

24
3A.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS Y ENZIMATICOS
SOBRE LA ACTIVIDAD MODULATORIA DE LA
ESTEROIDOGENESIS DE CELULAS DE LEYDIG PRESENTE
EN EL MEDIO CONDICIONADO DE CELULAS DE SERTOLI

TESIS DE LICENCIATURA EN BIOLOGIA
QUE PRESENTA :

JAVIER BUSTOS ROSAS

BAJO LA ASESORIA DE :
BIOLOGO : ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ

REALIZADO EN EL LABORATORIO : MECANISMOS DE
REGULACION ENDOCRINA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

México, D. F.

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1. INTRODUCCION	
1.1. ANATOMIA DEL TESTICULO	1
1.2. FISIOLOGIA TESTICULAR	5
1.3. MODELOS EXPERIMENTALES	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. HIPOTESIS DE TRABAJO	14
4. OBJETIVO GENERAL	15
5. MATERIALES Y METODOS	
5.1. OBTENCION DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CELULAS DE LEYDIG Y EN CELULAS DE SERTOLI	16
5.2. ESTANDARIZACION DEL METODO DE RADIOINMUNOANALISIS	18
5.3. CULTIVOS CELULARES	19
5.4. PRUEBA ESTADISTICA	20
6. RESULTADOS	21
7. ANALISIS DE RESULTADOS	25
8. CONCLUSIONES	29
9. BIBLIOGRAFIA	30

*Un maestro nunca sabe hasta
donde pueden llegar sus
enseñanzas*

r. INTRODUCCION.

En el año de 1849. el fisiologo aleman A.A. Berthold realizo el experimento fundamental que conduciría (80 años mas tarde) al aislamiento de la hormona de las glandulas genitales masculinas. experimento considerado con razon como punto de partida de la Endocrinologia. Demostro que no se atrofiaba la cresta de los gallos castrados si los testiculos extirpados se colocaban sueltos dentro de la cavidad abdominal del animal. Berthold interpreto correctamente esta experiencia al suponer que la accion de los testiculos sobre la cresta se ejercia por medio de la sangre. Mas tarde. la cresta de gallo se convirtio en objeto de prueba para comprobaria actividad de los extractos testiculares (r).

En 1929. y casi al mismo tiempo. se obtuvieron en Chicago (F.C. Koch) y en Amsterdam (E. Laqueur. E. Dingeransen. E. Freud) extractos del testiculo de toro que hacian crecer notablemente la cresta de capon en pocos dias. La observacion de que tambien podrian obtenerse efectos cualitativamente semejantes con orina masculina. condujo al aislamiento de un esteroide de la orina. que fue llamado androstendiona por Butenandt, su descubridor. Se debe a Laqueur. y sobre todo a su compañero Freud. el haber encontrado. mediante minuciosos experimentos las diferencias cualitativas y cuantitativas entre la accion de la androsterona y la de los extractos testiculares purificados. La busqueda continuada de la hormona testicular emprendida por K. David condujo en 1935. al aislamiento y cristalización de la testosterona. descrita por K. David y. por otro lado. el grupo de Amsterdam. Por investigaciones convergentes e independientes entre si. llevadas a cabo en Holanda. Suiza y Alemania. pudo establecerse la estructura. en tres meses. y confirmarla por síntesis (r).

No cabe duda de que actualmente. cuando la estructura quimica de casi todas las hormonas se encuentra determinada casi por completo. las investigaciones se dirigen. y deben dirigirse. aun con mayor medida a encontrar órganos sensibles a las hormonas. Una circunstancia que ha fomentado el desarrollo de los conocimientos acerca del funcionamiento gonadal. ha sido la utilización de la microscopia. de técnicas de tinción adecuadas para la observación de las células y del uso de isótopos radiactivos. entre otros. permitiendo conocer las transformaciones biológicas que sufren los esteroides con y a través de sus órganos blanco. posibilitando iniciar o continuar los conocimientos actuales al respecto.

r.r. Anatomía del Testículo.

La mayor parte del aparato genital masculino esta situado en el interior del cuerpo. como es el caso de la prostata. las

glandulas bulbouretrales, los epididimos, los conductos deferentes, las vesiculas seminales y la uretra; quedando en el exterior el pene y el escroto, el cual contiene a los testiculos (2.3). En los cordados, los testiculos se encuentran en numero de dos y tiene un origen embriologico que esta relacionado con el del aparato renal, surgiendo como diferenciaciones de la region del surco primitivo a partir de bordes mesonefricos. En la mayoria de las especies de mamíferos, los testiculos experimentan migración de la cavidad abdominal al escroto (2.4).

Cada testiculo se encuentra rodeado inmediatamente por la capsula testicular, compuesta de tres capas: la mas externa, la vaginal, es una capa de celulas mesoteliales atenuadas; esta capa se apoya en una lamina basal que la separa de la capa media, mas prominente, la albuginea, la cual esta engrosada a lo largo de la superficie posterior de la glandula como mediastino testicular, y la capa mas interna, la vasculosa, formada por redes de vasos sanguineos incluidos dentro de un tejido areolar fino (3.4).

La capsula testicular actua como membrana dinamica, capaz de contracciones periodicas, las cuales probablemente sirvan para regular el volumen del testiculo y efectuar masaje al sistema de conductos, ayudando de esta manera al desplazamiento de los espermatozoides para su salida; ademas, la capsula posee las caracteristicas de una membrana semipermeable e interviene en varios aspectos de la fisiologia testicular (2.3.5).

Desde el hilo testicular a la capsula, salen tabiques fibrosos delgados, los tabiques testiculares, que se dividen en el interior del organo en 250 compartimientos piramidales, los lobulillos testiculares, con sus vertices en sentido del hilo. Existen numerosos espacios entre los tabiques testiculares, por ellos los lobulillos se comunican entre si con libertad. Cada lobulillo contiene de uno a cuatro tubulos seminiferos notablemente tortuosos, incluidos en un estroma de tejido conectivo laxo, el cual contiene vasos, nervios y varios tipos celulares, principalmente una serie de acúmulos de celulas endocrinas llamadas intersticiales o de Leydig (1-3).

r.r.r. Celulas Espermato-genicas.

Los testiculos tienen una doble función: una exocrina y una endocrina; el producto exocrino es principalmente las celulas sexuales, y por ello puede considerarse al testiculo como glandula citogenica (1-3).

Las celulas germinales comprenden una capa estratificada de epitelio con cuatro a ocho celulas de altura que revisten los tubulos seminiferos. Las celulas se diferencian progresivamente de la region basal del tubo a la luz; la proliferacion desplaza a las

células hacia el interior del tubo, y las que están más cercanas a la luz se transforman en espermatozoides, desprendiéndose del epitelio y quedando de esta manera libres (3,4,7).

El ordenamiento de fenómenos es llamado espermatogénesis y entraña los dos mecanismos de multiplicación celular: observaciones hechas en la rata respecto de la duración del desarrollo de un espermatozoide a partir de espermatogonía, indican que es de 714 días, observado mediante la inyección intratubular de 3H -Timidina y su seguimiento en todo el proceso espermatogénico, el cual se divide en tres fases: i) replicación de las células troncales, también llamadas espermatogonias, ii) replicaciones meióticas, incluyendo a los espermatocitos, y iii) espermiogénesis o diferenciación celular de la espermatida (8).

La espermatogénesis se inicia con las espermatogonias, incluidas inmediatamente adyacentes a la membrana basal. Se suscriben dos tipos de espermatogonias, la de tipo A, con núcleo ovoide y nucleoplasma claro con granulos de cromatina, que cuando aumentan en número, por división meiótica, la mitad aproximadamente de las células hijas quedan como de tipo clara y de tipo oscura: a partir de esta última se generan las espermatogonias de tipo B, con núcleos esféricos, masas de cromatina densamente teñidas, con relación a la membrana nuclear: cuando estas se dividen, por mitosis, producen células hijas que después se diferencian en espermatocitos primarios, siendo las células germinativas más grandes observadas en los tubulos seminíferos. Los espermatocitos primarios sufren una división o reducción en su número cromosómico, por meiosis, y se producen espermatocitos secundarios, los cuales por mitosis resultan en espermatides, permaneciendo en un acumulo sincitial, dado que la citocinesis, al igual que en los espermatocitos secundarios, es incompleta (8-11) (Figura 1).

Se han localizado acumulos de espermatogonias unidas por puentes intercelulares, lo que sugiere que pueden existir células progenitoras de reserva que no entran al ciclo normal del tubulo seminífero (10,11).

La espermiogénesis incluye la diferenciación notable de la espermatida (1-3,7,16):

- a) aparecen pequeños granulos de muchas vesículas pequeñas en la zona de Golgi, que se unen y forman el acrosoma, incluido en la vesícula acrosómica (VA),
- b) la VA crece en la superficie de la membrana nuclear y por último cubre la mitad de la superficie del núcleo,
- c) la zona de Golgi emigra de la región de la VA hacia el polo opuesto del núcleo, se presenta resorción del líquido de la VA, que se colapsa con el acrosoma y forma un capuchón cefálico, inmediatamente adherido al núcleo,
- d) con la formación progresiva del acrosoma, en un polo del núcleo, los centriolos se asocian con la membrana nuclear del polo opuesto, se desarrolla un flagelo delgado de uno de ellos para formar un órgano vibrátil.

- e) crece el flagelo, y alrededor de los filamentos axiales del mismo aparece una vaina filamentosa delgada: el tubo caudal. otros centriolos emigran hacia la superficie de las células, englobando los filamentos longitudinales axiales como anillos.
- f) el núcleo se condensa, se aplana un poco y es desplazado hacia la membrana celular donde forma la cabeza o *capuchón* definitivo del futuro espermatozoide.
- g) en tanto, existe desplazamiento de la masa citoplasmática hacia el extremo caudal de la célula. y
- h) las mitocondrias, distribuidas al azar en el citoplasma, emigran a la región entre el centriolo basal y el anillo, disponiéndose en forma espiral alrededor de la porción proximal del flagelo, y forman la vaina mitocondrial delineándose la pieza intermedia del futuro espermatozoide.

Después de la diferenciación, los espermatozoides son liberados de su contacto íntimo con los elementos de sostén, y entran a la luz de los tubulos seminíferos. A partir de este momento tienen madurez morfológica pero no funcional, lo cual obtienen gradualmente mediante un proceso de activación que precede a la fertilización. Dada la índole cíclica de la espermatogénesis, no pueden observarse todas las etapas al mismo tiempo en un punto determinado a lo largo del epitelio seminífero (3.4).

