E., Sturgill, T.W., Biltonen, R.L. y Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5761-5775.
- Ross, E.M., Howlett, A.C., Ferguson, K.M. y Gilman, A.G. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 6401-6412.
- Ross, E.M. y Gilman, A.G. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49, 533-564.
- Ross, E.M. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 1949-1953.
- Rubin, C.S. y Rosen, O.M. (1975). *Ann. Rev. Biochem.* 44, 831-887.
- Sadler, S.E. y Maller, J.E. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 6368-6373.
- Sadler, S.E. y Maller, J.E. (1982). *J. Biol. Chem.* 257, 355-361.
- Salomon, Y., Londos, C. y Rodbell, M. (1974). *Anal. Biochem.* 58, 541-548.
- Salter, R.S., Krinks, M.H., Klee, C.B. y Neer, E.J. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 9830-9833.
- Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M. y Baulieu, E.E. (1976). *Nature* 262, 289-290.
- Schorderet-Slatkine, S., Schorderet, M., Boquet, P., Godeau, J.F. y Baulieu, E.E. (1978). *Cell* 15, 1269-1275.

- Schramm, M. y Rodbell, M. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 2232-2237.
- Schramm, M., Orly, J., Eimerl, S. y Korner, M. (1977). *Nature* 268, 310-313.
- Schulster, D., Orly, J., Seidel, G. y Schramm, M. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 1201-1206.
- Seelenfreund, D. (1981). Tesis para optar al título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. U. de Chile.
- Speaker, M.G. y Butcher, F.R. (1977). *Nature* 267, 848-850.
- Stadel, J.M., Shorr, R.G.L., Limbird, L.E. y Lefkowitz, R.J. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 8718-8723.
- Stengel, D. y Hanoune, J. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 5394-5398.
- Sternweis, P.C., Northup, J.K., Smigel, M.D. y Gilman, A.G. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 11517-11526.
- Strittmatter, S. y Neer, E.J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 77, 6344-6348.
- Svoboda, M., Furnelle, J., Eckstein, F. y Cristophe, J. (1980). *FEBS lett.* 109, 275-279.
- Tsafiriri, A., Channing, C.P., Pomerantz, S.H. y Lindner, H.R. (1977). *J. Endocrinol.* 75, 285-291.
- Valverde, I., Vandermeers, A., Anjane-Yulu, R. y Malaisse, W.J. (1979). *Science* 206, 225-227.
- Wallace, R.A., Misulovin, Z. y Etkin, L.D. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 78, 3078-3082.
- Walseth, T.F. y Johnson, R.A. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* 526, 11-31.
- Wasserman, W.J. y Masui, Y. (1975). *Exptl. Cell Res.* 91, 381-388.
- Wasserman, W.J., Pinto, L.H., O'Connor, C.M. y Smith, L.D. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 77, 1534-1536.
- Wasserman, W.J. y Smith, L.D. (1981). *J. Cell Biol.* 89, 389-394.
- Watling, K.J. y Dowling, J.E. (1981). *J. Neurochem.* 36, 559-568.

Weiss, B. y Wallace, T.L. (1980). En *Calcium and Cell Function*, vol. 1, pp. 329-379, edited by W.Y. Cheung (Ac. Press).

Welton, A.F., Lad, P.M., Newby, A.C., Yamamura, H., Nicosia, S. y Rodbell, M. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 5947-5950.

Wolff, J. y Jones, A.B. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 65, 454-459.

Yamamoto, K.R. y Alberts, B.M. (1976). *Ann. Rev. Biochem.* 45, 721-746.