

043
US
CDR
P1

POLI-ADP-RIBOSILACIÓ I CONTINGUT DE NAD DURANT LA DIFERENCIACIÓ DE LA LÍNIA GERMINAL ESPERMATOGÈNICA.

Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques, realitzada per Montserrat Coromines i Guiu, sota la direcció del Dr. Cristóbal Mezquita i Plà, en el Departament de Fisiologia i Bioquímica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

V.P.

Montserrat Coromines i Guiu

Cristóbal Mezquita i Plà

Barcelona, 10 de Novembre del 1986



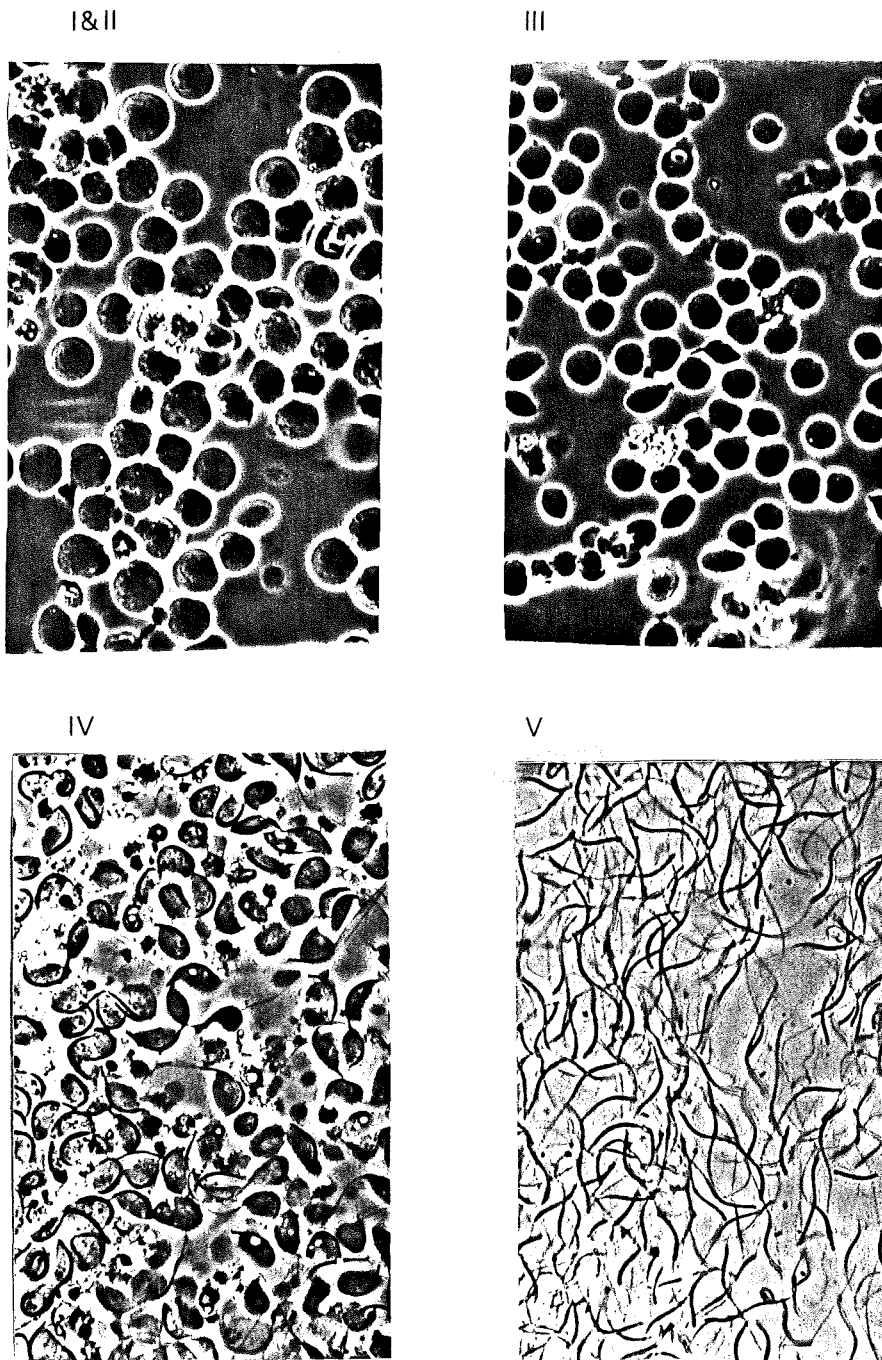


Fig.3.2- Microfotografia de les cèl.lules en diferents estadis de l'espermatogènesi separades per elutriació.

- I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques
- III - espermatides rodones
- IV - espermatides allargades
- V - espermatozoides recollits directament del conducte deferent.

3.2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT POLI(ADP-RIBOSA) POLIMERASA

3.2.1. Estudi de la incorporació d'ADP-ribosa en nuclis de cèl.lules testiculars i espermatozoides

L'estudi de l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa s'ha realitzat en mesurar la incorporació d'ADP-ribosa procedent del NAD dins el material insoluble en àcid tricloroacètic al 20% (sec .2.4).

Els nuclis s'han aïllat de les cèl.lules testiculars separades per sedimentació a força de gravetat unitat i dels espermatozoides madurs homogeneïtzant en la solució de sacarosa 0.25 M (sec. 2.3) que conté bisulfit sòdic i PMSF com a inhibidors de la proteòlisi. Aquests nuclis aïllats s'han incubat amb $-^{14}\text{C}$ -NAD $2 \mu\text{M}$ a 37°C durant 2 minuts i precipitat amb TCA al 20%.

L'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa, expressada com a ADP-ribosa incorporada respecte a DNA, decreix marcadament durant la transició de cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques (estadis I i II) i espermàtides rodones (estadi III) a espermàtides avançades (estadi IV) i espermatozoides (estadi V), als quals no s'ha trobat activitat enzimàtica (taula 3.I). A la fig. 3.3 es representa el mateix en forma de gràfica.

Taula 3.I

	<u>ADP-ribosa incorporada</u> <u>pmols/mg DNA/ 2 min</u>
cèl. premeiòtiques i meiòtiques	93.56± 7.47
espermàtides rodones	62.87±14.27
espermàtides allargades	15.22± 4.04
espermatozoides	0.6

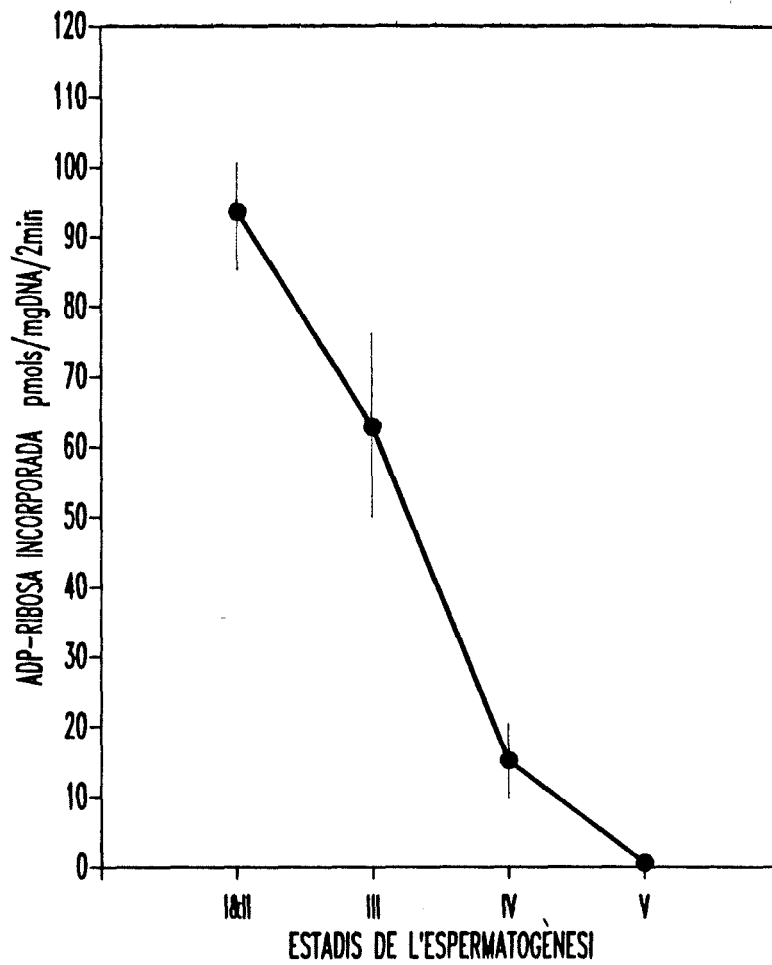


Fig.3.3-¹⁴C-Incorporació d'ADP-ribosa a partir de ¹⁴C-NAD pels nuclis en diferents estadis de l'espermatogènesi.

