

11  
2ej.



# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

"ZARAGOZA"

EVALUACION DEL EFECTO DEL MEDIO  
CONDICIONADO DE CELULAS DE SERTOLI SOBRE  
LA FUNCION ESTEROIDOGENICA DE CELULAS DE  
LEYDIG DEL TESTICULO DE LA RATA ADULTA NORMAL



T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A N  
JENNY RUTH GARCIA CASTRO  
EMMA RODRIGUEZ MALDONADO



México, D. F.

1989

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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.

## RESUMEN.

En la búsqueda de los factores que intervienen en el control del funcionamiento de los compartimientos testiculares, se evaluó el efecto que sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig tienen los medios condicionados (MC) de células de Sertoli. Para este propósito se condicionaron los medios libres de suero durante 24, 36 y 48 horas, con las células de Sertoli aisladas de testículos de ratas Wistar normales adultas. Dichos medios fueron mezclados con medio mínimo esencial de Eagle, modificado por Dulbecco (DME), en proporciones de 1:2, 1:5 y 1:10, siendo agregados a los cultivos de células de Leydig para sustituir el medio en el que se habían preincubado por 24 horas. Las células de Leydig estuvieron en presencia de los MC por periodos de 18, 24 y 48 horas, obteniéndose además, muestras control sin MC para todos los tiempos. La evaluación del efecto se realizó al analizar cuantitativamente mediante técnicas de radioinmunoanálisis (RIA) en el medio de cultivo, las concentraciones de los intermediarios de la vía de los  $\Delta$  para la síntesis de testosterona (T), encontrándose un claro dominio de la concentración de T en los medios (2-4 ng/ml); con cifras diez veces menores se encontraron pregnenolona (Preg), progesterona (Prog) y androstendiona (A), mientras que 17-hidroxi progesterona (17-OHPreg) se encontró en cantidades menores a 75 pg/ml. El efecto de los MC en dilución 1:2 marcó una disminución de las concentraciones de T, la que fue estadísticamente significativa a los tres tiempos de incubación con los tres MC. Al diluir estos medios a proporción 1:5, la diferencia perdió significado estadístico, a excepción del caso de 24 horas de cultivo con el MC de 24 horas. Con la dilución 1:10, se perdieron los significados estadísticos de las diferencias de los MC a los tres tiempos de cultivo. Se demostró asimismo, la existencia de un efecto causado por los MC de células de Sertoli, que provocan un incremento en las pozas de Preg, Prog, y 17-OHPreg, y variación en las de A, que es dosis dependiente. El efecto más significativo se encontró a las 36 horas de condicionamiento en dilución 1:2 para Preg, Prog, 17-OHPreg y A, y en dilución 1:5 para la disminución de la concentración de T. Se determinó la necesidad de realizar estudios posteriores para establecer tanto la identidad del factor o factores responsables de los efectos detectados como el mecanismo de acción de éstos sobre las vías esteroidogénicas en las células de Leydig en cultivo.

NOMBRES FORMALES DE LOS ESTEROIDES.

A	Androstendiona	Androst-4-en-3,17diona
Col	Colesterol	Colest-5-en-38ol
Col-S	Sulfato de colesterol	Colest-5-en-38sulfato
DHEA	Dehidroepiandrosterona	Androst-5-en-38ol-17ona
E	Estradiol	Estra-1,3,5(10)-trien-3,178diol
Preg	Pregnenolona	Pregn-5-en-38ol-20ona
17-OHPreg	17-hidroxipregnenolona	Pregn-5-en-38,178diol-20ona
Prog	Progesterona	Pregn-4-en-3,20-diona
17-OHProg	17-hidroxiprogesteronona	Pregn-4-en-178ol-20ona
T	Testosterona	Androst-4-en-178ol-3ona

## INDICE

I. INTRODUCCION	
1.1. Aspectos históricos	1
1.2. Aspectos morfológicos del testículo	2
1.3. Aspectos fisiológicos del testículo	6
1.4. Esteroidogénesis testicular	11
1.5. Modelos <u>in vitro</u> de estudios de la regulación de la esteroidogénesis	14
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
III. OBJETIVOS	18
IV. HIPOTESIS DE TRABAJO	19
V. MATERIALES Y METODOS	
5.1. Obtención de fracciones enriquecidas de células de Leydig y células de Sertoli	20
5.2. Cultivos celulares	21
5.3. Estandarización del método de radioinmunoanálisis	22
5.4. Purificación cromatográfica de los esteroides	23
5.5. Cuantificación de los esteroides en los medios de cultivo	25
5.6. Pruebas estadísticas	25
VI. RESULTADOS	
6.1. Obtención de fracciones enriquecidas de células de Leydig y Sertoli	26
6.2. Cultivos celulares	27
6.3. Determinaciones de los esteroides en los medios de cultivo	27
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	29
VIII. CONCLUSIONES	33
IX. BIBLIOGRAFIA	

## I. INTRODUCCION

### 1.1. Aspectos históricos.

El hacer un estudio acerca de los testículos no es nuevo, ya que si se toma en cuenta la posición expuesta, su notoriedad en la mayoría de las especies de mamíferos, y el hecho de que la pérdida de uno ó ambos órganos no resulta vital para el animal, luego entonces el papel fisiológico y muchos de los efectos que la orquitectomía deliberada o accidental tienen en los organismos, se han podido reconocer desde tiempos remotos. Está escrito en tabletas de arcilla asirias de 15 Siglos Antes de Cristo, que la castración de hombres era utilizada como castigo a delitos sexuales (1). Asimismo, la castración como castigo de adulterio está descrita en el Código Babilónico de Hammurabi (unos 2,000 años A.C.), y en las leyes egipcias de la 20a. Dinastía (1,200-1,085 A.C.) (2). Todo ello implica que desde esos tiempos ya se conocían los efectos de la castración sobre la libido y la potencia sexual; así, la orquitectomía - como la trepanación craneana - puede ser una de las primeras intervenciones quirúrgicas practicadas en seres humanos y con fines preestablecidos como castigo y para la creación de eunucos con propósitos sociales (3).

Se sabe también que hasta principios de este siglo algunas tribus antropófagas de las Antillas y del Norte de Brasil castraban a los prisioneros para que aumentaran de peso y fueran devorados en fechas especiales. También en la cultura occidental se realizaron este tipo de "prácticas", ya que son mencionadas en el Antiguo y Nuevo Testamentos. Dada la prohibición del ingreso de mujeres a los coros, la Iglesia terminó por sustituirlas en las voces de soprano y mezzosoprano por niños, y posteriormente por eunucos, mediante la castración prepupal de niños seleccionados por la tesitura de su voz, siendo éstos sumamente requeridos, llegándose a solicitar de 4,000 a 5,000 anuales, terminándose esta costumbre con el papa León XIII en 1878 (4,5,6).

Respecto del conocimiento del papel fisiológico de los testículos en animales, no se tienen datos precisos, pero es de suponer que al menos al final del Neolítico (aproximadamente 7,000 A.C.) ya se conocía su importancia, ya que en esta época fueron domesticadas algunas especies de mamíferos (7). Es claro que en la cultura griega fueron tomados como objeto de estudio y, p.ej., Aristóteles hizo una detallada descripción de estos órganos, incluyendo algunas ilustraciones. Respecto de su papel fisiológico, se reconocieron claramente los diferentes efectos de las castraciones pre y post-puberales tanto en animales como en humanos.

No obstante, Aristóteles realizó una observación que originó un debate que duró cerca de 2,000 años, ya que indicó que los testículos no eran necesarios para que el animal fuera fértil, ya que observó que toros recién castrados eran capaces de fertilizar a vacas (8). Es hasta 1668 cuando Reignier de Graff, recopilando

información acerca de la anatomía testicular y después de sus propias observaciones, establece claramente la existencia de túbulos seminíferos y define que la parte fertilizante del semen es originada en dichos túbulos (9), reafirmando los hallazgos de Leuwenhoek en 1667, quien demostró la existencia de espermatozoides en el semen (10).

Más tarde, en 1849, Berthold demostró el papel endocrino del testículo en sus experimentos de autotransplante de testículo en gallos, indicando la presencia de "algo" producido por el testículo y que actuaba sobre otras partes del cuerpo, cincuenta años antes de que se acuñaran las palabras "hormona" y "Endocrinología" (11).

En 1889 el fisiólogo francés Brown-Sequard reportó que al haberse inyectado un extracto de testículo de animales, había experimentado un rejuvenecimiento en varios aspectos; estos reportes produjeron un gran impacto en el campo de la Fisiología y permitieron el uso terapéutico en ocasiones apropiado, de extractos glandulares de tiroides en 1920, y de adrenales y gónadas en la década de los cuarentas (12).

La utilización del microscopio y el desarrollo de técnicas cada vez más adecuadas para la observación de las células han dado como resultado una enorme cantidad de estudios relacionados con estos órganos, permitiendo iniciar los conocimientos "modernos" al respecto.

### 1.2. Aspectos morfológicos del testículo.

Los testículos en la mayoría de los mamíferos son fácilmente visibles y su posición es, por lo general, en la región inguinal, aunque en ocasiones suelen estar situados hacia la porción posterior como en los cánidos, o bien ser colgantes como en los bovinos. Los testículos en sí se encuentran contenidos en las bolsas escrotales, que son porciones de la piel con características especiales y particulares de cada especie.

En los primates, la llamada región genital puede tener una pigmentación diferente a la del resto del cuerpo; el tamaño de los testículos es muy variable y no parece guardar relación con el tamaño del animal, pudiéndose observar dentro de la misma especie, diferencias en el tamaño de estos órganos, dependiendo de la etapa de madurez de los individuos y de la época de apareamiento, en los animales con actividad estacional (9).

El testículo es un órgano que se desarrolla retroperitonealmente en el abdomen, y que desciende gradualmente a través del conducto inguinal hacia el escroto, que es una bolsa evaginada de la piel y el tejido subcutáneo. La pared del escroto contiene también una delgada capa de músculo liso o tánica dartos y el músculo estriado o músculo cremaster que corresponde al músculo interno oblicuo de la pared abdominal. Durante el descenso del testículo el peritoneo cubre el interior del escroto con el llamado proceso

vaginalis; en el testículo adulto al remanente de esta porción se le llama túnica vaginalis y por lo general pierde su conexión con la cavidad peritoneal (13).

El testículo es por lo general un cuerpo ovoide, liso, rodeado de una gruesa capa o cápsula de tejido conectivo, la túnica albugínea; bajo ella, en algunas especies se encuentra una túnica vasculosa, que como su nombre lo indica, está altamente vascularizada. La cápsula de tejido conectivo está especialmente desarrollada en el lado "interno" del testículo en una región denominada mediastino, donde rodea al sistema de conductos que comunican al testículo con el epidídimo. Del mediastino parten septos en forma radial que dividen al parénquima testicular en "lóbulos"; estos elementos de forma semipiramidal contienen a su vez varios túbulos seminíferos enrollados, los cuales van a terminar en una porción recta en una misma región del testículo, uniéndose con otros túbulos y formando el rete testis, el cual viene entonces a ser como una red de tubos más anchos donde desembocan los túbulos seminíferos. Del rete testis parten de 10 a 12 tubos o conductos eferentes que llevan los espermatozoides hacia el epidídimo. En los lóbulos y entre los tubos seminíferos se encuentra el llamado tejido intersticial, el cual está formado de una extensa red de vasos capilares, tanto sanguíneos como linfáticos, y una serie de acúmulos de células endocrinas llamadas intersticiales o de Leydig, dispersas entre el tejido conectivo laxo.

En los últimos 20 años se ha producido una marcada expansión en nuestros conocimientos de la citología testicular, especialmente por la utilización de nuevas técnicas para la fijación y la tinción selectiva en la microscopía de luz, así como por la disponibilidad del microscopio electrónico que ha permitido hallazgos relevantes para el estudio de este órgano.

De la enorme cantidad de información existente en este campo, se hace tan solo un breve resumen de las características de los principales tipos celulares que están presentes en este órgano.

#### Túbulo Seminífero.

La mayor proporción de células presentes en los túbulos seminíferos de un mamífero adulto corresponde a la línea germinal, en una variedad de formas celulares que determinan las diferentes etapas de la espermatogénesis. Los estudios detallados de Clermont (14,15) con microscopía de luz y de la cinética de la espermatogénesis de muchas especies de mamíferos, han demostrado una secuencia ordenada de eventos en el desarrollo de los espermatozoides, la cual se caracteriza en cada especie por la forma de inicio y el tiempo que se toma para completarse (15).

En un estudio detallado de la espermatogénesis humana, Clermont (14) identificó ó asociaciones celulares con las que se constituye el "ciclo seminífero humano", y mediante la inyección intratubular de  $^3\text{H}$ -timidina, demostró que el desarrollo de un

espermatozoide a partir de espermatogonia toma  $70 \pm 4$  días, siendo éste un proceso que puede ser dividido en 3 fases: a) replicación de las células troncales o espermatogonias, b) replications meióticas, que incluyen a los espermatoцитos, y c) espermiogénesis, es decir, la compleja metamorfosis que lleva de espermátida hasta espermatozoide.

Las espermatogonias se localizan en el túbulo seminífero, siempre adyacentes a la membrana basal. Clermont ha descrito 3 tipos distintos, basándose principalmente en las características tintoriales de sus núcleos: espermatogonia A, la cual se divide a su vez en oscura (Ad) y clara (Ap), y espermatogonia B. El mismo autor sugiere (16) que la espermatogonia Ad es la que al dividirse produce a la Ap, la cual a su vez genera la espermatogonia B, misma que tras varias divisiones, origina a los espermatoцитos primarios preleptoténicos. Se han localizado acúmulos de espermatogonias unidas por puentes intercelulares, lo que sugiere que pueden existir células progenitoras de reserva que no entran al ciclo normal del túbulo seminífero (17-20).

Los espermatoцитos son células que entran a meiosis, considerándose espermatoцитo primario a la célula aún diploide, y secundario a la haploide. Los espermatoцитos primarios pierden el contacto con la membrana basal del túbulo y entran a la larga profase de la primera división meiótica, caracterizada por una serie de cambios cromatínicos, ampliamente estudiados (21,22).

Después de completarse la primera división meiótica se pasa inmediatamente a la segunda, por lo que la existencia del espermatoцитo secundario es muy breve, dando paso rápidamente a las espermátides. Es de hacerse notar que los espermatoцитos primarios son de las células más grandes encontradas a nivel tubular, mientras que como se ha mencionado, los espermatoцитos secundarios son muy poco frecuentes (23).

Las espermátides llevan a cabo una de las más notables transformaciones celulares conocidas, ya que partiendo de una célula "típica", se llega a la diferenciación y especialización funcionales del espermatozoide, sin requerir nuevas divisiones celulares. Todos los cambios son continuos y coordinados, identificándose numerosas fases en las que se muestran etapas como cambios de forma y tamaño del núcleo, desarrollo del acrosoma, formación y crecimiento del flagelo y redistribución y pérdida final del citoplasma (24). Esta transformación o espermiogénesis ocurre hacia la luz del túbulo seminífero, por donde son transportados los espermatozoides ya formados, aunque inmóviles e incapacitados para fecundar.

En los túbulos seminíferos se encuentran además de las células de la línea germinal las células de Sertoli (25), las cuales se extienden desde la membrana basal del túbulo hasta la luz del mismo; una marcada característica de esta estirpe celular son las prolongaciones citoplasmáticas con las que rodean a todas y cada una de las células de la línea germinal (espermatogonias en la

base, espermatoцитos en la región media y las diferentes etapas de diferenciación de las espermátides en la región apical).

La microscopía electrónica ha demostrado que, no obstante rodear a las células de la línea germinal, existe un espacio entre ambas estirpes, fácilmente observable en la porción basal (20-25 nm). El núcleo de las células de Sertoli presenta un surco y su posición no es fija, modificándose por efecto de los cambios en la línea germinal. La mayor proporción de los organelos se encuentra en la región perinuclear, con mitocondrias usualmente ovoides, retículo endoplásmico rugoso muy abundante y un complejo de Golgi bien desarrollado; también se encuentran cuerpos lisosomales, autofágicos y multivesiculares (26,27).

Otra marcada especialización de las células de Sertoli es la formación de uniones intercelulares en las superficies laterales de células vecinas, las cuales constan de pequeñas uniones estrechas, cisternas del retículo endoplásmico liso en superficies paralelas a la membrana celular, y obliteración de los espacios intercelulares por muchos puntos de fusión (28-30). Toda esta barrera limita el libre paso de moléculas por el espacio tubular al resto del testículo y viceversa, formando la llamada "barrera hemato-testicular", que es constantemente reformada debido a la migración de las células germinales hacia la luz del túbulo (31-33).

#### Tejido Peritubular.

La "lámina propia" que rodea al túbulo es la responsable de la actividad contractil de éste (34-36). La pared tubular se inicia con una lámina basal estrechamente unida a la superficie basal de las células de Sertoli y sólo en contacto con las espermatogonias; esta capa está seguida de otras capas delgadas de células musculares o "células mioides", con gran cantidad de sustancias elásticas (37,38). Aunque estas células están estrechamente superpuestas dejando poco espacio intercelular, no participan en la llamada barrera hemato-testicular.

