

11261
207
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**EFECTO DE hCG, FSH Y PROLACTINA SOBRE LA PRODUCCION DE
TESTOSTERONA POR LAS CELULAS DE Leydig EN CULTIVO DEL
POLLO RECIEN NACIDO.**

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS-FISIOLOGIA

PRESENTA

JULIETA IVONE GASTRO ROMERO

FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1989.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página
RESUMEN EN ESPAÑOL	I
RESUMEN EN INGLÉS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
INTRODUCCION	1
Eje hipotálamo - hipófisis - gónada	3
a) Células de la hipófisis anterior	3
b) Estructura química y mecanismos de acción de la GnRH	5
Estructura química de la LH, hCG y FSH	9
Biosíntesis de andrógenos	12
Maduración del Eje hipotálamo-hipófisis-testículo	18
Desarrollo del testículo	
a) morfológico	20
b) funcional	22
LH/hCG y su relación con la función testicular	25
- receptores a LH	25
- regulación a nivel del receptor	27
FSH y su regulación con la función testicular	33
a) interacción Sertoli - Leydig	36
b) los macrófagos	39
PRL y su relación con la función testicular	41
Regulación autócrina	46
Regulación parácrina	47

HIPOTESIS 49

OBJETIVOS 50

MATERIAL Y METODOS

Cultivo primario de testículo	52
Preparación de las hormonas	54
Técnica de extracción de testosterona	54
Técnica de RIA de testosterona	55
Determinación de proteínas	56
Método estadístico	57

RESULTADOS (hCG)

1. Producción de testosterona en 24 Hs en medio de cultivo definido y no definido, en presencia ó ausencia de hCG	59
2. Curva dosis-respuesta a la hCG en las células de Leydig cultivadas en medio definido	60
3. Curva dosis-respuesta a la hCG en las células cultivadas en medio no definido	61
4. Producción de testosterona (2hs) en células previamente cultivadas en medio con ó sin SBF; en presencia ó ausencia de hCG:	
a) Medio definido	62
b) Medio no definido	63

RESULTADOS (FSH)

A. Efecto de FSH-Sigma	
- Curva dosis-respuesta	73
- Curva temporal	74
B. Efecto de FSH-NIH	

- Curva dosis-respuesta	75
- Curva temporal	76

RESULTADOS (PRL)

a) Efecto de la PRL sobre la producción basal de testosterona	85
b) Interacción de la PRL con la hCG	86

DISCUSION	93
-----------	----

CONCLUSIONES	104
--------------	-----

BIBLIOGRAFIA	106
--------------	-----

RESUMEN

En las aves existen algunas evidencias que apoyan la maduración funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gónada hacia el día 13 de la etapa embrionaria y que señalan que el testículo del pollo en este período posee la maquinaria esteroidogénica necesaria para que se lleve a cabo la biosíntesis de testosterona (Woods, 1987). Estudios "in vitro" en donde se utilizaron trozos de testículo de pollos entre 1 y 12 días de edad posnatal demostraron que existe un aumento importante en la producción basal de testosterona en los primeros días vida; las células en este período respondieron al estímulo con gonadotropina coriónica humana (hCG); la respuesta decayó hacia el décimo día (Pedrera, Mendoza y Romano, 1984).

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de la influencia directa del Suero Bovino Fetal (SBF), así como de las hormonas LH/hCG, FSH y PRL sobre la función esteroidogénica de las células testiculares del pollo recién nacido en cultivo. Se determinó la liberación de testosterona al medio de cultivo en diferentes situaciones experimentales mediante la técnica de Radioinmunoanálisis.

Se encontró que la presencia del SBF (10%) en el medio de cultivo mantiene la capacidad de respuesta de las células a la hCG; sin embargo, cuando las células fueron incubadas en presencia de SBF + hCG, éstas son incapaces de responder a la hCG, lo que sugiere la inducción de un fenómeno de regulación negativa en este último caso. Para evitar la influencia del SBF se probó cultivar las células en un medio totalmente definido (DMEM + Albúmina 0.1%) que permitió estudiar la influencia de

las hormonas hipofisiarias por separado.

Se demostró que la presencia de LH/hCG, FSH y PRL en el medio de cultivo regula la esteroidogénesis de las células de Leydig, Estos efectos fueron dependientes de : 1) la dosis de hormona administrada, 2) el tiempo de permanencia de las mismas en el medio de cultivo, 3) la pureza de la hormona y 4) de la especie animal que proviene.

Por último se observó que existe una interacción de la PRL y de la FSH con la hCG en la regulación de la esteroidogénesis, ya que ambas mantuvieron la capacidad de respuesta de las células a la hCG. Además la PRL incorporada al medio de cultivo junto con la hCG, tuvo un efecto sinergista sobre la producción de testosterona ya que ésta fué mayor que cuando solo se puso hCG.

Estos datos aportan información que hace posible la caracterización funcional de las células testiculares en etapas tempranas del desarrollo de particular importancia en las aves. Si bien no es posible con los resultados obtenidos hasta ahora explicar el mecanismo de acción de éstas hormonas en estas células, consideramos que los mismos demuestran la capacidad de las gonadotrofinas y la prolactina para modular la esteroidogénesis en el pollo recién nacido.

Este estudio abre un campo a futuras investigaciones, ya que será necesario realizar experimentos tendientes a la identificación y localización de los receptores específicos para cada hormona y la regulación de los mismos por las hormonas homólogas y heterólogas, acerca de lo cual no existe información en la literatura.

ABSTRACT

EFFECTS OF hCG, FSH AND PROLACTIN ON THE TESTOSTERONE PRODUCTION BY CULTURED LEYDIG CELLS FROM NEWLY HATCHED CHICKEN.

There are some evidences that support the maturation of the hipotalamus - hypophysis - gonade axis since 13-day-old chick embryo and indicate that in this period the chick testes have developed the steroidogenic machinery for the testosterone biosynthesis (Woods, 1987). "In vitro" studies (Federnera, Mendoza y Romano, 1987) using pieces of chick testes between 1 and 12 - posnatal days showed an important increase in the testosterone basal production in the first days that declined around 10 days of life. The objective of the present work was to study the influence of fetal bovine serum (FBS) and hormones like hCG, FSH and PRL on the steroidogenic function of developing cultured testis cells from cultured newly hatched chicken. We used the Radioimmunoassay. technique to measure the amount of testosterone released into the culture medium. Medium containing FBS (10%) maintained the capacity of cells to respond to hCG, but when SBF + hCG were added to the culture medium, the cells lost this capacity suggesting that FBS prodeded a down-regulation phenomenon. Furthermore the cells were cultivated in defined medium (DMEM + Albumine 0.1%) to avoid the FBS influence. This culture medium let us to study the influence of individual hormones on the testis cells. Presents results showed that hCG, FSH and PRL added to the culture medium could modulate Leydig cells steroidogenesis. These ffects are dependent of the dose and time of

exposition of the cells to the particular hormone as well as of the purity and origin specie to each hormone as it was showed for FSH. Finally , interactions between PRL and hCG and FSH on the testis steroidogenesis was demonstrated. Both hormones maintained the capacity of cells to respond to hCG. Moreover, the addition of PRL plus hCG to the culture medium produced a sinergist effect on testosterone production. Presents results suggest that pituitary hormones are involved in the function of testis en the neonatal period through a direct influence on the cells of this organ. The mechanism of action of this hormones on the different cells population of the testes remain to be elucidated.

LISTA DE ABREVIATURAS

LH = hormona luteinizante

FSH = hormona folículo estimulante

GnRH = factor liberador de gonadotrofinas

PRL = prolactina

EHHT = Eje-hipotálamo-hipófisis-testículo

SBF = suero de bovino fetal

INTRODUCCION

Una de las características fundamentales de los organismos pluricelulares es su capacidad de dar una respuesta global a un estímulo dado; esta respuesta del organismo como un todo debe de ser coordinada, es decir, debe existir una adecuada relación entre los elementos participantes tanto en espacio como en tiempo, con el fin de que el resultado final sea el correcto y deseado.

En la mayoría de los organismos superiores existen dos formas fundamentales de comunicación intercelular: el sistema endócrino y el sistema nervioso. Ambos sistemas se comunican entre sí por medio de mensajeros químicos, el primero a través de hormonas y el segundo de neurotransmisores. En el sistema endócrino, una glándula libera hormonas que pueden actuar sobre las células u órganos situados en cualquier sitio del cuerpo. Las células efectoras están provistas de receptores específicos para cada hormona (Snyder, 1985).

Un buen ejemplo de comunicación celular neuroendócrino corresponde al llamado eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (Fig. 1), en donde el hipotálamo sintetiza un decapeptido, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la secreta de una manera pulsátil dentro del sistema porta sanguíneo hipotálamo-hipofisiario. Después de alcanzar la hipófisis anterior, el GnRH se une a las células gonadotrópas estimulando la liberación de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) hacia la circulación general. La LH llega por la sangre a las células de Leydig, donde se une a receptores específicos. Esto lleva a la activación de la adenilato ciclasa y genera AMP cíclico y otros mensajeros que finalmente resultan en la secreción

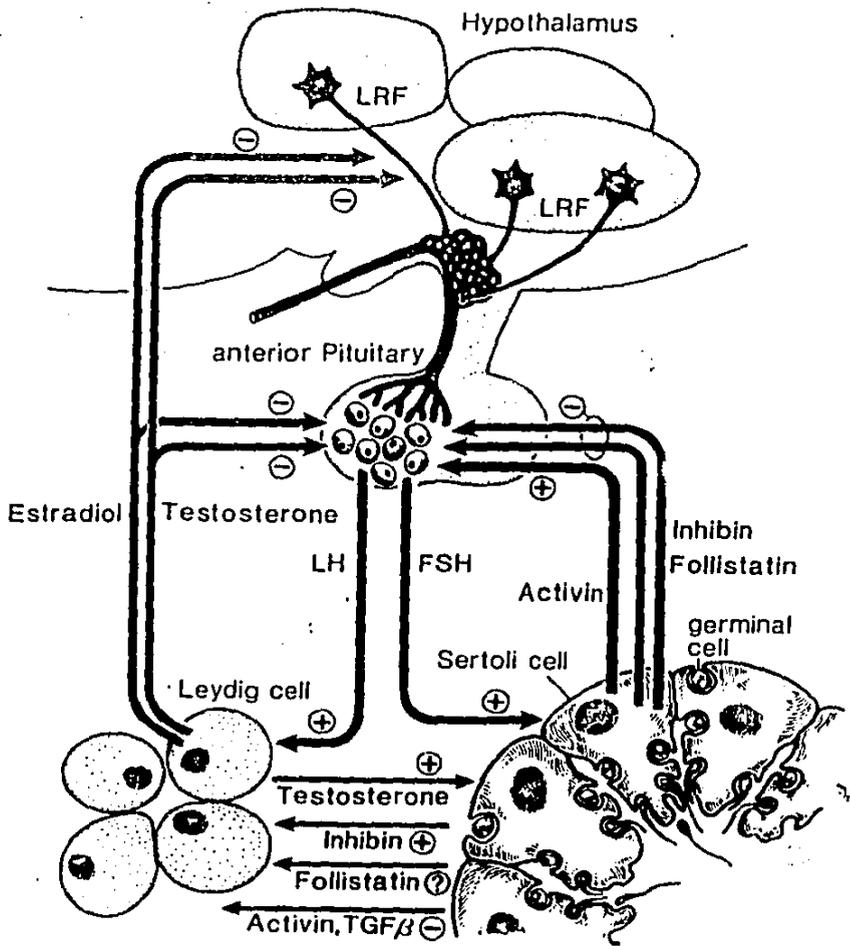


Fig. 1 Eje hipotálamo - hipófisis - testículo. En este esquema se resume el control hormonal de la función testicular. (Tomado de la revisión de Shao-Yao Ying, 1988. Endocrine Review.)

de andrógenos. Estos andrógenos a su vez tienen la capacidad de modular la secreción de las gonadotropinas de la hipófisis anterior a través de un mecanismo de retroalimentación.

EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA

a) Células de la hipófisis anterior

La hipófisis en un corte sagital, está separada por dos lóbulos, uno anterior y otro posterior. El lóbulo anterior se sabe que produce en la rata seis diferentes hormonas. Existen evidencias que indican la existencia de diferentes tipos de células para la producción de éstas hormonas, con una posible excepción para las gonadotropinas, que dan nombre a las células productoras que son llamadas gonadotropas. Para los fines de este trabajo sólo nos referiremos a las células conocidas como mamotropas y gonadotropas, ya que éstas tienen como función la secreción de las hormonas tróficas: prolactina, hormona folículo estimulante y hormona luteinizante.

Las células lactotropas o células productoras de prolactina predominan en las células hipofisiarias de las hembras con crías lactantes; son menos numerosas, pero aún abundantes en la hipófisis de hembras que están ciclando y menos frecuentes en hipófisis de ratas machos.

Las células gonadotropas son células grandes, redondas que

contienen gránulos de secreción de ~200 nm los cuales son típicamente menos osmiofílicos que los gránulos de las mamotropas. Algunas células gonadotropas contienen poblaciones de gránulos mayores (400-500 nm) los cuales son difíciles de fijar en OsO₄, pero son bien conservadas por fijación con glutaraldehído.

De acuerdo a evidencias inmunocitoquímicas, ambos tipos de gránulos son secretores, conteniendo almacenadas las hormonas gonadotróficas. Se han encontrado varios subtipos de células gonadotropas utilizando la microscopía y la inmunocitoquímica. Es probable que existan variantes funcionales del mismo tipo de células o diferentes tipos celulares, uno responsable de la formación de FSH y otro de la LH, que no se ha demostrado todavía por lo que en el presente no está claro si ambas gonadotropinas son producidas por la misma célula o por diferentes tipos celulares. Existen evidencias inmunocitoquímicas en ratas y en humanos que indican la presencia de LH y FSH en la misma célula, sin embargo estos estudios se llevaron a cabo utilizando anticuerpos generados a un grupo de hormonas que tienen un polipéptido en común, la subunidad alfa.

Más recientemente se hicieron estudios con anticuerpos específicos para la subunidad beta, pero el problema aún no ha sido resuelto. (Tixier Vidal, 1975).

b) Estructura química y mecanismo de acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

La secreción de las hormonas luteinizante y folículo estimulante por las células gonadotrópas es un fenómeno desencadenado por la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); esta hormona es un decapeptido de origen hipotalámico cuya secuencia de aminoácidos es la siguiente: P-Glu-His-Trp-Ser-Tir-Gli-Leu-Arg-Pro-Gli-NH₂. Este decapeptido difiere en la posición ocho con el decapeptido que se libera en el pollo, ya que se ha visto que contiene el aminoácido Glu en lugar de Arg (King, 1982).

Estudios realizados en la rata con hormona iodinada han encontrado la existencia de receptores a GnRH en membranas hipofisiarias, los cuales pertenecen a una sola población y presentan una alta afinidad (Clayton y Catt, 1981). Sin embargo, también estos receptores han sido encontrados en gónadas, placenta y corteza suprarrenal. En el ovario, la GnRH inhibe la diferenciación y la esteroidogénesis inducida en las células de la granulosa por acción de la FSH, así mismo suprime la respuesta de las células luteínicas a las hormonas luteotróficas LH y PRL. En el testículo, inhibe la producción de andrógenos (estimulada por la LH/hCG), así como la acción de FSH, PRL y hormona de crecimiento, en cuanto a la inducción de receptores a LH (Hsueh, 1983).

Por otro lado, la GnRH es capaz, por sí misma, de estimular la esteroidogénesis, tanto en las células de Leydig aumentando la producción de testosterona (Moger, 1984) como en las células de la

granulosa de ovario, aumentando la producción de progesterona (Wang, J., 1988). Estas acciones periféricas las lleva a cabo una molécula semejante al GnRH que se produce en las gónadas y en la placenta.

Se ha observado que la administración pulsátil de GnRH mantiene la respuesta hormonal de las células gonadotropas a un nivel constante y que dos pulsos dados con un intervalo de treinta minutos tienen un efecto potenciador en sí mismos. Este fenómeno potenciador posiblemente se debe a que la GnRH promueve una mayor provisión de LH y FSH para ser secretada, movilizandoo las reservas de hormonas durante la primera estimulación, lo que haría que para la segunda respuesta se disponga de un mayor número de gránulos para ser secretados (Fickering y Fink, 1976, 1977).

En la figura 2 se esquematiza un posible mecanismo de acción de la GnRH sobre la liberación de las gonadotropinas en el cual la GnRH se une al receptor (R) y se verifica una microagregación de los receptores que origina la activación de la proteína G (G) que a su vez activa a la enzima fosfolipasa C o fosfodiesterasa (PDE). La PDE promueve la hidrólisis del difosfato de fosfatidil inositol (PIP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacil glicerol (DG), esto trae como consecuencia un movimiento en el reciclamiento de la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) en sus derivados mono-(PIP) y di-fosforilados (PIP₂). El IP₃ interactúa con la membrana del retículo endoplásmico (RE) permitiendo la salida de Calcio (Ca) del RE al citosol, esto corresponde a la primera fase del incremento de la concentración de calcio. Por otro lado, el DG activa a la proteína cinasa C (PK-C), además de movilizar al ácido fosfatídico (AP) que activa a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) con la consecuente liberación del ácido araquidónico (AA) hacia

el citoplasma. El AA es transformado por la lipo-oxigenasa en el ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-HETE).

Por otro lado, se abre un canal de calcio probablemente por la intermediación de la PK-C y se presenta una entrada masiva de calcio del exterior correspondiendo a la segunda fase del aumento de la concentración de calcio. Este incremento del calcio intracelular activa el sistema de la calmodulina. Los sistemas de las diferentes cinasas activadas fosforilan a las proteínas que constituyen el siguiente paso de los mecanismos de secreción y síntesis que estimula el GnRH en la célula gonadotropa.

Por último, para la secreción de las gonadotropinas, se movilizan los gránulos que las contienen hacia la membrana plasmática por el reordenamiento de los microfilamentos, con la participación del calcio y el AMPc. El nucleótido cíclico se forma por la activación de la adenilato ciclasa presente en la membrana de los gránulos. Al ponerse en contacto la membrana del gránulo con la membrana plasmática se produce la exocitosis.

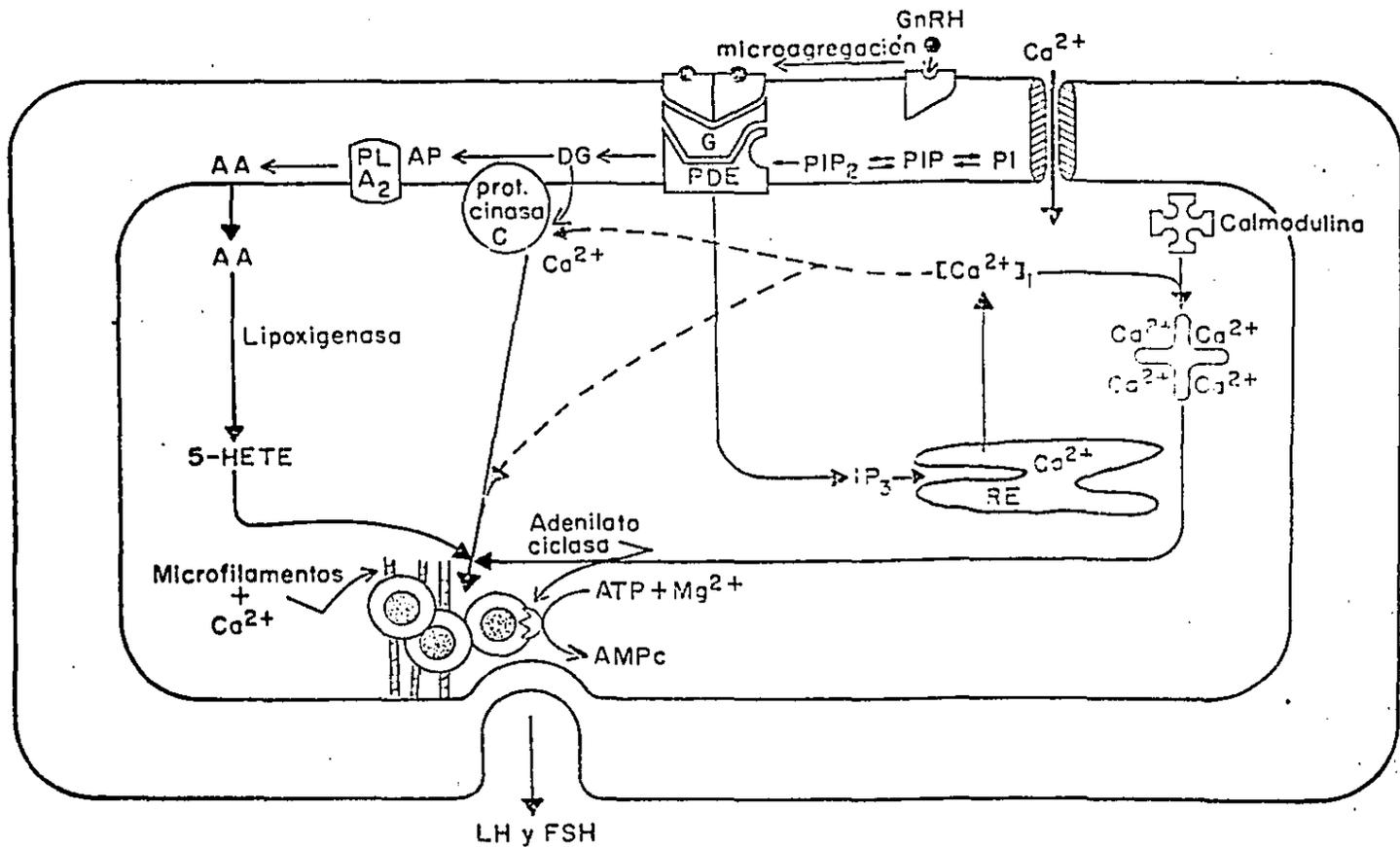


Fig.2 Mecanismo de acción del GnRH sobre la liberación de gonadotrofinas. Elaborado a partir de los trabajos de los grupos encabezados por Conn, Naor, Pink, Catt y Cronin.

ESTRUCTURA QUIMICA DE LA LH/hCG Y FSH.