1.1.2. Elementos de Sostén.

Los elementos de sostén, células sustentaculares de Sertoli, están dispuestas de forma espaciada en el tubo a intervalos regulares, incluidos entre las células germinativas. Su estructura tridimensional es extremadamente compleja, y su contorno es irregular e impreciso, dado que los extremos cefálicos de los espermatozoides se encuentran en espacios profundos del citoplasma (3).

Donde dos células de Sertoli están juntas, las superficies contiguas muestran especializaciones complejas de unión oclusiva, y estas áreas de aposición de membranas y de fusión, además del tejido peritubular, constituye la base morfológica de la *Barrera Hematotesticular*, dividiendo al tubo seminífero en los compartimientos basal y adluminal, cada uno con un ambiente único.

Las células de Sertoli proveen de soporte físico para el desarrollo de las células germinales, observado *in vitro*, donde las células germinales mueren en poco tiempo cuando se cultivan solas, pero permanecen viables por lo menos una semana en presencia de células de Sertoli, y el Medio Condicionado de células de Sertoli estimula la síntesis de proteínas en células germinativas, empleando una extensa comunicación química. Este reconocimiento célula-célula y la adherencia específica de los espermatozoides primarios y espermátides al cultivo de células de Sertoli, probablemente esté mediado por glucoproteínas de superficie (3.4.13-15).

1.1.3. Células Intersticiales.

El tejido intersticial en los lobulillos testiculares, se encuentra entre los tubulos seminíferos, y contiene algunas fibras de colágena, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y algunos tipos celulares: fibroblastos, macrófagos, células cebadas algunas células mesenquimatosas indiferenciadas, y algunos nervios sin mielina. Vasos sanguíneos entran y salen por el hilio y forman redes alrededor de los tubos; la presencia de células intersticiales específicas de Leydig es el carácter más notable de este tejido. Estas células se encuentran en grupos compactos, generalmente en las zonas angulares creadas por la disposición íntima de los tubulos seminíferos. Son células grandes con citoplasma de aspecto vacuolado, el núcleo contiene granulos de cromatina (con frecuencia existen células binucleadas) y un nucleolo preciso, el citoplasma contiene abundantes inclusiones, como gotitas de lípido (6,19) (Figura 1). El carácter más notable de las células de Leydig es el desarrollo extenso de un retículo endoplasmático agranular, como una trama fina de tubos que se anastomosan con una superficie sin ribosomas agregados, el cual se considera que es el sitio de la síntesis de las hormonas esteroideas. En el testículo humano se encuentran los llamados *cristales de Reinke*, cuya estructura y función son aun objeto de discusión (2,3,5,10).

La secreción principal del testículo es la Testosterona (T), producida por las células de Leydig, que son un tipo peculiar de glándula endocrina, que se caracteriza en que se desarrolla a partir del estroma mesenquimatoso del testículo; en esta zona, dado que se halla un gran flujo laminar, pasa con facilidad el producto de secreción al sistema vascular (2,5,6).

1.2. Fisiología Testicular.

La función testicular es regulada por la *Hormona Luteinizante (LH)* y la *Hormona Foliculo Estimulante (FSH)*. La primera estimula la esteroidogénesis y la producción de la Testosterona (T), al promover precursores de la T a partir de Colesterol, mientras que la FSH unida a células de Sertoli promueve la síntesis de proteínas, por fijación a sus receptores de membrana plasmática de las células de Leydig (un receptor analogo para la LH se encuentra en las células del cuerpo amarillo), y por activación del *Adenilato Ciclasa Intracelular*, incrementando así al *3',5'-Adenosinmonofosfato Cíclico (cAMP)*, uniéndose este a la fracción reguladora de una *proteínasa citoplasmática*, conformando una *holoenzima* y promoviendo substratos proteicos. Esta acción aumenta, en células de Leydig, la velocidad de separación de la cadena lateral del Colesterol, y para ello se ha propuesto la inducción de una enzima que facilita este proceso (17,18) (FIGURA 11).

La interacción de la T con su receptor proporciona el control

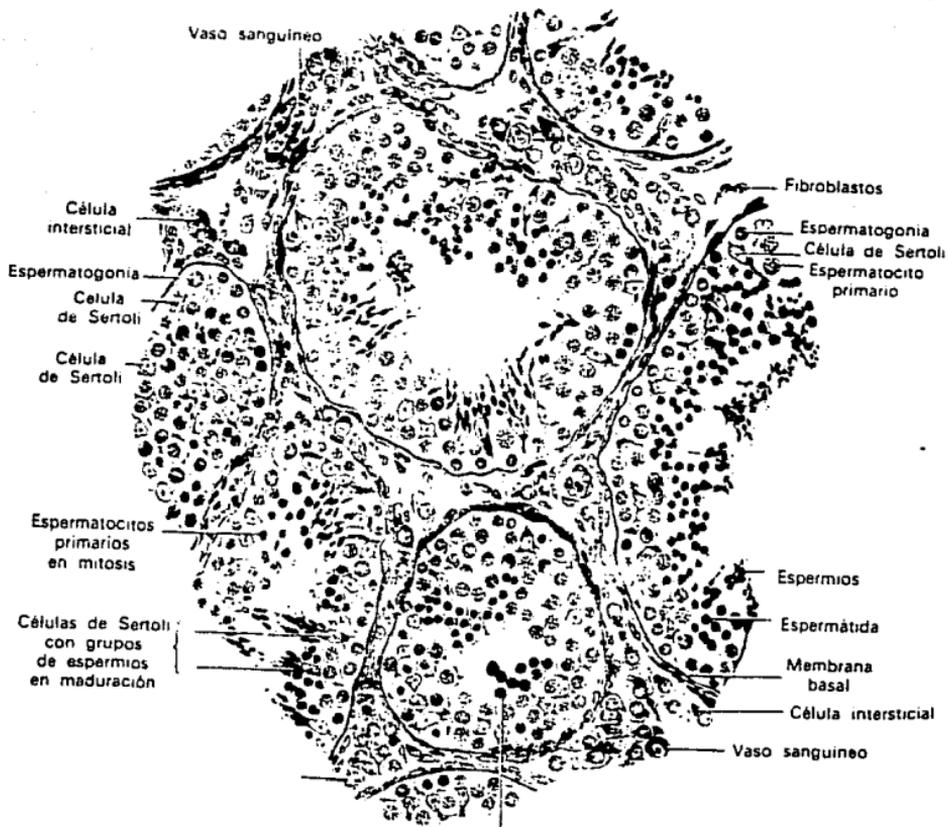


Fig 1. Corte de un testículo humano. Los túbulos cortados muestran diferentes fases de la espermatogénesis. 170 x. Tomado de Bloom y col., (4). Pp. 806

por retroalimentación de la liberación de Gonadotropinas (Gn), la cual se realiza en el hipotálamo inhibiendo la síntesis de Gn, y la inhibición de la producción de la *Hormona Liberadora de las Gn (GnRH)* (12,20,24,20).

La GnRH es liberada normalmente de modo intermitente, llegando a la adenohipofisis a través de los vasos linfáticos y venulas del sistema porta-hipotálamo y la producción máxima de la LH y FSH, en los sistemas experimentales se produce cuando se simula este patrón pulsátil de liberación de la GnRH (12,20).

Antes de la pubertad, las concentraciones séricas de T son muy bajas. Un evento temprano en este proceso de desarrollo, es el incremento, en estallidos pulsátiles, asociados con el sueño de la liberación de las Gn. Cuando las concentraciones séricas de T se elevan sobreviene el crecimiento y el desarrollo de los órganos sexuales secundarios; la señal que la inicia no ha sido descifrada aun, pero la hipótesis actual es que los centros hipotálamicos, responsables de la producción de GnRH, se vuelven menos sensibles a la inhibición, por retroalimentación, para las hormonas gonadales esteroides (12).

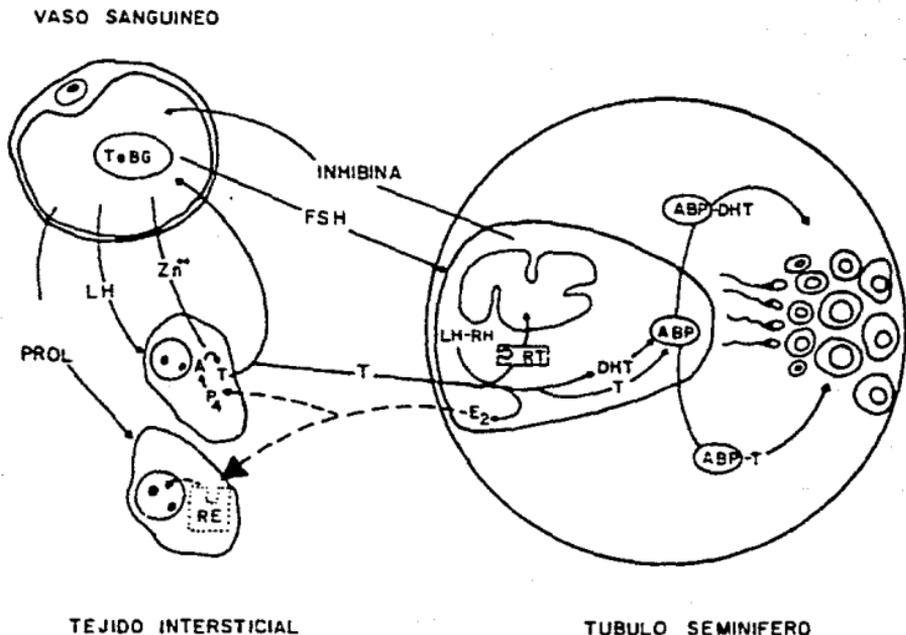
1.1.2. Modulación de la Células de Leydig.

De las células de Leydig, se sintetizan y secretan una gran variedad de esteroides, incluyendo la T, la 17-hidroxiprogesterona (17-OH-prog), y el Estradiol (E). En los hombres maduros normales se producen alrededor de 7mg diarios de T, oscilando entre 4 y 14mg (el nivel de T en el plasma es de aproximadamente 0.7mg/100mD), originándose principalmente en las células de Leydig, pero también puede sintetizarse fuera de ellas a partir de compuestos químicamente afines (precursores) segregados por los propios testículos o por las glándulas suprarrenales; mientras que en la mujer es de aproximadamente de 1 a 2mg por día (0.05 mg/100mD), y cuya concentración se debe a la transformación periférica de precursores secretados por la glándula suprarrenal, principalmente Androstendiona (A) (1,17,20).