#### Tejido intersticial.

Las asas y enrollamientos de los túbulos seminíferos están sostenidos por un tejido conectivo laxo ricamente suplementado con vasos sanguíneos y linfáticos, además de fibroblastos, macrófagos y algunos nervios sin mielina, además de grupos de las llamadas células de Leydig (39), las cuales son células grandes de unos 20-30  $\mu$ m de diámetro, con un núcleo redondo que se tiñe pálido, 1 ó 2 nucleolos, en ocasiones binucleadas, citoplasma vacuolado por vesículas de lípidos; en la zona periférica se observa una gran cantidad de vesículas y cisternas de retículo endoplásmico liso, y mitocondrias. En el testículo humano se encuentran los llamados "cristales de Reinke", cuya estructura y función son aún objeto de estudio (40-43).

### 1.3. Aspectos fisiológicos del testículo.

El control de la función testicular en el adulto está compuesto de elementos intra y extratesticulares. La hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) producidas por la hipófisis anterior regulan la función de los túbulos seminíferos y las células de Leydig.

La secreción de la FSH y la LH (gonadotropinas) es regulada por el hipotálamo por medio de una hormona peptídica denominada hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). El GnRH llega a la adenohipófisis en la sangre circulante de los capilares y vénulas del sistema porta hipotalámico-hipofisiario, y se une a los gonadotropos, lo que induce la síntesis y la secreción de las gonadotropinas.

Por otra parte, los esteroides producidos por las células de Leydig y factores no esteroideos del túbulo seminífero modulan las concentraciones periféricas de las gonadotropinas por su interacción en un centro de control anterior, el hipotálamo. Los principales elementos de control de la fisiología testicular se muestran en la figura 1.1.

#### Regulación de la función de la célula de Leydig.

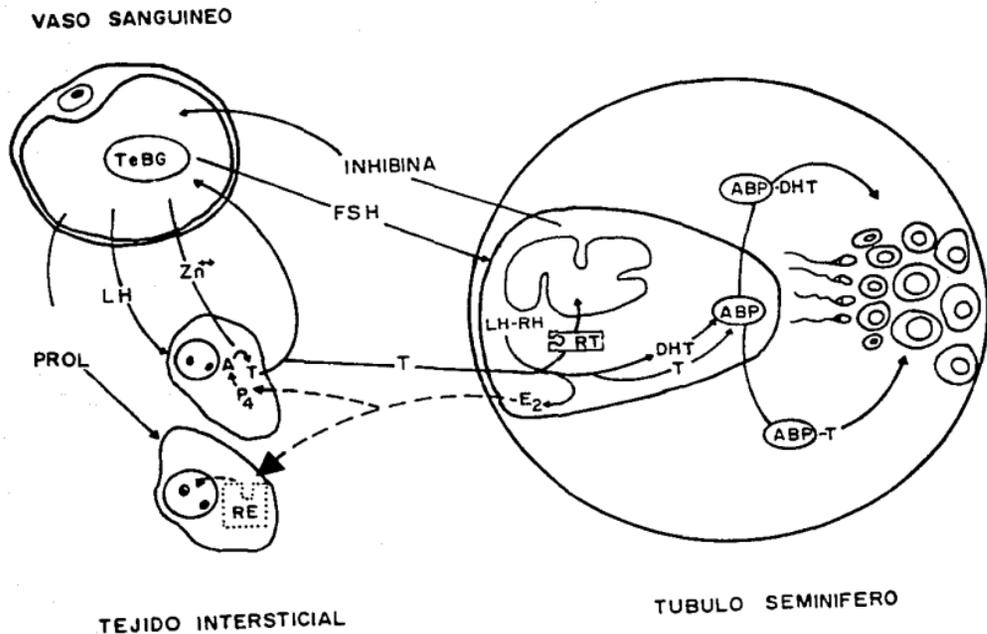
La LH se une a las células de Leydig, y la unión es mediada por proteínas de alta afinidad y especificidad (44). Estas proteínas receptoras, ya que se han unido a la LH son capaces de incrementar la actividad de la adenilatociclasa membranar, habiendo por consecuencia, un aumento en la concentración intracelular del 3',5'-riboadenosilmonofosfato (AMPc) (45).

El AMPc así formado se une a la porción reguladora de una proteincinasa, localizada en el citoplasma, formando una holoenzima que es capaz de activar sustratos proteicos (46).

Son varios los cambios producidos en las células de Leydig por efecto de la LH, como la movilización del ión calcio intracelular con el correspondiente hinchamiento de las mitocondrias y el incremento de la conversión de colesterol (Col) a pregnenolona (Prog), un precursor de la biosíntesis de testosterona (T), a través de los sistemas enzimáticos colesterol-esterasa y enzimas que rompen la cadena lateral del Col (47,48). También se incrementa la entrada de Col a las mitocondrias, donde las reacciones antes mencionadas se realizan. Así, el principal efecto de la LH es incrementar la disponibilidad de precursores de la esteroidogénesis, acelerando el metabolismo del Col (49).

De la célula de Leydig salen una gran variedad de esteroides, incluyendo la T, la 17-hidroxiprogesterona (17-OHPreg), y estradiol (E). En hombres maduros normales, se producen alrededor de 7 mg diarios de T, y es primordialmente originada en las

**FIGURA 1.1.** Compartimientos testiculares y posibles mecanismos de regulación extra e intragonadales.



células de Leydig, en contraste con la mujer, en donde la cantidad de T producida es significativamente menor (0.35 mg/día), y alrededor de la mitad de tal concentración se debe a la transformación periférica de precursores secretados por la glándula suprarrenal, principalmente androstendiona (A).

En los hombres, la mayoría de la T viaja por el organismo unida en equilibrio a la globulina transportadora de hormonas sexuales (TeBG), existiendo la idea de que sólo la T libre es la que está en disposición para la interacción celular, y para manifestar su actividad androgénica (50), incluyendo su papel inhibitorio de la secreción de LH. Aunque la concentración plasmática de T total es un buen reflejo de la función de la célula de Leydig, en algunos casos puede dar una impresión equivocada de la disponibilidad biológica de T, y de sus manifestaciones androgénicas, haciendo que la producción hepática de TeBG sea un modulador de dicha actividad (51).

Además, los estrógenos incrementan los niveles de TeBG, mientras que la T hace disminuir su concentración, proponiéndose que la relación entre andrógenos y estrógenos determina la producción hepática de la TeBG.

Sólo un tercio de la producción diaria de estrógenos es generada en el testículo, y existe controversia sobre el origen de los estrógenos testiculares, sobretodo de la participación de las células de Sertoli, aunque se ha demostrado la existencia de los sistemas enzimáticos de aromatización capaces de transformar T en E (52), aunque existen dudas considerables de que este mecanismo sea capaz de generar cantidades importantes de E en el testículo.

Otras hormonas de naturaleza proteica parecen estar relacionadas con la función de la célula de Leydig; así, hay evidencias de que la FSH pueda influir en la función de estas células en el conejo (53), en la rata inmadura (54), y en hombres hipogonadotrópicos (55). La FSH incrementa la estimulación de la esteroidogénesis inducida por la LH, y aunque no se ha demostrado la unión de FSH a la célula de Leydig, se habla de una mediación de esta hormona por el incremento de los receptores a LH.

Existe una considerable controversia acerca del papel que pueda tener la prolactina (PRL) en la función testicular (56). La mayoría de las evidencias de que la PRL puede actuar en el tejido testicular, viene de investigaciones en roedores (57). La PRL incrementa la producción de T inducida por HL, facilitando la transformación de Col a Preg en ratas sexualmente inmaduras. Se ha demostrado la unión de PRL a las células de Leydig (58).

El papel de la PRL es en cierta forma contradictorio, ya que si bien se detectan incrementos de T después de elevaciones inducidas de PRL (59), cifras altas de PRL parecen inhibir la biosíntesis de andrógenos (60-62).

Regulación de la función del túbulo seminífero.

Se ha demostrado que de todos los elementos celulares que componen el túbulo seminífero, sólo las células de Sertoli tienen receptores para FSH, y no existen evidencias de que la LH pueda interactuar directamente con éstas. De acuerdo al modelo de mecanismo de acción de hormonas proteicas, la FSH estimula a la adenilato ciclasa de las células de Sertoli, incrementando los niveles de AMPc, el cual activa a la subunidad reguladora de una proteína cinasa citoplasmática, tal como ya se ha mencionado anteriormente.

Una de las principales acciones de la FSH es estimular la síntesis de proteínas (63), habiéndose demostrado la incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente después de la exposición de las células de Sertoli de ratas inmaduras a FSH en condiciones experimentales, tanto in vivo como in vitro. La FSH incrementa la producción de cuando menos 4 proteínas específicas (64), incluyendo la proteína unidora de andrógenos (ABP) y el activador de plasminógeno (65), siendo ambas secretadas al fluido tubular. Las otras 2 proteínas cuya síntesis está regulada por FSH no salen de la célula de Sertoli y son: un inhibidor de la proteína cinasa citoplasmática y la - glutamiltranspeptidasa (66), habiéndose usado esta última como marcador citoquímico de este tipo celular.

La producción de ABP está bien caracterizada en ratas inmaduras (67), y aunque hubo ciertas dificultades metodológicas para determinar su existencia en humanos (68), hay evidencias de que tiene mayor afinidad en la unión de andrógenos que la TeBG de plasma sanguíneo (69).

Hasta la fecha sólo se ha demostrado actividad de la FSH en testículos de ratas sexualmente inmaduras, y una pequeña estimulación de síntesis de AMPc o ABP en animales maduros, en función de que la célula de Sertoli se hace refractaria a la FSH a los 25 días de edad en la rata, aunque la hipofisectomía puede restaurar la sensibilidad de la célula de Sertoli en animales maduros (64).

La pérdida de respuesta en la rata adulta parece deberse a un defecto en la producción de AMPc, secundario al incremento en la actividad de la fosfodiesterasa, y no a una disminución de los receptores, ya que el número de éstos se incrementa con la edad. Además de influir en la síntesis proteica, la FSH puede actuar sobre el citoesqueleto de la célula de Sertoli, y sobre la distribución intracelular del ión calcio, por la estimulación de síntesis de proteínas reguladoras dependientes de calcio; estas proteínas reguladoras modulan el sistema de la adenilato ciclasa a través de la fosfodiesterasa, y alteran la secreción y movilidad celulares por reacomodo de microfilamentos (70).

El potencial esteroidogénico de los túbulos seminíferos ha desatado considerable controversia. Se sabe que las ratas de 10 días de edad pueden transformar A en T cuando son estimuladas con FSH (71), pero no existe formación de T cuando se añade Col.

Aunque se ha demostrado la existencia de los sistemas enzimáticos de aromatización para transformar T a E en células de Sertoli de ratas inmaduras, no se sabe qué papel puede tener la cantidad de E producido en los túbulos seminíferos, ya que las células de Sertoli de ratas adultas no manifiestan un incremento en la biosíntesis de esteroides al ser estimuladas con FSH. Aparentemente, el papel de las células de Sertoli en el control de la esteroidogénesis parece estar limitado a la etapa del desarrollo del testículo inmaduro.

#### Control de la espermatogénesis.

El control endocrino de la espermatogénesis es un proceso complejo que requiere de la presencia de FSH y de altos niveles intratesticulares de T. No obstante existir estudios en hombres y roedores (72-74), continúan las discusiones sobre la distribución relativa de FSH y T en el control espermatogénico.

Se ha presentado alguna evidencia de que en ratas inmaduras e hipofisectomizadas la T por sí misma podría iniciar la espermatogénesis y que la FSH únicamente sería requerida para las etapas finales (75). Algunos estudios en muchachos con pubertad precoz causada por tumores testiculares de células intersticiales refuerzan el concepto de que los altos niveles intratesticulares de T son necesarios para el inicio de la espermatogénesis, ya que los túbulos adyacentes al tumor andrógeno-productor entran en maduración germinal, mientras que el testículo contralateral permanece sin estimularse, aún a pesar de los altos niveles de andrógenos circulantes.

Al contrario de lo que ocurre en la rata, la inyección de T a humanos no induce la espermatogénesis (76). Sin embargo, la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) estimula la producción de T intratesticular y posteriormente la espermatogénesis. En ausencia de la FSH, la maduración del epitelio germinal no va más allá del estado de espermátide, tanto en el humano como en la rata.

#### Regulación de las gonadotropinas.

Como ya se ha puesto en evidencia, las gonadotropinas hipofisarias son principalmente los factores extratesticulares que modulan la actividad de la gónada, y por lo tanto, resulta lógico pensar que éstas deban ser reguladas a su vez, por la respuesta testicular.

Existen abundantes evidencias de que varios esteroides sexuales son capaces de modificar las concentraciones periféricas de FSH y LH (77-79). Los primeros estudios mostraban que la T era el principal regulador de la secreción de LH, mientras que el E lo era para FSH (80). Otros estudios demostraron que la T es precursor del E, por lo que del 66 al 75% de la producción diaria de E en el hombre proviene de la transformación periférica de T a E (81).

Estudios más recientes han demostrado que los andrógenos y los estrógenos tienen diferente papel en el control de las gonadotropinas (82,83). Cuando se inyecta T a hombres normales en dosis fisiológicas, las concentraciones de LH y FSH son igualmente suprimidas (84). La administración de E a niveles que son alcanzados en la transformación periférica de concentraciones normales de T, produce una inhibición de FSH semejante a la producida por T en concentración normal, pero sólo el 60% de la inhibición de LH producida por la T.

Existen aparentemente otros sistemas de regulación de la secreción de las gonadotropinas, y para explicar la elevación de la FSH y no de la LH después de la disminución de las células germinales. En 1932 se hipotetizó (85) que los túbulos seminíferos pueden producir una sustancia capaz de lograr una supresión selectiva de FSH, a la que se llamó inhibina. En la última década, varios laboratorios han comprobado dicha hipótesis, y recientemente se ha propuesto que la inhibina es un factor proteico (PM 5-7,000), habiéndose encontrado un factor semejante en el fluido folicular de ovarios (86).

En el testículo se ha situado a la célula de Sertoli como el sitio más probable de síntesis de inhibina; utilizando cocultivos de células hipofisiarias y células de Sertoli, se han visto disminuidas las concentraciones de FSH en el medio, y además, se ha inhibido la respuesta a hormona liberadora de hormona luteinizante (GnRH) (87,88).

#### Interacciones entre células de Leydig y células de Sertoli.

Aunque el eje hipotálamo-hipófisis-testículo ha sido tomado como el camino principal de control endocrino, estudios recientes aportan interesantes evidencias sobre la existencia de una interacción intratesticular entre células de Leydig y Sertoli (89). Mediante estudios *in vitro* se demostró que las células de Sertoli son capaces de transformar andrógenos en estrógenos, en ausencia de células de Leydig (52). En ratas, los estrógenos son capaces de inhibir la síntesis de T independientemente de la supresión a nivel hipotalámico-hipofisiario de LH, habiéndose pensado que dicho efecto se realiza por medio de una disminución a nivel de los receptores para LH en células de Leydig, así como la inhibición de los sistemas enzimáticos de la 17- $\alpha$ -hidroxilasa, y la 17-20 desmolasa (58).

Efectos semejantes han podido ser demostrados en pacientes con carcinoma prostático tratados con estrógenos sintéticos (90), donde la concentración de T es suprimida hasta un 20% de los niveles normales pretratamiento, y sin supresión significativa de LH.

Como se puede observar, un posible candidato como regulador entre células de Leydig y Sertoli es el E (91), ya que las células de Leydig de rata han mostrado la posibilidad de poseer un receptor

para estrógenos y ninguno para andrógenos (92). Estos datos sugieren la presencia de un sistema regulador por retroalimentación paracrino intratesticular donde, los andrógenos de las células de Leydig son transformados en estrógenos en las células de Sertoli, regresando por difusión al tejido intersticial, regulando a su vez la función de las células de Leydig.

#### 1.4. Esteroidogénesis testicular.

Se han hecho algunas revisiones en las que se detallan los pasos y correlaciones metabólicas que ocurren durante la biosíntesis de los esteroides testiculares (93-97).

No obstante el conocimiento de que el testículo tiene 2 compartimientos distintos y que ellos están formados por diferentes estirpes celulares, sólo se han realizado algunos estudios referentes a la esteroidogénesis en los compartimientos aislados de animales adultos normales, debido a las dificultades que se presentan durante el aislamiento celular. De cualquier forma, ha quedado establecido que la esteroidogénesis de novo ocurre solamente en la llamada fracción intersticial, con la posibilidad de que el compartimiento tubular modifique los productos de la primera (97).

La esteroidogénesis testicular ha sido amplia y profundamente estudiada en el sentido de encontrar caminos o rutas predominantes que se forman durante la biosíntesis de las hormonas características del órgano, llegándose a tener una gran cantidad de datos acerca de los compuestos intermediarios y sistemas enzimáticos involucrados en sus transformaciones, pero la velocidad de las reacciones enzimáticas in vivo es dependiente de la presencia de los sustratos adecuados, de cofactores y de condiciones intracelulares específicas.