- I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques
- III - espermatides rodones
- IV - espermatides allargades
- V - espermatozoides

3.2.2. Recanvi de grups ADP-ribosil a les diferents cèl.lules testiculars

Els nuclis aïllats amb sacarosa 0.25 M (sec. 2.3) de les diferents cèl.lules testiculars, separades per sedimentació a 1 g s'han incubat amb ^{-14}C -NAD 2 μM a 37°C i s'hi ha afegit benzamida fins a una concentració 5 mM al cap de 2 minuts. La benzamida, un anàleg de la nicotinamida, elimina la síntesi de poli(ADP-ribosa) in vitro i no afecta l'alliberament de residus ADP-ribosil, la qual cosa permet considerar el descens en l'ADP-ribosilació com a mesura del recanvi (Wielckens et al., 1982).

L'eliminació de grups ADP-ribosil en nuclis de cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques (estadis I i II) i també en espermatides rodones (estadi III) és bifàsic, amb una fracció d'alliberament ràpid ($t_{1/2} < 5$ minuts) i una població residual d'alliberament més lent. Contràriament, els nuclis de les espermatides més avançades (estadi IV) no presenten recanvi de residus ADP-ribosil en les condicions estudiades (fig. 3.4).

A la figura 3.4 s'ha de destacar que el 100% representa quantitats molt diferents d'ADP-ribosa incorporada als nuclis dels diferents tipus cel.lulars: 93, 63 i 15 pmol/mg DNA/2 min a les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques, espermatides rodones i espermatides allargades respectivament.

L'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa no s'ha detectat, fins al moment, als espermatozoides madurs procedents del conducte deferent (estadi V). Per tant, no s'ha pogut observar el possible recanvi de residus ADP-ribosil utilitzant aquest mètode in vitro.

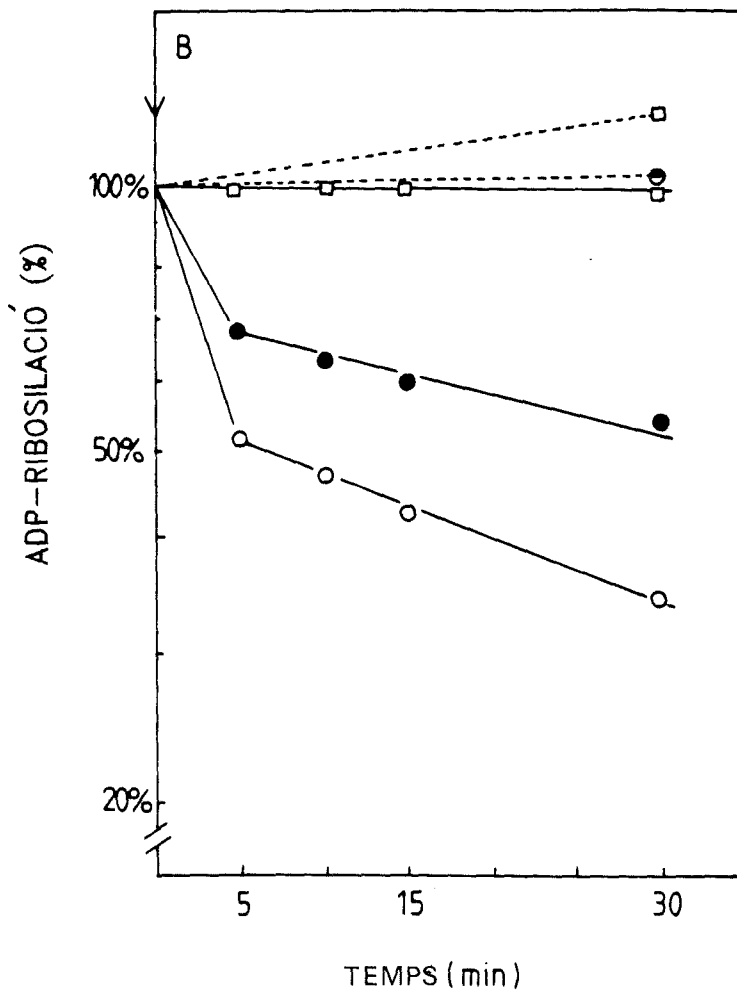


Fig.3.4- Descens del nivell d'ADP-ribosa incorporada després d'inhibir la poli(ADP-ribosa) polimerasa amb benzamida.

Els diferents nuclis testiculars s'han incubat amb ^{14}C -NAD a 37°C i la benzamida s'ha afegit als 2 minuts.

Els controls sense benzamida (---) s'han incubat durant 32 minuts.

- cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques
- espermàtides rodones
- espermàtides allargades

3.2.3. Recanvi a les espermàtides allargades després del tractament amb l'agent mutagen DMS

L'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa s'incrementa després del tractament amb agents que danyen el DNA (sec.1.2.6). Per aquest motiu, i a causa de no haver observat recanvi de residus ADP-ribosil, a la vegada que una baixa activitat a les espermàtides més avançades, hem intentat estimular la poli(ADP-ribosilació) d'aquestes cèl.lules amb l'agent mutagen dimetil sulfat (DMS).

Una població enriquida en espermàtides allargades obtinguda per centrifugació diferencial i posterior separació per sedimentació a 1g s'ha incubat amb el DMS 1 mM a 37 °C durant 1 hora. Després d'aquest tractament, s'han aïllat els nuclis i s'han incubat també a 37 C amb ^{14}C -NAD 5 μM . Al cap de 2 minuts s'hi ha afegit benzamida fins a una concentració 5 mM.

El tractament amb el dimetil sulfat incrementa la incorporació d'ADP-ribosa respecte al DNA aproximadament unes dues vegades (taula 3.II), però no afecta el recanvi de residus ADP-ribosil (fig. 3.5).

Taula 3.II

	<u>ADP-ribosa incorporada pmols/mg DNA/2 min</u>
espermàtides allargades control	34
espermàtides allargades DMS	70

La màxima quantitat de poli(ADP-ribosa) unida a proteïnes és deguda, sobretot, al balanç de dues activitats enzimàtiques, la poli(ADP-ribosa) polimerasa i la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa. En el cas de les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques i espermàtides rodones la incorporació d'ADP-ribosa a partir del NAD és màxima als 2-3 minuts (Corominas, 1982). Les espermàtides allargades, en canvi, continuen incorporant molècules d'ADP-ribosa almenys durant les 2 primeres hores (fig. 3.6).

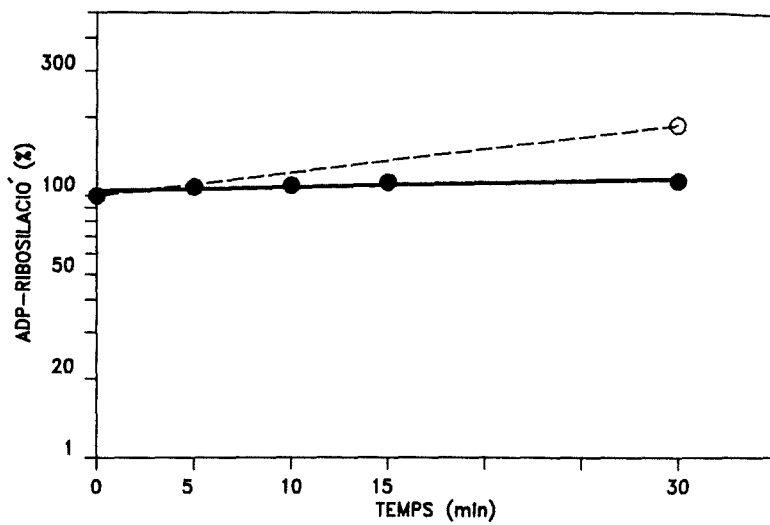


Fig.3.5- Recanvi de residus ADP-ribosa a les espermatides allargades després del tractament amb DMS. Els nuclis s'han incubat amb ^{14}C -NAD i la benzamida s'ha afegit als 2 minuts. El control sense benzamida (---) s'ha incubat durant 32 minuts.