Las gonadotropinas , hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculo estimulate (FSH) de origen hipofisiario, la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) de origen placentario, y también otra hormona, estimulante del tiroides (TSH), constituyen una familia de hormonas glucoproteicas constituidas por dos cadenas de aminoácidos conocidos como cadena alfa y beta. El número de aminoácidos para cada una de ellas, así como el peso de la molecula completa se muestra en el cuadro siguiente (Ryan, J. y cols, 1988):

Glucoproteinas	Peso Molecular	Aminoacidos	
		Alfa	Beta
LH	29,416	92	114
FSH	32,603	92	118
hCG	38,633	92	145
TSH	30,461	92	118

Desde el punto de vista evolutivo, se ha propuesto que todas las subunidades de las hormonas glucoproteicas de la hipófisis en vertebrados evolucionaron desde una molécula ancestral común que da origen a dos tipos de moléculas, alfa y beta, las cuales evolucionaron dando hormonas diferentes. Así se han identificado dos gonadotropinas diferentes , tanto en anfibios, aves, reptiles como en mamíferos (Pierce

y cols, 1981).

Por estudios de la estructura primaria de éstas gonadotropinas, se sabe que estas hormonas son heterodímeros constituidos por dos subunidades, la alfa y la beta, las cuales se encuentran unidas por fuerzas no covalentes. La subunidad alfa es común para todas las hormonas y muestra una considerable homología de una especie a otra. En cambio la subunidad beta es diferente para la LH, FSH y TSH. Las subunidades beta de la LH y la hCG son altamente homólogas (85 %) en sus primeros 114 residuos, pero la subunidad beta de la hCG difiere en que ésta contiene una extensión carboxilo terminal rica en residuos de serina y prolina. Ambas subunidades son codificadas por genes separados y cada una tiene su propia secuencia.

La presencia de la subunidad alfa, común para la LH y hCG y la alta homología existente entre las cadenas beta de estas hormonas, nos ofrece una base química para entender la actividad biológica común que comparten estas hormonas. Además se conoce que los carbohidratos presentes en éstas hormonas son indispensables para su actividad biológica y no así para su unión al receptor, ya que se ha visto que la deglicosilación tanto de LH, hCG, FSH ó TSH no interfiere en la unión a su receptor específico, pero sí en su actividad biológica tal como la estimulación de la adenilato ciclase y la esteroidogénesis (Ryan, 1987, 1988).

Existen evidencias que demuestran claramente que la subunidad beta está directamente involucrada en la unión al receptor y que demuestran el rol esencial de ésta tanto en el reconocimiento como en la transducción de la señal. Experimentos de competencia y de acoplamiento cruzado señalan que cuando se aísla la subunidad beta de la subunidad

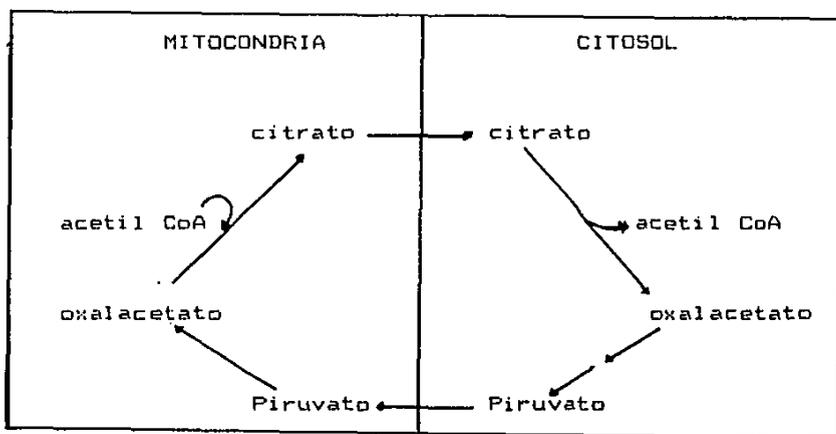
alfa, esta se une al receptor, y que los fragmentos peptídicos de la subunidad beta además de unirse al receptor, son capaces de promover la producción de testosterona (Ryan, 1987). Sin embargo, otros autores señalan que esta actividad hormonal es expresada únicamente si existe una fuerte interacción específica, no covalente entre ambas subunidades alfa y beta (Pierce, 1981).

Se ha sugerido la posibilidad de que la subunidad beta se una al receptor específico y que la subunidad alfa se internalice dentro de la célula o se internalice dentro de la membrana plasmática para la estimulación de la adenilato ciclasa. Este mecanismo podría explicar la función de la subunidad común (alfa) con el concepto de una subunidad "unidora" y una "activadora" similar a la propuesta para algunas toxinas de plantas y bacterias (Pierce, 1981), pero aún no existen datos concluyentes que apoyen esta hipótesis.

Por último, también se ha reportado que la cadena beta de la LH, altamente homóloga a la de hCG, es capaz de promover la producción de testosterona, activando los receptores a LH en las células de Leydig (Charreau, 1980).

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS

La célula de Leydig, localizada en el tejido intersticial del testículo, es la mayor fuente de andrógenos en el macho. Extensos estudios han mostrado que la testosterona es una hormona producida y secretada por los testículos hacia la circulación sistémica. Las fuentes principales para la biosíntesis de los andrógenos en el testículo son la Glucosa y los ácidos grasos, que provienen del plasma y atraviesan libremente la membrana celular, transformándose en acetil CoA por acción de la piruvato deshidrogenasa en el caso de la glucosa y por la vía de la beta-oxidación de los ácidos grasos; ambos eventos se llevan a cabo en la matriz mitocondrial. Debido a que la membrana mitocondrial es impermeable a la acetil CoA, ésta sale de la mitocondria posiblemente vía su formación a citrato el cual acarrea grupos acetil a través de la membrana mitocondrial interna hacia el citosol (Fig 3)



(Fig. 3)

Una vez en citosol, el acetil CoA y el acetoacetil CoA sintetizan

la 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMGCoA) por la acción de una enzima sintetasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA). La HMGCoA es reducida posteriormente a mevalonato por otra enzima, la HMGCoA reductasa. El mevalonato continúa la ruta biosintética hasta la formación de colesterol, generando metabolitos intermedios como el escualeno y el lanosterol. Dicho colesterol sintetizado ó el proveniente del plasma es esterificado rápidamente con ácidos grasos y acumulado en gránulos lipídicos a partir de los cuales puede ser hidrolizado por esterases citoplasmáticas que proveen de esta forma más colesterol libre para ser utilizado en la biosíntesis de esteroides (Fig. 4)

Mucho del colesterol en la célula de Leydig probablemente se deriva del acetato y no del colesterol circulante. En la célula de Leydig el colesterol se encuentra en forma libre y esterificada y la hidrólisis de los ésteres de colesterol y sulfato de colesterol ocurre bajo la influencia de la LH. El mecanismo por el cual la LH estimula la síntesis del esteroide en el testículo probablemente se debe a un aumento en el transporte del colesterol a la membrana interna mitocondrial para que la enzima que rompe la cadena lateral del colesterol actúe sobre este.

Independientemente de la procedencia del colesterol que puede llegar directamente del espacio extracelular, éste entra a la mitocondria hasta las crestas de la membrana interna en donde se encuentran las 20 y 22 hidroxilasas, las cuales rompen la cadena lateral del colesterol dando como resultado la formación de Pregnenolona. Se ha propuesto que la ruptura de esta cadena es a su vez regulada por la LH en el testículo del adulto, mientras que en la vida embrionaria es activado por la gonadotrofina coriónica humana de origen trofoblástico.

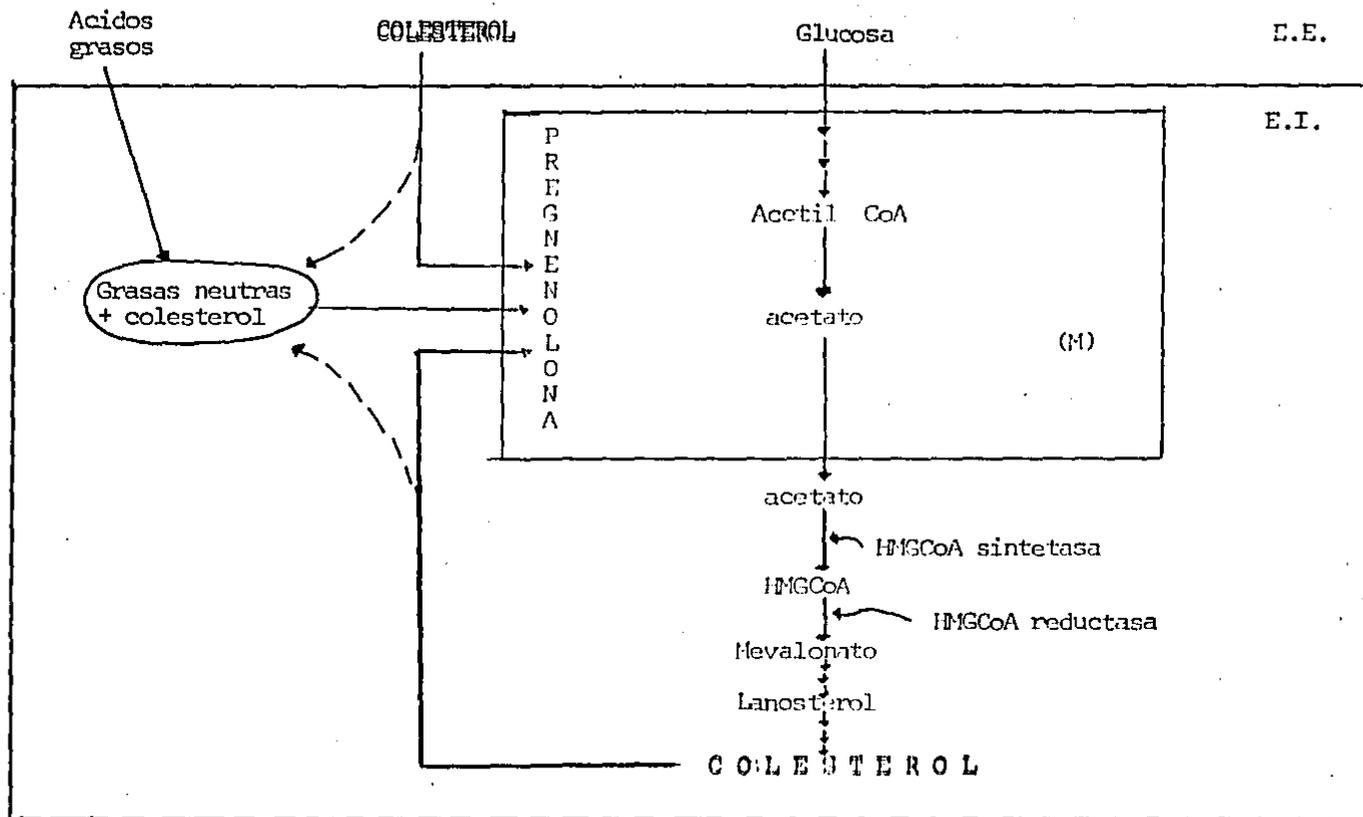


Fig.4. Biosíntesis de pregnenolona a partir de glucosa y ácidos grasos. (E.E) Espacio extracelular; (E.I) Espacio intracelular; (HMGCoA) 3-OH, 3 metil-glutaril CoA; (M) mitocondria.

(Vease rev. de Loza, y cols., 1988).

Una vez que esta escisión se lleva a cabo, la pregnenolona resultante migra al citoplasma en donde puede seguir dos rutas para la formación de testosterona. La conversión a testosterona se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso y requiere de la acción de 5 enzimas (Fig.4)

La conversión de pregnenolona, a progesterona involucra la acción dos enzimas microsomales: $\Delta^5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la 3-cetoesteroide $\Delta^4-\Delta^5$ -isomerasa que utilizan NAD como aceptor de hidrógenos.

