

## INFLUENCIA DEL DESARROLLO Y DEL TESTICULO SOBRE LA ACTIVIDAD ESTERASICA DE MUSCULO CARDIACO Y ESQUELETICO DE LA RATA

The influence of development and testes on esterase activity in  
myocardium and skeletal muscle of the rat.

RAÚL DOMENECH y ONOFRE GONZÁLEZ

*Cátedra de Fisiopatología, Escuela de Medicina, Universidad de Chile,  
Casilla 3170, Santiago, Chile.*

Recibido para su publicación el 20 de Enero de 1967.

### RESUMEN

Se estudió la influencia del desarrollo post-natal y de la gónada masculina sobre la actividad esterásica inespecífica de músculo cardíaco y esquelético de la rata. Mediante enzimograma en acrilamida se lograron separar siete fracciones de actividad esterásica en la masa ventricular y cinco fracciones en el músculo esquelético. Dos de las fracciones de músculo cardíaco y una de las de músculo esquelético experimentaron un incremento de su actividad en un período del desarrollo coincidente con la pubertad del animal. La orquiectomía bilateral total en la rata pre-púber (30 días de edad) provocó una disminución de la actividad esterásica de estas fracciones analizadas. La administración de testosterona desde el momento de la castración recuperó esta actividad.

Se concluye que las modificaciones de la actividad de ciertas fracciones de esterazas de músculo cardíaco y esquelético durante la pubertad de la rata son dependientes de la secreción hormonal del testículo.

### INTRODUCCIÓN

La influencia del desarrollo y de los factores hormonales sobre la actividad enzimática ha motivado desde hace algún tiempo numerosos trabajos experimentales. Una de las dificultades principales para este estudio ha sido la falta de información detallada acerca de la composición enzimática de los tejidos. Los métodos químicos e histoquímicos utilizados en un comienzo no han permitido la separación de fracciones de una enzima, las que difieren en su estructura aún cuando presentan igual actividad enzimática.

En los últimos años, el desarrollo de los procedimientos electroforéticos ha conseguido obtener un método simple que permite el análisis en detalle de las fracciones de una enzima (enzimograma); este método ha permitido establecer modelos enzimáticos tisulares que han servido de base para el estudio de la influencia

de la especie, del desarrollo y del sexo sobre una enzima (1, 2, 3, 4, 5 y 6).

Se ha demostrado en suero y en tejidos como riñón, epidídimo y tejido nervioso la influencia del desarrollo (3, 4) y de las hormonas sexuales (6, 7, 8 y 9) sobre enzimas que presentan actividad esterásica.

En nuestro laboratorio, en que se estudia la importancia de la actividad esterásica en el funcionamiento del miocardio, consideramos fundamental analizar en una primera etapa la influencia del desarrollo post-natal y de las gónadas en un modelo enzimático de esterazas de músculo cardíaco y comparativamente de músculo esquelético. En esta comunicación nos hemos limitado a estudiar en la rata la influencia de la gónada masculina.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Ratas machos del stock de vivero de nuestro laboratorio se agruparon de la siguiente manera:

A. Cinco grupos de 6 animales cada uno en que se analizó la influencia del desarrollo post-natal; a estas ratas se dio muerte a los 30, 40, 50, 60 y 70 días de edad.

B. Dos grupos de 6 animales cada uno en que se estudió la influencia de la gónada masculina; los animales de ambos grupos se castraron a los 30 días de edad. A los animales de uno de estos grupos se les suministró por vía subcutánea propionato de testosterona en aceite de oliva en dosis de 40  $\mu\text{g}/100\text{g}$  p.c. a partir del momento de la castración y cada dos días. A las ratas del otro grupo (testigo) se les inyectó solamente aceite de oliva. A todos los animales se dio muerte a los 70 días de edad.

Paralelamente con el grupo al que se le administró testosterona desde el momento de la castración, se estudió un grupo de 6 animales en que la administración de la hormona se comenzó a los 40 días de edad.