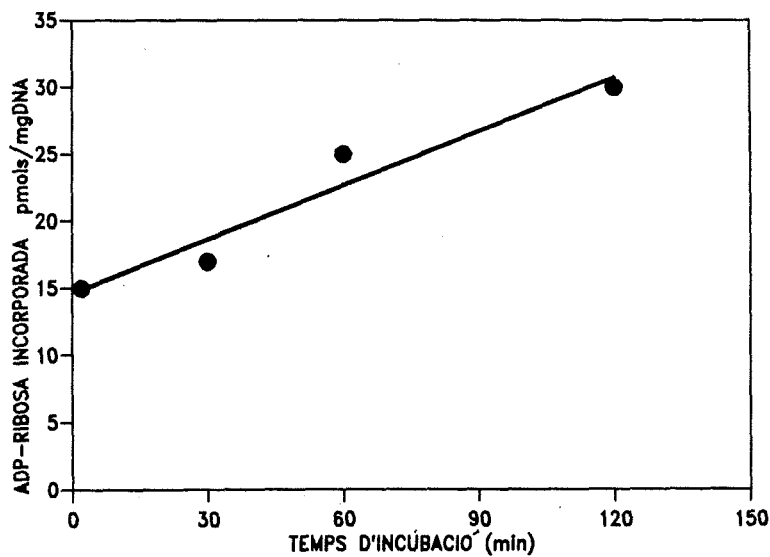


Fig.3.6- Incorporació d'ADP-ribosa als nuclis de les espermatides allargades en diferents temps d'incubació amb ^{14}C -NAD.

3.2.4. Recanvi als eritròcits

El possible recanvi de residus ADP-ribosil s'ha estudiat també a l'eritròcit del gall, que serveix com a punt de referència d'una altra cèl.lula diferenciada.

Després de seccionar la vena jugular s'ha recollit la sang en SSC (àcid cítric 15 mM NaCl 150 mM, pH 7.4) i s'han fet diversos rentats. Posteriorment s'han aïllat els nuclis d'eritròcit amb sacarosa 0.25 M (sec. 2.3) i s'ha seguit el protocol descrit a la sec. 3.2.2 per tal de mesurar el recanvi.

A la fig. 3.7 es mostra una fotografia al microscopi de contrast de fase dels eritròcits.

Els nivells d'ADP-ribosa incorporada pels eritròcits són del mateix ordre als observats a les espermatides allargades: 35 pmols/mg DNA/ 2 min i, a l'igual que en aquestes cèl.lules, tampoc es detecta recanvi de residus ADP-ribosil (fig. 3.8).

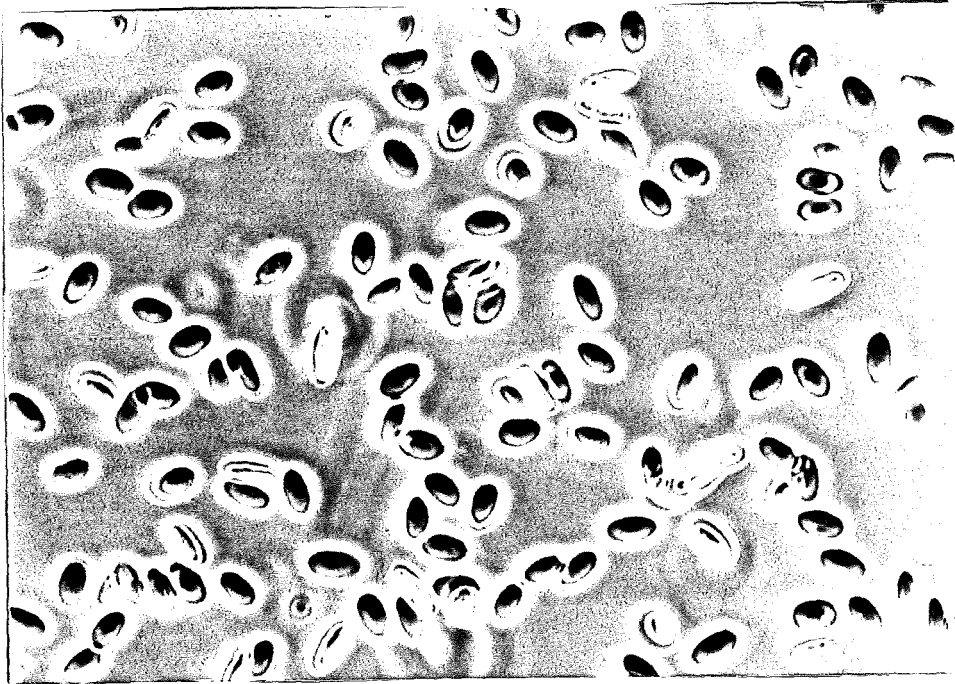


Fig.3.7- Microfotografia dels eritròcits.

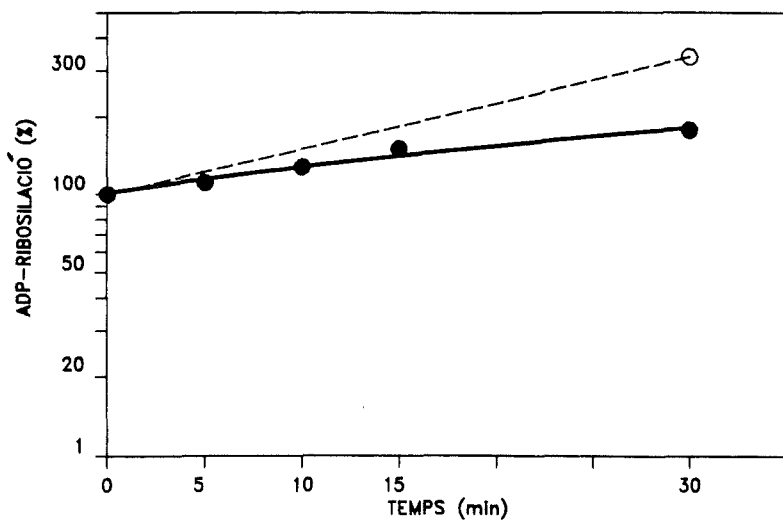


Fig.3.8- Recanvi de residus ADP-ribosil als nuclis d'eritròcit després d'inhibir la poli(ADP-ribosa) polimerasa amb benzamida.
 Els nuclis s'han incubat amb ^{14}C -NAD i la benzamida s'ha afegit als 2 minuts.
 El control sense benzamida (---) s'ha incubat durant 32 minuts.

3.3. DETERMINACIÓ QUANTITATIVA I QUALITATIVA DE LA POLI (ADP-RIBOSA)

La purificació del polímer d'ADP-ribosa s'ha fet mitjançant una cromatografia d'afinitat en resina de boronat (sec.2.5). La resina utilitzada, DHB-Bio Rex, ha estat sintetitzada prèviament i s'ha determinat la seva capacitat d'unió amb ^{14}C -NAD.

Es defineix la capacitat d'unió com la màxima quantitat de NAD que es pot aplicar a la columna mentre es mantingui una eficiència d'unió de $\geq 90\%$. A la resina sintetitzada aquesta eficiència es manté fins a una concentració de 2-3 μmols de NAD (fig. 3.9)

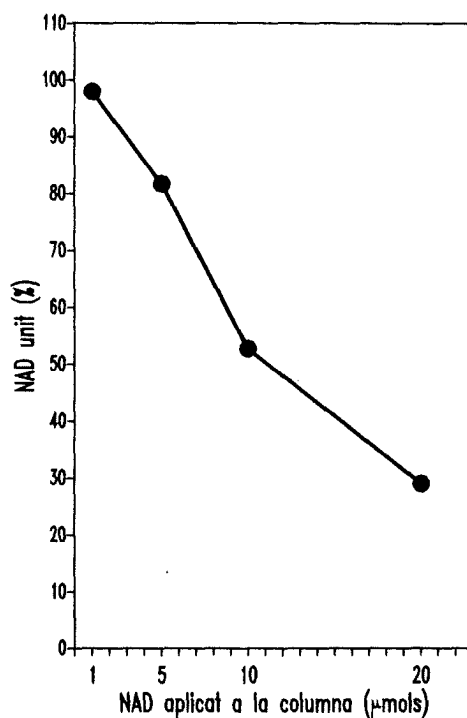


Fig.3.9- Determinació de la capacitat d'unió de la resina DHB-Bio Rex amb ^{14}C -NAD.

3.3.1. Quantificació dels nivells "in vivo" de poli(ADP-ribosa)

Les cèl.lules en diferents estadis de l'espermatogènesi s'han separat pel mètode de sedimentació a 1g i els espermatozoides madurs s'han obtingut del conducte deferent. Els nuclis s'han aïllat a partir de les cèl.lules ja separades amb sacarosa 0.25 M (sec.2.3) i bisulfit sòdic i PMSF com a inhibidors de la proteòlisi.