La progesterona es posteriormente convertida a 17 α -hidroxiprogesterona, pero debido a que esta reacción se lleva cabo muy rapidamente, existe poca acumulación en el testiculo. Este esteroide es un sustrato para la C17-20 liasa la cual remueve la cadena de dos carbonos para formar androstenediona, la cual es convertida a testosterona por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esta biotransformación se conoce como ruta Delta 4, y es probablemente la ruta preferida para la biosíntesis de testosterona. El camino alternativo es la ruta Delta 5 en la cual la pregnenolona pasa de la mitocondria al retículo endoplásmico liso para que se lleve a cabo una hidroxilación y formar así la 17 α -hidroxipregnenolona y a través de otras enzimas biotransformarse en testosterona. (Fig.5)

A partir de los hallazgos de Le Roy (1948) acerca de la existencia de una sustancia extraída de las gónadas del embrión de pollo, la cual muestra propiedades andrógenicas en un bioensayo, otros investigadores se avocaron al estudio de la esteroidogénesis "in vitro" e "in vivo" en testículos de pollo a diferentes edades. Así se mostró que los pollos a

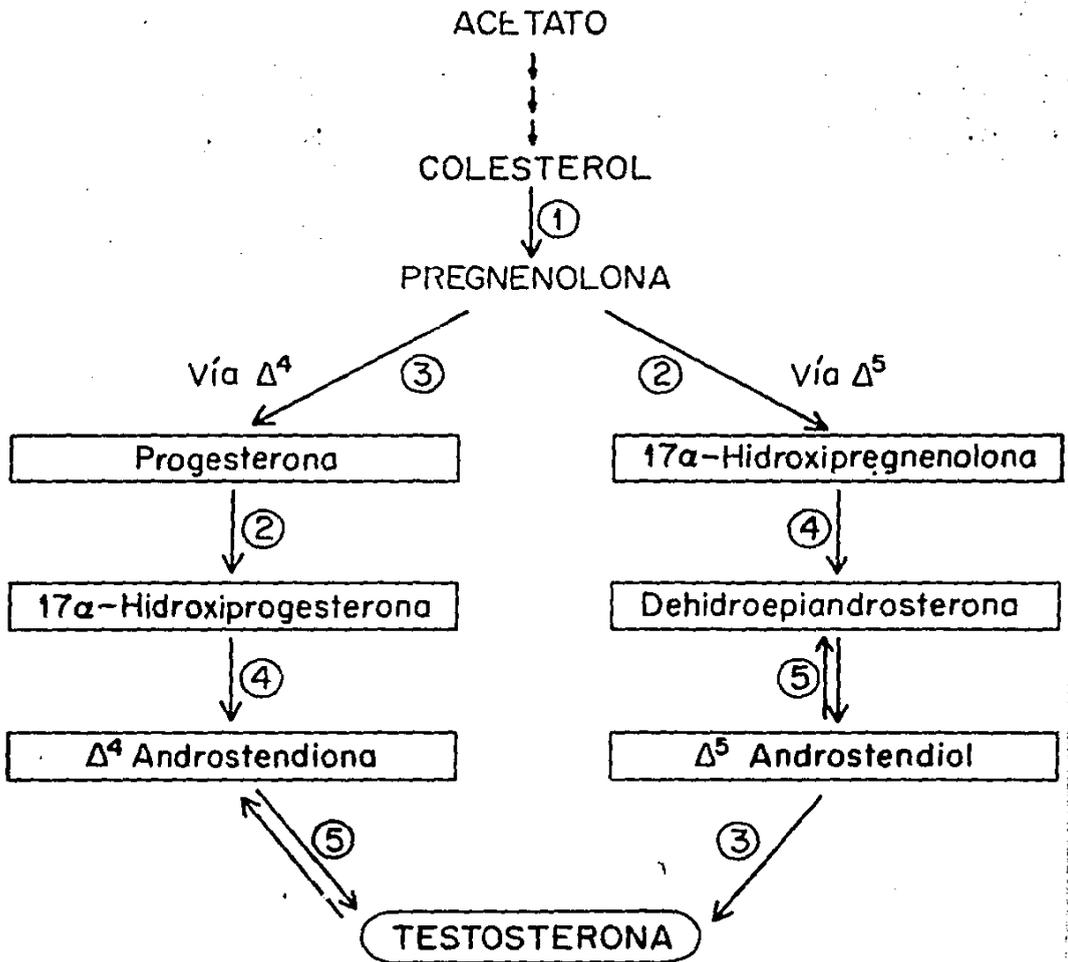


Fig. 5 Biosíntesis de testosterona en testículo. Enzimas que intervienen :

- (1) 20α y 22β esteroide hidroxilasas y $20,22$ esteroide liasa.
- (2) 17α hidroxilasa.
- (3) $\Delta^5 - 3\beta$ hidroxioesteroide deshidrogenasa y 3 ceto esteroide $\Delta^4 - \Delta^5$ - isomerasa.
- (4) 17β hidroxioesteroide deshidrogenasa.

los 12 días de la etapa prenatal (Nakamura, 1972) a los 2 días de vida posnatal (Conell, 1966), a los 15 días de vida posnatal y en la etapa adulta (Galli, 1972, 1973) poseen la maquinaria necesaria para que se lleve a cabo la síntesis de testosterona a partir de acetato vía la formación de pregnenolona. Esta sigue dos rutas diferentes para la síntesis de testosterona (Nakamura, 1972), pero el hecho de que la testosterona en esta especie es con poca frecuencia convertida en androstenediona nos indica que el producto terminal en la esteroidogénesis por el testículo del pollo es la testosterona.

MADURACION DE EJE HIPOTALAMO - HIPOFISIS - TESTICULO

Durante los estadios tempranos en el desarrollo del eje endócrino en vertebrados, los componentes glandulares de estos son autónomos en su crecimiento, diferenciación y actividad, y es solo mas tarde, en la etapa embrionaria que ocurre la integración funcional entre ellos (Woods, 1987). Existen evidencias que apoyan un proceso de maduración del Eje Hipótalamo - Hipófisis - Testículo (EHHT) en aves, en el que se puede apreciar una primera etapa de independencia funcional de sus componentes y otra a partir de la segunda mitad de la etapa fetal, donde se establecen las interacciones demostradas en el adulto (Woods, 1977).

En el embrión de pollo, la unidad hipotálamo - hipófisis es funcionalmente madura hacia el día 13.5 de desarrollo embrionario: las terminaciones nerviosas de neuronas hipotalámicas se observan por primera vez en el día 7.5 - 8.0 de incubación, éstas incrementan en número y penetran a la capa externa de la eminencia media en el día 9.0. Los vasos sanguíneos empiezan a invadir la adenohipófisis hacia el día 6 de desarrollo, quedando formado el plexo vascular portal hipotálamo - hipofisiario el día 12.0. Estos hallazgos muestran que los prerrequisitos anatomicos para la comunicación hipotálamo - hipófisis se establece hacia la mitad de la gestación (Woods, 1977).

Respecto al desarrollo funcional del EHHT se ha visto que en el embrión de pollo la producción de gonadotropinas por la adenohipófisis inicia su regulación en la producción de andrógenos testiculares a los 13.5 días de incubación, lo que se manifiesta por una elevación máxima de los niveles de testosterona en el plasma a esta edad. Antes de este

tiempo, la síntesis de andrógenos por los testículos es autónoma (Woods, 1977, 1987; Pedernera y Gomar, 1984) encontrándose que ésta se inicia a los 3.5 días de incubación en las células indiferenciadas (Woods, 1974).

Por otro lado, varias observaciones han implicado al hipotálamo en la regulación de la unidad hipófisis - gonada. Se ha visto que en ambos sexos, la GnRH es inmunocitoquímicamente demostrable, apareciendo primeramente en el cuerpo celular nervioso (Pericaria) del infundíbulo hipotalámico en el día 5.5 del desarrollo. Por el día 7.5 los axones de éstas se pueden localizar en el hipotálamo anterior sobre las ramas del plexo capilar primario de la eminencia media (Woods, 1987). También se ha visto que el estradiol marcado unido al pericario hipotalámico en el día 10.0 alcanza el plexo vascular hipotálamo - hipofisiario en el día 12.0 del desarrollo.

Otras observaciones que sugieren una independencia de la hipófisis respecto del hipotálamo en etapas tempranas son el transplante de hipófisis a la membrana corioalantoidea (CAM) y la adición de LH/hCG a embriones hipotálamo - hipofisectomizados, los cuales restablecen los andrógenos testiculares a niveles similares a los encontrados en embriones intactos de 15.5 días de incubación (Woods, 1977, 1987).

Estudios en rata han demostrado que el EHHT es estimulado al momento del nacimiento, ya que los resultados obtenidos por Corbier y cols, (1978) indican que durante el primer día de vida extrauterina, el crecimiento testicular fue más rápido que el observado en las últimas 24 horas de vida fetal. Estos hallazgos coinciden con los reportados por Esuchi y Morikawa, 1968 los cuales observaron que el peso testicular aumenta ligeramente más rápido entre el día 22 fetal y el primer día

post-parto, que entre el lapso del día 21 y 22 fetal.

Por otro lado también se ha demostrado en la rata que en el periodo posnatal, la secreción de testosterona disminuye a partir del primer día del nacimiento, comenzando a incrementarse otra vez hacia el día 21.

Federnera, Mendoza y Romano. (1984) han demostrado que en el pollo existe un aumento del peso corporal así como testicular durante el periodo neonatal; la secreción de testosterona del testículo también aumenta en los primeros días del periodo neonatal para decaer hacia el décimo día de vida. Además observaron que en todas las edades comprendidas entre 2 y 12 días posnatales, los pollos responden al estímulo con gonadotropina coriónica, pero el incremento es menor a medida que avanza la edad del animal.

DESARROLLO DEL TESTICULO

a) Desarrollo morfológico.

Un evento crucial en el desarrollo testicular es la diferenciación de las células secretoras de esteroides, las células de Leydig, en el compartimiento extracordal. Estas células se diferencian poco tiempo después de que los cordones testiculares se han formado.

Debido a que se diferencian de la misma masa celular (Blastema) de la cual surgen las células de Sertoli, varios autores han propuesto un origen común de estos dos tipos celulares. Así, algunos autores han sugerido que el Blastema es de origen mesenquimal (humanos y cerdos), en

tanto otros han sugerido un origen mesonéfrico (ratón, conejo, humanos y ovejas).

Las diferencias entre gónadas masculinas y femeninas en embriones de pollo pueden demostrarse en base a sus características morfológicas a los seis días de incubación. Existen dos teorías acerca del origen de las células intersticiales en esta especie : la primera que indica que el precursor de estas células se forma en el estroma y es por lo tanto de origen mesenquimatoso (Narbaitz, 1966) y la segunda que sugiere que el precursor de las células de Leydig se forma dentro de los cordones testiculares, y desde ahí migran hasta situarse en el estroma, lo que sugiere un origen epitelial (Scherbi, 1970). Este último autor encuentra que dichas células precursoras (en embriones de 7 días) tienen características basófilas, con ribosomas, poco retículo endoplasmico rugoso y liso, con inclusiones lipídicas y con mitocondrias con crestas lamelares en un número pequeño e irregular.

