

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

# REGULACION HORMONAL DE LA PRODUCCION DE ANDROGENOS POR LA CELULA DE LEYDIG.

*Autor:* DANIEL R. AQUILANO

*Licenciado en Ciencias Bioquimicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.*

*Directores:* HUGO E. SCAGLIA  
HELVIO GALDEANO

Nº 856

Trabajo de Tesis presentado para optar por el titulo de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

ANO 1990



DONACION *autor* .....

A .....

Fecha *8-IV-91* .....

Inv. E. *73221* ..... INV. .... B. *53661* .....


-A mi esposa, incondicional compañera, quien con su apoyo me alento para llevar a cabo este Proyecto.

-A mis hijos, de quienes fueron muchas de las horas que dedique a este Trabajo.

RECONOCIMIENTOS

-Al Dr. Hugo E. Scaglia, Director del Centro de Referencia de Radioinmunoensayo, quien me despertó el interés por la Endocrinología, con quien tengo el orgullo de trabajar, de quien sigo aprendiendo diariamente, y de quien tengo el privilegio de ser Amigo.

-A la Dra. Maria L. Dufau, Jefa del Laboratorio de Endocrinología Molecular del National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), National Institutes of Health (NIH), EEUU, quien me inició y orientó en el estudio de la función y regulación hormonal de la célula de Leydig, y con quien tuve la fortuna de trabajar.

A G R A D E C I M I E N T O S

-Al Dr. Hugo E. Scaglia, quien con su inagotable creatividad discutió y enriqueció este Trabajo.

-Al Dr. Helvio Galdeano, Profesor de la Cátedra de Bioquímica Patológica de la Facultad de Ciencias Exactas, de quien tengo el Honor de haber sido alumno, por aceptar ser Co-Director de mi Trabajo de Tesis.

-A la Dra. María L. Dufau, con quien realice algunas de las experiencias presentadas.

-Al Centro de Referencia de Radioinmunoensayo-Centro de Especialistas en Análisis Biológicos Distrito I, quien cedió sus instalaciones y parte del material utilizado para la realización del Trabajo.

-A la Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, quien subsidio parte de este Trabajo.

-Al Laboratorio de Endocrinología Molecular, Endocrinology and Reproduction Research Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health (NIH) de EEUU, quien subsidio parte de este Trabajo.

-Al Prof. Dr. Eloy Mandrile, quien con inmensa amabilidad, predisposicion y desinterés colaboro para que esta Tesis pudiera ser presentada.

-A los Dres. Chon-Hwa Tsai-Morris, Masa-Aki Hattori y Kaoru Nozu del Laboratorio de Endocrinologia Molecular del NIH quienes colaboraron en algunos de los trabajos realizados en roedores.

-A las Dras. Cecilia Zylbersztein, Miriam Colombani y Virginia Mariani del Centro de Referencia de Radioinmunoensayo quienes realizaron los radioinmunoensayos de LH, FSH, Prolactina y Estradiol.

-A los Dres. Carlos Carrere, Eduardo Kelly, Gaston Rey-Valzacchi y Guillermo Antonioli, medicos andrologos del Hospital de Clinicas Gral. San Martin de Buenos Aires, quienes aportaron los pacientes estudiados.

-A las Dras. Mirta Jazan, Lidia Arevalo y Gloria Turin, bioquimicas del Centro de Estudios Urologicos, Sexologicos y Andrologicos (CEUSA) de Buenos Aires, quienes realizaron los estudios de semen.

-Al National Hormone and Pituitary Program del National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIADDK), NIH, EEUU, por la donacion de estandares y anticuerpos para los RIAs de LH, FSH, prolactina y hCG.

-A CIBA-Geigy de Argentina por la donacion de la aminoglute-  
timida.

I N D I C E

RESUMEN . . . . .	1
INTRODUCCION . . . . .	5
Breve reseña sobre las evidencias de la existencia y funcion de las celulas intersticiales de Leydig .	5
La hormona luteinizante (LH). . . . .	7
Mecanismos involucrados en la respuesta de las celulas de Leydig a la LH.	
1. Receptores de LH. . . . .	8
2. Adenilato ciclase . . . . .	12
3. Proteina quinasa. . . . .	14
4. Fosfodiesterasa . . . . .	17
5. Proteinas especificas . . . . .	18
Biosintesis de androgenos.	
1. El colesterol como precursor de esteroides. .	20
2. Conversion de colesterol en pregnenolona. . .	25
3. Conversion de pregnenolona a testosterona . .	28
4. Otros metabolitos de la pregnenolona y de la testosterona. . . . .	30
Regulacion hormonal de la funcion testicular. . . .	34
Inhibicion de la funcion de la celula de Leydig por deficiencia de gonadotrofinas . . . . .	35
Inhibicion de la funcion de la celula de Leydig por esteroides. . . . .	36
Regulacion de la funcion testicular por hormonas proteicas . . . . .	41
El fenomeno de desensibilizacion de la celula de Leydig. . . . .	43
Las lesiones enzimaticas. . . . .	44
Objetivos . . . . .	45
MATERIALES Y METODOS. . . . .	47
Animales. . . . .	47

Tratamiento de los animales:	
a) Gonadotrofina corionica humana. . . . .	47
b) Estradiol . . . . .	47
c) Aminoglutetimida. . . . .	48
d) Tamoxifeno. . . . .	48
e) Androstatriendiona. . . . .	48
Aislamiento de celulas de Leydig por tratamiento con colagenasa. . . . .	48
Preparacion de celulas de Sertoli . . . . .	50
Microscopia de optica y electronica . . . . .	51
Preparacion de nucleos de celulas de Leydig . . . . .	52
Determinacion de la actividad de las RNA polimerasas . . . . .	53
Capacidad templante de la cromatina . . . . .	54
Obtencion de gonadotrofina corionica humana radioactiva . . . . .	55
Purificacion por cromatografia en Sepharosa-concanavalina A . . . . .	56
Determinacion del numero de sitios receptores para LH/hCG . . . . .	58
Estudios de union de la 125I-hCG a celulas intersticiales testiculares . . . . .	58
Incubacion de las celulas de Leydig purificadas:	
a) En suspension . . . . .	59
b) En cultivo. . . . .	60
Sintesis de proteinas in vitro. . . . .	61
Analisis de la fracciones proteicas por electroforesis en gel . . . . .	62
Determinacion de la actividad aromatasa . . . . .	63
Actividad aromatasa de celulas en suspension. . . . .	64
Actividad aromatasa de celulas en cultivo . . . . .	64

Preparacion de mitocondrial de celulas de Leydig. . . . .	64
Aislamiento de la membrana interna de mitocondrias de celulas de Leydig . . . . .	65
Determinacion de colesterol . . . . .	66
Determinacion de niveles circulantes de aminoglutetimida. . . . .	67
Preparacion de mitocondria adrenal precipitada con acetona . . . . .	67
Sintesis de pregnenolona y acido isocaproico marcado en mitocondria. . . . .	68
Filtracion en gel de sephacryl S-300. . . . .	70
Isoelectroenfoque . . . . .	71
Cromatografia de afinidad en 2',5' ADP-sepharosa 4B. . . . .	71
Estudios realizados en humanos. . . . .	72
I) Pacientes con sindrome de insensibilidad a los androgenos . . . . .	72
a) Preparacion de las celulas de Leydig. . . . .	72
b) Produccion de testosterona por celulas de Leydig humanas . . . . .	73
II) Pacientes oligo-astenospermicos . . . . .	73
III) Pacientes con varicocele . . . . .	75
Respuesta testicular a la gonadotrofina corionica humana (Test de hCG). . . . .	75
Test de LHRH:	
a) Agudo . . . . .	76
b) Infusion. . . . .	76
Tratamiento con Aminoglutetimida. . . . .	77
Determinaciones hormonales . . . . .	77
Estudio estadistico . . . . .	80

RESULTADOS. . . . .	81
I. Estudios fisicos y bioquimicos de la celula de Leydig . . . . .	81
I.1-Analisis morfologico y funcional de las fracciones obtenidas por elutriacion . . . . .	85
I.2-Gradiente de Metrizamida de celulas elutriadas . . . . .	89
I.3-Elutriacion centrifuga de celulas separadas en el gradiente de Metrizamida . . . . .	92
II- Accion de la gonadotrofina en la celula de Leydig:	
II.1-Sobre la secrecion de testosterona y pregnenolona . . . . .	94
II.2-Sobre el numero de receptores de LH. . . . .	96
II.3-Sobre la actividad de las RNA Polimerasas. . . . .	96
II.4-Sobre la actividad templante de la cromatina. . . . .	101
III. Efectos de diferentes dosis de hCG . . . . .	101
IV. Papel del Estradiol . . . . .	104
IV.1-Tratamiento con Estradiol. . . . .	106
IV.2-Tratamiento con antiestrogenos . . . . .	106
V. Induccion de proteinas especificas por hCG y estradiol . . . . .	110
VI. Origen del estradiol testicular . . . . .	113
VI.1-Otimizacion del ensayo de la aromatasa . . . . .	115
VI.1-Localizacion celular de la actividad aromatasa. . . . .	119
VI.2-Efecto de hCG y cAMP sobre la actividad aromatasa y la esteroidogenesis de la celula de Leydig . . . . .	122
a) In vitro. . . . .	122
b) In vivo . . . . .	125
VII. La lesion esteroidogenica no dependiente de estradiol . . . . .	130
VII.1-Disponibilidad de precursores. . . . .	130
VII.2-Actividad inhibidora en la mitocondria . . . . .	131
VII.3-Efecto de hCG sobre la produccion de pregnenolona por la mitocondria . . . . .	135

VII.4-Efecto de la sonicacion y el calor . . .	138
VII.4-Tiempo y dosis de hCG en la induccion del inhibidor. . . . .	141
VII.5-Curvas de dosis-respuesta con el inhibidor . . . . .	144
VII.6-Actividad inhibidora en citosol. . . . .	147
VII.7-Efecto del 20 $\alpha$ -hidroxicoolesterol sobre la esteroidogenesis. . . . .	147
VII.8-Characterizacion parcial del inhibidor. .	150
a) Solubilidad . . . . .	150
b) Tamaño molecular. . . . .	150
c) Radio de Stokes . . . . .	150
d) Isoelectroenfoque . . . . .	151
VII.9-Posible sitio de accion del inhibidor. .	151
VIII. El fenomeno de desensibilizacion testicular en el Hombre.	
VIII-A. En pacientes con feminizacion testicular. . . . .	159
VIII-B. En pacientes con infertilidad asintomatica. . . . .	161
VIII-B.1-Respuesta testicular a la hCG . . . . .	161
VIII-B.2-Efecto de la aminoglutetimida (AGT) . . . . .	168
VIII-B.3-Efecto sobre la espermatogenesis . . . . .	170
VIII-B.4-Estudio de la pulsatilidad de la secrecion hipofisaria de LH. . . . .	172
VIII-C. Respuesta testicular a la hCG en pacientes infertiles con varicocele. . .	174
VIII-D. Respuesta hipofisaria a la infusion de LHRH en pacientes con varicocele . . . .	175
<b>DISCUSION . . . . .</b>	<b>177</b>
Regulacion de los receptores de LH. . . . .	177
La desensibilizacion de la respuesta esteroidogenica . . . . .	179
1. La lesion enzimatica lejana . . . . .	180
2. La lesion enzimatica cercana. . . . .	182
Integracion de las 2 lesiones biosinteticas . . . .	185

La desensibilizacion testicular en el Hombre. . . . .	187
CONCLUSIONES. . . . .	195
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. . . . .	198

## R E S U M E N

El control de la producción androgénica de la célula de Leydig depende de la secreción episódica de su hormona trófica (LH), la que es liberada de la hipófisis en pulsos de alta actividad biológica. Este modo de secreción permite el mantenimiento de una actividad enzimática permanente llevando a una biosíntesis adecuada de testosterona (T). La exposición de la célula de Leydig a concentraciones supra-fisiológicas y/o tónicas de LH o gonadotropina coriónica humana (hCG) induce la aparición de 2 fenómenos: 1) pérdida de los receptores membranales de LH, 2) disminución de la capacidad esteroidogénica. Este último efecto es debido por un lado a la disminución de la actividad de las enzimas microsomales 17  $\alpha$  hidroxilasa y 17,20 desmolasa encargadas de la conversión de pregnenolona (P5) en T (lesión lejana), y por el otro, a la disminución de la actividad de la enzima mitocondrial 20,22 desmolasa, responsable de la conversión de colesterol en P5 (lesión cercana).

En el presente trabajo hemos demostrado concluyentemente que el efecto desensibilizante de la hCG es mediado in vivo e in vitro por la acción del estradiol (E2), después de una activación temprana (a los 45 min) de las RNA polimerasas nucleares, seguido de la aparición de una proteína de PM 27000 (entre 3-6 hs). El E2 responsable de este fenómeno es

sintetizado por la propia célula, ya que la misma muestra una alta actividad aromatasa. Esta enzima es activada dentro de los 30 min de iniciada la acción de la hCG, por un mecanismo dependiente de AMP cíclico. Por el contrario, la célula de Sertoli del testículo maduro muestra una escasa actividad aromatizante de andrógenos. Por otra parte, la disminución de la actividad de la enzima mitocondrial se hace evidente con dosis mayores de hCG, y es independiente de E2. Dicha lesión enzimática fue atribuida a la activación de una proteína mitocondrial de PM de alrededor de 200000, con un punto isoelectrónico de 5.05.

El hecho de que la disminución de la actividad esteroideogénica inducida por hCG haya sido también observada en el Hombre, indujo a la hipótesis de que pacientes infértiles que presentaban solamente oligo-astenospermia como causa de su infertilidad pudieran tener una alteración de la biosíntesis androgénica que los llevara a tener una deficiente espermatogénesis. Por esta razón, se administraron 5000 UI de hCG por vía i.m. a 128 pacientes oligo-astenospermicos y se evaluó las respuestas de T, E2 y 17 hidroxiprogesterona (17OHP). La respuesta de T permitió clasificarlos en 2 grupos: Grupo 1 (n=89), con una hiporrespuesta temprana (dentro de las 4 hs), y Grupo 2 (n=39), con una respuesta bifásica normal (primer pico a las 4 hs y segundo pico

despues de las 24 hs). Los pacientes del Grupo 1 presentaron 3 tipos de respuesta de 17OHP: alta, normal y baja.

El tratamiento de estos individuos con el inhibidor de la aromatasa Aminoglutetimida (para inhibir la produccion de E2) mejoro la espermatogenesis solo en aquellos con hiporespuesta de T y respuesta de 17OHP normal o alta (lesion lejana), lograndose embarazo en el 30% de los casos. No se observaron cambios en pacientes del Grupo 1 con hiporespuesta de 17OHP (lesion cercana), ni en los del Grupo 2, indicando la independendencia del E2. En estos pacientes, otros factores locales o perifericos estarian involucrados en la modulacion negativa de la espermatogenesis. Asimismo, se evaluaron las respuestas esteroidogenicas a la hCG y la calidad espermatica en pacientes con varicocele, observandose un comportamiento similar a los pacientes sin esta patologia.

El estudio de la pulsatilidad de LH demostro que aquellos pacientes con hiporespuesta de T a la hCG, presentan una disminucion en la frecuencia de aparicion de los pulsos, mientras que la pulsatilidad fue normal en los pacientes con respuesta de T normal. Estos resultados sugieren que posiblemente la disminucion en la capacidad de respuesta del testiculo al estimulo gonadotrofico sea debida al efecto

desensibilizante que ejercería una secreción tónica de LH.

El análisis morfológico y funcional de las células de Leydig aisladas demostró que el intersticio testicular presenta una gran variedad en cuanto a la densidad y velocidad de sedimentación. Sin embargo, las características funcionales de las células fueron idénticas.

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo permiten avanzar en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos involucrados en el fenómeno de la desensibilización de la célula de Leydig, lo cual contribuiría a la elucidación de la etiología de algunos tipos de infertilidad del Hombre.

## I N T R O D U C C I O N

**Breve reseña sobre las evidencias de la existencia y funcion de las celulas intersticiales de Leydig.**

Las mas antiguas evidencias sobre la influencia que el testiculo ejerce sobre las glandulas accesorias son quizas las de John Hunter, quien en 1786 realizo experimentos de castracion de animales observando una regresion de la prostata y de las vesiculas seminales (1). En 1849, Berthold (2) observo que testiculos transplantados ectopicamente en gallos castrados eran todavia capaces de prevenir la atrofia de la cresta de estas aves y concluyo que la regulacion era ejercida a traves de la sangre. En 1850, Franz Leydig describio la presencia de celulas intersticiales en el testiculo de varios mamiferos (3), a las que posteriormente se les atribuyeron diferentes funciones tales como aportar nutrientes para el tubulo seminifero, producir hormonas masculinas, almacenar productos hormonales producidos por el tubulo, eliminar sustancias nocivas que pudieran dañar los tubulos o migrar al tubulo seminifero para reemplazar a celulas de Sertoli envejecidas (4).

Las evidencias mas sobresalientes que atribuian un papel endocrino a la celula de Leydig fueron presentadas en una serie de trabajos que se inician en 1903 por Bowin y Ancel

(5), las cuales pueden resumirse en las siguientes observaciones:

1- Las células de Leydig tienen forma epitelióide y núcleo prominente, lo cual es característico de células involucradas en procesos secretorios.

2- Las células de Leydig están más orientadas hacia la vasculatura que hacia los tubulos.

3- En muchas condiciones experimentales o patológicas (calor, rayos x, algunos casos de vasectomía y otros tratamientos), el tubo sufre un proceso regresivo, pero tanto las células de Leydig como las características sexuales secundarias del macho permanecen intactas.

4- Las células de Leydig son numerosas en el testículo embrionario de los mamíferos en el momento en que el tracto reproductivo masculino se desarrolla, cuando aun el tubo seminífero es rudimentario.

Recien en la década del 30 evidencias concluyentes demostraron que los cambios involutivos originados por la castración podían ser revertidos por la administración parenteral de extractos crudos de testículos (6), y que la principal responsable de dicho fenómeno era la testosterona, la cual pudo ser químicamente aislada en 1935 por David y col (7). Por la misma época pudo determinarse también que la función testicular estaba controlada por hormonas de la

hipofisis (8).

La prueba definitiva de que las células de Leydig son la principal fuente de andrógenos se ha obtenido hace pocos años. En 1958 se describió una técnica para localizar la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (9,10) lo cual permitió determinar tanto en mamíferos como en otros vertebrados estudiados, que la actividad de esta enzima se hallaba predominantemente en las células de Leydig. Por otro lado, el desarrollo de una técnica para separar los tubulos de las células de Leydig en testículo de rata, permitió incubar ambos tejidos por separado con progesterona radioactiva lo que demostró que era el tejido intersticial el capaz de convertir este sustrato en andrógenos (11). Posteriormente, se pudo demostrar que el tejido intersticial era capaz de transformar colesterol en andrógenos (12), lo que de alguna manera dejó claro el papel de las células de Leydig en el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales del varón.

#### **La hormona luteinizante (LH).**

Esta hormona hipofisaria es llamada así porque en la hembra es capaz de inducir la ovulación y transformar el folículo remanente en cuerpo luteo. Cuando fue descubierta en el macho, se le dio el nombre de Hormona Estimulante de

las Celulas Intersticiales (ICSH) por su efecto estimulador de las celulas testiculares de Leydig. Hoy se sabe que ambas hormonas son quimicamente identicas pero se ha conservado el nombre de LH para ambos sexos. Estudios inmuoquimicos demostraron que tanto la LH como la hormona foliculoestimulante (FSH) son segregadas por las mismas celulas PAS-positivas de la hipofisis anterior.

La LH, al igual que otras glicoproteinas tales como FSH, Tirotrofina (TSH) y la gonadotrofina corionica humana (hCG) contienen 2 cadenas polipeptidicas denominadas sub-unidades alfa y beta (13,14). Las sub-unidades alfa son identicas entre si pero las beta son diferentes y les confieren la especificidad de su accion. La estructura de la LH es virtualmente identica a la de hCG solo que la hCG posee 30 aminoacidos mas en el extremo C-terminal de la sub-unidad beta, lo que le confiere una potencia biologica superior a la de LH (15)

### **Mecanismos involucrados en la respuesta de las celulas de Leydig a la LH.**

#### **1. Receptores de LH.**

Las primeras evidencias de que las celulas de Leydig poseian receptores para LH fueron aportadas gracias a la aparicion de tecnicas inmuohistoquimicas usando LH acoplada

a ferritina (16) y autoradiograficas luego de exponer al animal in vivo a LH marcada con  $^{125}\text{I}$  (17,18). Se pudo demostrar que la LH interaccionaba selectivamente con las celulas de Leydig, mientras que no se observaba union a las celulas del tubo seminifero. Dado que la hormona marcada expuesta a las celulas permanecia en la superficie por un tiempo, se postulo que los receptores se localizaban en la membrana plasmatica. Avalaron esta hipotesis 2 experiencias posteriores: 1) La LH unida a Sepharosa, la cual no penetra en la celula, era capaz de estimular la esteroidogenesis (19), y 2) La gonadotrofina unida a la celula podia eluirse simplemente disminuyendo el pH del medio (20). Mas recientemente pudo observarse el complejo hormona-receptor unido a la membrana celular por tecnicas de inmunofluorescencia (21).

La asociacion entre LH o hCG y los sitios receptores es marcadamente dependiente de la temperatura de incubacion. Se vio que a 37 °C se produce rapidamente. Sin embargo, la mayoria de los estudios de union de LH o hCG marcadas han sido realizados a temperaturas entre 20 y 24 °C para disminuir al maximo los efectos de degradacion de la hormona y/o de los sitios receptores durante la reaccion de union. La velocidad de interaccion entre la hormona y su receptor depende tambien de la concentracion de la hormona utilizada

y que sigue una cinetica de segundo orden, hasta que se utiliza un exceso de hormona en que la reaccion adquiere una cinetica de pseudo-primer orden (22). Se ha encontrado que las características de la union de las gonadotrofinas a los receptores son identicas en celulas de Leydig aisladas, en homogenatos testiculares y en membranas de celulas intersticiales y se ha calculado que existen aproximadamente 20.000 sitios receptores por celula de Leydig. La constante de union en el equilibrio  $K_a$  es  $4 \times 10^{10} \text{ Me}^{-1}$  y pertenece a una sola clase de sitios de union no interactivos, que se demostraron en la obtencion de graficos de Scatchard lineales y en graficos de Hill con pendiente 1.0 (23). La vida media del complejo receptor-hormona es de 24 hs a 24 oC, y la disociacion se produce aun mas lentamente a 4 oC. Esta propiedad de los sitios receptores para gonadotrofinas ha sido de incalculable valor en la solubilizacion y caracterizacion fisico-quimica de los mismos, permitiendo la utilizacion de metodos tales como filtracion en geles o gradientes de densidad, que son relativamente largos.

Cuando se correlaciono la union de hCG a sus sitios receptores con la esteroidogenesis se vio que la celula de Leydig contenia un gran exceso de receptores con respecto a los necesarios para producir una respuesta esteroidogenica maxima (24). Esta respuesta puede ser inducida con una

ocupacion de sitios receptores menor del 1%. La ocupacion de sitios necesaria para producir pequeños incrementos en la esteroidogenesis deberia involucrar solo unos pocos sitios. No existen evidencias de que haya una subpoblacion de sitios de alta afinidad que sea la responsable de la respuesta esteroidogenica aguda. La funcion de este gran exceso de receptores muy por encima de los necesarios para producir una respuesta biologica maxima y que han dado en llamarse "receptores de repuesto" (spare receptors) no ha sido completamente aclarada. Dos posibles explicaciones serian 1) se favoreceria la formacion del complejo receptor-hormona y por lo tanto indirectamente la respuesta biologica en condiciones de baja concentracion del ligando, y 2) proveerian un reservorio de sitios para reemplazar aquellos utilizados o procesados como consecuencia de la interaccion de la hormona en condiciones fisiologicas que inducen la secrecion hormonal. Las fluctuaciones en el numero de sitios receptores tendrian efectos en la sensibilidad de las curvas dosis-respuesta de cada celula.

Cuando la hormona gonadotrofica se pone en contacto con su receptor (localizado en la membrana celular) se produce primero una movilizacion de los receptores ocupados para formar acumulos o "clusters" los que seguidamente son introducidos en el citoplasma mediante un proceso de

pinocitosis denominado "internalizacion" (25,26). Este fenomeno involucra la formacion de una especie de hoyo (coated pit) recubierto por una proteina llamada clatrina. Esta estructura es inmediatamente transformada en una vesicula recubierta de clatrina (coated vesicle), la que posteriormente pierde el revestimiento proteico transformandose en endosoma o receptosoma. Finalmente, el receptosoma (conteniendo el complejo Hormona-Receptor) se acerca al Complejo de Golgi donde la hormona es degradada por los lisosomas y el receptor es o bien degradado o bien reciclado a la membrana celular (27,28).

## **2. Adenilato ciclase**

El primer efecto de la LH sobre la celulas de Leydig es la activacion mediada por el complejo receptor-hormona de la adenilato ciclase que resulta en la formacion del cAMP. En la celula de Leydig intacta los niveles de cAMP se elevan rapidamente, dentro de los primeros segundos luego de la interaccion LH-receptor, mientras que la produccion de testosterona se pone en evidencia luego de por lo menos 10 minutos. La respuesta del nucleotido ciclico a la gonadotropina en celulas de Leydig aisladas es grande y rapida. El hecho de que la respuesta esteroideogena a la LH pueda ser reproducida por analogos del cAMP y por toxina colerica, y

que además sea potenciada por inhibidores de la fosfodiesterasa es consistente con que el cAMP es el segundo mensajero de la acción gonadotrófica, así como de los efectos de ACTH en la corteza adrenal. Sin embargo, las marcadas discrepancias entre las curvas de dosis respuesta para el cAMP y para la producción de esteroides en células de Leydig aisladas así como en células luteales y adrenales, oscureció por mucho tiempo el papel del cAMP en el mecanismo de acción hormonal, planteándose la posible existencia de otros mensajeros responsables de la respuesta esteroidogénica a bajos niveles hormonales. Solo recientemente, un estudio detallado de los niveles intracelulares de cAMP, incluyendo aquel que involucra el nucleótido unido a la subunidad reguladora de la proteína quinasa, ha demostrado que existe una muy buena correlación entre producción de cAMP, activación de proteína quinasa y esteroidogénesis durante la estimulación hormonal en testículo, ovario y adrenal (29-32). En estos experimentos se puso asimismo en evidencia que el proceso de activación regulado por cAMP estaba controlado por cambios muy pequeños en los niveles intracelulares de cAMP y que existirían respuestas mediadas por el cAMP en determinados compartimentos celulares (29). Estos hallazgos, junto con las observaciones recientes que demuestran la fosforilación de proteínas citosólicas en

celulas de Leydig y celulas adrenales estimuladas por las respectivas hormonas troficas (33,34), aportan evidencias firmes sobre el papel de la adenilato ciclasa-proteina quinasa en el mecanismo de accion hormonal.

Dufau y col (35) demostraron asimismo que es el receptor el que determina la especificidad de la respuesta de la adenilato ciclasa, transfiriendo receptores solubilizados de ovario a celulas adrenales aisladas, hicieron que estas ultimas celulas se hicieran sensibles a la hCG respondiendo a su estimulo con la produccion simultanea de cAMP y de glucocorticoides.

Si bien el sistema de la adenilato ciclasa ha sido poco estudiado en particular en la celula de Leydig, parece ser que tambien aqui al igual que en otros tejidos (36,37) los nucleotidos guanilicos juegan un papel decisivo en el acoplamiento del receptor a la ciclasa y su activacion subsiguiente. El grado de activacion parece ser dependiente de las concentraciones en el medio de magnesio, calcio y ATP.

### **3. Proteina quinasa**

Aunque se supo por mucho tiempo de la existencia de proteina quinasas en la celula de Leydig, solo recientemente y con el advenimiento de nuevas tecnicas de separacion

celular estas quinasas han sido caracterizadas (38-41). Estos estudios demostraron la existencia de dos proteina quinasas dependientes de cAMP y una independiente de cAMP. Se creia que esta ultima era la subunidad catalitica comun a las dos holoenzimas, ya que el tratamiento de las celulas de Leydig con bajas dosis de hCG producia activacion progresiva de ambas proteina quinasas y conversion a la subunidad independiente de cAMP (41). Cuando se estudiaron los pesos moleculares de estas quinasas (42) se vio que el 70% de la proteina kinasa dependiente de cAMP de la celula de Leydig, tiene dos subunidades regulatorias (PM 116.400). La segunda holoenzima con un peso molecular menor (PM 59.600) derivaria de la mayor y estaria constituida por una subunidad reguladora unida a una subunidad catalitica. La union del cAMP a las dos subunidades regulatorias de la holoenzima de mayor peso molecular, o a la subunidad regulatoria unica de la menor, causaria la liberacion de las subunidades cataliticas respectivas (PM 33.000) que fosforilarian proteinas celulares. Podesta y col (43) usando electroforesis en geles de poliacrilamida para separar las diferentes holoenzimas, pudieron demostrar que usando bajas dosis de hCG, el cAMP endogeno ocupa las subunidades regulatorias correspondientes a la enzima de PM 116.400, mientras que la segunda holoenzima solo es activada cuando se utilizan dosis altas de

gonadotrofina para el estimulo. De estos experimentos se deduciria que la holoenzima de mayor peso molecular, es la involucrada en la respuesta esteroidogenica que se obtiene a bajos niveles de gonadotrofina.

Los estudios en que se comparan las curvas de dosis respuesta del cAMP y de la testosterona despues de exponer a la celula de Leydig a la hCG o a la toxina colerica indicarian que la proteina quinasa que se activa por la accion gonadotrofica estaria ubicada en un compartimento celular especifico. esta aseveracion se basa en la siguiente evidencia: durante la estimulacion con la toxina, la curva de dosis respuesta para la testosterona se obtiene con ocupacion del 75-100% de los receptores de cAMP, mientras que se necesita solamente una ocupacion del 5 % de los sitios receptores para el nucleotido en la estimulacion hormonal, para producir niveles maximos esteroidogenicos (44,45). Estas observaciones sugieren que el cAMP producido en la estimulacion hormonal, tiene un acceso mas rapido o directo a receptores de cAMP que se encuentran en las proximidades de enzimas esteroidogenicas que son la clave de una produccion de testosterona aumentada, y que serian activadas por la proteina quinasa. Luego de la union de la toxina y de la estimulacion inespecifica de la ciclasa en multiples puntos de la membrana celular, el cAMP producido ocuparia recep-

tores que no se encuentran directamente relacionados con la proteína quinasa involucrada en la esteroidogénesis y se explicaría así el porqué se necesita un número mucho mayor de receptores ocupados para activarla.

#### **4. Fosfodiesterasa**

El grado de activación de la proteína quinasa depende de los niveles intracelulares del cAMP, que están regulados por la actividad simultánea de dos enzimas: la adenilato ciclasa que lo forma bajo el estímulo hormonal y la fosfodiesterasa que lo degrada al compuesto inactivo 5'AMP. En varios tejidos se ha considerado que las fosfodiesterasas juegan un papel clave en la regulación de la respuesta celular a la hormona. Así, en la célula de Sertoli se ha supuesto que uno de los mecanismos para la falta de respuesta a la FSH en células de animales adultos, se debe a un incremento en la actividad de estas enzimas. Existen evidencias indirectas de que en las células de Leydig las fosfodiesterasas regulan la respuesta celular a la gonadotropina, y son las que se derivan de estudios realizados en presencia de MIX o de teofilina. La incubación de células de Leydig aisladas en presencia de estos inhibidores, tienen un efecto potenciador sobre la respuesta esteroidogénica inducida por LH/hCG (45-47), sugiriendo asimismo estos resultados que en condiciones normales la señal hormonal es en cierta forma

atenuada por la presencia de fosfodiesterasas. Sin embargo, la mayor parte de los estudios sobre fosfodiesterasa testicular han sido realizados en homogenatos testiculares totales y existen muy pocos intentos para caracterizar estas enzimas en las distintas poblaciones celulares. Los trabajos realizados con células de Sertoli indicarian que existen múltiples formas de estas enzimas, con diferentes especificidades de sustrato, comportamiento cinético y requerimiento de calcio (48).

#### **5. Proteínas específicas**

Las proteínas intracelulares que son fosforiladas por la proteína quinasa, activan probablemente una secuencia de eventos involucrados en la biosíntesis esteroidea, pero los mecanismos precisos de su acción son aun desconocidos. Durante la activación hormonal, se produce síntesis proteica en la célula de Leydig y este es un prerrequisito para una respuesta esteroideogénica normal. Esto ha sido demostrado por el efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de esteroides que ejercen los inhibidores de síntesis proteica (49-53). Janszen y col (52,53) han descrito varias proteínas que son inducidas por estimulación con LH en células de Leydig normales y tumorales, sin embargo, estas proteínas no parecen estar involucradas en la respuesta esteroideogénica

aguda, ya que su presencia no ha podido ser detectada antes de un periodo de 2 horas luego de la estimulacion con gonadotrofina. Recientemente se han encontrado mas fosfoproteinas dependientes de LH en las celulas de Leydig (54). Las propiedades de estas proteinas deben ser investigadas en mayor detalle tratando de encontrar correlaciones entre fosforilaciones y activacion proteica en fracciones subcelulares aisladas y purificadas.

De los experimentos con cicloheximida se ha concluido que ciertas proteinas con una vida media muy corta ( $t_{1/2}$ : 13 min), estan involucradas en la regulacion de la esteroidogenesis en la celula de Leydig (49). Ademas de estos estudios sobre el papel del metabolismo proteico en la respuesta esteroidogenica, se han investigado especificamente ciertas proteinas. Se ha detectado en tejido testicular (55), una proteina termoestable que une especificamente al colesterol, y se ha sugerido que esta proteina podria cumplir un papel en el transporte del colesterol desde el espacio extramitocondrial al intramitocondrial. Hall y col (56) han demostrado que los microfilamentos conteniendo actina en las celulas de Leydig podrian estar involucrados en el transporte de colesterol, ya que la esteroidogenesis es inhibida luego del tratamiento de las celulas con liposomas conteniendo anticuerpo antiactina. El

requerimiento de los microfilamentos para el suministro de colesterol a la mitocondria parece ser condicion necesaria pero no suficiente, ya que no existen evidencias de que el sistema de transporte del colesterol constituya la etapa de velocidad limitante en el control de la esteroidogenesis. Los experimentos con anticuerpos contra proteinas intracelulares especificas, introducidos en celulas intactas ya sea via liposomas o fusion celular parecen promisorios y podrian contribuir a un mejor entendimiento acerca del papel de ciertas proteinas en el mecanismo de accion de la LH.

## **Biosintesis de androgenos**

### **1. El colesterol como precursor de esteroides.**

No existen dudas de que los organos esteroidogenicos pueden convertir el colesterol a las hormonas segregadas por estos organos, es decir: corticosteroides en la adrenal (57-59); progesterona en el cuerpo luteo (60,61); y testosterona en el testiculo (62,63). Ademas, la conversion de colesterol a estas hormonas es estimulada por las hormonas troficas ACTH (58,59) y LH (61,62). Ambas hormonas producen una disminucion del contenido de colesterol en sus organos blancos respectivos (57,64) y en el caso de la corteza adrenal la disminucion absoluta en colesterol es del mismo

orden que la producción de esteroides. Sin embargo la mayor parte del colesterol en los órganos esteroideogénicos está presente en una forma en la que no es directamente precursor de hormonas esteroideas y además se encuentra en compartimientos celulares específicos complicándose así la experimentación en este campo. El colesterol exógeno marcado no es un buen precursor de andrógenos observándose un porcentaje de conversión muy bajo. Esto se debe en parte a que el colesterol es insoluble en agua siendo así difícil ofrecerlo a los tejidos y con el resultado de que es muy poco lo que entra y por otra parte, lo poco que uno consigue incorporar es diluido por una gran cantidad de colesterol endógeno no marcado (61). Por otro lado, el (14C)-acetato sirve como precursor medianamente efectivo para hormonas esteroideas (59,65). Estos resultados fueron interpretados hace algunos años (66) como que el colesterol no era el precursor fisiológico de esteroides, y como que el acetato podría formar esteroides sin pasar por el colesterol, o sea que se planteó en aquel momento que el colesterol podía no ser un precursor obligatorio de las hormonas esteroideas. Actualmente se considera que no existe ninguna evidencia que no pueda ser reconciliada con que el colesterol es precursor obligatorio de esteroides y con que el acetato es convertido a esteroides luego de pasar por colesterol. Cuando se estudia la

contribucion del colesterol plasmatico al nivel de colesterol precursor de hormonas esteroideas la situacion parece diferir en distintos organos. En adrenal la fuente principal de esteroides parece ser el colesterol plasmatico: en el hombre 80% (67); perro 90% (68); rata 90% (69) y cobayo 60% (70). En estudios similares en que se estudio la contribucion del colesterol plasmatico a la produccion de androgenos testiculares, se vio que era del 13% en cobayo (70), y aproximadamente 40% en la rata (69).

En realidad las contribuciones relativas del colesterol testicular y del colesterol plasmatico a la sintesis de esteroides pueden variar en distintas circunstancias (por ejemplo de acuerdo a la velocidad con que se sintetizan los androgenos) y las evidencias presentadas respecto al origen del colesterol que esta involucrado en la esteroidogenesis, no resultan concluyentes.

Los acidos grasos constituyen probablemente los principales precursores iniciales de la biosintesis de colesterol testicular (la glucosa puede ser tambien un buen sustrato). Una vez en el interior de la celula, tanto los acidos grasos como la glucosa pueden transformarse en acetil-CoA, pilar fundamental de la biosintesis de esteroides. El sistema enzimatico para la degradacion de los acidos grasos (beta oxidacion) se localiza en las mitocondrias. Una vez formada

la acetil-CoA destinada a la biosíntesis de esteroides, debe abandonar esta organela (posiblemente vía citrato), por ser la membrana mitocondrial impermeable a la acetil-CoA, llegando al citoplasma donde se encuentran las enzimas responsables de catalizar los dos pasos siguientes que lo transforman en 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA (HMGCoA) cuya posterior reducción a ácido mevalónico depende de enzimas fuertemente asociadas al retículo endoplasmático.

Los pasos sucesivos que dan lugar a la formación de farnesil-pirofosfatos (a partir de 3 de los 5 carbonos provenientes del mevalónico) son catalizados por enzimas citoplasmáticas solubles mientras que la transformación de este compuesto a colesterol depende de sistemas enzimáticos presentes en el retículo endoplasmático. Quizás, esto sea una ventaja ya que el farnesil-pirofosfato y los productos posteriores son comparativamente más insolubles en el citoplasma acuoso. En esta forma estos sustratos podrían asociarse con las porciones más hidrofóbicas del retículo endoplasmático, facilitando su presentación a las enzimas responsables de la síntesis de colesterol. La Fig. 1 muestra un esquema de la distribución celular de estas enzimas.

Una vez sintetizado en la célula o tomado desde el plasma, el colesterol es rápidamente esterificado con ácidos grasos y acumulado en granulos lipídicos, de los cuales

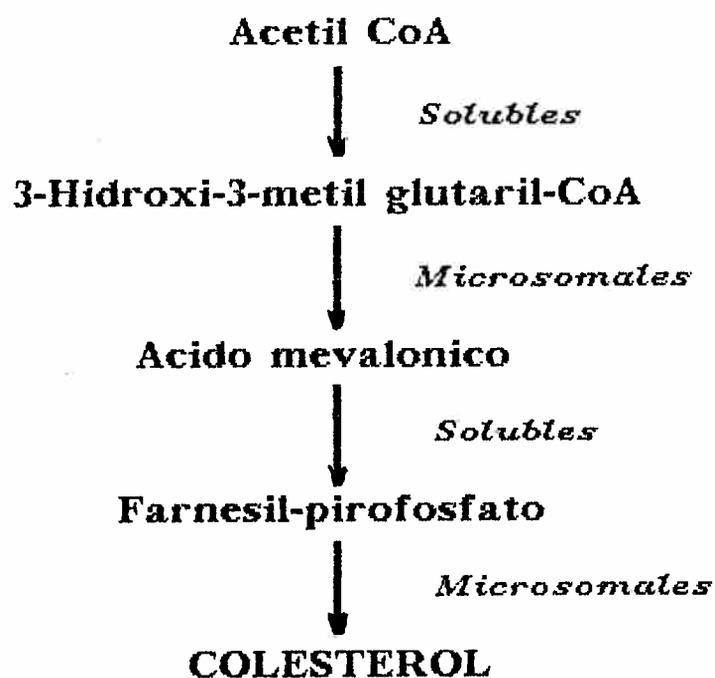


FIGURA 1. Esquema de la distribución celular de las enzimas involucradas en la biosíntesis de colesterol.

puede ser hidrolizados por estererasas citoplasmaticas, que proveen de esta forma mas colesterol libre para ser utilizado en la biosintesis de esteroides.

## **2. Conversion de colesterol en pregnenolona.**

Como ya se menciona, el principal punto de accion tanto de ACTH como de LH sobre la esteroidogenesis parece ser la conversion de colesterol en pregnenolona (59,71), y por lo tanto es probable que las proteinas fosforiladas por la proteian quinasa, asi como las proteinas labiles que son sintetizadas en las celulas de Leydig (51), esten involucradas en esta etapa de la biosintesis esteroides. Tales proteinas podrian ser necesarias para el transporte del colesterol dentro de la mitocondria y/o para la activacion del sistema enzimatico que rompe la cadena lateral del colesterol. Segun Burnstein y col (72) precisamente la etapa que se estimula por la LH en la secuencia biosintetica entre colesterol y pregnenolona, seria la conversion del colesterol a 20 y 22 alfa-colesterol. Por otro lado, tanto en testiculo como en ovario, LH y prolactina parecen tener influencia sobre la sintesis y el metabolismo de los esteres del colesterol. Bajo tratamiento con LH se ha observado en las gonadas una actividad aumentada de la colesterol ester-  
rasa y una actividad disminuida de la enzima que esterifica

al colesterol (71-74), favoreciendose de esta forma la presencia de colesterol libre que puede ser utilizado para la biosíntesis de andrógenos. El tratamiento con prolactina induce la acumulación de ésteres del colesterol en el testículo de ratón y conduciría a una producción incrementada de andrógenos testiculares en presencia de LH (75).

Una vez formado en el citoplasma, el colesterol libre debe movilizarse hacia la membrana mitocondrial externa, y probablemente lo realiza combinándose con una proteína transportadora. Ya que el complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol se halla situado en la membrana interna mitocondrial, el colesterol debe ahora incorporarse a esta zona de la organela celular. En la adrenal, se ha demostrado que la ACTH induce la unión del colesterol al citocromo P-450, siendo este último un componente del complejo enzimático. La reacción enzimática que ocurre en la membrana interna mitocondrial sería el paso limitante de la esteroidogénesis; este sistema enzimático es sumamente complejo e incluye a las 20 y 22 hidroxilasas que introducen grupos hidroxilos en las posiciones respectivas, previamente a la ruptura del enlace carbono entre los carbonos 20 y 22 por la 20,22 desmolasa (también llamada 20,22 liasa). Cada una de las hidroxilasas posee un transportador de electrones diferente al conocido para la respiración, actuando el

citocromo P-450 como oxidasa terminal de las hidroxilaciones.

La hipofisectomia produce un decaimiento notable en el contenido testicular de citocromo P-450 y enzimas relacionadas, mientras que la administracion prolongada y simultanea de LH evita esta disminucion (77). Caron y col (78) demostraron asimismo que la fosforilacion con proteina quinasa cAMP dependiente proveniente de ovario, de un sistema enzimatico reconstituido in vitro, aumenta la actividad de ruptura de la cadena lateral. La esterasa del colesterol proveniente de extractos crudos de corteza adrenal incrementa su actividad en una reaccion que es dependiente de Mg-ATPasa y que es estimulada por cAMP o sus derivados (79-82). La reaccion es incrementada por la adiccion de proteina quinasa cAMP dependiente exogena y es bloqueada por un inhibidor de esta proteina, no quedando asi practicamente dudas de que la fosforilacion estaria involucrada.

La colesterol esterasa altamente purificada puede ser fosforilada y activada por cAMP, sin embargo el grado de activacion alcanzado es pequeno cuando se lo compara con el grado de estimulacion de la produccion hormonal inducida por ACTH (82). De todas estas evidencias puede verse claramente cuales podrian ser los puntos de control, importantes en la

regulación de la biosíntesis esteroidea que ejerce la LH.

### 3. Conversión de pregnenolona a testosterona.

Si se examina la Fig. 2 se ve claramente que la conversión de pregnenolona a andrógenos requiere cinco reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas: 17  $\alpha$ -hidroxilasa, 17,20 desmolasa, 3  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa,  $\Delta^5-3$  cetohidroxiesteroide isomerasa y 17  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. En esta figura puede asimismo observarse que estas operaciones enzimáticas pueden ser realizadas con secuencias diferentes, dando lugar a varios caminos alternativos para la síntesis de testosterona a partir de pregnenolona. Ya que la etapa limitante de la velocidad en la síntesis de andrógenos ocurre antes de la producción de pregnenolona, el determinar el camino que prevalece parecería tener un interés meramente académico. Sin embargo los hallazgos sobre la predominancia de un camino en las distintas especies, podrían sugerir un ordenamiento preciso de las enzimas involucradas en el retículo endoplasmico. Aun así, el camino predominante podría cambiar cuando cambia la velocidad de la biosíntesis esteroidea. Se ha especulado con que la entrada de la pregnenolona al retículo endoplasmico podría efectuarse a través de una "puerta específica", determinándose así la

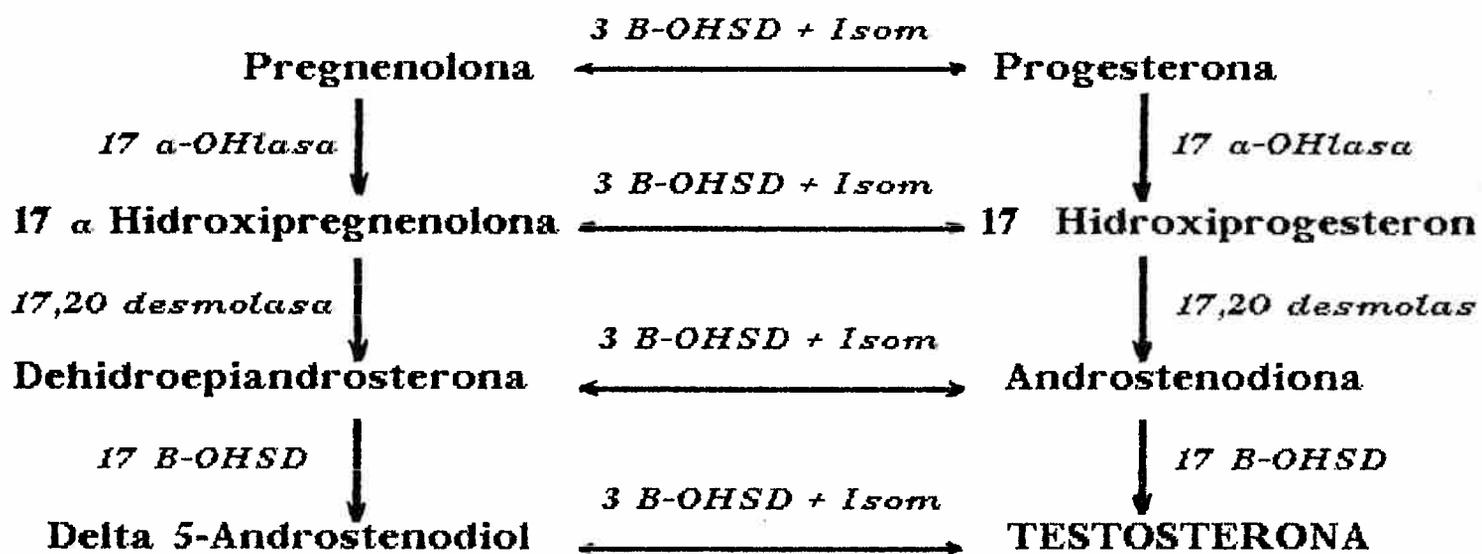


FIGURA 2. Esquema de la esteroidogenesis de la celula de Leydig.