L'anàlisi de l'ADP-ribosa polimèrica s'ha fet a partir dels sediments d'àcid tricloroacètic al 20% dels diferents tipus cel.lulars o nuclears. La poli(ADP-ribosa) s'ha purificat per cromatografia d'afinitat i, després d'una digestió enzimàtica del polímer, s'han identificat i quantificat per cromatografia líquida d'alta pressió els derivats fluorescents de la ribosiladenosina i diribosiladenosina, nucleòsids que vénen dels residus lineal i ramificat respectivament. L'adenosina no és representativa de la poli(ADP-ribosa) ja que pot derivar d'altres molècules cel.lulars, inclòs el RNA.

La figura 3.10 mostra els perfils fluorescents dels cromatogrames obtinguts per HPLC en fase reversa a partir de mostres aïllades de cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques (A) i espermatozoides madurs (B).

A la taula 3.III s'expressen els nivells de polímer de les diferents cèl.lules testiculars respecte a DNA (A) i proteïna (B).

Taula 3.III

A)	<u>pmols</u> <u>RAdo/mg DNA</u>
cèl. premeiòtiques i meiòtiques	61.63±7.6
espermàtides rodones	50.61±6.6
espermàtides allargades	38.57±7.78
espermatozoides	12.34±1.29

B)	<u>pmols</u> <u>RAdo/mg proteïna</u>
cèl. premeiòtiques i meiòtiques	2.83±0.35
espermàtides rodones	2.13±0.39
espermàtides allargades	1.89±0.60
espermatozoides	5.38±0.57

Els nivells de poli(ADP-ribosa) de cèl.lules o nuclis en diferents estadis de l'espermatogènesi decreixen, relativament al DNA, durant el procés de diferenciació (fig. 3.11). El contingut d'ADP-ribosa polimèrica baixa des de les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques (estadis I i II) a les espermatides rodones (estadi III) i durant l'espermiogènesi a les espermatides allargades (estadi IV) i espermatozoides (estadi V).

A causa que, en general, el percentatge de residus ramificats és inferior o igual al 2% del total de residus interns, la diribosiladenosina ($R_2\text{Ado}$) no es detecta a totes les fraccions cel.lulars (taula 3.IV).

Taula 3.IV

	$\frac{R_2\text{Ado}}{R\text{Ado}+R_2\text{Ado}} \times 100$
cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques	0.7-0.9
espermatozoides	2

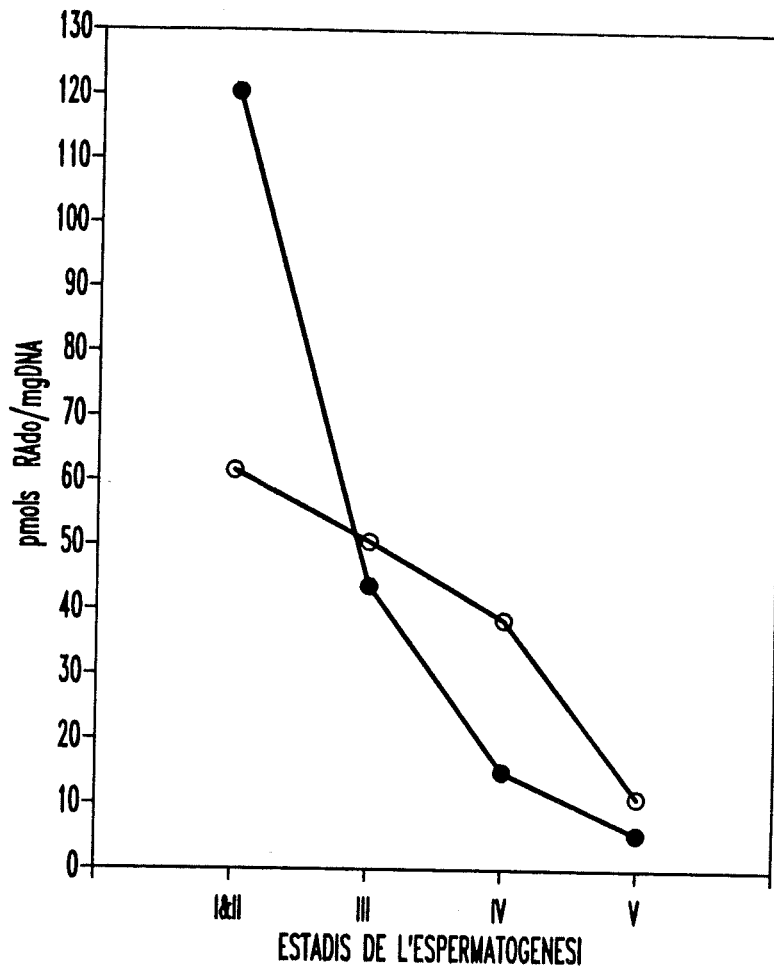


Fig.3.11- Nivells de poli(ADP-ribosa) a les cèl.lules (o) o nuclis (•) en diferents estadis de l'espermatogènesi.

- I-II - cèl. premeiòtiques i meiòtiques
- III - espermatides rodones
- IV - espermatides allargades
- V - espermatozoides

3.3.2. Estudi de la complexitat del polímer

L'estudi de la complexitat del polímer, és a dir de la seva mida, s'ha fet mitjançant electroforesi i fluorografia (sec.2.10). A causa de l'elevada quantitat que es necessita per tal de poder detectar marcatge en el gel, s'ha determinat la complexitat de la poli(ADP-ribosa) globalment a tots els nuclis testiculars.

Els nuclis s'han obtingut a partir d'una suspensió cel.lular amb sacarosa 0.25 M (sec.2.3) i aprotinina i PMSF com a inhibidors de la proteòlisi, i s'han incubat amb ^{-14}C -NAD durant 5 minuts a 37 °C. Seguidament, s'ha purificat el polímer per cromatografia d'afinitat en la resina de boronat. L'eluït de la columna s'ha dissolt en tampó de mostres i s'ha deixat desenvolupar l'electroforesi en un gel de poliacrilamida al 20%.

A la fig. 3.12 es pot veure el patró fluorogràfic de la separació electroforètica de la poli(ADP-ribosa). Les bandes representen mides diferents de polímer.

La primera banda correspon a dues unitats d'ADP-ribosa ja que la mono(ADP-ribosa) es converteix a 5'AMP en el pas previ a la cromatografia d'afinitat. El blau de bromofenol i el xilencianol co-migren amb oligo(ADP-ribosa) d'una mida aproximada de 8 i 20 residus respectivament (Alvarez-González, 1985).

Els densitogrames de la fluorografia mostren la distribució de les diferents mides de polímer (fig.3.13). La mida majoritària correspon, doncs, a 6-10 residus d'ADP-ribosa.

BBF

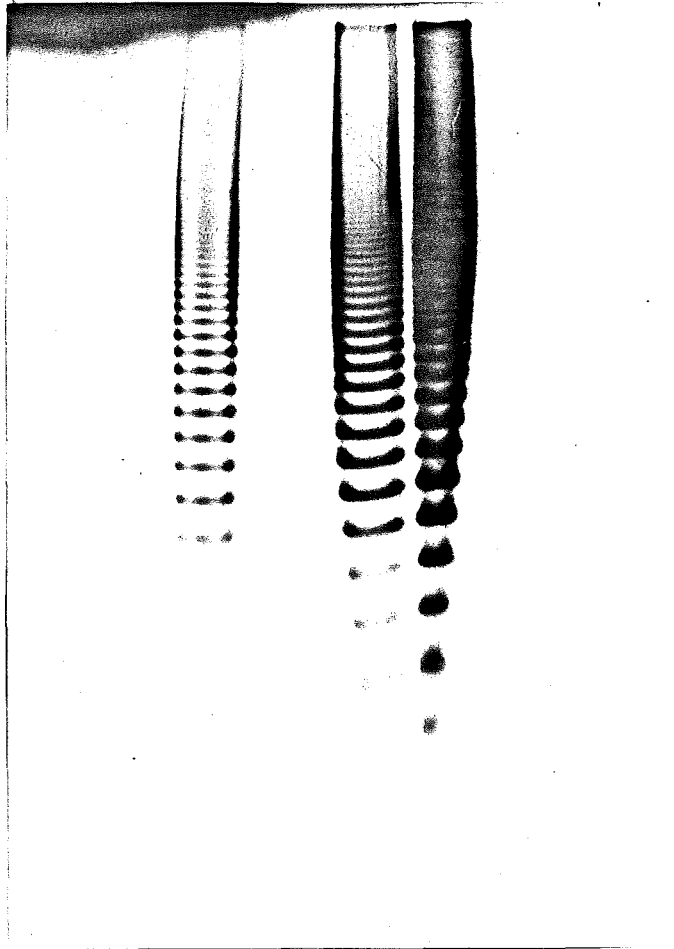


Fig.3.12- Fluorografia del gel del 20% poliacrilamida de la poli(ADP-ribosa) purificada per cromatografia d'afinitat a partir de nuclis testiculars.