La mayoría de la T circulante viaja unida a la γ -Globulina Unidora de Hormonas Sexuales (TeBG), existiendo la idea de que solo la T libre es la que está a disposición para la interacción celular, y para manifestar su actividad androgénica, incluyendo su papel inhibitorio de la secreción de la LH¹ (20).

1 Los metabolitos de la T son principalmente 17-cetosteroides, donde el grupo hidroxilo del C17 se encuentra oxidado a grupo ceto; sin embargo la mayor parte de los compuestos que aparecen en este grupo no se derivan de la T sino de otros esteroides, en su mayor parte de las suprarrenales, por ello no debe considerarse la eliminación de 17-cetosteroides como una medida de la producción de la T testicular y de sus manifestaciones androgénicas, más bien que la producción hepática de la TeBG sea un modulador de dicha actividad, donde la T disminuye la concentración de la TeBG y los estrógenos la incrementan (1).

Fig II. Compartimientos testiculares y posibles mecanismos de regulación extra- e intragonadales. TeBg, beta-globulina fijadora de hormonas sexuales; prol., prolactina; LH, hormona luteinizante; Zn, zinc; T, testosterona; RE, retículo endoplásmico; LH-RH, hormona liberadora de la LH; E2, estradiol; ABP, proteína unidora de andrógenos; DHT, hihidrotosterona; A, androstendiona; FSH, hormona foliculo estimulante.



En años recientes, varias observaciones *in vivo* e *in vitro* han contribuido a un mejor entendimiento del control hormonal de la esteroidogénesis de las células de Leydig; la mayoría de tales estudios han sido realizados en rata. A bajas concentraciones, parece que LH/Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) es el factor estimulador principal de las fracciones de células de Leydig, un papel el cual incluye no solo la estimulación aguda de la esteroidogénesis sino también el mantenimiento de la respuesta de la célula de Leydig a esta estimulación. Sin embargo, grandes dosis de LH/hCG puede ejercer un efecto negativo sobre la respuesta esteroidogénica (21,23). Además, parece que tal respuesta puede ser modulada por varias hormonas, incluyendo a LH/hCG, indicando que la regulación *in vivo* de la secreción androgénica, en el testículo de rata, es multihormonal, incluyendo a la Prolactina, la Insulina, Glucocorticoides, Estrógenos y Andrógenos (23-25).

La estimulación de la producción de esteroides por la LH es acompañada por un incremento en el nivel del AMPc^c, activación de la Proteincinasa A y C (debido al calcio y a la Calmodulina), e incremento de la fosforilación proteica (23).

La actividad esteroidogénica de las células de Leydig puede ser estimulada, además de la GnRH, por agonistas de la LH (LHRHa) y factores producidos endógenamente de estructura desconocida. La GnRH incrementa la producción esteroidogénica de forma máxima cuando es acompañada por la LH; este efecto sinérgico de la GnRH puede ser mediado por el calcio, al incrementarse este aunque la LH también lo promueva, lo que imposibilita el observar tal efecto sinérgico considerándose solo los cambios en las concentraciones del calcio. Puede ser que la GnRH y la Prolactina C (PLC), y por otro lado la LH regulen diferentes reservas de calcio, entonces la liberación se presenta en el retículo endoplasmático y el flujo del calcio a través de la membrana celular. Esas diferentes estructuras de los sistemas del calcio pueden ejercer efectos independientes sobre la actividad del enzima unida a la cadena lateral del Colesterol mitocondrial, la cual puede ser regulada a diferentes niveles: la promoción del Colesterol y cofactores reducidos, activación del enzima unida al Colesterol y la síntesis *de novo* de las enzimas del complejo unido al Colesterol (23,26).

2 En general se acepta que el AMPc juega un importante papel en la transducción de señales, pero es menos clara su función como único segundo mensajero, ya que en adición a este se han encontrado otros sistemas de segundos mensajeros que pueden operar en las células. Más bien la hipótesis de segundo mensajero no considerado estudios con inhibidores del adenilato ciclasa, y actualmente se entiende que forma parte de un conjunto de sistemas de transducción alternativos en la acción de estas moléculas.

Por otro lado la *proteincinasa A* y *C* fosforilan proteínas promovidas por la *LH* y ésteres de *Forbol (PMA)*, ya sea las mismas proteínas o que interactuen en ello, mientras que la *Fosfolipasa C (PLC)* y la *LHRHa* no presentan tal efecto. Tales proteínas fosforiladas son de 17 y 33 *Kilodaltons (Kd)*, y aunque parece no ser un paso esencial en la regulación de la esteroidogénesis, sin embargo pueden representar elementos estructurales en la célula, tal como el citoesqueleto, el cual juega un papel importante en los efectos tróficos de las hormonas tanto como en las acciones de estimulación aguda (31).

12.1. Modulación de las Células de Sertoli.

La *FSH* se une a las células de Sertoli y activa la síntesis de la proteína unidora de andrógenos (*ABP*), la cual es una glucoproteína que retiene a la *T*, pero es distinta de la *T*EBG, del receptor intracelular de andrógenos y del 5- α -dihidrotestosterona (*DHT*) (*18*). Además de la síntesis del activador de plasminógeno.

La *ABP* es secretada al lumen del tubo seminífero, y en este proceso la *T*, producida por las células de Leydig, es transportada en concentración muy alta al sitio de la espermatogénesis. Al parecer este es un proceso clave puesto que los valores circulantes normales de *T*, que podrían lograrse por terapéutica de reposición, no mantienen la espermatogénesis. Aunque solo se ha identificado una *GnRH*, existe evidencia de una liberación selectiva de la *LH* y de la *FSH*, es una sustancia de los tubos seminíferos, específicamente de células de Sertoli, que regula la liberación de la *FSH*, una *Inhibina* (*18,27*). Se ha inducido la secreción de la *Inhibina* en los tubos seminíferos con *FSH*, *dibutilil AMPc (dbAMPc)* y se ha inhibido por la *insulina*, de forma dosis-dependiente a bajas concentraciones (*28*).

Parte de este efecto de retroalimentación sobre la liberación de la *FSH* puede ser mediada por el *Estradiol (E)*, que es sintetizado en pequeñas cantidades en las células de Leydig y en las de Sertoli (estas contienen las enzimas para transformar *T* a *E*). La producción de *E* en estas células está estimulada por *FSH*, y en este proceso el esteroide produce inhibición por retroalimentación de la *FSH*, bajo ciertas condiciones de estudio (*18,20,24*).

La actividad funcional de las células de Sertoli es modulada por la etapa del ciclo espermatogénico (*12*). En los roedores de laboratorio se ha estudiado muy a fondo tal ciclo, donde se observa un grado de orden y regularidad que facilita su análisis sistemático, en contraste en el hombre, donde se han identificado seis diferentes asociaciones celulares (seguidas por la marca de ³H), las cuales se muestran como un mosaico de áreas de forma irregular. En el cobayo se han identificado doce diferentes asociaciones celulares relacionado con la función de la célula de

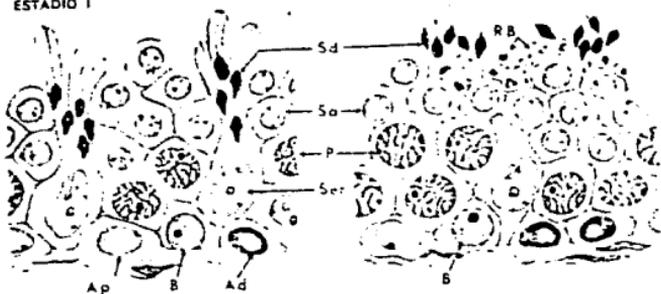
Sertoli (3) (Figura III).

En la etapa VII y VIII las células de Sertoli presentan la mayor velocidad de secreción de ABP , del activador de plasminogeno, la mas alta actividad de la fosfodiesterasa, una minima unión a la FSH una minima estimulación de la producción de $AMPc$ por la FSH y un inhibidor de la aromataza de alto peso molecular es secretado en mucho mayor cantidad; mientras que en la etapa VI y XII se presenta, principalmente, la mayor producción de proteínas y en la etapa VI y VIII-XI existe la inhibición máxima de actividad hacia la célula de Sertoli. Otro marcador de la función de célula de Sertoli, es la γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP), una enzima de union membranial, ampliamente distribuida en tejidos de los mamíferos, y cuya función es catalizar la transferencia de la γ -glutamyl moietina a un aminoácido aceptor peptídico, sugiriéndose que funge como un sistema de transporte para aminoácidos a través de la membrana plasmática, dependiente de la FSH (12,15,28,29). El lactato y el piruvato tambien son indicadores de la función de las células de Sertoli, detectadas en el medio de cultivo requiriendolo los espermatoцитos en paquiteno y las espermátides redondas, para obtener la energía necesaria para los futuros procesos de síntesis proteica y del ATP, de la utilización de la glucosa y de la actividad del ciclo del ácido cítrico. La producción de lactato y piruvato, por la célula de Sertoli, es marcadamente estimulada por la FSH , y se sugiere que estan envueltas en los efectos de la FSH sobre la espermatogénesis, pudiendo ser un factor limitante la producción de tales compuestos para el desarrollo de un número óptimo de células germinales (30).

Las etapas VII y VIII del ciclo espermatogénico son los mejores ejemplos de la múltiple interacción de las células testiculares, pues a esos estadios (paquiteno medio, espermatoцитos primarios y las etapas 7 y 19 de las espermátides) las células germinales son mas sensibles a la disminución de la T , hecho correlacionado con la observación de que que contenido de T de los tubulos seminíferos, en esos estadios, es mas alta que en otros, además de que en tales estadios tienen el mas alto efecto estimulador de la esteroidogénesis sobre las células de Leydig purificadas (12,15,28,31,32).