3 B-OHSD: 3 beta hidroxil-esteroide deshidrogenasa

Isom: Isomerasa

17  $\alpha$ -OHlase: 17 alfa hidroxilase

17 B-OHSD: 17 beta hidroxil-esteroide deshidrogenasa

primer enzima con que entraria en contacto (83).

Pareceria que el camino de la progesterona, o bien "via Delta 4" es el que predomina en la rata (84), si bien otros caminos alternativos no pueden ser excluidos. En el testiculo humano la "via Delta 5" parece ser la mas significativa. En el testiculo fetal humano se ha demostrado que estan presentes pregnenolona y dehidroepiandrosterona pero no progesterona (85) y se concluyo que la formacion de testosterona ocurre via pregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstenodiona (86-88).

#### **4. Otros metabolitos de la pregnenolona y de la testosterona**

Cuando se miden los esteroides endogenos, se demuestra que existe en los mismos, de acuerdo a las especies y al grado de desarrollo una gran variabilidad (89). Por ejemplo en el testiculo de rata inmadura el 5 alfa-androstano-3 alfa 17 beta diol y el 3 alfa-hidroxi-5 alfa-androstan-17 ona (androsterona) estan presentes en cantidades muy superiores a la testosterona, mientras que esta ultima se halla incrementada en el testiculo maduro (90). Se han hecho observaciones semejantes para las cantidades relativas de testosterona y androstenodiona en el testiculo del toro, siendo este ultimo esteroide cuantitativamente mas impor-

tante en animales inmaduros, mientras que la testosterona lo es en animales adultos (91).

En la Fig. 3 se muestran algunos de los metabolitos que han sido encontrados en tejido testicular.

Las enzimas requeridas para la formacion de pregnenolona, asi como para su posterior conversion a androstenodiona y testosterona estan localizadas fundamentalmente en la celulas de Leydig. Algunas de estas enzimas sin embargo, han sido localizadas en mas de un tipo celular testicular.

Otros tipos celulares, distintos de la celula de Leydig, en el testiculo podrian estar involucradas en la biosintesis de otros esteroides biologicamente activos derivados de la testosterona, tales como la dihidrotestosterona y el estradiol, o podrian asimismo ser responsables de la inactivacion de esteroides biologicamente activos. Cabe mencionar que los esteroides teoricamente difunden facilmente a traves de las membranas, pudiendo asi permitirse una cooperacion metabolica entre los distintos tipos celulares (92,93). Se deduce entonces, que la produccion de esteroides testiculares este fundamentalmente determinada por las actividades enzimaticas totales, mas que por la distribucion celular especifica de estas enzimas. Por otro lado la regulacion de las actividades enzimaticas en los distintos tipos celulares podria ser distinta, y esto podria contribuir a un aporte cuanti-

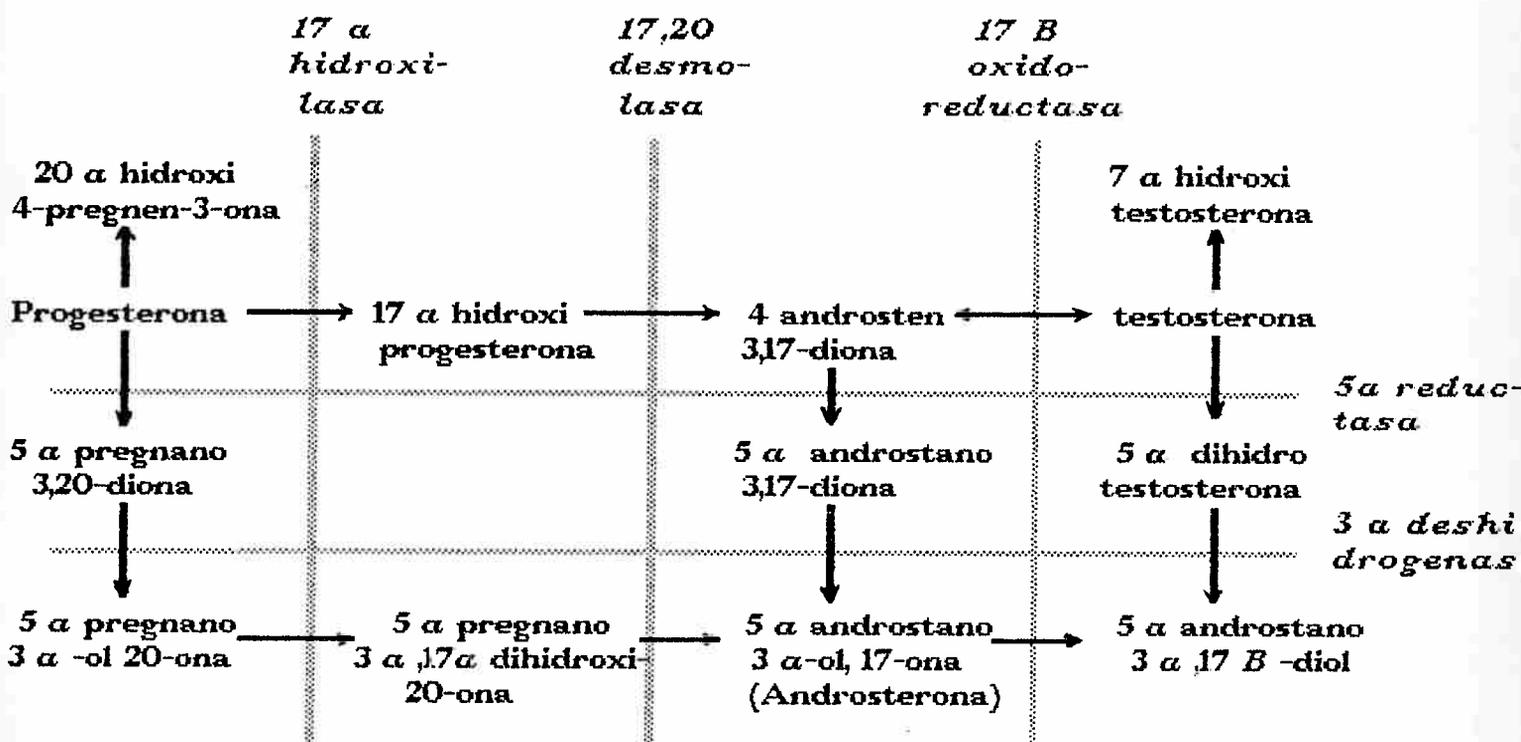


FIGURA 3. Esquema de la síntesis de los principales metabolitos de la célula de Leydig y las enzimas involucradas.

tativamente diferente de los distintos tipos celulares. En los últimos años ha recibido particular interés la distribución celular de la aromatasa testicular. El esclarecimiento de la localización de esta enzima responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos, podría contribuir a un mejor entendimiento del papel que ejercen distintas hormonas que están involucradas en el control de la producción de estradiol testicular. El estradiol puede inhibir la esteroidogénesis testicular y sería importante por lo tanto, saber si el estradiol actúa como una señal intercelular para la interacción entre las células de Leydig y otras células tales como las de Sertoli, llevando consigo el mensaje para detener la producción de andrógenos.

Los experimentos realizados con células de Sertoli en cultivo (94-96), además de los realizados con fracción tubular testicular (97), parecerían indicar que las células de Sertoli constituyen la principal fuente testicular de estrógenos. Otros autores, sin embargo discrepan con estos resultados (98,99). Recientemente se ha demostrado, que esta actividad es mucho menor en células de Sertoli de ratas mayores de 20 días (94), y que en animales adultos puede detectarse actividad aromatizante estimulable por tratamiento con hCG "in vivo" (98,100). Se concluye que la distribución subcelular de la aromatasa podría cambiar con

la maduración testicular. Los efectos de la LH sobre la actividad de aromatasa testicular en fracciones subcelulares se ponen en evidencia luego de 2 o 3 días de tratamiento con la gonadotrofina, mientras que puede observarse un incremento en el contenido testicular de estrógenos luego de 30 minutos de la administración de LH (101). Luego de una hora de la administración in vivo de LH se observa un incremento en el nivel de estrógenos en el plasma venoso testicular (102) y en células de Leydig aisladas incubadas en presencia de 3H-testosterona se observa producción de 3H-estradiol dentro de los primeros 30 minutos de incubación (100). La célula de Leydig parecería así ejercer un papel dominante en la biosíntesis de esteroides biológicamente importantes. Además, no debe olvidarse que el testículo ejerce otra función importante que es la de producir espermatozoides, por lo que la actividad normal de la célula de Leydig sería de vital importancia para una espermatogénesis normal.

#### **Regulación hormonal de la función testicular**

La regulación de la función endocrina testicular por mecanismos hormonales, depende de las acciones integradas de las hormonas hipofisarias (LH, FSH, prolactina, somatotrofina e insulina) y de los esteroides (estrógenos y andrógenos) sobre la célula de Leydig.

### **Inhibición de la función de la célula de Leydig por deficiencia de gonadotrofinas**

La hipofisectomía de la rata adulta es seguida por una disminución en la población de receptores testiculares para LH (103-107), lo que indica que la población de receptores testiculares debe ser restituida continuamente por factores que son dependientes de la glándula pituitaria. El efecto sobre los niveles de receptores parece depender de la edad del animal al que se le realiza la ablación, y esto podría explicar las diferencias observadas por varios laboratorios. En la rata adulta, esta pérdida de sitios receptores para LH se aproxima al 50% (21,103,107). Experimentos de marcación de los receptores por inmunofluorescencia han sugerido que esta pérdida no es generalizada, sino debida a la desaparición de sitios receptores en una subpoblación de células de Leydig. Otro grupo de investigadores han por su parte sugerido que se debe a la primera posibilidad (104,105). En cualquiera de los casos, parecería existir una población de receptores que escapa al control hipofisario, o que sería relativamente independiente de este.

La producción de cAMP en células de Leydig, luego de la hipofisectomía, se encuentra aumentada con respecto a los controles (108). En todos los casos se ha observado que la producción de cAMP es mantenida, mientras que la esteroido-

genesis maxima, asi como los niveles de receptores para LH se encuentran disminuidos. Se ha sugerido que este fenomeno podria resultar de una eficiencia mayor de acoplamiento del receptor a la unidad catalitica de la adenilato ciclasa, o de una actividad de fosfodiesterasa disminuida. Esta ultima posibilidad parece tener confirmacion experimental (106), y podria explicar la sensibilidad aumentada de la curva de dosis respuesta para cAMP observada en celulas de Leydig de animales hipofisectomizados. Los efectos principales de la hipofisectomia sobre la esteroidogenesis parecen encontrarse mas alla de la produccion del cAMP (108).

#### **Inhibicion de la funcion de la celula de Leydig por esteroides**

Cuando se administran esteroides a animales intactos, la produccion de androgenos se ve disminuida. Este efecto ha sido atribuido a la accion de los esteroides sobre la hipofisis que causa inhibicion en la secrecion de gonadotrofinas y altera secundariamente el estado endocrino de las gonadas (109-112). Este mecanismo es claramente un factor muy importante en la accion de los androgenos y de los estrogenos sobre la secrecion de testosterona, pero la presencia de una receptor de estradiol en la celula de Leydig (113,114) y las observaciones que demuestran

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley adultas de 50-60 días de edad (200-250 g). Para algunos experimentos se emplearon también ratas inmaduras de 5 y 15 días de edad. El manipuleo de los animales se hizo dentro de las normas publicadas en la "Guía de principios para el cuidado y uso de animales", del Department of Health, Education and Welfare-NIH, EEUU.

### **Tratamiento de los animales**

Los animales fueron tratados con diferentes sustancias, según el experimento, de acuerdo al siguiente detalle:

a) **Gonadotrofina corionica humana:** hCG (Pregnyl, Organon, USA) se administro en forma subcutanea en diferentes dosis, como se describira mas abajo. Los animales controles recibieron vehiculo solamente (agua destilada).

Los animales fueron sacrificados por decapitacion a diferentes tiempos. Los sueros se utilizaron para las determinaciones hormonales correspondientes. Los testiculos fueron retirados mediante apertura abdominal y colocados en hielo para su procesamiento inmediato.

b) **Estradiol:** Estradiol (Sigma) fue inyectado por via intramuscular a la dosis de 200 ng disueltos en 100 ul de aceite

de sesamo. Para este tratamiento se utilizaron ratas hipofisectomizadas con el objeto de independizar las fluctuaciones que sobre la secrecion de LH ocasionaria el esteroide.

**c) Aminoglutetimida:** 2-(p-aminofenil)-2-etil-glutarimida (Aminoglutetimida ) fue donada por Laboratorios CIBA Geigy (Argentina). La solucion de este inhibidor de la actividad aromatasas (100 mg/ml) fue preparada disolviendo la droga pura en HCl 1N, y ajustando a pH 4 con NaOH 10 N. El volumen fue completado con solucion fisiologica de NaCl (0.9%). Se inyecta por via intraperitoneal a la dosis de 60 mg en 3 inyecciones de 20 mg con intervalos de 4 hs.

**d) Tamoxifeno:** Trans-1-(p-B-dimetilamino-etoxifenil) (1,2-difenilbut-1-eno) (Tamoxifeno, I.C.I. Organics Inc, Stanford, USA) fue disuelto en solucion fisiologica e inyectado por via intraperitoneal a la dosis de 2 ug en 100 ul 1 hora antes y 1 hora despues de la inyeccion de hCG.

**e) Androstatriendiona:** 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (Androstatriendiona, Steraloids, Wilton, USA) fue administrada por via subcutanea a la dosis de 15 mg en 100 ul de aceite de sesamo, 1 hora antes y 1 hora despues de la inyeccion de hCG.

#### **Aislamiento de celulas de Leydig por tratamiento con colagenasa**

Se utilizo la tecnica descripta por Mendelson y col. (46), utilizando colagenasa para la dispersion del tejido testicular.

Los testiculos decapsulados, colocados en tubos de plastico (seis testiculos por tubo) fueron suspendidos en medio 199 (Difco Co) conteniendo albumina serica bovina (BSA) al 0.1 %, en la relacion 1 testiculo por ml de medio, conteniendo ademas 0.3 mg colagenasa/ml.

La incubacion se realizo a 34 oC, durante 15-20 minutos en un incubador Dubnoff, bajo atmosfera de carbogeno (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%), con agitacion constante.

Finalizada la incubacion, la reaccion se detuvo por dilucion con medio 199 (8 ml por cada ml de incubado).

Con el objeto de dispersar mejor el tejido, se agito en forma rotatoria el tubo incubado, durante 3 minutos, dejandolo reposar otros 3 minutos. Cuando los tubulos hubieron decantado, el sobrenadante fue aspirado con una jeringa de plastico y filtrado a traves de Nitrex (malla de poro 50 um), recogiendo el liquido filtrado en otro tubo plastico. La recuperacion se repitio una vez mas y el liquido filtrado se junto con el anterior.

Este filtrado, conteniendo las celulas intersticiales, se centrifugo a 700 x g durante 10 minutos en centrifuga refrigerada. El sedimento asi obtenido (preparacion cruda de celulas de Leydig) se resuspendio en medio 199-0.1% BSA, en la relacion 3 testiculos/ml. Las celulas de Leydig asi obtenidas, fueron purificadas por centrifugacion en un gradiente de

densidad de Metrizamida (Accurate chemical), segun la tecnica descripta por Aquilano y Dufau (168). Los gradientes lineales de 40 ml se prepararon a partir de una solucion al 80 % de Metrizamida en medio 199-0.1 % BSA con una bomba peristaltica. Sobre estos gradientes se sembraron 2 ml de la preparacion celular obtenida con colagenasa, que contenia aproximadamente  $10^8$  celulas. Se centrifugo el gradiente durante 5 minutos a  $3300 \times g$ . Se tomo la banda celular correspondiente a las celulas de Leydig (la tercera desde arriba localizada inmediatamente encima de la banda correspondiente a los globulos rojos). Se mezclo esta suspension celular con 30 ml de medio 199-0.1 % BSA fresco y se centrifugo a  $700 \times g$  durante 10 minutos. El sedimento resultante se resuspendio en una proporcion equivalente a 3 ml por testiculo, que correspondia a  $2 \times 10^6$  celulas de Leydig purificadas (90-95% de pureza).

La determinacion del numero de celulas se realizo sobre 50 ul de esta preparacion, teñidas con 150 ul de una solucion acuosa de azul de metileno al 0.2 %. Luego de 10 minutos, se agregaron 300 ul de medio 199 y las celulas se contaron en una camara de Neubauer en una dilucion 1:10.

#### **Preparacion de celulas de Sertoli**

Los restos testiculares del tratamiento con colagenasa fueron cortados con tijera y tratados seguidamente con 25 ml de medio

199 conteniendo 0.25% tripsina (Sigma) mas 0.25 mg de DNAsa (buffer A), segun la tecnica de Dorrington y col (169). Despues de un periodo de incubacion de 20 minutos a 34 oC en un incubador metabolico con una agitacion de 80 ciclos por minuto, se le agrego inhibidor de tripsina. La suspension celular fue filtrada a traves de un filtro de malla metalica para separar tejido no digerido, y lavada dos veces con buffer A. Luego de 5 minutos de reposo el sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido con 20 ml de colagenasa 0.05% preparada en buffer A, e incubado a 34 oC por 20 minutos. Finalizada la incubacion la suspension fue centrifugada a 400 rpm por 4 minutos, y el pellet celular resuspendido con medio 199-0.1% BSA y filtrado a traves de una malla de nylon. Las celulas de Sertoli fueron obtenidas por centrifugacion del filtrado a 400 rpm por 4 minutos.

#### **Microscopia de optica y electronica**

Los pellets celulares fueron fijados en glutaraldehido al 2% y posteriormente deshidratados in embebidos en Epon (170). Cortes gruesos para microscopia optica (1 um) fueron teñidos con azul de metileno:azur II (1:1 vol/vol), mientras que cortes ultrafinos (50-60 nm) para microscopia electronica fueron teñidos con tetroxido de Dsmio y acetato de Uranilo (171) y luego observados en un microscopio electronico Siemens Elmiskop

1A. Las muestras para autoradiografía fueron preincubadas con 1 millón de cpm de  $(^{125}\text{I})\text{hCG}$  por 3 h a  $35^{\circ}\text{C}$  y lavadas varias veces para eliminar trazador libre. Para determinar la unión no específica los preparados fueron simultáneamente incubados con exceso de hCG fría. Los cortes para microscopía fueron preparados como se indica más arriba, y luego expuestos a la placa fotográfica por 1 mes.

#### **Preparación de núcleos de células de Leydig**

Las células de Leydig fueron lisadas utilizando una solución hipotónica de 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$  y 0.5 mM ditioneína (DTT) en un volumen final de 2.5 ml y congeladas inmediatamente en hielo seco por 10 minutos. La suspensión se hizo 1.62 M de sacarosa por el agregado de 7 ml de una solución de sacarosa 2.2 M en buffer TKMD (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2.5 mM  $\text{KCl}$ ; 2 mM  $\text{MgCl}_2$  y 0.5 mM DTT), conteniendo además 0.25% de Triton X-100. La suspensión fue homogeneizada en un homogeneizador motorizado vidrio-vidrio a 900 rpm. El homogenato se deposita sobre un tubo conteniendo 2.5 ml de 2.2 M sacarosa en TKMD y se centrifuga a  $124,000 \times g$  durante 30 minutos en un rotor Beckman SW 40 a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue aspirado, y la pared del tubo fue secada con una espátula envuelta en papel absorbente. El pellet nuclear se resuspendió en TGED (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 25% glicerol, 0.1 mM EDTA y 0.5 mM DTT) usando un homogeneizador motorizado con

embolo de teflon, ajustando la concentracion de DNA a 0.5 mg/ml, y almacenandolo a -70 oC hasta el ensayo de las RNA polimerasas. La determinacion de proteina se realizo por el metodo de Lowry (172) y la de DNA por el de Burton (173).

#### **Determinacion de la actividad de las RNA polimerasas**

Alicuotas de la suspension nuclear (10-20 ug de DNA en 30 ul) fueron agregadas a una mezcla de reaccion helada conteniendo 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.6 mM ATP, 0.6 mM CTP, 0.6 mM GTP, 0.02 mM (3H)UTP (4 uCi, New England Nuclear, USA), 1.6 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM NaF y 1 mM DTT en un volumen final de 60 ul con: 1) nada mas, 2) 0.10 ug/ml de alfa-amanitina (para inhibir la RNA polimerasa II), 3) 100 ug/ml de alfa-amanitina (para inhibir la RNA polimerasa III), o 4) 10 ug de actinomicina D (para inhibir la actividad total). La reaccion enzimatica se inicio por transferencia de las muestras a un baño a 32 oC. Para los ensayos realizados en condiciones de baja o alta fuerza ionica, la mezcla de reaccion tambien contenia 50 o 250 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectivamente. Luego de 10 minutos de incubacion, la reaccion se detuvo colocando los tubos en baño de hielo y agregando 50 ul de 1% dodecilsulfato de sodio en 5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Las muestras fueron depositadas sobre filtros Whatman DE-81 (Whatman Inc, USA) y lavadas 6 veces por 5 minutos cada lavado en 5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, como se describio previamente (174). Posteriormente los filtros se lavaron 2 veces con agua por 2 minutos, 2 veces con etanol al

95% y 2 veces con eter. Despues de secarlos con aire caliente, los filtros fueron incubados por 20 minutos a 60 oC en viales de centelleo conteniendo 0.5 ml de Protosol (New England Nuclear, USA). Luego se le agrego 50 ul de acido acetico glacial y 10 ml de liquido centelleante, y la radioactividad incorporada al RNA se midio en un espectrometro Nuclear Chicago modelo 70008, con una eficiencia para tritio del 40%. La actividad de la RNA polimerasa II fue calculada como la diferencia entre las muestras incubadas en las condiciones 1 y 2; la RNA polimerasa III, como la diferencia entre 2 y 3; y la RNA polimerasa I como la diferencia entre 3 y 4. Bajo estas condiciones experimentales, 1 pmol de (3H)UTP incorporado fue equivalente a 5500 dpm. Todas las muestras fueron procesadas por triplicado.

#### **Capacidad templante de la cromatina**

La cromatina de los nucleos de las celulas de Leydig fue obtenida utilizando el metodo de Markarevich y col (175). La capacidad de las preparaciones de cromatina para servir de templado para la sintesis in vitro de RNA dependiente de DNA se determino por el metodo de Tsai y col (176) utilizando RNA polimerasa de Escherichia coli. De esta manera, solo moleculas de RNA unidas a la cromatina en estables complejos de preiniciacion son capaces de iniciar la sintesis de RNA. El ensayo se llevo a cabo en un volumen final de 150 ul. Las

muestras y los reactivos fueron preparados en una buffer de incubacion conteniendo 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 8 mM MnCl<sub>2</sub>, 16 mM beta-mercaptoetanol, y 50 mM de sulfato de amonio. Concentraciones variables de RNA polimerasa de E. coli (0-40 ug en 30 ul) fueron primero incubadas a 37 oC por 30 minutos con 1.5 ug de DNA cromatinico en 90 ul. Al final del periodo de preincubacion, la sintesis de RNA fue iniciada por el agregado de la mezcla de reaccion conteniendo en el volumen final 0.625 mM de cada uno de los nucleotidos ATP, CTP y GTP, 0.0625 (3H)UTP 95 ug), 0.66 ug/ml de heparina, 0.033 mg/ml de rifampicina, y 0.66 mM de fosfato de potasio, pH 8. La reaccion se prosiguió por 15 minutos mas a 37 oC y se detuvo y conto como se indico para el ensayo de las RNA polimerasas. Bajo estas condiciones, 1 pmol de (3H)UTP represento 5500 dpm. En ensayos realizados con RNA polimerasa II de semilla de trigo, 30 ul de la mezcla de reaccion usada para medir las RNA polimerasas (ver mas arriba) fueron incubadas en condiciones de baja fuerza ionica con 15 ul de cromatina nuclear de celulas de Leydig (1 ug DNA) y 15 ul de RNA polimerasa II exogena (1 U). Los demas pasos fueron identicos a los descriptos para el ensayo de las RNA polimerasas.

#### **Obtencion de gonadotrofina corionica humana radioactiva**

Para preparaciones optimas de la hormona marcada, 6 ug de hCG (10.000 UI/mg, CR-125, proporcionada por el National Institute

of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Hormone and Pituitary Program, NIH, USA) fueron marcados con 500 uCi de  $^{125}\text{I}$  (177), segun se detalla a continuacion:

- 1) hCG, 6 ug en 10 ul  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M, pH 7.4
- 2) Buffer acetato de sodio 0.4 M, pH 5.6 (10 ul)
- 3)  $^{125}\text{I}$  libre de portador, en  $\text{NaOH}$  0.1 N, 500 uCi (6 ul)
- 4) Lactoperoxidasa bovina (Calbiochem, grado B, Cat No. 427466) 2.7 mg/ml en buffer Acetato de sodio 0.1 N 94 ul)
- 5)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (300 volúmenes, diluida 1:20.000) (4 ul)

Despues de agitar vigorosamente durante 2 minutos, la mezcla de iodination fue diluida con 300 ul de buffer fosfatos 0.05 M y transferida a una columna de Sephadex G-75 Pharmacia Fine Chemicals, Suecia). Separado el pico hormonal del de iodo libre, la fraccion correspondiente a la hormona se dividió en alícuotas, que se guardaron congeladas a  $-70^\circ\text{C}$  para su posterior repurificación, antes de su utilización.

Cada alícuota, aproximadamente de 0.2 ml, fue purificada por columna de Sepharosa-concanavalina A o ACA 54 (Ultrogel, LKB, Suecia), separandose la hormona agregada de la utilizable para los estudios de union a receptor. Usualmente, la actividad especifica obtenida fue de 50 uCi/ug.

#### **Purificación por cromatografía en Sepharosa-concanavalina A**

La afinidad de los restos de hidratos de carbono de las

hormonas glicoproteicas por la Concanavalina A, fue utilizada para la purificación de la gonadotrofina marcada. Mediante este método, dichas hormonas son específicamente adsorbidas a Sepharosa-Concanavalina A y luego eluidas con soluciones de alfa-metilglucosido o alfa-metilmanosido. La selectividad de este procedimiento por la porción de hidratos de carbono de la molécula marcada, contrasta enormemente con el método de adsorción en celulosa, donde el componente proteico es el que desempeña el papel principal.

Para la purificación de  $^{125}\text{I}$ -hCG, la mezcla de iodación fue transferida a una columna de Sepharosa-Concanavalina A (5 x 140 mm). El yodo libre y la hormona dañada fueron eluidos con 12 ml de PBS, conteniendo 1 mg/ml de gamma-globulina bovina; luego de esto, la hormona marcada fue eluida con la misma solución, conteniendo alfa-metilglucosido 0.2 M.

Las propiedades físicas de la  $^{125}\text{I}$ -hCG, obtenida por este método, no difieren de la hormona no marcada según los criterios utilizados (filtración por gel, electroforesis en gel de poli-acrilamida, isoelectroenfoque).

La concentración de hormona en las preparaciones se determinó por radioinmunoensayo con estándares y anticuerpos donados por el National Hormone Pituitary Program, NIADDK, NIH, USA. La actividad específica usual de la  $^{125}\text{I}$ -hCG empleada fue de 50 uCi/ug.

### **Determinacion del numero de sitios receptores para LH/hCG**

La interaccion entre la hCG y su receptor, se estudio sobre la base de la union de la hormona radiactiva agregada en cantidad variable, a componentes particulados de testiculos de ratas adultas, o a celulas intersticiales aisladas. La union inespecifica fue evaluada agregando una cantidad 1000 veces superior de hormona no radiactiva.

### **Estudios de union de la <sup>125</sup>I-hCG a celulas intersticiales testiculares**

Para estudiar la union de la hormona marcada a su receptor en preparaciones de celulas de Leydig purificadas, se procedio segun el siguiente esquema: alicuotas de 1 ml ( $10^6$  celulas) de la suspension de celulas de Leydig fueron incubadas con 0.1 ml de hCG marcada (100.000 dpm, equivalente a 4-5 ng) en presencia de concentraciones crecientes de hCG no marcada (hasta 100 ng) por 3 horas a 34 °C, o a temperatura ambiente por 16 horas. Estas condiciones son adecuadas para alcanzar el equilibrio de la reaccion de union. La union no especifica de la <sup>125</sup>I-hCG fue determinada incubando en tubos controles con un exceso de hormona no marcada (100 UI). Finalizado el periodo de incubacion, se agregaron a todos los tubos 2 ml de buffer PBS-Dulbecco frio y se centrifugaron a  $1500 \times g$  por 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron por aspiracion. El sedimento

celular remanente fue resuspendido en 3 ml del mismo buffer frio, y los tubos fueron centrifugados nuevamente en las mismas condiciones. Luego de aspirar y descartar este segundo sobrenadante, la radioactividad unida a las celulas fue evaluada en un contador automatico gamma.

### **Incubacion de las celulas de Leydig purificadas**

#### **a) En suspension**

Se incubaron alicuotas de 1 ml de celulas de Leydig purificadas ( $10^6$  celulas/ml) en viales plasticos (Packard) para contador de centelleo liquido (20 ml), en presencia de 1-metil-3-isobutil-xantina (MIX) 0.125 mM.

El agregado de hCG, se hizo en alicuotas de 100 ul en medio 199-BSA 0.1 %. todas las incubaciones se hicieron a 34 oC durante 3 horas en un incubador Dubnoff bajo una atmosfera de carbogeno.

Para poder medir la produccion de 3-ol-5-Pregnen-20-ona (pregnenolona) de celulas de Leydig normales y de animales desensibilizados se estudio el efecto de dos inhibidores: cianocetona (Winthrop Laboratories, No. 19578) y espirolactona (Sigma Chemical Co). En los experimentos subsiguientes, los dos inhibidores se usaron juntos a la concentracion optima ( $10^{-6}$  M para la cianocetona y  $10^{-5}$  M para la espirolactona) en aquellos casos en que se quiso estudiar la produccion de pregne-

nolona. Estos inhibidores se disolvieron en etanol y los volúmenes deseados se pipetearon en los viales de incubación, evaporándolos bajo corriente de aire. Luego de agregar las células, se incubó por un período de 15 minutos con los inhibidores antes de agregar hCG. Las células, fueron al igual que antes incubadas por 3 hs a 34 °C bajo carbogéneo y con agitación a 100 ciclos/min. Luego de 180 minutos o a intervalos seleccionados, se detuvo la incubación transfiriendo los viales a un baño con hielo.

Las células más el medio de incubación, se transfirieron a tubos de polietileno (12 x 75 mm) y se centrifugaron a 260 x g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se guardó a -20 °C para la determinación de testosterona y pregnenolona.

Para la determinación de AMP cíclico total (cAMP) una alícuota de 450 µl de células más medio de incubación fueron agregadas a tubos de vidrio conteniendo 50 µl de teofilina 10 mM. Inmediatamente estos tubos fueron colocados en un baño a ebullición por 10 minutos y se guardaron luego congelados hasta su procesamiento. Los restantes 550 µl de células y medio fueron centrifugados y el sobrenadante guardado congelado para la determinación de testosterona u otros esteroides.

#### **b) En cultivo**

Alrededor de  $2 \times 10^6$  células en 1 ml de medio 199-0.1 % BSA

fueron sembradas en placas plasticas de cultivo constituidas por 6 celdas de 35 mm cada una (Costar, Cambridge, USA), e incubadas a 37 °C por 1 hora en una estufa de cultivo gaseada (5% CO<sub>2</sub>-5% aire) y con humedad controlada. Luego que las celulas se adhirieron al fondo de las placas, los cultivos comenzaron con el agregado de 1 ml de medio de cultivo conteniendo las diferentes sustancias para cada experimento.

#### **Sintesis de proteinas in vitro**

Las celulas de Leydig fueron incubadas con 100 ng de estradiol o 50 ng de hCG en presencia o no de 500 ng de Tamoxifen (trans-1(p-B-demetil-aminoetoxifenil)-1,2-difenilbut-1-ene; ICI Organics, Inc, Stanford, USA). Las celulas fueron entonces lavadas con medio 199-0.1% BSA sin leucina, incubando seguidamente por 2 horas con 50 uCi de (3H)-Leucina (actividad especifica 52 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, USA) para los cultivos tratados, o con 5 uCi de (14C)-Leucina (342 mCi/mmol) para los cultivos control. Finalizada la incubacion, los cultivos fueron lavados y las celulas de los cultivos control y tratados fueron recuperadas, combinadas, lavadas y solubilizadas con dodecil sulfato al 5% conteniendo 30% de glicerol y 15% de mercaptoetanol. Las muestras solubilizadas fueron hervidas durante 10 minutos y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida. La incorporacion de leucina radioactiva a la

proteína sintetizada por las células de Leydig fue del 10-20%.

#### **Análisis de las fracciones proteicas por electroforesis en gel**

La electroforesis fue realizada según la técnica descrita por Laemmli (178), empleando un gel separador de poliacrilamida al 10% con 0.1% de dodecil sulfato de sodio en tubos Bio-Rad (6 x 125 mm). Las muestras fueron aplicadas y cromatografiadas usando una corriente de 3 mA/gel por aproximadamente 6 horas, cuando el colorante marcador había recorrido 7 cm. Luego de la electroforesis, los geles fueron cortados en rodajas de 1 mm, colocados en viales de 20 ml y solubilizados con 0.5 ml de peróxido de hidrógeno a 60 °C. A cada vial conteniendo una rodaja del gel se le agregó 10 ml de líquido de centelleo (7 gr de 2,5 Difenil-oxazol, 300 mg de 1,4-bis (2-(5-feniloxazol))-benceno), 100 g de naftaleno, 385 ml de dioxano, 230 ml de metanol y tolueno csp 1 litro). La radioactividad fue cuantificada en un espectrometro de centelleo líquido marca Nuclear Chicago modelo 70008, con correcciones para conteo cruzado de radiación de  $^{14}\text{C}$  en el canal de 3H. La relación 3H: $^{14}\text{C}$  fue calculada para cada rodaja de gel para seguir el incremento o inhibición de la síntesis de proteínas específicas. Los pesos moleculares fueron estimados por comparación de las especies proteicas separadas con standards (Bio-Rad, Richmond, USA) en un rango de 14300 a 94000.

### Determinacion de la actividad aromatasa

La actividad aromatasa fue determinada utilizando una modificacion del metodo del agua tritiada (179), cuya reaccion es la siguiente:



La (1 $\beta$ -3H)-Testosterona fue preparada utilizando (1 $\beta$ ,2 $\beta$ -3H)-Testosterona (50 Ci/mmol, New England Nuclear) mediante reaccion alcalina drastica (180). La actividad aromatasa aumento linealmente con el tiempo de incubacion hasta los 30 minutos, y con la concentracion celular desde 0.05-1.0 x 10<sup>6</sup> celulas, teniendo un Km para testosterona de 1.69  $\mu$ M. La actividad enzimatica fue inhibida con androstatriendiona (ATD), un inhibidor especifico de aromatasa. En la mayoria de los experimentos se utilizaron 10<sup>6</sup> celulas (aproximadamente 0.1 mg de proteina) incubadas con 3  $\mu$ Ci (1 $\beta$ -3H)-Testosterona en 10  $\mu$ l de etanol absoluto, con un exceso (por lo menos de 300 veces) de testosterona no marcada (600 ng) por sobre la contenida en el preparado celular. La concentracion final de sustrato fue 2  $\mu$ M. ATD (100  $\mu$ M) fue usado en cada experimento como blanco. Cada valor proporcionado en el texto es el resultado de haber sustraído el valor obtenido en los incubados con ATD.

**Actividad aromatasa de celulas en suspension:** El ensayo fue realizado en viales de 20 ml en un volumen total de 1 ml e incubados a 34 °C por 1 hora en un incubador metabolico Dubnoff con agitacion.

**Actividad aromatasa de celulas en cultivo:** La determinacion se hizo con los mismos agregados pero a las placas de cultivo en la estufa de cultivo, usando tambien placas con ATD como blanco.

La reaccion se detuvo por el agregado de 10 ml de cloroformo, seguido por agitacion vigorosa. Una vez formadas las 2 capas, 0.8 ml de la capa acuosa superior se transfirio a tubos de vidrio de 12 x 75 mm, a los que se les agrego 0.8 ml de carbon activado al 2.5%. Luego de 30 segundos de agitacion los tubos fueron incubados por 10 minutos en baño de hielo y centrifugados a 4000 rpm por 25 minutos. Alicuotas de 1 ml fueron pipeteadas a viales de centelleo con el agregado de 10 ml de liquido centelleante, y la radioactividad fue determinada en un espectrofotometro Nuclear Chicago modelo 70008, con una eficiencia para tritio de 40%. La recuperacion del agua tritiada en la fase acuosa fue 93%, y solamente 0.009% de la (1 $\beta$ -3H)-Testosterona permanecio en dicha fase.

#### **Preparacion de mitocondrial de celulas de Leydig**

El pellet de Celulas de Leydig obtenido despues de la purificacion en gradientes de Metrizamida se resuspendio en 2.5 ml de

una solución hipotónica consistente en Tris 10 mM, pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM, NaCO<sub>3</sub>H 1 mM y ditioneitol 1mM. En los experimentos en los que se requirió, esta solución también contenía por ml 100 ug de aminoglucetimidato. La suspensión se mantuvo en hielo por 30 minutos, para permitir que las células se hinchen. Posteriormente, la suspensión celular fue pasada 10 veces por una aguja de calibre 25 g, ajustada a 0.25 M sacarosa, y centrifugada a 400 x g por 10 minutos, para separar células enteras, núcleos, y otros restos celulares. El sobrenadante resultante fue centrifugado por 15 minutos a 8000 x g para obtener el pellet de mitocondrias. Dicha preparación fue lavada 4 veces con 10 ml de un buffer consistente en manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EDTA 0.1 mM, y Tris-HCl 1 mM, pH 7.4 (Buffer B), para remover microsomas contaminantes. Para efectuar mediciones en esta preparación de mitocondrias, el pellet final fue resuspendido en 30% glicerol en FBS a una concentración proteica de 250 ug/100 ul. La determinación de proteínas fue realizada por el método de Lowry (172), usando BSA como standard.

#### **Aislamiento de la membrana interna de mitocondrias de células de Leydig**

El pellet mitocondrial lavado fue resuspendido en buffer B, sometido a sonicación por 5 minutos a 40 watts, y centrifugado a 105.000 x g durante 60 minutos (181). El pellet de membrana

interna fue resuspendido con buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 7.4), a una concentracion proteica de 1 mg/ml.

Tanto las preparaciones mitocondriales como las de membranas internas fueron analizadas para la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa como marcador de pureza, encontrandose valores de 150 y 400 mU/ mg proteina, respectivamente. La actividad succinato deshidrogenasa fue valorada por el metodo de la reduccion de dicloroindofenol mediada por fenazina metosulfato a 38 oC, usando un coeficiente de extincion de 21 mM(e-1) cm(e-1) a 600 nm (182). Bajo estas condiciones, 1 mU fue definida como la cantidad de enzima capaz de reducir 1 nmol de dicloro indofenol/minuto. Para determinar el grado de contaminacion de la preparacion de membrana interna con membrana externa, se valoro la actividad de la enzima NADH-citocromo c reductasa insensible a rotenona (marcador de membrana externa) tanto en el pellet (membrana interna) como en el sobrenadante (membrana externa mas matriz mitocondrial) de la centrifugacion a 105.000 x g. El ensayo enzimatico se realizo a 30 oC como fue previamente descrito (183). Aproximadamente el 30% de la actividad total de la enzima se encontro en la preparacion de membrana interna.

#### **Determinacion de colesterol**

Las preparaciones de membrana interna mitocondrial fueron

utilizadas sin previa extracción para medir la concentración de colesterol libre utilizando un método fluorimétrico (184). Dicho método emplea colesterol-oxidasa para generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con ácido p-hidroxifenil acético, generando un producto fluorescente. La sensibilidad del ensayo fue de 0.01 µg de colesterol.

#### **Determinación de niveles circulantes de aminoglucetimidina**

Aminoglucetimidina fue valorada por un método colorimétrico que utiliza p-dimetilaminobenzaldehído (Reactivo de Ehrlich), después de extracción de los sueros con cloroformo (185). La recuperación de cantidades conocidas de aminoglucetimidina agregadas al suero fue de alrededor del 40%, por lo que se debió aplicar un factor de corrección apropiado para expresar los resultados obtenidos.

#### **Preparación de mitocondria adrenal precipitada con acetona**

Glandulas adrenales fueron obtenidas de ratas macho y homogenizadas en 5 volúmenes de buffer C (0.25 M sacarosa, 5 mM ditiotreitól y 50 mM buffer Tris-HCl pH 7.4). Los pasos subsiguientes fueron similares a los descritos anteriormente para la obtención de mitocondrias de células de Leydig. Los pellets mitocondriales fueron resuspendidos en agua destilada fría a una concentración proteica de aproximadamente 10 mg/ml. Posteriormente, 20 volúmenes de acetona helada fueron agregados y la

preparacion se deajo precipitar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La proteina precipitada fue sedimentada por centrifugacion a  $1500 \times g$  por 5 minutos a  $-15^{\circ}\text{C}$ , lavada con acetona helada y desecada en vacio. El material seco fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , siendo utilizado como fuente de la enzima de clivage de la cadena lateral del colesterol. Para algunos experimentos, el precipitado acetonic de mitocondrias de celulas de Leydig fue preparado de manera similar.

#### **Sintesis de pregnenolona y acido isocaproico marcado en mitocondria**

La produccion de pregnenolona en mitocondria fue en general valorada en un volumen final de 0.5 ml conteniendo buffer C, 100  $\mu\text{M}$  o 2.4 mM NADPH (Sigma Chemical Co., USA), 2 mM DL-isocitrato, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 400-500  $\mu\text{g}$  de proteina mitocondrial y 30% glicerol-PBS. Para detener el metabolismo de pregnenolona se le agrego a la preparacion 1  $\mu\text{M}$  cianocetona y 10  $\mu\text{M}$  espirolactona en etanol absoluto, evaporando el vehiculo bajo corriente de aire antes de la incubacion con las mitocondrias. Estudios preliminares habian demostrado que concentraciones de 0.5 mM Ca y 2 mM isocitrato eran optimas para la produccion de pregnenolona por mitocondrias de celulas de Leydig. En algunos experimentos, las suspensiones mitocondriales fueron dispersadas con un sonificador (Ultrasonic, Inc., Modelo W185) cuatro veces a

0oC por 15 segundos. Los precipitados acetonicos de mitocondrias de celulas de Leydig y adrenales fueron tambien tratados de esta manera. La produccion de pregnenolona fue iniciada por la adicion de NADPH e isocitrato despues de una preincubacion de las mitocondrias con buffer C conteniendo 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> for 5 minutos. Las incubaciones fueron realizadas a 34oC durante 10 minutos en condiciones aerobicas y con agitacion constante, y finalizadas por el agregado de 2 ml de cloruro de metileno. Los metabolitos fueron extraidos 3 veces con 6 ml de cloruro de metileno, y la capa organica fue utilizada para la determinacion de pregnenolona.

Para la determinacion de acido isocaproico marcado, mitocondrias intactas (no sonificadas) fueron incubadas con (26-14C)-colesterol (59.6 mCi/mmol, New England Nuclear, USA) en el mismo sistema descrito anteriormente. Colesterol marcado (100 uM) fue agregado en acetona (5 ul) al tubo de incubacion en presencia de los dos inhibidores metabolicos. Al final de la incubacion, 0.2 ml de la solucion fueron transferidos a tubos conteniendo 1.8 ml de 1 mM HgCl<sub>2</sub>-10 mM buffer glicina pH 9.5 a determinados tiempos (186). Las proteinas fueron precipitadas con acido tricloroacetico al 10%, y los sobrenadantes se ajustaron a pH 8-10 con NaOH concentrado. Las soluciones fueron sometidas a cromatografia en columna de 0.5 g de alumina (Calbiochem, poro 100-200), y el acido (14C)-isocaproico fue separado del

(14C)-colesterol. La recuperacion de acido (14C)-isocaproico fue siempre mayor del 95%, y el (14C)-colesterol eluido de la columna fue menor del 0.01%. Se realizo paralelamente un blanco en ausencia de isocitrato y NADPH.

#### **Filtracion en gel de sephacryl S-300**

El precipitado acetonicico de mitocondrias de celulas de Leydig (aproximadamente 95 mg) fue resuspendido en 2 ml de 50 mM buffer Tris-HCl pH 7.4, conteniendo 0.2 % emulgen 911. Esta suspension mitocondrial fue sujeta a sonicacion, como se describio anteriormente, y se dejo en hielo durante 1 hora. Luego, la suspension fue centrifugada a 105.000 x g durante 30 minutos usando un rotor Beckman Ti 60. Una parte del sobrenadante (1 ml) fue sembrado en una columna de Sephacryl S-300 (1.6 x 90 cm) equilibrada con buffer Tris-HCl conteniendo 0.2% Emulgen 911. La columna fue eluida con el mismo buffer a una velocidad de flujo de 309 ml/h. Las fracciones conteniendo la sustancia inhibidora mitocondrial fueron combinadas y concentradas usando conos de membrana Centriflo CF-25 (Amicon, Lexington, USA). Para estimacion de los radios de Stokes de la proteina mitocondrial se utilizaron como standards en la misma columna catalasa, aldolasa, BSA y ovalbumina (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia).