Els carrils 1, 2 i 3 corresponen a quantitats diferents de polímer.

BBF: blau de bromofenol

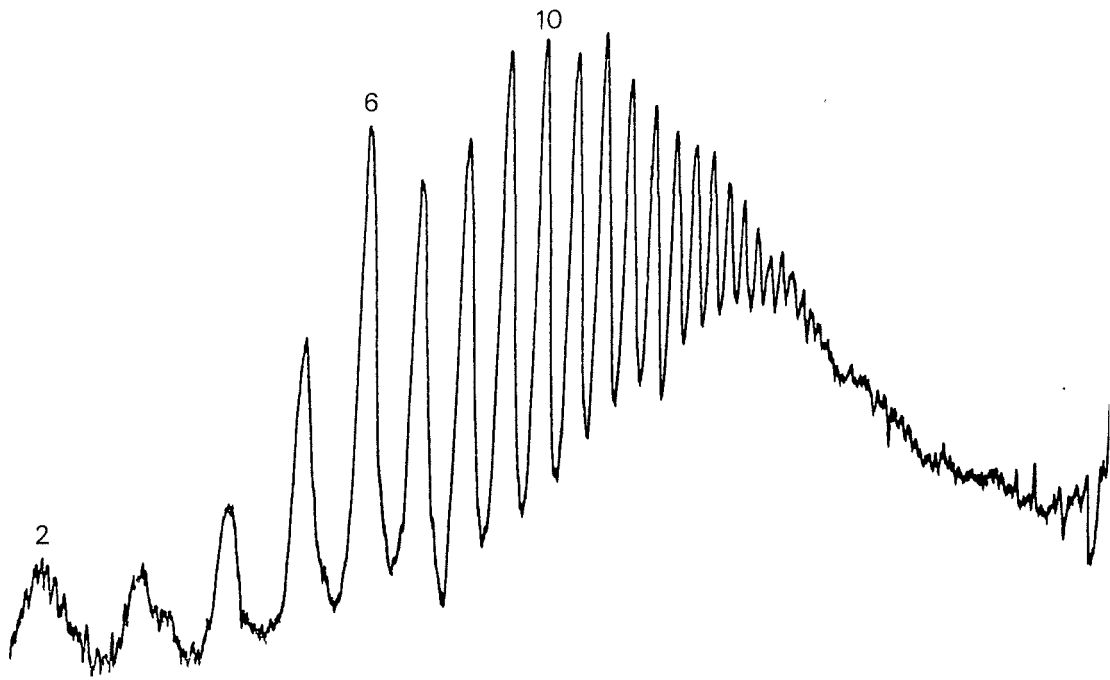


Fig.3.13- Perfil densitomètric que correspon a la fluorografia de la fig.3.12.

3.4. QUANTIFICACIÓ DEL NAD

La quantificació del NAD, substrat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa, s'ha fet segons el mètode enzimàtic cíclic que utilitza alcohol deshidrogenasa (sec. 2.7.1). Aquest mètode mesura conjuntament el nucleòtid oxidat i el reduït.

Els NAD+NADH s'han extret amb NaOH/nicotinamida a partir de les cèl.lules testiculars separades per elutriació i dels espermatozoides madurs. Després de neutralitzar l'extracte s'ha convertit tot el NAD a NADH i l'etanol a acetaldehid, gràcies a l'acció de l'enzim alcohol deshidrogenasa (ADH) a 30 °C durant 30 minuts. Amb aquest pas comença un procés cíclic que continua amb l'oxidació del NADH a NAD, al mateix temps que es redueix el PES. El procés acaba amb la reducció del MTT, quan s'oxida de nou el PES. Aquest canvi es detecta en mesurar la D.O. a 570 nm.

Els nivells de NAD+NADH respecte a DNA (A) i proteïna (B) es mostren a la taula 3.V.

A excepció dels espermatozoides del tub seminífer, en els quals s'observa una baixada del contingut de nucleòtid, no s'aprecien diferències importants en els nivells de NAD a les altres cèl.lules testiculars (fig. 3.14 A,B).

Taula 3.V

A)	<u>nmols NAD/mg DNA</u>
cèl. premeiòtiques i meiòtiques	190±24.3
espermàtides rodones	208±13.7
espermàtides allargades	167±12.9
espermatozoides	13± 1.2

B)	<u>nmols NAD/mg proteïna</u>
cèl. premeiòtiques i meiòtiques	8.71±1.37
espermàtides rodones	8.76±0.71
espermàtides allargades	8.19±0.78
espermatozoides	4.75±0.55

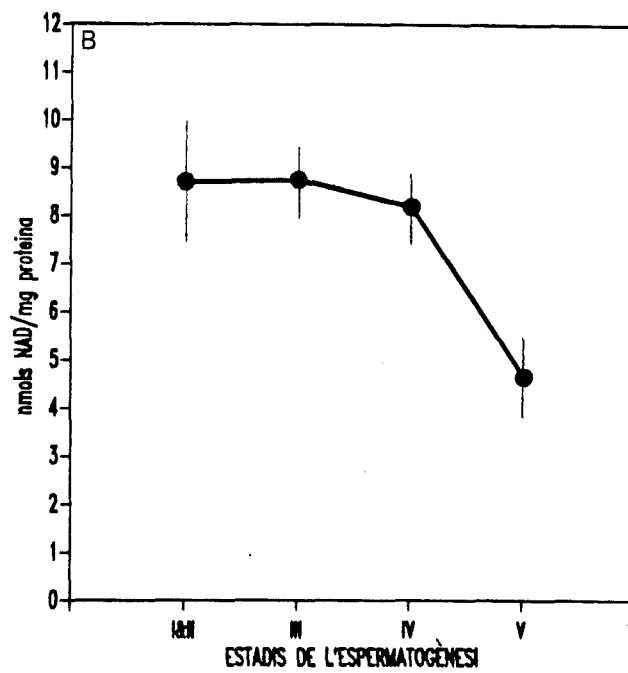
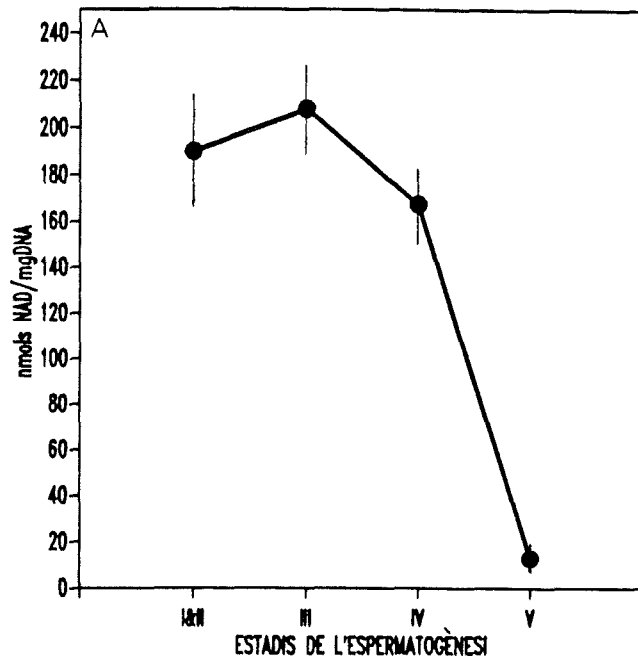


Fig.3.14- Contingut de NAD respecte a DNA (A) i proteïna (B) de les cèl.lules en diferents estadis de l'espermatogènesi.

- I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques
- III - espermatides rodones
- IV - espermatides allargades
- V - espermatozoides

3.5. EFECTE D'AGENTS QUE DANYEN EL DNA SOBRE LA POLI(ADP-RIBOSILACIÓ)

Una de les propietats més destacables de la poli(ADP-ribosa) polimerasa és la seva estimulació sempre que es produeixen ruptures en el DNA, tant fisiològiques com induïdes per diversos mecanismes. Hem estudiat, doncs, l'efecte d'agents tant diferents com els raigs X, l'antibiòtic antitumoral bleomicina o l'agent mutagen N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) sobre la poli(ADP-ribosilació).

3.5.1. Efecte dels raigs X

L'efecte dels raigs X en la poli(ADP-ribosilació) s'ha estudiat en dos tipus de poblacions cel·lulars: els espermatozoides madurs procedents del tub seminífer i una suspensió en la qual hi ha una barreja de cèl·lules testiculars que serveix de control.

Aquest efecte s'ha determinat en mesurar l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa *in vitro* després d'aïllar els nuclis amb sacarosa 0.25 M i bisulfit Na i PMSF (sec. 2.3) i sotmetre'ls a diferents dosis de raigs X (0.5-8 kilorads).