Es en este sentido importante señalar que muchas observaciones del metabolismo esteroidogénico han sido realizadas utilizando compuestos marcados con radioisótopos, estimando la radiactividad en intermediarios y productos finales después de incubar con precursores radiactivos, obteniendo así información sobre las diferentes rutas utilizadas para llegar a los productos finales.

Los datos de incorporación de radiactividad en dichos experimentos dan sólo una impresión de las velocidades de transformación de un sustrato agregado, en el mejor de los casos en condiciones de estado estacionario (steady state) para un sistema enzimático dado e información acerca de la contribución cuantitativa de determinada vía de transformación in vivo, ya que no se puede evaluar el movimiento y transformaciones de los esteroides endógenos no radiactivos.

Muy recientemente se ha manifestado un punto de vista diferente a la evaluación del proceso de la esteroidogénesis (98), el cual

implica que las hormonas esteroideas son biotransformadas en "hormonadas" o unidades de transformación en donde, en forma organizada, se modifica un precursor hasta generar una hormona final, sin que este compuesto o sus intermediarios puedan separarse de la hormonada; como ejemplo se tendría la transformación del sustrato Col a Preg en una hormonada presente en la mitocondria, y no serían liberados los compuestos intermediarios como 20-hidroxicolesterol, 22-hidroxicolesterol o 20,22-dihidroxicolesterol. La hormonada contendría en este caso, las actividades enzimáticas y/o las enzimas que las llevan a cabo. De manera semejante, pueden explicarse las transformaciones de Preg a desoxicorticosterona, de esta a aldosterona, o bien, de Preg a T y de andrógenos a estrógenos.

El significado cuantitativo de la producción de esteroides endógenos sólo podrá ser establecido cuando se conozcan las concentraciones endógenas y el tamaño relativo de las pozas metabólicas de las sustancias intermediarias de las rutas biosintéticas y las modificaciones de estas pozas bajo condiciones fisiológicas y experimentales (97). Bajo estos aspectos, el significado biológico de los esteroides producidos dependerá entonces de muchos factores; algunos serán inherentes a las actividades biológicas conocidas del esteroide en particular, y otros pudieran estar en relación a su papel de intermediario o bien de la cantidad que se acumule de él en un momento dado, o de la velocidad que fuera secretado a los sistemas de transporte (sangre, linfa, líquido seminal), o a la transferencia a otros tipos celulares, o aún, incluso a la combinación de 2 ó más de estas variables.

#### Rutas esteroideogénicas.

El esquema cualitativo de la producción de esteroides precursores e intermediarios, así como de las hormonas en el testículo humano o de otros mamíferos es semejante a los correspondientes a otros tejidos esteroideogénicos como el ovario, las glándulas adrenales y la placenta (99), en los cuales el Col es el precursor obligado, que será transformado intramitocondrialmente en otros esteroides, siguiendo diferentes caminos.

Por ser Preg el primer esteroide, y aparentemente su síntesis muy semejante en todos los órganos esteroideogénicos, resulta importante conocer este primer paso.

#### Transformación de Col a Preg.

Los primeros experimentos con Col y acetato marcados radiactivamente mostraron que el Col es precursor de la esteroideogénesis, y es principalmente sintetizado en el mismo testículo a partir de acetato (100), en lugar de ser obtenido de Col circulante. La biosíntesis testicular del Col ocurre en el retículo endoplásmico de las células del compartimiento intersticial e involucra la existencia de intermediarios "típicos", como lo son el mevalonato (101), escualeno (102) y

lanosterol (103).

No se está seguro aún de que el Col requerido para la esteroidogénesis testicular sea almacenado en el testículo como tal o en su forma de éster sulfato (Col-S). El 95% ó más del Col en el testículo humano se encuentra en forma no esterificada (104), y el Col recién sintetizado se mezcla con esta poza de Col libre (105).

No obstante, algunos autores señalan que la síntesis de T requiere de la hidrólisis de Col-S bajo la influencia de LH; a este respecto, es importante señalar algunas diferencias encontradas entre especies, ya que en el testículo del ratón, del 10 al 40% del Col total se encuentra como Col-S (106,107), mientras que en la rata sólo aparece del 2 al 5% como tal (105). Esto pudiera señalar diferentes rutas preferenciales o diferencias en las velocidades de transformación enzimática.

Los productos de los pasos enzimáticos ocurridos en la remoción de la cadena lateral del Col han podido ser aislados de la fracción mitocondrial de células de Leydig (108), así como también de fracción mitocondrial testicular cruda total (109). Esta actividad está probablemente localizada en la membrana interna de la mitocondria (110,111), requiriendo la forma reducida del monofosfato de nicotinadeninucleótido (NADPH), oxígeno molecular y un sistema de citocromo P450, una flavoproteína y una proteína con hierro no hémico para las reacciones de hidroxilación involucradas en la remoción de la cadena lateral del Col.

Bajo el punto de vista de Lieberman (98), estas moléculas estarían reunidas en una hormona, agregándose las enzimas requeridas para llevar a cabo la transformación. Después de los pasos de hidroxilación del Col, la producción de Preg y aldehído isocaproico se ha establecido en condiciones in vitro (112,113), sobretodo en glándulas adrenales o fracciones mitocondriales de las mismas (114,115), pero la naturaleza exacta de esta transformación en el testículo no es tan clara, ya que se han aislado otros posibles intermediarios, como son 20,22-colesterol y 20,22-epoxicolesterol (116,117).

Se ha propuesto que el paso limitante de la reacción Col a Preg es la velocidad de asociación del Col con el sistema de ruptura dependiente de citocromo P450, el cual está controlado por el metabolismo del calcio intra y extramitocondrial, afectado a su vez por las hormonas hipofisarias (118), aunado a cambios en la estructura misma de las mitocondrias (119).

#### Transformación de Preg a T.

En vista de que es bien conocido que T es el principal producto hormonal de los testículos, este aspecto ha sido ampliamente estudiado por numerosos grupos de investigadores (120-127). Como resultado de sus investigaciones, se dan como establecidos 2

posibles caminos de biotransformación: el llamado camino de los  $\Delta 5$ , que incluye compuestos intermediarios de la serie  $\Delta 5-3\beta$ -hidroxi (Preg, 17-hidroxipregnenolona (17-OHPreg), dehidroepiandrosterona (DHEA), A y T); y el llamado de los  $\Delta 4$ , formado por Preg, Prog, 17-OHPreg, A y T, de los cuales todos menos Preg, tienen estructura  $\Delta 4-3$ -cetona en el anillo A (Figura 1.2).

Se han propuesto una gran cantidad de variantes a estas rutas; entre las que más se mencionan se encuentran la de los esteroides sulfoconjugados, la que sería semejante al camino de los  $\Delta 5$ , pero con los esteroides sulfoesterificados en posición 3 $\beta$  (128,129).

Las rutas planteadas son posibles, al menos cualitativamente, en los testículos de la mayoría de los mamíferos. La prioridad de determinada ruta dependerá de la especie, de la edad, de la estacionalidad reproductiva e incluso de los ritmos circadianos, además de otros factores aún no claramente definidos.

Los estudios en el testículo humano indican que existe una preferencia por el camino de los  $\Delta 5$  en la vida fetal, mientras que la ruta  $\Delta 4$  es preferida en el adulto (130-133), mientras que en la rata se piensa que sólo se utiliza la vía de los  $\Delta 4$  (127). Otros autores han encontrado que en ratas inmaduras se producen más 5-androstandiol y A que T (134); algo semejante se ha mostrado con respecto de la  $\Delta 5$ -hidroxitestosterona (135). En el testículo de cerdo, en cambio, la producción de esteroides  $\Delta 16$  es tan importante como la de la misma T (136-138).

Respecto a la localización de las actividades enzimáticas que transforman la Preg hasta T, se ha encontrado que sólo en el compartimiento intersticial se sintetiza T a partir de Preg, respondiendo además a las cantidades fisiológicas de LH, como ya se ha mencionado anteriormente. Del compartimiento intersticial, sólo las células de Leydig parecen tener actividad esteroidogénica (139), y dentro de esta estirpe celular, la transformación de Preg a T parece ocurrir en el retículo endoplásmico liso (140).

#### 1.5. Modelos in vitro de estudio de la regulación de la esteroidogénesis.

##### 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 aquél 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.

Para obtener a las estirpes celulares con un grado confiable de

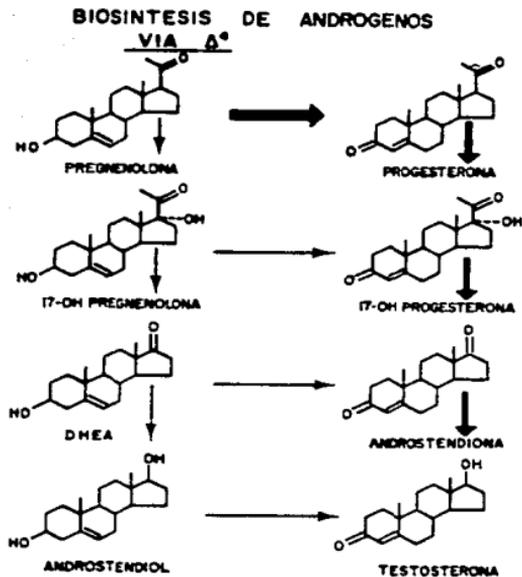


Figura 1.2. Las flechas gruesas indican la vía preferente de transformación para los esteroides en el testículo.

pureza, 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 (141-143).

Para el enriquecimiento de las fracciones celulares se han probado varios métodos, entre los que se encuentran la separación a través de gradientes de Metrizamida, Percoll o Ficoll. Si a estas fracciones se les da un tratamiento por elutriación, se incrementan los porcentajes de pureza y viabilidad celular deseadas (145,146).

Este modelo experimental implica que, además de aislar las estirpes celulares, éstas pudieran mantenerse en condiciones adecuadas para responder a algunas pruebas o retos, pudiendo evaluarse las respuestas celulares durante periodos de hasta 48 horas bajo situaciones funcionales adecuadas.

#### Cultivos primarios.

Los cultivos primarios juegan un papel fundamental en el estudio de la fisiología y morfología celulares. Históricamente, la endocrinología celular se originó a partir de intentos para desarrollar líneas celulares cultivadas, funcionalmente diferenciadas, particularmente derivadas del sistema endocrino (147). Estos estudios han permitido, entre otras cosas, definir y clasificar hormonas, factores de crecimiento y prostaglandinas, así como mensajeros endocrinos definidos.

Después de que una población es aislada, es necesario proporcionarle los medios que optimicen su funcionamiento, los cuales deben incluir un sustrato, ya que la matriz extracelular normal de una estirpe es un componente esencial para su función adecuada (148); también deben contener suplementos adecuados (hormonas, factores de crecimiento, etc.), además de considerar los parámetros de incubación (temperatura, humedad, pH, concentraciones de oxígeno, etc.) óptimos para cada estirpe celular (149). La adición de algunas vitaminas y, en ocasiones, la adición de gonadotropinas, puede ayudar a optimizar las condiciones ideales para los cultivos de estas estirpes celulares.

Hace algunos años, se sugirió 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 poder desarrollar un medio completamente definido, lo que provee múltiples ventajas (150). Los estudios nutricionales o de la acción de drogas o toxinas, así como el de productos celulares, son muy precisos en ausencia de los componentes del suero, que pueden simular, antagonizar, inactivar o actuar sinérgicamente con las sustancias de interés (151).

Además, a los medios libres de suero, se les puede agregar

hormonas o factores requeridos en condiciones de alta pureza y en concentraciones perfectamente definidas, así como algún otro factor que, según el caso, resultase indispensable (152). A su vez, esto ha resultado ventajoso para el establecimiento de líneas celulares poco contaminadas; por lo tanto, resulta muy útil 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.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente, se conoce la existencia de una relación intercompartmental para el funcionamiento del testículo; la T producida por las células de Leydig en el compartimiento intersticial es captada por las células de Sertoli de los túbulos seminíferos, promoviéndose algunas etapas de la espermatogénesis. Algunos grupos de investigación han propuesto la existencia de algún mecanismo de control intratesticular, mediante el cual el funcionamiento de las células de Sertoli del compartimiento tubular, regularía la función principal de las células de Leydig en el compartimiento intersticial, por lo que se propone que las células de Sertoli, al mantenerse en cultivos primarios, poseerán la capacidad de "controlar" las funciones de las células de Leydig, también mantenidas en cultivo primario, de forma semejante a lo que podría estar operando en condiciones in vivo.

### III. OBJETIVOS.

1. Determinar las concentraciones de hormonas esteroides producidas por cultivos primarios de células de Leydig mediante la técnica de radioinmunoanálisis.

2. Evaluar el efecto del medio condicionado de células de Sertoli obtenido a diferentes tiempos y en distintas concentraciones, sobre la producción de hormonas esteroides en cultivos primarios de células de Leydig.

#### IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Se propone que las células de Sertoli de ratas adultas normales mantenidas en cultivo primario producen un "efector" que, liberado al medio de cultivo es capaz de modificar los procesos esteroidogénicos normales de células de Leydig, también mantenidas en cultivo primario, de forma tal que es posible visualizar dicho efecto mediante la cuantificación de la producción hormonal de dichas células.

## V. MATERIALES Y METODOS.

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico, o bien en preparaciones para fines bioquímicos; sólo se señalará la diferencia en caso contrario.

### 5.1. Obtención de fracciones enriquecidas en células de Leydig y células de Sertoli.

Todas las soluciones utilizadas fueron esterilizadas mediante ultrafiltración a través de membranas de filtración Millipore (MF) de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro el día previo a su utilización, para ser debidamente almacenadas en refrigeración.

Los animales de experimentación fueron ratas macho adultos normales, de la cepa Wistar, con peso aproximado de 250 g, correspondientes a aproximadamente 90 días de edad, mantenidos en el bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, con periodos de luz-oscuridad de 12 horas c/u, y alimentación y agua ad libitum.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente se les extirparon los testículos por vía abdominal, previniendo la contaminación bacteriana por las heces. Los testículos son descapsulados y liberados de la vena central bajo condiciones de esterilidad, y posteriormente son llevados a una campana de flujo laminar, donde se continúa con el protocolo de separación.

De acuerdo al esquema planteado en la figura 5.1, los testículos descapsulados fueron lavados con solución salina amortiguada de Krebs (KRBG) - NaCl 125 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1mM, Tris 35 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mM, pH 7.4 - a la que se agregó glucosa al 0.2% y gentamicina al 0.05%. Cada par de testículos se colocó en 7 ml de KRBG-Colagenasa (1 mg/ml) en baño con agitación a 37°C durante 18 minutos; al término de este periodo se suspendió la actividad de la enzima por dilución con 15 ml de solución salina isotónica, mezclando por inversión en 10 ocasiones, y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

La suspensión tisular se filtró a través de una malla estéril de Nylon con un poro de entre 50-100  $\mu\text{m}$  de diámetro. El filtrado (Fracción intersticial cruda) se utilizó posteriormente para la obtención de células de Leydig, mientras que el remanente en la malla (fracción tubular cruda), se trató posteriormente para la obtención de células de Sertoli.

### Purificación de la fracción intersticial cruda.

Las células del filtrado fueron sedimentadas a 1,500 g durante 10 minutos a temperatura de 5°C. Se desechó el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 1 ml de KRBG para ser colocado sobre

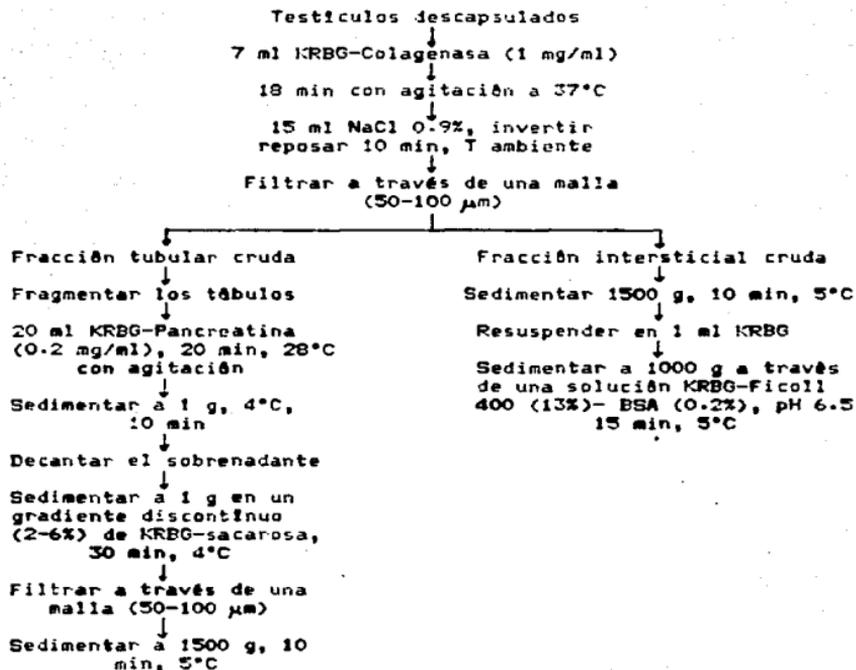


Figura 5.1. Esquema de separación y purificación celular para la obtención de fracciones enriquecidas en células de Leydig y Sertoli.