### **Isoelectroenfoque**

Las fracciones conteniendo la proteina mitocondrial preparada por filtracion en gel de Sephacryl S-300 fueron sometidas a isoelectroenfoque usando una columna LKB 8100-1 (LKB-Produkter AB, Bromma, Suecia). El isoelectroenfoque fue realizado a 4oC de acuerdo a metodos previamente publicados (187). Anfolitos de pH 3.5-10 (LKB) fueron empleados a una concentracion de 1%. Como agente solubilizante se uso Nonidet P-40 (Shell, Bethesda Research Laboratories, USA) a una concentracion de 0.25%. Despues de un enfoque de 2 dias a 2-5 oC, se recolectaron fracciones de 2.5 ml y sus pH fueron medidos a 20 oC con un pHmetro Beckman. Cada fraccion fue filtrada por conos Centriflo CF-25, lavados con 50 mM buffer Tris-HCl pH 7.4, y resuspendidos en 1 ml de buffer Tris-HCl conteniendo 0.2% Emulgen 911. La sustancia inhibidora fue ensayada en muestras de 0.1 ml.

### **Cromatografia de afinidad en 2',5' ADP-sepharosa 4B**

La preparacion mitocondrial precipitada con acetona (aproximadamente 25 mg) de celulas de Leydig provenientes de animales estimulados con 10 ug de hCG fue extraida con 50 mM buffer Tris-HCl pH 7.4 conteniendo 0.2% Emulgen 911 y sonicada como se describio mas arriba. Despues de una centrifugacion a 105.000 x g, 5.2 mg de proteina de la fraccion soluble fue sembrada en una columna de 0.5 g de 2',5' ADP-Sepharosa 4B (Pharmacia Fine

Chemicals, Suecia), equilibrada con buffer Tris-HCl conteniendo 0.2% Emulgen 911. La columna fue lavada con el mismo buffer a una velocidad de flujo de 4.62 ml/h a 40C. La fraccion adsorvida fue eluida con 0.5 M NaCl. La actividad inhibidora fue ensayada en muestras de 0.1 ml.

#### **Estudios realizados en humanos.**

Todos los estudios en humanos fueron realizados dentro de las normas eticas enunciadas en la Declaracion de Helsinki, luego de expreso consentimiento firmado.

#### **I) Pacientes con sindrome de insensibilidad a los androgenos**

a) **Preparacion de las celulas de Leydig.** Se estudio la produccion de testosterona in vitro por celulas de Leydig de dos pacientes de 18 años con sindrome de insensibilidad a los androgenos (feminizacion testicular). Los testiculos fueron extirpados por el equipo de cirugia del Hospital Alvarez de la Capital, los que fueron depositados en PBS frio y trasladados al Laboratorio. Inmediatamente fueron decapsulados con una hoja de bisturi y tratados con colagenasa como los testiculos de rata, con la sola diferencia de que el tratamiento enzimatico se prolongo por espacio de 30 minutos. El procedimiento posterior fue identico al descripto mas arriba. Como control se utilizaron celulas de Leydig de testiculo normal, proveniente de hombres operados por carcinoma de prostata.

**b) Produccion de testosterona por celulas de Leydig**

humanas. Las celulas de Leydig ( $0.5 \times 10^6$  en 0.5 ml) fueron incubadas durante 3 horas a  $34^{\circ}\text{C}$  bajo atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ -95% aire en presencia de 10 ng de hCG para lograr la maxima estimulacion. La produccion de testosterona se valoro por RIE tomando como parametro de estimulacion un set de celulas incubadas en ausencia de hCG.

**II) Pacientes oligo-astenospermicos**

La evaluacion dinamica in vivo de la funcion testicular del Hombre se realizo en 128 pacientes con edades comprendidas entre 21 y 37 años que consultaron por esterilidad en el Servicio de Andrologia del Hospital de Clinicas General San Martin de la Capital, quienes presentaban espermogramas patologicos y actividad sexual normal. Los exámenes clinicos y de laboratorio que incluyeron entre otros, hemograma, glucemia, y pruebas de funcionalidad hepatica, renal, tiroidea y suprarrenal no evidenciaron ninguna patologia. En todos los casos la concentracion circulante de prolactina fue normal. Los estudios inmunologicos realizados en semen y en el suero de ambos conyuges fueron negativos e incluyeron la investigacion de anticuerpos antiespermaticos de superficie (MAR test: mixed-agglutinating reactions, e Immunobeads: inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, especificas para espermatozoides adheridos a particulas de

poliacrilamida), y tests específicos para anticuerpos aglutinantes o inmovilizantes (Kibrick e Isojima). En ningún caso se obtuvo reacción positiva para VDRL y Sabin Feldman. Los estudios bacteriológicos para gérmenes comunes así como para micoplasma (*ureaplasma urealyticum*) fueron negativos tanto en la 1era. y 2da. porción de la micción, como en el semen. No se detectó chlamydias por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales en semen, orina o flujo vaginal de las parejas incluidas en este estudio.

Luego de determinar las características fisicoquímicas y morfológicas del semen se realizó el conteo espermático en una cámara Makler ultraplana con una videocámara receptora de la imagen del microscopio conectada a una computadora Pinecom modelo AT, lo que permitió, evitando la subjetividad en la observación, determinar la concentración de espermatozoides por ml, el porcentaje de movilidad, la linealidad de la trayectoria y la velocidad de migración, la cual en condiciones normales es de 25 micrones por segundo. Se emplearon como control 10 hombres normales con edades comprendidas entre 22 y 35 años, los que presentaban espermogramas normales y fertilidad verificada dentro de los 6 meses anteriores al estudio por haber logrado embarazos espontáneamente. Los pacientes fueron considerados oligo-astenospermicos por lo menos por 2 análisis de semen en los que demostró una disminución de la movilidad espermática y

una concentracion de 10-20 x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml.

### III) Pacientes con varicocele.

Se estudiaron 110 pacientes con varicocele grados I a III, con niveles normales de prolactina y gonadotrofinas. En todos los casos, se encontraron alteraciones seminales: 4 pacientes presentaban azoospermia, 54 oligospermia, y los restantes 52 tenian astenospermia. El varicocele se localizo en el testiculo izquierdo en 76 pacientes, mientras que fue bilateral en los restantes. De los pacientes con varicocele unilateral 14 presentaban disminuido el tamaño de ambos testiculos, mientras que otros 14 solo mostraron disminuido el tamaño del testiculo izquierdo. De los pacientes con varicocele bilateral, el tamaño de ambos testiculos se vio disminuido solo en 8 casos, mientras que en 7 casos se encontro disminuido el tamaño del testiculo izquierdo. El estudio de semen se realizo como se indica mas arriba para los pacientes oligo-astenospermicos.

### Respuesta testicular a la gonadotrofina corionica humana (Test de hCG).

A los pacientes oligo-astenospermicos se les extrajo 3 muestras basales de sangre con un intervalo de 15 minutos, e inmediatamente recibieron una inyeccion i.m. de 5000 UI de hCG (Endocorion, ELEA). Nuevas muestras de sangre fueron obtenidas a

las 2, 4, 24 y 48 horas posteriores a la misma. Para establecer el perfil de respuesta de los hombres normales, las muestras de sangre en este grupo fueron obtenidas a las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas despues de la inyeccion de hCG. Los sueros fueron conservados a -20oC hasta su procesamiento. En un pool de las 3 muestras basales se determino LH, FSH, testosterona, estradiol y 17 hidroxiprogesterona. En cada muestra obtenida luego del estimulo con hCG se determino testosterona, estradiol, 17 hidroxiprogesterona y hCG. Todas las muestras de suero de un mismo hombre se procesaron en un mismo RIE para evitar el error interensayo del metodo.

#### **Test de LHRH.**

a) **Agudo.** Se administraron 100 ug de LHRH (Luteolibarina ELEA) por via endovenosa a traves de un cateter y se extrajeron muestras de sangre para la determinacion de LH y FSH antes, y a los 30 y 60 minutos de la inyeccion.

b) **Infusion.** Se administraron 100 ug de LHRH disueltos en 240 ml de solucion fisiologica esteril, los cuales fueron administrados por via endovenosa durante 4 hs, a razon de 1 ml/min. Las muestras de sangre para la determinacion de LH y FSH fueron obtenidas antes y a las 1, 2, 3 y 4 hs de comenzada la infusion.

### **Tratamiento con Aminoglutetimida**

El tratamiento con el inhibidor de la actividad aromatasa consistio en la administracion de 1 g diario de la droga durante 90 dias a 22 pacientes. La administracion de aminoglutetimida se acompaño de 20 mg de hidrocortisona, para compensar el bloqueo suprarrenal ocasionado por el inhibidor. A los 30 dias de iniciado el tratamiento se repitio el test de hCG. A los 90 dias se repitio el analisis de semen.

### **Determinaciones hormonales**

La determinacion de LH y FSH se realizo por radioinmunoensayo de doble anticuerpo de acuerdo con tecnicas previamente descriptas (188). Los anticuerpos, estandares y hormonas para iodinacion fueron donados por el National Hormone and Pituitary Program perteneciente al National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Deseases (NIADDK), National Institutes of Health (NIH), USA. La iodinacion se realizo segun la tecnica de Hunter y Greenwood (189). El rango de eficiencia de iodinacion (n = 6) empleando 1 mCi de  $^{125}\text{I}$  (NEZ-033H, New England Nuclear, USA) y 2.5 ug de hormona, fue de 40 a 65% para FSH y de 35-55% para LH. La eficiencia fue calculada por la integracion de la radioactividad encontrada en los picos de hormona iodinada y de  $^{125}\text{I}$  libre, separados por cromatografia en Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia). El anticuerpo

utilizado en los RIAs como segundo anticuerpo fue obtenido en el Centro de Referencia de Radioinmunoensayo de La Plata por inyección en carnero de gamma globulina de conejo.

La determinación de prolactina se realizó por método de doble anticuerpo-Polietilenglicol, según técnicas previamente descritas (190). El anticuerpo, standard y hormona para iodación fueron donadas por el National Hormone and Pituitary Program, NIADDK, NIH, USA. La preparación hipofisaria NIADDK-hPRL-I-7 (AFP-9900) fue iodada por un método previamente descrito (191).

Los RIAs de testosterona y estradiol fueron desarrollados en el Centro de Referencia de RIE utilizando la técnica de Carbon Dextran 2:0.2 mg/tubo) para la separación de la fracción libre del trazador. La determinación de dichos esteroides en los sobrenadantes de las preparaciones celulares se realizó directamente, efectuando solamente las diluciones apropiadas. Para la determinación en suero, las muestras fueron extraídas con éter etílico, efectuando el RIE sobre el extracto etéreo evaporado. El antisuero anti-testosterona fue obtenido por inoculación a conejos del complejo T-6-oxima-BSA (Sigma), según método previamente descrito (192). Se empleó como trazador (1,2,6,7-<sup>3</sup>H)-testosterona (actividad específica 85-105 Ci/mmol, New England Nuclear, USA). El RIE se realizó en tubos de vidrio de 12 x 75 mm en un volumen final de 0.5 ml, utilizando como diluyente PBS

0.2 M conteniendo 0.1 % gelatina. Los tubos se incubaron 10 minutos a 50°C y 10 minutos a 4°C. Seguidamente se le agrego 0.1 ml de la suspension de carbon:dextran, agitando vigorosamente durante 10 segundos. Luego de 10 minutos de incubacion a 4°C, los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos, y los sobrenadantes recogidos en miniviales de polietileno (Polistor SA, Argentina), a los que se les agrego 1.5 ml de liquido de centelleo.

El antisuero anti-estradiol fue obtenido por inoculacion en conejos del complejo estradiol-6-oxima-BSA (Sigma). Se empleo como trazador (2,4,6,7-<sup>3</sup>H)-estradiol (actividad especifica 90-115 Ci/mmol, New England Nuclear, USA). La Tabla I muestra la especificidad de los anticuerpos de testosterona y estradiol empleados.

La determinacion de pregnenolona fue realizada por el metodo de Di Pietro y col (193).

La medicion de la radioactividad de las muestras de RIE se realizo en un contador automatico Nuclear Medical Laboratories, modelo in-V-tron 4010, con una eficiencia para <sup>125</sup>I del 75%, y en un contador de centelleo liquido Nuclear Chicago modelo 7000B, con una eficiencia del 45% para <sup>3</sup>H.

Los RIEs de dehidroepiandrosterona, 17 hidroxiprogesterona y androstenodiona fueron realizados con kits comerciales (Diagnostic Products Corporation, USA), utilizando trazadores

marcados con 125I.

La determinacion de cAMP se realizo por radioinmunoensayo en alicuotas de la suspension celular despues de la inmersion en una baño a ebullicion durante 10 minutos y luego de centrifugar a 1400 x g por 10 min.

Tabla I. Reaccion cruzada de diversos esteroides con antitestosterona y antiestradiol

Esteroides ensayado	Anti-T % de reaccion	Anti-E2 % de reaccion
Testosterona	100	<0.01
5 a dihidrotestosterona	88	<0.01
5 a 3 a androstanodiol	17	<0.01
5 a 3 B androstanodiol	32	<0.01
D 5 androstenodiol	8	0.04
D 4 androstenodiona	58	<0.01
Dehidroepiandrosterona	<0.01	<0.01
Sulfato de Dehidroepiandr.	<0.01	<0.01
Androsterona	<0.01	<0.01
Etiocolanona	<0.01	<0.01
17 B estradiol	<0.01	100
Estrona	0.68	6
Estriol	<0.01	2
Progesterona	<0.01	<0.01
17 OH Progesterona	<0.02	<0.01
Pregnenolona	<0.01	<0.01
Pregnandiol	<0.01	<0.01
17 HO pregnenolona	<0.01	<0.01
Cortisol	<0.01	<0.01
Cortisona	<0.01	<0.01
Corticosterona	<0.01	<0.01
11 desoxicortisol	<0.01	<0.01
11 desoxicorticosterona	1.2	0.16
Aldosterona	<0.01	0.03

### Estudio estadístico

El estudio estadístico se realizo empleando el test "t" de Student para muestras pareadas. Una diferencia con valor de  $p < 0.01$  fue considerada estadísticamente significativa.

## R E S U L T A D O S

### **I. Estudios fisicos y bioquimicos de la celula de Leydig.**

La purificacion parcial de preparaciones crudas de celulas de Leydig ha sido lograda en varios Laboratorios empleando gradientes de densidad con Metrizamida (194,195), Ficoll (195,196), Ficoll-Paque (195) y Percoll (197). De todos estos metodos, el gradiente de Metrizamida ha mostrado producir preparaciones celulares con el mas alto grado de pureza y completamente separadas de los globulos rojos. La limitacion de estos procedimientos es la relativa escasa cantidad de celulas que pueden cargarse en el gradiente (no mas de 100 millones). Esto, sumado al hecho de que las preparaciones crudas de celulas intersticiales del testiculo contienen aproximadamente un 20-25% de celulas de Leydig, hace que para lograr un cantidad importante de celulas puras se deban preparar numerosos gradientes, volviendo este procedimiento impractico.

Por tal motivo, hemos intentado aplicar el metodo de la elutriacion centrifuga (198), basado en la separacion de celulas por su velocidad de sedimentacion, el cual ha demostrado tener mayor capacidad de carga y mayor velocidad de resolucio.

El elutriador consiste en un rotor de centrifuga conteniendo una camara de separacion, la cual tiene un orificio de entrada y uno de salida de liquido que es inyectado desde el exterior

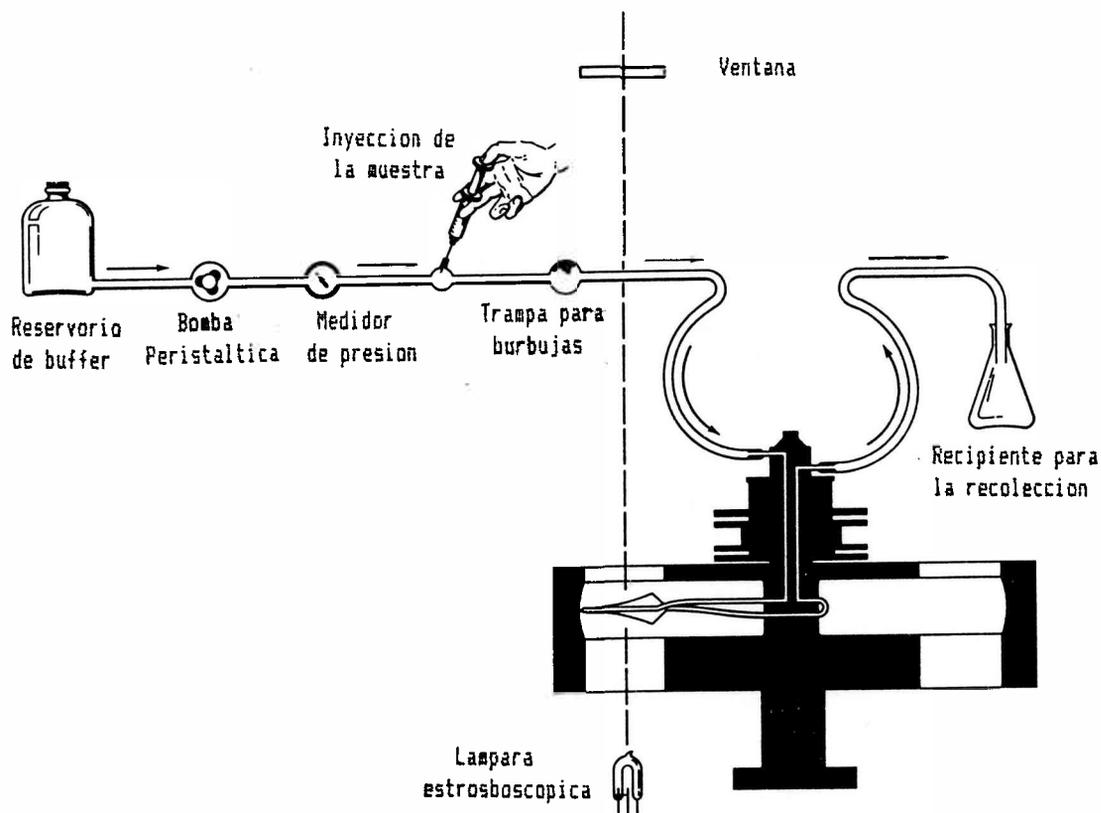
mientras el rotor gira (Fig. 4). Una ventana ubicada en la tapa de la centrifuga permite observar la camara, gracias a la iluminacion porporcionada por una luz estroboscopica. Las son inyectadas a traves de una bomba peristaltica que permite regular la velocidad del flujo de entrada. Una vez dentro de la camara en movimiento las celulas se encuentran sometidas a dos fuerzas opuestas: por una lado la fuerza centrifuga, producida por giro del rotor, y por el otro la fuerza centripeta provocada por el flujo de entrada de liquido (Fig 5). La velocidad de flujo para cargar las celulas en la camara debe ser tal que no supere la fuerza centrifuga, de modo que las celulas que entran quedan retenidas en la camara. Mientras esto ocurre la velocidad de giro del rotor se mantiene constante a 2000 rpm.

Una vez en el interior de la camara de separacion, las celulas se acomodan de acuerdo a sus velocidades de sedimentacion, proceso regido por la siguiente ecuacion:

$$s = 1.93 \times f/R^2$$

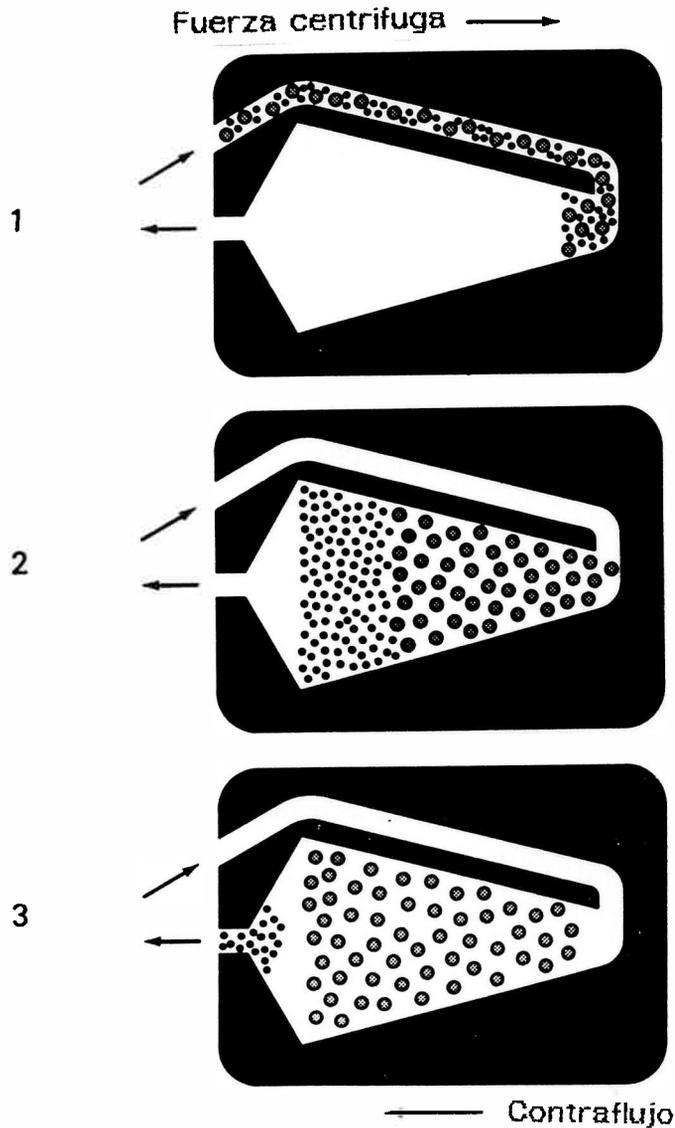
donde s es la velocidad de sedimentacion (mm/h.g), f es el flujo volumetrico (ml/min), R es la velocidad del rotor expresada en miles de rpm, y 1.93 es una constante que involucra las caracteristicas del rotor y la camara y las conversiones de minutos a horas y de centimetros a milimetros.

Cuando se ha logrado el equilibrio, el aumento gradual de la velocidad de flujo permite ir desalojando la camara de las



**FIGURA 4. El sistema de la elutriacion centrifuga.**

El buffer o las muestras son impulsados hacia la camara de separacion por medio de una bomba peristaltica que regula la velocidad del flujo. La recoleccion se efectua en el lado opuesto despues que las celulas salen de la camara. El procedimiento puede ser observado desde el exterior mediante una abertura efectuada en la tapa de la centrifuga.



**FIGURA 5. La camara de separacion celular.**

1. Las células en suspensión entran en la cámara por el fondo de la misma, impulsadas por la bomba peristáltica.
2. Las células se acomodan de acuerdo a su velocidad de sedimentación balanceadas por el flujo contrario a la fuerza centrífuga.
3. Cuando el flujo aumenta, las células más livianas que se habían colocado en la parte superior son desalojadas.

celulas mas livianas. De esta forma se van recogiendo en el exterior de la centrifuga, diferentes fracciones celulares. Al finalizar el procedimiento se detiene el rotor, de modo que se recogen todas las celulas que aun permanecian en la camara (wash out). La tincion especifica de las celulas recogidas utilizando el metodo de la 3 B hidroxi-esteroide deshidrogenasa permitio determinar las fracciones conteniendo las celulas de Leydig (Tabla II).

Tabla II. Elutriacion centrifuga de celulas intersticiales de testiculo de rata adulta.

Fraccion Numero	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Flujo (ml/min)	7	10	13	15	17.5	20	25	30	35	40	45.5	Wash out
Vel. Sed. (mm/h.g)	3.3	4.8	6.2	7.2	8.4	9.6	12	14.4	16.8	19.3	22	>22
Celulas recup. (%)	56	2.1	11	4.2	3.5	3.4	4.0	3.4	3.0	3.5	2.8	3.1
Celulas de Leydig (%)	0	0	0.9	1.0	2.5	7.0	12	93	95	94	92	93

### I.1-Analisis morfologico y funcional de las fracciones

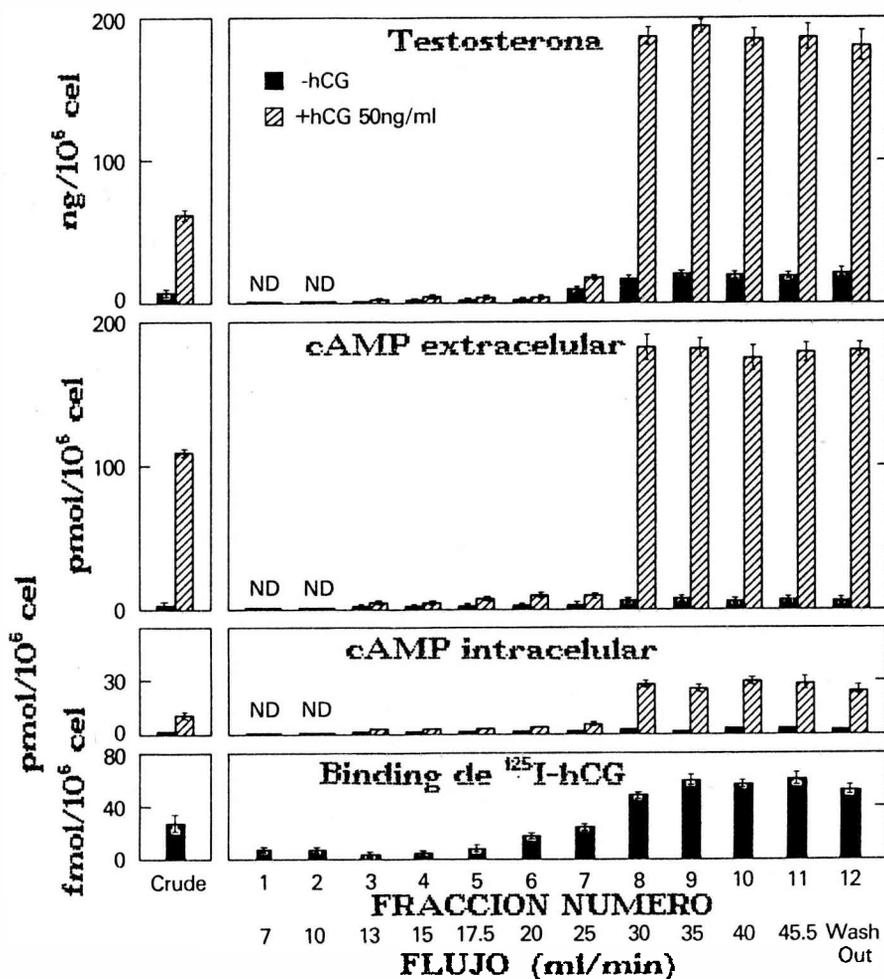
La fraccion 1 contenia la mayor parte de los eritrocitos presentes en la preparacion cruda, con un pequeño porcentaje presente tambien en la fraccion 1. La microscopia electronica revelo ademas que las fracciones 1 a 7 eran heterogeneas e incluian la mayoria de las celulas contaminantes de los tubulos, macrofagos, celulas endoteliales, celulas de Leydig dañadas y

restos celulares. Solo una reducida proporción de estos elementos (< 4%) presentaban la típica estructura de una célula de Leydig, y fueron localizadas principalmente en las fracciones 6 y 7. Por el contrario, las fracciones 8 a 12 contenían la mayor parte de las células de Leydig intactas. La ultraestructura de una célula de Leydig de rata madura incluye un abundante retículo endoplasmático liso, mitocondrias con pronunciadas crestas internas, un gran núcleo con un anillo fino de heterocromatina conteniendo 2 nucleolos, y abundantes gotas de lípidos diseminadas en el citoplasma (199). El tamaño de las células de Leydig en las fracciones 8-12 fue de  $120 \pm 38 \mu m^2$  (media  $\pm$  DS), similar al reportado por Risbridger y col (200) y Mori y col (201).

Las fracciones 1 a 7, colectadas entre 7 y 25 ml/min contenían el 80-85% del total de células aplicadas a la elutriación, con menos del 4% de células de Leydig teñidas por técnicas citoquímicas, mientras que las fracciones colectadas por encima de 25 ml/min, contenían 15-20 % de las células aplicadas, con 90-95% de células de Leydig. El tipo celular contaminante de esta preparación resultó ser espermatocitos en el estado de paquitene, a juzgar por la presencia de complejos sinaptolemáticos en sus núcleos asociados a fibrillas compactas de cromatina (202). Una pequeña y variable proporción de linfocitos fue habitualmente encontrada en estas fracciones, reflejando la

capacidad de estas células a unirse a células de Leydig formando típicas rosetas (203).

La actividad funcional de las fracciones celulares separadas por elutriación fue evaluada mediante la incubación *in vitro* en incubador metabólico, en presencia o no de hCG en el medio de incubación para lograr máxima estimulación de las células de Leydig (Fig. 6). En ensayos paralelos se valoró la producción de testosterona, cAMP extra- e intra-celular, y la capacidad de unión de la  $(^{125}\text{I})\text{-hCG}$ . Estos resultados demostraron que las fracciones con células más pesadas (Fracciones 8 a 12) poseían la mayor producción hormonal y la mayor capacidad de unión a la hCG marcada. Por el contrario, las fracciones 1 y 2, conteniendo células con la más baja velocidad de sedimentación no mostraron producción de testosterona ni cAMP. Las fracciones 3 a 7 si bien tenían actividad enzimática, la misma fue poco significativa, y debida a células de Leydig intactas contaminantes. La capacidad de unión a la hCG marcada fue baja en esas fracciones pero ligeramente aumentada en las fracciones 6 y 7, aun con baja actividad metabólica. Micrografía electrónica y autoradiografía electrónica mostraron que las fracciones 1 a 7 contenían células dañadas y restos membranales con capacidad de binding pero sin actividad esteroidogénica. Por el contrario, la radioactividad encontrada en las fracciones 8 a 12 fue totalmente ligada a membranas de células intactas. La especificidad del binding fue



**FIGURA 6. Elutriación centrifuga de células intersticiales dispersadas con colagenasa.**

Las fracciones fueron colectadas como se indica en la Tabla 2. Las células de la preparación cruda y las de las distintas fracciones fueron individualmente pelleteadas, resuspendidas y contadas. Aproximadamente 1 millón de células nucleadas/ml fueron incubadas en un agitador metabólico a 35 °C por 3 h bajo atmósfera de 95% O<sub>2</sub>:5% CO<sub>2</sub> con o sin 50 ng/ml de hCG (para la producción de testosterona y cAMP), o con 200000 cpm de <sup>125</sup>I-hCG (5-10 ng), con o sin 10 µg de hCG fría. Los resultados son la media ± DS de incubaciones por triplicado. ND: No detectable.

confirmada por la ausencia de granulos de plata asociados a otros tipos celulares y por la ausencia de granulos de plata en incubaciones con exceso de hCG fria.

### **I.2-Gradiente de Metrizamida de celulas elutriadas**

Con el objeto de observar el comportamiento en el gradiente de las celulas de Leydig fraccionadas por elutriacion centrifuga se prepararon 2 tipos de gradiente: Gradiente a (de 14 a 32%) y Gradiente b (de 16 a 24 %). La preparacion cruda de celulas intersticiales fue separada en dos fracciones principales: Fraccion H (heterogenea, conteniendo las celulas de las fracciones 1 a 7) y Fraccion L (rica en celulas de Leydig, conteniendo las celulas de las fracciones 8 a 12). Ambas fracciones fueron aplicadas en distintos experimentos a los dos tipos de gradientes (Fig. 7).

**Gradiente a:** La Fraccion L fue separada en 4 bandas, de las cuales solo las bandas II, III y IV contengan celulas de Leydig. La banda I contenia los contaminantes espermatozoides paquitene. Por su parte, la Fraccion H fue separada en 5 bandas, conteniendo linfocitos, celulas germinales, celulas endoteliales, celulas de Leydig dañadas y restos celulares. La banda V solo contenia eritrocitos, mostrando ser el componente celular mas denso. La Tabla III muestra la distribucion de celulas en el gradiente.

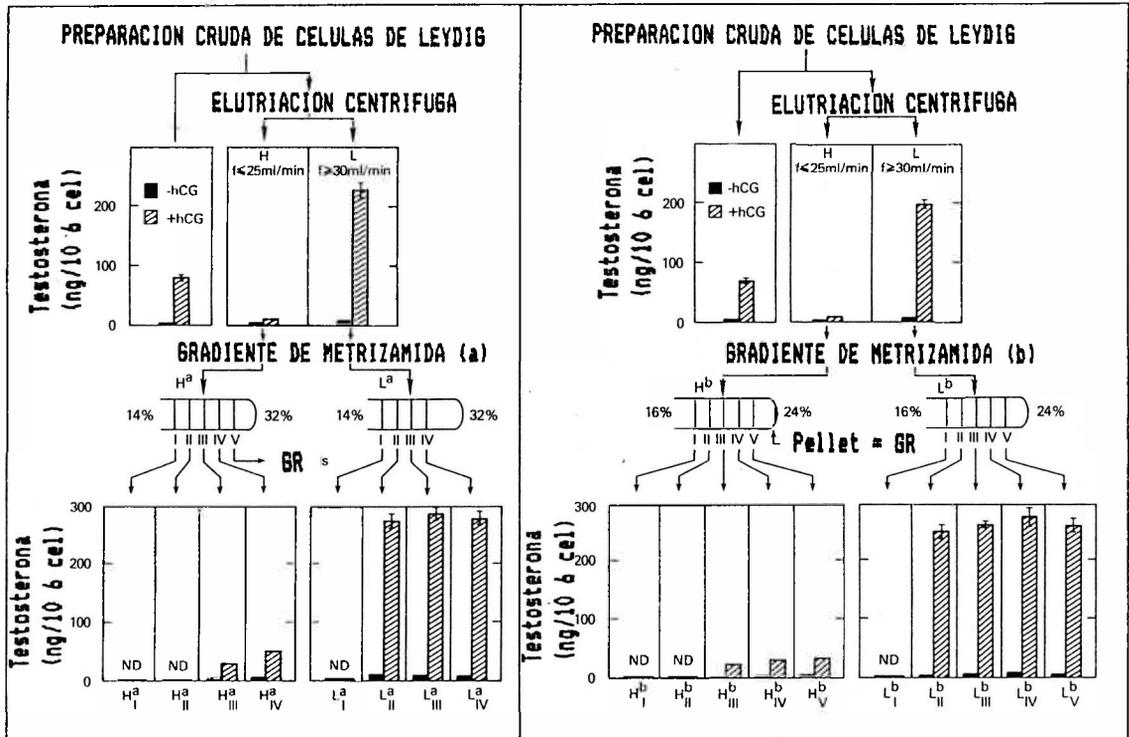


FIGURA 7. Subfraccionamiento en Gradientes de Metrizamida de las fracciones H y L obtenidas por elutriación centrifuga. Se utilizaron 2 tipos de gradientes : (a) 14-32% y (b) 16-24%. Las bandas celulares fueron separadas, centrifugadas, lavadas y luego incubadas para la producción de testosterona. Los resultados son la media  $\pm$  DS de incubaciones por triplicado. ND: No detectable.

Tabla III. Separacion en el gradiente a (14-32% Metrizamida) de las Fracciones H y L obtenidas por elutriacion.

	HI	HII	HIII	HIV	HV
Densidad (g/ml)	1.049	1.078	1.086	1.105	1.148
Celulas encontradas (%)	43	45	8	4	0
Celulas de Leydig (%)	0	0	5	10	0
	LI	LII	LIII	LIV	-
Densidad (g/ml)	1.053	1.080	1.087	1.106	-
Celulas encontradas (%)	10	10	58	22	-
Celulas de Leydig (%)	0	100	100	100	-

**Gradiente b:** La Fraccion L fue separada en 5 bandas. Todas contenian celulas de Leydig intactas excepto la I, que contenia los espermatozoides paquitene. La fraccion H fue tambien separada en 5 bandas, solo que los eritrocitos esta vez quedaron en el pellet. La Tabla IV muestra la distribucion de celulas en el gradiente.

Tabla IV. Separacion en el gradiente b (16-24% Metrizamida) de las Fracciones H y L obtenidas por elutriacion.

	HI	HII	HIII	HIV	HV
Densidad (g/ml)	1.048	1.069	1.090	1.099	1.108
Celulas encontradas (%)	47	39	5.2	6.4	2.4
Celulas de Leydig (%)	0	0	3	9	12
	LI	LII	LIII	LIV	LV
Densidad (g/ml)	1.048	1.075	1.088	1.098	1.110
Celulas encontradas (%)	12.8	11.6	14	31	30.6
Celulas de Leydig (%)	0	95	100	100	100

El analisis funcional de todas estas bandas demostro que la produccion de testosterona in vitro solo fue encontrada en aquellas que contenian celulas de Leydig intactas (Fig. 7, paneles inferiores).

### **I.3-Elutriacion centrifuga de celulas separadas en el gradiente de Metrizamida.**

Con el proposito de comparar los resultados, se hicieron separaciones en el sentido inverso al expuesto anteriormente. Para este fin se utilizaron gradientes de Metrizamida de 14-32%, el cual concentra las celulas de Leydig en las bandas II, III y IV. La separacion por elutriacion de dichas bandas demostraron que las celulas de Leydig se separaban nuevamente en diferentes velocidades de sedimentacion, pero con capacidad esteroidogenica y contenido de receptores similares entre si (Fig. 8). Las celulas encontradas en las fracciones de 20 y 25 ml/min contenian principalmente linfocitos, celulas endoteliales y germinales y una menor proporcion de celulas de Leydig.

Estos resultados han demostrado que las celulas de Leydig de una preparacion de celulas intersticiales obtenidas por colagenizacion de testiculos de rata adulta presentan diferentes caracteristica gravitatorias (velocidad de sedimentacion y densidad), pero identica actividad biologica, sugiriendo la

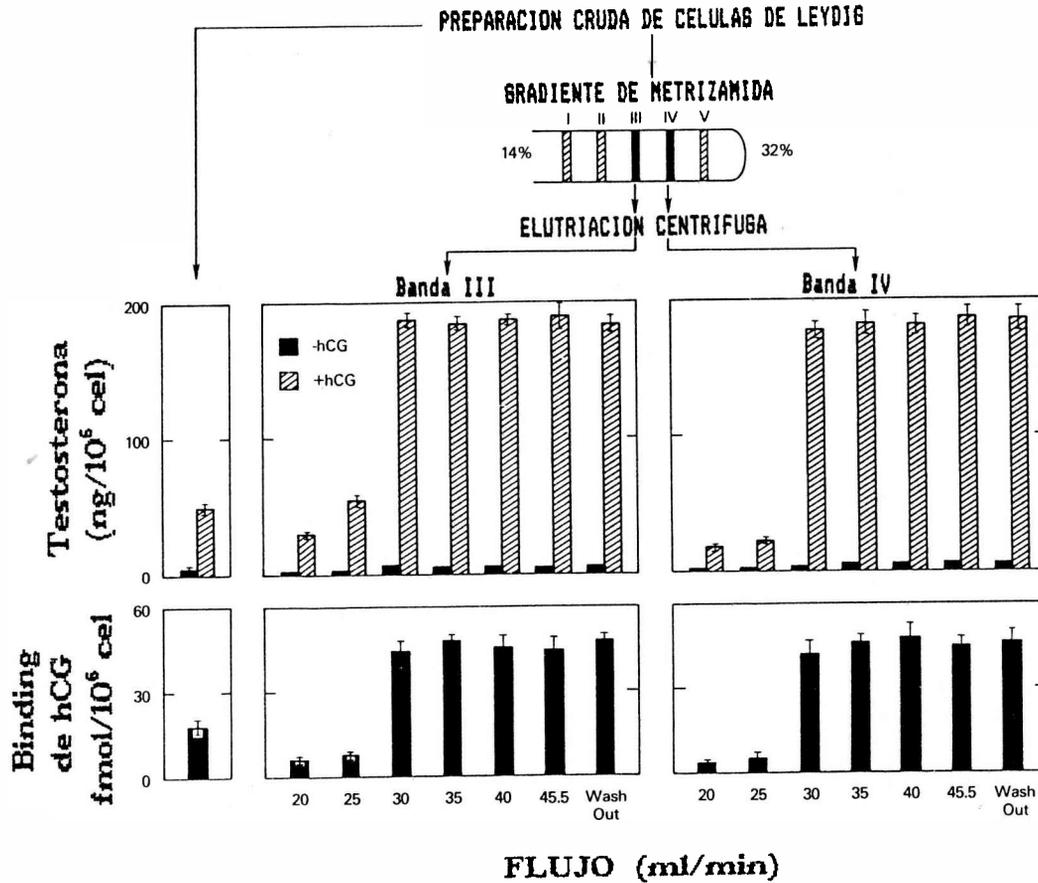


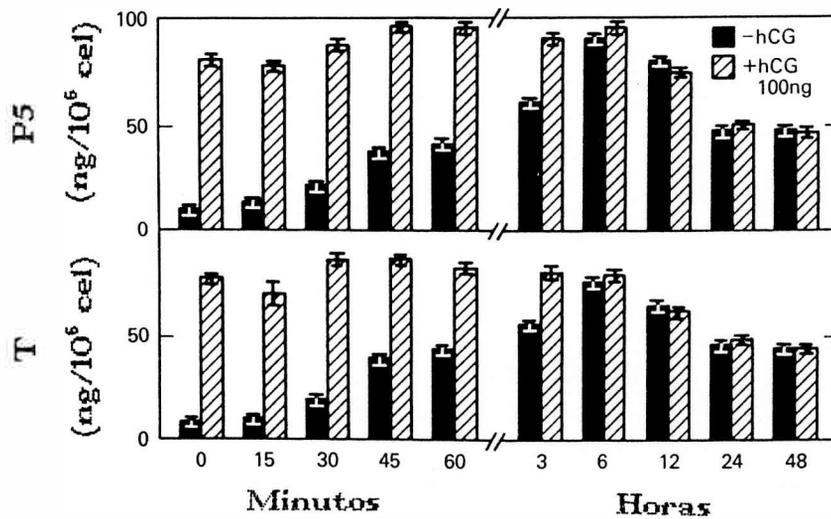
FIGURA 8. Elutriacion centrifuga de células de Leydig previamente purificadas por Gradiente de Metrizamida. La preparacion intersticial cruda fue separada primeramente en gradiente de metrizamida de 14-32%. Las bandas III y IV (con mayor proporcion de células de Leydig) fueron entonces elutriadas separadamente. Las incubaciones fueron realizadas como se indica en la leyenda de la Fig. 6.

existencia de solo una poblacion de celulas activas.

## II- Accion de la gonadotrofina en la celula de Leydig

### II.1-Sobre la secrecion de testosterona y pregnenolona.

Ratas adultas fueron tratadas con solucion fisiologica (Grupo control), o 10 ug de hCG por via subcutanea. Los animales (en grupos de a 5) fueron sacrificados para la separacion de celulas de Leydig a los 15, 30, 45 minutos, 1, 3, 12, 24 y 48 horas posteriores al tratamiento. Las celulas de Leydig fueron incubadas en parte para evaluar la produccion de testosterona y pregnenolona, y en parte para determinar el numero de receptores de LH. Los esteroides producidos por las celulas fueron evaluados con y sin el agregado de 100 ng de hCG en el medio de cultivo con el objeto de provocar una maxima estimulacion y compararla con la produccion basal. Como se muestra en la Figura 9, la administracion del estimulo in vivo hizo que la produccion basal de cada grupo (barras negras) fuera aumentando hasta las 6 hs (efecto trofico), tiempo en que se hizo similar a la respuesta maxima obtenida in vitro (barras rayadas). Despues de las 12 hs la capacidad esteroidogenica fue disminuyendo, desapareciendo las diferencias entre el basal y el estimulado (efecto desensibilizante). Dado que la disminucion de las respuestas se vio tanto para testosterona como para pregnenolona, es posible inferir que la lesion o bloqueo enzimatico parcial estaria



TIEMPO DESPUES DEL TRATAMIENTO

FIGURA 9. Produccion de pregnenolona y testosterona in vitro por celulas de Leydig aisladas de ratas adultas en funcion del tiempo posterior a la inyeccion subcutanea de 10 ug de hCG.

Aproximadamente 1 millon de celulas fueron incubadas por 3 horas a 34 oC sin (barras llenas) y con (barras rayadas) el agregado de hCG en el medio de incubacion. Los valores representan la media  $\pm$  DS de 3 incubaciones.

ubicado en un paso anterior a la síntesis de este último esteroide.

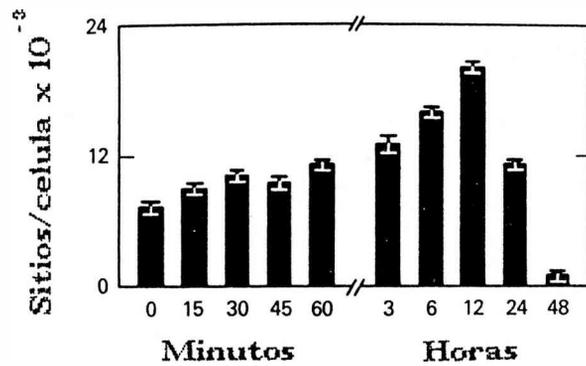
### **II.2-Sobre el número de receptores de LH.**

El número de sitios receptores de LH sufrió un incremento hasta las 12 hs (up-regulation), disminuyendo posteriormente (Fig. 10), hasta valores prácticamente no detectables (down-regulation). Es interesante notar que la disminución de las respuestas esteroidogénicas se hizo evidente antes que la pérdida de los receptores, indicando la independencia entre los dos fenómenos.

### **II.3-Sobre la actividad de las RNA Polimerasas.**

Con el objeto de evaluar los cambios transcripcionales inducidos por la hormona trófica se determinó la actividad RNA polimerasa en núcleos de células de Leydig tratadas con una dosis desensibilizante de hCG.

La valoración de la actividad de las RNA polimerasas se hizo aprovechando la diferente sensibilidad de las mismas a la  $\alpha$ -amanitina y a la actinomicina D. La Fig. 11 muestra la inhibición provocada por los antibióticos sobre la incorporación del UTP radiactivo. Dado que la RNA polimerasa III resultó ser solo el 5-7% de la actividad total, los siguientes experimentos fueron realizados tomando la suma de las RNA polimerasas I+III y



TIEMPO DESPUES DEL TRATAMIENTO

FIGURA 10. Numero de receptores de LH obtenido por incubacion de las celulas de Leydig con (125-I)-hCG. Los animales fueron tratados como se indica en la Fig. 9. Los valores representan la media  $\pm$  DS de 3 incubaciones.