La incorporació d'ADP-ribosa a partir de ^{14}C -NAD $2\ \mu\text{M}$ a $37\ ^\circ\text{C}$ durant 2 minuts s'incrementa dràsticament als nuclis de les cèl·lules testiculars tractats amb raigs X. En canvi, l'activitat de l'enzim no es pot induir tampoc als espermatozoides madurs després de la irradiació (fig. 3.15).

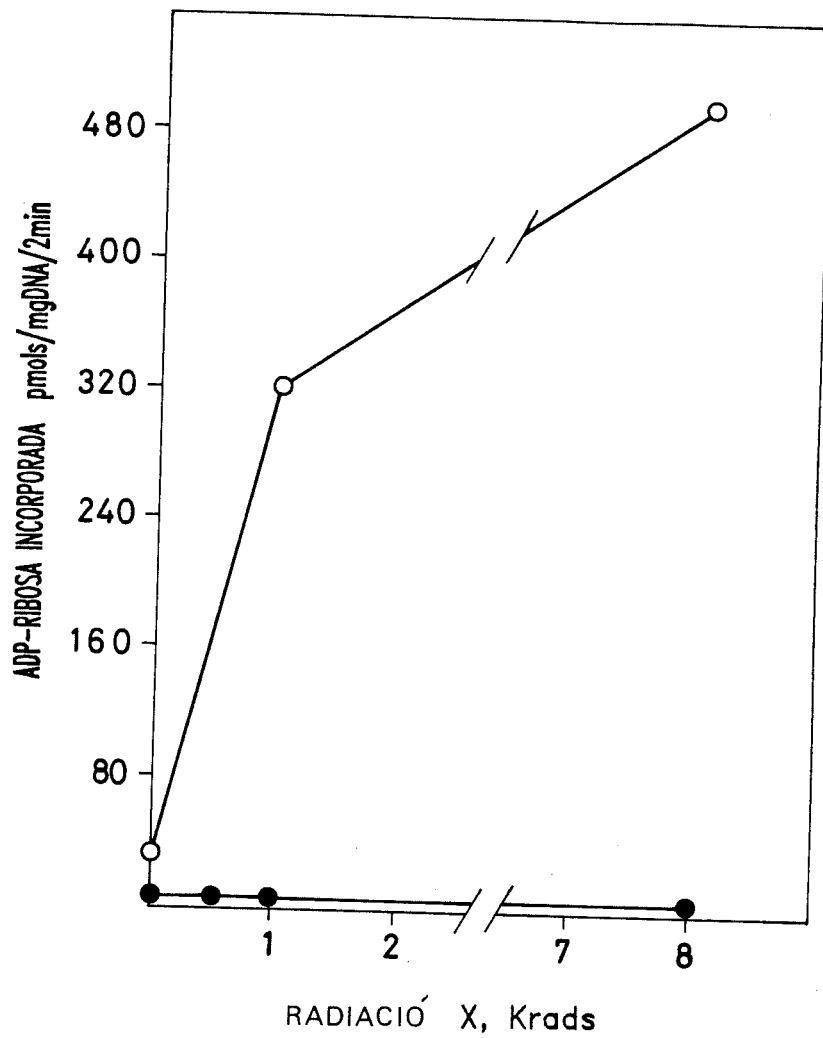


Fig.3.15- Incorporació d'ADP-ribosa als nuclis dels espermatozoides després del tractament amb raigs X.

- (●) nuclis d'espermatozoides madurs
- (○) nuclis testiculars control

3.5.2. Efecte de la bleomicina

La bleomicina és un antibiòtic antitumoral que s'utilitza en combinació amb altres agents antineoplàsics i radioteràpia per al tractament de determinats càncers humans (Friedman, 1978). Malgrat això, l'aplicació clínica d'aquesta droga és limitada a causa dels seus efectes tòxics (Kraus i Hamlin, 1973). La bleomicina s'uneix de manera preferencial al DNA i la interacció dóna lloc a una fragmentació d'aquest àcid nucleic (Gillani et al., 1981).

En primer lloc s'han estudiat les condicions més adequades per al tractament amb la bleomicina. El criteri utilitzat ha estat l'estimulació de l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa *in vitro* i els paràmetres considerats: concentració d'antibiòtic (fig. 3.16) i temps d'incubació (fig. 3.17).

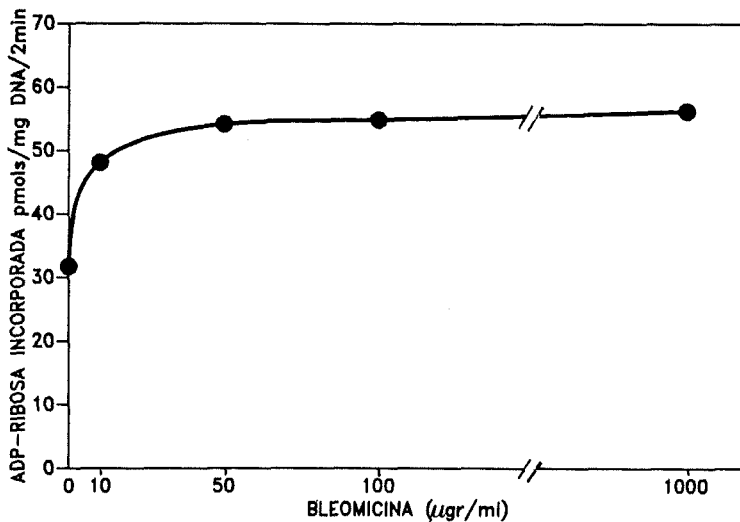


Fig.3.16- Incorporació d'ADP-ribosa a partir de ^{14}C -NAD als nuclis testiculars després del tractament de les cèl.lules amb diferents concentracions de bleomicina durant 1 hora.

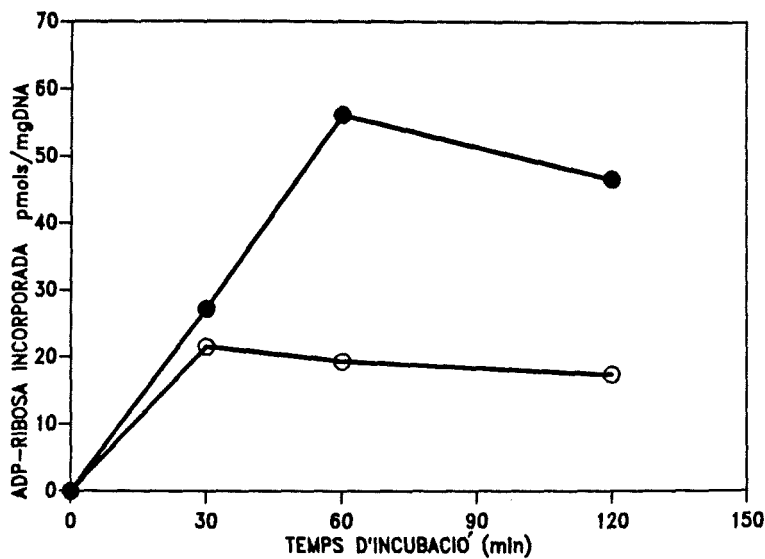


Fig.3.17- Incorporació d'ADP-ribosa a partir de ^{14}C -NAD als nuclis testiculars després de tractar les cèl.lules amb bleomicina (1 mg/ml) durant diferents períodes de temps.

El tractament amb la bleomicina de les diferents cèl.lules resuspeses en PBS s'ha fet a T ambient i una concentració de 1mg/ml d'antibiòtic durant 1 hora.

La incorporació d'ADP-ribosa a partir de ^{14}C -NAD $2\ \mu\text{M}$, mesurada en nuclis aïllats amb sacarosa $0.25\ \text{M}$ que conté aprotinina i PMSF (sec. 2.3), s'incrementa a les cèl.lules testiculars separades per elutriació després d'administrar l'antibiòtic (1.5 a 2 vegades). Els espermatozoides madurs no mostren estimulació de l'activitat enzimàtica després del tractament amb bleomicina (fig. 3.18).

El contingut de poli(ADP-ribosa) i NAD s'ha mesurat a les cèl.lules en diferents estadis de l'espermatogènesi tractades amb bleomicina a partir del sediment i sobrenedant de TCA al 20% respectivament (sec. 2.5 i 2.6).

A la figura 3.19 es mostren els cromatogrames que s'obtenen per HPLC en fase reversa de la poli(ADP-ribosa) (A) i HPLC d'intercanvi aniònic del NAD (B). El nucleòsid R_2Ado , diribosiladenosina, no s'observa a cap de les ffaccions cel.lulars estudiades a causa que aquest representa menys d'un 2% dels residus lineals.