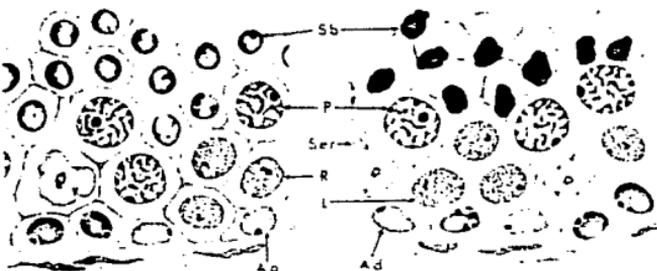
Aunque la significación fisiológica de los cambios en la función de las células de Sertoli, dependientes de la etapa del ciclo espermatogénico, no es clara aún indican que su función es modulada por señales que se originan en las células germinativas recién nacidas. La actividad celular normal de las células de Sertoli es un requerimiento absoluto para la multiplicación y maduración de las células germinales, a su vez estas últimas regulan cíclicamente la función de las primeras, para obtener el requerimiento especial en cada estadio de su ciclo. Esas múltiples y bidireccionales interacciones entre células de

ESTADIO I



ESTADIO II

ESTADIO III



ESTADIO IV

ESTADIO V

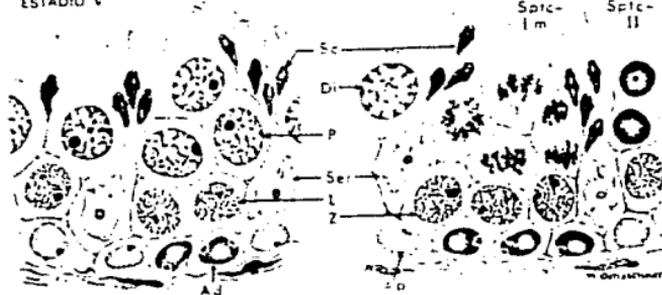
ESTADIO VI
Sptc-
Im Sptc-
II

Fig. II Esquema de los seis estadios del ciclo espermatogénico del hombre. Ser, célula de Sertoli; Ad y Ap, espermatozonias tipo A; B, espermatozonía tipo B; R, espermatoците primario en reposo; L, espermatoците leptotónico; Z, esp. zigotónico; P, esp. paquetiforme; Di, esp. diplotónico; Sptc-Im, esp. primario en división; Sptc-II, esp. sec. en interfase; Sa, Sb, Sc, Sd, espermidas en varias fases de diferenciación; Rb, cuerpos residuales de Regnaud. Tomado de Bloom y col., (4), Pp. 831.

Sertoli-células Germinativas, pueden estar mediadas ya sea por contacto directo célula-célula, muy desarrollado entre ellas, o a través de ~~Factores célula-célula (muy desarrollado entre ellas)~~ o a través de Factores Paracrinos Difundibles o por ambos (12.14,15,28).

1.2.2. Interacción Entre Célula de Leydig-Célula de Sertoli.

En los últimos años se ha incrementado la evidencia referente a una regulación fina de la función testicular, por una modulación local o regulación paracrina, lo que significa que las hormonas hipofisarias proveen la estimulación básica sobre la cual la función testicular es dependiente, pero la intensidad y el tiempo de la respuesta a tales estimulaciones, por las células testiculares, parecen estar moduladas por complejas interacciones entre estas mismas (12.15,33).

Se ha encontrado que el fluido intersticial (FI) participa en tal regulación, de forma independiente de la LH y GnRH sobre la función de las células de Leydig (12.24,34); aunque con dosis máximas de estimulación de LH/HCG o de GnRH, el efecto estimulador del FI es sinérgico (35), mientras que de efecto aditivo para dosis submáximas (35,36).

El FI es la principal entrada de nutrientes y hormonas a la corriente sanguínea en el testículo y la única vía de comunicación entre el compartimiento de tubulos seminíferos y el tejido intersticial vascularizado. La velocidad de formación del FI, que depende del flujo sanguíneo testicular y de la permeabilidad de los capilares testiculares, está bajo control hormonal y también local (12); su volumen y actividad se ve incrementado cuando se induce un rompimiento severo, pero selectivo, de la esteroidogénesis ya sea por el criptoquidismo (34,37), por calentamiento testicular (34,37), encontrando en este último caso una correlación con la concentración de ABP (26) o por R-X (38).

El FI en el testículo tratado con dimetilsulfonato (DMS), que destruye selectivamente a las células de Leydig, y por otro lado el testículo escrotal contralateral, son observaciones importantes que indican que la fuente de tal(es) factor(es) del FI pueden tener un origen común: la célula de Sertoli (12.26,34,35,40); siendo el factor(es) responsable termclabil y de peso molecular mayor de 25 Kd. (12.24).

Los tubulos seminíferos secretan factores los cuales incrementan la síntesis de la aromatas en células de Leydig, debido a las interacciones células de Sertoli-Germinativas o Peritubulares (25); y por otro lado el medio de Tubulos Seminíferos disminuye la concentración de AMPc intra- y extracelular, siendo el factor(es) de origen proteico y de peso molecular mayor de 50 Kd., (40), mientras que Verhoeven y col., (34) hallaron que el medio de cultivo de células de Sertoli

estimula un paso primario en la vía esteroidogénica, pero al mismo tiempo produce la conversión de precursores C₂₁ en Andrógenos.

Considerando los conocimientos actuales de la función testicular, existe una considerable evidencia de que las células de Sertoli pueden influenciar la función esteroidogénica de células de Leydig de dos formas: i) por estimulación aguda de la esteroidogénesis, dependiente de la concentración del medio de células de Sertoli y de la inhibina, y ii) el efecto a largo plazo. La naturaleza de la cual depende el tipo de modelo ocupado *in vitro* y del suplemento hormonal del medio de cultivo (41).

Syed y col. (24,42) encontraron que la sustancia activa del medio de células de Sertoli (MCS) actúa a nivel de la proteína reguladora estimuladora del complejo adenilato ciclasa, y no debe su actividad a la presencia de enzimas proteolíticas en el medio ni a la influencia de la unión de la LH a las células intersticiales, ni a la producción de la T promovida por el ANPc o sobre el metabolismo de la T, sugiriendo que inhibe un paso posterior a la unión de la LH a su receptor, pero anterior a la acción del ANPc.

Por otro lado García y col. (43) y Herrera y col. (44) evaluando el efecto que sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig presenta el Medio Condicionado de Células de Sertoli (MCCS), hallaron que el efecto inhibitorio del MCCS es dosis-dependiente, con un efecto más significativo a una incubación de 36 hrs y a una dilución de 1:5. Además demostraron la existencia de un patrón en el cual se observa que el efecto se presenta durante las primeras 24 hrs de cultivo de las células de Leydig y parece ir desapareciendo durante las siguientes 24 hrs. El sistema enzimático alterado, al parecer, es que transforma *Androstendiona* (4) en T: la 17-Hidroxisteroide *Deshidrogenasa*.

1.4. Modelos Experimentales.

1.4.1. Separación de Estirpes Celulares.

Para conocer la respuesta específica a la presencia de una hormona por alguna determinada estirpe celular, un modelo experimental útil sería aquel que permitiera evaluar la actividad de la hormona en forma aislada de otros factores que pudieran estar presentes en el tejido. Esto ha llevado a tener la necesidad de tratar de aislar y/o purificar las diversas estirpes celulares que forman un órgano, en el caso particular nuestro es el testículo. Para obtener a las estirpes celulares con una purificación confiable es necesario recurrir a procedimientos mecánicos y/o enzimáticos para la separación celular, seguidos de gradientes de densidad para la purificación o al menos el enriquecimiento de las fracciones celulares (46-48). Este modelo

experimental implica que además de aislar las estirpes celulares, estas pudieran mantenerse en condiciones adecuadas para responder a algunas pruebas o retos pudiendo evaluar la o las respuestas celulares durante periodos de hasta 48 hrs (44).

Los cultivos primarios juegan un papel fundamental en el estudio de la fisiología y morfología celular. Despues de que una poblacion celular es aislada, es preciso proporcionarles los medios que optimicen su funcionamiento, los cuales deben incluir un sustrato y suplementos adecuados; además se deberan considerar los parametros de incubacion (temperatura, humedad, pH, concentración de oxígeno y CO₂, etc), los que son optimos para cada estirpe celular. Se ha encontrado que el Medio Mínimo Basal de Eagle (MEM), puede ser útil para el cultivo de células de Sertoli y de Leydig. La adición de algunas vitaminas y en ocasiones la adición de gonadotropinas puede ayudar a optimizar las condiciones ideales para los cultivos en estas estirpes celulares (40).

1.4.2. Cultivos Celulares en Medios Definidos.

Anteriormente se había sugerido que el papel del suero agregado para el desarrollo de las células en cultivo era el de proporcionar hormonas y factores de crecimiento indispensables, sin embargo la eliminación del suero ha permitido desarrollar un medio completamente definido, al cual se le puede agregar las hormonas o factores requeridos en condiciones de alta pureza y en concentraciones perfectamente definidas, así como otro factor que resultase indispensable (49).

De esta manera la utilización de medios de cultivo libres de suero, pero complementados con una o más hormonas, factores u otras sustancias ha llevado al establecimiento de líneas celulares poco contaminadas. Por lo tanto resulta ventajoso para el estudio de los mecanismos de regulación endocrina intratesticular el manejo de cultivos primarios de células de Leydig y de Sertoli en medios de cultivo definidos y sin suero (51).

No obstante las ventajas que tienen los cultivos celulares en las condiciones antes señaladas, para poder establecer los nexos fisiológicos que pudieran existir entre las diferentes estirpes celulares, en ocasiones se utilizan las sustancias excretadas por las células al medio de cultivo como posibles efectores sobre otras células, por lo que al medio de cultivo utilizado en la primera estirpe celular se le extrae y separa el o los factores de interés, o bien despues de restaurarles sus propiedades nutritivas se le utiliza completo para afectar a la segunda estirpe celular; los cultivos celulares en este ultimo caso descritos se le llama Cultivos en Medios Condicionados (43,44).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente se conoce la existencia de una relación intercompartamental para el funcionamiento del testículo o regulación intragonadal, la cual, aparentemente, actúa independientemente de la regulación extratesticular. Los compartimientos intersticial, principalmente las células de Leydig, y la tubular, principalmente células de Sertoli, son el eje de tal regulación. La Testosterona producida por las células de Leydig es captada por las células de Sertoli promoviendo algunas etapas de la espermatogénesis, a su vez la etapa del ciclo espermatogénico actúa sobre la función de las células de Sertoli y estas sobre las de Leydig.