Por otra parte se ha demostrado que el testículo de rata contiene dos poblaciones de células de Leydig, las cuales fueron separadas por gradientes de Metrizamida, y a las que se les denominó población fetal (I) y adulta (II). La población I aparece en el testículo de la rata en el último tercio de la gestación y declina durante los primeros 10-15 días de vida posnatal; la generación adulta se incrementa de una manera gradual después de este tiempo (Lording, 1972).

En estudios morfológicos realizados en embriones de pollo de 17 días, (Aguilar, Romano y Pedernera, 1981) muestran que en esta etapa el cordón seminífero y el tejido intersticial se encuentran bien definidos en su desarrollo , y describen además la existencia de tres tipos celulares en el tejido intersticial (I, II, III).

Las células tipo I con forma de fibroblasto se encuentran cerca de la membrana basal del cordón seminífero, tienen citoplasma en forma de huso con abundantes prolongaciones y mitocondrias ovaes con crestas lamelares, retículo endoplásmico rugoso ocasional y ausencia de retículo endoplásmico liso. Su núcleo es redondo con cromatina condensada periféricamente.

Las células tipo II (transicionales) localizadas alrededor de los cordones sexuales, presentan forma de huso, núcleo elongado, menos prolongaciones citoplasmáticas, mitocondrias con crestas tubulares o vesiculares y mitocondrias con crestas lamelares que aún coexisten en la misma célula. Contienen poco REL, un prominente aparato de Golgi y una cantidad menor de polisomas.

Las células tipo III (ó de Leydig) forman islotes separados del cordón seminífero y de las células tipo I y II. Son redondas o poligonales con núcleo central y pocas prolongaciones citoplasmáticas, contienen un gran número de gotas lipídicas en su citoplasma y sus mitocondrias son de forma oval o redonda con crestas tubulares o vesiculares abundantes y el retículo endoplásmico liso se encuentra bien desarrollado.

b) Desarrollo funcional

La esteroidogénesis testicular tiene dos fases activas durante la vida: la primera se presenta en la vida fetal. Dependiendo de la especie el pico de actividad fetal se encuentra cercano a la mitad de la gestación (humanos) o al final de ésta (roedores). Esta actividad

continúa (roedores) o se reactiva (humanos y primates) durante la vida posnatal inmediata, pero permanece quiescente hasta la pubertad. La segunda fase de actividad esteroideogénica se inicia en la pubertad y se mantiene durante la edad adulta (Huhtaniemi, 1984).

Estas variaciones en la esteroideogénesis se correlacionan con la morfología evolutiva de las células de Leydig, las cuales aparecen en dos fases de crecimiento como fue explicado en el apartado anterior.

Woods, 1977 y Guichard, 1973., demuestran que en el embrión de pollo, las gónadas se encuentran ya diferenciadas a los 8 días, tanto morfológicamente como funcionalmente, ya que a esta edad el embrión es capaz de producir testosterona en pequeñas concentraciones. Estos hallazgos son apoyados por los trabajos de Chieffi, 1964 y Narbaitz, 1963., quienes encuentran actividad enzimática de la $\Delta^5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa así como la presencia de lípidos en esta edad.

Pedernera, Mendoza y Romano, (1987) en un estudio realizado con fragmentos testiculares de pollo a diferentes edades (nacimiento - 12 días) reportan aumento tanto en el peso corporal como en el testicular durante este período; y un aumento en la producción basal de testosterona en los primeros días del período neonatal el cual decae hacia el décimo día de vida. En todas las edades se observó una respuesta al estímulo con Gonadotropina coriónica (hCG), la cual disminuyó a medida que avanzaba la edad de los animales. Después del nacimiento se ha visto que la producción basal de testosterona medido por radioinmunoensayo en el medio de incubación es cuantificable durante los primeros 12 días posnatales, alcanzando un pico máximo de producción de testosterona hacia el sexto día (Pedernera, Mendoza y Romano, 1987).

Estos hallazgos coinciden con los datos aportados por Tanabe y Cols, (1979) "in vivo", donde se describe en el pollo un pico de testosterona en plasma hacia el séptimo día posnatal, así como un aumento en los niveles plasmáticos de LH hacia el tercer día, el cual posteriormente decae. Por último estos mismos autores señalan que durante la evolución del espacio pericordonal, se observa que las células tipo I y las tipo III tienen su máximo desarrollo en el segundo día del nacimiento, y tienden a disminuir conforme avanza la edad.

Estos resultados llevaron a la conclusión de que en el período posnatal las células de Leydig del testículo del pollo poseen la maquinaria necesaria para la esteroidogénesis. Estudios realizados en rata han mostrado resultados morfológicos y funcionales del testículo muy similares pero no iguales a los encontrados en el pollo ya que existen diferencias, fundamentalmente temporales. Chese y Payne (1983) demuestran la existencia de dos poblaciones de células de Leydig (I y II) en las ratas recién nacidas, las cuales poseen la capacidad de producir andrógenos , señalando que dicha capacidad fué mayor para las células tipo I en las ratas inmaduras y el fenómeno opuesto en ratas maduras. Desde el punto de vista funcional, Hutaniemi y cols (1982) mostraron que en la rata, la producción basal de testosterona, así como la respuesta a hCG disminuyen entre el 2o. y 15o. día de vida posnatal. Observaron en el 15o. día una pérdida de la capacidad de respuesta a la hCG "in vitro", lo cual coincide con la disminución del porcentaje de células intersticiales que se encuentra hacia el mismo día.

LH / hCG Y SU RELACION CON LA FUNCION TESTICULAR

Durante el desarrollo prenatal de los mamíferos, se encuentra una hormona que tiene efecto luteotrópico, secretada por la placenta, conocida como gonadotropina coriónica, la cual juega un papel importante en el desarrollo y función testicular de estos animales, principalmente en cuanto a la secreción de testosterona por las células de Leydig.

El testículo en desarrollo es capaz de producir cantidades de testosterona similares a las del adulto y este hecho coincide con el pico de máxima secreción de hCG placentario, siendo los niveles de LH en esta etapa despreciables. También se conoce que a la aparición de las células de Leydig en el testículo fetal sigue una activación de la esteroidogénesis. Se ha visto que cuando la secreción de esteroides es máxima, los niveles de receptores a LH en el testículo fetal, alcanzan también un máximo y simultáneamente el testículo fetal presenta una máxima respuesta a la estimulación con gonadotropinas "in vitro".

RECEPTORES A LH/hCG

Los efectos de LH / hCG en la célula de Leydig se han clasificado en rápidos, aquellos que se presentan a los pocos minutos de la adición de la hormona y lentos, de carácter trófico, que implican síntesis de proteínas.

La unión de LH/hCG al receptor específico, una glicoproteína dimerica que forma parte de la membrana de la célula de Leydig, inicia una cascada de eventos que incluye activación de una enzima mitocondrial

que tiene como función el rompimiento de la cadena lateral del colesterol, aumento de los niveles de AMPc producto de la activación de la adenilato ciclasa; activación de la cinasa A y fosforilación de al menos seis proteínas celulares (Dufau y cols, 1984). La unión de la hormona al receptor induce la incorporación de nucleótidos de guanina (GTP) a las unidades reguladoras, proteínas N o G (Dufau y cols. 1980) que conducen a la activación de la adenilato ciclasa y el consecuente aumento del AMPc que a su vez activa a la proteína cinasa A, la cual inicia como se señala más arriba una cascada de procesos de fosforilación de proteínas necesarias para la esteroidogénesis.

Paralelamente a este sistema, el cual utiliza al AMPc como segundo mensajero, se ha reportado otro relacionado con la proteína cinasa dependiente de calcio y fosfolípidos el cual es activado por los ésteres del Forbol (Lin, 1985; Welsch y cols, 1984; Cooke y cols, 1984; Tahka, 1986). Asimismo se ha mostrado que la calmodulina es importante en el proceso de transporte del colesterol a la mitocondria (Hall et al, 1981).

Se han encontrado en la rata alrededor de 20,000 sitios receptores a la LH/hCG por célula, cuyas características involucran una alta constante de afinidad ($K_a = 4 \times 10^{-11} M$) y una baja capacidad de unión (1 pmol/g) a esta hormona (Catt y Dufau, 1978). Se considera que la activación del 1 % de los receptores para LH/hCG es suficiente para desencadenar el efecto de estas hormonas, por lo que los receptores en exceso (receptores de reserva) servirían para asegurar el efecto hormonal, aún en presencia de bajos niveles de las mismas.

En la rata se han identificado receptores a LH/hCG desde la gestación, los cuales se elevan progresivamente hasta el nacimiento. No

se han encontrado diferencias entre el número de receptores en este período respecto a la cantidad encontrada durante los primeros 5 días después del nacimiento, aún cuando el contenido de testosterona en esta etapa (5o. día posnatal) tiende a decrecer (Warren, 1984).

a) Regulación a nivel del receptor.

Se sabe que la LH y la hCG en el mamífero tienen la capacidad de regular a sus propios receptores, fenómeno que se denomina regulación homóloga, ésta puede ser en un sentido positivo manteniendo o estimulando los receptores ó en sentido negativo disminuyendo el número de ellos.

En el testículo adulto, la capacidad de la células de Leydig para responder a la estimulación sostenida con gonadotrofinas con un incremento en la producción de andrógenos se encuentra limitada por el desarrollo de un estado refractario que se asocia a una pérdida de receptores y de la respuesta esteroidogénica (Cigorrage, 1978).

Asimismo, se ha observado que en las células de Leydig del testículo adulto, la gonadotrofina induce un control dual sobre la función: bajas dosis de LH/hCG mantiene los receptores y enzimas esteroidogénicas en un estado de " regulación positiva", en tanto que altas dosis de esta hormona causan "regulación negativa" del receptor y desensibilización (Huhtaniemi y cols, 1981; Tahka, 1986; Tsuruhara, y cols, 1977; Dufau y cols, 1988).

A diferencia de lo que ocurre en la célula de Leydig de rata adulta, las células del testículo fetal y posnatal temprano son refractarias a este proceso de desensibilización (Huhtaniemi y cols,

1981).

Huhtaniemi, y cols. 1981 utilizando un modelo de cultivo de células de testiculares de rata adulta demostró que una dosis única fisiológica de hCG induce un aumento en el número de receptores para esta hormona.

Este fenómeno ha sido considerado como un efecto trófico tardío de la hCG en cuanto a la inducción o mantenimiento de receptores (Huhtaniemi y cols, 1981; Tahka, 1986). La administración de una dosis alta de hCG produce en un primer momento un rápido aumento del número de receptores LH/hCG que se explicaría por un desenmascaramiento de los mismos, o bien por incorporación de nuevos receptores a la membrana (Huhtaniemi, Tahka y Dufau, 1984).

Estudios "in vitro " e "in vivo" (Warren y cols, 1982, 1987) en testículos fetales de rata, han mostrado que altas dosis de LH/hCG incrementan el número de receptores a estas hormonas, así como la respuesta esteroidogénica evaluada por un aumento en la producción de testosterona. No se observó en estos experimentos el fenómeno de desensibilización demostrado para las células de ratas adultas.

Dufau y Catt, 1982., utilizando ratas de 1 día de edad demuestran que la adición de bajas dosis de hCG durante tres días causó un incremento del 91 % de los receptores a LH por el testículo y que por el contrario una dosis alta de esta hormona generó una pérdida de receptores.