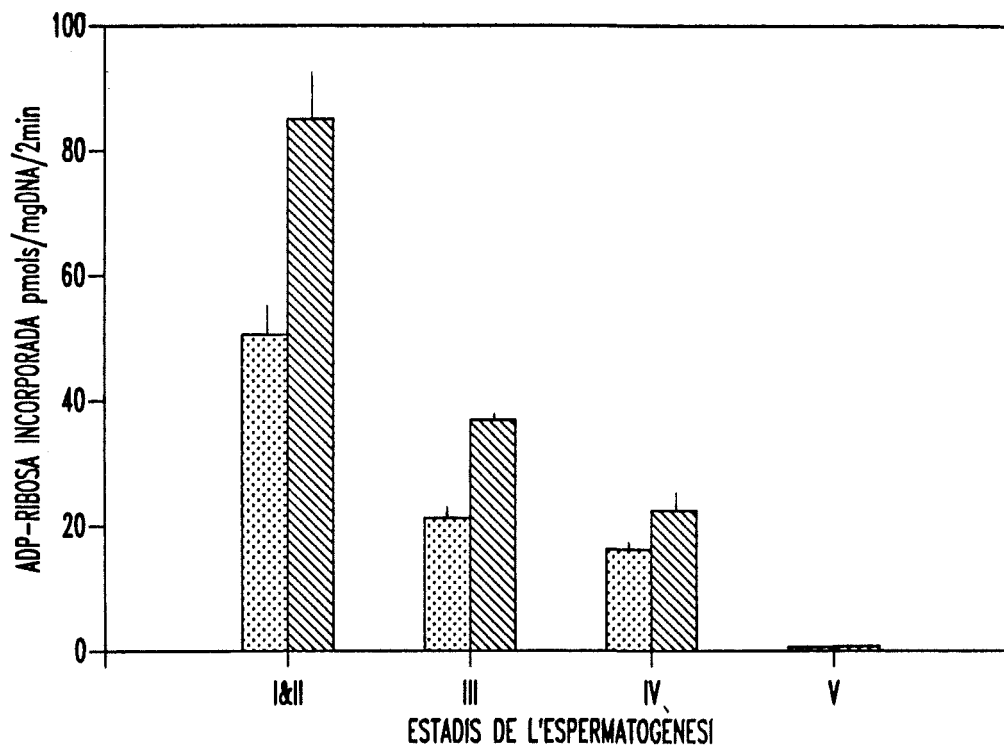


Fig.3.18- Incorporació d'ADP-ribosa a partir de ^{14}C -NAD als diferents nuclis testiculars després del tractament amb 1 mg/ml de bleomicina durant 1 hora.

(•••) cèl.lules control

(//) cèl.lules tractades amb bleomicina

I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques

III - espermatides rodones

IV - espermatides allargades

V - espermatozoides

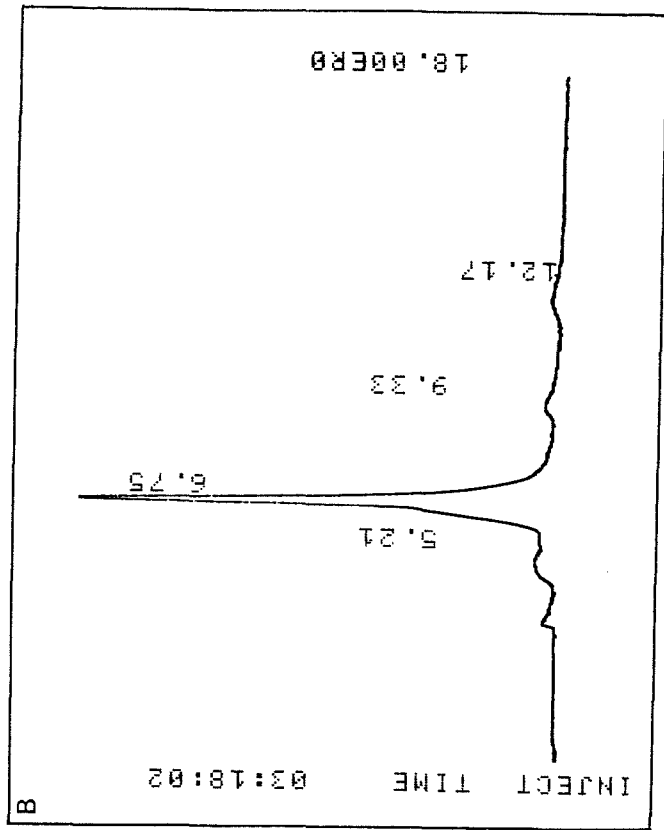
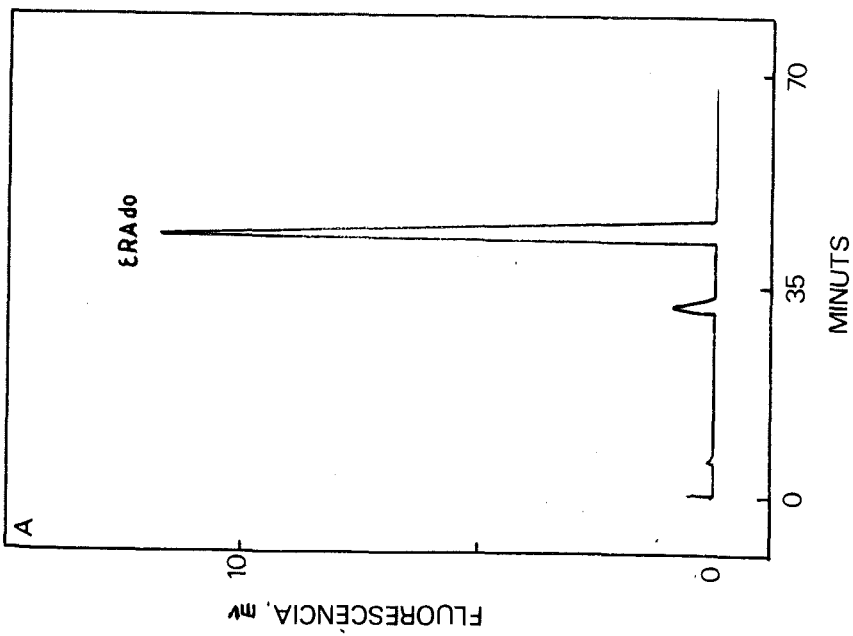


Fig.3.19- A) Cromatograma obtingut per HPLC en fase reversa del derivat fluorescent de la ribosiladenosina procedent de la poli (ADP-ribosa).

B) Cromatograma obtingut per HPLC d'intercanvi aniònic del NAD.

Els nivells de poli(ADP-ribosa) expressats respecte al DNA s'incrementen a les diferents cèl.lules per acció de l'antibiòtic (1.5 a 2 vegades). Els nivells de polímer no varien, però, als espermatozoides madurs (taula 3.VI i fig. 3.20).

Taula 3.VI

	<u>pmols RAdo/mg DNA</u>	
	control	bleomicina
cèl.premeiòtiques i meiòtiques	51.08±2.9	103.90± 6.57
espermàtides rodones	34.20±0.78	67.82±16.07
espermàtides allargades	20.21±0.14	35.48± 0.69
espermatozoides	9.77±2.19	9.68± 1.71

L'efecte de l'antibiòtic sobre la quantitat de NAD, relativament al DNA, es mostra a la fig. 3.21, on s'observa una lleugera baixada dels nivells de nucleòtid a les cèl.lules testiculars amb l'excepció dels espermatozoides, els quals no presenten cap tipus de variació.