3 ml de una solución KRBG-Ficoll-Albúmina sérica bovina (Ficoll 400 12%; Albúmina 0.2%, pH 6.5), y centrifugado a 1,000 g durante 15 minutos a 5°C. El segundo sobrenadante se desechó, y el botón celular se resuspendió en 5 ml de medio mínimo esencial de Eagle, modificado por Dulbecco (DME).

En estas condiciones, se realizó el conteo de células, y se ajustó la densidad celular a  $3 \times 10^6$  células/ml en DME, sembrándolas en cámaras multipozos Nunc de plástico, con un volumen de 1.5 ml aproximadamente, por pozo (4 pozos/placa).

#### Purificación de la fracción tubular cruda.

Para obtener la fracción enriquecida en células de Sertoli, a la fracción tubular cruda se le fragmentó con un bisturí hasta obtener pedazos de aproximadamente 5 mm de longitud, los que se incubaron con 20 ml de KRBG-Pancreatina (0.2 mg/ml), durante 20 minutos a 28°C, con agitación manual periódica cada 3 minutos.

La suspensión se dejó sedimentar durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y la suspensión celular se volvió a fragmentar mecánicamente, pasándola a presión a través de una aguja de un calibre 20 ga. Se colocó posteriormente sobre un gradiente discontinuo de KRBG-Sacarosa del 2 al 6%, con intervalos de 1% para cada escalón, y se dejó sedimentar durante 30 minutos a 4°C. Se recuperaron las fracciones correspondientes al 4 y 5% por aspiración, y la suspensión celular se filtró a través de la malla antes descrita, y las células se sedimentaron por centrifugación a 1,500 g durante 2 minutos a 5°C.

El sobrenadante se desechó y el botón celular fue resuspendido en 5 ml de DME, para realizar el conteo celular. Se ajustó la densidad celular a  $3 \times 10^6$  células por ml, y fueron sembradas en botellas de cultivo Nunc de plástico, con 25 cm<sup>2</sup> de superficie y una capacidad de 10 ml de medio de cultivo por botella.

Las células de Leydig y Sertoli obtenidas para cultivo, fueron identificadas con base en su morfología, haciendo énfasis en las características nucleares, y apoyado en microscopía de contraste de fases, además de su capacidad esteroidogénica (153). La viabilidad fue evaluada mediante la prueba de exclusión de azul de tripano (154).

#### 5.2. Cultivos celulares.

Los cultivos celulares se realizaron en DME sin adición de suero, vitaminas, hormonas o cualquier otro factor. Las condiciones de cultivo incluyeron atmósfera aire-CO<sub>2</sub> (95-5%) y 37°C de temperatura. Las células de Sertoli se cultivaron durante periodos de 24, 36 y 48 horas, mientras que las células de Leydig fueron preincubadas durante 24 horas con DME, y al término de este periodo se sustituyó el medio original por medio condicionado de células de Sertoli (medio inicial de cultivo de células de Sertoli), o por DME en los cultivos control. Las

células de Leydig se mantuvieron posteriormente en cultivo durante períodos de 18, 24 y 48 horas.

### S.3. Estandarización del método de radioinmunoanálisis (RIA).

Las determinaciones de los esteroides se realizaron por medio de RIA, utilizando anticuerpos específicos, siguiendo métodos descritos anteriormente (155-157). La fuente de los anticuerpos fueron sueros de conejo, inmunizados con antígenos de los 19-hidroxiderivados de los esteroides, unidos en forma de hapteno a la albúmina sérica bovina, por medio de una molécula de ácido succínico. Los marcadores radiactivos fueron ( $^3\text{H}$ )-7-Preg, actividad específica (AE) 25 Ci/mmol, ( $^3\text{H}$ )-1,2,6,7-Prog, AE=100 Ci/mmol, ( $^3\text{H}$ )-1,2-17OH-Prog, AE=50 Ci/mmol, ( $^3\text{H}$ )-1,2,6,7-A, AE=100 Ci/mmol, y ( $^3\text{H}$ )-1,2,6-T, AE=100 Ci/mmol, todos ellos previamente purificados por cromatografía en capa fina, según se describe a continuación.

Para llevar un control de la pérdida de material durante los procedimientos previos a la determinación cuantitativa, se colocaron en tubos de vidrio cónico con tapón esmerilado de 15 ml de capacidad, 10  $\mu\text{l}$  de solución de cada uno de los esteroides marcados y diluidos hasta tener aproximadamente 1,000 cuentas por minutos (cpm) por 10  $\mu\text{l}$ ; la misma alícuota se agregó a viales de conteo que sirvieron de control. La extracción se realizó al agregar 5 ml de éter dietílico y agitarlo mecánicamente durante 1 minuto. Después de observar que se habían separado las fases orgánica y acuosa, los tubos fueron colocados en un baño de hielo seco-acetona hasta la congelación de la fase acuosa. La fase orgánica se decantó a un tubo de vidrio para centrifuga de fondo cónico, sin tapón, con capacidad de 15 ml. El procedimiento de extracción se repitió una vez más después de comprobar que la fase acuosa remanente se hubiera descongelado, reuniendo las 2 fases orgánicas en el mismo tubo.

Tomando en consideración las cantidades de esteroides a encontrar a las muestras, se eligió un nivel de sensibilidad entre 0 y 1,000 pg, por lo que se prepararon soluciones de cada esteroide no marcado, para ser utilizadas en la formación de las curvas patrón. Una solución madre de concentración de 1 mg/ml se obtuvo pesando 5 mg del esteroide puro, y disolviéndolo en etanol absoluto; la concentración se ajustó espectrofotométricamente, utilizando el coeficiente de extinción molar de cada esteroide a 254 nm, a excepción de Preg, que no contiene la función 4, 3 cetona. De la solución madre se preparó una solución N de concentración 1 ng/ $\mu\text{l}$ , tomando 5  $\mu\text{l}$  y diluyendo hasta 5 ml con etanol absoluto; una solución E de concentración 20 pg/ $\mu\text{l}$ , tomando 100  $\mu\text{l}$  de la solución N y diluyéndolo hasta 5,000  $\mu\text{l}$  con etanol; una solución J de concentración 0.2 pg /  $\mu\text{l}$ , tomando 50  $\mu\text{l}$  de la solución E y diluyendo hasta tener 5 ml con etanol.

La curva patrón para cada esteroide se preparó por quintuplicado, de acuerdo a las siguientes cantidades de masa:

Tubos	Masa (pg)	Volumen ( $\mu$ l)	Solución
5 (T)	-	-	-
1-5	0	-	-
6-10	1	5	J
11-15	2	10	J
16-20	4	20	J
21-25	10	50	J
26-30	20	100	J
31-35	40	2	E
36-40	100	5	E
41-45	200	10	E
46-50	400	20	E
51-55	1,000	50	E
56-60	10,000	10	N

A cada uno de los sueros se les evaluó su capacidad de unión con una concentración de aproximadamente 10,000 desintegraciones por minuto (dpm) del esteroide correspondiente, se diluyó el suero en amortiguador de RIA (fosfatos de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7, con gelatina 0.1% y azida de sodio 0.1%), en proporción desde 1:1,000 hasta 1:500,000 para determinar la dilución óptima para la que se demostrara el 50% de saturación. Quintuplicados de cada dilución fueron incubados durante 18 horas a 4°C, y al final del período de incubación, una vez logrado el equilibrio de la unión del esteroide radiactivo a los sitios correspondientes de los anticuerpos, se agregaron 200  $\mu$ l de una suspensión de carbón activado-Dextrán T-70 (0.625-0.0625 %) para separar la fracción libre de la unida al anticuerpo, sedimentando el carbón por centrifugación a 1,500 g durante 15 minutos a 5°C; el sobrenadante o fracción unida se decantó a viales de conteo, para posteriormente agregarles 5 ml de la solución de centelleo Instagel y evaluar su contenido de radiactividad en un espectrofotómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3390, que en condiciones óptimas para conteo de tritio tenía una eficiencia del 37%.

#### 5.4. Purificación cromatográfica de los esteroides.

El disolvente de las soluciones tanto de los esteroides puros que sirvieron como referencia como de las fases colectadas por procesamiento de los medios de cultivo, fue evaporado, quedando el extracto sobre las paredes de los tubos; dichos extractos fueron resuspendidos y concentrados al lavarse las paredes internas de los tubos, con 10 gotas de una mezcla de metanol al 10% en éter dietílico; el extracto resuspendido se transfirió a la línea de origen de una cromatoplaça (Silica Gel 60, F-254, 0.25 mm de espesor, 20 x 20 cm), marcada a 2 cm de uno de los bordes de la cromatoplaça, en forma tal que la muestra no se

extendiera más de 3 mm a los lados, repitiendo el lavado de tubo y la transferencia de los extractos en 2 ocasiones más con 6 y 4 gotas de la mezcla de solventes antes señalada. Después de aplicadas las muestras, y en lugares preestablecidos de la cromatoplaca, se colocaron 2 µg de cada uno de los esteroides a separar, los que sirvieron como referencia.

Las placas se colocaron en forma vertical en una cámara para cromatografía que contenía aproximadamente 125 ml de benceno puro, se tapó la cámara y se dejó que el disolvente ascendiera por la sílica hasta el borde superior de la cromatoplaca. En el desarrollo de este sistema, los esteroides prácticamente no se mueven, pero el extracto es liberado de lípidos poco polares, tales como ácidos grasos, los cuales fueron desplazados por el benceno.

Al llegar el disolvente al borde superior de la placa, se sacó de la cámara, y después de secarla evaporando el benceno, se colocó en otro sistema con 125 ml de una mezcla de benceno-acetato de etilo (7:3); el desarrollo de este segundo sistema desplaza moléculas más polares, como las de los esteroides, aunque no llega al grado de separar los esteroides a cuantificar, por lo que se somete a la cromatoplaca a un tercer sistema de desarrollo formado por benceno-metanol (95:5). Este último sistema permitió la separación óptima de los 5 esteroides a cuantificar.

La cromatoplaca ya seca se colocó bajo luz ultravioleta de 254 nm de longitud de onda y, utilizando por una parte la fluorescencia de la sílica, el hecho de que los esteroides con función  $\Delta^4$ , 3-cetona absorben a esta longitud de onda, se marcó sobre la sílica la zona de desarrollo de 4 de los esteroides. La Preg se reveló al agregar el reactivo de Oertel (Ácido sulfúrico-etanol 2:1). Se marcaron las zonas de migración correspondientes a cada esteroide, tomando como límites los bordes superior e inferior de los estándares; por paralelismo se marcaron las zonas correspondientes a las muestras, por lo que además se marcaron los límites izquierdo y derecho correspondientes a las zonas de aplicación de cada muestra, formando finalmente una serie de cuadros en la placa, en la que cada área delimitada representó la zona de localización correspondiente a un esteroide de cada muestra.

La sílica de las áreas marcadas se raspa con una navaja para transferirse por aspiración a una pipeta Pasteur previamente empacada con fibra de vidrio. Los esteroides fueron redisoluertos con 1.2 ml de éter etílico-metanol (9:1) en un tubo de ensayo de vidrio. Se tomaron 2 alícuotas de 500 µl cada una, y una de ellas se colocó en otro tubo de ensayo, y la segunda se colocó en un vial de conteo. El disolvente se evaporó a sequedad, y se agregó al vial 5 ml de solución de conteo, evaluando la radiactividad presente, la cual fue considerada como "recuperación" del trazador agregado al inicio (1,000 cpm). La muestra en el tubo se evaluó por medio de RIA.

### 5.5. Cuantificación de los esteroides en los medios de cultivo.

Los medios de cultivo de células de Leydig obtenidos después de la sustitución del medio original por MC o por DME son procesados para la extracción y purificación de los esteroides en forma semejante a la descrita anteriormente.

Se preparó una mezcla de ensayo para cada esteroide purificado, la cual contenía el esteroide marcado en cantidad de 10,000 dpm/500  $\mu$ l de amortiguador RIA, y el suero antiesteroide correspondiente, en proporción de 1:10,000 para Preg, Prog, 17-DHPreg, y de 1:5,000 para A y T en amortiguador RIA, de acuerdo a lo evaluado mediante la técnica ya descrita. Se agregaron 500  $\mu$ l de la mezcla de ensayo en cada tubo de la curva; se incubaron entre 18 y 24 horas a 4°C, y posteriormente se agregaron 200  $\mu$ l de la suspensión carbón-dextrán, excepto para los tubos marcados como totales. La separación de las fases libre y unida se realizó como ya se ha descrito. El sobrenadante se decantó a viales de conteo, y se añadieron 5 ml de Instagel para determinar la cantidad de radiactividad presente en cada vial.

### 5.6. Pruebas estadísticas.

El análisis de los resultados se realizó mediante la comparación de medias y varianzas de los grupos control y experimental; la significancia estadística de las diferencias se obtuvo por medio de la prueba de t de Student con 2 colas, para niveles de  $P < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS.

### 6.1. Obtención de fracciones enriquecidas en células de Leydig y Sertoli.

El procedimiento de obtención de fracciones enriquecidas permitió separar adecuadamente los componentes de los compartimientos tubular e intersticial. En el caso de la fracción intersticial fue posible, partiendo de una composición inicial de aproximadamente 6% de células de Leydig (fracción intersticial cruda), obtener una preparación final con el  $50 \pm 7\%$  de pureza y de un 90% de viabilidad (Tabla 6.1). La principal fuente de contaminación en este caso correspondió a espermatoцитos primarios y espermatogonios, sin presencia apreciable de espermatozoides, y algunas espermátides que son retenidas durante la centrifugación a través del Ficoll.

En lo que corresponde a la fracción enriquecida en células de Sertoli, el factor de purificación fue de 10x. La utilización de distintos procedimientos suplementarios, tales como la centrifugación a través de soluciones de Ficoll de diferentes densidades, no logró un enriquecimiento sustancial en cuanto a pureza, pero sí una disminución notable de la viabilidad celular final.

TABLA 6.1

CELULAS DE LEYDIG Y SERTOLI EN PREPARACIONES FINALES OBTENIDAS DE TESTICULO DE RATA ADULTA.

	% PUREZA	% VIABILIDAD
Fracción de células de Leydig purificadas a través de Ficoll	$50 \pm 7$	$90 \pm 3$
Fracción de células de Sertoli sedimentadas a través de un gradiente de sacarosa	$7 \pm 3$	$92 \pm 2$

### 6.2. Cultivo celular.

Al observar los cultivos celulares después de las primeras 24 horas, se encontraron células refringentes, unidas al fondo de los recipientes de cultivo, lo que indicó adecuada tonicidad y adherencia celulares. Sólo en los cultivos de células de Bertoli se observaron grupos de células no adheridas, en aquellos se acumularon en los que existían muchas células de la línea germinal.

De los cultivos de células de Bertoli se obtuvieron los medios condicionados a las 24, 36 y 48 horas de incubación. De los cultivos de las células de Leydig fueron obtenidas muestras de las 24 horas de preincubación y las correspondientes a los tratamientos con los MC; también fueron obtenidas muestras de los diversos tiempos de estudio en los que se cambió el medio de cultivo simulando dilución al infinito de un MC.

Las muestras fueron obtenidas por aspiración con una pipeta, por lo que se colectó entre 1.1 y 1.3 ml de medio en cada ocasión.

### 6.3. Determinaciones de esteroides en las medias de cultivo.

Los valores obtenidos para cada esteroide a los diferentes tiempos de incubación y diversas diluciones de los MC se observan en las tablas 6.2 a 6.6, y los resultados se expresan gráficamente en las figuras 6.1 a 6.5.

Para el caso de Preg, se observa un incremento en la producción del esteroide con respecto al control, para todos las diluciones de MC y casi para todos los tiempos de incubación (Tabla 6.2 y Figura 6.1). El efecto parece ser dosis dependiente, y se observó más claramente con MC de 36 horas, y a una dilución 1:2 del MC.

En el caso de Prog, el patrón general es el mismo que en el caso anterior, aunque las diferencias entre puntos experimentales y controles ya no se detectan a la dilución 1:10 del MC (Tabla 6.3 y Figura 6.2). A diferencia del caso anterior, existe un cambio de pendiente en la producción del esteroide entre las 18 y las 24 horas de incubación de las células de Leydig.

En lo que toca a 17-OHPreg (Tabla 6.4 y Figura 6.3), no es posible apreciar diferencias significativas entre los controles y los puntos experimentales; sin embargo, existe una tendencia semejante a la observada para los esteroides anteriores.

La producción de A es la más variable de todas las observadas en este modelo experimental (Tabla 6.5 y Figura 6.4). En el caso de los controles, se observa un incremento en la producción hormonal durante las primeras 18 horas de cultivo, seguido de un descenso (24 horas) y un nuevo incremento hacia el final de la incubación. A diferencia de los casos anteriores, se observa una tendencia hacia una disminución significativa de la producción hormonal

TABLA 6.2. Concentración de Pregnenolona ( pg/ml ) en los medios de cultivo de células de Leydig.