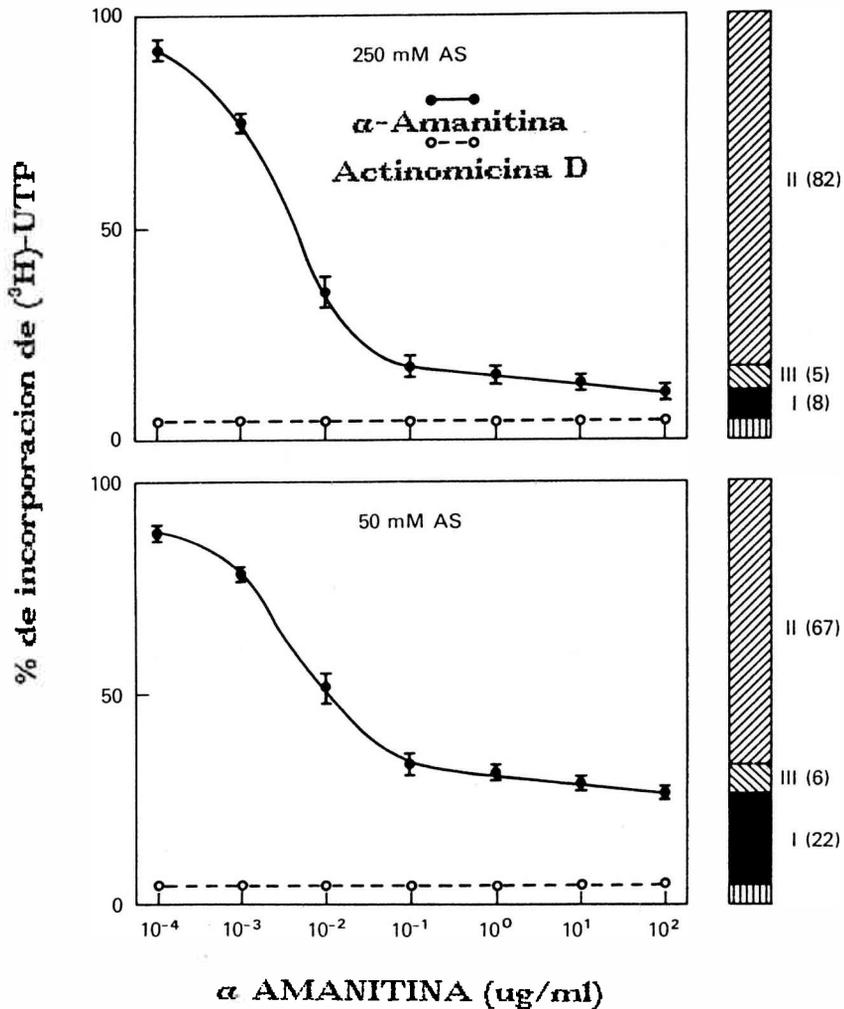


FIGURA 11. Efecto de alfa amanitina y actinomicina D sobre la incorporación de (3H)-UTP al RNA de nucleos de células de Leydig.

30  $\mu$ l de la preparación nuclear fueron incubados por 10 min a 32°C con 30  $\mu$ l de la mezcla de reacción mas 250 mM (arriba) o 50 mM (abajo) de sulfato de amonio (AS) como sigue: 1) sin nuevos agregados; 2) con 0.0001-100  $\mu$ g/ml de alfa amanitina; y 3) con 10  $\mu$ g/ml de actinomicina D. Las barras (derecha) indican la contribución de cada una de las 3 RNA polimerasas a la incorporación total de (3H)-UTP. Los resultados son la media  $\pm$  DS de 3 ensayos.

la II. La actividad de la RNA polimerasa II fue mayor en condiciones de alta fuerza ionica (200 mM de sulfato de amonio), mientras que la de la RNA polimerasa I fue mayor a baja fuerza ionica (50 mM sulfato de amonio). La actividad de las 3 polimerasas fue linear en un rango de 5 a 30 ug de DNA y valoradas dentro de los 10 minutos de incubacion.

El tratamiento de los animales con 10 ug de hCG causo un marcado incremento inicial en las RNA polimerasas II y I+III dentro de los 30 min despues de la inyeccion, alcanzando niveles maximos alrededor de los 45 min ( $180 \pm 6\%$  y  $162 \pm 20$  del valor control, respectivamente), volviendo a los valores basales a los 60 min aproximadamente (Fig. 12). Un segundo y mas sostenido incremento en la actividad de dichas enzimas se observo entre las 12 y las 24 hs post-hCG ( $212 \pm 12\%$  y  $180 \pm 10\%$  del valor control), manteniendose hasta por lo menos 48 hs post-hCG. La actividad de las RNA polimerasas es mayor cuando se evalua en condiciones de alta fuerza ionica debido a que el desenrollamiento del DNA hace que las cadenas de la doble helice esten mas expuestas a la accion enzimatica. Sin embargo, en estudios previos (204) hemos demostrado que si bien hay diferencias cuantitativas no hay diferencias cualitativas en el patron de respuesta realizando el ensayo de las polimerasas en condiciones de baja o alta fuerza ionica, y en consecuencia, todos los ensayos subsiguientes fueron realizados en condiciones de alta

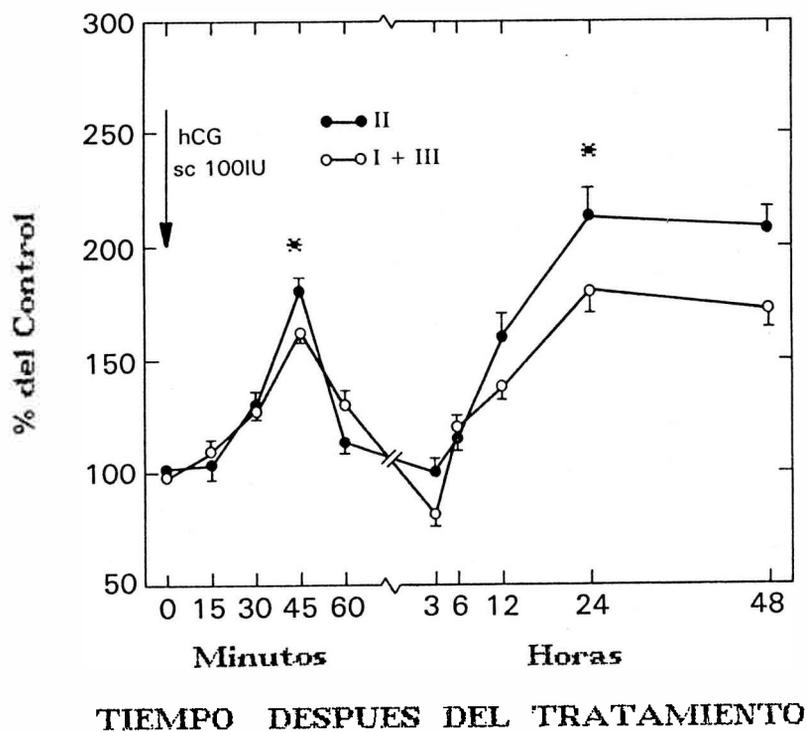


FIGURA 12. Efecto de la hCG sobre las actividades de las RNA polimerasas II y I+III de nucleos de celulas de Leydig evaluadas en condiciones de alta fuerza ionica. Las ratas fueron tratadas como se indica en la Fig. 6. Los resultados son la media  $\pm$  DS de 3 experimentos. (\*) =  $p < 0.05$ .

fuerza ionica.

#### **II.4-Sobre la actividad templante de la cromatina.**

Con el objeto de determinar si el incremento en el proceso de transcripcion inducido por el estimulo gonadotrofico era debido a alteraciones de la actividad templante de la cromatina o a un incremento de la actividad de las RNA polimerasas, cromatina de celulas de Leydig aisladas de ratas control, asi como de ratas tratadas con 10 ug de hCG, fueron incubadas con RNA polimerasa de Escherichia coli. Se eligieron para ello los tiempos de mayor actividad polimerasa (45 min y 24 h post-hCG). No se observaron cambios significativos en la actividad templante de la cromatina que justifiquen los cambios observados en las enzimas (Fig. 13). Resultados similares fueron observados cuando utilizamos RNA polimerasa II de eucariotes (semilla de trigo) (204)

#### **III. Efectos de diferentes dosis de hCG**

La estimulacion de la actividad de las RNA polimerasas fue observada tambien con dosis menores de hCG (0.1 y 1.0 ug), pero no de una manera dosis-dependiente, lo cual sugiere que aun bajas concentraciones de hCG son capaces de provocar un maxima estimulacion de dichas enzimas (Fig. 14). En cuanto a la capacidad esteroidogonica, las celulas de Leydig aisladas de los animales tratados con 3 dosis de hCG por 45 minutos mostraron un incremento en la produccion de pregnenolona y testosterona tanto

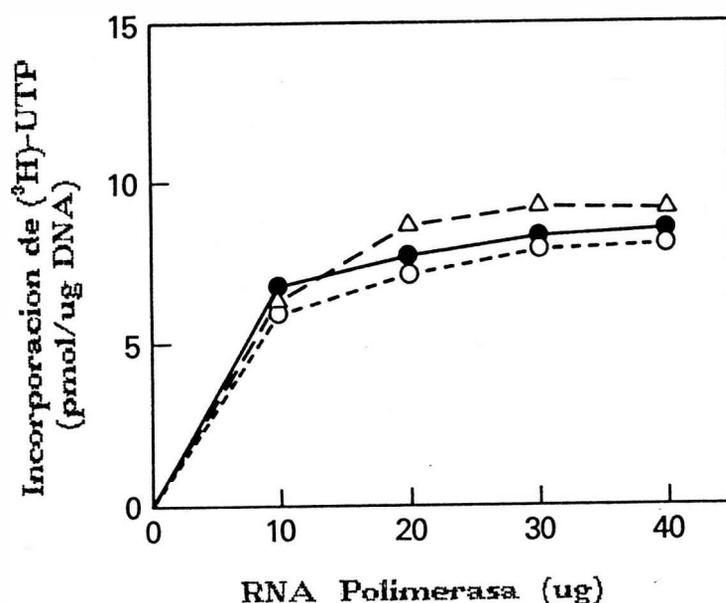


FIGURA 13. Actividad templante de la cromatina de células de Leydig.

Se incubaron por separado durante 30 minutos a 37 °C 1.5 ug de DNA cromatinico de células de Leydig obtenidas de ratas control (O) y tratadas con hCG por 45 minutos (●) y 24 horas (Δ), con cantidades crecientes de RNA polimerasa de *E. coli* en ausencia de nucleótidos. Luego, los nucleótidos fueron agregados junto con 100 ug de heparina y 5 ug de rifampicina. La reacción se continuó por 15 minutos más a 37 °C y se detuvo, como se indica en la sección Material y Métodos.

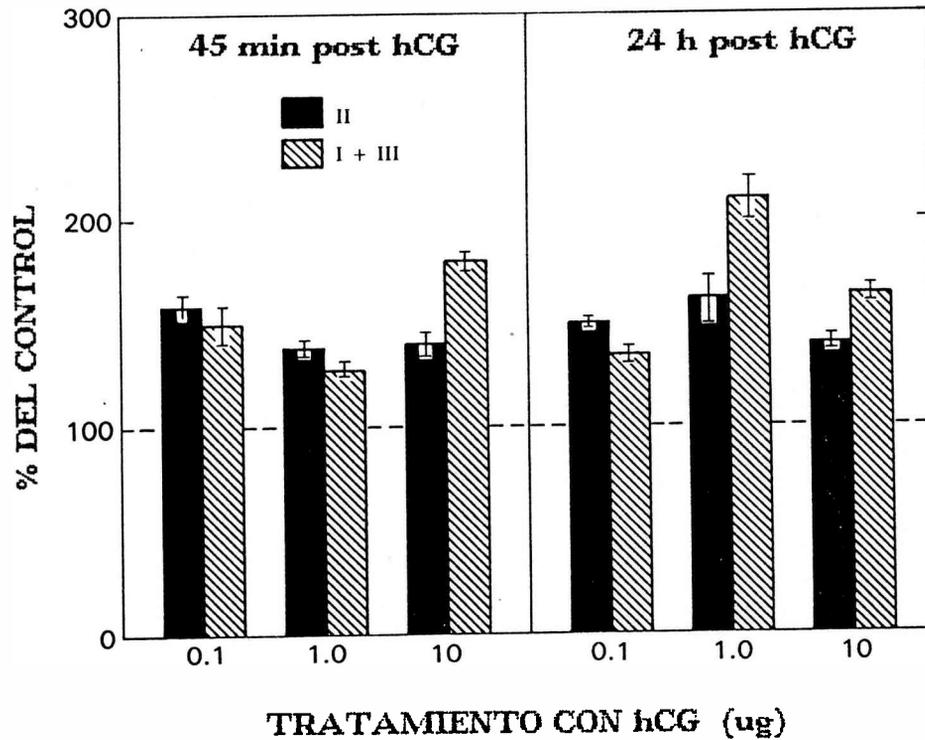


FIGURA 14. Actividad relativa de las RNA polimerasas en los picos de estimulación. Las barras indican el aumento de la actividad respecto del basal (100%) luego de la administración de 3 dosis de hCG. Los resultados son la media  $\pm$  de 3 experimentos.

en las células incubadas sin hCG como con las que se incubaron con hCG en el medio (Fig. 15, centro). Además, el aumento de la esteroidogénesis se hizo más pronunciado cuanto mayor fue la dosis de hCG administrada, debido a un primer efecto trófico de la gonadotropina. Por el contrario, la persistencia del estímulo durante 24 hs con las dosis de 1 y 10 ug de hCG hizo que las respuestas *in vitro* de pregnenolona y testosterona a la hCG agregada al medio fueran abolidas (Fig. 15, derecha). La dosis de 0.1 ug de hCG provocó a las 24 hs un pronunciado incremento en la respuesta de pregnenolona (del 167% respecto de la respuesta del control), no acompañado por una estimulación de igual magnitud en la producción de testosterona (del 125%). Esta diferencia entre las respuestas de pregnenolona y testosterona indican un bloqueo parcial en la conversión de pregnenolona a testosterona evidenciado solo con la menor dosis de hCG (lesión biosintética lejana). La ausencia de respuesta tanto de pregnenolona como de testosterona con dosis mayores de hCG indican un bloqueo previo a la síntesis de pregnenolona (lesión biosintética cercana).

#### **IV. Papel del Estradiol**

Para investigar el papel del estradiol en este proceso de desensibilización de la célula de Leydig, se hicieron 2 experimentos:

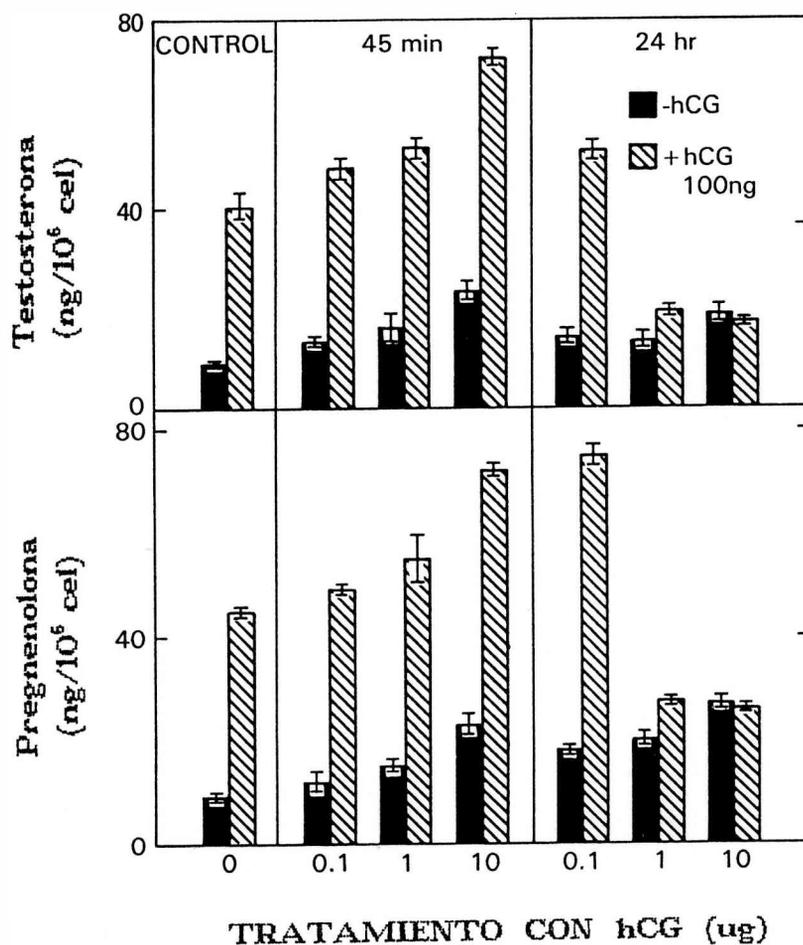


FIGURA 15. Produccion de pregnenolona y testosterona por celulas de Leydig aisladas de ratas control y tratadas con 0.1, 1.0 o 10 ug de hCG por via subcutanea durante 45 minutos o 24 horas.

Aproximadamente 1 millon de celulas fueron incubadas por 3 horas a 34 oC sin (barras llenas) y con (barras rayadas) el agregado de 100 ng/ml de hCG en el medio de incubacion. Los valores representan la media  $\pm$  DS de 3 incubaciones.

1.- Tratamiento de ratas con estradiol, con el objeto de reproducir la estimulación de las RNA polimerasas que se observa con hCG, y

2.- Tratamiento de ratas con hCG y antiestrogenos (Tamoxifen, Aminoglutetimida y Androstatriendiona), con el objeto de bloquear el estradiol producido como consecuencia de la administración de la hCG.

**IV.1-Tratamiento con Estradiol.** La administración de estradiol a ratas hipofisectomizadas indujo un aumento de las RNA polimerasas similar al encontrado con hCG sola, confirmando un efecto estimulador de la actividad nuclear (Fig. 16).

**IV.2-Tratamiento con antiestrogenos.** Tanto la administración de antiestrogenos (Tamoxifen), como la de inhibidores de la síntesis de estradiol (aminoglutetimida y androstatriendiona) abolieron la estimulación de las RNA polimerasas inducida por hCG, fortaleciendo la idea de que este esteroide es el mediador del efecto negativo que induce la gonadotrofina a altas dosis (Fig 17).

Estos hallazgos han demostrado que la estimulación bifásica de las RNA polimerasas por hCG es mediada por estradiol, dado que la activación enzimática es abolida por antiestrogenos e

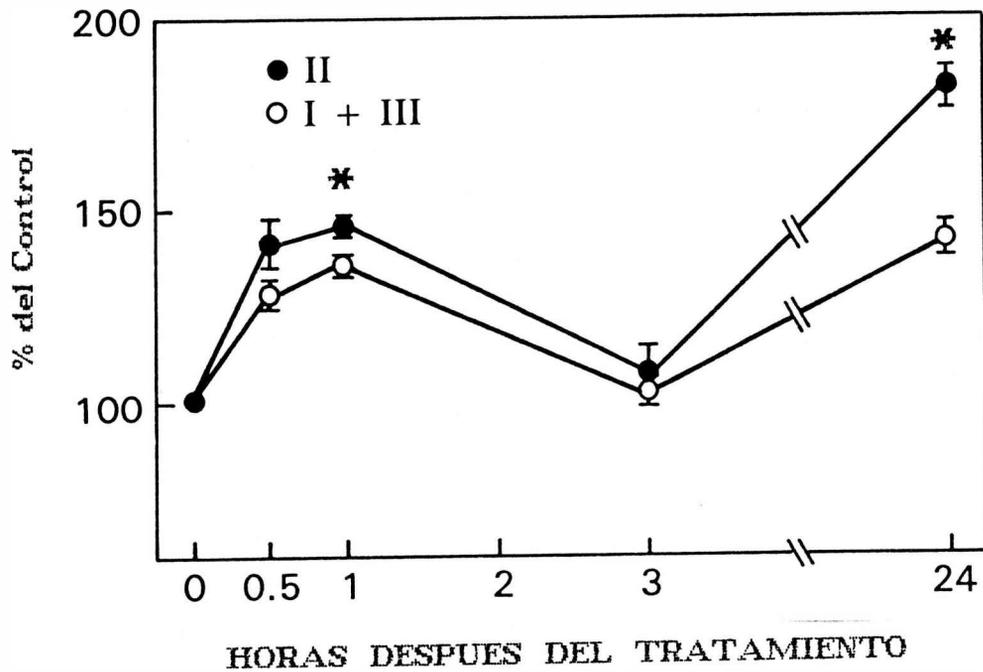
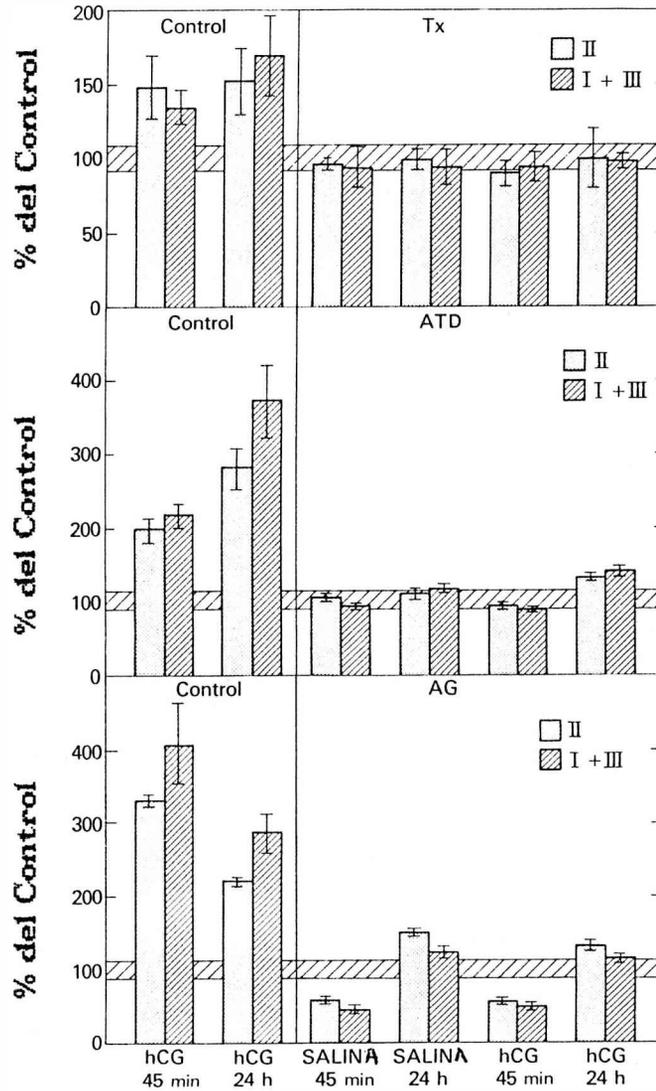


FIGURA 16. Efecto del estradiol sobre la actividad RNA polimerasa.

Ratas hipofisectomizadas fueron tratadas con 200 ug de estradiol disuelto en aceite de sesamo y los nucleos de las celulas de Leydig obtenidos a los tiempos indicados. Cada valor representa la media  $\pm$  DS de muestras por triplicado obtenidas de 7 ratas. (\*) =  $p < 0.05$ .



**TIEMPO DESPUES DEL TRATAMIENTO**

FIGURA 17. Efecto de la hCG sobre las RNA polimerasas de celulas de Leydig tratadas previamente antiestrogenos. Las ratas fueron tratadas con tamoxifen (Tx, panel superior), Androstatriendiona (ATD, panel medio), o aminoglutetimida (AG, panel inferior), de acuerdo al protocolo enunciado en la seccion Material y Metodos. Cada valor representa la media  $\pm$  DS de 3 muestras obtenidas de 5 ratas.

inducida por la administracion de estradiol. El primer incremento, observado dentro de los 45 minutos, podria estar relacionado con la induccion de una proteina que modularia negativamente las enzimas microsomales responsables de la conversion de pregnenolona a testosterona (17 alfa hidroxilasa y 17,20 desmolasa), mientras que el segundo incremento, observado a las 24 hs, estaria involucrado en otros aspectos de la regulacion de la esteroidogenesis. Un mecanismo similar fue propuesto para la accion de los glucocorticoides en las celulas del timo (205). Sin embargo no podemos excluir la posibilidad de un efecto inhibitorio directo del estradiol sobre la transcripcion del gen del sistema enzimatico P-450 al cual pertenecen estas enzimas microsomales. Un efecto directo del estradiol sobre el genoma fue propuesto en la oveja macho castrada donde se encontro que el estradiol induce disminucion de la sintesis de FSH por supresion de los niveles de RNA mensajero que codifica la subunidad beta de dicha hormona (206).

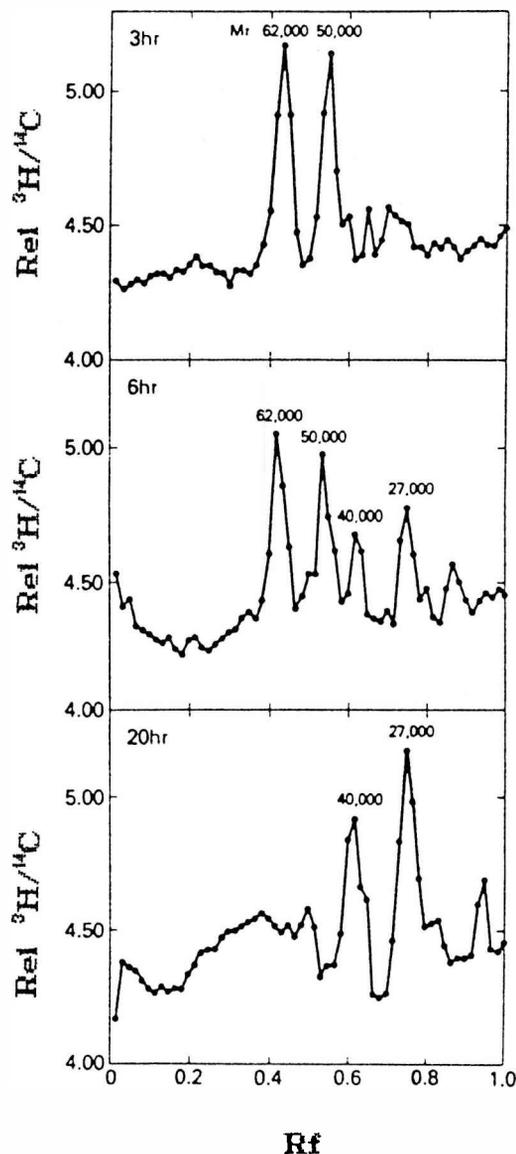
Nuestros resultados sugieren un papel regulador relevante del estradiol como mediador de la accion gonadotrofica sobre la transcripcion genetica de la celula de Leydig. Sin embargo, tecnicas mas sofisticadas, tales como transcripcion nuclear in vitro de secuencias geneticas especificas (207), y sintesis de copias de DNA obtenidas de especificos RNA mensajeros purificados (208) clarificaran el papel preciso del estradiol sobre la

transcripcion nuclear de la celula de Leydig.

#### V. Induccion de proteinas especificas por hCG y estradiol

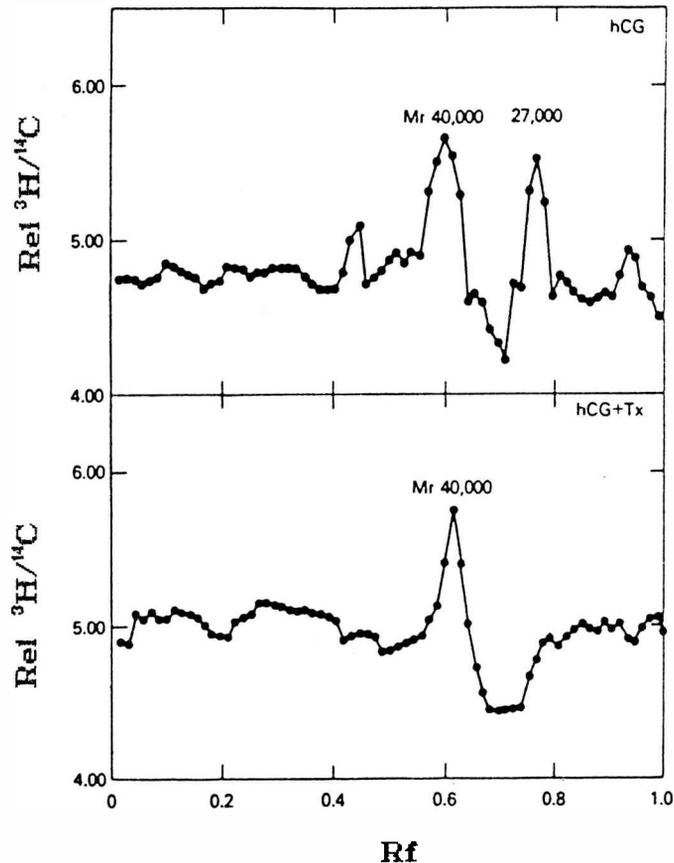
Celulas de Leydig cultivadas, fueron tratadas con 100 ng de hCG durante varios tiempos entre 3 y 24 hs en medio 199 conteniendo BSA en presencia y ausencia de 500 ng de Tamoxifen. Se prosiguió con cambio de medio libre de leucina y adición de (3H)-leucina a los cultivos pre-tratados con hCG o (14C)-leucina a los cultivos control. Despues de 2 hs de incubacion, los dos grupos de celulas fueron lavados, combinados y finalmente solubilizados antes de ser aplicados a una corrida electroforetica en gel. La induccion de proteinas especificas por hCG o estradiol fue evaluada analizando las variaciones en la relacion 3H/14C de las preparaciones combinadas.

El tratamiento con hCG indujo la sintesis de por lo menos 4 proteinas, dos de las cuales (PM 62000 y 50000) fueron evidentes a las 3 y a las 6 hs de incubacion, pero no las 20 hs (Fig.18). Dos proteinas mas de menor tamaño se hicieron mas evidentes desde las 3 a las 20 hs de incubacion, siendo sus PM de 40000 y 27000. La induccion de la proteina de peso molecular 27000 por hCG fue inhibida por tamoxifen, agregado 20 minutos previos a la hCG y presente durante las 20 hs de incubacion junto con la gonadotrofina (Fig. 19). El tamoxifen solo, no indujo incorporacion de los aminoacidos marcados.



**FIGURA 18. Evolucion de la induccion de proteinas especificas por hCG en la celula de Leydig.**

Las celulas fueron expuestas a 50 ng de hCG por 3, 6 y 20 hs, y entonces incubadas con 50 uCi de (<sup>3</sup>H)-leucina en medio 199-0.1% BSA sin leucina for 2 hs. Celulas no tratadas (control) fueron incubadas con 5 uCi de (<sup>14</sup>C)-leucina. Las celulas tratadas y las no tratadas fueron combinadas, solubilizadas y sujetas a electroforesis en gel de SDS. La relacion 3H/14C fue graficada contra los Rf para cada preparacion.



**FIGURA 19. Evolucion de la induccion de proteinas especificas por hCG en la celula de Leydig.**

Celulas de Leydig en cultivo fueron expuestas a 50 ng de hCG sola o en presencia de 500 ng de tamoxifen (Tx) por 20 hs. Entonces, las celulas fueron incubadas con 50 uCi de (<sup>3</sup>H)-leucina en medio 199-0.1% BSA sin leucina. Celulas no tratadas (control) fueron incubadas con 5 uCi de (<sup>14</sup>C)-leucina. Las celulas tratadas y las no tratadas fueron combinadas, solubilizadas y sujetas a electroforesis en gel de SDS. La relacion <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C fue graficada contra los Rf para cada preparacion.

En cultivos expuestos a estradiol, se observo la induccion de una proteina de PM 27000 (Fig. 20, arriba). Esta proteina aparecio tambien a las 6 hs de iniciado el tratamiento y fue de identico peso molecular al encontrado con hCG. La sintesis de esta proteina fue tambien inhibida por tamoxifen (Fig. 20, abajo).

En consecuencia, la aparicion de la lesion biosintetica a nivel de las enzimas microsomales 17 alfa hidroxilasa y 17, 20 desmolasa, es precedida por la sintesis de una proteina inducida especificamente por estradiol e inhibida por antagonistas de la accion estrogenica (209), la que seria traducida de un RNA mensajero sintetizado luego de la accion gonadotrofica (204). Estos resultados refuerzan los previamente publicados sobre la capacidad del estradiol de inducir una proteina de peso molecular 27000, lo que fue demostrado en diversos tumores, organos y lineas celulares humanas (210).

## VI. Origen del estradiol testicular

Los siguientes estudios fueron realizados con el objeto de dilucidar:

1. que compartimiento testicular (celula de Leydig o celula de Sertoli) es el principal responsable de la sintesis de estrogenos, y
2. si el incremento de estradiol era debido a un aumento de

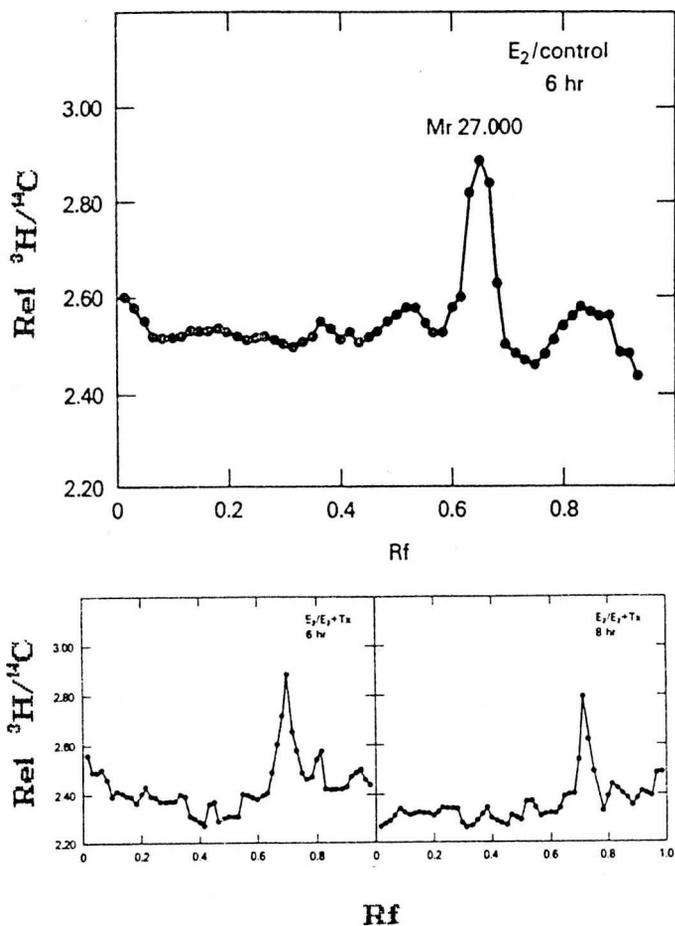
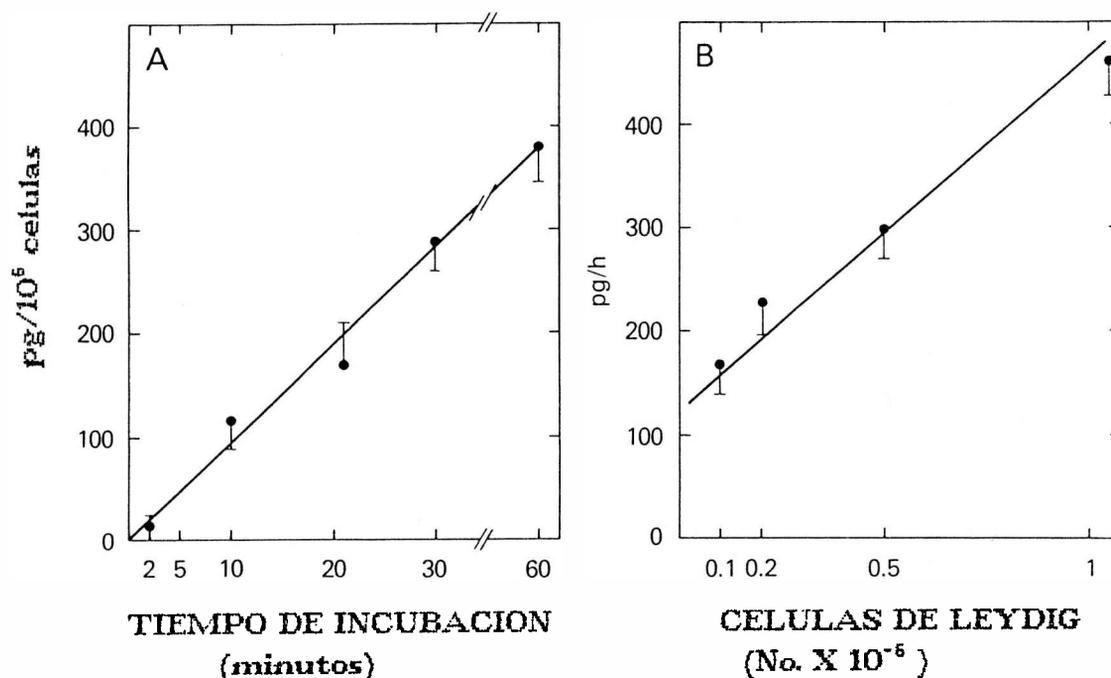


FIGURA 20. Evolucion de la induccion de proteinas especificas por estradiol en la celula de Leydig.

Las celulas de Leydig fueron expuestas a 100 ng de estradiol por 6 (arriba y abajo) y 8 hs (abajo solo) seguido por cambio de medio sin leucina. 50 uCi de (<sup>3</sup>H)-leucina fueron agregados a las celulas tratadas con estradiol, y 5 uCi de (<sup>14</sup>C)-leucina fueron agregados a las celulas control o a las tratadas con estradiol mas 500 ng de tamoxifen (Tx). Las celulas tratadas y las controles fueron combinadas, solubilizadas y sujetas a electroforesis en gel de SDS. La relacion <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C fue graficada contra los R<sub>f</sub> para cada preparacion.

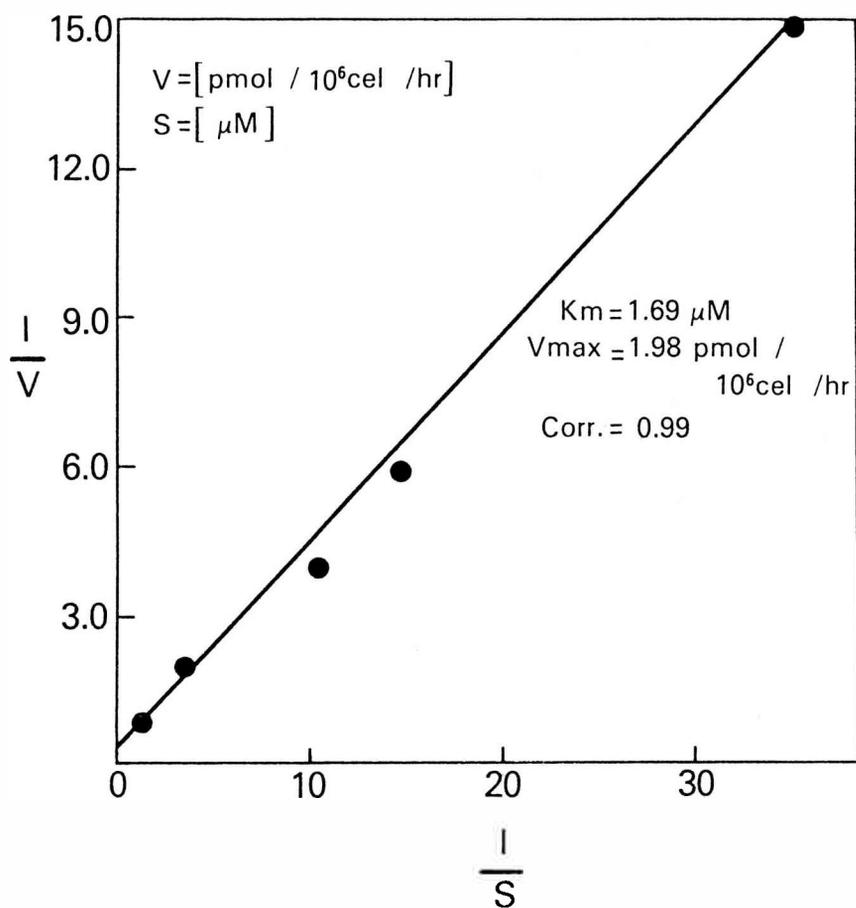
de sustrato, a una activación de la aromatasa, o a ambos.

**VI.1-Otimizacion del ensayo de la aromatasa.** La actividad aromatasa aumento linealmente con el tiempo de incubacion hasta los 30 minutos (Fig. 21.A). La enzima aumento linealmente con cantidades crecientes de celulas de Leydig ( $0.05-1.0 \times 10^6$ ) durante un periodo de incubacion de 60 minutos (Fig. 21.B). El grafico de Lineweaver-Burk obtenido por incubacion con cantidades crecientes testosterona como sustrato ( $0.03-10 \mu\text{M}$ ) arrojó un  $K_m$  aparente de  $1.69 \mu\text{M}$  (Fig. 22). La actividad aromatasa fue inhibida por androstatriendiona (ATD), un inhibidor especifico de aromatasa, de una forma dosis-dependiente (Fig. 23) con una  $ED_{50} = 5 \mu\text{M}$ . Dado que la mayor dosis de ATD ensayada ( $500 \mu\text{M}$ ) fue parcialmente soluble en el medio acuoso, elegimos  $100 \mu\text{M}$  ATD lo cual dio un blanco de alrededor del 30 % de la actividad total. En consecuencia, las condiciones optimas para el ensayo de la actividad aromatasa fueron:  $0.5-1.0 \times 10^6$  celulas,  $3.0 \mu\text{Ci}$  ( $2 \mu\text{M}$ ) de sustrato (200-300 veces en exceso con respecto a los niveles de testosterona intracelulares), y 1 h de incubacion, usando  $100 \mu\text{M}$  ATD como blanco.



**FIGURA 21. Optimización del ensayo de la aromatasa.**

A. Un millón de células de Leydig se incubaron con <sup>3</sup>H en 2  $\mu$ M de (3H)-testosterona variando el tiempo de incubación de 2 a 60 minutos. B. Cantidades crecientes de células se incubaron por 1 hora con <sup>3</sup>H en 2  $\mu$ M de (3H)-testosterona. El valor blanco fue obtenido por incubaciones en presencia de 0.1 mM de androstatriendiona (ATD). Cada valor representa la media  $\pm$  ES de incubaciones por triplicado. Los resultados son representativos de 2 experimentos.



**FIGURA 22. Optimización del ensayo de la aromatasa.**

Un millón de células de Leydig se incubaron por 1 hora con 3 uCi de (3H)-testosterona y concentraciones variables de testosterona fría. El valor blanco fue obtenido por incubaciones en presencia de 0.1 mM de androstatriendiona (ATD). Cada valor representa la media  $\pm$  ES de incubaciones por triplicado. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

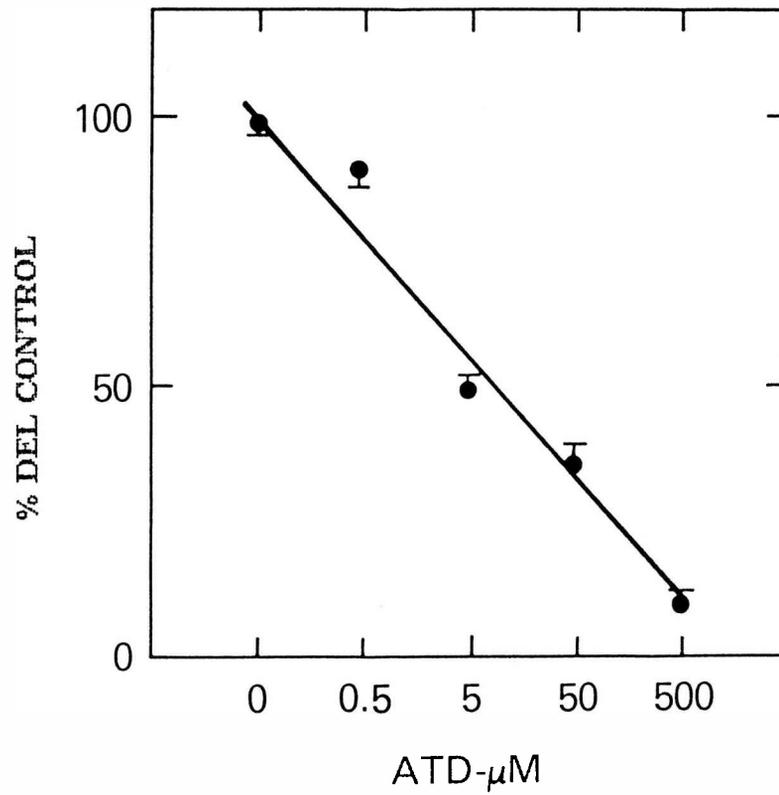


FIGURA 23. Actividad aromatasa de celulas de Leydig en respuesta a dosis crecientes de androstatriendiona (ATD). Cada valor representa la media  $\pm$  ES de incubaciones por triplicado. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

#### **VI.1-Localizacion celular de la actividad aromatasa.**

La actividad enzimatica fue valorada separadamente en celulas de Sertoli y de Leydig aisladas de ratas de 3 diferentes edades: 5 dias, 15 dias y 60 dias (adultas). Las características de ambos tipos celulares, asi como la pureza de las preparaciones obtenidas por los metodos empleados han sido ya publicadas (211,212). El numero de receptores de LH/hCG aumento con la edad en la preparacion de celulas de Leydig, pero fue casi no detectable en la de celulas de Sertoli (Fig. 24, panel izquierdo). El mayor numero de receptores de FSH en celulas de Sertoli fue observado en las preparaciones de ratas de 15 dias de edad (Fig. 24, panel derecho), mientras que el binding de FSH en celulas de Leydig fue practicamente no detectable. La pequeña cantidad de binding de FSH en las preparaciones de celulas de Leydig puede atribuirse a la presencia de un 13% de LH contaminante de la preparacion de FSH marcada usada como trazador. La acumulacion de cAMP extracelular aumento significativamente en las celulas de Leydig solo despues de la incubacion con hCG, y en las celulas de Sertoli solo despues de la incubacion con FSH (Fig. 25), indicando la presencia de poblaciones celulares puras. Los niveles de aromatasa aumentaron significativamente con la edad en las celulas de Leydig, mientras que decrecieron en las celulas de Sertoli

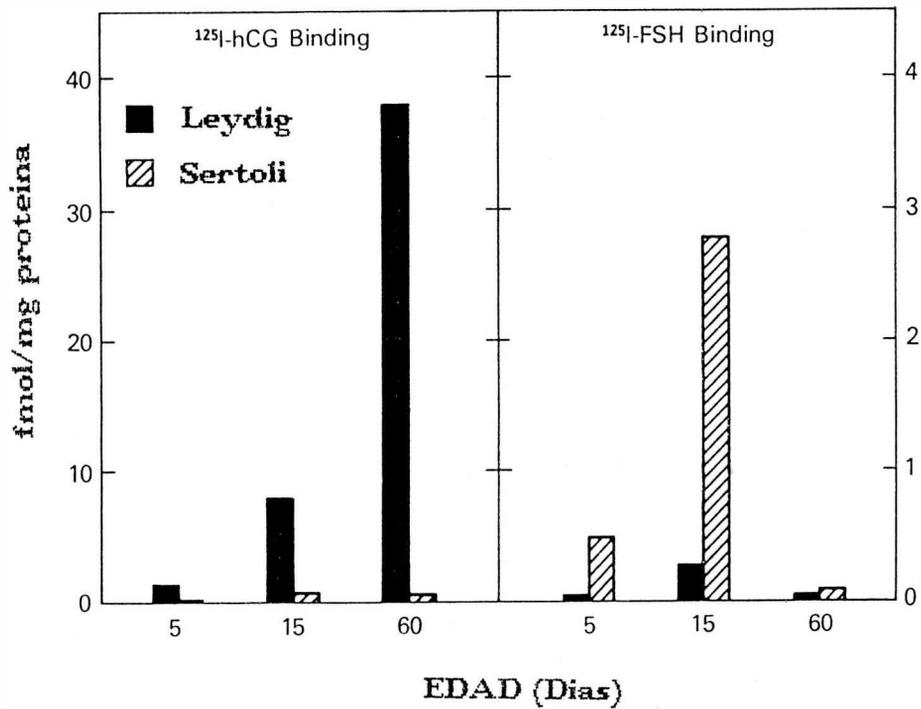


FIGURA 24. Sitios de union para las gonadotropinas en celulas de Leydig y de Sertoli durante la maduracion. Cada valor representa la media  $\pm$  de 3 determinaciones. Los resultados son representativos de por lo menos 2 experimentos distintos.