Las ratas se anestesiaron con nebutal sódico (5 mg por 100 g) y luego se perfundieron 200 ml de solución Ringer-Locke, pH 7,4 a 37°C por vía aorta abdominal. Se diseccionó músculo de la pared abdominal y masa ventricular que se conservaron a -20°C; posteriormente estos tejidos se liofilizaron. Previa tamización se homogeneizó el material resultante en 15 volúmenes de tampón fosfato de fuerza iónica 0,1, pH 7,8 y luego se centrifugó a 20.000 g por 30 minutos a 20°C. Se separó el sobrenadante, el cual se utilizó para los análisis electroforéticos posteriores. Se estimó la concentración de seroproteínas presentes en los extractos por medio de anti-seroproteínas y se demostró que era inferior a 0,5 mg%, concentración que se demostró no interfiere en la reacción enzimática. Se practicó electroforesis en acrilamida según la modificación técnica descrita por Matson (10). La acrilamida y la metilbisacrilamida se polimerizaron con beta-dimetil-amino-propionitrilo en tampón Tris-glicina, pH 9,2. Sobre la columna de acrilamida se colocaron 150  $\mu\text{l}$  de sacarosa al 40%; sobre ésta se agregó una alícuota de 20 a 25  $\mu\text{l}$  de la muestra. La separación electroforética se efectuó aplicando una corriente eléctrica de 0,8 mA por tubo durante 2 horas a temperatura ambiente. Concluida la electroforesis se separaron de los tubos los geles de acrilamida y se sumergieron en una solución que contenía, sustrato inespecífico para esterasas (alfa naftil-acetato), un acoplador para el naftol liberado por la reacción enzimática (Fast Blue RR Salt) y tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4.

Para la determinación cuantitativa de la actividad enzimática se cortaron solamente aquellas zonas en que interesaba estimar la actividad esterásica; las bandas seleccionadas se disgregaron con un homogeneizador; la suspensión obtenida se centrifugó y en el sobrenadante se determinó la actividad esterásica de acuerdo con la técnica descrita por Nachlas y Seligman (11). Además se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry *et al.* (12) en las zonas en que se practicó la cuantificación de la actividad enzimática.

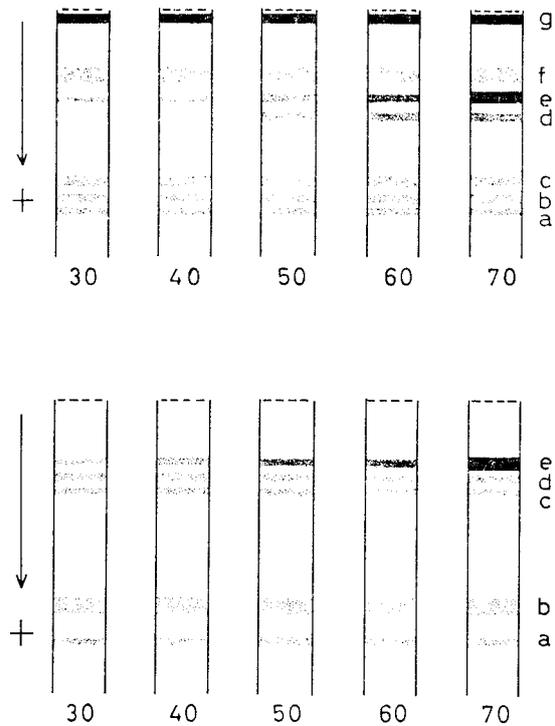


Fig. 1: Enzimgrama de actividad esterásica de músculo cardíaco (arriba) y músculo esquelético (abajo) de ratas. Los números bajo cada columna indican la edad del animal en días.