Tiempo de Cultivo	GRUPO CONTROL	GRUPO EXPERIMENTAL								
		Medios condicionados 24 hs Dilución			Medios condicionados 36 hs Dilución			Medios condicionados 48 hs Dilución		
		1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10
18 hs	90.20 ± 22.1	150.25 ± 13.0	133.00 ± 11.2	96.75 ± 15.6	28.35 ± 28.3	202.50 ± 32.3	151.25 ± 8.8	202.50 ± 18.5	190.00 ± 16.8	124.25 ± 13.1
24 hs	139.00 ± 21.0	201.25 ± 13.8	191.25 ± 16.5	169.25 ± 10.9	363.75 ± 34.9	242.50 ± 22.2	190.00 ± 28.3	256.25 ± 7.5	223.75 ± 23.6	191.25 ± 19.3
48 hs	208.60 ± 56.0	285.60 ± 26.4	284.60 ± 12.9	191.75 ± 16.8	423.75 ± 30.4	341.25 ± 27.1	274.50 ± 41.8	299.75 ± 29.0	275.25 ± 23.8	252.00 ± 47.8

**PREGNENOLONA**  
**DILUCION DEL MEDIO CONDICIONADO**

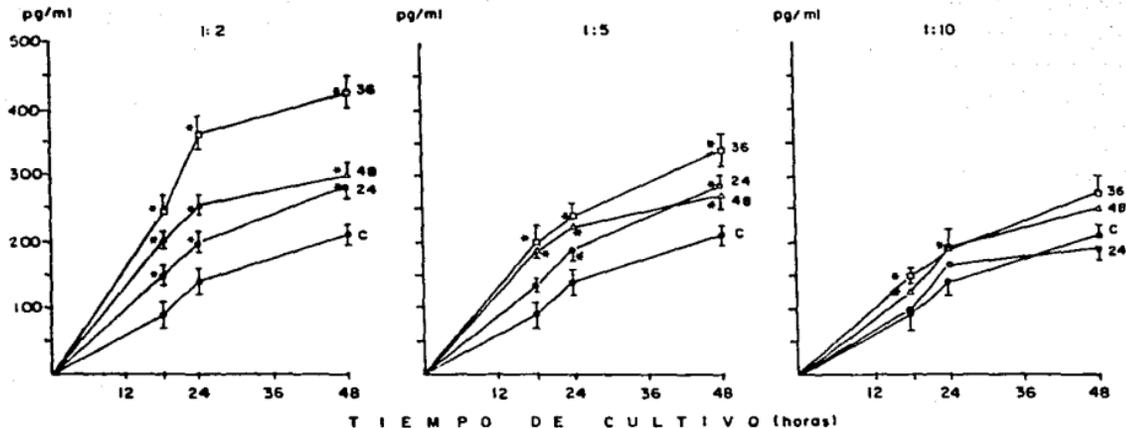


Figura 6.1. Concentración de Pregnenolona en medios de cultivo de células de Leydig tratadas con diferentes diluciones de medios condicionados en células de Sertoli. (\*  $p < 0.05$ )

TABLA 6.3. Concentración de Progesterona ( pg/ml ) en los medios de cultivo de células de Leydig.

Tiempo de Cultivo	GRUPO CONTROL	GRUPO EXPERIMENTAL								
		Medios condicionados 24 hs			Medios condicionados 36 hs			Medios condicionados 48 hs		
		Dilución			Dilución			Dilución		
	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10	
18 hs	42.50 ± 9.9	77.50 ± 10.3	70.50 ± 13.4	51.50 ± 8.8	115.10 ± 7.1	91.00 ± 9.5	55.00 ± 5.2	96.00 ± 8.9	81.50 ± 10.1	58.00 ± 10.0
24 hs	145.00 ± 39.0	166.75 ± 9.5	171.00 ± 16.8	144.00 ± 9.4	213.75 ± 8.5	180.00 ± 17.6	141.00 ± 19.1	191.00 ± 5.2	177.75 ± 13.0	141.25 ± 15.5
48 hs	293.75 ± 15.2	293.75 ± 15.2	253.00 ± 46.8	206.25 ± 17.9	440.00 ± 63.2	373.00 ± 16.9	246.50 ± 55.4	390.00 ± 14.1	278.50 ± 14.8	218.00 ± 26.6

## PROGESTERONA

### DILUCION DEL MEDIO CONDICIONADO

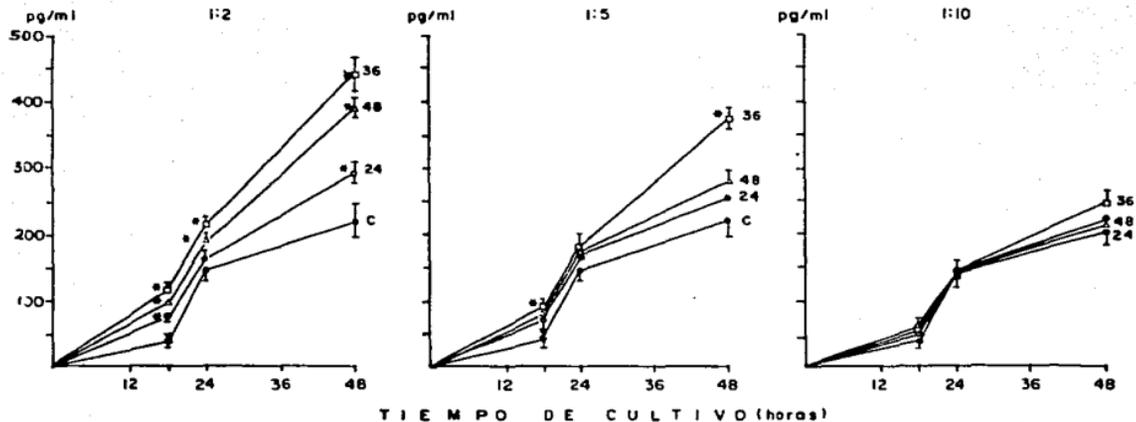


Figura 6.2. Concentración de Progesterona en medios de cultivo de células de Leydig tratadas con diferentes diluciones de medios condicionados en células de Sertoli. (\*  $p < 0.05$ )

TABLA 6.4. Concentración de 17OH-Progesterona ( pg/ml ) en los medios de cultivo de células de Leydig.

Tiempo de Cultivo	GRUPO CONTROL	GRUPO EXPERIMENTAL								
		Medios condicionados 24 hs Dilución			Medios condicionados 36 hs Dilución			Medios condicionados 48 hs Dilución		
		1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10
18 hs	39.01 ± 17.0	39.75 ± 4.8	39.75 ± 7.5	39.75 ± 6.9	89.25 ± 4.3	50.25 ± 2.9	49.25 ± 4.0	68.25 ± 6.4	46.50 ± 13.4	36.75 ± 1.7
24 hs	53.02 ± 15.3	66.00 ± 6.9	54.50 ± 6.9	43.75 ± 5.6	86.75 ± 9.0	77.25 ± 6.3	66.25 ± 4.1	67.00 ± 4.3	63.00 ± 5.2	49.25 ± 4.6
48 hs	65.00 ± 34.0	77.50 ± 4.4	62.50 ± 6.1	71.24 ± 5.6	103.25 ± 11.4	86.75 ± 19.0	87.00 ± 9.1	90.50 ± 5.2	82.60 ± 6.8	70.75 ± 9.0

# 17-HIDROXIPROGESTERONA

## DILUCION DEL MEDIO CONDICIONADO

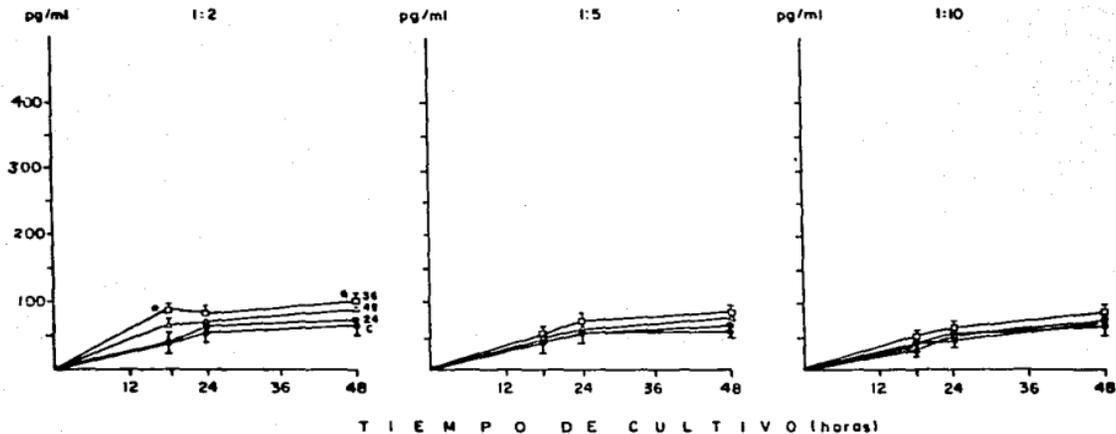


Figura 6.3. Concentración de 17OH-Progesterona en medios de cultivo de células de Leydig tratadas con diferentes diluciones de medios condicionados en células de Sertoli. (\*  $p < 0.05$ )

TABLA 6.5. Concentración de Androstendiona ( pg/ml ) en los medios de cultivo de células de Leydig.

Tiempo de Cultivo	GRUPO CONTROL	GRUPO EXPERIMENTAL								
		Medios condicionados 24 hs Dilución			Medios condicionados 36 hs Dilución			Medios condicionados 48 hs Dilución		
		1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10
18 hs	246.00 ± 26.0	174.75 ± 10.2	191.50 ± 10.9	255.75 ± 31.6	98.50 ± 11.2	144.50 ± 6.2	217.50 ± 6.4	107.25 ± 8.8	146.00 ± 13.7	224.25 ± 15.9
24 hs	126.01 ± 11.1	160.00 ± 10.7	140.50 ± 9.3	112.25 ± 3.2	161.25 ± 7.1	132.75 ± 10.5	120.25 ± 9.3	175.00 ± 7.1	136.00 ± 4.5	118.50 ± 6.8
48 hs	835.02 ± 164	144.75 ± 10.2	139.25 ± 8.8	117.01 ± 13.1	142.00 ± 3.5	128.01 ± 2.4	124.00 ± 9.7	117.25 ± 3.1	115.50 ± 4.2	116.00 ± 2.9

## ANDROSTENDIONA

### DILUCION DEL MEDIO CONDICIONADO

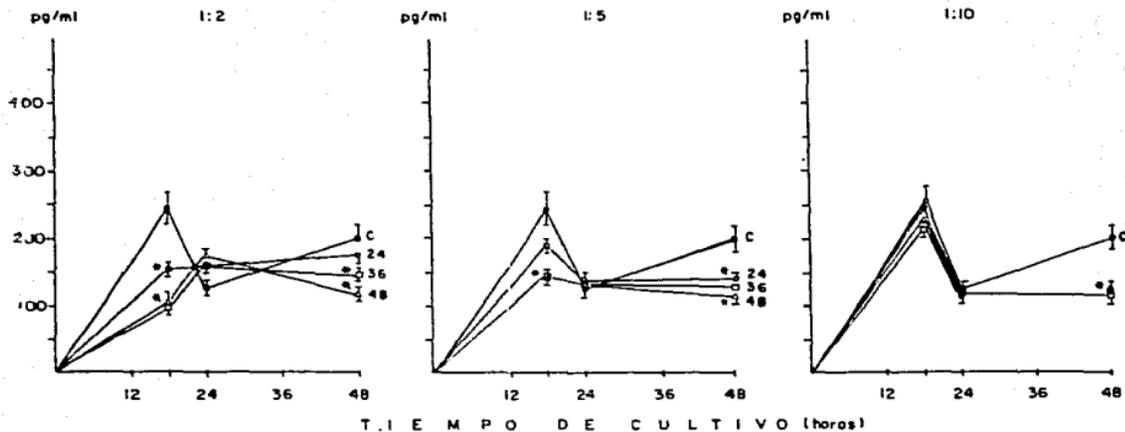


Figura 6.4. Concentración de Androstendiona en medios de cultivo de células de Leydig tratadas con diferentes diluciones de medios condicionados en células de Sertoli. (\*  $p < 0.05$ )

TABLA 6.6. Concentración de Testosterona ( pg/ml ) en los medios de cultivo de células de Leydig.

Tiempo de Cultivo	GRUPO CONTROL	GRUPO EXPERIMENTAL								
		Medios condicionados 24 hs Dilución			Medios condicionados 36 hs Dilución			Medios condicionados 48 hs Dilución		
		1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 2	1 : 5	1 : 10
18 hs	1,508 ± 150	1,143 ± 55	1,381 ± 48	1,607 ± 66	613 ± 82	1,098 ± 124	1,222 ± 102	742 ± 154	1,235 ± 187	1,175 ± 94
24 hs	2,751 ± 212	1,691 ± 135	2,156 ± 131	2,704 ± 109	1,026 ± 54	1,736 ± 127	2,226 ± 148	1,349 ± 115	1,365 ± 160	1,184 ± 30
48 hs	4,210 ± 191	2,433 ± 209	3,148 ± 215	3,809 ± 263	1,607 ± 142	2,209 ± 82	3,202 ± 349	1,927 ± 114	1,847 ± 93	3,005 ± 103

## TESTOSTERONA

### DILUCION DEL MEDIO CONDICIONADO

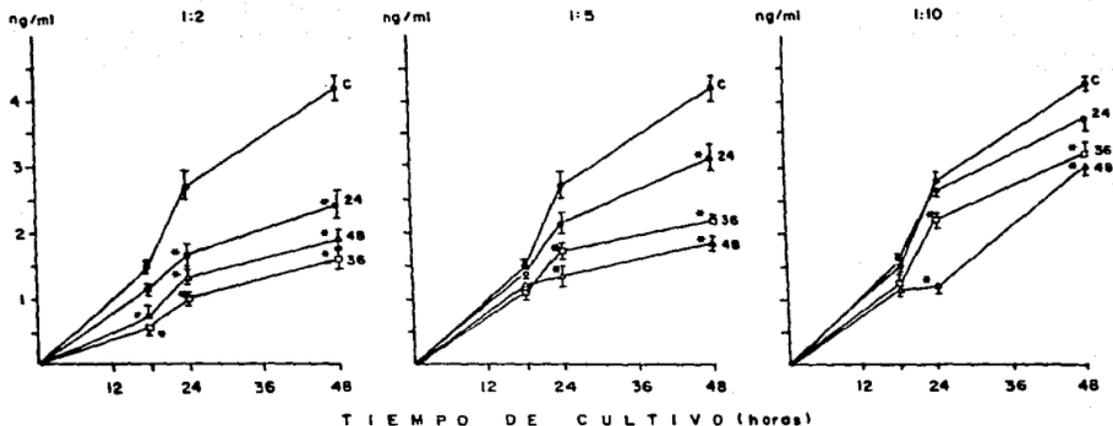


Figura 6.5. Concentración de Testosterona en medios de cultivo de células de Leydig tratadas con diferentes diluciones de medios condicionados en células de Sertoli. (\* p < 0.05 )

hacia el final de la incubación, aunque esta tendencia ya es apreciable desde las 18 horas de cultivo.

El producto final de la vía esteroidogénica, T, se mantiene como el esteroide producido en mayor cantidad durante todo el período de cultivo celular (cantidades máximas de 4 µg/ml, en comparación con menos de 500 pg/ml de Preg), lo que refleja probablemente el buen estado funcional general de las células de Leydig en el cultivo primario.

Continuando la tendencia ya señalada para A, en el caso de T, la producción hormonal disminuye significativamente a todas las diluciones de MC prácticamente desde las 18 horas del cultivo (Tabla 6.6 y Figura 6.5). El efecto máximo de los MC se observa para MC de 36 horas a diluciones bajas, y para MC de 48 horas a diluciones de 1:5 y 1:10.

Las variaciones intra e intersayo no fueron superiores al 5 y 10% respectivamente para todas las mediciones de esteroides. Los anticuerpos utilizados no presentan afinidad superior al 2% para otros esteroides contra los que no se encuentran originalmente dirigidos. Las dosis mínimas detectadas para los esteroides van desde 0.5 pg/ml hasta 2 pg/ml, y las condiciones de precisión y exactitud de los ensayos están de acuerdo con datos reportados anteriormente (156,157).

## VII.- DISCUSION DE RESULTADOS.

La obtención de fracciones enriquecidas en las estirpes celulares de Leydig y Sertoli reproduce los datos obtenidos anteriormente (153), y además están de acuerdo con los señalados para las células de Leydig por otros autores (142), mientras que para las células de Sertoli, aunque el enriquecimiento no es comparable a los datos reportados por otros autores (141,158), se debe tener en consideración que, en este caso, partimos de testículos de animales normales y sexualmente maduros, lo que implica la existencia de una mayor cantidad de células de la línea germinal presentes en los túbulos seminíferos, y además, del formal establecimiento de la barrera hemato-testicular. Ambos factores dificultan la obtención de un factor de enriquecimiento celular mayor.