Ante esto, ciertos grupos de investigación han encontrado que el Medio Condicionado de Células de Sertoli regula la función de las células de Leydig, inhibiendo algún paso de la vía biosintética que lleva a la producción de la T, pero anterior a esta, por lo que se propone, como un paso necesario en el estudio de tal modulador esteroideogénico, mediante ciertos tratamientos, dilucidar sobre la probable naturaleza del modulador evaluando su efecto sobre la función normal de las células de Leydig en cultivos primarios.

3. HIPOTESIS.

Los tratamientos termicos, asi como el enzimático inhibe el efecto que sobre el modulador esteroideogénico de las células de Leydig presenta el Medio Condicionado de células de Sertoli.

4. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto que sobre el modulador esteroideogénico de células de Leydig presente en el Medio Condicionado de Células de Sertoli presentan diferentes tratamientos térmicos y enzimáticos.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

4.1.1. Obtencion de Medios Condicionados de Células de Sertoli.

4.1.2. Tratamientos Térmicos y Enzimáticos sobre el Medio Condicionado de Células de Sertoli.

4.1.3. Cuantificación de los Esteroides de las Células de Leydig en cultivo, con y sin Medio Condicionado en Células de Sertoli tratados

4.1.4. Evaluación del Efecto Modulador del Medio Condicionado de Células de Sertoli.

5. MATERIALES Y METODOS.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o bien en proporciones para fines bioquímicos. Cuando no sea de esta manera será indicado.

5.1. Obtención de Fracciones Enriquecidas en Células de Leydig y en Células de Sertoli.

Se utilizaron ratas machos adultos (3 meses de edad), los cuales se sacrificaron por decapitación y los testículos se extrajeron por vía abdominal, se lavaron con una solución amortiguadora de KRBG (NaCl, 125 mM; KCl, 5mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.2 mM; Tris, 35 mM; NaH_2PO_4 , 1 mM, a pH 7.4; después se adicionó glucosa al 2% y gentamicina al 0.05%), se descapsularon eliminándose el máximo de venas y arterias. Los testículos se incubaron en una solución de colagenasa (1mg/ml; 7mg/ml por par de testículos) por 18 min a 37°C, agitando cada 6 min. Se adicionó dos volúmenes de NaCl al 0.9% vertiendo varias veces y se dejó reposar a 1 x g por 10 min a 4°C; se filtró a través de una malla de poro 50-100 μ m, utilizando una pipeta para trasvasar el sobrenadante, y el filtrado se centrifugó a 1,500 x g por 10 min a 4°C; el botón se resuspendió en 1 ml de KRBG, y se colocó en 8 ml de KRBG-Ficoll-BSA (13%+0.2%), pH 6.5; se centrifugó a 1,000 x g por 15 min a 4°C, el precipitado se resuspendió en 5 ml de Medio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco (DME). Se realizó el conteo, utilizando para este efecto un Hemocitometro, ajustándose a 3×10^6 células/ml, y sembrándolas en cámaras multipozos de plástico (Nunc) con un volumen final de 2.5 ml/pozo (52) (Esquema 1).

5.1.2. Purificación de la Fracción Tubular Cruda.

Para obtener la fracción enriquecida en células de Sertoli, el precipitado testicular, después de separar la suspensión, se fragmentó con bisturí hasta obtener fragmentos de aproximadamente 5 mm, los cuales se incubaron en 20 ml de KRBG-Pancreatina (0.2mg/ml) durante 20 min a 28°C, con agitación cada 3 min; se dejó sedimentar a 1 x g por 10 min a 4°C; se decantó el sobrenadante y la suspensión celular se volvió a fragmentar mecánicamente pasándola a presión por una aguja de calibre 20 ga. Se colocó sobre un gradiente discontinuo de KRBG-Sacarosa del 2 al 6%, en intervalos de 1%, dejándola reposar a 1 x g por 30 min a 4°C. Se recuperaron las fracciones correspondientes a 4 y 5% por aspiración, la suspensión celular se filtró por una malla, descrita con anterioridad, y las células filtradas se sedimentan por centrifugación a 1,500 x g por 2 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en 5 ml de DME, para el

Testiculos Descapsulados

↓

7.5 ml de KRBG-Colagenasa (mg/ml)

↓

15 ml NaCl al 0.9%, invertir 10x;
reposar 10 min a temp. ambiente

↓

Filtrar a través de una malla
(50-100µm)

Fracción Tubular Cruda

Fracción Intersticial Cruda

↓

↓

Fragmentar los Tubulos

Sedimentar a 1.500 x g 10
min a temp. ambiente

↓

↓

20 ml KRBG-Pancreatina (0.2mg/
ml); 20 min a 28°C. agitación

Resuspender en 1 ml KRBG

↓

↓

Sedimentar a 1 x g a 4°C
por 10 min

Sedimentar a 1.000 x g a
traves de 8ml KRBG-Ficoll 400
(13%)-BSA (0.2%), pH 6.5, 15
min a temp. ambiente

↓

↓

Decantar el sobrenadante;
sedimentar a 1 x g en un
gradiente discontinuo (2-6%)
de sacarosa-KRBG por 30 min
a 4°C

Resuspender el boton celular
en 5 ml de DME, contar y ajustar
a 3×10^7 celulas/ml. Sembrar en
cajas multipozos de 6 a razón de
2.5 ml/pozo

↓

↓

Filtrar a través de la malla;
sedimentar a 1,500 x g por 10
min a 4°C

↓

↓

Resuspender en 5 ml de DME y
ajustar a 200,000 celulas/ml
sembrandolas en cajas de
cultivo de 25 cm², a razón de
10 ml

Esquema I. Metodo de separación y purificación celular para
la obtención de fracciones enriquecidas en celulas de Leydig y de
Sertoli.

conteo celular, descrito con anterioridad, ajustandose a 2×10^5 células/ml y sembrándolas en botellas de cultivo de plástico (Nunc), de 25 cm^2 de superficie y un volumen final de 10 ml/botella (52) (Esquema 1).

Todas las condiciones de trabajo se realizaron bajo ambiente aseptico, así como lo fueron las soluciones utilizadas. La evaluación de la pureza en ambos tipos celulares, se realizó con tinción utilizando Fucsina acida e identificando las células por su morfología.

5.2. Estandarización del Método de Radioinmunoanálisis (RIA).

Se utilizo un RIA específico para la T en la determinación cuantitativa de ésta presente en el cultivo de las células de Leydig. La fuente de anticuerpos (Ac) fue un suero de conejo, ocupando el complejo 19-hemisuccinato unido al Albumina Sérica de Bovino (BSA) como antígeno; siendo el marcador radiactivo Tritio (^3H) con actividad de 100mCi/mMol, purificada por Cromatografía en Capa Fina, en cromatoplacas de Silica Gel 60.254 en los sistemas de disolventes:

a) benceno. b) benceno-acetato de etilo 1/8:2 y c) benceno-metanol 1/9:1, con T pura como patrón (53,54).

5.2.1 Preparación de la Curva Patrón.

Se eligen rangos de sensibilidad para la T, de 0 a 1.000 picogramos (pg), y se preparan soluciones de T no marcada para los puntos de la curva patrón.

Considerando que se tiene:

a) una solución patrón de concentración 1mg/ml, tomando 5mg del esteroide puro y disolviendo en etanol absoluto hasta un volumen de 5ml;

b) una solución N, concentración 1 nanogramo (ng)/ml, tomando 5ul de la solución patrón y llevando hasta un volumen de 5ml con etanol absoluto;

c) una solución E, de concentración 20pg/ul, tomando 100ul de la solución N, y diluyendo con etanol absoluto hasta 5ml, y

d) una solución J, de concentración 0.2pg/ul, tomando 50ul de la solución E y divutiendo hasta 5ml con etanol absoluto.

Se prepara una mezcla de ensayo con $^3\text{H-T}$ de actividad conocida (5.000 cpm/500ul) en amortiguador de RIA y suero antitestosterona (1:5.000). Se colocan y marcan una serie de tubos, por triplicado, y se adicionan 500ul de la mezcla de ensayo en cada tubo de la curva, de la siguiente manera:

tubo	vol(ul)	solución	masa
------	---------	----------	------

1-3	0.0	--	0.0
4-6	5.0	J	1.0
7-9	25.0	J	5.0
10-12	50.0	J	10.0
13-15	2.0	E	40.0
16-18	5.0	E	100.0
19-21	25.0	E	500.0
22-24	50.0	E	1000.0
25-27	10.0	N	10000.0
28-30	--	-	--
(totales)			

Se realizaron los pasos del RIA, mencionados anteriormente. Se trabajó con 10.000 pg de T no marcada para evaluar las uniones inespecíficas del Ac acupado, y tres para determinar las cuentas por minuto (cpm) totales (43,44).

5.3. Cultivos Celulares.

Las células son cultivadas sin suero o factores adicionales en una atmósfera aire-CO₂ (95-5%) a 37°C. Para las células de Sertoli se ocupó un período de incubación de 36 hrs. y para las células de Leydig 24 hrs de preincubación. Al medio condicionado de células de Sertoli (MCCS), obtenido según García y col., (43) y Herrera y col., (44), se le aplicaron, por un lado los tratamientos térmicos (55,70 y 90°C/30 min), y por otro lado el tratamiento enzimático con tripsina (0.3 mg/ml/1 h a 37°C) al término de este se adicionó Antitripsina (0.2 mg/ml/1 min a 37°C), y Carbon Activado-Dextran 70 (0.625-0.0625g), 1.5 ml, centrifugando a 3.000 x g por 2 min. Los MCCS con estos tratamientos, correspondientes, se diluyen a 1:5 con DME y se adicionaron a las células de Leydig, previa eliminación del medio en que se preincubaron, incubándose 12 y 24 hrs. Se maneja un control (DME) y MCCS sin tratamientos a los mismos períodos de incubación.

Los medios de cultivo se recuperaron y se procesaron para la extracción de la T; cada medio recuperado se colocó en un tubo de centrifuga de vidrio de 15 ml con tapón, correspondiente, y se adicionó 5 ml de éter, agitando por 1 min en Vortex, después se congeló la fase acuosa ocupando hielo seco-acetona y la fase orgánica se decantó a un tubo de centrifuga de vidrio sin tapón.