## RESULTADOS

En el enzimgrama en gel de acrilamida se lograron separar en la masa ventricular siete fracciones con actividad esterásica, que emigran hacia el ánodo y que arbitrariamente hemos designado con las letras a, b, c, d, e, f, y g. En la Fig. 1 puede observarse que la actividad esterásica de las fracciones d y e fue escasa en los animales muertos a los 30 y 40 días de edad y claramente mayor a partir de los 50 días de edad. No se observó modificación de la actividad de las otras fracciones con la edad.

En la parte inferior de la Fig. 1 se muestra la actividad esterásica de las fracciones de músculo esquelético que hemos denominado a, b, c, d y e. La actividad de la fracción e fue mayor después de los 50 días de edad. La actividad de las fracciones c y d creció progresivamente con la edad. Las otras fracciones no experimentaron mayores variaciones en relación con la edad.

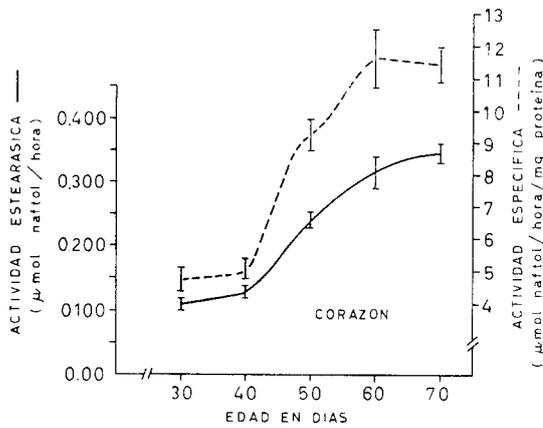


Fig. 2: Modificaciones de la actividad esterásica del músculo cardíaco en relación con la edad.

La actividad esterásica se midió exclusivamente en aquellas fracciones que presentaron cambios en la actividad enzimática durante el desarrollo post-natal. Técnicamente no es posible separar fracciones de migración muy próximas, por lo cual se procedió a eluir en conjunto las fracciones *d*, *e* y *f* de la masa ventricular. Por igual motivo se procedió a eluir en conjunto las fracciones *c*, *d* y *e* del músculo esquelético.

En las Figs. 2 y 3 se observan los cambios cuantitativos de la actividad esterásica del corazón y de músculo esquelético en el curso del desarrollo, respectivamente. Llama la atención la magnitud del incremento de la actividad enzimática de la masa ventricular que se observó con posterioridad a los 40 días de edad (Fig. 2). En la Fig. 3 se observa un notable aumento de la actividad esterásica del músculo esquelético después de los 50 días de edad.

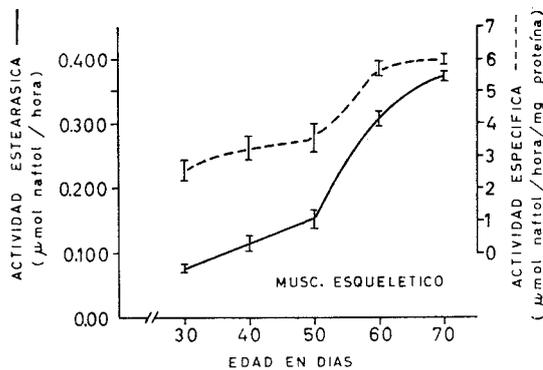


Fig. 3: Modificaciones de la actividad esterásica del músculo esquelético en relación con la edad.

La concentración de proteínas en las muestras de músculo cardíaco, no se modificó apreciablemente a través de la edad (0,66 mg de proteínas por ml a los 30 días de edad y 0,86 mg/ml a los 70 días de edad). En cambio, en el músculo esquelético se observó una modificación de la concentración de las proteínas en relación con la edad (0,96 mg de proteínas por ml a los 30 días y 2,06 mg/ml a los 70 días de edad). Como los cambios de actividad enzimática podrían ser la consecuencia de variaciones de la concentración de las proteínas tisulares, se prefirió expresar la actividad enzimática en función del contenido de proteínas de la zona de elución ("actividad específica"). En las Figs. 2 y 3 se observa que los cambios de la actividad específica siguen una evolución con la edad similar a los cambios descritos anteriormente.