Respecto de los cultivos celulares, se puede indicar que el estado morfológico fue muy adecuado, ya que no se observaron muchas células no adheridas, lo que sugiere una adecuada adhesividad celular (154), ni vacuolización o birrefringencia notorias durante los periodos de incubación utilizados en los experimentos.

En relación al funcionamiento de las células de Leydig, se observa que no se suspende la producción esteroidogénica, ya que existe un incremento en el tamaño de las pozas de Preg, Prog y 17-OHProg; además, se puede indicar que al evaluar la función endocrina durante la preincubación de 24 horas, y en los tiempos de cultivo subsecuentes, se encontró una producción de T en niveles semejantes a los antes reportados (142-144), así como también al expresar la concentración en términos de producción por número de células (159).

Al evaluar el funcionamiento esteroidogénico de las células de Sertoli se obtuvieron resultados que coinciden con los reportados por otros autores (141).

La utilización de los medios de cultivo se realizó en condiciones basales, sin utilizar ningún tipo de estímulo o complemento para el medio (suero, factores de enriquecimiento, etc.), lo que no coincide con lo realizado por otros autores (149,152). Sin embargo, esto no parece afectar el funcionamiento celular, en la medida que la producción esteroidogénica se mantiene durante todo el periodo de incubación.

Todo lo anterior hace pensar que las muestras de medios de cultivo obtenidas al retar a los cultivos primarios de células de Leydig con los MC en células de Sertoli representaron condiciones basales "normales" con respecto a las que se esperaría encontrar en sistemas de cultivo equivalentes (160).

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de los esteroides se expresaron en gráficas de masa (ver Resultados), y

en vista de que se expresan en diferentes unidades, y para homogeneizar los resultados, se pueden transformar a gráficas de porcentajes de cambio respecto del control para cada tiempo de cultivo (Figuras 7.1 a 7.5). Al observar los coeficientes de variación correspondientes, se encontró que no excedieron del 15%. En las gráficas se pueden también observar los límites correspondientes a  $\pm 2$  desviaciones estándar (DE), lo que implica que los valores encontrados fuera de la zona de 30% de variación, son estadísticamente significativas.

Para poder hacer el análisis de los resultados obtenidos se supone que:

- a) A mayor dilución de los MC se obtendrá un menor efecto, y
- b) A mayor tiempo de condicionamiento, el efecto será mayor.

Con base en estos supuestos, se encontró lo siguiente para cada esteroide:

#### Prog.

Se puede observar (Figura 7.1) que existe un aumento significativo de su producción en las diluciones 1:2 y 1:5 con los MC de 24, 36 y 48 horas; en la dilución 1:10, sólo es significativo el incremento en el MC de 36 horas; asimismo, se observa que el mayor efecto se encuentra con la dilución 1:2 y el MC de 36 horas.

#### Prog.

En la figura 7.2 se observa que en la dilución 1:2 existe un incremento significativo con todos los MC, excepto en el correspondiente a 24 horas de condicionamiento y a las 24 horas de cultivo. En la dilución 1:5 se observa que sólo a las 18 horas de cultivo existe significancia en la diferencia entre el control y los MC, no ocurriendo de igual manera a las 24 y 48 horas de cultivo. En la dilución 1:10 no existe un efecto significativo en ningún caso.

#### 17-OHProg.

En la figura 7.3 se observa que en la dilución 1:2 existe una diferencia significativa para los MC de 36 y 48 horas, excepto para las 24 horas de cultivo del MC de 48 horas. En la dilución 1:5 existe significancia sólo en el MC de 36 horas, y a las 24 y 48 horas de cultivo. La dilución 1:10 no presenta diferencias significativas.

#### A.

En la figura 7.4 se observa que existe una disminución significativa a las 18 horas de cultivo con los 3 MC, y sólo en el MC de 36 horas existe un incremento a las 24 horas, y una disminución también significativa a las 48 horas de cultivo. En la dilución 1:5 sólo los MC de 36 y 48 horas son

significativamente menores a las 18 y 48 horas de cultivo. En la dilución 1:10 con los MC de 36 y 48 horas se presenta una disminución sólo a las 48 horas de cultivo.

### I.

La figura 7.5 muestra que existe un efecto de disminución significativo con los 3 MC para la dilución 1:2, excepto a las 18 horas de cultivo con el MC de 24 horas. En la dilución 1:5, sólo los medios de 36 y 48 horas producen una disminución de la producción de T a las 24 y 48 horas; para la dilución 1:10 no existe efecto significativo alguno.

Como se ha observado, existe una relación inversa entre la magnitud del efecto y la dilución del MC; asimismo, se ha observado que no siempre va a existir un mayor efecto como respuesta a un mayor tiempo de condicionamiento. El efecto más claro se obtiene con la dilución 1:2 con el MC de 36 horas, para la mayoría de los esteroides.

Podemos suponer que, in vivo, las pozas metabólicas de los esteroides mantienen un tamaño constante, debido a la estabilidad de las condiciones fisiológicas en el órgano (oxígeno, estimulación, etc.), con lo que la actividad de las enzimas que intervienen en la formación de los esteroides permanecerá en un estado de equilibrio dinámico. Las condiciones de las células in vitro serían diferentes debido a los cambios producidos al manejar las células, lo que probablemente afecte el tamaño de las pozas metabólicas de los esteroides.

Los resultados obtenidos in vitro muestran que en el grupo control, las pozas metabólicas de Preg y Prog tienen un tamaño semejante, en tanto que la de 17-OHProg es más pequeña comparada con las anteriores, y la de A es aproximadamente 2 veces mayor comparada con Preg y Prog, mientras que la de T es varias veces mayor. Al comparar los grupos experimentales con el grupo control, se observa que al aumentar el tiempo de cultivo, Preg y Prog aumentan en la misma proporción, 17-OHProg se mantiene prácticamente igual, en tanto que la de A presenta fluctuaciones y T disminuye.

De lo anterior se puede deducir que existe un efecto global que modifica el tamaño de las pozas metabólicas de los esteroides; la causa de este efecto puede deberse a la alteración de uno o varios sistemas enzimáticos.

Si suponemos que esta alteración provoca un bloqueo en la transformación de A a T, entonces se observaría que las pozas metabólicas de A y de los esteroides anteriores de la vía metabólica aumentarían. Este supuesto se asemeja a los resultados obtenidos. Sin embargo, se observa una "fluctuación" en la poza metabólica de A con respecto al tiempo de cultivo, en la cual se aprecia una disminución a las 18 horas, aumento a las 24 y nuevamente una disminución a las 48 horas de cultivo, mientras

# PREGNENOLONA

## DILUCION DEL MEDIO CONDICIONADO

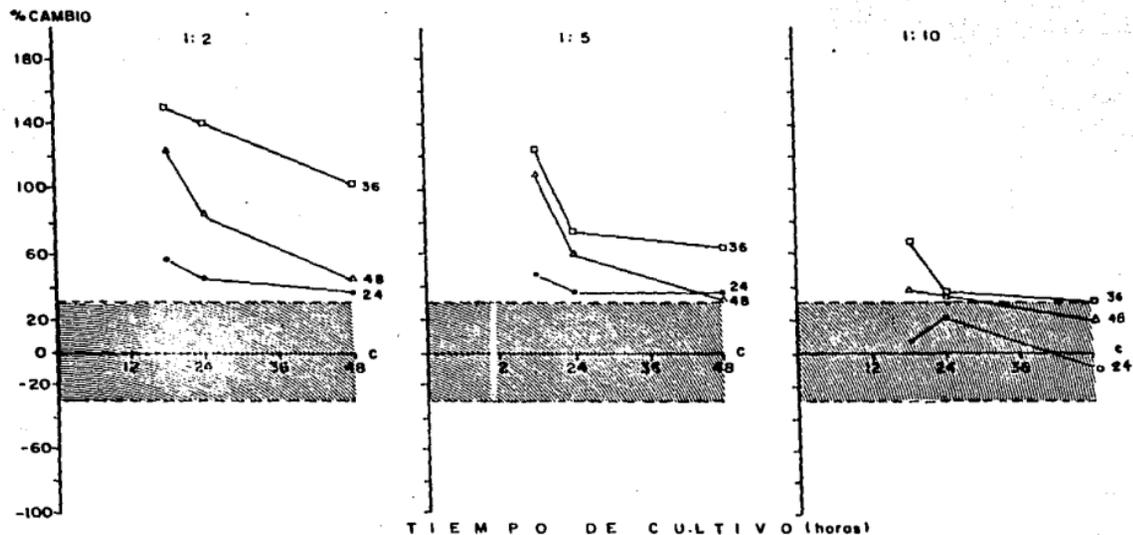


Figura 7.1. Porcentaje de cambio respecto de los controles en la concentración de Pregnenolona. El Área sombreada representa  $\pm 2$  desviaciones estándar de la media del grupo control.

# PROGESTERONA

## DILUCION DEL MEDIO CONDICIONADO

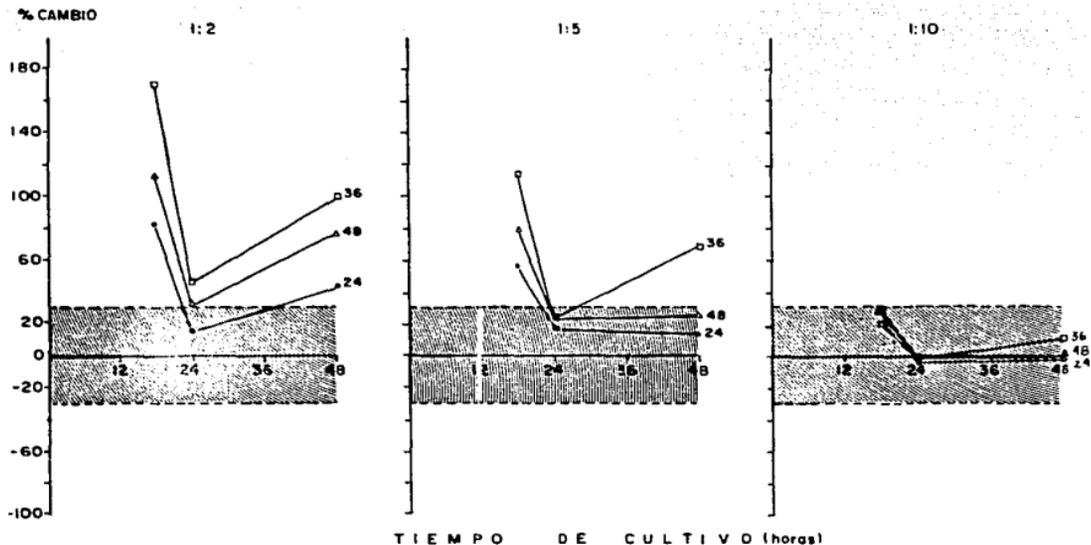


Figura 7.2. Porcentaje de cambio respecto de los controles en la concentración de Progesterona. El área sombreada representa  $\pm 2$  desviaciones estándar de la media del grupo control.

17-OH-PROGESTERONA  
DILUCION DEL MEDIO CONDICIONADO

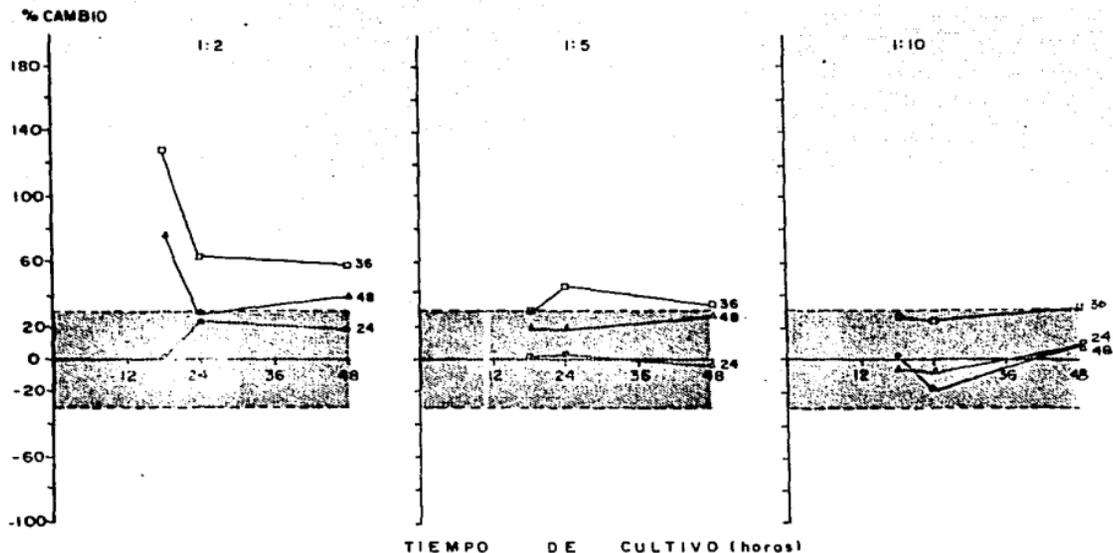


Figura 7.3. Porcentaje de cambio respecto de los controles en la concentración de 17OH-Progesterona. El área sombreada representa  $\pm 2$  desviaciones estándar de la media del grupo control.

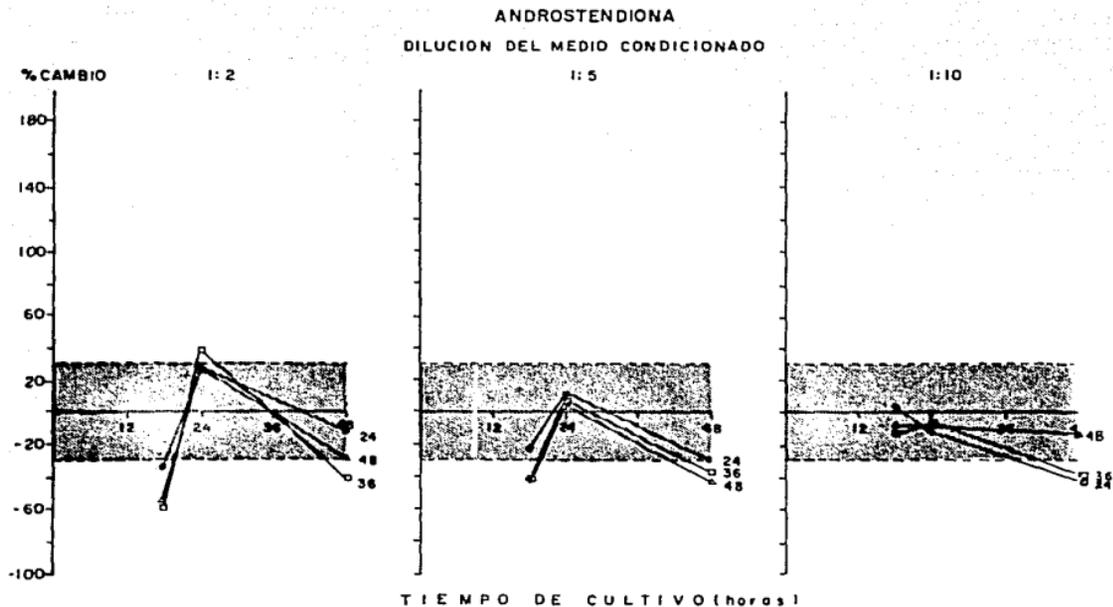


Figura 7.4. Porcentaje de cambio respecto de los controles en la concentración de Androstendiona. El área sombreada representa + 2 desviaciones estándar de la media del grupo control.

## TESTOSTERONA

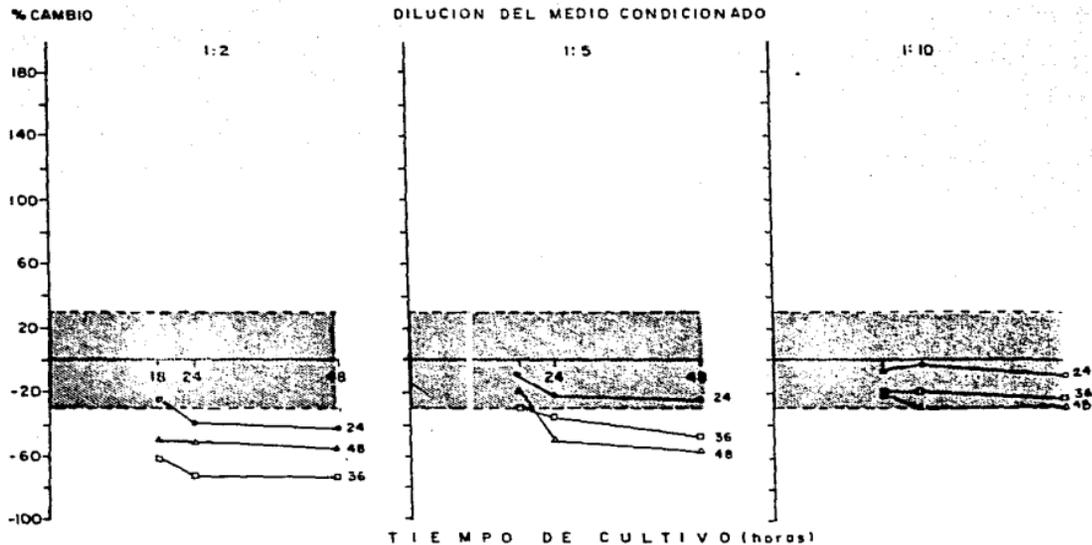


Figura 7.5. Porcentaje de cambio respecto de los controles en la concentración de Testosterona. El área sombreada representa  $\pm 2$  desviaciones estándar de la media del grupo control.

que en las otras pozas existe un aumento, y la T disminuye. Lo anterior haría suponer que el efector causante de la variación expresa su actividad durante las primeras 24 horas de cultivo, y va perdiéndola durante las siguientes 24, de forma que la producción de esteroides termina volviéndose semejante a la del control.