Varios autores han estudiado las modificaciones que se asocian al fenómeno de "regulación negativa" para estos receptores. Se ha observado que el tratamiento agudo con hCG induce dos tipos de alteraciones, que son dependientes de la dosis y del tiempo de exposición a esta hormona. Entre estas se encuentran la pérdida de

receptores a LH/hCG y las alteraciones esteroideogénicas, que pueden ser de dos tipos: "tardía" en los pasos posteriores a la formación de progesterona, y "temprana", que se presenta antes de la formación de pregnenolona. Experimentos "in vivo" e "in vitro" en los cuales fueron utilizadas altas dosis de hCG demostraron la existencia de una rápida pérdida de receptores a LH ulterior al tratamiento; estos efectos perduraron hasta una semana, produciéndose la recuperación dos días después de este período. (Sharpe, 1976; Haour y Saez, 1977; Hsueh y cols 1976; Catt et al, 1979, Schumacher, 1976).

Los resultados obtenidos en ratas adultas difieren un poco de los encontrados cuando se utilizaron animales de 5 días, en donde se observó también una caída rápida en el porcentaje de receptores a LH/hCG durante las primeras 24 horas, pero sin embargo la recuperación de los mismos se produjo más rápidamente a las 48 y 72 horas después de la estimulación con una dosis alta de hCG. Esta aparente pérdida de la regulación negativa se explicó aduciendo que en los testículos de rata en la etapa neonatal éste fenómeno no existe; descartando la posibilidad de que la ausencia de ésta regulación negativa en esta etapa puede ser explicada porque las células "viejas" sensibles a la desensibilización, sean remplazadas por células "nuevas" inducidas por la inyección de LH en las que se produce un incremento compensatorio del número de receptores. Altas dosis de gonadotropinas disminuyen el número de receptores por ocupación, pero tan rápido como la hormona se disocia, los sitios de unión son remplazados por nuevos receptores funcionales.

No se sabe actualmente si los receptores "viejos" pierden su capacidad de unión o si son remplazados por otros nuevos (Huhtaniemi,

1984).

La desensibilización en el testículo adulto se acompaña de la disminución de la producción de AMPc y a la recuperación de los receptores sigue un aumento de los niveles de AMPc en respuesta a las nuevas dosis de hCG (Heueh y cols, 1974). Estos datos sugieren que el fenómeno de desensibilización está ligado al acoplamiento entre el receptor de hCG y la adenilato ciclasa. El hecho de que en células desensibilizadas a hCG, se logre un aumento en la producción de AMPc con toxina del cólera, apoya la hipótesis de un desacoplamiento entre el complejo LH/hCG- receptor y el sistema adenilato ciclasa, así como de alteraciones en la degradación e internalización de los receptores (Rajaniemi y Huhtaniemi, 1979) y cambios a nivel de la proteína N (Dufau et al, 1984).

Paralelamente a estos cambios inducidos a nivel del receptor LH/hCG por la hormona homóloga, se producen alteraciones en la esteroidogénesis que no dependen sólo de la refractariedad del AMPc, puesto que no pueden ser revertidos con la toxina del cólera y desaparecen antes de que se produzca la recuperación de los receptores (Tsuruhara y cols, 1977). La alteración llamada "tardía" que ocasiona estas modificaciones en la esteroidogénesis parece estar en pasos posteriores a la proteína cinasa, a nivel de las enzimas microsomales 17 - esteroide hidroxilasa y la C17 y 20 esteroide liasa que catalizan la conversión de esteroides C21 a andrógenos (Cigorruga y cols, 1978).

Se ha postulado un papel para los estrógenos en el fenómeno de regulación negativa por LH/hCG (Dufau, 1988). La incapacidad de las células fetales y de las células de animales inmaduros para ser desensibilizadas por la gonadotropina ,se ha atribuido a la baja

actividad de aromatasa del testículo fetal, donde no es posible detectar una producción de estradiol y los receptores a estrógenos se encuentran en niveles bajos, así como las proteínas inducidas por estradiol (Dufau, 1986, 1987, 1988)

La actividad de aromatasa de la célula de Leydig es raramente detectable en la vida fetal y en la etapa posnatal temprana, sin embargo se incrementa con la edad. Por el contrario, dicha actividad es muy importante en las células de Sertoli durante el desarrollo (Dufau, 1988). Los mayores niveles de actividad de aromatasa fueron encontrados en las células de Leydig de rata adulta y en las células transicionales del testículo fetal (Tsai-Morris, Aquilano y Dufau, 1985, 1986, 1987). Sin embargo el tratamiento de las células de Leydig fetales en cultivo con LH cada tercer día causó una regulación positiva del receptor a estradiol, y un incremento en la proteína regulada por esta hormona con la consiguiente inducción de una alteración esteroidogénica a nivel microsomal y finalmente disminución en la producción de andrógenos (Dufau, 1988). Esta inhibición enzimática mediada por estrógenos fue muy similar a la encontrada en la desensibilización por la LH/hCG en las células de Leydig de rata adulta.

Por lo tanto la inducción de la actividad de aromatasa, seguida de un incremento y consiguiente aumento del número de receptores a estrógenos e inducción de la proteína reguladora de 27 K, dependiente de estrógenos llevaría a la inhibición de las enzimas microsomales 17 β -esteroide hidroxilasa/ 17, 20-esteroide liasa con la consecuente reducción de la producción de testosterona en las células de Leydig fetales tratadas diariamente y/ con altas dosis de LH. De esta manera, el tratamiento de las células de Leydig en cultivo con múltiples y altas dosis de LH

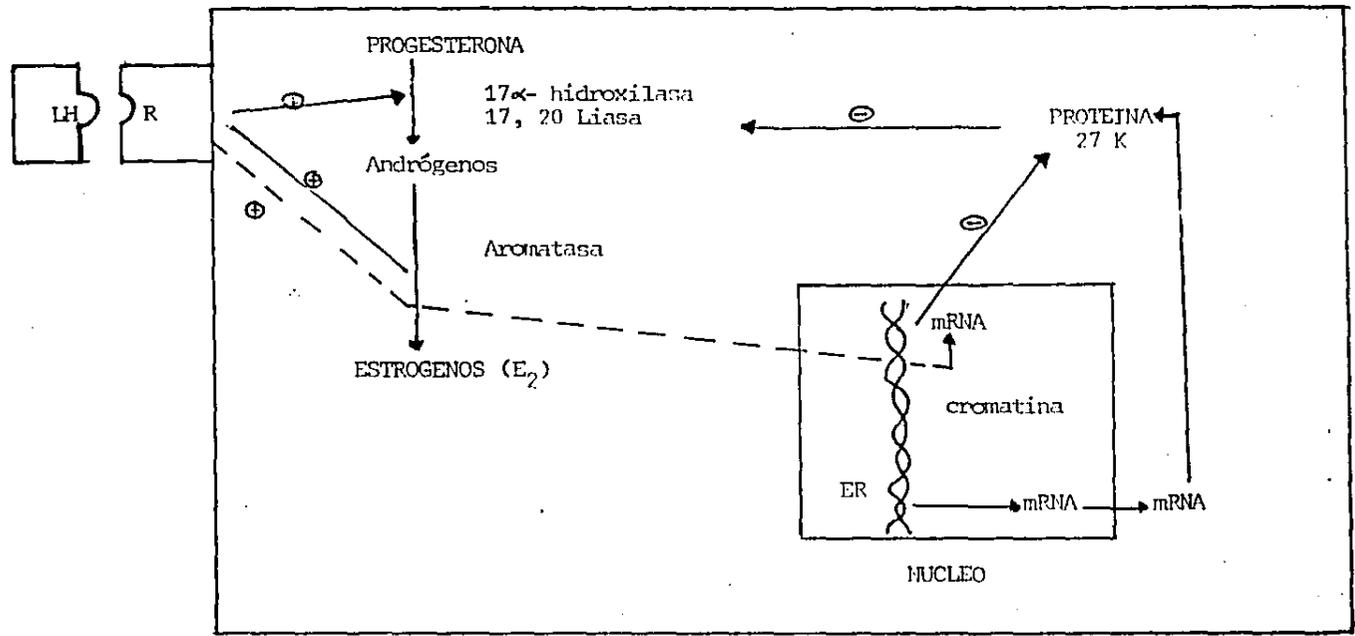


Fig. 6: Alteración esteroidogénica "tardía" por acción de la hormona luteinizante y el estradiol (E₂).

HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH) Y SU RELACION CON LA FUNCION TESTICULAR.

La hormona foliculo estimulante (FSH) de origen hipofisiario, cuya estructura ha sido descrita en párrafos anteriores, es una glucoproteína que también se encuentra involucrada en la función endocrina del testículo.

La purificación y la composición de aminoácidos tanto para la LH como para la FSH en aves fue reportada en 1975 por Godden, quien encuentra una gran similitud entre éstas y las gonadotropinas de origen humano y de carnero. Ambas gonadotropinas en aves contienen una gran proporción de residuos de glicina y alanina y mantienen la capacidad esteroidogénica y espermatogénica del testículo, respectivamente.

Se ha supuesto en el pasado que la proliferación y diferenciación de las células de Leydig de rata durante la maduración testicular y en ciertas condiciones experimentales en el testículo adulto, depende principalmente de LH; estos datos han sido sugeridos por diferentes autores a través de la respuesta del testículo a la privación o bien a la estimulación con esta hormona (Cigorruga, 1978; Huhtaniemi y cols, 1981; Tahka, 1986; Rev. Dufau, 1988). Sin embargo, existen evidencias que involucran también a la FSH en el desarrollo de las células de Leydig , ya que se ha visto que existe una correlación estrecha entre los niveles de FSH y la formación de la generación adulta de las células de Leydig en la rata (Kerr, 1985). Estudios en ratas inmaduras hipofisectomizadas han mostrado que la FSH aumenta la capacidad del

testículo para unir LH y secretar testosterona (Kerr, 1985) y que produce un incremento en el peso del testículo (Odell, 1976). Este último autor reporta además una pérdida de respuesta a la LH por el testículo de las ratas inmaduras hipofisectomizadas de 25 días, las cuales sin embargo responden al estímulo con FSH, 5 días después de la hipofisectomía, lo que se manifestó por el incremento en el peso testicular. Resultados contrarios fueron presentados por Meidan R., 1985, utilizando un modelo "in vitro". Este investigador observa que en un cultivo de células dispersas de testículo de rata de 7 días de edad postnatal, el estímulo con 100 ng/ml de FSH ovina (50 NIH FSH SI Unidades/mg y < 0.01 NIH LH SI Unidades /mg) durante tres días, no genera ningún incremento en la producción de testosterona.

Se han cuantificado receptores a FSH en testículo desde los 17.5 días de gestación en las ratas, los cuales se mantienen bajos hasta el día 19.5 de la vida fetal. A los 20.5 días, los niveles de estos receptores comienzan a elevarse rápidamente y este incremento continúa hasta el día 21.5 de la gestación, justo antes del nacimiento (Warren, 1984). Estas observaciones son consistentes con el hecho de que en este estadio del desarrollo están presentes células de Sertoli en el testículo de la rata. Sin embargo aún no se ha demostrado que la FSH se una específicamente a las células de Sertoli del feto y no a otras células. La elevación de los receptores observada puede deberse a un incremento en el número de receptores por célula o a un incremento en el número de células de Sertoli ó a ambos eventos (Warren, 1984).