En la Fig. 4 se aprecian las modificaciones cuantitativas de la actividad esterásica del miocardio y de músculo esquelético de animales castrados a los 30 días después del nacimiento y muertos a los 40 días después. Con la orquidectomía total bilateral se observa una disminución significativa de la actividad esterásica de corazón y músculo esquelético. En la misma figura se exponen los efectos de la administración de testosterona desde el

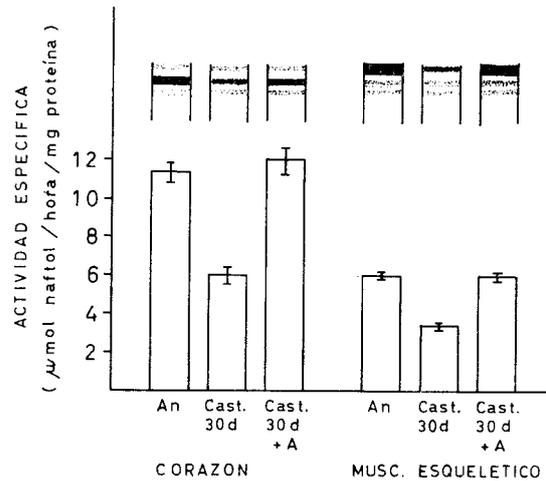


Fig. 4: Influencia de la castración y la administración de andrógenos sobre la actividad esterásica inespecífica de músculo cardíaco y esquelético. En la parte superior se presenta el diagrama de las bandas de enzimo-grama *d*, *e* y *f* de músculo cardíaco y *c*, *d* y *e* de músculo esquelético, de acuerdo con la Fig. 1. An = animal normal de 70 días de edad. Cast = animal de 70 días de edad, castrado a los 30 días. A = administración de andrógenos (propionato de testosterona).

momento de la castración hasta la muerte (70 días de edad). Se aprecia que la actividad enzimática de las fracciones cuya actividad había disminuido con la castración, la recuperaron prácticamente en su totalidad con el tratamiento con testosterona.

En el grupo en el cual la administración de testosterona se inició a los 40 días de edad, se observaron efectos semejantes de la hormona, aunque de una magnitud inferior a la encontrada en los animales tratados desde el día de la castración.

#### DISCUSIÓN

Varios autores han señalado la influencia de hormonas sexuales sobre la actividad esterásica en diversos tejidos; así, por ejemplo, Sawyer y Everett (13) mediante microtitulación química demostraron que la actividad de colinoesterasas inespecíficas del suero de rata es mayor en la hembra que en el macho y que la síntesis de estas enzimas aumenta con la administración de estrógenos. Allen y Hunter (14) demostraron mediante enzimograma en almidón que la actividad de algunas fracciones de esterasas del epidídimo de ratón aumenta con la castración, mientras que la de otras fracciones disminuye; la administración de testosterona permite la recuperación de la actividad de estas últimas. Augustinsson y Henricson (9), también mediante enzimograma en almidón, observaron que la actividad de arilesterasa del suero de perro macho aumenta con la castración, efecto que es revertido al administrar testosterona al animal castrado. Recientemente Allen y Moore (6) trabajando con la técnica de enzimograma en acrilamida (electroforesis en disco) han señalado modificaciones de algunas bandas de actividad esterásica del suero del ratón por la acción de testosterona y de la castración.

Nuestros resultados demuestran que ciertas enzimas de actividad esterásica del músculo cardíaco y esquelético de la rata macho, incrementan su actividad en un período del desarrollo que según otros autores correspondería a la pubertad (15).