Es posible que la razón de que las pozas de Preg, Prog y 17-OHProg aumenten, se deba a que las enzimas que intervienen en la transformación de Preg a Prog y de prog a 17-OHProg se encuentran funcionando a su plena capacidad, en tanto que el sistema enzimático de 17-OHProg a A tenga una rápida transformación, por lo que la poza de 17-OHProg sería muy pequeña. Si existiera una modificación en el sistema de transformación de A a T, esto explicaría la fluctuación que se da en la poza metabólica de A.

Como la mayoría de los sistemas enzimáticos que intervienen en la esteroidogénesis es oxidante, se podría creer que se verían afectados debido a una falta de oxígeno en el medio, resultado de las condiciones de cultivo; sin embargo, parece que estos sistemas no se ven alterados, ya que como se puede observar en la producción de los controles y en los datos experimentales, la reacción modificada parece ser una reducción (A a T).

Para comprobar lo anterior, es necesario realizar estudios del funcionamiento de la cadena respiratoria u otros que involucren reacciones de óxido-reducción, en los cuales se pueda medir la cantidad de oxígeno gastado y/o la producción de ATP.

Otros estudios complementarios a realizar serían el de cuantificar la producción esteroidogénica a las 12 y 36 horas de cultivo, con la finalidad de obtener resultados a intervalos iguales de tiempo durante todo el estudio, realizar estudios acerca de la enzima involucrada directamente en la transformación de A a T, así como el de corroborar lo obtenido por otros autores, quienes han reportado que a intervalos cortos de tiempo (un máximo de 5 horas), la concentración o producción de T aumenta (161,162), lo cual no está necesariamente en contradicción con nuestros resultados, ya que no definimos el comportamiento de nuestro sistema a tiempos cortos de incubación.

#### VIII. CONCLUSIONES.

1. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en células de Leydig y Sertoli en condiciones adecuadas de pureza y 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 al menos 48 horas en estas condiciones.
3. Se obtuvieron los MC en células de Sertoli a tiempos diferentes y se probó su efecto sobre la esteroidogénesis en células de Leydig, determinando las concentraciones de cada uno de los esteroides intermediarios de la vía biosintética en sus medios de cultivo.
4. Se establecieron las condiciones óptimas para la determinación de cada uno de los esteroides en los medios de cultivo, utilizando procedimientos de RIA específicos.
5. Se demostró la existencia de un efecto causado por los MC de las células de Sertoli, que provoca un incremento en las pozas de Preg, Prog y 17-OHPreg, variación en la poza de A y disminución en la de T.
6. Se demostró que el efecto de los MC es dosis-dependiente.
7. Se encontró un efecto más significativo para el MC de 36 horas y en dilución 1:2, excepto para la poza de T, en la cual la dilución óptima fue 1:5.
8. Se demostró la existencia de un patrón en el cual se observa que el efecto se presenta más claramente durante las primeras 24 horas de cultivo en presencia del MC, y parece ir desapareciendo durante las 24 horas siguientes.
9. Se encontró que el sistema enzimático alterado parece ser el que transforma A en T (17 hidroxisteroide deshidrogenasa).
10. Se encontró que es necesario ampliar los estudios para determinar el lugar preciso y el mecanismo de acción de este efecto.

IX. BIBLIOGRAFIA.

1. Pritchard, J.B. (ed). Ancient Near Eastern Texts. Princeton University Press, Princeton, USA, 1955.
2. Spencer, R.F. The cultural aspects of eunuchism, in: Ciba Symposium 8 (7): 406, 1946.
3. Majiro, G. The healing hand- Man and Wound in the Ancient World, Harvard University Press, Cambridge, USA, 1975.
4. Melicow, M.M. & Pulrang, S. Castrati choir and Opera singers. Urology 3: 663, 1974.
5. Heriot, C. The castrati in Opera. Secker & Warburg, London, 1956.
6. Schönberg, H.C. The lives of the great composers. W.W. Norton & Co, NY, USA, 1970.
7. Steinach, E. Sex and life: Forty years of Biological and Medical Experiments. Viking Press, NY, USA, 1940.
8. Aristoteles. Historia Animalum, in: The Works of Aristotle, Vol. IV, Clarendon Press, Oxford, 1910.
9. DeGraff, R. On the Reproductive Organs. J Reprod Fertil Suppl 17, 1972.
10. Bodemer, C. The microscope in early embryological investigations. Gynecol Invest 4: 188, 1973.
11. Berthold, A.A. Transplantation der Hoden. Arch Anat Physiol Wiss Med 16: 42, 1849.
12. Brown-Séquard, C.E. Experience démontrant la puissance dynamogénique chez l'homme d'un liquide extrait de testicules du animal. Arch Phys Nom Pathol 21: 651, 1889.
13. Rhodin, J.A.G. Histology. A Text and Atlas. Oxford University Press, NY, USA, 1974.
14. Clermont, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. Amer J Anat 112: 35, 1963.
15. Clermont, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev 52: 196, 1972.
16. Clermont, Y. Renewal of spermatogonia in man. Amer J Anat 118: 509, 1966.

17. Clermont, Y & Bustos-Obregón, E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Amer J Anat* 122: 122, 1968.
18. Huckins, C. Cell cycle properties of differentiating spermatogonia in adult Sprague Dawley rats. *Cell Tissue Kinet* 4: 139, 1971.
19. Huckins, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. II. A radioautographic analysis of their cell cycle properties. *Cell Tissue Kinet* 4: 313, 1971.
20. Huckins, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. III. Evidence for a long-cycling population. *Cell Tissue Kinet* 4: 335, 1971.
21. Wettstein, R. & Sotelo, J.R. Electron microscopic serial reconstruction of the spermatocyte I nuclei at pachytene. *J Microsc* 6: 557, 1967.
22. André, J. Contribution a la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurelles pendant la spermatogénèse. *J Ultrastruct Res Suppl* 3: 1, 1962.
23. Heller, C.G. & Clermont, Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res* 20: 545, 1964.
24. DeKretser, D.M. Ultrastructural features of human spermiogenesis. *Z Zellforsch* 98: 477, 1969.
25. Fawcett, D.W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: Hamilton, D.W. & Greep, R.O. (eds) *Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology, Vol. VI: Male Reproductive System*. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1975.
26. Nagano, T. Some observations on the fine structure of the Sertoli cell in the human testis. *Z Zellforsch* 73: 89, 1966.
27. Schulze, C. On the morphology of the human Sertoli cell. *Cell Tissue Res* 153: 339, 1974.
28. Fawcett, D.W., Leak, L.V. & Heidger, P.M. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fertil Suppl* 10: 105, 1970.
29. Dym, M. & Fawcett, D.W. The blood-testis barrier in the rat on the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3: 308, 1970.
30. Gilula, N.B., Fawcett, D.W. & Aoki, A. The Sertoli occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Biol Reprod* 9: 500, 1976.
31. Nagano, T. & Suzuki, F. Freeze-fracture observations of the

intercellular junctions of Sertoli and Leydig cells in the human testis. *Cell Tissue Res* 166: 37, 1976.

32. McGinley, D., Posalaky, Z. & Porvanknik, M. Intercellular junctional complexes of the rat seminiferous tubules. A freeze-fracture study. *Anat Rec* 189: 211, 1977.

33. Connell, C.J. A freeze-fracture and lanthanum tracer study of the complex junction between Sertoli cells of the canine testis. *J Cell Biol* 76: 57, 1978.

34. Clermont, Y. Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Exp Cell Res* 15: 438, 1958.

35. Lacy, D. & Rotblat, J. Study of normal and irradiated boundary tissue of the seminiferous tubules of the rat. *Exp Cell Res* 21: 49, 1960.

36. Ross, M.H. & Long, I.R. Contractile cells in human seminiferous tubules. *Science* 153: 1271, 1966.

37. DeKretser, D.M., Kerr, J.B. & Paulsen, C.A. The peritubular tissue in the normal and pathological human testis: An ultrastructural study. *Biol Reprod* 12: 317, 1975.

38. DeMenezes, A.P. Elastic tissue in the limiting membrane of the human seminiferous tubule. *Amer J Anat* 150: 349, 1977.

39. Ham, A.W. *Histology*. J.B. Lippincott, Philadelphia, USA, 1974.

40. Fawcett, D.W. & Burgos, M.H. Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Amer J Anat* 107: 245, 1960.

41. Nagano, T. & Ohtzuki, I. Reinvestigation of the fine structure of Reinke's crystals in the human testicular interstitial cell. *J Cell Biol* 51: 148, 1971.

42. Schual, A.R., Gabilove, J.L. & Churg, J. Ultrastructure of Leydig cells paracrystalline inclusions, possibly related to Reinke crystals in the normal human testis. *Z Zellforsch* 142: 13, 1973.

43. Christensen, A.K. Leydig cells. In: Hamilton, D.W. & Greep, R.O. (eds) *Handbook of Physiology*. Section 7. Endocrinology, Vol V: Male Reproductive System. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1975.

44. Catt, K.J., Tsuruhara, T., Mendelson, C., Ketelslegers, J.M. & Dufau, M.L. Gonadotrophin binding and activation of the interstitial cell of the testis. In: Dufau, M.L. & Means, A. R. (eds) *Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis*, Plenum Press, NY, USA, 1974.

45. Tsuruhara, T., Dufau, M., Cigorruga, S. & Catt, K.J. Hormonal regulation of testicular luteinizing hormone receptors. Effects on cyclic AMP and testosterone responses in isolated Leydig cells. *J Biol Chem* 252: 9002, 1977.
46. Dufau, M., Tsuruhara, T., Horner, K.-A., Podestà, E.-J. & Catt, K.J. Intermediate role of adenosine cycle monophosphate and protein kinase during gonadotrophin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 74: 3419, 1977.
47. Hafiez, A.A., Philpott, J.E. & Bartke, A. The role of prolactin in the regulation of testicular function: The effect of prolactin and luteinizing hormone on 3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testes of mice and rats. *J Endocrinol* 50: 619, 1971.
48. Hafiez, A.A., Bartke, A. & Lloyd, C.W. The role of prolactin in the regulation of testis function: The synergistic effects of prolactin and LH on the incorporation of C14-acetate into testosterone and cholesterol by testis from hypophysectomized rats in vitro. *J Endocrinol* 53: 223, 1972.
49. Hall, P.F., Irby, D.C. & DeKretser, D.M. Conversion of cholesterol to androgens by rat testis. Comparison of interstitial cells and seminiferous tubules. *Endocrinology* 84: 488, 1967.
50. Hansson, V.M., Ritzén, E.M., French, F.S. & Nayfeh, S.N. Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. In: Hamilton, D.W. & Greep, R.O. (eds) *Handbook of Physiology, Section 7. Endocrinology. Vol V: Male Reproductive System.* Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1975.
51. Chopra, I.J., Tikhinsky, D. & Greenway, F.L. Estrogen-androgen imbalance in hepatic cirrhosis. *Ann Intern Med* 79: 195, 1973.
52. Dorrington, J.H. & Armstrong, D.T. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol 17- $\beta$  synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 2677, 1975.
53. Johnson, B.H. & Ewing, L.L. Follicle-stimulating hormone and the regulation of testosterone secretion in rabbit testis. *Science* 73: 635, 1971.
54. Odell, W.D., Swerdloff, R.S., Jacobs, H.S. & Hescow, M.A. FSH induction of sensitivity to LH: One cause of sexual maturation in the male rat. *Endocrinology* 92: 160, 1973.
55. Sherings, R.J., Winters, S.J. & Wachslicht, H. Studies on the role of hCG and low dose of FSH in initiating spermatogenesis in hypogonadotropic men. *Proceedings of 59th Meeting of the American*

- Endocrine Society, Abstract 312, 1977.
56. Besser, G.M. & Thurner, M.D. Prolactin and gonadal function. *Pathol Biol (Paris)* 23: 779, 1975.
57. Bartke, A. Pituitary-testis relationships: Role of prolactin in the regulation of testicular function. *Int Hubinst, P.O. 1 Hermite, M.L.* (eds) *Progress in Reproductive Biology- Sperm Action, Vol 1.* AG Karger, Basel, 1976.
58. Dufau, M., Hsueh, A.-J., Cigorruga, S., Backal, A.-J. & Catt, K.-J. Inhibition of Leydig cell function through hormonal regulatory mechanism. *Int J Androl Suppl* 2: 193, 1978.
59. Rubin, R.-T., Poland, R., Sobel, I., Towin, B. & Odell, W. Effects of prolactin and prolactin plus luteinizing hormone on plasma testosterone levels in normal adult men. *J Clin Endocrinol Metab* 47: 447, 1978.
60. Paniagua, F., Arreola, F., Herrera, J., Pérez, A., Diaz, S., Mondragón, L., Sereno, O., Villalpando, S., Enaire, E. & Bermúdez, J.-A. Zinc, prolactin, gonadotropin and androgens levels in uremic men. *Arch Androl* 8: 271, 1982.
61. Bermúdez, J.-A., Paniagua, F., Arreola, F., Herrera, J., Pérez, A., Diaz, S., Mondragón, L., Villalpando, S. & Enaire, E. Endocrine profile in patients with chronic renal failure under zinc replacement. *Arch Androl* 9: 167, 1982.
62. Enaire, E., Paniagua, F., Arreola, F., Herrera, J., Pérez, A., Diaz, S., Mondragón, L., Gómez-Orta, P., Villalpando, S. & Bermúdez, J.-A. Testicular function in men with chronic renal failure and transplant recipients under bromocriptine therapy. *Arch Androl* 9: 183, 1982.
63. Means, A.-R., Fakunding, J.-L., Huckins, C., Tindall, D.-J. & Vitale, R. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell and spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 32: 477, 1976.
64. Means, A.-R., Dedman, J.-R., Tindall, D.-J. & Welsh, M.-J. Hormonal regulation of Sertoli cell. *Int J Androl Suppl* 2: 403, 1978.
65. Lacroix, M., Smith, F.-E. & Fritz, I.-B. Secretion of plasminogen activator: L Sertoli cell-enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol* 9: 227, 1977.
66. Krueger, P.-M., Hodgen, G.-D. & Sherins, R.-J. New evidence for the role of the Sertoli cell and spermatogenesis in feedback control of FSH secretion in male rats. *Endocrinology* 95: 955, 1974.
67. Thanki, K.-N. & Steinberger, A. Effect of age and hypophysectomy on FSH binding by rat testis. *Andrologia* 9: 307, 1977.