La constante de afinidad de la FSH por su receptor en el testículo fetal es similar a la medida para el testículo neonatal y el adulto (Warren, 1984), En el testículo fetal la constante de afinidad (K_a) de

la la hormona por su receptor en el caso de la FSH es aproximadamente el 10% de la de LH. Debido a esta baja constante de afinidad y el número tan pequeño de sitios de unión de FSH, ha sido difícil técnicamente medir los sitios de unión de FSH bajo condiciones de saturación durante el desarrollo del testículo fetal. Sin embargo, las mediciones de unión al receptor bajo condiciones no saturadas, son proporcionales, pero no idénticas con la concentración del receptor, cuando las afinidades permanecen constantes.

La interpretación de los efectos de la FSH sobre la función de las células de Leydig en el testículo inmaduro ha sido difícil, ya que la respuesta medida es dependiente de la edad, la dosis y el tiempo de exposición a esta hormona. Por otro lado es de vital importancia para una correcta interpretación de los resultados la pureza en la preparación de la FSH. A este respecto existen en la literatura, resultados contradictorios, los cuales por un lado reportan que el efecto de la FSH sobre la función de las células de Leydig se debe a la contaminación de las preparaciones con la otra gonadotropina, la hormona luteinizante (LH) (Purvis, 1979; Moger, 1982) cuya acción sobre la esteroidogénesis ha sido ampliamente demostrado por diferentes investigadores. Otros autores sin embargo han mostrado que la administración de LH a ratas inmaduras en cantidades equivalentes a aquellas conocidas como contaminantes de las preparaciones de FSH, no son capaces de replicar el efecto estimulatorio sobre la esteroidogénesis de la FSH (Purvis y Clausen, 1979).

A pesar de la evidencia que indica que existe un efecto de la FSH sobre la maduración funcional de las células de Leydig, los estudios histológicos no apoyan estos resultados ya que el número de células

intersticiales y su morfología permanecen sin cambios después del tratamiento con FSH en ratas inmaduras hipofisectomizadas (Maidan, 1985).

a.- Interacción Sertoli-Leydig en la rata, efecto de moléculas similares a GnRH:

Otra interpretación del efecto de la FSH sobre la función de testículo concierne a la regulación paracrina entre las células de Sertoli y las células de Leydig. Debido a que la función de las células de Sertoli es críticamente dependiente del funcionamiento normal de las células de Leydig, se ha sugerido una influencia regulatoria bidireccional de las células de Sertoli con las de Leydig. La hormona foliculo estimulante (FSH) actúa a través de un receptor específico sobre la célula de Sertoli, causando éstas a su vez cambios importantes en la función de las células de Leydig; sin embargo aún no se conoce fehacientemente el mecanismo ó los mecanismos para que se lleve a cabo este efecto.

Se ha demostrado que a través de este efecto modulador la FSH induce receptores a LH en las células de Leydig, lo cual incrementa la capacidad esteroidogénica de las mismas; de esta manera la FSH y la LH tienen un efecto sinergista sobre la función testicular (Chen, 1977; Georgopoulos y Payne, 1979; Moger, 1982; Benahmed, 1984; Kerr, 1985). Por otra parte, Sharpe y Coles, 1981 proponen la existencia de un factor parecido a la LHRH (GnRH), el cual ha sido detectado en el fluido intersticial rodeando a las células de Leydig. Se ha visto que cuando se inyecta un agonista de GnRH al testículo, éste causa un desajuste

funcional en esta gónada inhibiendo directamente los efectos inducidos por la FSH sobre la función de las células de Leydig a través de receptores de membrana; por todo esto, este factor ha sido postulado como mensajero entre la célula de Sertoli y la célula de Leydig. En la actualidad existe un reconocimiento general acerca de la existencia de receptores a GnRH en las células de Leydig de testículo de rata (Dufau, 1988). Se han descrito efectos inhibitorios del GnRH y sus agonistas análogos sobre la función testicular vía receptores específicos, durante el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con esta hormona (Dufau, 1988).

En contraste, la acción inhibitoria de la GnRH causada por el tratamiento prolongado con GnRH "in vivo", en animales intactos se debió a una alteración tardía causada por la acción de la LH, que causó desensibilización a nivel de la hipófisis.

Algunos efectos tempranos directos de la GnRH sobre el testículo se han encontrado en las células de Leydig en cultivo. Estos han sido principalmente de tipo estimulatorio, ya que los efectos inhibitorios no se han podido demostrar durante periodos cortos de incubación (Sharpe, 1981; Dufau, 1988)., sin embargo, los efectos inhibitorios directos también han sido observados en cultivos de células de Leydig fetales (Dufau, 1985) y en cultivos de células intersticiales de animales hipofisectomizados.

No se han detectado receptores a GnRH en homogenados de testículo de 20.5 días fetales ni en preparaciones frescas de células de Leydig de esta misma edad, sin embargo, se han encontrado a partir de los 3 y hasta los 70 días del cultivo de células de testículo tomados de estos mismos animales. Estos receptores también son detectables en el

período posnatal en testículos de rata de 5 días y aumentan sensiblemente durante la maduración, hacia los 30-40 días de edad.

El tratamiento de cultivos de células del testículo fetal de rata con agonistas de GnRH inhibió la producción de esteroides dependiente de LH de una manera dependiente de la dosis y abolió la producción aguda de testosterona en respuesta a la hCG, lo cual se acompañó de una disminución en la producción de AMPc. (Dufau y Knox, 1985).

La presencia de receptores a GnRH y la acción inhibitoria de esta hormona sobre las células de Leydig fetales en cultivo, indican que péptidos relacionados a la GnRH pueden modificar los efectos de las gonadotropinas sobre el testículo fetal. De esta manera, el contenido de GnRH materno, así como los bajos niveles de LH durante este período, podrían ser los responsables del estado quiescente de la población de las células de Leydig fetales, contrario al estado de gran actividad de estas células durante la vida embrionaria. Por otro lado, también se ha postulado que el GnRH podría estar ejerciendo una acción moduladora sobre la transición de la población fetal a la población adulta de estas células (Dufau, 1988).

Existen también otros reportes que apoyan la existencia de otro tipo de proteínas o factores, secretados por las células de Sertoli que modulan la función de las células de Leydig. Se ha mostrado que el medio de cultivo obtenido de una población enriquecida en células de Sertoli, contiene una proteína que estimula la producción de andrógenos por las células de Leydig, tanto inmaduras como de la etapa adulta; la producción de esta proteína aumenta por adición de AMPc, FSH y glucágon. Otros autores han postulado también que la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la síntesis de RNA y proteínas (De Philip, 1982).

Además de estas acciones de tipo sintético, la FSH promueve la multiplicación y la maduración de la propia célula de Sertoli (Chemes, 1979), así como la síntesis de estradiol. A este respecto se ha mencionado que la hCG es capaz de estimular la aromatización de testosterona a estradiol en células de Sertoli aisladas de ratas adultas (Valladares y Payne, 1979b). Dorrington y Armstrong (1978) reportaron que las células de Sertoli jóvenes, mantenidas en cultivo son capaces de producir estradiol en presencia de testosterona y FSH. observaciones posteriores de Pomerantz (1979) "in vivo", indican que tanto las células de Sertoli, como las células de Leydig de ratas inmaduras tienen la capacidad de sintetizar estradiol después del tratamiento con FSH, proponiendo la hipótesis de que la aromatización es una modalidad del túbulo y del tejido intersticial en ratas jóvenes, pero que en el momento en el que el animal llega a la etapa adulta, una mayor proporción de esta función se lleva a cabo en las células de Leydig. Esta hipótesis fue apoyada por Valladares (1981), quien demuestra que las células de Leydig de rata de 15 días de edad tienen capacidad de aromatizar y que esta aromatización puede ser estimulada por la hCG "in vitro" en animales de 25 días de edad.

b.- Los macrófagos:

Recientemente se ha reportado que los macrófagos intersticiales se encuentran estrechamente relacionados con las células de Leydig y su estado funcional se relaciona con el de las células intersticiales. Los macrófagos tienen también capacidad esteroideogénica y poseen una superficie común antigénica con las células de Leydig. Se ha sugerido que son precursores de las células de Leydig y algunos estudios indican

que los macrófagos poseen receptores a FSH (Dufau, 1988). Por los hallazgos anteriores se ha pensado que es posible que los efectos de la FSH no se produzcan solamente a través de cambios funcionales en las células de Sertoli, sino que además podría ser relevantes las modificaciones inducidas por la FSH en la función de los macrófagos (Dufau, 1988).

LA PROLACTINA (PRL) Y SU RELACION CON LA FUNCION TESTICULAR

La prolactina es una hormona polipeptídica de 198 aminoácidos, con un peso molecular de 22.000 ; es sintetizada y secretada por las células lactotropas de la hipófisis anterior. A pesar de la evolución ancestral a partir de una hormona común para la hormona de crecimiento y la hormona lactógeno placentario (hPL), la prolactina comparte sólo el 16 % de sus residuos con la primera y un 13 % con la hPL. Por otro lado, también existe un precursor para esta hormona, la PrePRL cuyo peso molecular se encuentra entre 40,000 y 50,000 que puede representar el 8 - 20 % de la inmunoreactividad plasmática de la prolactina en personas normales y en pacientes con tumores secretores de PRL.

El efecto más conocido de esta hormona es la estimulación de la lactancia en el periodo postparto . Sus niveles son muy altos en el feto y en los infantes recién nacidos, declinando durante los primeros meses de vida.

A pesar de que se desconoce si la prolactina juega un papel fisiológico en la regulación de la función gonadal, es conocido que hiperprolactinemia en humanos lleva a un estado de hipogonadismo. En la mujer, inicialmente hay un acortamiento de la fase lútea; subsecuentemente, anovulación, oligomenorrea o amenorrea e infertilidad. En el hombre el exceso de prolactina disminuye la síntesis de testosterona y la espermatogénesis; clínicamente se encuentran en éstos pacientes una disminución de la libido, impotencia e infertilidad (Findling y Blake, 1986).

El control en la secreción de la PRL , a diferencia de otras

hormonas hipofisiarias, es predominantemente inhibitorio. La dopamina se ha considerado como el factor inhibitorio primario para la liberación de esta hormona. Otros factores que están involucrados en esta regulación son la TSH, los estrógenos, glucocorticoides y algunos derivados de aminoácidos como la serotonina, el GABA.

Existen evidencias que señalan que una deficiencia de PRL en la leche materna, secundaria a la administración de un inhibidor de la secreción de prolactina (bromocriptina) a madres en el período de lactancia, genera en sus descendientes un estado de hiperprolactinemia sérica. Este aumento en los niveles de prolactina sérica se deben al bajo desarrollo del sistema neuroendócrino inhibitorio de la secreción de prolactina (tubero infundibular - dopamina) secundario a los bajos niveles de prolactina presentes en los productos, ya que éstos no lo obtienen de la leche materna. Por lo que se concluye que la prolactina proveniente de la leche materna es necesaria para un buen desarrollo del sistema neuroendócrino regulatorio de la secreción de prolactina (Shah y cols, 1988).

Este estado de hiperprolactinemia en la rata macho adulto trae como consecuencia la disminución del peso de la vesícula seminal, así como en la concentración testicular del colesterol, y de los niveles de testosterona plasmática. Además, también se ha observado una disminución en el número de receptores a LH en la célula de Leydig (Dufau, 1978). En animales normales la inducción de hiperprolactinemia lleva a un incremento de los receptores testiculares a LH (Belanger, 1979; Sharpe, 1979; Chan, 1980). Contrariamente, la reducción de los niveles de prolactina sérica por el tratamiento con bromocriptina, se acompaña de una caída en los receptores a la hormona luteinizante (Belanger, 1979).