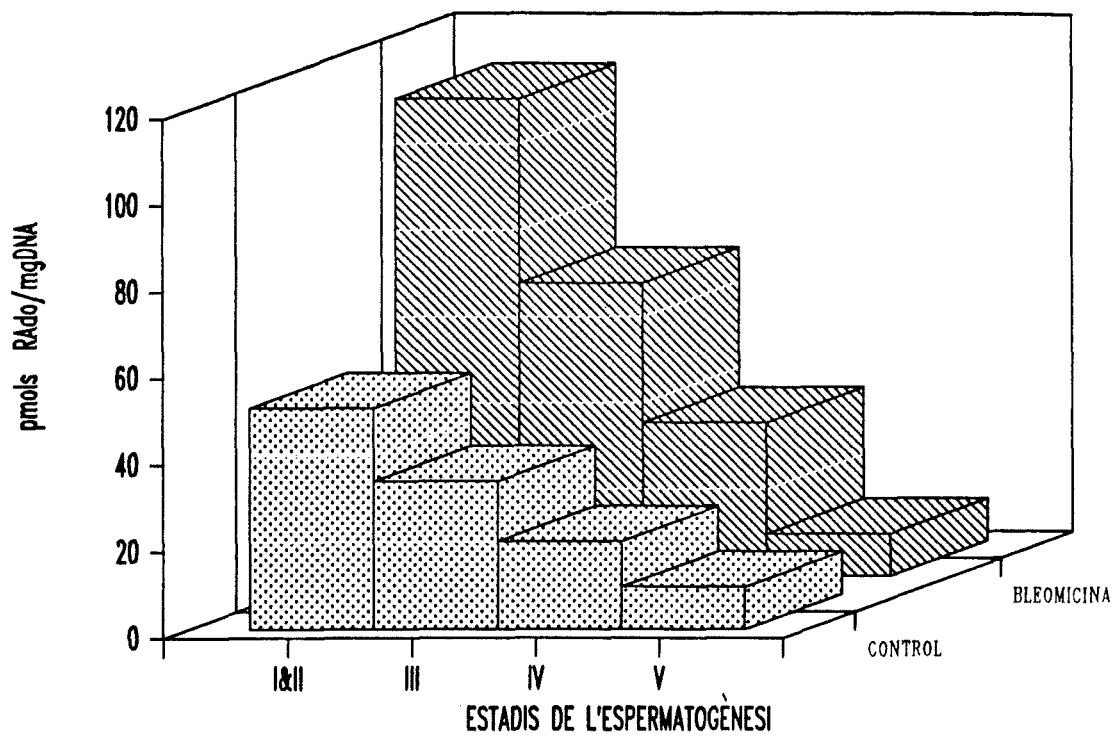


Fig.3.20- Efecte de la bleomicina sobre els nivells de ribosiladenosina, nucleòsid derivat de la poli(ADP-ribosa).

(·) cèl.lules control

(//) cèl.lules tractades amb bleomicina

I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques

III - espermatides rodones

IV - espermatides allargades

V - espermatozoides

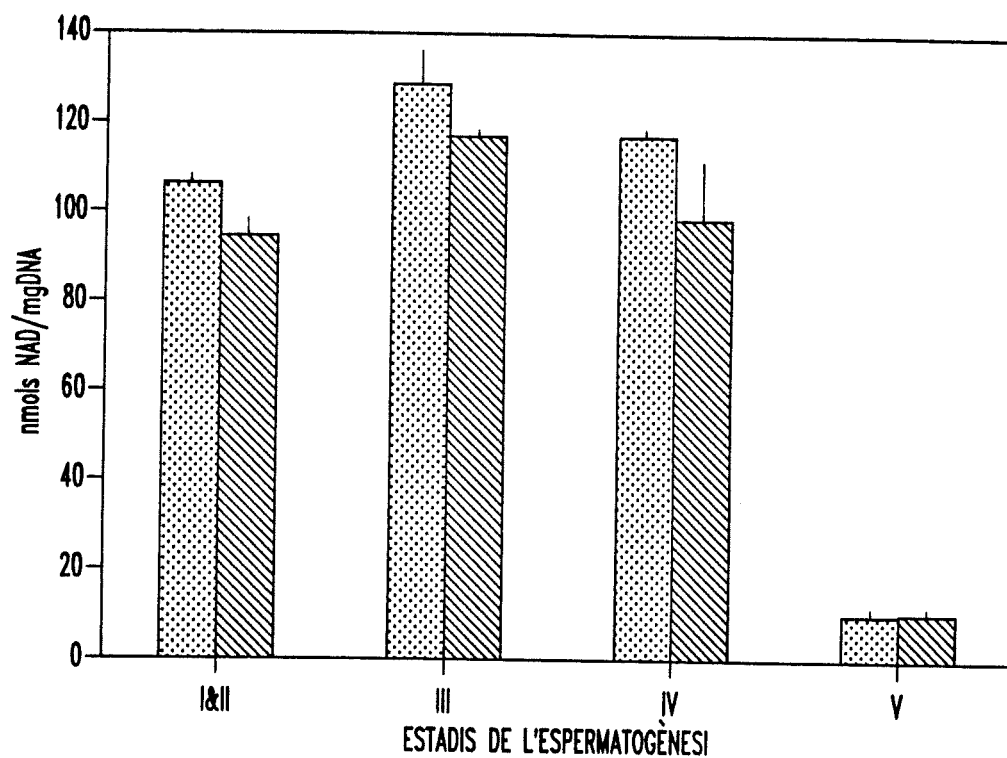


Fig.3.21- Efecte de la bleomicina sobre el contingut de NAD.

(·) cèl.lules control

(//) cèl.lules tractades amb bleomicina

I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques

III - espermatides rodones

IV - espermatides allargades

V - espermatozoides

Per tal de conèixer si l'increment de la poli(ADP-ribosilació) després del tractament amb bleomicina podria ésser degut a un augment del nombre de trencaments del DNA s'ha estudiat la integritat d'aquest àcid nucleic mitjançant la tècnica de sedimentació dels nucleoides (sec. 2.7) o electroforesi en gels desnaturalitzants d'agarosa (sec. 2.11.1).

L'anàlisi de la sedimentació dels nucleoides en una població de cèl.lules totals i en cèl.lules premeiòtiques, meiòtiques i espermatides rodones separades per elutriació ha posat de manifest un increment del nombre de ruptures del DNA causades per l'antibiòtic (fig. 3.22).

A les espermatides més avançades i sobretot als espermatozoides madurs la protamina dóna un grau de compactació molt gran al DNA. Per aquesta raó les cèl.lules no es lisen i sedimenten al fons del tub, la qual cosa impedeix la utilització de la tècnica dels nucleoides en aquestes últimes fases de l'espermioogènesi.

La integritat del DNA d'espermàtides allargades i espermatozoides s'ha mesurat gràcies a l'electroforesi en gels d'agarosa després d'aïllar els nuclis amb àcid cítric (sec. 2.3) i purificar el DNA per extraccions fenòliques (sec. 2.9).

Les espermatides allargades mostren un augment del nombre de trencaments del DNA causat per l'antibiòtic. En el cas dels espermatozoides tractats amb bleomicina no es veu cap diferència respecte als espermatozoides utilitzats com a control (fig. 3.23).

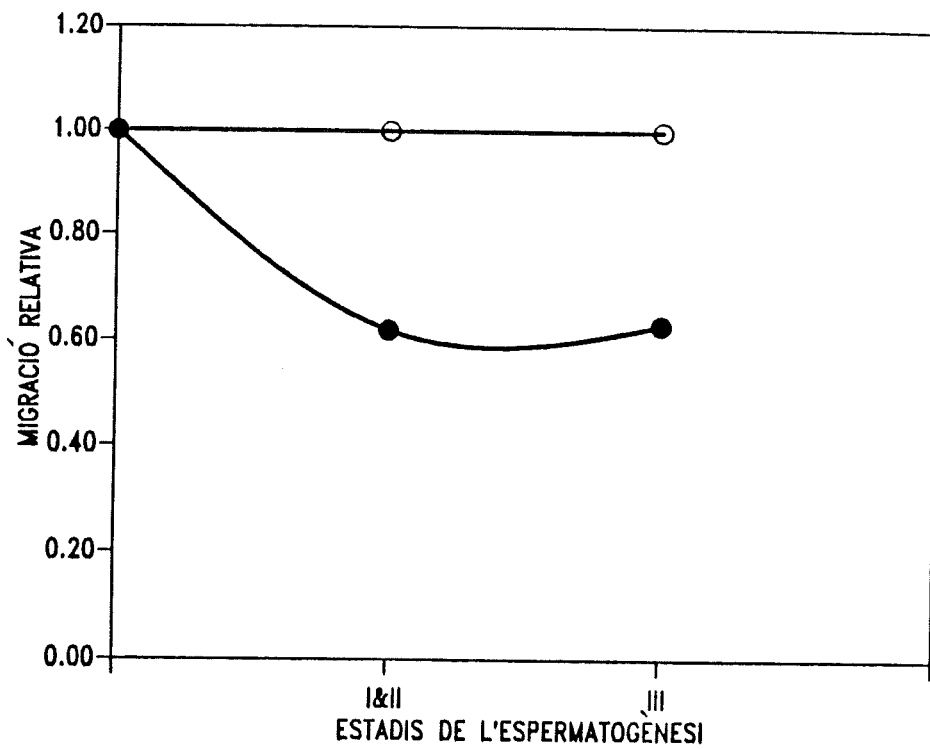


Fig.3.22- Efecte de la bleomicina sobre la velocitat de sedimentació dels nucleoides.

(o) cèl.lules control

(●) cèl.lules tractades amb bleomicina

I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques

III - espermàtides rodones