Se esperó a que la fase acuosa de descongelar y se repitió la operación, reuniendo ambas fases orgánicas en un solo tubo, concentrando a sequedad. A cada tubo se le adicionó 1 ml de éter y se decantó a tubos de ensayo (10 x 75 mm), correspondiente, concentrando, nuevamente, a sequedad. A los tubos de ensayo se le adicionó 0.5 ml de la mezcla de ensayo, según García y col., (44), y se trabajaron igual que los tubos para la curva patrón de T.

5.4. Prueba Estadística.

El análisis de resultados se realizó por comparación de las medias y del error estándar de los grupos control y experimental, utilizando la prueba 't' de Student con dos colas, considerándose como significativos aquellas diferencias de $p < 0.001$.

6. RESULTADOS.

El procedimiento para la obtención de las fracciones enriquecidas resultó en una adecuada separación de los constituyentes celulares del compartimiento intersticial y tubular. Para la fracción intersticial se obtuvo una preparación final de 50±7% de pureza, considerando una composición inicial de 6% en promedio, con una viabilidad celular de 90±3%, siendo la fuente principal de contaminantes celulares espermatocitos primarios y espermatogonias y una pequeña cantidad de espermatozoides, los cuales no son retenidos durante la filtración a través del Ficoll 400-BSA-KRBB (Tabla 1).

Por otra parte, de la fracción tubular se obtuvo una preparación final de 7±3% de pureza (factor de purificación de 10x) y una viabilidad de 92±2% (Tabla 1).

	Pureza (%)	Viabilidad (%)
Fración de células de Leydig purificadas a través de Ficoll 400-BSA-KRBB	50±7	90±3
Células de otro tipo	Espermatocitos Primarios Espermatogonias	
Densidad Celular	3 x 10 ⁵ células/ml	
Fración de células de Sertoli sedimentadas a través de un gradiente de sacarosa	7±3	92±2
Células de otro tipo	Espermatozoides Espermátidas	
Densidad celular	2 x 10 ⁵ células /ml	

Tabla 1. Células de Leydig y de Sertoli en preparaciones finales obtenidas de testículo de rata adulta normal.

	12 hrs.	24 hrs.
Control	1536 ± 579	2556 ± 594
MCCS	459 ± 142 ^a	584 ± 124 ^a
55°C	631 ± 154 ^{a,b}	1114 ± 280 ^{a,b}
70°C	988 ± 142 ^{a,b,c}	1453 ± 293 ^{a,b,c}
90°C	1530 ± 475 ^{b,c}	1956 ± 359 ^{a,b,c}

^a p < 0.001 comparado con el control

^b p < 0.001 comparado con el MCCS

^c p < 0.001 comparado con 55°C

Tabla II. Resultados del tratamiento térmico sobre el modulador esteroideopéptico de células de Leydig presente en el MCCS^o correspondiente a las 12 y 24 hrs de incubación. Los datos están tabulados en np.^o 10 células de Leydig, y representan a tres experimentos

TESTOSTERONA pg/10⁶ células

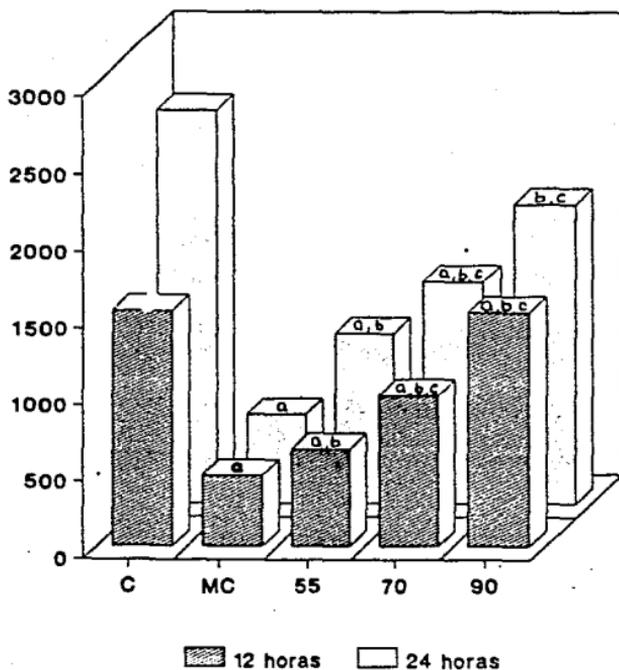


Fig.V. Gráfico que muestra la relación entre Tratamientos con Triosina y Carbón-Destón 70, y la producción de Testosterona por cada 10⁶ células de Leydig. - (Cada barra representa la media y desviación estándar de 3 experimentos).

^a $p < 0.001$ comparado con el Control ; ^b $p < 0.001$ comparado con MC ; ^c $p < 0.001$ comparado con 55°C

	12 hrs	24 hrs
	-----	-----
Control	2188 ± 472	2610 ± 656
MCCS	720 ± 111 ^a	822 ± 142 ^a
Tripsina	2012 ± 352 ^b	2217 ± 623 ^{a,b}
CD 70	1044 ± 227 ^{a,c}	1282 ± 224 ^{a,b,c}

^a p < 0.050 comparado con el control.

^b p < 0.001 comparado con el MCCS.

^c p < 0.001 comparado con tripsina.

Tabla III. Resultados del tratamiento con tripsina y Carbin Aluvado-Dextran 70 (CD 70) sobre el regulador estereogénico de células de Leydig presente en el MCCS, correspondiente a la incubación de 12 y 24 hrs. Los datos están tabulados en pp/10⁶ células de Leydig, y representan a tres experimentos.

TESTOSTERONA
pg/10⁶ células

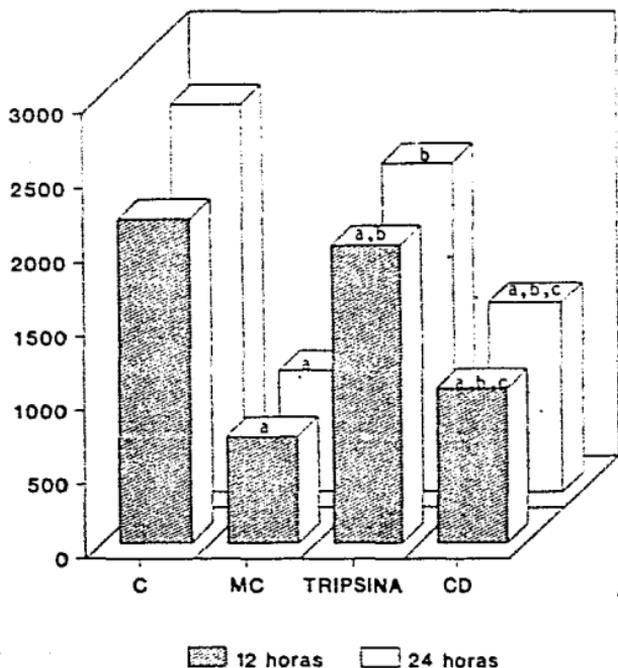


Fig. IV. Gráfico que muestra la relación entre tratamientos Térmicos y la Producción de Testosterona por cada 10⁶ células de Leydig. (Cada barra representa la media y subdivisión estándar de 3 experimentos).

^a p < 0.050 comparado con el control; ^b p < 0.001 comparado con el MC; ^c p < 0.001 comparado con Tripsina

Los resultados del efecto de los diferentes tratamientos sobre el factor modulador presente en el MCCS se encuentran resumidas en la *Tabla II* y *III*: de forma gráfica en la *Figura IV* y *V*.

En los tratamientos térmicos, es posible observar una diferencia estadísticamente significativa, entre el control (DME) y el MCCS no tratado en una proporción de 3:1 (1536 vs 459pg) a las 12 hrs, manteniéndose la velocidad de inhibición de la producción de la T también a las 24 hrs (*Tabla II*). Por otro lado, los tratamientos térmicos muestran entre sí disimilitudes en su efecto sobre el MCCS y también con respecto al control a las 12 hrs, excepto el control y 90°C (1536 vs. 1539) el cual no guarda diferencia; mientras que a las 24 hrs de incubación, existe una pequeña diferencia, aunque el patrón de respuesta es semejante al de 12 hrs (*Figura IV*). Comparados con el MCCS no tratado la diferencia, es incluso, desde los 55°C (459 vs. 631) del de 55°C (*Figura IV*).

En lo referente al segundo grupo de tratamientos sobre el MCCS, el patrón general del MCCS no tratado con respecto al control, nuevamente se repite, comparado con el primer grupo de tratamientos descrito (*Figura IV* y *V*). El MCCS con la Tripsina muestra una similitud de actividad con el control y disimilitud, además de con el MCCS no tratado, con el de Carbón Activado-Dextrán 70 (2217 vs. 1282pg) (*Figura IV*), mientras que este último, si bien no es igual al control, y por ende tampoco con la Tripsina, tampoco lo es respecto del MCCS no tratado (720 vs. 584pg), haciéndose extensible, en general, el mismo comportamiento, e incluso más definido a las 24 hrs de incubación (*Tabla II*, *Figura IV*).

La variación existente dentro de los ensayos y entre los ensayos, no fue superior al 5 y 10%, respectivamente, en la medición de la T sin purificar en los medios de cultivo, siendo el anticuerpo ocupado con una especificidad mayor a 90% para la T.

La dosis mínima detectada para la T es de 5pg/ml, un poco por encima de los obtenidos con anterioridad (0.2 pg/ml) (43,53,54).

7. ANALISIS DE RESULTADOS.

Los antecedentes en la literatura indican que los resultados obtenidos con las células de Leydig y Sertoli, se reproducen con los datos hallados por otros autores (47,55).

Todos los experimentos necesarios para el presente trabajo han mostrado un estado de las células morfológicamente adecuado, y considerando trabajos al respecto por otros autores (46), las células no muestran vacuolización, ni birrefringencia en ninguno de los periodos de incubación probados.

Desde el punto de vista de funcionamiento, an nivel de actividad esteroidogénica, hay un incremento en la producción de la Testosterona (T) en las células de Leydig durante las segundas 12 hrs de incubación, corroborando los hallazgos de otros autores (45). Además, en trabajos con preparaciones en fresco de células de Leydig, estas responden bien a la Gonadotropina Corionica Humana (hCG), con un incremento en la producción de la T (43).