68. Vigersky, R.A., Loriaux, D.L., Howards, S.S., Hodgen, G.D., Lipsett, M.B. & Chrambach, A. Androgen binding proteins of testis, epididymis and plasma in man and monkey. *J Clin Invest* 58: 1061, 1976.
69. Hsu, A-F. & Troen, P. An androgen binding protein in the testicular cytosol of human testis. *J Clin Invest* 61: 1611, 1978.
70. DiZerega, G.S. & Sherins, R.J. Endocrine control of adult testicular function. In: Burger, H. & DeKretser, D. (eds) *The Testis*. Raven Press, NY, 1981.
71. Armstrong, D.T., Moon, Y.S., Fritz, I.B. & Dorrington, J.H. Synthesis of estradiol 17 $\beta$  by Sertoli cells in culture. Stimulation of FSH and dibutyryl cyclic AMP. In: French, F.S. (ed) *Hormonal Regulation of Spermatogenesis*. Plenum Press, NY, 1975.
72. Steinberger, E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Rev* 51: 1, 1971.
73. Elkington, J.S.H. & Blackshaw, A.W. Studies on testicular function. Quantitative effects of FSH, Lh, testosterone and dihydrotestosterone on restoration and maintenance of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Aust J Biol Sci* 27: 47, 1974.
74. Burger, H.G., Franchimont, P., DeKretser, D.M. & Hudson, E. Gonadotropins in spermatogenesis control. In: Crosignani, P.G. & James, V.H.T. (eds) *Recent Progress in Reproductive Endocrinology*. Academic Press, NY, 1975.
75. Steinberger, E., Root, A., Fischer, M. & Smith, K.D. The role of androgens in the initiation of spermatogenesis in the rat. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 746, 1973.
76. MacLeod, J. The effect of urinary gonadotropin following hypophysectomy and in hypogonadotropic eunuchoidism. In: Rosenberg, E. & Paulsen, C.A. (eds) *The Human Testis*. Plenum Press, NY, 1970.
77. Sherins, R.J. & Loriaux, D.L. Studies on the role of sex steroids in the feedback control of FSH concentration in men. *J Clin Endocrinol Metab* 36: 886, 1973.
78. Stewart-Bently, M., Odell, W. & Horton, R. The feedback control of luteinizing hormone in normal adult men. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 545, 1974.
79. Kalra, S. & Kalra, P. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrine Rev.* 4: 311, 1983.
80. Franchimont, P., Chari, S. & Demoulin, A. Hypothalamus-

- Pituitary-Testis interaction. *J Reprod Fert* 44: 335, 1975.
81. Longcope, C., Kato, T. & Horton, R. Conversion of blood androgen to estrogens in normal men and women. *J Clin Invest* 48: 2191, 1969.
82. Swerdloff, R.S. & Walsh, P.C. Testosterone and estradiol suppression of LH and FSH in adult male rats. Duration of castration, duration of treatment and combined treatment. *Acta Endocrinol* 73: 11, 1973.
83. Santén, R.J. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of LH secretion in men? *J Clin Invest* 56: 1555, 1975.
84. Winters, S.J., Janik, J., Loriaux, D.L. & Sherins, R.J. Studies on the role of sex steroids in the feedback control of gonadotropin concentrations in men: Use of estrogens antagonist clomiphene citrate. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 222, 1979.
85. McCullagh, D.R. Dual endocrine activity of the testis. *Science* 79: 19, 1932.
86. Schwartz, N.B. & Channing, C.P. Evidence of ovarian "inhibin": Suppression of the secondary rise by injection of porcine follicular fluid. *Proc Nat Acad Sci USA* 74: 5721, 1975.
87. Steinberger, A. & Steinberger, E. Secretion of an FSH inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 99: 912, 1976.
88. Steinberger, E. & Chowdhury, M. Control of pituitary FSH in male rats. *Acta Endocrinol* 76: 235, 1974.
89. Aoki, A. & Fawcett, D.W. Is there a local feedback from the seminiferous tubules affecting activity of Leydig cells? *Biol Reprod* 19: 144, 1978.
90. Baker, H.W.G., Burger, H.C., Dekretser, D.M., Hudson, B. & Straffon, W.G. Effects of synthetic oral estrogens in normal men and patients with prostatic carcinoma. Lack of gonadotropin suppression with chlorotrienesine. *Clin Endocrinol* 2: 297, 1973.
91. Hsueh, A.-J., Dufau, M. & Catt, K.-J. Inhibitory effects of estrogen on Leydig cell function: Studies of FSH treated hypophysectomized rat. *Endocrinology* 103: 1069, 1978.
92. Mulder, E., Van Beurden-Lameijs, W.M.D., DeBoer, W., Brinkmann, A.O. & Van der Moelen, H.J. Testicular estradiol receptors in the rat. In: Dufau, M.-L. & Means, A.-R. (eds) *Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis*. Plenum Press, NY, 1974.
93. Eik-Nes, K.B. The androgens of the testis. Marcel Dekker, NY, 1970.

94. Ewing, L.L. & Brown, B.L. Testicular steroidogenesis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R. & Vandemark, N.L. (eds) *The Testis*, Vol. IV, Academic Press, NY, 1977.
95. Hall, P.F. Endocrinology of the testis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R. & Vandemark, N.L. (eds) *The Testis*, Vol. II, Academic Press, NY, 1970.
96. Wilson, J.D. Metabolism of testicular androgens. In: Greep, R.O. & Astwood, E.B. (eds) *Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology, Vol. V: Male Reproductive System*. American Physiological Society, Washington, 1975.
97. Van der Molen, H.J. & Rommerts, F.F.G. Testicular steroidogenesis. In: Burger, H. & DeKretser, D.M. (eds) *The Testes. Comprehensive Endocrinology Series*, Raven Press, NY, 1981.
98. Lieberman, S., Greenfield, N.J. & Wolfson, A. A heuristic proposal for understanding steroidogenic processes. *Endocrine Rev* 5: 122, 1984.
99. Williams, R.H. *Endocrinology. A Textbook*, 5th ed, W.B. Saunders, Philadelphia, 1974.
100. Morris, M.D. & Chaikoff, I.L. The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland and testis of the rat. Dietary versus endogenous contributions. *J Biol Chem* 234: 1095, 1959.
101. Tsai, S-C., Ying, B.P. & Gaylor, J. Testicular sterols. I. Incorporation of mevalonate and acetate into sterols by testicular tissue from rats. *Arch Biochem Biophys* 105: 329, 1964.
102. Salokangas, R-A., Rilling, H.C. & Samuels, L-T. Terpene metabolism in the rat testis. I. The conversion of isopentenylpyrophosphate to squalene and sterols. *Biochemistry* 3: 833, 1964.
103. Dennick, R.G. The intracellular organization of cholesterol biosynthesis. A Review. *Steroids Lip Res* 3: 236, 1972.
104. Pearman, P.L. The functional significance of the testis cholesterol in the rat: Effects of hypophysectomy and cryptorchidism. Histochemical observations on testes following hypophysectomy and experimental cryptorchidism. *Endocrinology* 46: 341, 1950.
105. Van der Molen, H.J., Bijleveld, M.J., Van der Vusse, G.J. & Cooke, B-A. Effects of gonadotrophins on cholesterol and cholesterol esters as precursors of steroid production in the testis. *J Endocrinol* 57: vi, 1972.

106. Bartke, A. Concentration of free and sterified cholesterol in the testes of immature and adult mice. *J Reprod Fert* 25: 153, 1971.
107. Pokel, J.D., Moyle, W.P. & Greep, R.O. Depletion of esterified cholesterol in mouse testis and Leydig cell tumors by lutenizing hormone. *Endocrinology* 91: 325, 1972.
108. Van der Vusse, G.J., Kalkman, M.L. & Van der Molen, H.J. Endogenous production of steroids by subcellular fractions from total rat testis, and from isolated interstitial tissue and seminiferous tubules. *Biochim Biophys Acta* 297: 179, 1973.
109. Toren, D., Menon, K.M., Forchielli, E. & Dorfman, R.I. In vitro enzymatic cleavage of the cholesterol side chain in rat testis preparation. *Steroids* 3: 381, 1963.
110. Moyle, W.R., Jungas, R.L. & Greep, R.O. Metabolism of free and esterified cholesterol by Leydig cell tumour mitochondria. *Biochem J* 134: 415, 1973.
111. Van der Vusse, G.J., Kalkman, M.L. & Van der Molen, H.J. Endogenous steroid production in cellular and subcellular fractions of rat testis after prolonged treatment with gonadotropins. *Biochim Biophys Acta* 360: 404, 1975.
112. Menon, K.M.J., Drosowsky, M., Dorfman, R.I. & Forchielli, E. Side-chain cleavage of cholesterol 26-<sup>14</sup>C and 20-hydroxycholesterol 22-<sup>14</sup>C by rat testis mitochondrial preparations and the effect of gonadotropin administration and hypophysectomy. *Steroids Suppl* 1: 95, 1965.
113. Drosowsky, M., Menon, K.M.J., Forchielli, E. & Dorfman, R.I. Requirements of the cholesterol side-chain cleavage enzyme system of rat testis mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 104: 229, 1965.
114. Burstein, S. & Gut, M. Biosynthesis of pregnenolone. *Recent Prog Horm Res* 27: 303, 1971.
115. Burstein, S. & Gut, M. Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone: Kinetics and mechanism. *Steroids* 28: 115, 1976.
116. Kraaiipoel, R.J., Degenhart, H.J. & Leferink, J.G. Incorporation of H<sub>2</sub><sup>18</sup>O into 20-, 22P-di-OH-cholesterol: Evidence for an apoxide-diol pathway in the adrenocortical cholesterol side-chain cleavage mechanism. *FEBS Lett* 57: 294, 1975.
117. Kraaiipoel, R.J., Degenhart, H.J., Leferink, J.G., Van Beek, V., Deleau-Simon, H. & Visser, H.K.A. Pregnenolone formation from cholesterol in bovine adrenal cortex mitochondria: Proposal of a new mechanism. *FEBS Lett* 58: 204, 1975.

118. Mason, J.I., Estabrook, R.W. & Purvis, J.L. Testicular cytochrome P-450 an iron-sulfur protein as related to steroid metabolism. *Ann NY Acad Sci* 212: 406, 1973.
119. Koritz, S.B. & Kumar, A.M. On the mechanism of action of the adrenocorticotropic hormone. *J Biol Chem* 245: 152, 1970.
120. Ikonen, M. & Niemi, J. Metabolism of progesterone and 17 - hydroxypregnenolone by the human testis in vitro. *Nature* 212: 716, 1966.
121. Hoscholan, J.C. & Brownie, A.C. Pathways for androgen biosynthesis in monkey testis. *Steroids* 19: 19, 1967.
122. Bell, J.R.G., Vinson, G.P., Hopkin, D.J. & Lacy, D. Pathways of androgen biosynthesis from (7-<sup>3</sup>H) pregnenolone and (4-<sup>14</sup>C) progesterone by rat testis interstitium in vitro. *Biochim Biophys Acta* 164: 420, 1968.
123. Bedrak, E. & Samuels, L.T. Steroid biosynthesis by the equine testis. *Endocrinology* 85: 1186, 1969.
124. Dufau, M.L., Dekretser, D.M. & Hudson, B. Steroid metabolism by isolated rat seminiferous tubules in tissue culture. *Endocrinology* 89: 825, 1971.
125. Van Der Molen, H.J. & Eik-Nes, K.R. Biosynthesis and secretion of steroids by the canine testis. *Biochim Biophys Acta* 248: 343, 1971.
126. Podestà, E.J. & Rivarola, M.A. Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development. *Endocrinology* 95: 455, 1974.
127. Samuels, L.T., Bussman, L., Matsumoto, K. & Huseby, R.A. Organization of androgen biosynthesis in the testis. *J Steroid Biochem* 6: 291, 1975.
128. Payne, A.H. & Jaffe, R.B. Comparative roles of dehydroepiandrosterone sulfate and androstenediol sulfate as precursors of testicular androgens. *Endocrinology* 97: 316, 1970.
129. Laatikainen, T., Laitinen, E.A. & Viikio, R. Secretion of free and sulphate-conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 32: 59, 1971.
130. Acevedo, H.F., Axelrod, L.R., Ishikawa, E. & Takaki, F. Studies in fetal metabolism. II. Metabolism of progesterone-4- (<sup>14</sup>C) and pregnenolone-7- (<sup>3</sup>H) in human fetal testes. *J Clin Endocrinol Metab* 33: 885, 1963.
131. Mathur, R.S., Wiqvist, N. & Diczfalusy, E. De novo synthesis

of steroids and steroid sulphates by the testis of the human foetus at midgestation. *Acta Endocrinol* 71: 792, 1972.

132. Yaraihara, T. & Tisén, P. Studies of human testis. I. Biosynthetic pathways for androgens formation in human testicular tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 34: 783, 1972.

133. Huhtaniemi, I. Studies on steroidogenesis and its regulation in human fetal adrenal and testis. *J Steroid Biochem* 8: 491, 1977.

134. Mizutani, S., Tsujimura, T., Akashi, S. & Matsumoto, K. Lack of metabolism of progesterone, testosterone, and pregnenolone to 5 $\alpha$  products in monkey and human testes compared with rodent testes. *J Clin Endocrinol Metab* 44: 1023, 1977.

135. Lacroix, E., Eechaute, W. & Leusen, I. Influence of age on the formation of 5 $\alpha$ androstenediol and 7 $\alpha$ hydroxytestosterone by incubated rat testes. *Steroids* 25: 649, 1975.

136. Gower, D.B. & Ahmad, N. Studies on biosynthesis of 16 dehydrosteroids. The metabolism of (4-<sup>14</sup>C) pregnenolone by boar adrenal and testis tissue in vitro. *Biochem J* 104: 550, 1967.

137. Ruokonen, A. & Vihko, R. Steroid metabolism in testes tissue. Concentrations of unconjugated and sulfated neutral steroids in boar testis. *J Steroid Biochem* 5: 33, 1974.

138. Booth, W.D. Changes with age in the occurrence of C-19 steroids in the testis and submaxillary gland of the boar. *J Reprod Fert* 42: 459, 1975.

139. Cooke, B.A., De Jong, F.H., Van der Molen, H.J. & Rommerts, F.F.G. Endogenous testosterone concentrations in rat interstitial tissue and seminiferous tubules during in vitro incubation. *Nature (New Biol)* 237: 255, 1972.

140. Miller, W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Rev* 9: 295, 1988.

141. Welsh, M.J. & Wiebe, J.F. Rat Sertoli cells. A rapid method for obtaining viable cells. *Endocrinology* 96: 618, 1975.

142. Janszen, F.H.A., Cooke, B.A., Van Driel, M.J.A. & Van der Molen, H.J. Purification and characterization of Leydig cells from rat testes. *J Endocrinol* 70: 345, 1976.

143. Conn, P.M., Tsuruhara, I., Dufau, M. & Catt, K.J. Isolation of highly purified Leydig cells by density gradient of centrifugation. *Endocrinology* 101: 639, 1977.

144. Browning, J.Y., D'Agata, R. & Grotjan, H.E. Isolation of purified rat Leydig cells using continuous Percoll gradients. *Endocrinology* 109: 667, 1981.

145. Aquilano, R.D. & Dufau, M.L. Studies on Leydig cell purification. *Ann NY Acad Sci* 483: 237, 1984.
146. Bordy, M. & Shaper, J.H. Trophic influence of luteinizing hormone on steroidogenesis by Percoll-separated rat Leydig cells in culture. *Ann NY Acad Sci* 483: 329, 1984.
147. Orly, J., Sato, G. & Erickson, G. Serum suppresses the expression of hormonally induced functions in cultured granulosa cells. *Cell* 20: 817, 1980.
148. Suárez-Ovian, C.A., Hadley, M.A. & Dym, M. Effect of substrate on the shape of Sertoli cell in vitro. *Ann NY Acad Sci* 483: 417, 1984.
149. Mather, J.P. & Phillips, D.M. Primary cultures of testicular somatic cells. In: Barnes, D.W. & Sato, G.H. (eds) *Methods for Serum Free Cultures of Cells of the Endocrine System*. Alan R. Liss, NY, 1984.
150. Mather, J.P., Zhuang, L.-Z., Pérez-Infante, V. & Phillips, D.M. Culture of testicular cells in hormone supplemented serum-free medium. *Ann NY Acad Sci* 383: 44, 1982.
151. Barnes, D., McKeehan, W. & Sato, G.H. Cellular endocrinology: Integrated physiology in vitro. *In Vitro* 23: 659, 1987.
152. Mather, J.P. & Sato, G.H. The use of hormone-supplemented serum free media in primary cultures. *Exp Cell Res* 124: 215, 1979.
153. Bermúdez, J.A., Mendieta, E. & Herrera, J. Evaluación de los métodos de aislamiento y purificación de células de Leydig y Sertoli. *Arch Inv Méd* 19: 291, 1988.
154. Kruse, P.F. & Patterson, M.K. *Tissue Cultures, Methods and Applications*. Academic Press, NY, 1973.
155. Bermúdez, J.A., León, C. & Herrera, J. Fundamento y estudio comparativo de dos métodos de análisis por saturación. *Rev Méd IMSS* 12: 11, 1973.
156. Lac-Denisot, D., León, C., Herrera, J., González-Bárcena, D. & Bermúdez, J.A. Métodos de análisis por saturación para cuantificar cortisol y testosterona. *Arch Inv Méd* 4: 7, 1973.
157. Herrera, J., Morán, L., Raudales, L., León, C. & Bermúdez, J.A. Radioinmunoanálisis de pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y sus formas sulfocnjugadas. *Arch Inv Méd* 5: 617, 1974.
158. Dorrington, J.H., Fritz, I.B. & Armstrong, D.I. Testicular

estrogen synthesis by isolated Sertoli cells and regulation of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. In: Spillman, C.H. (ed) Regulatory Mechanism of Male Reproductive Physiology. Excerpta Medica, Amsterdam, 1976.

159. Steinberger, A.E. & Wayne, C.E. Mammalian testis in organ culture. *Exp Cell Res* 36: 19, 1964.

160. Herrera, J., Hernández, H., Bermúdez, J.A. & Mendieta, E. Evaluación funcional de las células de Sertoli aisladas y preparadas para cultivos primarios. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad mexicana de Nutrición y Endocrinología, Guanajuato, Gto, 9-12 de noviembre de 1983.

161. Jarecki, A., Jakubowiak, A. & Lukaszuk, A. Stimulatory effect of Sertoli cell secretory products on testosterone secretion by purified Leydig cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 42: 227, 1985.

162. Sharpe, R.M. & Cooper, I. Intratesticular secretion of a factor(s) with major stimulatory effects on Leydig cell testosterone secretion in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 37: 159, 1984.