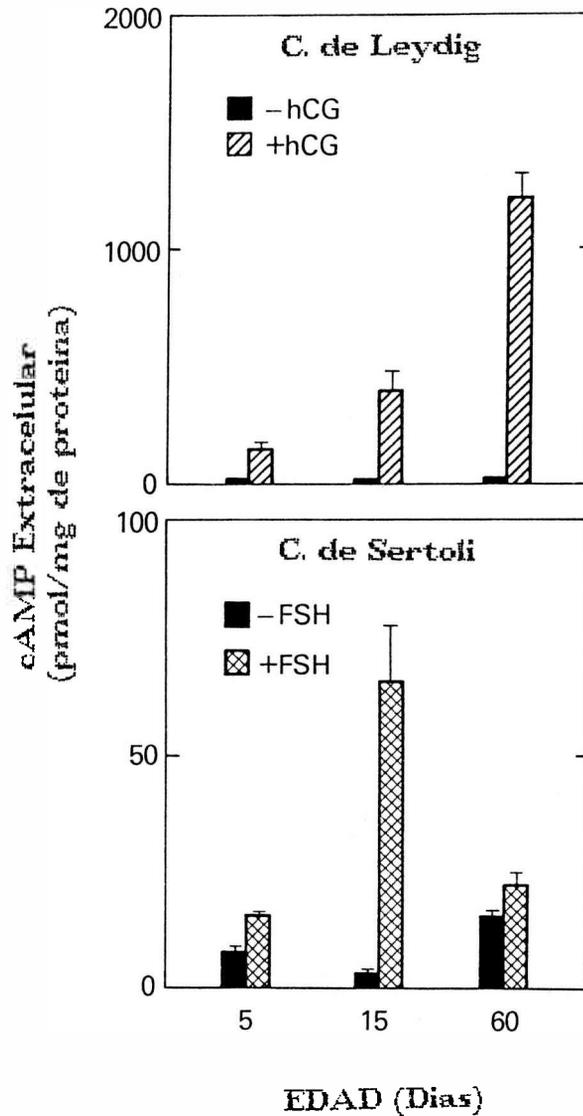


FIGURA 25. Efecto de las gonadotropinas sobre la producción de AMPc en células de Leydig y de Sertoli durante el desarrollo.

El AMPc extracelular fue valorado en las células aisladas de ratas de 5, 15 y 60 días de vida en respuesta a la incubación in vitro con 100 ng hCG o 100 ng FSH por 3 horas. Cada valor representa la media  $\pm$  de 3 determinaciones. Los resultados son representativos de por lo menos 2 experimentos distintos.

(Fig. 26), indicando que la principal fuente de estradiol testicular en el adulto es la célula de Leydig. Estos resultados son de suma importancia ya que cambian el concepto de los 2 compartimientos, que indicaba que la testosterona generada por la célula de Leydig bajo la influencia de LH es convertida en estradiol en la célula de Sertoli bajo el control de FSH. Luego, el estradiol formado se dirige a la célula de Leydig para ejercer su acción (94). De acuerdo a nuestros resultados este modelo es por consiguiente de aplicación en el testículo inmaduro, en donde predomina la actividad aromatasa de la célula de Sertoli, no así en el adulto.

#### **VI.2-Efecto de hCG y cAMP sobre la actividad aromatasa y la esteroidogenesis de la célula de Leydig.**

a) **In vitro.** Células de Leydig en cultivo fueron tratadas por diferentes tiempos con hCG. La actividad aromatasa se incrementó significativamente ( $304.2 \pm 20.1$  a  $404.6 \pm 24.7$  pg/10E6 células.h;  $p < 0.05$ ) dentro de los 30 min después de hCG (Fig. 27, arriba). Los niveles de testosterona en el medio de incubación aumentaron desde  $5.64 \pm 1.2$  ng/10E6 células a los 30 min hasta un plateau de  $300 \pm 20.1$  ng/10E6 células a las 4 hs después de hCG (Fig. 27, abajo). Los niveles de estradiol aumentaron a  $2.1 \pm 0.1$  pg/10E6 células a

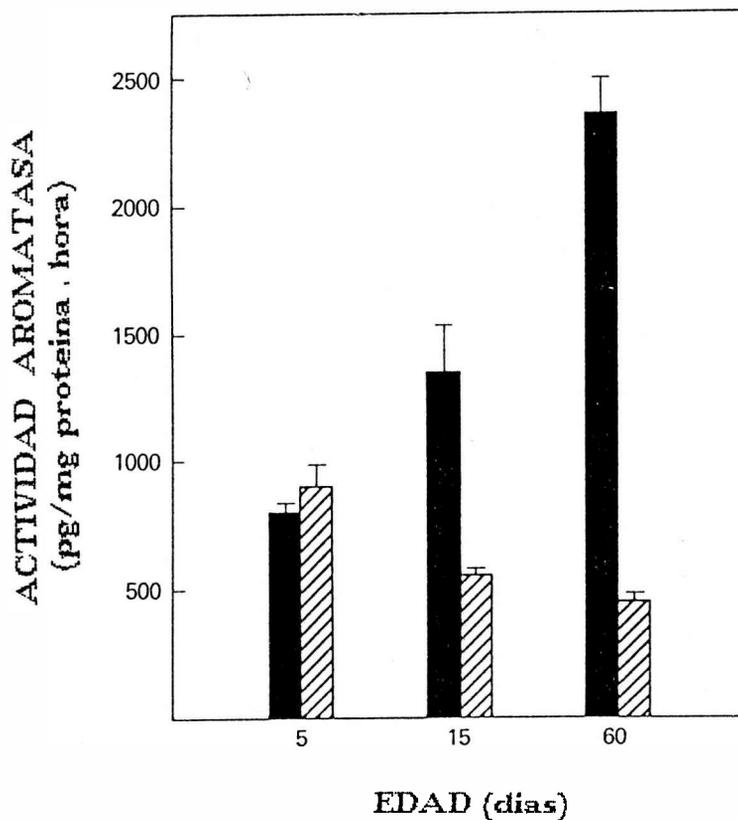


FIGURA 26. Localizacion celular de la actividad aromatasa durante la maduracion testicular.

La actividad enzimatica fue valorada en preparaciones purificadas de celulas de Leydig (barras llenas) y celulas de Sertoli (barras rayadas). Cada valor representa la media  $\pm$  DS de 3 determinaciones. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

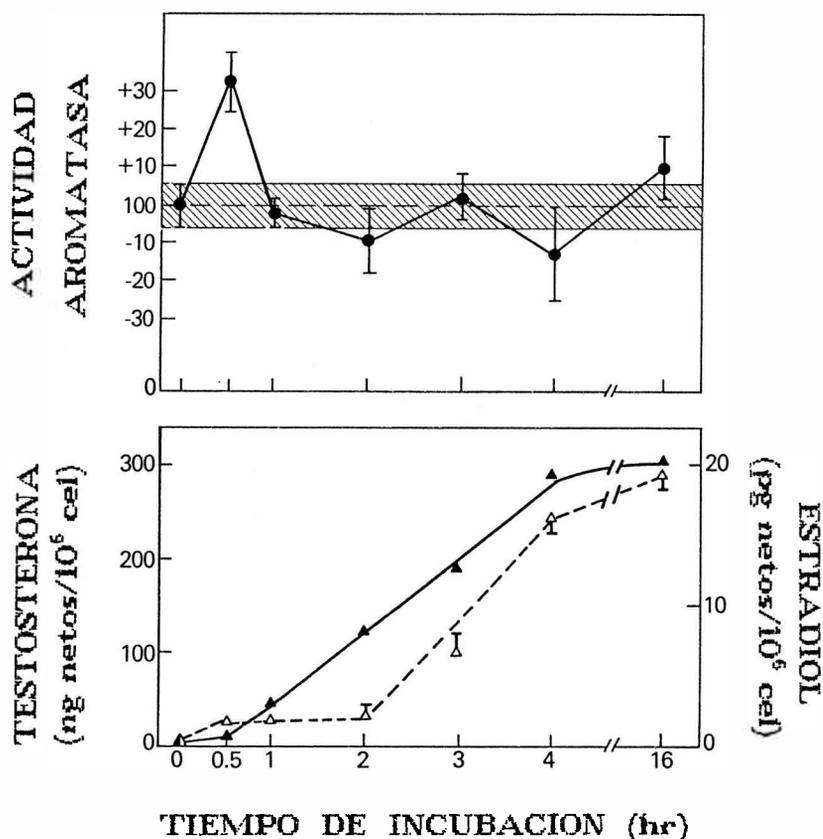


FIGURA 27. Panel superior: Efecto temporal de la hCG in vitro sobre la actividad aromatasa de la celula de Leydig, expresada como porcentaje de su respectivo valor control a cada tiempo. Panel inferior: Produccion de testosterona y estradiol neta (estimulada menos control) en el medio de incubacion.

Cada valor representa la media  $\pm$  DS de determinaciones por triplicado. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

los 30 min ( $p < 0.05$ ), permaneciendo constante por alrededor de 2 hs. A partir de allí, el incremento fue mas pronunciado, alcanzando valores de  $16.4 \pm 0.8$  y  $20.4 \pm 0.5$  pg/10E6 células a las 4 y 16 hs despues de hCG, respectivamente (Fig. 27, abajo).

Con el objeto de comprobar si la activacion enzimatica era consecuencia de la accion de hCG mediada por cAMP, se repitio la incubacion pero con el agregado de 1 mM de 8-Bromo-cAMP y 5 uM de forskolina (Fig. 28), encontrandose resultados similares (la actividad aromatasa a los 20 minutos fue  $22.3 \pm 5$  % mayor que la basal,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, cuando se uso 0.12 uM de toxina colerica, la actividad aromatasa y el aumento de testosterona se hicieron evidentes alrededor d las 2 hs. Esto ultimo podria ser explicado por la compartamentalizacion de las proteinas quinasas dependientes de AMPc, que no habrian podido ser activadas por las bajas dosis de toxina colerica.

**b) In vivo.** Una hora despues de la administracion in vivo de 5 ug de hCG, la actividad aromatasa de la celula de Leydig se incremento en alrededor del 17,4 % (de  $308.8 \pm 18.9$  a  $362.6 \pm 21.1$  pg/10e6 células.h;  $p < 0.05$ ), siendo posteriormente no estadisticamente diferente (Fig. 29, panel inferior). Los receptores de LH aumentaron entre 4-28% dentro de la primera hora, pero disminuyeron posteriormente

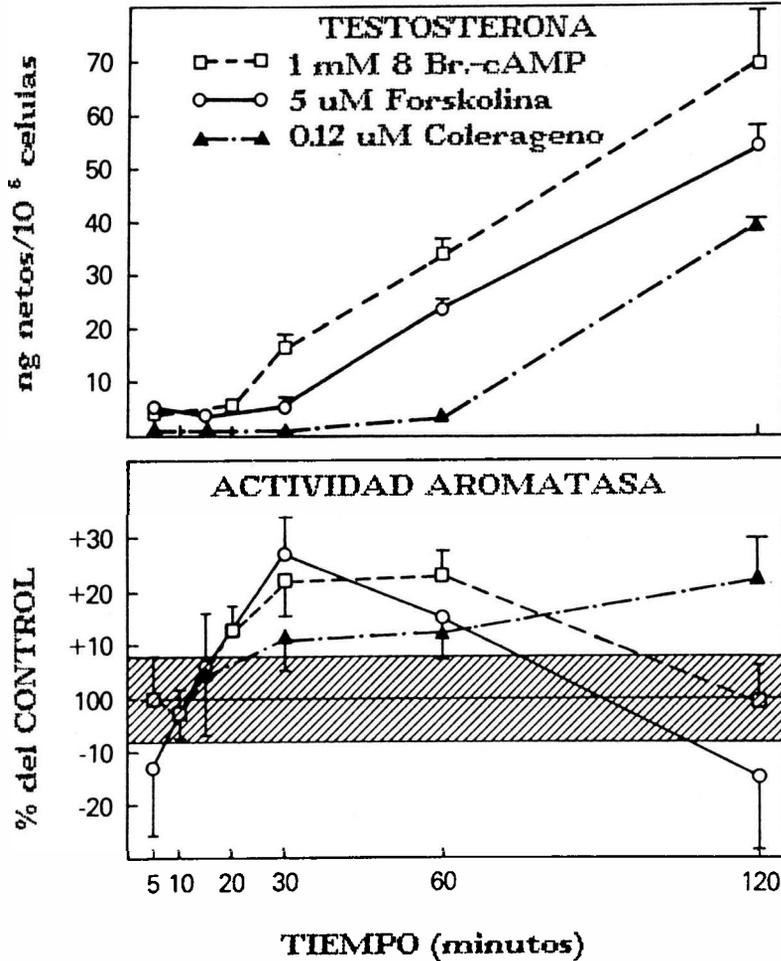
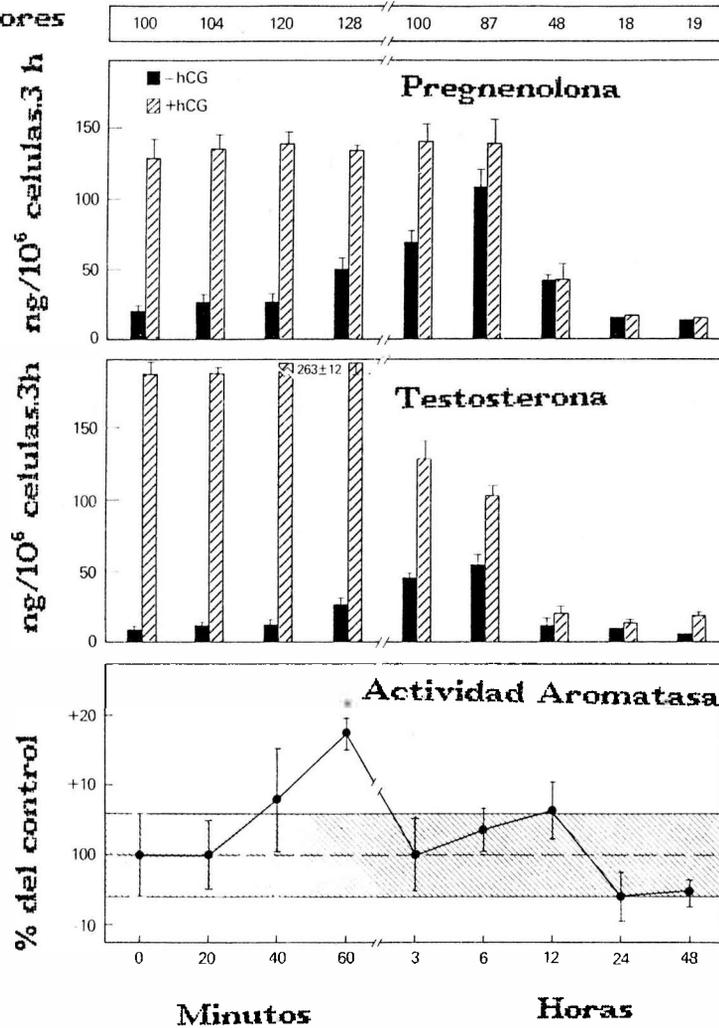


FIGURA 28. Efecto temporal in vitro de 1 mM 8-Br-cAMP, 5 uM forskolina o 0.12 uM de toxina colerica sobre la testosterona y la actividad aromatasa.

Arriba. Los resultados se expresan como aumento neto de testosterona (estimulado menos basal). Abajo. Los resultados se expresan como el porcentaje de incremento respecto a su basal. Cada valor representa la media  $\pm$  de triplicados. Los valores de p para la actividad aromatasa fueron menos de 0.05 para forskolina a los 30 y 60 min, para 8 br-cAMP a los 20, 30 y 60 min, y para la toxina colerica a los 120 min. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

% de receptores



**TIEMPO DESPUES DE hCG IN VIVO**

FIGURA 29. Tratamiento ratas con 5 ug de hCG in vivo.  
Panel superior: Numero de sitios de binding para LH/hCG.  
Paneles centrales: Produccion de pregnenolona y testosterona.  
Panel inferior: Actividad aromatasa expresada como porcentaje del valor control al tiempo cero. Las celulas fueron incubadas por 3 h en presencia o no de 100 ng de hCG. Cada valor representa la media ± DS de determinaciones por triplicado. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

entre un 20-80% desde las 6 a las 48 hs. (Fig. 29, panel superior). Los niveles basales de pregnenolona y testosterona en las células aisladas se incrementaron hasta su valor máximo alrededor de las 6 hs ( $108.3 \pm 11.1$  y  $50 \pm 5.5$  ng/ $10^6$  células.3 hs, respectivamente), volviendo a los niveles basales posteriormente (Fig. 29, paneles medios). Como puede observarse, a las 3 hs ocurre una primera lesión biosintética, con disminución en la producción de testosterona, sin cambio en la producción máxima de pregnenolona. Pero a las 12 hs post hCG, ya es evidente también una disminución en la producción de pregnenolona. El contenido testicular de testosterona en los homogenatos aumentó significativamente desde  $131 \pm 0.4$  a  $176 \pm 21$  ng/testículo dentro de los 40 minutos y alcanzó valores de  $768 \pm 80$  ng/testículo 1 hr después de la hCG (Fig. 30). Un pequeño, aunque significativo incremento de estradiol testicular se observó dentro de la primera hora ( $p < 0.05$ ), y fue seguido de un marcado incremento posterior que alcanzó  $92 \pm 4$  pg/testículo) a las 3 hs, coincidente con la aparición de la primera lesión biosintética.

Estos hallazgos sugieren que la hCG induce, a través de su segundo mensajero, el cAMP, una activación de la aromatasa de la célula de Leydig produciendo un primer y moderado aumento en la concentración de estradiol

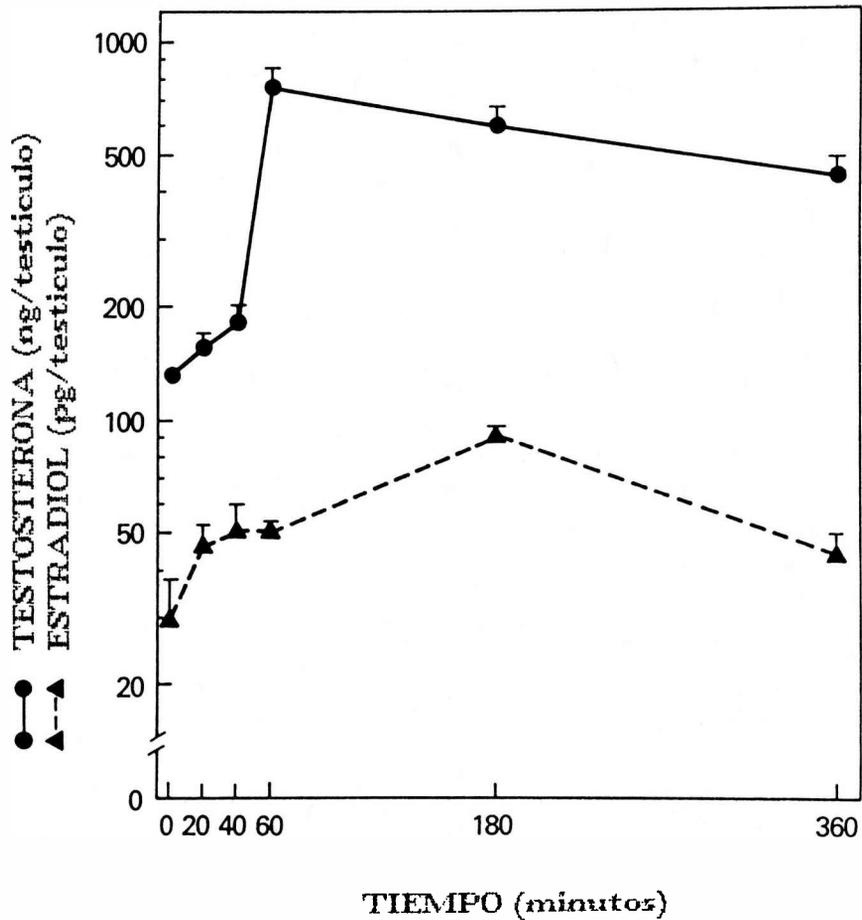


FIGURA 30. Contenido testicular de estradiol y testosterona despues de una inyeccion de 5 ug de hCG. Cuatro testiculos de cada grupo fueron combinados, homogenizados y posteriormente extraidos para la determinacion de los esteroides. Cada valor representa la media  $\pm$  DS de determinaciones por triplicado. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

intracelular que desencadenaria la cascada de eventos que llevan a la desensibilizacion mediada por estradiol. El subsecuente incremento de los niveles de testosterona generado como consecuencia de la actividad estimuladora de la hCG, proveeria el sustrato necesario para provocar un segundo y mas marcado incremento de estradiol, ya que el aumento de estradiol se hace paralelo al de testosterona aun cuando la aromatasa permanece en los niveles basales.

## **VII. La lesion esteroidogenica no dependiente de estradiol**

### **VII.1-Disponibilidad de precursores.**

Hemos visto mas arriba que la desensibilizacion de la respuesta esteroidogenica de la celula de Leydig ocurre por inhibicion enzimatica a dos alturas de la biosintesis: 1) a nivel de la conversion de pregnenolona a testosterona (17 alfa hidroxilasa y 17,20 desmolasa), y 2) a nivel de la conversion de colesterol a pregnenolona (20,22 desmolasa). La primera lesion se produce con dosis bajas de hCG y es mediada por una proteina inducida por estradiol. En cambio la segunda lesion, ocurre con dosis mas altas de hCG y no depende de la accion estrogenica ya que no es prevenida por antiestrogenos. Con el objeto de determinar si la deficiencia en la sintesis de pregnenolona era debida a falta de sustrato (colesterol) o a una inhibicion del la

enzima de clivaje de la cadena lateral del colesterol (20,22 desmolasa), se evaluo la concentracion de colesterol la membrana interna de la mitocondria de la celula de Leydig, el cual es el metabolicamente disponible para su conversion a pregnenolona.

Los niveles de colesterol libre fueron en la celula intacta:  $3 \pm 0.41$  ug/mg de proteina, en la mitocondria total  $8 \pm 0.53$  ug/ mg de proteina, y en membrana interna de la mitocondria  $33 \pm 1.9$  ug/mg de proteina. La administracion in vivo de 10 ug de hCB a ratas adultas, indujo a las 48 hs el bloqueo esperado en la estimulacion in vitro de pregnenolona (Fig 31, centro), y en consecuencia en la de testosterona (Fig. 31, abajo). Sin embargo, la concentracion de colesterol en la membrana interna de la mitocondria aumento cerca del 100% del control (Fig. 31, arriba), indicando que la deficiencia en la estimulacion de pregnenolona no fue debida a la falta de precursores, sino probablemente a algun factor inhibidor a nivel mitocondrial (213).

#### **VII.2-Actividad inhibidora en la mitocondria.**

En experimentos iniciales se evaluaron los requerimientos de NADPH por la enzima 20,22 desmolasa, con el objeto de dilucidar la naturaleza de la inhibicion (214). Para tal fin se incubaron mitocondrias intactas de celulas de Leydig

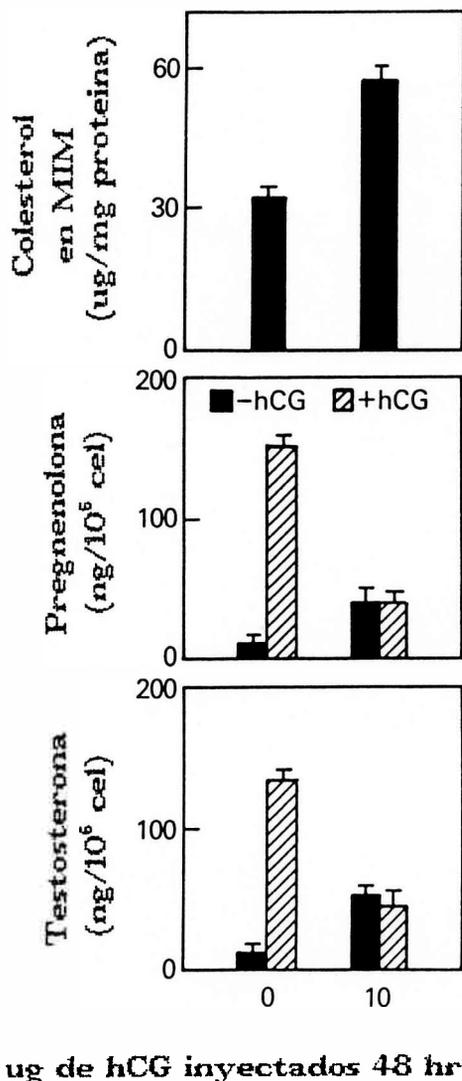


FIGURA 31. Contenido mitocondrial de colesterol libre (arriba) y respuestas de pregnenolona (centro) y testosterona (abajo) a la hCG en células de Leydig aisladas con una lesión biosintética cercana.

Grupos de 10 ratas fueron tratadas con 10 ug de hCG o vehículo por 48 hs. Las células aisladas fueron separadas en 2 fracciones: una para la determinación de colesterol y la otra para la producción in vitro de pregnenolona y testosterona. Cada valor representa la media  $\pm$  DS de incubaciones por triplicado. Los resultados son representativos de 2 experimentos. MIM: membrana interna de mitocondria.

control o pretratadas con hCG (desensibilizadas) con 26(14C)-colesterol y concentraciones variables de NADPH, determinando la cantidad de ácido (14C)-isocaproico formado. De los gráficos de Lineweaver-Burk se obtuvieron los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ , los que fueron comparados con los obtenidos en un sistema reconstituido conteniendo mitocondrias de células de Leydig (polvo de acetona) y enzima obtenida de la glándula suprarrenal. Como se muestra en la Tabla V, la 20,22 desmolasa de la suprarrenal tiene una alta afinidad por NADPH con un  $K_m$  aparente de 0.017 mM. La adición de mitocondrias de célula de Leydig control aumento el  $K_m$  a 0.111 mM. Pero cuando la preparación mitocondrial agregada fue de las células tratadas con hCG el  $K_m$  llegó a 0.374 mM. Sin embargo, los valores de  $V_{max}$  entre los tres grupos fue similar, indicando la naturaleza competitiva de la inhibición. Estos resultados indican que la mitocondria de la célula de Leydig contiene una sustancia inhibidora capaz de aumentar los requerimientos de NADPH ( $K_m$ ) de la enzima 20,22 desmolasa, y que aumenta o se activa por acción de la hCG (209,214).

Tabla V. Valores de Km y Vmax de la enzima 20,22 desmolasa con cantidades variables de NADPH.

	Km (mM)	Vmax (*)
<b>Mitocondria intacta</b>		
Control	0.105	1.11
Tratadas con hCG	0.182	1.17
<b>Sistema reconstituido</b>		
Enz Adr	0.017	0.400
Enz Adr + Mit. CL control	0.111	0.417
Enz Adr + Mit. CL hCG	0.370	0.408

Enz\_Adr = Extracto enzimatico de mitocondrias de glandula adrenal de ratas control; Mit.\_CL = Extracto enzimatico de mitocondrias de celulas de Leydig de ratas control o tratadas con hCG. (\*) = Los valores estan expresados como nmol de pregnenolona/10 min/mg proteina para mitocondrias intactas o nmol de acido (14C)-isocaproico/10 min para el sistema reconstituido.

La síntesis ácido isocaproico por mitocondrias de células control fue ligeramente mayor que la de células tratadas con hCG en incubaciones con alta concentración de NADPH (2.4 mM) (Fig. 32, abajo). Por el contrario, hubo una mayor diferencia en la cantidad de ácido isocaproico formado en presencia de baja concentración de NADPH (100  $\mu$ M), sugiriendo que la actividad enzimática fue marcadamente reducida en el grupo tratado con hCG (Fig. 32, arriba). Subsecuentes estudios en mitocondrias incubadas con concentraciones crecientes de NADP<sup>+</sup> o NADPH (0.05-0.2 mM) mostraron una reducción significativa en la capacidad de producir pregnenolona de las mitocondrias de células tratadas con hCG (Fig. 33). Este experimento indicó que el NADPH generado por reducción ligada a isocitrato del NADP<sup>+</sup> (Fig. 33, arriba) fue tan efectivo como el NADPH agregado (Fig. 33, abajo), y en consecuencia el NADPH fue utilizado en experimentos posteriores como fuente de equivalente reductores.

### **VII.3-Efecto de hCG sobre la producción de pregnenolona por la mitocondria**

Como ya hemos visto, la administración de dosis de hCG de 1 a 2.5  $\mu$ g a ratas adultas causa una estimulación en la producción de pregnenolona de las células de Leydig

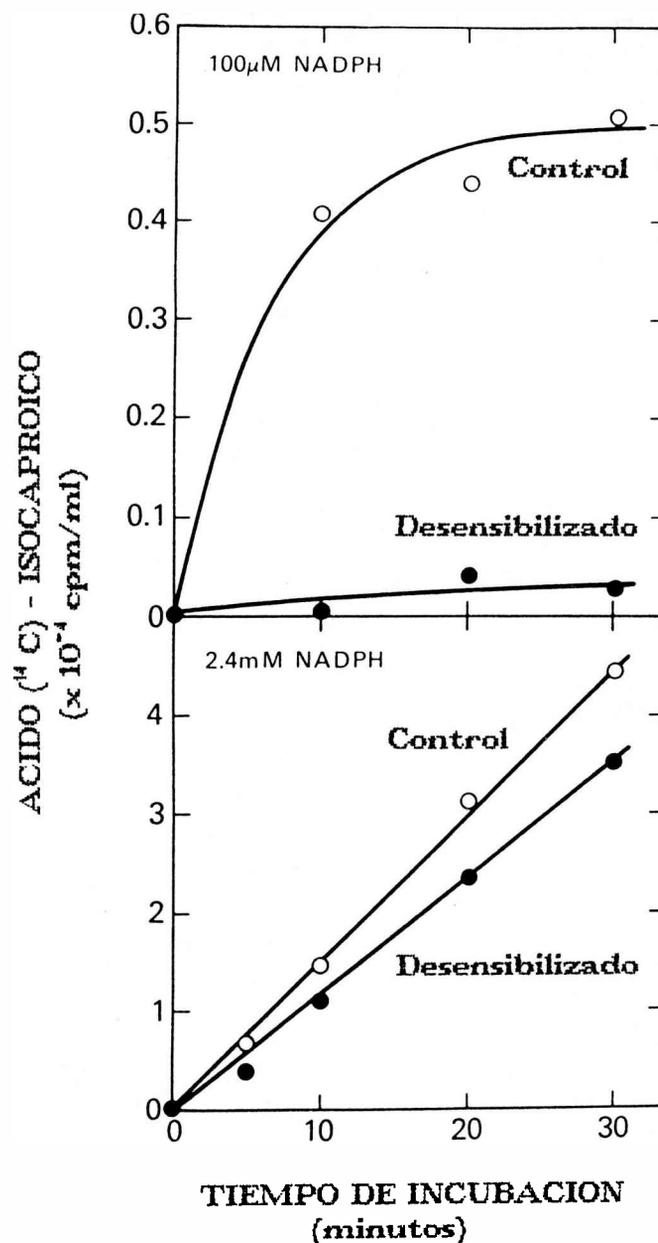


FIGURA 32. Conversion de (14C)-colesterol a acido (14C)-isocaproico en mitocondrias de celulas de Leydig control y de ratas tratadas con 10 ug de hCG. El colesterol marcado (100 uM) fue agregado en acetona a una concentracion de 12 ul/1.2 ml de volumen de incubacion. Despues de una preincubacion de 15 min en presencia del colesterol marcado, la reaccion se inicio por el agregado de NADPH en baja (100 uM) o alta (2.4 mM) concentracion. Una alicuota de 0.2 ml de la solucion de reaccion se extrajo a los tiempos de incubacion seleccionados y se transfirio a tubos conteniendo 1.8 ml de 1 mM HgCl<sub>2</sub>-50 mM buffer glicina pH 9.5. El acido isocaproico marcado se separo por cromatografia en columna de alumina.

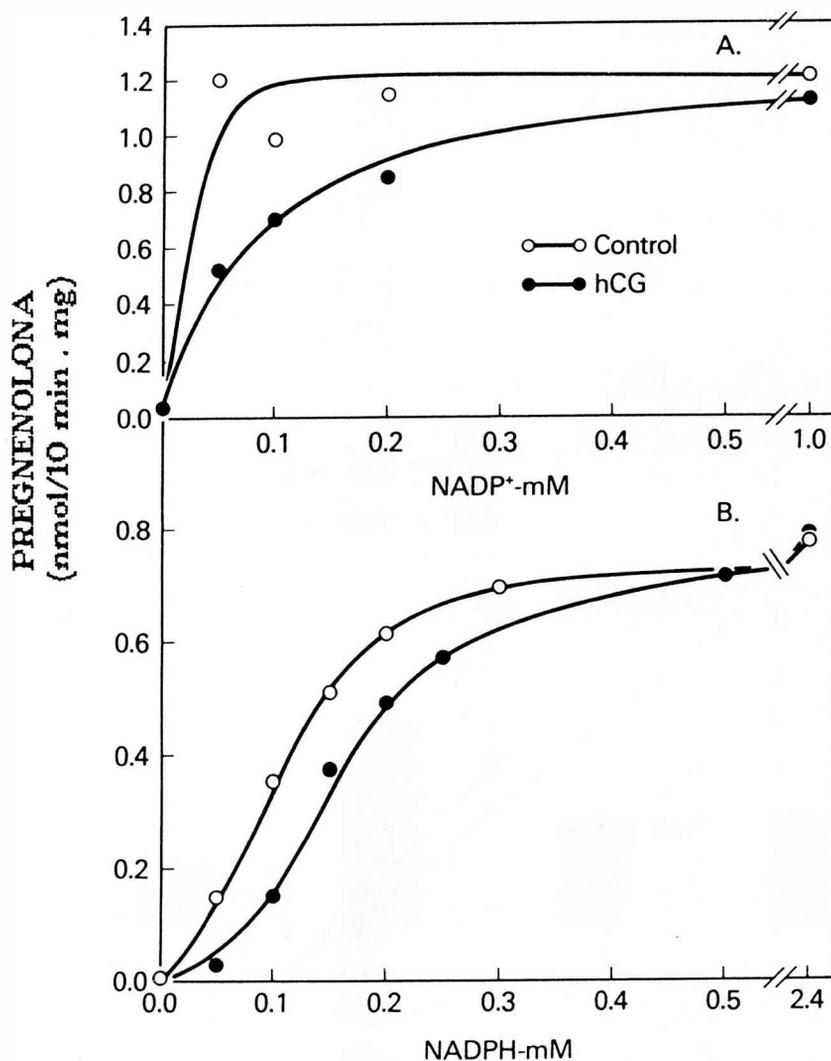


FIGURA 33. Cambios en la dosis de equivalentes reductores requeridos para dar la mitad de la actividad maxima de la 20,22 desmolasa.

Las mitocondrias de la celula de Leydig fueron aisladas de ratas control y de ratas tratadas con 10 ug de hCG 48 h antes. La produccion de pregnenolona fue iniciada por el agregado de diferentes concentraciones de NADP+ mas 2 mM isocitrato (A) o diferentes concentraciones de NADPH (B). Cada punto es la media de incubaciones por duplicado.

aisladas, tanto en condiciones basales como con la incubación de hCG en el medio (Fig. 34). Sin embargo, la administración de dosis mayores (10 ug de hCG) ocasiona una marcada reducción en la capacidad esteroidogénica de la célula intacta, con pérdida de los receptores de LH (Fig. 34). Cuando las mitocondrias de las células de Leydig fueron aisladas para la evaluación de la producción de pregnenolona (Fig. 35) se vio que la menor dosis de hCG indujo un incremento en la producción de pregnenolona en presencia de 2.4 mM de NADPH más 2 mM isocitrato, mientras que no fueron observados cambios con 2.5 ug hCG. Tratamiento con 10 ug de hCG resultó en una marcada disminución de la producción de pregnenolona evaluada con el agregado de 100 uM NADPH (Fig. 35, paneles superior y central) y no con 2.4 mM NADPH (Fig. 35, panel inferior).

#### VII.4-Efecto de la sonicación y el calor

Para profundizar nuestras primeras evidencias sobre la reducción de la actividad 20,22 desmolasa por hCG y excluir efectos de diferentes permeabilidades del NADPH en mitocondria controles y desensibilizadas, examinamos un sistema reconstituido con mitocondrias de la zona fasciculata adrenal precipitadas con acetona como fuente de la enzima. En incubaciones que utilizaron mitocondria sonicadas y tratadas

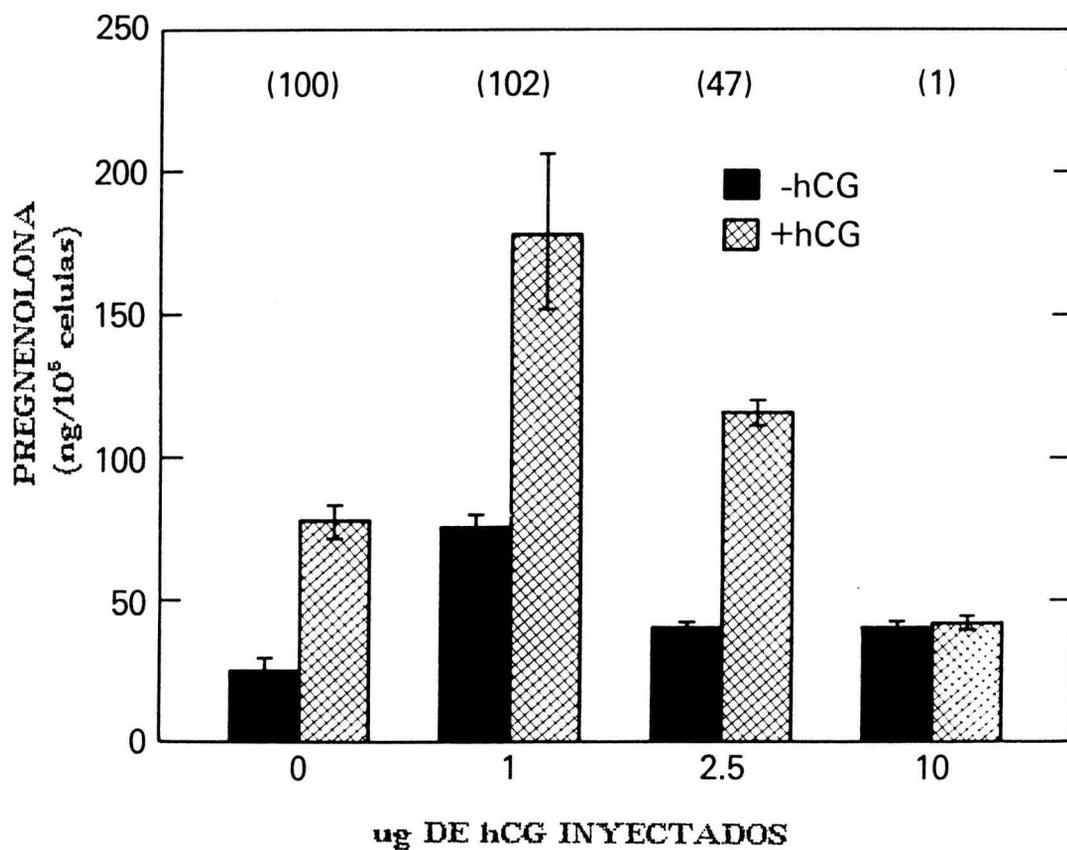


FIGURA 34. Producción de pregnenolona por células de Leydig de ratas control y de ratas tratadas con 1, 2.5 y 10 ug de hCG 48 h antes.

Aproximadamente 1 millón de células fueron incubadas por 3 h en presencia o no de 100 ng de hCG en el medio. Los resultados son la media  $\pm$  de incubaciones triplicadas. Los números entre parentesis indican el contenido de receptores de LH expresado como porcentaje del valor control.

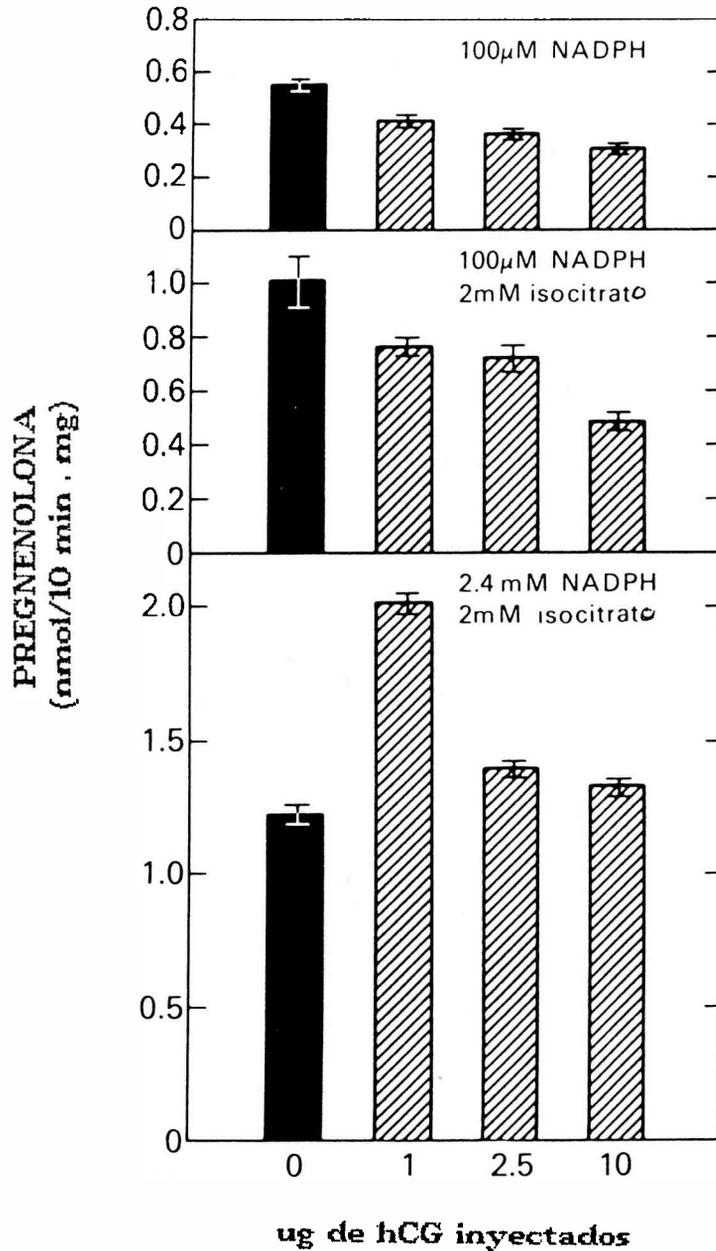


FIGURA 35. Produccion de pregnenolona por mitocondrias de celulas de Leydig control y tratadas con hCG. Los tratamientos fueron como se indican en la leyenda de la Fig. 34. La produccion de pregnenolona se inicio por el agregado de 100 uM de NADPH en ausencia (arriba) o presencia (centro) de 2 mM isocitrato, o 2.4 mM NADPH mas 2 mM isocitrato (abajo). Los resultados son la media  $\pm$  ES de incubaciones por triplicado.

por calor la producción de pregnenolona fue reducida, no observándose diferencias entre las control y las desensibilizadas (Fig. 36, B y D). La adición de polvo acetonico de mitocondria adrenal a las mitocondrias sonicadas de células de Leydig devolvió las diferencias observadas anteriormente entre los grupos control y desensibilizados (Fig. 36, C). El agregado de enzima adrenal a mitocondrias de células de Leydig tratadas con calor aumento significativamente la producción de pregnenolona y las diferencias vistas en el grupo C no se observaron en el grupo E. Estos resultados sugieren que la diferencia en la actividad de la 20,22 desmolasa en la mitocondria intacta no estaba relacionada con diferente permeabilidad al NADPH sino mas bien a un factor inhibidor inducido por el tratamiento con hCG.