Con respecto a las células de Sertoli, debemos considerar que se utilizan testículos de rata adulta (90 días) y por tanto la existencia de un mayor número de células de la línea germinal, presentes en los tubulos seminíferos, lo que repercute en el porcentaje de pureza obtenido, además de que a esta edad ya se encuentra establecida la Barrera Hemato-Testicular, lo que aumenta la dificultad de obtención de un factor de enriquecimiento mayor.

Los medios utilizados para ambos cultivos fueron basales, es decir, no se les adicionó ningún factor de enriquecimiento (hormonas, factores de crecimiento, suero, etc.) lo que hace diferente del ocupado por otros autores (24,28,35,59,60), quienes manejan líneas celulares establecidas, además sembradas sobre Citodex, lo que permite una mejor adhesividad y una citoarquitectura más cercana a la existente *in situ* (56); estimuladas con LH, de forma máxima, junto con la adición de lipoproteínas de bovino, etc. (57), lo que las hace más útiles incluso hasta por más de 3 días, y sin embargo esto no implica que la actividad celular, de nuestro modelo ocupado, disminuyera en las diferentes pozas metabólicas, principalmente en la vía Δ^4 , lo que nos hace suponer que las células se encuentran intactas (36), y por lo tanto los cultivos primarios pueden ser considerados como representantes de las condiciones basales normales, respecto a lo que se debe encontrar en modelos de cultivo equivalentes (56).

A partir de trabajos realizados por otros autores

(34.33.59-62). existe evidencia de que uno omás factores derivados de diferentes tiposcelulares testiculares están involucrados en la regulación de la vía biosintética que lleva a la producción de la T.

Existe considerable evidencia de que las células de Sertoli ejercen influencia sobre la función de las células de Leydig, de tal forma que a partir de las características del medio estará la actividad del modulador, existiendo para ello las siguientes alternativas: 1) una marcada estimulación de la esteroidogénesis (dependiendo de las características del medio de cultivo para las células de Sertoli, de la FSH, de la Inhibina, etc.); 11) el efecto trófico a mediano plazo (tipo de modelo celular *in vitro* utilizado y del suplemento hormonal del medio) (47).

Con referencia a la estimulación de la esteroidogénesis, Verhoeven y col., (34) encontraron un factor en el Medio Enriquecido en Celulas de Sertoli (MECS) el cual estimula la actividad de las células de Leydig, y demostraron que tenía su origen en la célula de Sertoli, y no en las células Peritubulares que contaminan al cultivo, pero si son co-cultivadas con células de Sertoli, promueven la producción de tal factor, y cuya regulación se asemeja a la de otras proteínas, sintetizadas y secretadas en la célula de Sertoli (ABP, Transferrina), pero no es influenciada por Andrógenos, en presencia o en ausencia de células Peritubulares (24.42), aunque algunos de sus agonistas conocidos (LHRHa, etc.) incrementan su actividad, pero no su cantidad, dado que su principio activo es casi paralelo a su capacidad de estimulación en cuanto a la producción del AMPc en esas células.

El factor estimulador no es específico de las células esteroidogénicas (48), que actúa desde los primeros 30 a 60 min, además este factor actúa tanto sobre las células de rata maduras como en prepúberes(35.40-48), logrando obtener un incremento de 50 veces de la actividad específica (actividad/mg de proteína) del MECS sin dibutililAMPc (dbAMPc), y de 130 veces más en presencia de este último, por su fraccionamiento ocupando un sistema Amicon de Ultracentrifugación (35).

Por su parte Janecki y col., (62) y otros autores (35) encontraron que en el MECS existían, por lo menos, dos factores: a) uno que presenta su actividad máxima entre las 12-18 hrs de incubación con un peso molecular de 10-15 Kd., y b) otro que la presenta hacia el tercer día de incubación, y que tiene un peso molecular de 20-30 Kd., dentro del cual probablemente existiera el Factor de Crecimiento y Transformación- β (TGF- β) (58) y la proteína CMB-2r (45), que actúa independientemente del AMPc.

Con respecto al efecto trófico a mediano plazo, Syed y col., (24) demostraron la existencia de una substancia, o substancia, termoestable (60°C/1 h) de gran peso molecular (cercano al que se

asemeja a la LHRH) en el medio de Túbulos Seminíferos (MTS), obtenido después de la incubación de tubulos seminíferos en los estadios VIII y XI del ciclo espermatogénico de rata, el cual parcialmente inhibe la producción de la T. estimulada por la LH en las células intersticiales *in vitro*, sin embargo la posible presencia de acarreadores, los cuales aparentemente incrementan el peso molecular, no se pueden excluir.

Su sitio de acción, tomando como base su incapacidad de influenciar la producción de la T. estimulada por la LH, y sobre el metabolismo de la T. sugiere que el sitio de acción de esta substancia(s) es a nivel de la activación de la enzima Adenilato Ciclasa o anterior a este (25), y no actúa a nivel de los receptores para la LH, ni a través de la actividad incrementada de la Fosfodiesterasa.

Por otro lado García y col., (43) y Herrera y col., (44) trabajando con células de rata adulta preincubadas (en células de Leydig 24 hrs y células de Sertoli 36 hrs), demostraron una influencia específica del Medio Condicionado de Células de Sertoli (MCCS) sobre los Andrógenos de la vía biosintética de los cultivos primarios de células de Leydig durante las primeras 48 hrs.

La mayor dilución del MCCS induce un aumento en la síntesis de las tres hormonas: Progesterona (Prog), Pregnenolona (Prog) y 17-Hidroxipregnenolona (17-OHpreg); mientras que para la Androstendiona no se observa un efecto definido; e inhibe la síntesis de la T. por eso es posible inferir que el punto crítico de la vía, estará a nivel de la enzima que convierte la Androstendiona en T: 17-hidroxiesteroide Deshidrogenasa, cuyo patrón de conducta observable durante las primeras 24 hrs., gradualmente va disminuyendo o desapareciendo durante el segundo periodo de 24 hrs.

Los presentes resultados son una aportación dentro de los estudios primarios respecto de la naturaleza del modulador esteroideogénico de las células de Leydig presente en el Medio Condicionado de Células de Sertoli, los cuales muestran que tal modulador es peptídico por ser termosensible (90°C), incluso a temperatura de 55°C, y sensible a la actividad de enzimas proteolíticas como la Tripsina.

Por otra parte, pareciera estar constituida por moléculas de pesos moleculares mayores de 6Kd., ya que considerando el dato del Carbón Activado-Dextrán 70, por lo menos es parcialmente incapaz de removerlas del MCCS, concordando con los factores inhibidores descritos por otros autores en base a su sensibilidad al calor y a los tratamientos enzimáticos (34,40,46), mientras que Syed y col., (48) hallaron un factor correspondiente a la fracción de 40-50 Kd., obtenido por Cromatografía en Ultrogel ACA 44.

Dentro de las moléculas parcialmente removidas, por el Carbón

Activado-Dextrán 70. se halla el Estradiol (E), el cual al parecer no es parte del modulador, dado que en trabajos previos (63) se encontró que su concentración en el MCCS no concuerda con los picos de actividad del modulador presente en este último.

De tal manera de avanzar sobre el conocimiento de la naturaleza de las regulaciones *paracrinas* entre los compartimientos intersticial y tubular, se hacen necesarios trabajos adicionales para establecer las interacciones que modulan los diferentes pasos de la vía esteroidogénica en la rata adulta normal

Uno de estos, es el fraccionamiento del MCCS, en la búsqueda del número de péptidos que lo constituyen, el efecto que cada fracción presenta sobre las células de Leydig (en cultivos primarios), su purificación y caracterización electroforética, contrastándolos con el obtenido por otros autores.

Otros estudios complementarios a realizar serían el de valorar el efecto, que sobre el modulador presente en el MCCS, presentan diferentes ambientes hormonales (FSH, Insulina, etc.) y otros factores producidos conocidos (EGF, IGF-I, AMPC, etc.).

8. CONCLUSIONES.

1. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en células de Leydig y Sertoli en condiciones adecuadas de pureza y de viabilidad.

2. Se establecieron cultivos primarios de las estirpes celulares de Leydig y Sertoli en medios definidos que permitieron el funcionamiento continuo de dichas estirpes celulares durante los tiempos requeridos en estas condiciones.

3. Se obtuvieron los Medios Condicionados de Células de Sertoli (MCCS) a 36 hrs y se probó su efecto sobre la actividad esteroidogénica de las células de Leydig.

4. Se probó el efecto que sobre el modulador presente en el MCCS tienen los tratamientos térmicos de 55, 70 y 90°C, con la Tripsina y la centrifugación a través de Carbón Activado-Dextrán 70.

5. Se establecieron las condiciones óptimas necesarias para el desarrollo de la determinación de la T de los medios de cultivo ocupando el RIA.

6. Se estableció que el modulador presente en el MCCS es termosensible (90°C), observándose una disminución de su actividad inhibidora desde los 55°C.

7. El modulador presente en el MCCS es afectado por la Tripsina y parcialmente por el Carbón Activado-Dextrán 70, el cual adsorbe moléculas de peso molecular menores de 6Kd.

8. Los resultados obtenidos permiten sugerir que el modulador presente en el MCCS es de naturaleza peptídica por ser termosensible (90°C) y afectado por la Tripsina, de peso molecular mayor de 6Kd.