Por otra parte, es evidente que la testosterona también tiene influencia sobre determinadas esterasas de corazón y de músculo esquelético, como se aprecia por

la disminución de actividad de ciertas fracciones de esterasas en el animal adulto que ha sido castrado a los 30 días de edad (antes de la pubertad). Relacionando este hecho con la influencia del desarrollo, se podría concluir que los incrementos de actividad esterásica que ocurren en el período de la pubertad serían debidos principalmente a la secreción de testosterona en el testículo, como lo demuestra la recuperación de la actividad enzimática cuando se administra testosterona al animal castrado. Cabe la crítica que la administración de testosterona en nuestros experimentos no simula la pubertad del animal, por cuanto se comenzó el tratamiento con la hormona después de la castración, es decir, a una edad aún temprana. Esta forma de proceder se adoptó con el objeto de acentuar los efectos de la testosterona, ya que en el grupo experimental en que se administró testosterona tardíamente (40 días de edad) sólo se consiguió una recuperación parcial de la actividad esterásica disminuida con la castración.

La forma en que los andrógenos modifican la actividad enzimática está más allá del objetivo de este trabajo. Sin embargo, hay que señalar que esta acción es diferente para diversos tipos de esterasas. Así, por ejemplo, a diferencia de la acción activadora de la testosterona sobre algunas esterasas encontradas por Allen y Hunter (14) en epidídimo de ratón y la acción también activadora de esta hormona en nuestros resultados, se ha comprobado una acción inhibitoria de la testosterona sobre algunas esterasas de suero de perro (9).

Además de la importancia de profundizar en el estudio de la relación hormona-enzima, nuestros resultados plantean la necesidad de identificar en forma específica estas enzimas de actividad esterásica que son modificadas por hormonas sexuales y estudiar su significado en relación con la función del órgano.

#### SUMMARY

The nonspecific esterase activity of myocardium and skeletal muscle of the male rat at different ages was studied. Zymogram in acrylamide was used according to Matson (10). Seven fractions from the myocardium and five fractions

from the skeletal muscle were separated (Fig. 1). Only two fractions of myocardium esterase activity and one of the skeletal muscle showed increment after puberty (Figs. 2 and 3). The enzyme activity of the puberty-modified fractions was reduced after castration. The esterase puberty-modified fractions recovered their activity when the castrated animals were treated with testosterone (Fig. 4).

The changes in activity in myocardium and skeletal muscle esterases of the male rat have been discussed in relation to the dependence of the sexual development.

#### REFERENCIAS

- 1.—MARKERT, C. L. y URSPRUNG, H. — *Developmental Biology* 5:363, 1962.
- 2.—SOLOMON, E. P., JONHSON, E. M. y GREGG, J. H. — *Developmental Biology* 9:314, 1964.
- 3.—SYNER, F. N. — *Federation Proceeding* 23:504, 1964.
- 4.—BERNSOHN, J., BARROW, K. D., HESS, A. R. y HEDRICK, M. T. — *J. Neurochem.* 10:783, 1963.
- 5.—MARKERT, C. L. y HUNTER, R. L. — *J. Histochem. Cytochem.* 7:42, 1959.
- 6.—ALLEN, R. C. y MOORE, D. J. — *Endocrinology* 78:655, 1966.
- 7.—SHAW, C. R. y KOEN, A. L. — *Science* 140:70, 1963.
- 8.—FRIEDMAN, M. M. y LAPMAN, B. — *Am. J. Obstet. Gynecol.* 82:132, 1961.
- 9.—AUGUSTINSSON, K. B. y HENRICSON, B. — *Acta Endocrinologica* 50:145, 1965.
- 10.—MATSON, CH. — *Anal. Biochem.* 13:294, 1965.
- 11.—NACHLAS, M. M. y SELIGMAN, A. M. — *J. Biol. Chem.* 181:343, 1949.
- 12.—LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. L. — *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
- 13.—SAWYER, CH. H. y EVERETT, J. W. — *Endocrinology* 39:307, 1946.
- 14.—ALLEN, J. M. y HUNTER, R. L. — *J. Histochem.* 8:50, 1960.
- 15.—RAMÍREZ, V. D. y PRAGER, R. — *Arch. Biol. Med. Exp.* 2:161, 1965.