#### **VII.4-Tiempo y dosis de hCG en la induccion del inhibidor**

Los experimentos anteriores han sugerido que la sustancia mitocondrial podria alterar la actividad de la desmolasa mitocondrial. En presencia de baja concentracion de NADPH (100  $\mu$ M) la producción de pregnenolona disminuyo a las 15, 48 y 72 h despues de la hCG (Fig. 37, panel superior), seguido a un incremento en la actividad de alrededor del 30% sobre los valores control a las 2 y 6 hs. En contraste, con

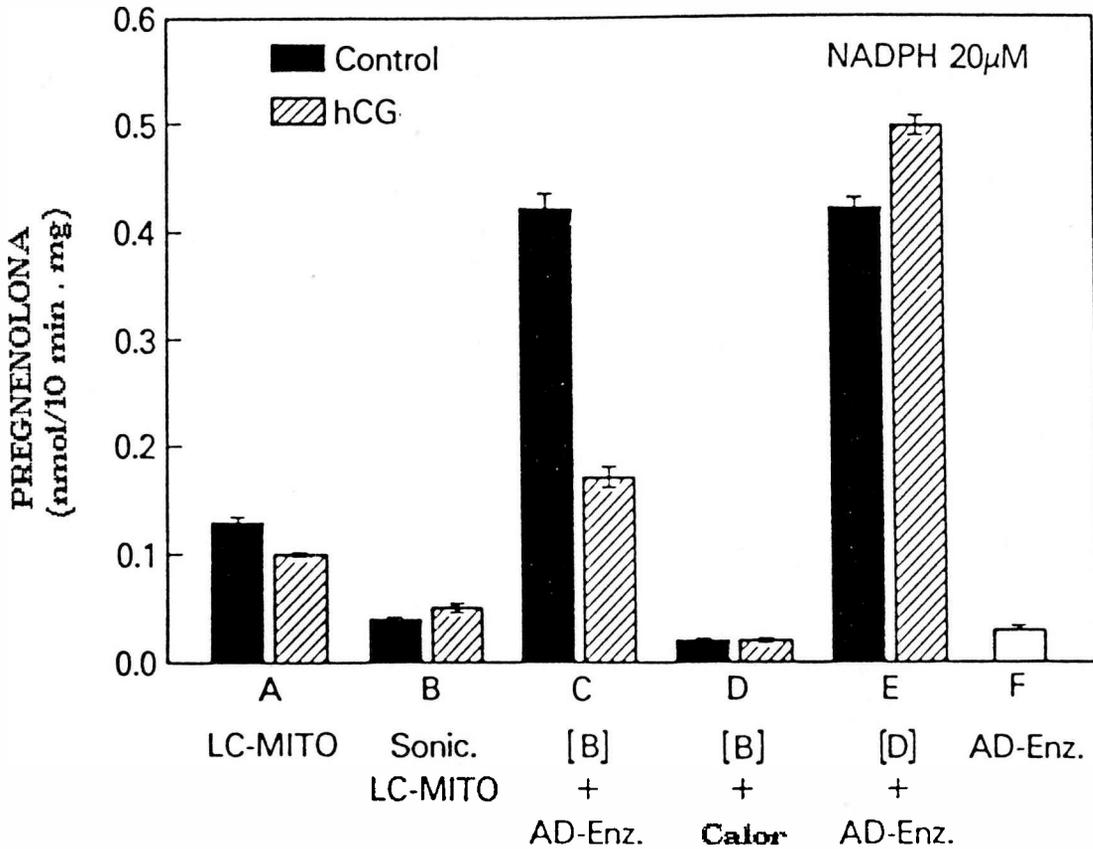


FIGURA 36. Efecto de la sonicacion o calentamiento de las mitocondrias de las celulas de Leydig sobre la actividad de la enzima adrenal.

La sonicacion se realizo a 0oC for 15 seg. Las mitocondrias sonicadas fueron calentadas a 100oC por 5 min. La cantidad de proteina mitocondrial fue de 0.5 mg y la del polvo de acetona de la adrenal fue de 0.2 mg de proteina, como fuente de la enzima 20,22 desmolasa. La produccion de pregnenolona fue iniciada por el agregado de 20 uM NADPH. Los resultados son la media  $\pm$  incubaciones por triplicado. A: mitocondrias intactas de celulas de Leydig; B: mitocondrias sonicadas de celulas de Leydig; C: B mas enzima de mitocondria adrenal; D: B mas calor; E: D mas la enzima de mitocondria adrenal; F: enzima adrenal precipitada con acetona.

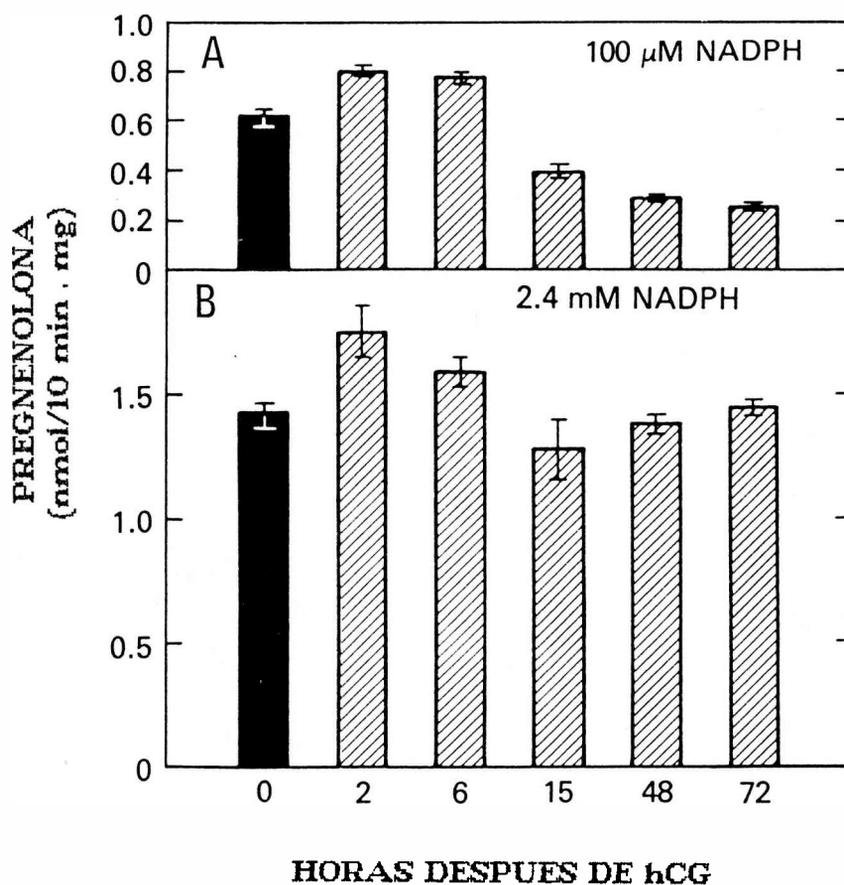


FIGURA 37. Induccion tiempo-dependiente del inhibidor mitocondrial por tratamiento con hCG in vivo. Las mitocondrias de células de Leydig fueron preparadas de ratas control y de ratas tratadas por diferentes tiempos con 10 ug de hCG. La producción de pregnenolona fue iniciada por el agregado de 100 uM (arriba) o 2.4 mM NADPH (abajo). Los resultados son la media  $\pm$  ES de incubaciones triplicadas.

2,4 mM NADPH, la producción de pregnenolona no se redujo entre las 15-72 hs (Fig. 37, panel inferior). Por el otro lado, la mitocondria sonicada mostro una producción reducida de pregnenolona a todos los tiempos (Fig. 38, panel superior). Sin embargo, la adición de mitocondria de celula de Leydig sonicada a la enzima adrenal volvio a mostrar la disminución tiempo-dependiente encontrada antes (Fig. 38, panel inferior). Además, cuando la actividad inhibitoria de la sustancia mitocondrial fue estimada a partir de la capacidad de producir pregnenolona usando enzima adrenal mas mitocondria sonicada de celula de Leydig, un progresivo incremento de la actividad inhibitora fue observado con hCG en un rango de 0 a 5 ug, alcanzando un plateau a este nivel (Fig. 39).

#### VII.5-Curvas de dosis-respuesta con el inhibidor.

Para excluir la posibilidad de que los cambios en la actividad enzimatica estuvieran relacionados con lipidos o esteroides endogenos, las mitocondrias de las celulas de Leydig fueron lavadas con acetona fria. El polvo de acetona de estas mitocondrias fue incubado por 10 min con el preparado adrenal como fuente de la enzima (200 ug de proteina) en presencia de 40 uM de NADPH, usando 100 uM de colesterol como sustrato. La formación de pregnenolona fue

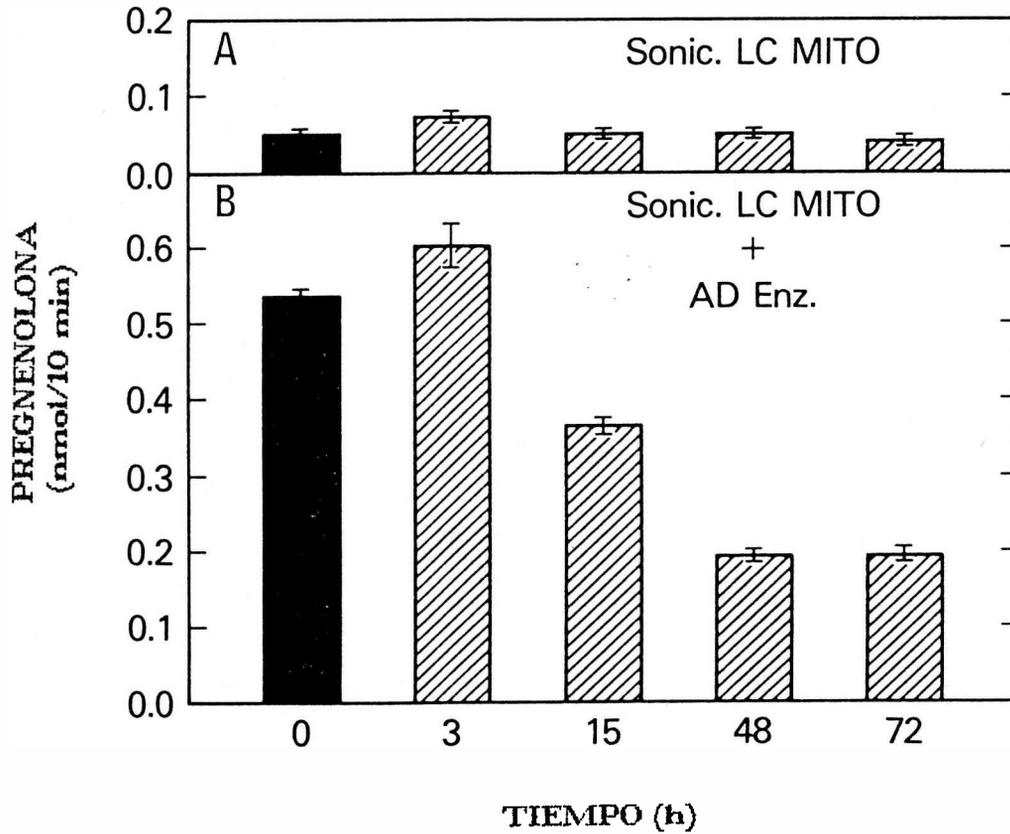


FIGURA 38. Induccion tiempo-dependiente del inhibidor mitocondrial por tratamiento con hCG in vivo. Las mitocondrias de celulas de Lydig fueron preparadas de ratas control y de ratas tratadas por diferentes tiempos con 10 ug de hCG. Arriba: mitocondrias sonicadas de celulas de Leydig. Abajo: mitocondrias sonicadas mas la enzima adrenal. Los resultados son la media  $\pm$  ES de incubaciones triplicadas.

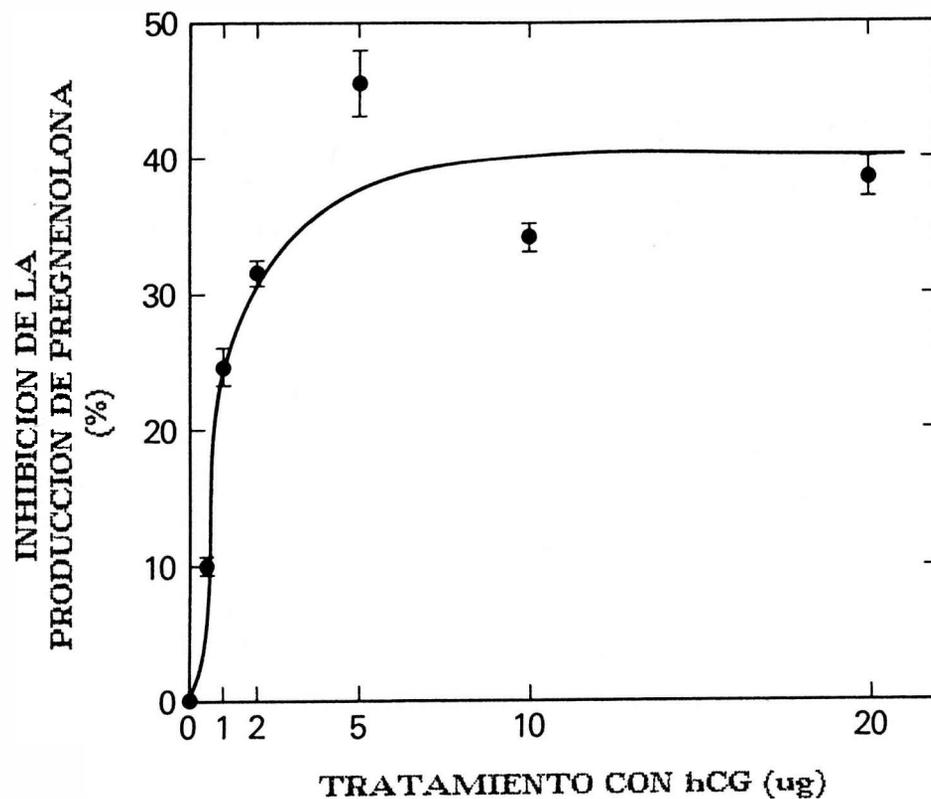


FIGURA 39. Induccion dosis-dependiente del inhibidor mitocondrial por tratamiento con hCG in vivo. Mitochondrias sonicadas de celulas de Leydig (0.5 mg) y la enzima mitocondrial de adrenal (0.2 mg) fueron incubadas en presencia de 40  $\mu$ M NADPH. La induccion del inhibidor fue expresada como el porcentaje de inhibicion de la produccion de pregnenolona vs el control. Los resultados son la media  $\pm$  ES de incubaciones triplicadas.

valorada por RIA. Como se muestra en la Fig. 40, la actividad enzimática adrenal fue progresivamente inhibida por cantidades crecientes de mitocondrias de células de Leydig control y tratadas con hCG. La DI-50 fue de 500  $\mu$ g para las mitocondrias controles y de 280  $\mu$ g para las tratadas con hCG.

#### **VII.6-Actividad inhibidora en citosol.**

Polvos de acetona de citosol de células de Leydig control o desensibilizadas incubados con la enzima adrenal no mostraron actividad inhibidora, indicando que la sustancia inhibidora es de naturaleza mitocondrial.

#### **VII.7-Efecto del 20 $\alpha$ -hidroxicolesterol sobre la esteroidogénesis.**

Células de Leydig control y desensibilizadas fueron incubadas en presencia o no de una máxima dosis de hCG *in vitro*, con el agregado de 20  $\alpha$ -hidroxicolesterol o progesterona como sustratos. Como se muestra en la Fig. 41, panel derecho, la adición de 20  $\alpha$ -hidroxicolesterol revirtió completamente la lesión biosintética ocasionada por hCG. El incremento en la producción de pregnenolona observado podría estar relacionado con el bajo consumo de NADPH por parte del 20  $\alpha$ -hidroxicolesterol (215), así como también a un mayor

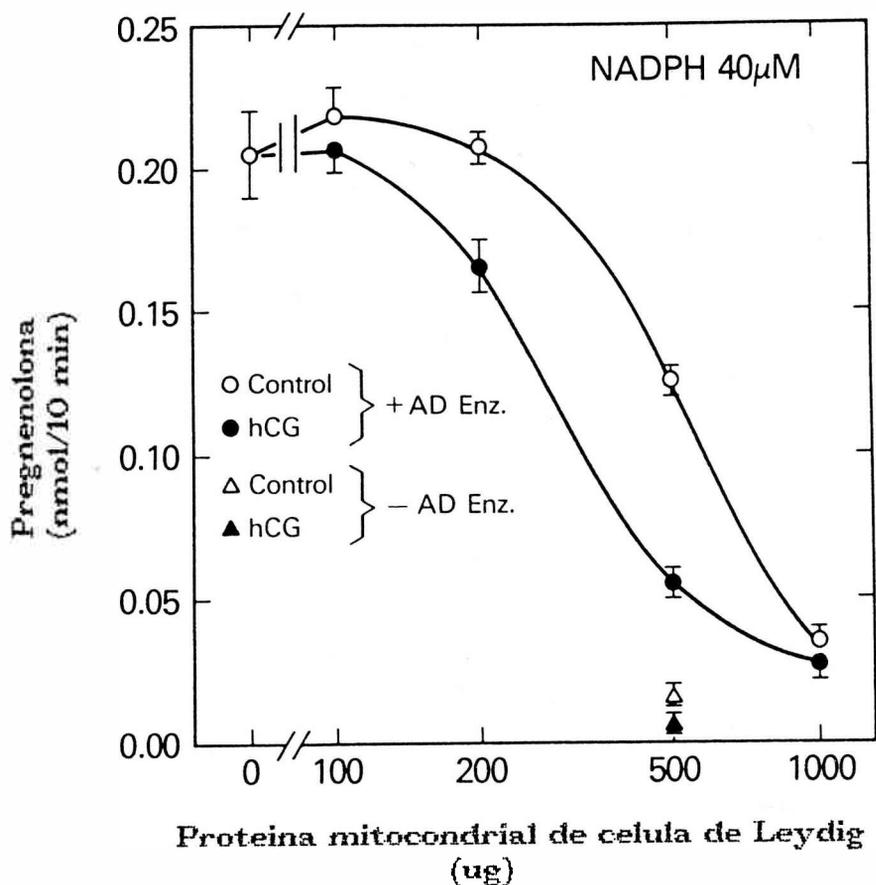


FIGURA 40. Dosis-dependencia de la inhibición de la actividad 20,22 desmolasa de mitocondria adrenal por acción del polvo de acetona de mitocondrias de células de Leydig control o de animales tratados con hCG.

Las distintas cantidades de proteína mitocondrial de las células de Leydig, 0.2 mg de del preparado adrenal y 40  $\mu$ M de colesterol solubilizado en 10  $\mu$ g Tween 80 fueron incubados en presencia de 40  $\mu$ M de NADPH por 10 minutos. Los resultados son la media  $\pm$  ES de incubaciones por triplicado.

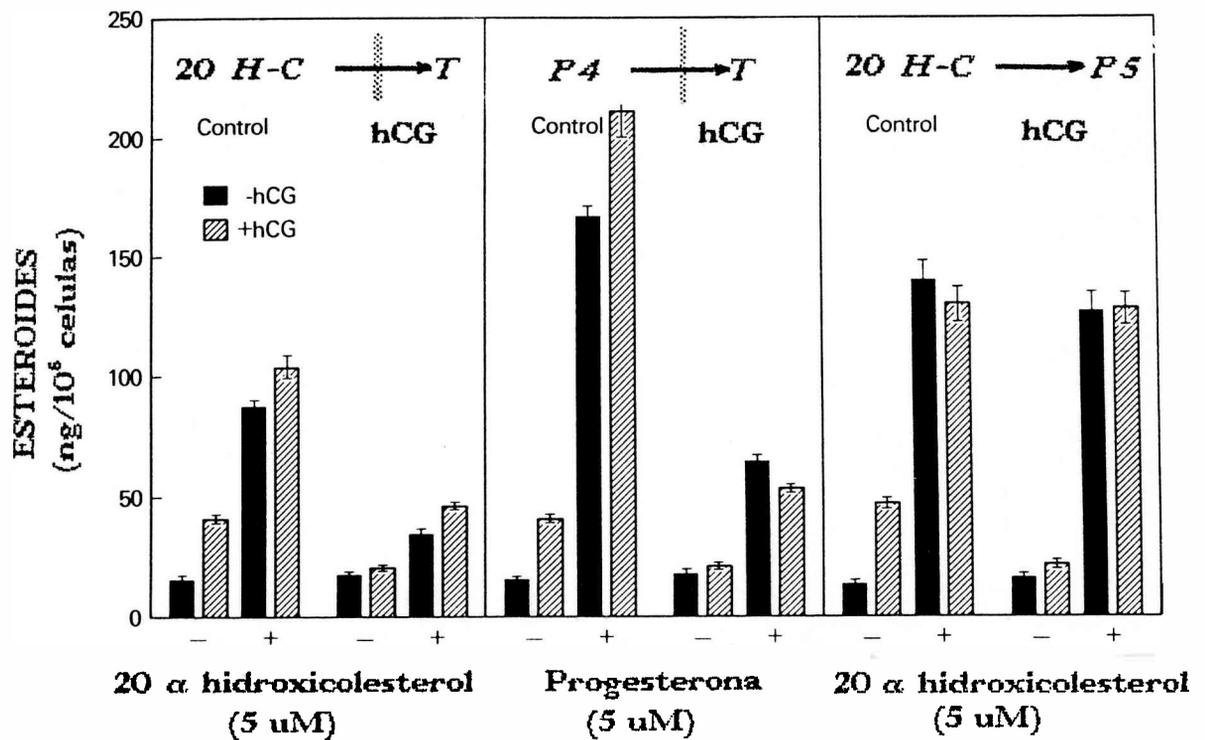


FIGURA 41. Síntesis de esteroides por la célula de Leydig desensibilizada. Síntesis de testosterona (izquierda y centro) y de pregnenolona (derecha) por células de Leydig de ratas que fueron tratadas 48 h antes con 10 ug de hCG sc. Las incubaciones fueron llevadas a cabo en presencia de 20 a-hidroxicolesterol (5 uM) o progesterona (5 uM). Los resultados son la media ± ES de incubaciones por triplicado.

accesibilidad de este esteroide al sistema de clivaje de la cadena lateral del colesterol. La determinación de testosterona en incubaciones paralelas en ausencia de inhibidores del metabolismo de pregnenolona demostraron que ni el 20  $\alpha$ -hidroxicolesterol (Fig. 41, izquierda) ni la progesterona (Fig. 41, centro) revirtieron la lesión esteroidogénica lejana dependiente de estradiol, donde los niveles de testosterona estaban marcadamente reducidos.

#### VII.8- Caracterización parcial del inhibidor.

a) **Solubilidad.** La sustancia inhibidora no pudo ser solubilizada en ausencia de detergentes. En presencia de Emulgen 911 o colato sódico al 1 %, aproximadamente el 60% de la actividad inhibidora fue recuperada en la fracción soluble.

b) **Tamaño molecular.** El tamaño molecular fue estimado bajo condiciones no desnaturizantes usando conos de membrana Centriflo de tipo CF25 y CF50A, los cuales separan tamaños moleculares mayores de 50000, entre 25000 y 50000, y menores de 25000. La actividad inhibidora, medida en nmol de pregnenolona producida/10 min/mg proteína en el ensayo de reconstitución, fue observada en la fracción de tamaño molecular superior a 50000.

c) **Radio de Stokes.** Fraccionamiento en Sephacryl S-300

del polvo de acetona mitocondrial solubilizado con detergente resulto en un unico pico de actividad que eluyo con un  $K_{av}$  de 0.168 (Fig. 42), correspondiente a un radio de Stokes aproximado de 4.8 nm (peso molecular aparente de 200000) (Fig. 43).

**d) Isoelectroenfoque.** Las fracciones con actividad inhibidora eluidas de la filtracion en Sephacryl S-300 revelaron un unico pico con un punto isoelectrico de  $5.05 \pm 0.23$  ( $n=8$ ) (Fig. 44). La Fig. 45 muestra una curva dosis-respuesta de la inhibicion de la enzima adrenal por una preparacion de la sustancia inhibidora mitocondrial de la celula de Leydig obtenida por isoelectroenfoque. La actividad inhibidora fue lineal en un rango de proteina desde 2 a 20 ug.

#### VII.9-Posible sitio de accion del inhibidor

Un preparado mitocondrial de celulas de Leydig desensibilizadas parcialmente purificado por filtracion en Sephacryl S-300 fue utilizado como fuente del inhibidor. El ensayo fue iniciado por agregado de la enzima adrenal y NADPH preincubado con y sin la sustancia inhibidora por 5 minutos. En el sistema reconstituido, la formacion de acido (14C)-isocaproico fue marcadamente reducida en presencia del factor mitocondrial (Fig. 46 B). Sin embargo, no hubo

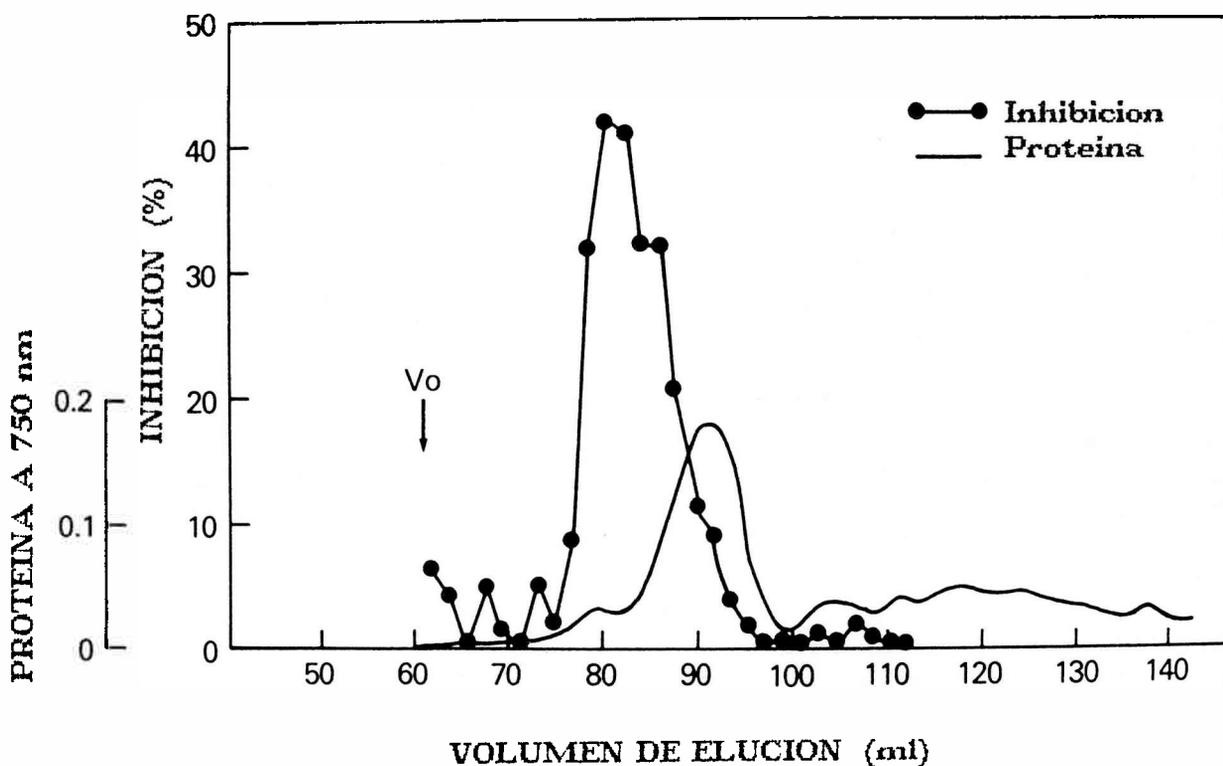


FIGURA 42. Filtración del factor mitocondrial en gel de Sephacryl S-300.

El extracto de mitocondria de celula de Leydig desensibilizada precipitado con acetona y tratado con Emulgen fue aplicado a una columna de Sephacryl S-300. Cada fraccion (0.2 ml) fue ensayada para la actividad inhibidora.

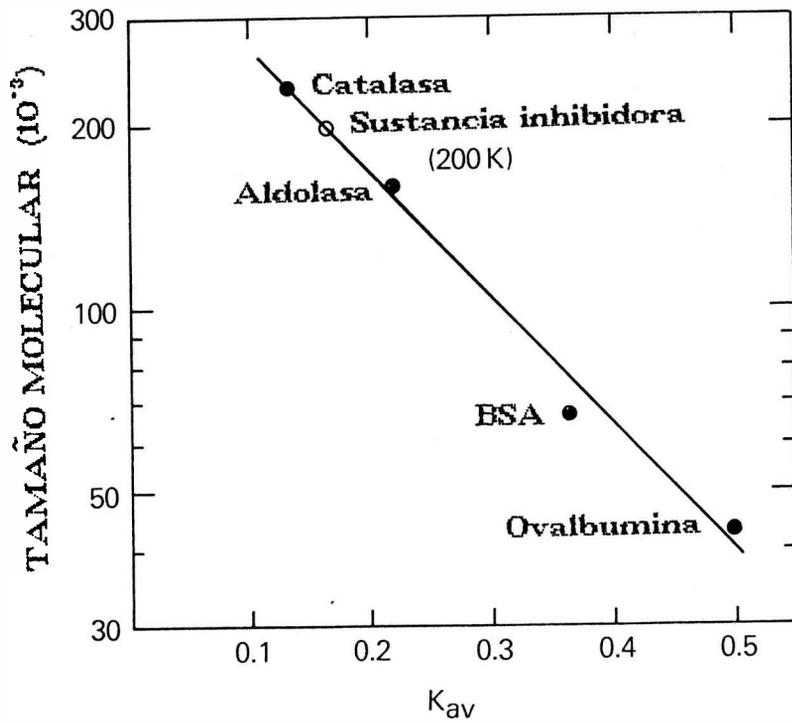


FIGURA 43. Curva de calibracion de Pesos Moleculares.  
El peso molecular aproximado en base al  $K_{av}$  fue estimado en 200.000.

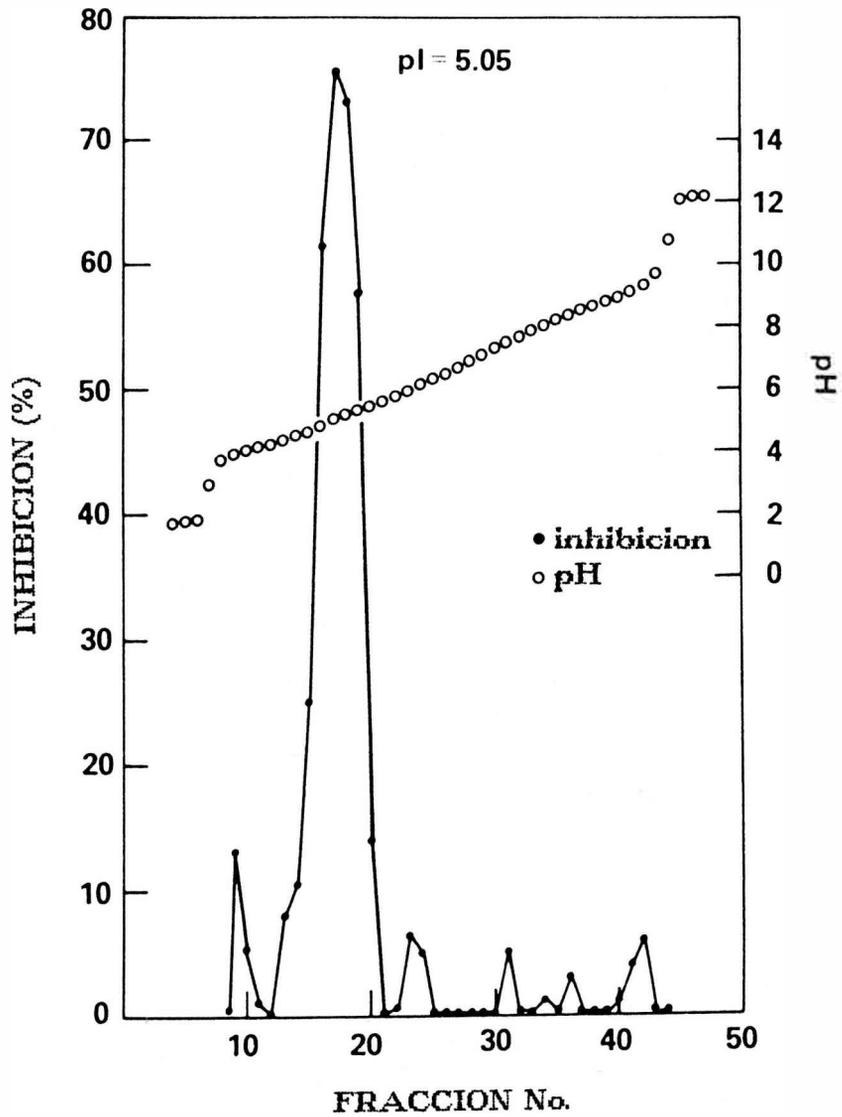


FIGURA 44. Isoelectroenfoco del factor inhibidor. La fraccion purificada por columna de Sephacryl S-300 fue sometida a isoelectroenfoco. La actividad inhibidora fue evaluada en muestras de 0.1 ml. La sustancia inhibidora mostro tener un punto isoelectrico de  $5.05 \pm 0.23$  ( $n=8$ ).

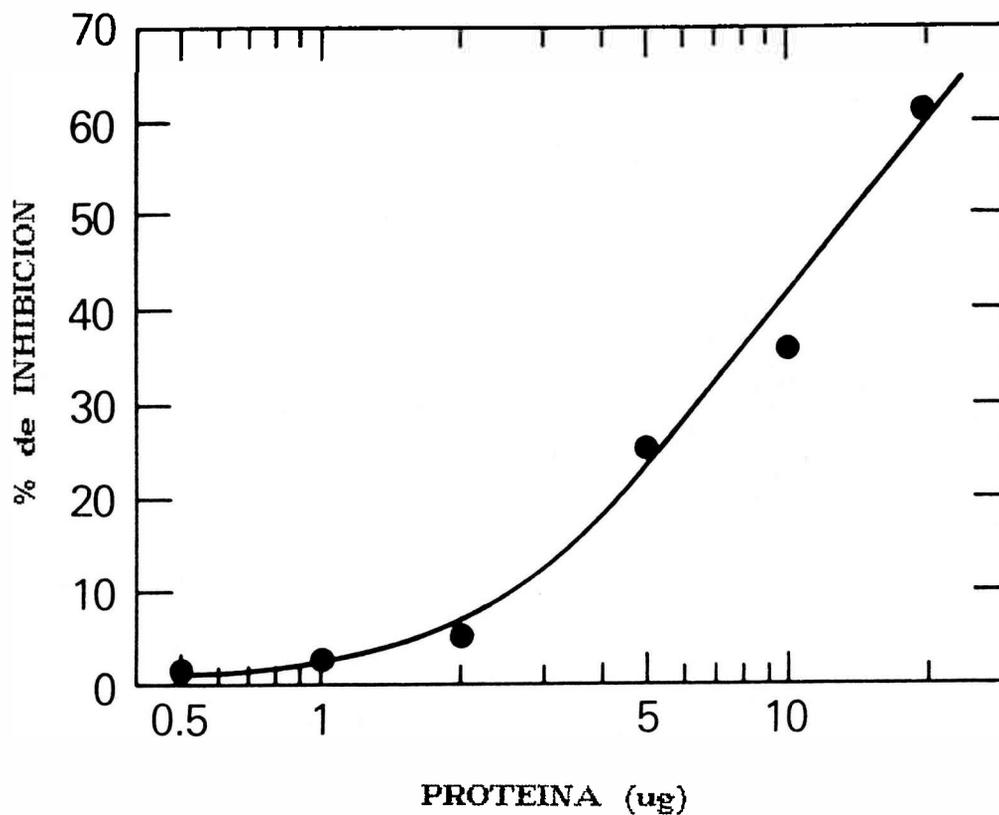


FIGURA 45. Curva dosis-respuesta de la actividad inhibidora. La sustancia inhibidora purificada por filtracion en gel e isoelectroenfoque fue incubada en un sistema reconstituido usando mitocondria adrenal como fuente de la enzima.

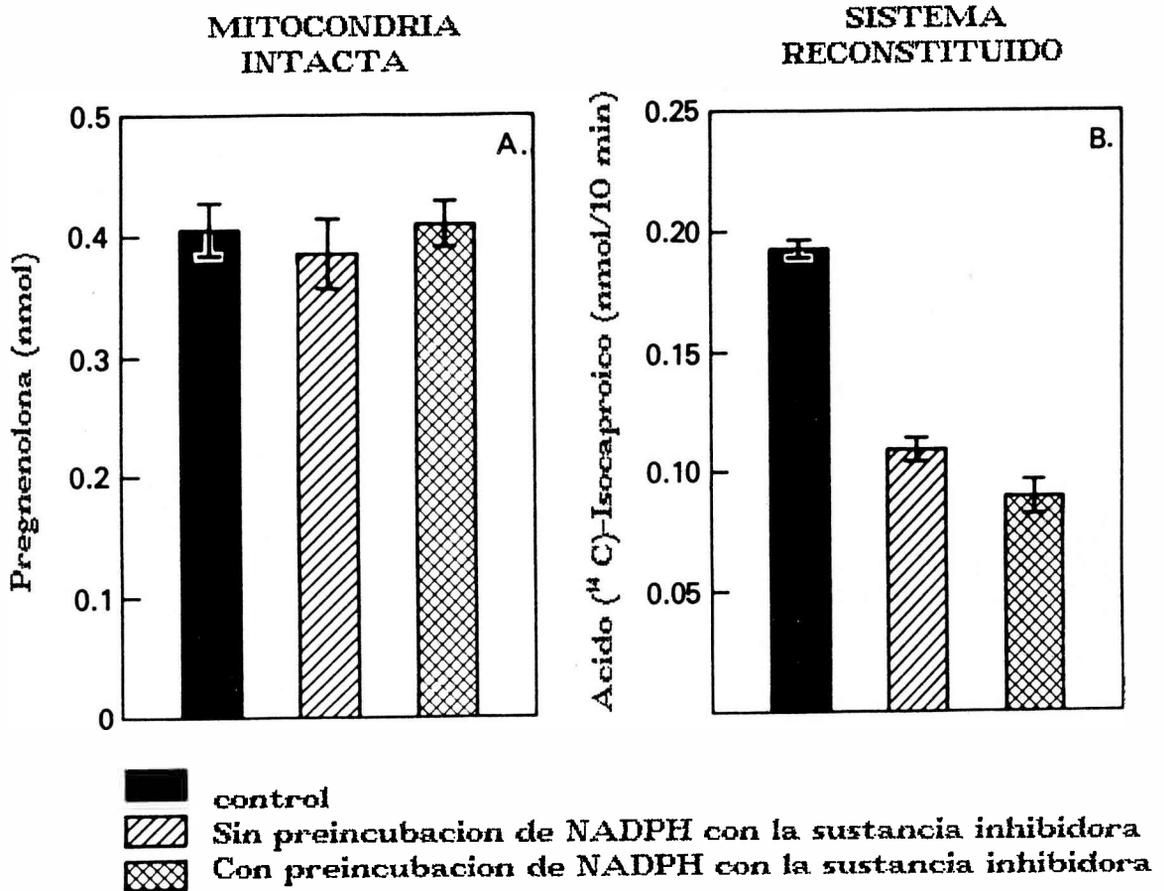


FIGURA 46. Posible sitio de accion de la sustancia inhibidora mitocondrial. Mitochondrias intactas (A) o un sistema reconstituido compuesto de mitochondrias sonicadas de celulas de Leydig y enzima adrenal (B) fueron empleados para medir pregnenolona y acido (14C)-isocaproico. NADPH (300  $\mu$ M concentracion final) fue incubado en 0.675 ml de tris buffer con o sin la sustancia inhibidora (900  $\mu$ g) por 5 min a 34  $^{\circ}$ C. La reaccion fue iniciada por la adicion del NADPH preincubado a la concentracion final de 100  $\mu$ M. Los resultados son la media  $\pm$  ES de incubaciones triplicadas.

diferencias significativas en la actividad enzimática haya habido o no preincubación con el inhibidor, indicando que el NADPH no fue ni oxidado ni degradado durante la preincubación. En la incubación de mitocondrias intactas, en las cuales la sustancia inhibidora probablemente no llega al sitio de acción de la enzima 20,22 desmolasa quizás por su gran tamaño molecular, la producción de pregnenolona no fue significativamente afectada por la adición de NADPH preincubado con o sin el inhibidor (Fig. 46 A). Estas observaciones sugieren que este factor no oxidaría o inmovilizaría el NADPH agregado. La evidencia de la falta de interacción entre el NADPH y el factor inhibidor fue aportada por experimentos en los que la sustancia inhibidora fue sometida a cromatografía en 2',5'ADP-Sepharosa-4B. La actividad inhibidora fue eluida en la fracción no adsorbida, indicando que el inhibidor no interacciona directamente con el NADPH (Fig. 47).

Estos resultados sugieren que la sustancia mitocondrial inhibidora probablemente actuaría afectando la interacción de los componentes del sistema de clivaje de la cadena lateral del colesterol con la consecuente reducción del transporte electrónico al citocromo P-450.

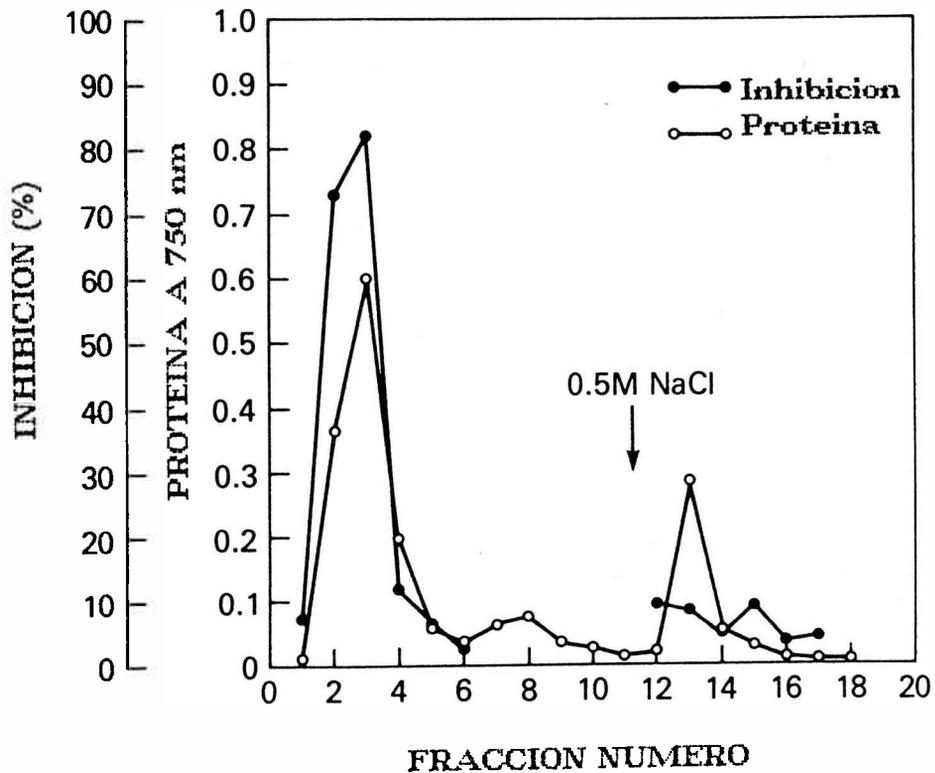


FIGURA 47. Cromatografía de afinidad de la sustancia inhibidora en 2',5'-ADP Sepharosa 4B.

El polvo de acetona de mitocondria de células de Leydig fue extraído con Tris buffer conteniendo 0.2% Emulgen 911, y la fracción soluble (5.2 mg de proteína) fue aplicada a una columna de 2',5'-Sepharosa 4B (0.5 g) equilibrada con Tris buffer 0.2% Emulgen. La columna fue lavada con el mismo buffer y la fracción adsorbida fue eluida con 0.5 M NaCl. Las fracciones adsorbidas fueron filtradas en conos CF25 y resuspendidos en Tris buffer 0.2% Emulgen. Cada fracción fue ensayada para la actividad inhibidora y para la determinación de proteína.

## VIII. El fenomeno de desensibilizacion testicular en el Hombre.

### VIII-A. En pacientes con feminizacion testicular.

Uno de los primeros pasos de la accion androgenica es la interaccion de la testosterona o dihidrotestosterona (su metabolito mas activo) con los receptores nucleares presentes en los tejidos blanco (217). Posteriormente, el complejo hormona-receptor se une en sitios especificos de la cromatina denominados aceptores, donde inducen la activacion de las RNA polimerasas, y desencadenan la cascada de eventos que llevan a la sintesis proteica responsable de la aparicion del efecto biologico. La ausencia congenita de estos receptores impide que la accion androgenica se lleve a cabo conduciendo al sindrome de insensibilidad a los androgenos o tambien llamado feminizacion testicular (218). Estos individuos son geneticamente hombres, pero la ausencia de receptores androgenicos los hace fenotipicamente mujeres con desarrollo glandular mamario, genitales externos femeninos e infantiles, vagina corta terminada en fondo de saco y ausencia de pelo axilar y pubico. Poseen testiculos localizados en abdomen o regiones inguinales y no tienen utero y anexos. Lo que resulta interesante desde el punto de vista endocrinologico es que a pesar de presentar niveles elevados de LH, los niveles de testosterona de estos individuos se encuentran por debajo o dentro del rango

normal del hombre (219). En consecuencia, es posible especular que los testiculos de estos pacientes esten desensibilizados por la elevada concentracion gonadotrofica.

Con el objeto de investigar esta posibilidad, celulas de Leydig aisladas de dos pacientes con feminizacion testicular se incubaron con y sin hCG en el medio para provocar la maxima respuesta. Como control se utilizaron celulas de Leydig de testiculos de un paciente operado por adenoma prostatico. Como se muestra en la Tabla VI, la respuesta de testosterona fue significativamente menor en los testiculos con insensibilidad a los androgenos.

Tabla VI. Produccion de testosterona in vitro por celulas de Leydig humanas (ng/millon de celulas/3 hs).

---

	<u>Basal</u>	<u>Post-estimulacion</u>
Hombres Normales	20 ± 5	48 ± 15
Hombres con SIA	22 ± 6	25 ± 6

---

Las celulas de Leydig aisladas fueron incubadas durante 3 hs en incubador metabolico sin (basal) y con (post-estimulacion) el agregado de 100 ng hCG/ml de medio de incubacion. SIA = Sindrome de insensibilidad a los androgenos. Los testiculos normales fueron obtenidos de pacientes operados por carcinoma de prostata. La respuesta de las celulas de Leydig de pacientes con SIA no fue estadisticamente significativa ( $p > 0.5$ ). Los resultados son la media ± DS de incubaciones triplicadas.