9. Se hacen necesarios mayores estudios para determinar los componentes del modulador presente en el MCCS, evaluando el efecto de cada fracción y sus características químicas y físicas.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Tausk M. (1975). *Farmacología de las Hormonas*. Alhambra. Madrid. 226 P.
2. Tortora C.J. y Agnostakos N.P. (1981). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Ed. Hartra, 3ra. edición. México.
3. Lesson S.T. y Lesson C.R. (1985) *Histología*. Ed. Interamericana. 4ta. edición. México. Pp. 48r-502.
4. Bloom W.M.D. Fawcett D.M.D. (1975) *A Testbook of Histology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA Pp. 805-834.
5. Langman J. (1982). *Embriología Médica*. Editorial Médica Panamericana 4ta. edición México Pp. 245-25r.
6. Strand F.L. (1982). *Fisiología Humana*. Interamericana. México. 694 Pp
7. Clermont Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithellum in man. *Amer J. Anat* 112:35
8. Clermont Y. & Bustos-Obregon (1968). Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted in toto. *Amer J Anat* 122:122
9. Huckins C. (1971). Cell cycle properties of differentiating spermatogonia in adult Sprague Dawley rats. *Cell Tissue Kinet* 4:139
10. Huckins C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats.II. A radiographic analysis of their cell cycle properties. *Cell Tissue Kinet* 4:313
11. Huckins C.(1971). The spermatogonial ateam cell population in adult rats. III Evidence for long-cycling population. *Cell Tissue Kinet* 4:335
12. Saez J.M.& Ferrari-Sapori M.H.(1987). Paracrine Regulation of Testicular Function. *J Steroi Biochem* 27:319
13. Sanborns B.M., Lamb D.J., Tsai Y.H. & Stenberger A. (1980). Androgen action in the Sertoli cell. *Sadler,inc. USA Pp.206*
14. Van der Dank J.A., de Ruiter-Bootsma A.L., Ultee-Van A.M.G. & Wanben-Penris P.J.J.(1986). Cell-cell interaction between rata Sertoli cells and mouse germ cells in vitro. *Exp Cell Res* 164:191
15. Sharpe R.M. (1984). Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 30:29
16. Fawcett, D. W. & Burgos M.H. (1960). Studies on the fine structure of the mammalian testis. II The human interstitial *Amer J Anat* 107:245
17. Bhagavan N.V. (1983). *Bioquímica*. Ed. Interamericana. México. Pp.579
18. Martin Jr. W.D., Mayes A.P. y Rodwell W.B.Harper (1986). *Bioquímica de Harper*. Ed. El Manual Moderno. 19a. edición. México. 619 Pp
19. McDonald L.E. (1978). *Reproducción y Endocrinología Veterinarias*. Ed. Interamericana, 2da. edición. México 446 Pp.
20. Ganong. F.W. (1988). *Fisiología Médica*. Ed. El Manual

Moderno, 11a. edición. México. 692 Pp

21. Rommerts F.F.G. & Brikman A.O. (1981). Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells. *Mol Cell Endocr* 21:15
22. Parvis K., Cusan L. & Hanson V. (1981). Regulation of the steroidogenesis and steroid action in Leydig cells *J. Steroid Biochem* 15:77
23. Saez J.M., Benahmed M., Reventos J., Bommelaer, M.C., Mombrial C. & Haour F. (1986). Hormonal regulation of pig Leydig cells in culture. *J Steroid Biochem* 19:375
24. Syed V., Khan S.A., Lindh M. & Ritzen E.M. (1988). Mechanism of action of the factor(s) secreted by rat seminiferous tubules and inhibiting interstitial cell testosterone production in vitro. *Acta Endocrinologica* 119:427
25. Carreau S., Papadopoulos V. & Drosowsky M.A. (1985). Rat Leydig cell aromatase activity: regulation by seminiferous tubules secreted factor(s). *Acta Endocrinologica (Suppl. 270)* 109:212
26. Rommerts F.F.G., Teerds K., Themmen A.P.N. & Van Noort (1987). Multiple regulation of testicular steroidogenesis. *J Steroid Biochem* 27:309
27. Steinberger A. & Steinberger E. (1976). Secretion of a FSH inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocr* 99:912
28. Scheingart, Rivarola M.A. & Cigorruga S.B. (1989). Hormonal and paracrine regulation of γ -glutamyl transpeptidase in rat Sertoli cells. *Moll Cell Endocr* 67:73
29. Williams J & Foster P.M.D. (1988). The production of lactate and piruvate as sensitive indices of altered rat Sertoli cell function in vitro following the addition of various testicular toxicants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 94:160
30. Nicolett H.P.M., Jutte N. H.P.M., Jansen R., Grootegoed J.A., Rommerts F.F.G. & Van der molen H.J. (1983). FSH stimulation of the production of piruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J Reprod Fert* 68:219
31. Parvinen M, Nikula H. & Huhtaniemi (1984): Influence of rat seminiferous tubules on Leydig cell testosterone production. *Molec Cell Endocr* 37:331
32. Le Magueresse B., Le Gac F., Loir M. & Jégou (1985). Germ cell and residual body stimulation of Sertoli cell secretory activity in vitro. *Acta Endocrinologica (Suppl. 270)* 109:213
33. Ferrari-Sapori M.R., Chatelain P.C., Rogemound N. & Saez J.M. (1987). Modulation of Leydig cell function by culture with Sertoli cells or with Sertoli cell-conditioned medium: effect of insulin, somatomedin C and FSH. *Mol Cell Endocr* 50:193
34. Verhoeven G. & Calleau J. (1985). A factor in spent medio from Sertoli cell-enriched cultures that stimulates steroidogenesis in Leydig cells. *Mol Cell Endocr* 40:57
35. Rommerts F.F.G., Hoogerbrugge J.W. & Van der Molen H.J. (1985). Stimulation of steroid production in isolated rat Leydig cells by unknown factor in testicular fluid differs from the effects of LH or LH-realising hormone *J Endocr* 109:111

36. Sharpe N.R. (1985) Intratesticular regulation of the testosterone secretion: comparison of the effects and interactions, an LHRH agonist and testicular interstitial fluid on Leydig cell testosterone secretion in vitro. *Mol Cell Endocr* 41:247
37. Bartlett J.M.S. & Sharpe R.M. (1987). Effect of local heating of the rat testis on the levels in interstitial fluid of a putative paracrine regulator of the Leydig cells and its relationship to changes in Sertoli cell secretory function. *J Reprod Fert* 80:259
38. Wang J.G.A.A. & Satchel B.P. (1983). Changes in testicular blood flow and testosterone production during a spermatogenesis after irradiation. *J Endocr* 98:35
39. Sharpe R.M. & Cooper I. (1984). Intratesticular secretion of a factor(s) with major stimulatory effects on Leydig cell testosterone secretion of in vitro. *Mol Cell Endocr* 37:159
40. Papadopoulos V., Carreau S. & Drosowsky M.A. (1986). Effect of seminiferous tubule secreted factor(s) on Leydig cell cyclic AMP production in mature rat. *FEBS* 202:74
41. Ferrari-Sapori M.H., Chatelain P., Vallier P. & Saez J.M. (1986). In vitro interactions between Sertoli cells and steroidogenic cells. *Bioch Biophys Res Comm* 134:957
42. Syed V., Khan S.A. & Ritzén E.M. (1985). Stage-specific inhibition of interstitial cell testosterone secretion by rat seminiferous tubules in vitro. *Mol Cell Endocr* 40:57
43. García C.J.R. y Rodríguez M.E. (1989). Efecto del Medio Condicionado en Células de Sertoli sobre la función esteroidogénica en células de Leydig en cultivo. *Tesis de Licenciatura en Biología. ENEP-Zaragoza. UNAM. México. 46 Pp*
44. Herrera J., García E., Mendieta E. & Bermúdez J.A. (1988). Sertoli cell conditioned media (SCCM) modulate the androgen biosynthetic pathway in rat Leydig cell (CL) primary cultures. *XVIII Reunión Anual de la Soc Mex de Nutrición y Endocrinología. Guanajuato, Gto. México.*
45. Welsh M.J. & Wiebe J.P. (1975). Rat Sertoli cells. A rapid method for obtaining viable cells. *Endocr* 96:618
46. Conn P.M., Isuruhara I., Dusan M. & Catt K.J. (1977). Isolation of highly purified Leydig cells by density gradient of centrifugation. *J Endocr* 102:639
47. Jansen F.H.A., Cooke B.A., Van Driel M.J.A. & Van de Molen H.J. (1976). Purification and characterization of Leydig cells from rat testis. *J Endocr* 70:345
48. Browning J.Y., D'Agata R. & Grotjan H.E. (1981). Isolation of purified rat Leydig cells using continuous Percoll gradients. *Endocr* 109:667
49. Kruse P.F. & Patterson M.K. (1973). Tissue cultures, methods and applications. *Academic Press. New York.*
50. Herrera J., Mendieta E. y Bermúdez J.A. (1985). Estudios preliminares de proteínas unificadoras de esteroides en fracciones enriquecidas de células de Leydig y Sertoli de ratas. *X Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la*

Reproducción, A.C., Morelia, Mich. México.

51. Mather J.P. & Soto G.H. (1979). The use of hormone-supplemented serum free media in primary cultures. *Exp Cell Res* 124:215
52. Bermúdez J.A., Mendieta E. y Herrera J. (1988). Evaluación de los métodos de aislamiento y purificación de células de Leydig y Sertoli. *Arch Invest Med (Méx)* 19:291
53. Herrera J., Morán L., León C. y Bermúdez J.A. (1974). Radioinmunoanálisis de pregnenolona, dehidroepiandrosterona y sus formas sulfoconjugadas. *Arch Invest Méd (Méx)* 5:617
54. Bermúdez J.A., León C. y Herrera J. (1973). Fundamento y estudio comparativo de dos métodos por saturación. *Rev Méd IMSS* 12:11
55. Sharpe R.M. & Cooper I. (1982). Variation in the steroidogenic responsiveness of isolated rat Leydig cells. *J Reprod Fert* 65:475
56. Klinefelter G.R. & Ewing L. (1988). Optimizing testosterone production by purified adult rat Leydig cells in vitro. *In Vitro Cell Develop Biol* 24:545
57. Klinefelter G.R. & Ewing L. (1989). Maintenance of testosterone production by purified adult rat Leydig cells for 3 day in vitro. *In Vitro Cell Develop Biol* 25:283
58. Sporn M.B., Roberts A.B., Wakefield L.M. & Assoian R.K. (1986). Transforming growth factor- β : Biological Function and chemical structure. *Science* 233:532
59. Boujrad N., Papadopoulos V., Drosowsky M.A. & Carreau S. (1989). Rôle D' une protéine Sertolienne purifiée (CMB-21) dans la biosynthèse de testostérone Leydigienne chez le rat immature. *Path Biol* 37:819
60. Papadopoulos V., Kantchoung P., Drosowsky M.A., Hocherea de Riviers M.T. & Carreau S. (1987). Adult rat cell secrete a factor or factors which modulate Leydig cell function. *J. Endocr* 114:459
61. Verhoeven G. & Cailleau J. (1986). Specificity and partial purification of a factor in spent media from Sertoli cell-enriched cultures that stimulates steroidogenesis in Leydig cells. *J. Steroid Biochem* 25:393
62. Janeczek A., Jakubowiak A. & Lukasik A. (1985). Stimulatory effect of Sertoli cell secretory products on testosterone secretion by purified Leydig cells in primary culture. *Moll Cell Endocr* 42:235
63. Herrera M.J. (1990). Comunicación personal.