#### **VIII-B. En pacientes con infertilidad asintomatica.**

Es sabido que tanto la LH como la FSH son necesarias para la espermatogenesis (220). Sin embargo, ha sido aceptado que el efecto de la LH esta mediado por la testosterona de la celula Leydig. En consecuencia, testosterona y FSH son las hormonas que actuan directamente sobre el epitelio del tubulo seminifero. En la pubertad, la iniciacion de la espermatogenesis requiere tanto de testosterona como de FSH. Una vez que el epitelio germinal se ha establecido, la testosterona sola es capaz de mantener la produccion espermatica (221). La accion androgenica parece ser necesaria para la formacion de espermatogonias y para la segunda division meiotica que produce las espermaticos (220).

Dado que la infertilidad asintomatica de causa no inmunologica o infecciosa observada en hombres con niveles normales de LH, FSH, testosterona, estradiol y prolactina, es en general debida a alteraciones de la espermatogenesis tales como la oligo-astenospermia (222), nos propusimos evaluar la capacidad androgenica del testiculo sometido a una estimulacion aguda con gonadotropina in vivo.

##### **VIII-B.1-Respuesta testicular a la hCG.**

Ha sido demostrado que el testiculo humano responde a la administracion intramuscular de hCG con una secrecion

bifasica de testosterona (223). Sin embargo, una segunda inyeccion de hCG 24 hs mas tarde produce una respuesta monofasica, en la que se ha perdido el primer incremento (224). Es decir, la celula de Leydig ha sido desensibilizada por la primera dosis de hCG y se hace incapaz de responder a la segunda. Nuestra hipotesis fue que los pacientes con oligo-astenospermia idiopatica tendrian una deficiente biodisponibilidad intratesticular de testosterona por disminucion de la relacion testosterona:estradiol mas que por una disminucion del nivel absoluto de la misma, ya que los pacientes presentaban niveles normales de este androgeno.

Con el objeto de investigar la posible presencia del efecto modulador negativo del estradiol sobre el testiculo de estos pacientes, se evaluo las respuestas de testosterona, estradiol y 17 hidroxiprogesterona a la administracion de hCG, en 128 pacientes oligoastenospermicos, las que fueron comparadas a las obtenidas en 10 hombres normales con fertilidad comprobada. Se eligio la 17 hidroxiprogesterona y no pregnenolona, porque a diferencia de los roedores, donde la via metabolica preponderante es la de los esteroides delta-5, en el humano la via principal es la de los delta-4 (217).

Dado el amplio rango en las concentraciones circulantes de los esteroides entre los distintos individuos estudiados,

y a los efectos de permitir una comparacion de las respuestas, los valores obtenidos luego de la inyeccion de hCG fueron expresados para cada hombre como el porcentaje de incremento con respecto al promedio de sus propios basales.

Las respuestas de testosterona y 17 hidroxiprogesterona a la hCG encontradas en el grupo control fueron de tipo bifasico, con un primer incremento entre las 2 y 4 hr, y un segundo y mas prolongado aumento despues de las 24 hs (Fig. 48). En cambio la respuesta de estradiol fue monofasica, haciendose maxima alrededor de las 24 hs post hCG.

Cuando una segunda dosis de 5000 UI de hCG se inyecta a hombres normales 24 hs despues de la primera, la 17 hidroxiprogesterona responde con un incremento de similar magnitud al observado con la primera dosis (solo que partiendo de un "basal" mas elevado), mientras que la testosterona no experimenta cambios significativos (Fig. 49). Estos resultados indican la existencia de un bloqueo parcial en la conversion de 17 hidroxiprogesterona a testosterona inducido por la primera dosis de hCG y puesto en evidencia por la segunda. En consecuencia, nuestra hipotesis fue que pacientes con trastornos de la espermatogenesis no debidos a alteraciones en la secrecion de gonadotrofinas ni a patologias de tipo histologico, tendrian una secrecion inapropiada de esteroides testiculares producto de un estado de desensibilizacion, que podria

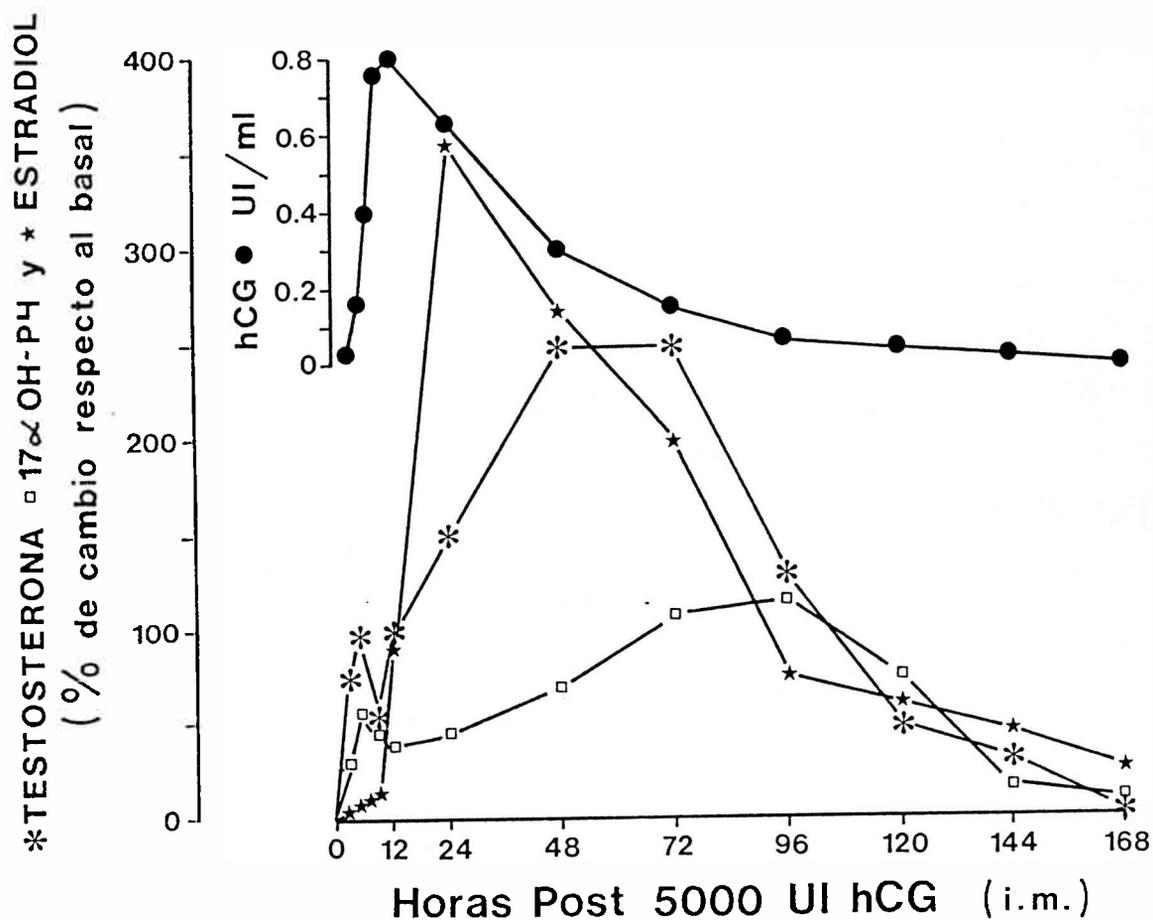


FIGURA 48. Niveles circulantes de testosterona, 17 hidroxiprogesterona (17 OH-P4) y estradiol en hombres normales luego de la inyección intramuscular de 5000 UI de hCG.

En círculos negros se muestra la concentración circulante de la hCG inyectada.

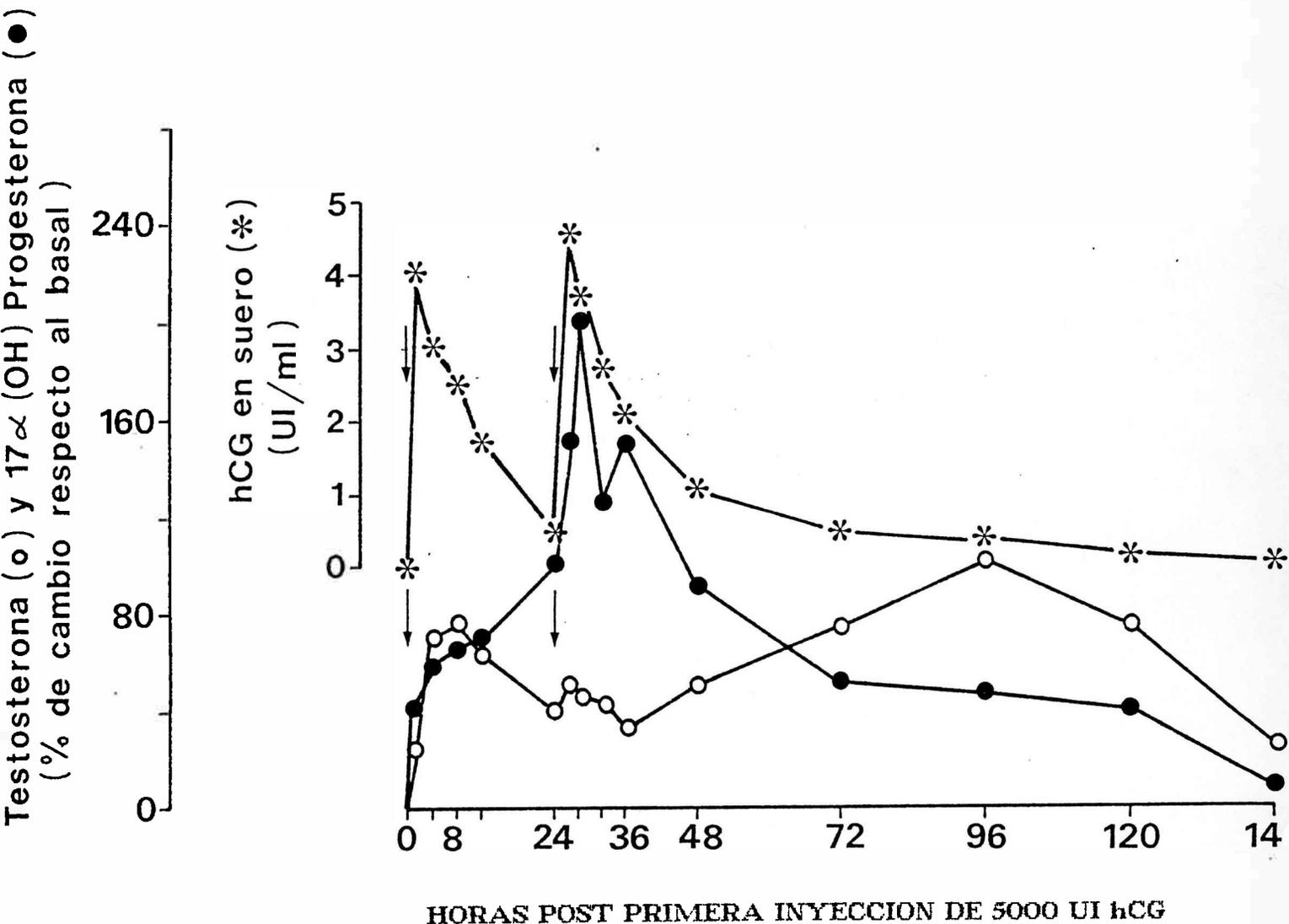


FIGURA 49. Niveles circulantes de testosterona, y 17 hidroxiprogesterona (17 OH-P4) en hombres normales luego de una segunda inyección intramuscular de 5000 UI de hCG 24 hs después de la primera.

La primera inyección intramuscular de hCG se indica con una flecha a las 0 hs, mientras que la segunda se indica a las 24 hs.

ponerse de manifiesto mediante el estímulo agudo con hCG.

De esta forma, se le practicó el test de hCG a 128 pacientes infértiles que presentaban oligoastenospérmica idiopática como única causa de infertilidad. La respuesta de testosterona encontrada en estos pacientes permitió clasificarlos en dos grupos (Fig. 50): Grupo 1 (n=89) con un incremento inferior al 10% a las 4 hs (hipo-respuesta temprana), pero dentro del rango normal a las 24 hs, y Grupo 2 (n=39) con una respuesta similar a la del grupo control en todos los tiempos.

La respuesta de estradiol fue similar en ambos grupos y dentro del rango normal. Sin embargo, la respuesta de 17 hidroxiprogesterona fue similar a la normal en el Grupo 2, pero de 3 tipos en el Grupo 1. En efecto, el 30% de los pacientes con hipo-respuesta de testosterona mostró a las 24 hs post hCG una hiper-respuesta de 17 hidroxiprogesterona ( $636.5 \pm 34.2\%$  de incremento); otro 30% mostró una respuesta normal ( $166.7 \pm 14.3\%$ ), mientras que el 40% restante tuvo una respuesta significativamente disminuida ( $97.8 \pm 39.2\%$ ).

No se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones basales de testosterona, estradiol, 17 hidroxiprogesterona, LH y FSH ni entre los grupos de pacientes, ni con el grupo control. Tampoco se observaron diferencias en la dinámica de la respuesta de LH y FSH al estímulo agudo con LHRH (225,226).

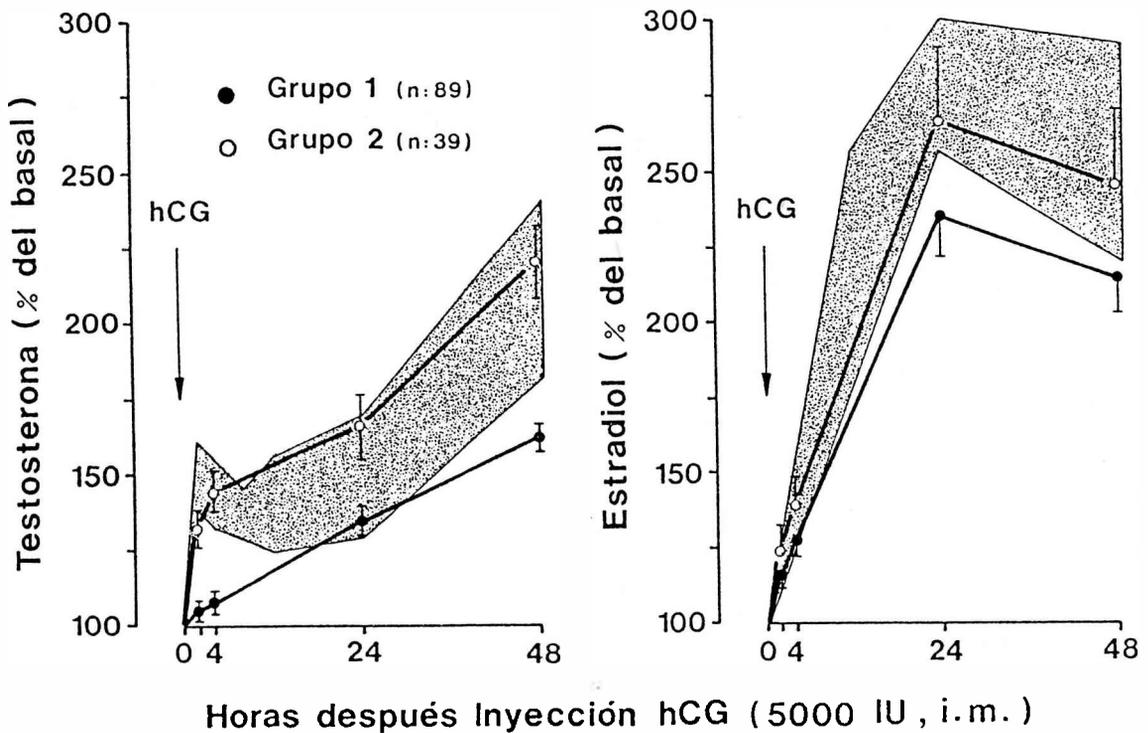


FIGURA 50. Respuesta de testosterona (panel izquierdo) y estradiol (panel derecho) expresada como porcentaje de incremento  $\pm$  ES con respecto a la media de sus propios basales al estímulo con 5000 UI de hCG. Círculos cerrados: Pacientes oligo-astenospermicos con hiporrespuesta temprana de testosterona (Grupo 1). Círculos abiertos: Pacientes oligo-astenospermicos con respuesta de testosterona normal (Grupo 2). El area sombreada representa los límites de la media  $\pm$  DS de los resultados obtenidos en 10 hombres normales.

### VIII-B.2-Efecto de la aminoglutetimida (AGT).

El tratamiento con el inhibidor de la síntesis estrogénica en 30 pacientes del Grupo 1 y en 10 del Grupo 2 indujo una significativa disminución en los niveles circulantes de estradiol en ambos grupos de pacientes sin variación importante en los niveles basales de testosterona, lo que provocó un aumento significativo de la relación testosterona:estradiol (Tabla VII). Además, indujo una reducción en la respuesta de 17 hidroxiprogesterona en el subgrupo de pacientes que la tenían elevada, normalizándose paralelamente la respuesta de testosterona (Fig. 51).

Tabla VII. Niveles circulantes de testosterona y estradiol antes y durante el tratamiento con aminoglutetimida.

Pacientes	Testosterona (ng/ml)		Estradiol (pg/ml)		Relación T:E2	
	B	AGT	B	AGT	B	AGT
Grupo 1	4.3±0.5	4.1±1.2	59±29	25±10	72±18	164±31
Grupo 2	4.4±1.0	5.2±1.5	62±13	32±5	71±15	162±54

Pacientes de los grupos 1 (n=30) y 2 (n=10) fueron tratados con aminoglutetimida (AGT) más hidrocortisona como se indica en Materiales y Métodos. Las muestras para la determinación de testosterona (T) y estradiol (E2) fueron tomadas antes (B) y a los 30 días de iniciado el tratamiento. Los resultados están expresados como la media ± DS de los valores individuales. El aumento de la relación T:E2 fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

También se normalizó la respuesta de testosterona en los pacientes con respuesta de 17 hidroxiprogesterona normal.

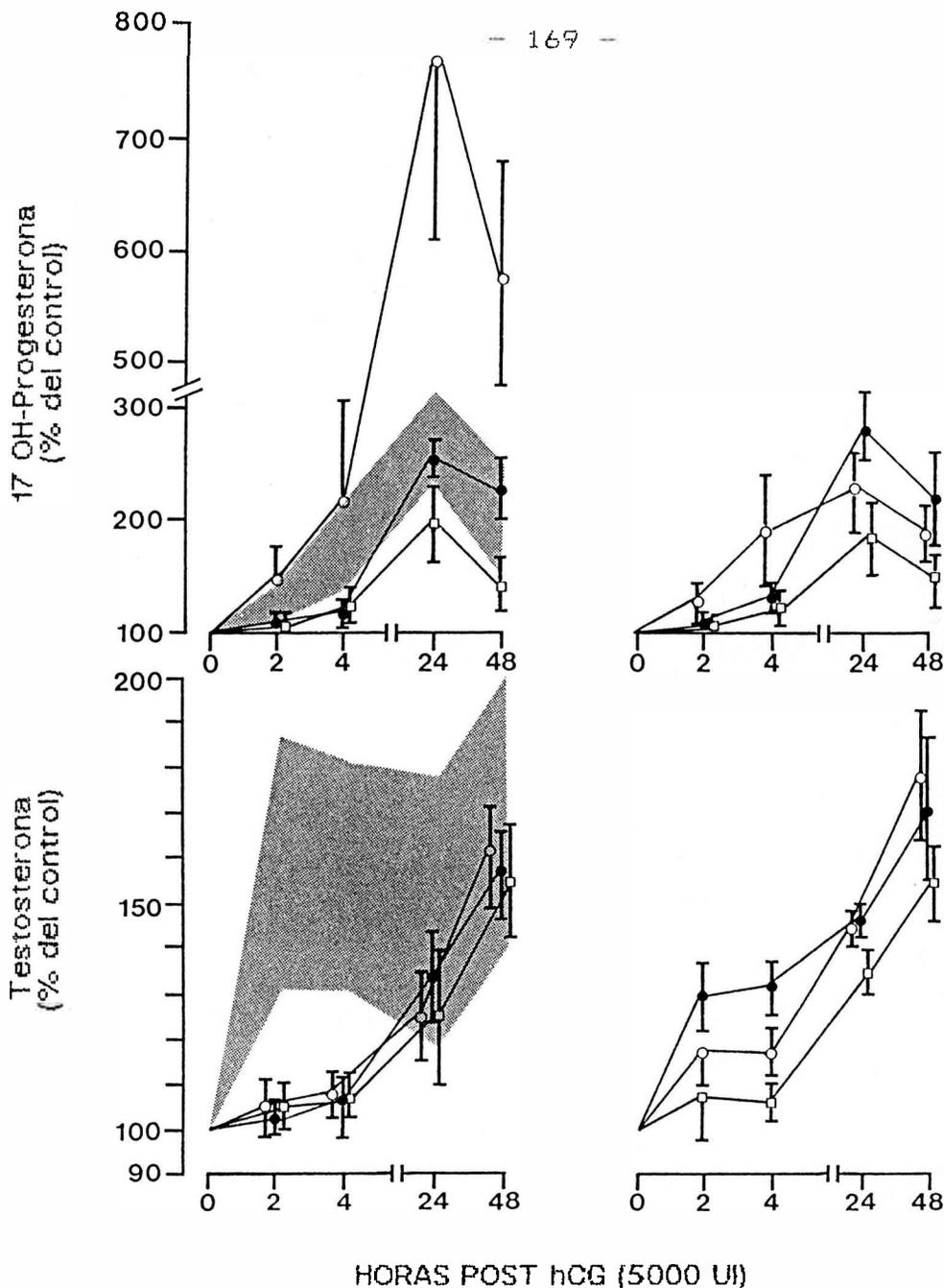


FIGURA 51. Respuestas de testosterona y 17 hidroxiprogesterona a hCG antes (panel izquierdo) y despues (panel derecho) del tratamiento con 500 mg/dia de aminoglutetimida (AGT) mas 20 mg/dia de hidrocortisona (HC) en 30 pacientes del grupo 1.

Estos pacientes fueron divididos de acuerdo a la respuesta de 17 hidroxiprogesterona en hipo- (cuadrados abiertos, n = 13), normo- (circulos cerrados, n = 9) e hiper-respondientes (circulos abiertos, n = 8). Las areas sombreadas representan las respuestas normales.

Sin embargo, el tratamiento no modifico la hipo-respuesta de 17 hidroxiprogesterona, manteniendose en estos pacientes tambien la hipo-respuesta de testosterona. Estos resultados sugieren que los pacientes con hiper-respuesta de 17 hidroxiprogesterona e hipo-respuesta de testosterona estarian afectados por una lesion a la altura de las enzimas microsomales 17 alfa-hidroxilasa y 17,20 desmolasa, la cual es dependiente de estradiol, y por ello es revertida por la AGT. Aquellos pacientes con hipo-respuesta de 17 hidroxiprogesterona y testosterona, tendrian un bloqueo anterior a la sintesis de 17 hidroxiprogesterona, no revertido con antiestrogenos.

#### **VIII-B.3-Efecto sobre la espermatogenesis.**

La calidad del semen se evaluo en 16 pacientes del Grupo 1 y en 6 del Grupo 2 antes y a los 90 dias de tratamiento con AGT. La concentracion total de espermatozoides, asi como la de espermatozoides Grado III (activos) aumento significativamente despues del tratamiento con AGT en el 100% de los pacientes del Grupo 1 (Fig. 52), no observandose cambios en el semen de los pacientes del Grupo 2. Ademas, 5 de los 16 pacientes del Grupo 1 (30%) lograron embarazo.

Dado que la calidad del semen mejoro solo en los pacientes con hipo-respuesta de testosterona, es posible

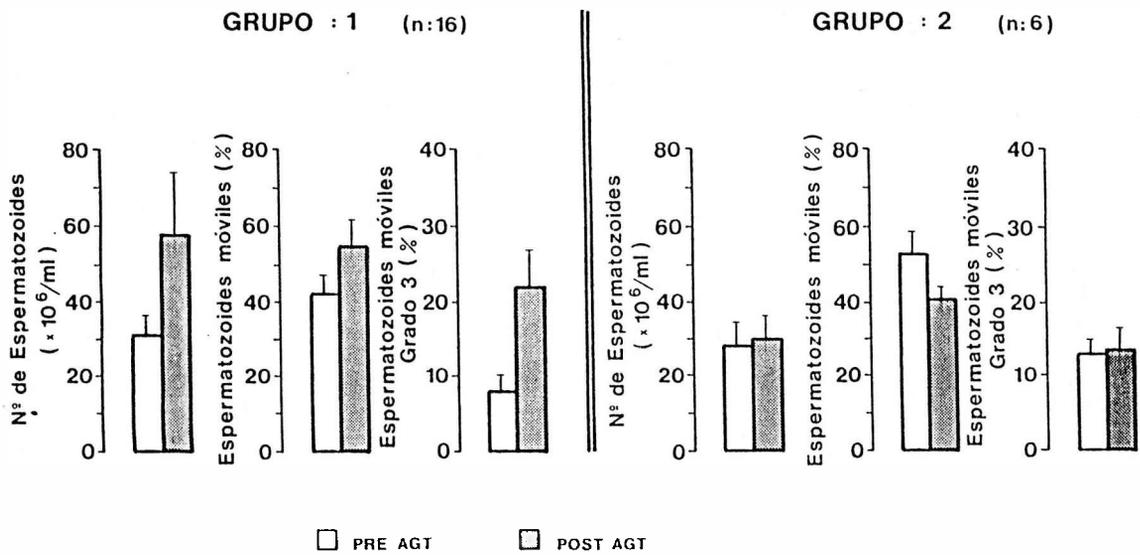


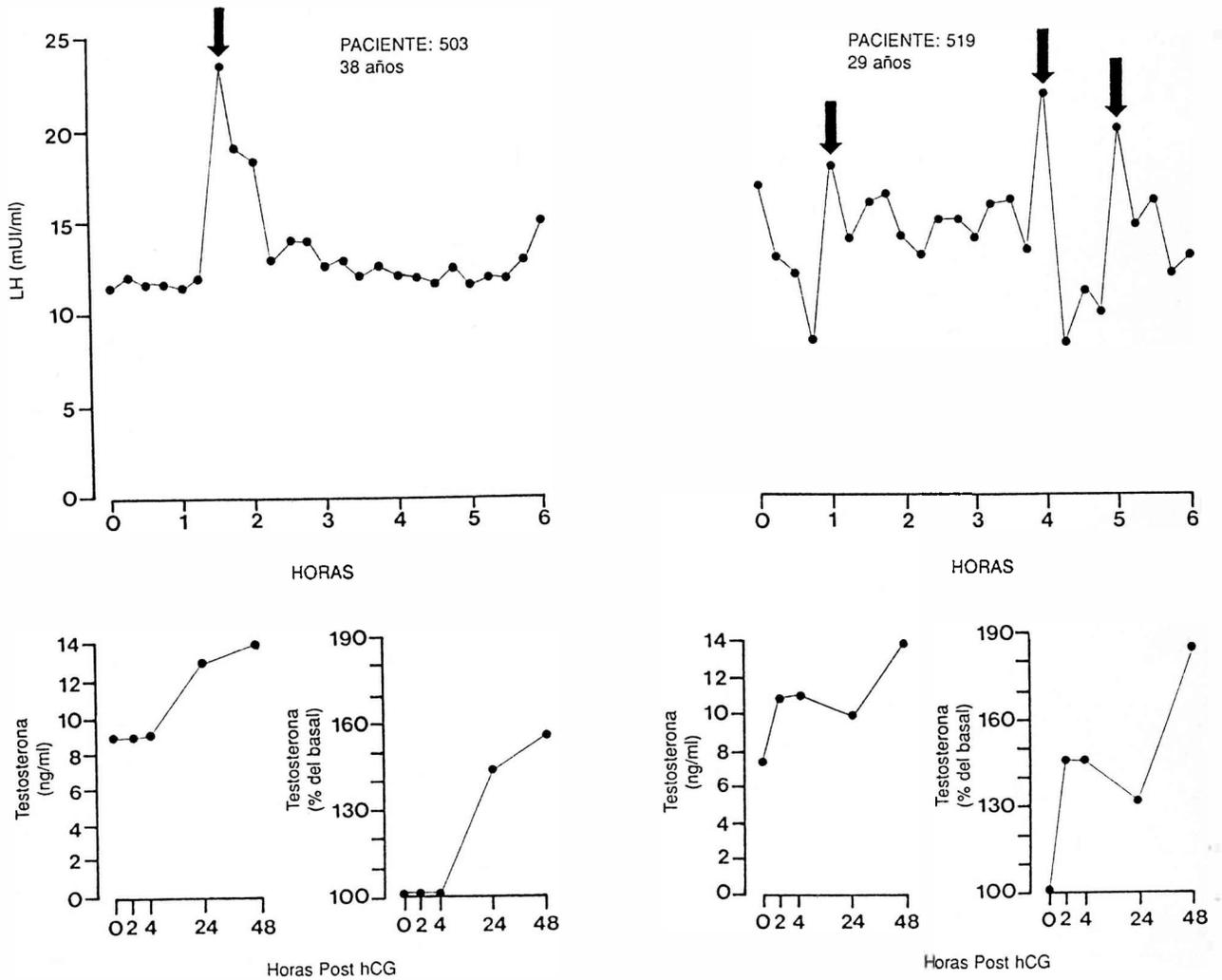
FIGURA 52. Características del semen eyaculado de los pacientes olig-astenospermicos de los Grupos 1 y 2 antes y despues del tratamiento con AGT.

Pacientes con hipo-respuesta de testosterona a la hCG (n=16) y con respuesta normal (n=6) fueron tratados por 90 dias con aminoglutetimida mas hidrocortisona (AGT/HC) y los paramatros seminales fueron evaluados antes y despues del tratamiento. Los resulatdos son la media  $\pm$  DS.

concluir que el test simplificado de hCG (con extracciones a las 2, 4, 24 y 48 hs post estímulo) es una herramienta clinica de suma utilidad para la seleccion de los pacientes a ser tratados con el inhibidor de estrogénos.

#### VIII-B.4-Estudio de la pulsatilidad de la secrecion hipofisaria de LH.

Dado que la pulsatilidad de la secrecion de LH es una condicion necesaria para evitar la desensibilizacion de la celula de Leydig, nos propusimos evaluar las fluctuaciones episodicas de la LH en ambos grupos de pacientes a los efectos de determinar si la hipo-respuesta temprana de testosterona a la hCG guardaba relacion con el tipo de secrecion hipofisaria. Las muestras fueron obtenidas cada 15 minutos durante 6 hs a traves de un cateter endovenoso conectado a solucion fisiologica para mantener la via permeable. Se considero un pulso cuando la diferencia entre un valor de LH y su inmediato anterior resulto mayor que 3 veces el coeficiente de variacion del metodo. Se estudiaron 10 pacientes del grupo 1 y 6 del Grupo 2. La Fig. 53 (panel superior) muestra un ejemplo representativo de los resultados encontrados. Como puede verse, el paciente con hipo-respuesta temprana de testosterona presento solo un pulso, mientras que el paciente con respuesta normal mostro 3 pulsos. En los paneles inferiores de la Fig. 53 se



**FIGURA 53. Pulsatilidad de LH en pacientes oligoastenospérmicos.**

La figura muestra 2 casos representativos en los que se vio que pacientes con hiporrespuesta temprana de testosterona a la hCG (izquierda y abajo) presentaban una disminución en la frecuencia de aparición de los pulsos de LH (izquierda y arriba), mientras que los pacientes con respuesta normal de testosterona (derecha y abajo) presentaban una secreción normal de LH (derecha y arriba).

muestran las respuestas de testosterona encontradas en los mismos pacientes. Estos resultados sugieren que la refractariedad parcial encontrada en los testiculos de los pacientes del Grupo 1 seria consecuencia de una secrecion tonica o cuasi-tonica de LH. Queda todavia por dilucidar si la falta de pulsatilidad gonadotrofica es debida a una falla hipofisaria o consecuencia de una secrecion tonica de la LHRH hipotalamica.

#### **VIII-C. Respuesta testicular a la hCG en pacientes infertiles con varicocele.**

Ha sido reportado que la presencia de varicocele es frecuente en el 20 % de los hombres de la poblacion general (227), muchos de los cuales son infertiles. Sin embargo, existe controversia acerca de la relacion entre varicocele e infertilidad. Hay evidencias de que hombres con varicocele mejoran su calidad espermatica luego de la cirugia (228,229). El mecanismo preciso por el que el varicocele causaria infertilidad es poco conocido, aunque se postula que existiria por un lado, un aumento de la temperatura testicular que afectaria la funcionalidad del epitelio seminifero, y por el otro, una acumulacion de desechos celulares como consecuencia de una disminucion en la velocidad del flujo sanguineo producto de un aumento en el grosor de las venas. Nuestro objetivo fue evaluar la

respuesta testicular a la hCG como lo hicimos con los pacientes sin varicocele, con el objeto de relacionar la presencia del varicocele con aparición de fallas en la esteroidogénesis. Se estudiaron 110 pacientes, los que presentaron los mismos 2 tipos de respuesta a la testosterona encontrados anteriormente: 58 pacientes mostraron una hipo-respuesta temprana, mientras que los 52 restantes mostraron una respuesta normal. Estos resultados demuestran que la presencia del varicocele no produce una respuesta diferente de la que se obtiene en otros pacientes infértiles sin varicocele. De la misma forma, la distribución de las anomalías seminales fue similar en ambos grupos, como puede verse en la Tabla VIII.

**Tabla VIII. Analisis seminal en hombres infértiles con varicocele (media  $\pm$  DS).**

	GRUPO 1			GRUPO 2		
	Azoos- permicos (n=2)	Oligo-astenos- permicos (n=26)	Astenos- permicos (n=30)	Azoos- permicos (n=2)	Oligo-astenos- permicos (n=28)	Astenos- permicos (n=22)
No. Esperm. (millones)	--	12.4 $\pm$ 1.6	71.0 $\pm$ 6.5	--	11.1 $\pm$ 1.4	78.0 $\pm$ 10.0
Esperm Grado III (%)	--	9.4 $\pm$ 1.5	11.7 $\pm$ 1.4	--	9.5 $\pm$ 1.5	8.2 $\pm$ 1.5

**VIII-D. Respuesta hipofisaria a la infusión de LHRH en pacientes con varicocele.**

A 18 pacientes del Grupo 1 y a 18 del Grupo 2 se les administro 100 ug de LHRH por infusion durante 4 hs, determinando LH y FSH cada 60 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IX (media  $\pm$  DS):

**Tabla IX. Respuesta hipofisaria a la infusion de LHRH en pacientes con varicocele.**

	Basal				Infusion LHRH				Basal				Infusion LHRH			
					1 h	2 h	3 h	4 h					1 h	2 h	3 h	4 h
Grupo 1	10.9 $\pm$ 1.6	15.8 $\pm$ 1.9	16.4 $\pm$ 2.1	20.1 $\pm$ 3.2	25.8 $\pm$ 4.8	12.3 $\pm$ 1.5	17.1 $\pm$ 4.0	17.7 $\pm$ 4.0	21.3 $\pm$ 6.1	25.3 $\pm$ 5.8						
Grupo 2	10.2 $\pm$ 1.1	23.5 $\pm$ 3.0	30.0 $\pm$ 5.1	33.5 $\pm$ 4.4	47.0 $\pm$ 8.5	13.3 $\pm$ 1.5	21.2 $\pm$ 3.8	21.8 $\pm$ 4.4	26.4 $\pm$ 5.4	28.8 $\pm$ 6.3						

Como puede verse, los niveles de LH durante la infusion de LHRH fueron significativamente mas elevados en los pacientes del Grupo 2, mientras que los de FSH fueron similares. Estas respuestas a la infusion de LHRH sugieren que la disminucion en la secrecion de LH observada en pacientes del Grupo 1 no parece deberse a la presencia del varicocele, ya que la del Grupo 2 fue normal. Esto ultimo, sumado al hecho de que la disminucion de la respuesta de testosterona a la hCG esta relacionada a un aumento en la relacion testosterona:estradiol, permite especular que tanto la alteracion de la funcion testicular, como asi tambien la reserva hipfisaria de LH observadas en los pacientes con hipo-respuesta de testosterona parecen depender de la accion del estradiol y no de la presencia del varicocele.

## D I S C U S I O N

### **Regulacion de los receptores de LH.**

Es sabido que un numero considerable de hormonas proteicas es capaz de modular la sensibilidad de sus tejidos blanco regulando precisamente la cantidad de sus receptores de membrana. En el testiculo, la exposicion a altas concentraciones de gonadotropinas endogenas o exogenas (LH o hCG) produce una auto-regulacion negativa de los receptores de la celula de Leydig (161), que lleva a una desaparicion casi total de los mismos. Esta disminucion en el numero de receptores (down-regulation) esta asociado a una respuesta androgenica deficitaria como consecuencia de inhibiciones enzimaticas que ocurren a lo largo de la cadena biosintetica (230). Sin embargo, tambien es posible observar un fenomeno de auto-regulacion positiva de los receptores (up-regulation), por el cual la hormona trofica induce un incremento temporario del numero de sus receptores especificos (231). Por lo menos dos mecanismos diferentes parecen estar involucrados en este proceso. La administracion de dosis fisiologicas de hCG o LH incrementa los receptores entre 1 y 2 dias mas tarde, mientras que dosis mayores (suprafisiologicas), lo induce en pocas horas (entre 1 y 3) despues del tratamiento hormonal. El incremento lento descrito primero podria ser el resultado de la accion trofica de la hormona, con

el consecuente mantenimiento o estimulación de los receptores, mientras que el incremento rápido parece ser causado por exposición de receptores ocultos presintetizados, ya que este fenómeno no es impedido con inhibidores de la síntesis proteica (231).

La down-regulation de los receptores de LH de la célula de Leydig, ocurre mucho más tarde que las lesiones enzimáticas descritas en este trabajo, por lo que puede ser considerada como un fenómeno independiente. En efecto, la administración de AMP cíclico a células de Leydig desensibilizadas (con lo cual se sortea la interacción Hormona-Receptor) no es capaz de restablecer la esteroidogénesis normal (230). Se ha demostrado que no es necesaria la internalización de la hormona para que se observe el efecto biológico, ya que este aparece siempre antes de que la hormona penetre la célula. Hemos visto que cuando la hormona gonadotrófica se pone en contacto con su receptor membranal, se produce primero una movilización de los receptores ocupados para formar acumulos o "clusters", los que seguidamente son introducidos en el citoplasma mediante un proceso de pinocitosis denominado "internalización mediada por receptor" (25,26). Este fenómeno involucra la formación de una especie de hoyo recubierto por una proteína denominada clatrina (coated pit), el cual es inmediatamente transformado en una vesícula recubierta (coated vesicle) conteniendo el complejo hormona-receptor, la

que posteriormente pierde la clatrina transformandose en endosoma o receptosoma. Finalmente, el receptosoma se dirige al complejo de Golgi, donde la hormona es degradada por los lisosomas, y el receptor es degradado o reciclado a la superficie celular. Precisamente, la down-regulation de los receptores se produciria cuando la velocidad de reciclado es inferior a la de internalizacion.

#### **La desensibilizacion de la respuesta esteroidogenica.**

Como vimos anteriormente, la exposicion de la celula de Leydig a concentraciones suprafisiologicas de su hormona trofica (LH o hCG), lleva a una perdida parcial y transitoria de la capacidad de producir androgenos frente a un nuevo estimulo. El tratamiento de ratas adultas (60 dias de edad) con dosis relativamente bajas de hCG (inferiores a 1 ug) es capaz de causar una disminucion en la capacidad de producir testosterona, observandose concomitantemente, una acumulacion de sus precursores pregnenolona y 17 hidroxipregnenolona. Esta alteracion en la biosintesis es debida a una inhibicion parcial de las enzimas microsomales dependientes del sistema P-450: 17 alfa hidroxilasa y 17,20 desmolasa, y ha sido denominada **lesion lejana** por su ubicacion en el camino esteroidogenico con respecto al colesterol. Dado que el tratamiento con antiestrogenos la previno, y que el tratamiento con estradiol la reprodujo, se puede afirmar

que es una lesion mediada por estradiol (164,206).

Cuando la dosis de hCG inyectada supera los 2 ug, se agrega una segunda lesion enzimatica a nivel de la conversion de colesterol a pregnenolona (20,22 desmolasa), que por su ubicacion en el camino esteroidogenico ha sido denominada **lesion cercana**, la que ha mostrado ser no dependiente de estradiol (217).

**1. La lesion enzimatica lejana.** La inhibicion de la 17 alfa hidroxilasa y la 17,20 desmolasa ocurre luego de la sintesis de una proteina de PM 27000, producida como consecuencia de una activacion de la transcripcion genetica. En efecto, el estradiol es capaz de inducir una estimulacion de las RNA polimerasas I, II y III, la que resulto ser de tipo bifasico. Dado los tiempos en que estos picos de actividad se producen, se puede sugerir que el componente mas temprano de esta respuesta estaria involucrado en la inhibicion de las enzimas microsomales, mientras que el tardio estaria relacionado con otros eventos celulares (206,210). El aumento en la actividad de las RNA polimerasas fue debido a una activacion de dichas enzimas y no a un aumento en la actividad templante de la cromatina. Por otra parte, el hecho que la inhibicion de las 2 enzimas microsomales ocurra simultaneamente refuerza la idea de que ambas enzimas estan localizadas en una misma proteina (232).

Ha existido controversia sobre el origen del estradiol

intratesticular, ya que hay autores que le han asignado a la celula de Sertoli dicho papel (94-96), mientras que otros se lo adjudican a la celula de Leydig (98-100). El presente trabajo demuestra concluyentemente que la actividad aromatasa de la celula de Sertoli es importante en el animal inmaduro, siendo la celula de Leydig la principal fuente de estrogenos del adulto. La activacion de la enzima aromatasa se hace evidente inmediatamente despues de la accion gonadotrofica, llevando a un aumento de la concentracion de estradiol intracelular (211,212). La demostracion de la existencia en la celula de Leydig de receptores de estradiol (166) permiten conformar la hipotesis de autoregulacion negativa que ejerce este esteroide en la biosintesis testicular de androgenos.

Nuestras observaciones de que la actividad aromatasa en la celula de Leydig aumenta a medida que el testiculo madura estan de acuerdo con otras previamente publicadas (233), donde se valoro la produccion de estradiol por RIA en presencia de LH, FSH y testosterona. Comparando la actividad aromatasa entre las celulas de Leydig y de Sertoli, observamos que el nivel basal de aromatasa aumenta con la edad en las celulas de Leydig, pero disminuye en las de Sertoli. Esto, sumado al hecho de que el numero de celulas de Leydig aumenta durante la maduracion sexual (201) sugiere que es la celula de Leydig la principal fuente de estrogenos del adulto. Este concepto ha sido recientemente

corroborado en el Hombre por técnicas histoquímicas (234).

La importancia fisiológica de la redistribución de la actividad aromatasa entre ambos tipos celulares es todavía poco clara, aunque puede contribuir a explicar la diferente respuesta que tiene la célula de Leydig inmadura con respecto a la madura frente a la estimulación con hCG. Se vio que el tratamiento con hCG tanto de testículos neonatales (235) o células fetales en cultivo (163) no causa ni la desensibilización de la respuesta esteroidogénica ni la pérdida de los receptores de LH que se observan en el adulto. Este fenómeno puede ser debido a la presencia simultánea de 1) alfafetoproteína, una proteína con alta afinidad por estradiol que disminuiría la cantidad de estradiol biodisponible, 2) la relativa falta de receptores de estradiol encontrada en las células inmaduras, y 3) la escasa actividad aromatasa descripta.

**2. La lesión enzimática cercana.** La disminución en la biosíntesis de precursores de testosterona tales como la pregnenolona y la 17 hidroxipregnenolona observada con altas dosis de hCG hicieron pensar en un principio en la posibilidad de una disminución de la concentración de su precursor inmediato: el colesterol. Sin embargo, el nivel de colesterol en la membrana interna de la mitocondria (el cual es el metabólicamente disponible) estaba aumentado en células desensibilizadas, sugiriendo la existencia de un bloqueo posterior, a nivel de la enzima de

clivage de la cadena lateral del colesterol: la 20,22 desmolasa (213). Esta lesion, a diferencia de la anterior, no fue revertida por los antiestrogenos ni fue reproducida por el estradiol, indicando la no dependencia de este estrogeno. Ya se habia demostrado que esta lesion no era revertiva por la adicion de mevalonato o colesterol ligado a lipoproteinas (236) por lo que se habia propuesto un sitio de inhibicion posterior a la sintesis de colesterol. Otros estudios habian mostrado inhibicion de la esteroidogenesis mitocondrial por diversos factores tales como metabolitos esteroideos (237), fosfolipidos (238) y proetinas de bajo peso molecular (238). Sin embargo, en este estudio hemos demostrado que los metabolitos esteroideos no estan relacionados a la lesion enzimatica cercana. Ademas, el factor inhibidor mitocondrial parece ser diferente de otros previamente reportados debido a la caracteristica competitiva de la inhibicion. En mitocondria adrenal, tanto la 20,22 desmolasa como la 11 B hidroxilasa requieren electrones del NADPH mediante un sistema de transporte comun (240), y fue sugerido que esas hidroxilaciones eran reguladas por requerimiento competitivo de NADPH (241). Dado que no hay otro sistema de hidroxilacion esteroidea en la mitocondria ademas del sistema P-450 de la 20,22 desmolasa, la actividad inhibidora descrita en el presente estudio no estaria relacionada con hidroxilaciones asociadas con otro citocromo. El citocromo c en la mitocondria

adrenal puede ser reducido por el mismo sistema de transporte de la 20,22 desmolasa (adrenodoxina reductasa-adrenodoxina) (242,243). Sin embargo, la reduccion del citocromo de esta forma no es considerado fisiologico debido a la diferente localizacion del citocromo c y el sistema adrenodoxina reductasa-adrenodoxina. Ademas, dado que el factor inhibidor encontrado en la celula de Leydig posee un peso molecular de alrededor de 200.000, parece poco probable que la inhibicion por los extractos de mitocondria de celulas de Leydig sea debida al citocromo c.

Por lo menos 2 procesos requieren NADPH en la mitocondria: la actividad transhidrogenasa para la fosforilacion oxidativa y el sistema de clivage de la cadena lateral del colesterol (251). La fosforilacion oxidativa es sensible a agentes de desacople tal como la rotenona, antimicina A y cianuro. En experimentos no mostrados hemos visto que la adiccion de 30 uM de rotenona o antimicina A a mitocondrias intactas no cambiaba el patron de inhibicion observado en la produccion de pregnenolona despues de la administracion de hCG. Esto indico que el factor inhibidor no estaba relacionado con enzimas de la cadena respiratoria.

Estos estudios realizados con preparaciones de mitocondria de celula de Leydig y de adrenal, permitieron demostrar la existencia de un factor inhibidor de la 20,22 desmolasa, presente en las celulas controles pero aumentado en las celulas

desensibilizadas (214). Dicha sustancia mostro ser una proteina con una radio de Stokes de 4.8 nm y un punto isoelectrico de 5.05. Este inhibidor es una proteina de la membrana mitocondrial interna que inhibiria competitivamente la actividad de la 20,22 desmolasa, contribuyendo a la auto-regulacion de la esteroidogenesis celular.

#### **Integracion de las 2 lesiones biosinteticas.**

La Fig. 54 muestra un esquema que resume, de acuerdo a nuestros resultados, el fenomeno de la desensibilizacion de la esteroidogenesis de la celula de Leydig. Luego de la interaccion de la LH/hCG con su receptor especifico, se produce la activacion de la adenilato ciclasa y sintesis de AMP ciclico, el cual actuando como segundo mensajero de la accion gonadotrofica induce por lo menos 2 fenomenos: movilizacion de colesterol a la membrana interna de la mitocondria, y fosforilacion de proteinas especificas (probablemente enzimas de la esteroidogenesis), lo que conduce a una activacion de la biosintesis de los esteroides testiculares (211). La pregnenolona formada en la mitocondria sale al citoplasma donde es metabolizada segun la especie, por la via de los esteroides delta 5 (como en los roedores) formando pregnenolona, o por la de los delta 4 (como en el Hombre) formando progesterona (219). La testosterona sintetizada es convertida en estradiol por accion de la aromatasa a traves de

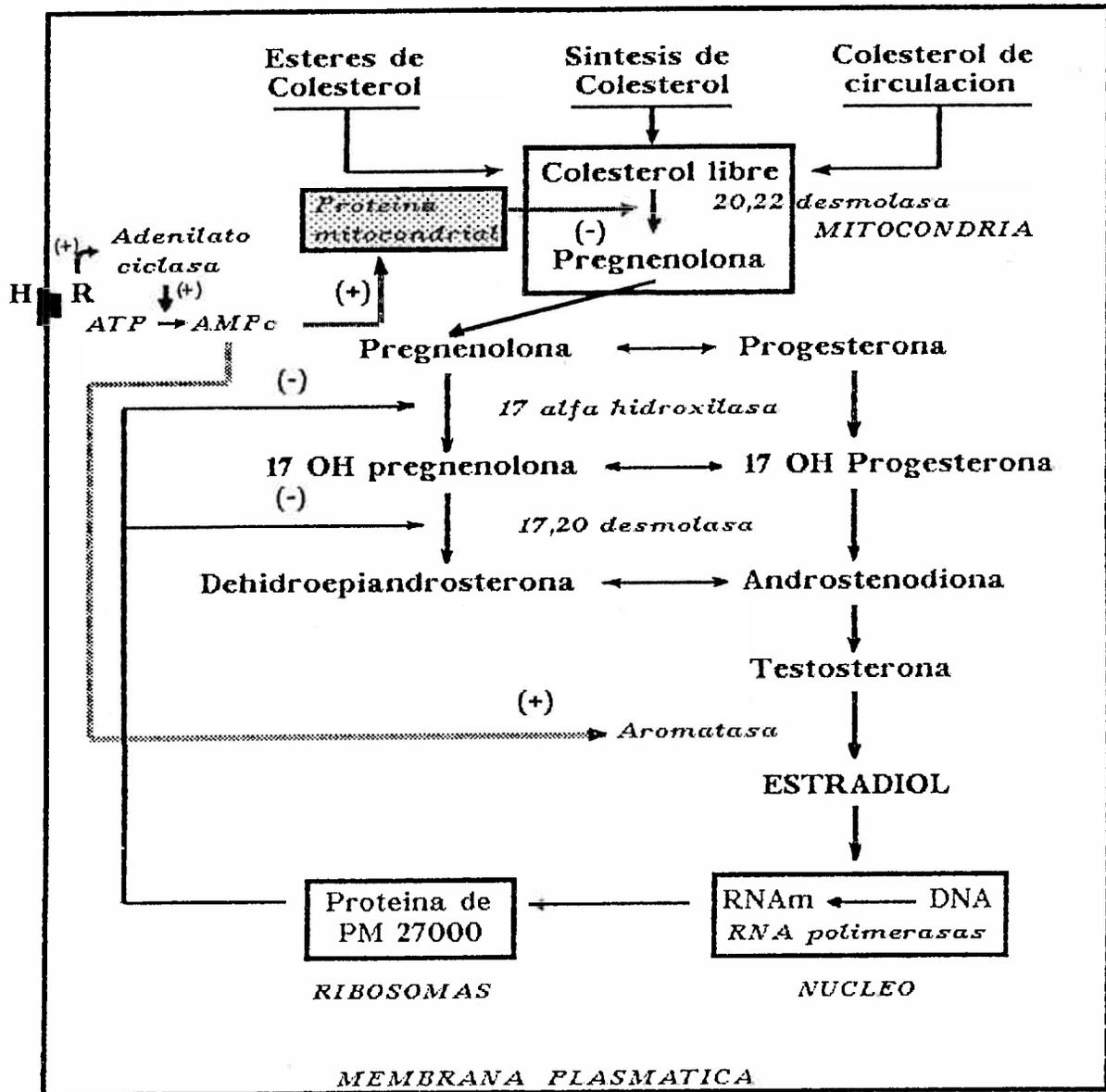


FIGURA 54. Esquema del mecanismo de la desensibilización de la esteroidogénesis de la célula de Leydig inducida por las gonadotropinas. Ver explicación en el texto.

un proceso tambien mediado por AMP ciclico (211,212), siendo tomado por sus receptores solubles y dirigido a sitios especificos de la cromatina denominados aceptores nucleares. Una vez alli se produce la activacion de la transcripcion de informacion genetica codificadora de una proteina de PM 27000 (204,210), la que inhibiria las enzimas microsomales 17 alfa hidroxilasa y 17,20 desmolasa, produciendose la lesion biosintetica lejana. Por otra parte, la accion desencadenada por la hCG, induciria la activacion de una proteina mitocondrial capaz de inhibir especificamente la actividad de la 20,22 desmolasa (213,214), llevando a la aparicion de la lesion biosintetica cercana.

#### **La desensibilizacion testicular en el Hombre.**

Es probable que el fenomeno de desensibilizacion celular sea un mecanismo de defensa de la maquinaria biosintetica de una celula. La capacidad de una celula para regular la concentracion de receptores para su hormona trofica ha sido demostrada en numerosos tejidos (247). Precisamente se utiliza a veces este fenomeno con fines terapeuticos, como es el caso de la LHRH y sus agonistas, usados como anticonceptivos masculinos por la inhibicion que inducen en la secrecion de LH y FSH debido a la perdida de receptores de LHRH del gonadotropo (248). Tambien es frecuente observar este tipo de cambios en la sensibilidad de un

organo blanco durante el uso de medicamentos, lo que permite a veces disminuir el riesgo de una intoxicacion. Los resultados encontrados en los testiculos de pacientes con feminizacion testicular, fortalecerian esta hipotesis, ya que de no producirse este fenomeno la celula de Leydig muy probablemente se agotaria por el prolongado estimulo gonadotrofico. Precisamente esto es lo que ocurre en individuos obesos por sobrealimentacion en los que la elevacion constante de la glucemia hace que tengan una hiperinsulinemia permanente, que finalmente conduce a un agotamiento del pancreas instalandose una diabetes. Sin embargo, de acuerdo a los resultados encontrados en los hombres infertiles, la desensibilizacion testicular ocurriria aun con niveles de LH normales, aunque es probable que ello sea debido a una secrecion gonadotrofica mas tonica que pulsatil. Ello se desprende de los estudios realizados con pacientes con hipo-respuesta de testosterona a la hCG en los que se vio una disminucion significativa en el numero de pulsos de LH en un periodo de 6 hs. Por el contrario, los pacientes que presentaban respuesta de testosterona normal, mostraron un numero de pulsos adecuado.

Es aceptado que la testosterona actua en el tubulo seminifero estimulando junto con FSH la division de los espermatocitos primarios, y en el epididimo favoreciendo la adquisicion de la movilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides. El

primer efecto epididimario es la síntesis de una proteína denominada de movilidad progresiva, y el segundo es la producción de proteínas glicosiladas de depósito sobre la cabeza del espermatozoide. Dichas proteínas activan los sitios de unión del espermatozoide a la zona pelúcida y a la membrana vitelina del ovocito (249). La testosterona es transportada a los distintos compartimientos intratubulares por una proteína denominada ABP (androgen binding protein) (250), ya que la existencia de la barrera hemato-testicular impide la llegada de este andrógeno por sangre. En consecuencia, la disminución de la biodisponibilidad de la testosterona podría conducir a una división deficiente de los espermátocitos (oligospermia), a una maduración deficiente del espermatozoide con fallas en su motricidad (astenospermia), o ambas (oligo-astenospermia).

Ha sido previamente demostrado (224) que una dosis de 6000 UI de hCG inyectada 24 hs después de una primera, no induce una nueva estimulación en la secreción de testosterona. La acumulación de 17 hidroxiprogesterona observada en estos individuos nos permite inferir que se había producido en ellos una desensibilización testicular a nivel de la 17 alfa hidroxilasa/17,20 desmolasa (lesión lejana).

Un objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad esteroidogénica de los testículos de hombres infértiles, que presentarían sólo disminución del número o la movilidad de sus

espermatozoides (oligo-astenospermia) como unica causa de infertilidad, con el objeto de buscar la posible conexion entre la alteracion de la espermatogenesis y la desensibilizacion testicular.

La administracion de hCG a los pacientes oligo-astenospermicos permitio separarlos en 2 grandes grupos: Grupo 1, con una falta de respuesta de testosterona entre las 2 y 4 hs despues de la inyeccion, pero con respuesta normal posteriormente, y Grupo 2, con una respuesta bifasica similar a la normal. La falta de respuesta temprana de testosterona encontrada en los pacientes del Grupo 1 hizo suponer la existencia de alguna de las lesiones biosinteticas vistas anteriormente. El analisis de las respuestas de su precursor la 17 hidroxiprogesterona, permitio clasificar los pacientes del Grupo 1 en 3 subgrupos: con respuesta aumentada, normal o disminuida.

Con el objeto de investigar la posible ingerencia del estradiol en estos procesos, los individuos fueron tratados con aminoglutetimida (AGT). La AGT disminuye la secrecion de estrogenuos por accion a varios niveles. Los mecanismos mas afectados son la conversion periferica e intratesticular de delta 4 androstenodiona y testosterona a estradiol, y la conversion intra-adrenal de colesterol en pregnenolona (251). Ademas, la AGT facilita la actividad 3 beta-ol deshidrogenasa-delta-4,5 isomerasa con bloqueo de la 21 hidroxilasa (252). En

consecuencia se observa una franca disminucion en la concentracion de estradiol y un incremento de androgenos. Como es posible que se produzca una disminucion paralela de la concentracion de glucocorticoides, es aconsejable administrar la AGT juntamente con hidrocortisona para evitar los sintomas de una insuficiencia suprarrenal. Los pacientes fueron re-examinados y sus espermogramas re-evaluados a los 90 dias de tratamiento. Solo los pacientes que presentaban la respuesta de 17 hidroxiprogesterona aumentada o normal mostraron una significativa mejoria de su calidad seminal, logrando embarazo el 30% de los mismos. Asimismo, las respuestas de testosterona e 17 hidroxiprogesterona se normalizaron. Sin embargo, ni los pacientes del Grupo 1 con hiporespuesta de 17 hidroxiprogesterona, ni los del Grupo 2, mostraron cambios significativos en las respuestas esteroidogenicas o espermatogenicas despues del tratamiento con AGT. Estos resultados sugieren que los pacientes del Grupo 1 (hiporespuesta aguda de testosterona) con hiperrespuesta de 17 hidroxiprogesterona presentarian un estado similar al inducido por la deficiencia en la actividad de la 17 alfa hidroxilasa/ 17,20 desmolasa (lesion lejana), mientras que los que presentan una hiporespuesta de 17 hidroxiprogesterona sufririan una inhibicion de la 20,22 desmolasa (lesion cercana). Dado que todos estos pacientes presentaban niveles normales de testosterona, es

posible especular que mas que el nivel absoluto de este androgeno tendria importancia la relacion testosterona: estradiol, la cual esta disminuida en este tipo de pacientes (253,254).

Los pacientes con varicocele mostraron un comportamiento esteroidogenico similar al de los pacientes sin esta patologia, lo cual permite deducir que el varicocele pudiera tener que ver mas con la falla espermatogenica que con la esteroidogenica.

Queda por dilucidar todavia la causa de la oligo-astenospermia de los pacientes del Grupo 2 la que podria estar debida a alteraciones de otros factores paracrinicos presentes en el testiculo. Se ha demostrado la existencia de un numero de factores con actividad inhibitora de la fisiologia testicular tales como GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas), prostaglandinas, angiotensina, opioides (252,255,256), y recientemente CRF (Factor liberador de corticotrofina) el cual es estimulado por la administracion de hCG (257). Se han encontrado ademas receptores beta adrenergicos en las celulas de Sertoli, observandose que los agonistas beta adrenergicos son capaces de aumentar el contenido de AMP ciclico intracelular y la actividad proteina quinasa sugiriendo la posible regulacion de la espermatogenesis por aminas (249). Deficiencia en la biodisponibilidad de la testosterona por aumento de sus proteinas transportadoras tanto en sangre (SHBG) como en tubulo seminifero (ABP) no deberian ser descartadas. El conocimiento de

dichos factores, así como el de sus mecanismos de acción permitiera encontrar los elementos que aseguren el éxito del tratamiento de la infertilidad del Hombre. La Fig. 55 muestra un esquema de lo expuesto anteriormente.



### C O N C L U S I O N E S

- Las células de Leydig presentes en el intersticio testicular tienen distintas características físicas (densidad y coeficiente de sedimentación) pero idénticas características morfológicas y funcionales.

- La exposición de la célula de Leydig a dosis farmacológicas de hormona trofíca (LH o hCG) induce la aparición de 3 fenómenos:

1) Disminución del número de receptores específicos (down-regulation).

2) Disminución de la actividad de las enzimas microsomales 17 alfa hidroxilasa y 17,20 desmolasa (lesión biosintética lejana).

3) Disminución de la actividad de la enzima mitocondrial 20,22 desmolasa (lesión biosintética cercana)

- El orden cronológico de aparición de estos tres eventos es lesión lejana (entre 3 y 6 hs post estímulo), lesión cercana (entre 18 y 24 hs post estímulo), y down regulation de receptores (después de las 24 hs post estímulo)

- La lesión lejana es inducida por estradiol, luego de la síntesis de una proteína de PM 27000.

- El estradiol intratesticular se produce principalmente en la célula de Leydig por la aromatización de testosterona. Este proceso es dependiente de LH.

- La capacidad aromatizante de la célula de Leydig aumenta con la edad del individuo.

- La lesión cercana es inducida por una proteína mitocondrial con un PM de alrededor de 200000 y es independiente de estradiol.

- En el Hombre, un estado de desensibilización testicular puede ser responsable de alteraciones de la espermatogénesis, y se pone de manifiesto mediante un estímulo agudo con hCG:

1) una hipo-respuesta de testosterona a la hCG con hiper-respuesta de 17 hidroxiprogesterona pondría en evidencia la presencia de la lesión lejana que provocaría una disminución en la relación testosterona:estradiol conduciendo a la oligo-astenospermia. Estos pacientes responderían favorablemente al tratamiento con antiestrogenos.

2) una hipo-respuesta de testosterona y 17 hidroxiprogesterona indicaría la presencia de la lesión cercana. Estos pacientes no responderían al tratamiento con antiestrogenos.

- La oligo-astenospermia idiopática de los hombres con esteroidogénesis normal podría ser debida, entre otros, a factores paracrinos intratesticulares, o a una disminución en la biodisponibilidad de testosterona. Estos pacientes no responderían al tratamiento con antiestrogénos.
  
- El test simplificado de hCG es una herramienta clínica útil para la elección de los pacientes a ser tratados con los inhibidores estrogénicos.
  
- Los pacientes con hiporrespuesta de testosterona a la hCG presentaron una disminución en la pulsatilidad de la secreción de LH.
  
- Los pacientes con varicocele presentaron un comportamiento esteroidogénico y una distribución de las alteraciones espermatogénicas similar a los pacientes sin esta patología.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hunter J. Nicol, Londres, 1786.
2. Berthold AA. A. Anat. Physiol. Wiss. Med., p. 42, 1849.
3. Leydig F.: Z. Wiss. Zool., 2:1, 1850.
4. Rasmussen AT. Special Citology (2nd. ed.), editado por EV Cowdry, New York Hoeber 3:1673, 1933.
5. Bowin P y Ancel P. Arch. Zool. Exptl. Gen. 1:437, 1903.
6. Gallagher TF y Koch FC. J. Biol. Chem. 84:495, 1929.
7. David K, Dingemanse E, Freud J, Laquer E, Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 233:281. 1935.
8. Smith PE. Am. J. Anat., 45:205, 1930.
9. Levy H, Deane HW y BL Rubin. Endocrinology 65:932, 1959.
10. Wattenberg LW. Cytochem. 6:625, 1958.
11. Christensen AK, Mason NR. Endocrinology 76:646, 1965.
12. Hall FF, Irby DC y de Kretser DM. Endocrinology 84:488, 1969.
13. Vaitukaitis JL, Ross GD, Braunstein GD, Rayford PL. Recent Prog. Horm. Res. 32:289, 1976.
14. Pierce JG. Endocrinology 89:1331, 1971.
15. Bishop WH, Nureddin A y Ryan RJ. Peptide Hormones, Parsons JA (ed), Baltimore, University Park Press, p. 273, 1976.
16. Mancini RE, Castro A y Seiguer AC. J. Histochem. Cytochem. 15:516, 1967.
17. De Kretser DM, Catt KJ, Burger HG y Smith GC. J. Endocr. 43:105, 1969.
18. De Kretser DM, Catt KJ y Paulsen CA. Endocrinology 80:332, 1971.

19. Dufau ML, Catt KJ y Tsuruhara T. *Biochem. Biophys. Acta* 252:574, 1971.
20. Dufau ML, Catt KJ y Tsuruhara T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:2414, 1972.
21. Hsueh AJW, Dufau ML, Katz SL y Catt JK. *Nature, London,* 251:710, 1976.
22. Ketelslegers JM, Knott GD y Catt KJ. *Biochemistry* 14:3075, 1975.
23. Catt KJ y Dufau ML. *Ann. Rev. Physiol.* 39:529, 1977.
24. Catt KJ y Dufau ML. *Nature New Biol.* 244:219, 1973.
25. Helenius H, Mellman I, Eall D y Hubbard A. *TIBS* 8:245, 1983.
26. Pastan I y Willingham MC. *TIBS* 8:250, 1983.
27. Tycko B y Maxfield FR. *Cell* 28:643, 1982.
28. Wehland J, Willingham MC, Gallo M y Pastan I. *Cell* 28:31, 1982.
29. Dufau ML, Tsuruhara T, Horner KA, Podesta E y Catt KJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 74:3419, 1977.
30. Dufau ML, Horner KA, Kayasi K, Tsuruhara T, Conn FM y Catt KJ. *J. Biol. Chem.* 253:3721, 1978.
31. Sala GB, Dufau ML y Catt KJ. *J. Biol. Chem.* 254:2077, 1979.
32. Hayashi K, Sala GB, Catt KJ y Dufau ML. *J. Biol. Chem.* 254:3861, 1979.
33. Hayashi K, Sorrell SH y Joshi L. 62nd Annual Meeting of the Endocrine Society. *Abst.* 616, 1980.
34. Sorrell SH, Catt KJ y Dufau ML. 62nd Annual Meeting of the Endocrine Society. *Abst.* 753, 1980.
35. Dufau ML, Hayashi KH, Sala GB, Baukal A y Catt KJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:4769, 1978.

36. Abou-Issa H y Reichert LE, Jr. *Endocrinology* 104:189, 1979.
37. Jahsen T, Purvis K, Birnbamer L y Hansson V. *Int. J. Androl.* 3:396, 1981.
38. Cooke BA, Lindh ML y Janszen FH. *Biochem. J.* 160:439, 1976.
39. Cooke BA, Van der Kemp y Van der Molen HJ. *J. Endocr.* 64:69, 1975.
40. Podesta EJ y Catt KJ. *FEBS Letts.* 70:212, 1976.
41. Podesta EJ, Dufau ML y Catt KJ. *Moll. Cell. Endocrinol.* 5:109, 1976.
42. Podesta EJ, Dufau ML y Catt KJ. *Biochemistry* 17:1556, 1978.
43. Podesta EJ, Dufau ML, Solano AR y Catt KJ. *J. Biol. Chem.* 253:8994, 1978.
44. Dufau ML. *Proc Natl Acad Sci* 74:3419, 1977.
45. Dufau ML, Mendelson C y Catt KJ. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 39:610, 1974.
46. Mendelson C, Dufau ML y Catt KJ. *J. Biol Chem.* 250:8818, 1975.
47. Williams CD, Horner KA y Catt KJ. *Endocr. Res. Comm.* 3:343, 1976.
48. Means AR, Dedman JR, Tindall DJ y Welsh MJ. En: *Endocrine Approach to Male Contraception*. Editores: V. Hansson, EM Ritzen, K. Purvis y FS French, Copenhagen. Scriptor p. 403, 1978.
49. Cooke BA, Janszen FHA, Clotscher WF y Van der Molen HJ. *Biochem J.* 150:413, 1975.
50. Cooke BA, Janszen FH y Van der Molen HJ. *Acta Endocr. (Kbh). Supl.* 199. Abstr. 41, 1975.
51. Mendelson C, Dufau ML y Catt KJ. *Biochim. Biophys. Acta* 411:222, 1975.

52. Janszen FHA, Cooke BA y Van der Molen HJ. *Biochem. J.* 162:341, 1977.
53. Janszen FHA, Cooke BA, Van Driel MJA y Van der Molen HJ. *Biochem. J.* 170:9, 1978.
54. Dufau ML, Hayashi K, Cigorruga SB, Baukal AJ, Sorrell S, Nozu K y Catt KJ. 6th. International Congress of Endocrinology, Melbourne, Australia. Abst. 64, 1980.
55. Lefevre A, Morera AM y Saez JM. *FEBS Letts.* 89:287, 1978
56. Hall PF, Charbonnier C, Nakamura M y Gobbi G. *J. Steroid Biochem.* 11:1361, 1979.
57. Long CHN. *Recent. Progr. Horm. Res.* 1:99, 1947.
58. Stone D y Hechter O. *Arch. Biochem. Biophys.* 51:457, 1954.
59. Karaboyas GC y Koritz SB. *Biochemistry* 4:462, 1965.
60. Mason NR y Savard K. *Endocrinology* 75:215, 1964.
61. Hall PF y Koritz SB. *Biochemistry* 4:1037, 1965.
62. Hall PF y Eik-Nes KB. *Biochim. Biophys. Acta*, 86:604, 1963.
63. Hall PF y Okazaki K. *Biochemistry* 5:1202, 1966.
64. Bell ET, Mukerji S y Loraine JA. *J. Endocrinol.* 28:231, 1964.
65. Brady RO. *J. Biol. Chem.* 193:145, 1951.
66. Hechter O, Solomon MM, Zaffaroni A y Pincus G. *Arch. Biochem. Biophys.* 46:201, 1953.
67. Borkowsky AJ, Levin S, Delcroix C, Mahler A y Verhas V. *J. Clin. Invest.* 46:797, 1967.
68. Krum AA, Morris MD y Bennett LL. *Endocrinology* 74:543, 1964.
69. Morris MD y Chaikoff IL. *J. Biol. Chem.* 254:1095, 1959.

70. Werbin H y Chaikoff IL. Arch. Biochem. Biophys. 93:476, 1961.
71. Behrman HR y Armstrong DT. Endocrinology 85:474, 1969.
72. Burnstein S, Middleditch BS y Gut M. J. Biol. Chem. 250:9028, 1965.
73. Flint ADF, Grinwich DL y Armstrong DT. Biochem J. 132:313, 1973.
74. Moyle WR y Ramachandran J. Endocrinology 93:127, 1973.
75. Hafiez AA, Bartke A y Lloyd DW. J. Endocrinol. 52:223, 1972.
76. Kan KW y Ungar F. J. Biol. Chem. 248:2868, 1973.
77. Purvis JL y Menard R. En: "Hormonal regulation of spermatogenesis". Editores: French FS, Hansson V, Ritzen EM y Nayfeh SN. Plenum Press, New York, pag. 65, 1975.
78. Caron MG, Goldstein S, Savard K y Marsh JM. J. Biol. Chem. 250:5137, 1975.
79. Trzeciak WH y Boyd GS. Eur. J. Biochem. 46:201, 1974.
80. Trzeciak WH y Boyd GS. Eur. J. Biochem. 37:327, 1973.
81. Naghshineh S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 61:1076, 1974.
82. Beckett GJ y Boyd GS. Biochem. Soc. Trans. 3:892, 1975.
83. Hall PF. En: The testis. Vol. II. Editores: Johnson D, Gomes WR y Van der Mark NL. Pag. 1. Academic Press, New York, 1970.
84. Samuels LT, Bussman L, Matsumoto K y Huseby RA. J. Steroid Biochem. 6:291, 1975.
85. Huhtaniemi I. J. Steroid Biochem. 8:491, 1977.
86. Acevedo HF, Axelrod LR, Ishikawa E y Takari F. J. Clin. Endocrinol. Metab. 23:885, 1963.
87. Ikonen M y Niemic J. Nature 212:716, 1966.

88. Mathur RS, Wigvist N y Diczfalusy. Acta Endocrinol. (Kbh) 71:792, 1972.
89. Mizutani S, Tsujimura T, Akashi S y Matsumoto K. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44:1023, 1977.
90. Lacroix E, Eechaute W y Lewsen I. Steroids 25:649, 1975.
91. Lindner HR. J. Endocrinol. 23:139, 1961.
92. Parvinen M, Hurme P y Niemi M. Endocrinology 87:1082, 1070.
93. Muller RE y Wotiz HH. Endocrinology 105:1107, 1979.
94. Dorrington JH, Fritz IB y Armstrong DT. Biol. Reprod. 18:55, 1978.
95. Rommerts FFG, Kruger-Sewnarain BC, Van Woerkom-Blik A, Grootegoed JA y Van der Molen HJ. Mol. Cell. Endocrinol. 10:39, 1978.
96. Verhoeven G, Dierickx P y de Moor P. Mol Cell. Endocrinol. 13:241, 1979.
97. Dejong FH, Hey AH y Van der Molen HJ. J. Endocrinol. 60:409, 1974.
98. Canick JA, Markis A, Gunsalus GL y Ryan KJ. Endocrinology 104:285, 1979.
99. Steinberger E, Tcholakian RK y Steinberger A. J. Steroid Biochem. 11:185, 1979.
100. Valladares LE y Payne AH. Endocrinology 105:431, 1979.
101. Cigorruga SB, Sorrell S, Bator J, Catt KJ y Dufau ML. J. Clin. Invest. 65:699, 1980.
102. De Jong FH, Hey AH y Van der Molen HJ. J. Endocrinol. 57:277, 1973.
103. Catt KJ, Tsuruhara T, Mendelson C y Dufau ML. En: Hormone and Target Cell Activation in the Testis. Editores: Dufau ML y Means AR. Plenum Press, New York. Pag. 1, 1974.
104. Frowein J y Engel W. J. Endocr. 64:59, 1975.

105. Hauger RL, Chen Y-Di, Kelch RP y Payne AH. *J. Endocr.* 74:57, 1977.
106. Purvis K, Clausen OPF, Torjesen PA y Hansson V. *Int. J. Androl.* 2:74, 1979.
107. Thanki KH y Steinberger A. *Endocr. Res. Comm.* 3:49, 1976.
108. Dufau ML, Hsueh AJ, Cigorruga SB, Baukal AJ y Catt KJ. En: *Endocrine Approach to male Contraception*. Editores: Hansson V, Hitzzen EM, Purvis K y French FS. Copenhagen, Scriptor, pag. 193, 1978.
109. Alder A, Burger H, Davis J, Dulmanis A, Hudson B, Sarfaty G y Stratton W. *Brit. Med. J.* 1:28, 1968.
110. Verjans HL, de Jong FH, Cooke BA, Van der Molen HJ y Eik-Nes KB. *Acta Endocr. (Kbh)* 77:636, 1974.
111. de Jong FH, Vilenbroek JTJ y Van der Molen HJ. *J. Endocr.* 65:281, 1975.
112. Van Beurden WMD, Mulder E, de Jong FH y Van der Molen HJ. *Endocrinology* 101:342, 1977.
113. Brinkmann AD, Mulder E, Lamers-Stahlhofen GJM y Van der Molen HJ. *FEBS Lett.* 26:301, 1972.
114. Mulder E, Brinkmann AD, Lamers-Stahlhofen GJM y Van der Molen HJ. *FEBS Lett.* 31:131, 1973.
115. Danutra V, Harper ME, Boyns AR, Cole EN, Brownsey BG y Griffiths K. *J. Endocr.* 57:207, 1973.
116. Mallampati RS y Johnson DC. *Neuroendocrinology* 11:46, 1973.
117. Chowdhury M, Tcholakian R y Steinberger E. *J. Endocr.* 60:375, 1974.
118. Dorner G, Stahl F, Rhode W y Schnorr D. *Endocrinologie* 66:221, 1975.
119. Oshima M, Wakabayashi K y Tamaoki B. *Biochim. Biophys. Acta* 137:356, 1967.

120. Harper ME, Pierrepoint CG, Fahmy AR y Griffiths K. J. Endocr. 49:213, 1971.
121. Yanaihara T y Troen P. J. Clin. Endocr. 34:968, 1972.
122. Odell WD, Swerdloff RS, Jacobs HS y Hescoc MA. Endocrinology 93:160, 1973.
123. Ketelslegers JM, Hsueh AJW, Hetzel WD y Catt KJ. 5th International Congress of Endocrinology, Hamburg. Abstr. 519, 1976.
124. Chen YI, Payne AH y Kelch RP. Proc. Soc. Exp. Biol. New York 153:473, 1976.
125. Van Beurden WMD, Roodnat B, de Jong FH, Mulder E y Van der Molen HJ. Steroids 28:847, 1976.
126. Samuels LT, Short GJ y Huseby RA. Acta Endocr. (Kbh) 45:487, 1964.
127. Samuels LT, Uchikawa T, Zain-ul-Abidin M y Huseby RA. Endocrinology 85:96, 1969.
128. Kalla NR, Nisula BC, Menard RH y Loiraux DL. Endocrinology 100 (Suppl) B2 (Abstract), 1977.
129. Murota S, Shikita M y Tamaoki B. Biochim. Biophys. Acta 117:241, 1966.
130. Mulder E, Peters MJ, van Beurden WMD, Galdier M, Rommerts FFG, Janszen FFG y Van der Molen HJ. J. Endocr. 70:331, 1976.
131. Dorrington JH y Armstrong DT. Proc. Natl. Acad. Sci. Washington 72:2677, 1975.
132. Leach RB, Maddock WD, Tokuyama I, Paulsen CA y Nelson WD. Rec. Prog. Hormone Res. 12:377, 1956.
133. Oshima H, Paraska L, Yoshida KI y Troen P. J. Clin. Endocrinol. Metab. 45:1097, 1977.
134. Rosness FA, Sinde A y Eik-Nes KB. Biochim. Biophys. Acta 488:55, 1977.

135. Sar M, Stumpf WE, Mc Lean WS, Smith AA, Hansson V, Nayfeh SN y French FS. En: Hormone Regulation of Spermatogenesis. Editores: French FS, Hansson V, Ritzen EM y Nayfeh SN. Plenum Press, New York, pag. 311, 1975.
136. Wilson E y Smith AA. En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis. Editores: French FS, Hansson V, Ritzen EM y Nayfeh SN. Plenum Press, New York. Pag. 281, 1975.
137. Chen YDI, Shaw MJ y Payne AH. Mol Cell. Endocrinol. 8:291, 1977.
138. Purvis K, Clausen OPF y Hansson V. Biol. Reprod. 20:304, 1979.
139. Zipf WB, Payne AH y Kelch RF. Endocrinology 103:595, 1978.
140. Gavin JR, Roth J, Neville DM, De Meyts P y Buell DN. Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. 71:84, 1974.
141. Mukherjee C y Lefkowitz RJ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73:1494, 1976.
142. Hinkle PM y Tashjian Jr. AH. Biochemistry 14:3845, 1975.
143. Lesniak MA y Roth J. J. Biol. Chem. 251:3720, 1976.
144. Raff M. Nature (London) 259:265, 1976.
145. Kahn CR, Neville DM Jr y Roth J. J. Biol. Chem. 248:244, 1973.
146. Hsueh AJW, Dufau ML y Catt KJ. Biochim. Biophys. Res. Comm. 72:1145, 1976.
147. Hsueh AJW, Dufau ML y Catt KJ. Proc, Natl. Acad. Sci. Wash. 74:592, 1977.
148. Sharpe M. Nature (London) 264:644:1976.
149. Conti M, Harwood JP, Hsueh AJW, Dufau ML y Catt KJ. J. Biol. Chem. 251:7729, 1976.
150. Conti M, Harwood JP, Dufau ML y Catt KJ. Mol. Pharmacol. 13:1024, 1977.

151. Conti M, Harwood JP, Dufau ML y Catt KJ. J. Biol. Chem. 252:8869, 1977.
152. Tsuruhara T, Dufau ML, Cigorruga SB y Catt KJ. J. Biol. Chem. 252:9002, 1977.
153. Haour F y Saez JM. Mol. Cell. Endocrinol. 7:17, 1977.
154. Chen YDI y Payne AH. Biochem. Biophys. Res. Comm. 74:1589, 1977.
155. Furvis K, Torjesen PA, Haug E y Hansson V. Moll. Cell. Endocrinol. 8:73, 1977.
156. Marsh JM, Mills TM y Lamaire WJ. Biochim. Biophys. Acta. 304:197, 1973.
157. Hunzicker-Dunn M y Birnbaumer L. Endocrinology, 99:185, 1976.
158. Hunzicker-Dunn M y Birnbaumer L. Endocrinology. 99:198, 1976.
159. Hunzicker-Dunn M y Birnbaumer L. Endocrinology. 99:221, 1976.
160. Bockaer J, Hunzicker-Dunn M y Birnbaumer L. J. Biol. Chem. 251:2623, 1976.
161. Dufau ML y Catt KJ. Vitam. Horm. 36:461, 1978.
162. Huhtaniemi IT, Nozu K, Warren DW, Dufau ML y Catt KJ. Endocrinology 111:1429, 1982.
163. Warren DW, Dufau ML y Catt KJ. Science 218:375, 1982.
164. Cigorruga SB, Dufau ML y Catt KJ. J. Biol. Chem. 253:4297, 1978.
165. Nozu K, Dehejia A, Zawistowich L, Catt KJ y Dufau NL. A.N.Y. Acad. Sci. 383:212, 1982.
166. Nozu K, Dufau ML y Catt KJ. J. Biol. Chem. 256:1915, 1981.
167. Saez JM y Forest MG. J. Clin. Endocr. Metab. 49:278, 1979.

168. Aquilano DR y Dufau ML. *Endocrinology* 114:499, 1984.
169. Dorrington JH, Roller NF y Fritz IB. *Mol. Cell. Endocrinol.* 3:57, 1975.
170. Luft JH. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409, 1961.
171. Watson ML. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:475, 1958.
172. Lowry O, Rosenbrough NJ, Farr AL y Randall RJ. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
173. Burton K. *Biochem. J.* 62:315, 1956.
174. Weil PA y Blatti SD. *Biochemistry* 14:1636, 1975.
175. Markarevich BM, Clark JH y Hardin JW. *Biochemistry* 17:3146, 1978.
176. Tsai MJ, Schwartz RJ, Tsai SY y O'Malley BW. *J. Biol. Chem.* 250:4165, 1975.
177. Dufau ML, Podesta EJ y Catt KJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:1272, 1975.
178. Laemmli UK. *Nature* 227:680, 1979.
179. Thompson EA y Siiteri PK. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 212:378, 1973.
180. Gore-Langton R, Mckeracher H y Dorrington J. *Endocrinology* 107:464, 1980.
181. Yago N, Kabayashi S, Sekiyama S, Hurokawa H, Iwai Y, Susuki I e Ichii S. *J. Biochem.* 68:775, 1970.
182. Youssef H. En: Fleisher S y Packer L (Eds): *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 53:34, 1978.
183. Sottocasa GL, Kuylenstierna B, Ernster L y Bergstrand A. *J. Cell. Biol.* 32:415, 1967.
184. Gamble W, Vaughan M, Kruth HS, y Avigan J. *J. Lipid Res.* 19:1068, 1978.
185. Murray FT, Santner S, Samojlik E, y Santen RJ. *J. Clin. Pharmacol.* 19:704, 1979.

186. Hochberg RS, Van der Hoeven TA, Welch M y Lieverman S. *Biochemistry* 13:603, 1974.
187. Wakabayasi K. *Endocr. Jap.* 24:473, 1977.
188. Midgley AR Jr. *Endocrinology* 79:10, 1966.
189. Hunter WM y Greenwood FC. *Nature (Lond)* 194:495, 1962.
190. Hwang WM, Guyda HJ y Friesen HG. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 68:1902, 1971.
191. Redshan MR y Lynch SS. *J. Endocrinol.* 60:327, 1974.
192. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, y Ross GT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:988, 1971.
193. Di Pietro DL, Brown PD y Strott CA. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35:729, 1972.
194. Dehehia A, Nozu K, Catt KJ y Dufau ML. *J. Biol. Chem.* 237:13782, 1982.
195. Conn PM, Tsuruhara T, Dufau ML y Catt KJ. *Endocrinology* 101:639, 1977.
196. Jansen FHA, Cooke BA, von Driel MJ, van der Molen HJ. *J. Endocrinol.* 70:345, 1976.
197. Schumacher M, Schafer G, Holstein AF, Hiltz H. *FEBS Lett.* 91:333, 1978.
198. Sanderson RJ y Bird KE. En: *Methods in Cell Biology*. Ed: Prescott DM. Academic Press, New York. Vol 15:1, 1977.
199. Christensen AK. *Handb. Physiol.* 5:57, 1975.
200. Risbridger GP, Kerr JB, Peake RA, de Kretzer DM. *Endocrinology* 109:1234, 1981.
201. Mori H, Christensen AK. *J. Cell Biol.* 84:340. 1980.
202. Romrell LJ, Bellve AR, Fawcett DW. *Dev. Biol.* 49:119, 1976.
203. Rivenson A, Rivenson M, Madden RE. *Cell Immunol.* 14:411, 1974.

204. Aquilano DR y Dufau ML. *Endocrinology* 113:94, 1983.
205. Bell PA y Bortwick NM. *J. Steroid Biochem.* 11:381, 1979.
206. Alexander DC y Miller WL. *J. Biol. Chem.* 257:2282, 1982.
207. Tsai MJ, Ting AC, Nordstrom JL, Zymmer W y O'Malley BW. *Cell* 22:219, 1980.
208. Harris RS, Rosen JM, Means AR y O'Malley BW. *Biochemistry* 14:2072, 1975.
209. Dufau ML, Winters CA, Hattori MA, Aquilano DR, Baraňao JLS, Nozu K, Baukal A y Catt KJ. *J. steroid Biochem.* 20:161, 1984.
210. Ciocca DR y Dufau ML. *Science* 226:445, 1984.
211. Tsai-Morris CH, Aquilano DR y Dufau ML. *Endocrinology* 116:38, 1985.
212. Tsai-Morris CH, Aquilano DR y Dufau ML. *Endocrinology* 116:31, 1985.
213. Aquilano DR, Tsai-Morris CH, Hattori MA y Dufau ML. *Endocrinology* 116:1745, 1985.
214. Hattori MA, Aquilano DR y Dufau ML. *J. steroid Biochem.* 21:265, 1984.
215. Shikita M y Hall PF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:1441, 1974.
216. Toaff ME, Strauss III JF, Flinkinger GL y Shattil SJ. *J. Biol. Chem.* 254:3977, 1979.
217. Bardin CW. Ed. Yen SSC y Jaffe R. Philadelphia. WB Saunders Co, pp. 110, 1975.
218. Bardin CW, Bullock LP, Sherins RJ, Mowszowicz I y Blackburn WR. *Recent Prog. Horm. Res.* 29:65, 1973.
219. Boyar RM, Moore RJ, Rosner W, Aiman J, Chipman J, Madden JD, Marks JF y Griffin JE. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47:1116, 1978.

220. Steinberger E. *Physiol. Rev.* 51:1, 1971.
221. Setchell BP. En *The mammalian testis*. Ed.: Setchell BP, Ithaca, NY, Cornell University Press, p. 109, 1978.
222. Winters SJ y Troen P. En *Treatment of male infertility*. Ed. Bailer J, Schill WB, Scherzstein L. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 85, 1982.
223. Saez JM y Forest MG. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:278, 1979.
224. Saez JM, Haour F, Tell GEP y Sanchez P. *Mol. Pharmacol.* 14:1054, 1978.
225. Scaglia HE, Aquilano DR y Zylbersztein CC. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 22:335, 1988.
226. Scaglia HE, Mariani V, Zylbersztein CC, Carrere C, Kelly E, Rey-Valzacchi G y Aquilano DR. *Clin. Latinoam.* 23:403, 1989.
227. Swerldoff RS y Walsh PC. *Fertil. Steril.* 26:1006, 1975.
228. Stewart BH. *J. Urol.* 112:222, 1974.
229. Aafjes JH y van der Vijver JCM. *Fertil. Steril.* 43:901, 1985.
230. Dufau ML, Cigorruga SB, Baukal AK, Bator JM, Sorrell SW, Neubauer JF y Catt KJ. *J. steroid Biochem.* 11:193, 1979.
231. Huhtaniemi IT, Katikineni M, Chan V y Catt KJ. *Endocrinology* 108:58, 1981.
232. Nakajin S, Shively JE, Yuan PM y Hall FF. *Biochemistry* 20:4037, 1981.
233. Rommerts FFG, de Jong FH, Brinkmann AO y van der Molen HJ. *J. Reprod. Fertil.* 65:281, 1982.
234. Inkster SE, Son C y Brodie AMH. 72 Anual Meeting of the Endocrine Society, Atlanta, Georgia, USA. Abs. 1342, 1990.
235. Huhtaniemi IT, Katikineni M y Catt KJ. *Endocrinology* 109:588, 1981.

236. Charreau EE, Calvo JC, Nozu K, Pignataro C, Catt KJ y Dufau ML. *J. Biol. Chem.* 256:12719, 1981.
237. Graves PE, Uzgiris VY y Salhanick HA. *Steroids* 35:543, 1980.
238. Mason JI y Boyd GS. *Eur. J. Biochem.* 21:308, 1971.
239. Toaff ME, Schelyer H y Strauss III JF. *Biochem. Biophys. Acta* 617:291, 1980.
240. Lambeth JD, Seyhert DW y Kamin H. *J. Biol. Chem.* 255:138, 1980.
241. Young DG y Hall PF. *Biochemistry* 10:1496, 1971.
242. Baron J, Taylor WE y Masters BSS. *Archs. Biochem. Biophys.* 150:105, 1972.
243. Lambeth JD y Kamin H. *J. Biol. Chem.* 254:2766, 1979.
244. De Pierre JW y Ernster L. *A. Rev. Biochem.* 46:201, 1977.
245. Churchill PF, de Alvare LR y Kimura T. *J. Biol. Chem.* 253:4924, 1978.
246. Simpson ER, Cooper DY y Estabrook RW. *Recent. Prog. Horm. Res.* 25:523, 1969.
247. Catt KJ, Harwood JP, Clayton RN, Davies TF, Chan V, Katikineni M, Nozu K y Dufau ML. *Rec. Prog. Horm. Res.* 36:557, 1980.
248. Pelletier G, Cusan GL, Belanger A, Seguin C, Kelly PA y Labrie F. *J. Androl.* 1:171, 1980.
249. Blaquier JA, Calandra RS y Piñero L. En: *Endocrinologia Molecular*. Eds. Calandra y De Nicola. El Ateneo p. 260, 1985.
250. Bardin CW, Musto N, Gonsalus G, Kotitte N, Cheng SL, Larrea F y Becker R. *Ann. Rev. Physiol.* 42:189, 1981.
251. Santen RJ, Samojlik E, Worgul TJ. En: *A comprehensive guide to the therapeutic use of aminoglutethimide*. Eds. RJ Santen e IC Hendersen, Basel, Switzerland, p.101, 1982.

252. Sharpe RM. Bibli. Reprod. 44:cap. 1, 1984.

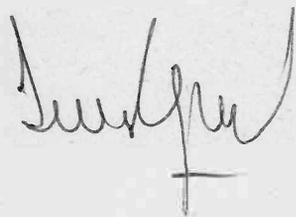
253. Aquilano DR, Carrere C, Rey-Valzacchi G, Kelly E, Mariani V, Zylbersztein C, y Scaglia HE. Libro del IV International Congress of Andrology. Ed: Monduzzi Editore, Florencia. pp. 149, 1989.

254. Scaglia HE, Carrere C, Rey-Valzacchi G, Kelly E, Mariani V, Zylbersztein C y Aquilano DR. Libro del IV International Congress of Andrology. Ed: Monduzzi Editore, Florencia. pp. 155, 1989.

255. Velletri FA, Aquilano DR, Bruckwick E, Tsai-Morris CH, Dufau ML y Lovenberg W. Endocrinology 116:2516, 1985.

256. Fabbri A, Tsai-Morris CH, Luna S, Fraioli F y Dufau ML. Endocrinology 117:2544, 1985.

257. Fabbri A, Tinaiero JC y Dufau ML. 72 Anual Meeting of the Endocrine Society, Atlanta, Gerogia, USA. Abs. 1061, 1990.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dufau ML', with a horizontal line extending from the bottom of the 'u'.

### FE DE ERRATAS

Pag. 34. La insulina debe excluirse del parentesis que involucra a las hormonas hipofisarias.

Pag. 82. En la 3ra. linea debe leerse "las celulas fueron inyectadas".

Pag. 116. En la Fig. 21 el eje de las ordenadas se refiere a "pg de estradiol".

Pag. 124. Los triangulos llenos se refieren a testosterona y los vacios a estradiol.

Pag. 175. Donde dice "respuesta a la testosterona" debe leerse "respuesta de testosterona a la hCG".

Pag. 176. En la Tabla, la mitad izquierda corresponde a los resultados de LH (mUI/ml) y la derecha, a los de FSH (mUI/ml).

*J. G. J.*