Actualmente se reconoce que el estado funcional de la célula de Leydig en los mamíferos está predominantemente determinado por la secreción de las gonadotropinas, la prolactina y posiblemente la ACTH (Barke, 1975, 1985b). También ha sido claramente establecido que la PRL se une de una manera específica a su propio receptor. Esto se ha demostrado en varios tejidos de mamíferos, incluyendo órganos esteroideogénicos como el testículo, el ovario y la glándula adrenal; así como en el hígado y riñón (Posner y cols, 1974; Barke, 1980).

Sitios receptores específicos para PRL han sido demostrados en homogenados de testículo (Posner, et al, 1974; Aragona, 1975, 1977, y Charreau, 1977) de rata y fueron localizados en el tejido intersticial del mismo (Charreau, 1974).

En los hepatocitos se ha demostrado que la PRL, así como la hGH, pueden ejercer un efecto dual sobre los receptores a PRL; dosis supramáximas de estas hormonas reducen el número de receptores y, dosis menores inducen su formación (Barash, 1980).

En el testículo maduro de la rata, se sabe que los receptores a PRL desaparecen transitoriamente durante la fase de regulación negativa del receptor de LH inducida por las gonadotropinas, un fenómeno denominado regulación negativa heteróloga. La duración de la pérdida de receptores a PRL es mucho menor que la de los receptores a LH. Sin embargo, Huhtaniemi y cols, (1984) estudiaron el desarrollo de este fenómeno administraron una dosis alta única de hCG, a ratas de 5 a 60 días de vida, y observaron que esta hormona (hCG) causó un incremento en el número de receptores a PRL que es evidente a los dos días postratamiento, en las células del testículo del neonato; a diferencia de éstos, en los animales adultos, el número de receptores disminuyó a

menos del 50 % en el primer día.

Estos datos muestran que la población de células de Leydig en la fase perinatal, no presenta el fenómeno de regulación negativa heteróloga para PRL. No existe una explicación para este fenómeno pero se ha sugerido que la hormona unida a su receptor en el testículo neonatal podría disociarse del mismo por un mecanismo diferente al de la internalización y que el receptor podría reasumir entonces su función después de que ha liberado la hormona, mecanismo el cual no estaría presente en los adultos. De hecho se ha demostrado que la asociación y disociación de las uniones de LH al receptor en el testículo neonatal, son mucho más rápidas que en el adulto (Katikinemi y Huhtaniemi, 1980)

Por otro lado también se ha demostrado en la célula de Leydig, que la PRL potencia la acción de la LH/hCG sobre la biosíntesis y secreción de andrógenos (Barke, 1976). A este respecto y en contraposición, Pettrini y Odell, 1984; muestran que en suspensión de células de Leydig de las ratas adultas, la PRL es capaz de suprimir la producción de testosterona en respuesta tanto a la LH endógena, como la hCG; este fenómeno posiblemente es secundario a la disminución de las concentraciones testiculares de colesterol causados por la PRL.

Papadopoulos, (1986), por otro lado, muestra que las células de Leydig de rata adulta cultivadas durante 24 hs, son capaces de aromatizar testosterona (T) a estradiol (E2). Esta actividad de aromatasa aumentó significativamente por efectos de la LH/hCG y AMPc y también fué incrementada, pero de una manera menos importante por la presencia de prolactina en el medio. Sin embargo, una concentración alta de LH y PRL inhibió el efecto estimulador de la LH sobre la actividad aromatasa y los niveles de estradiol permanecieron en la misma magnitud

que los obtenidos con LH sola.

Estos resultados coinciden con los mostrados por Dalterio y cols. (1983), quienes demostraron que la respuesta testicular del ratón a la administración de hCG se redujo durante la hiperprolactinemia, en tanto que los niveles de testosterona basal fueron elevados.

Estas observaciones han llevado a la hipótesis de que la activación de LH mediada por AMFc, es también afectada por la prolactina en un nivel anterior al complejo adenilato ciclasa, provocando de esa manera más inhibición sobre la actividad aromatasa; sin embargo, el mecanismo por el que se lleva a cabo aún no ha sido dilucidado. Shchaisman, 1984., observa por otro lado, que la prolactina es capaz de inhibir la actividad de la 5 alfa reductasa y apoya la hipótesis de la existencia de un efecto inhibitorio sobre la actividad de aromatasa por la PRL.

No se ha podido encontrar en la literatura actual, reportes sobre el efecto de prolactina en el testículo de las aves.

REGULACION AUTOCRINA

La célula de Leydig produce además de las hormonas esteroideas y sus metabolitos intermedios, sustancias bioactivas entre las que podemos mencionar endorfinas, prostaglandinas y otras proteínas cuya función aún no se conoce. Estos productos, por un lado modulan la función de los demás tipos celulares del testículo, principalmente las células de Sertoli, y por otro ejercen una regulación de tipo autócrino sobre la propia célula de Leydig.

Se sabe que las células de Leydig son capaces de producir prostaglandinas (E2 y F2) y que poseen receptores para estas sustancias (Haour y cols, 1981). La secreción de prostaglandinas depende, en las células de Leydig, de los niveles de hCG, esta hormona aumenta la liberación de éstas sustancias tanto "in vivo" como "in vitro" (Haour, 1979, 1981; Mather et al, 1982c). También se ha demostrado que la presencia de las prostaglandinas modifica la respuesta a hCG y la sobrevida de las células de Leydig (Mather, 1981; Grotjan, 1978).

Por otro lado se ha sugerido que los esteroideos producidos por las propias células de Leydig podrían ejercer algún tipo de regulación autócrina, sin embargo no existen aún resultados concluyentes. En células en cultivo, la producción de testosterona estimulada por hCG disminuyó en presencia de andrógenos sintéticos y por el contrario se incrementó con la presencia de antiandrógenos (Adashi e Hsueh, 1981).

Las células intersticiales del testículo producen estradiol y además poseen receptores nucleares para esta hormona. El papel del estradiol en la función de las células intersticiales no ha sido

totalmente aclarado, sin embargo existen evidencias que sugieren una modulación de la respuesta a hCG "in vitro". Por otra parte se ha sugerido que la lesión tardía inducida por altas dosis de hCG en las enzimas microsomiales de las células de Leydig, sería causado por un aumento local de la producción de estrógenos (Cigorruga, 1980 y Nozu, 1981)

REGULACION PARACRINA. Interacción bidireccional Sertoli - Leydig.

Las alteraciones producidas en el testículo por la lesión o desaparición de las células intersticiales sugiere fuertemente la existencia de una dependencia funcional entre estas dos diferentes poblaciones celulares. Desde hace tiempo se conoce el papel que la testosterona representa sobre el funcionamiento de las células de Sertoli, así como para la espermatogénesis (Steinberger, 1971; Sanborn, 1982).

Trabajos recientes en la literatura indican que en el medio condicionado obtenido de cultivos de células de Sertoli, se encuentran sustancias que son capaces de modular el desarrollo y función de las células de Leydig. Se han reportado experimentos que sugieren que las células de Sertoli producen péptidos del tipo GnRH (Sharpe et al, 1981) que se unen a receptores específicos en las células de Leydig (Sharpe y Cooper, 1982b). Dichos péptidos y sus agonistas poseen la capacidad de

estimular la esteroidogénesis en las células de Leydig (Moger, 1987) y por otro lado de inhibir la respuesta a la LH. La presencia de éstos péptidos no se encuentra limitada al testículo, sino que se les ha encontrado también en el ovario, lo que sugeriría un papel para ellos en la fisiología de las gónadas. Sin embargo, aún no se ha encontrado una explicación clara para su presencia en éstos órganos.

H I P O T E S I S

1.- Si las células de Leydig de pollo recién nacido producen testosterona y responden adecuadamente "in vitro" a la estimulación con Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) aumentando la producción de testosterona, es posible que dichas células presenten una respuesta similar cuando se las cultiva en un modelo de células disociadas.

2.- Es posible que la función esteroideogénica de éstas células pueda ser influenciada por la presencia de suero fetal de bovino como ha sido demostrado en cultivos de células gonadales en mamíferos.

3.- Dado que la célula de Leydig del pollo recién nacido es modulada por la LH/hCG, es posible que también sea influenciada por otras hormonas de origen hipofisiario, y/o por la interacción de éstas con la Gonadotropina Coriónica.

O B J E T I V O S

1.- Desarrollar un sistema de cultivo de células de testículo de pollo recién nacido. En este sentido se definirán las mejores condiciones del medio de cultivo, que favoreciendo el desarrollo de la células no interfieran con el diseño de experimentos en el modelo (concentración adecuada de suero, eliminación completa del mismo, tipo de suero etc.)

2. Caracterizar el modelo:

- a) Midiendo la secreción de testosterona basal y estimulada con hCG, por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) en las células cultivadas durante diferentes periodos.
- b) Estudiando la cinética de producción aguda de testosterona basal y estimulada con hCG.
- c) Determinando la relación entre la dosis de hCG administrada y la respuesta secretora de las células de Leydig en experimentos agudos.

3. Estudiar el efecto de la FSH y de la prolactina sobre la esteroidogénesis testicular del pollo recién nacido:

- a) Midiendo la secreción basal de testosterona en presencia y ausencia de FSH y/o prolactina.
- b) Estudiando la cinética de producción de testosterona en las células tratadas con FSH y/o prolactina. Explorar la posible interacción de estas hormonas con la hCG.
- c) Determinando la relación entre la dosis de FSH y/o Prolactina adicionada al medio de cultivo y la respuesta secretora de las células de Leydig.
- d) Determinando la influencia de FSH y/o Prolactina sobre la producción de testosterona estimulada con hCG.

MATERIAL Y METODOS

CULTIVO PRIMARIO DE TESTICULO

En el presente trabajo se utilizaron pollos machos Rhode Island recién nacidos (1 día de edad), los cuales fueron anestesiados en una cámara de éter y posteriormente decapitados. Se disecaron ambos testículos y se pusieron en cajas de Petri conteniendo una solución salina balanceada libre de calcio y magnesio. Una vez colectados todos los testículos se llevaron a un matraz que contenía tripsina al 0.25 % (Gibco, No. 840-702) en solución salina libre de Ca^{++} y Mg^{++} y se incubaron durante 20 minutos, a 37 grados, con agitación continua de 90 ciclos por minuto y en un baño Dubnoff (Precisión GCA Corporation).

Transcurrido este tiempo, los testículos se lavaron tres veces con la solución salina libre de Ca^{++} y Mg^{++} para diluir la enzima y después se procedió a separar la capa albugínea por disección instrumental. Este paso se realizó mediante un microscopio estereoscópico (Zeiss, W.G. Mod. 075022).

Una vez que la capa albugínea fue retirada de los testículos, éstos se colocaron nuevamente en una solución enzimática con Tripsina y fueron incubados durante 15 minutos en las mismas condiciones indicadas en los párrafos anteriores. También en esta ocasión , los testículos se lavaron tres veces con la solución salina libre de Ca^{++} y Mg^{++} .

Después de retirar la solución salina libre de Ca^{++} y Mg^{++} por completo, los testículos semidisociados se colocaron en un tubo cónico con medio de cultivo para completar la disgregación en forma mecánica. El medio de cultivo básico que se utilizó fue el Eagle Modificado por

Dulbecco (DMEM, GIBCO No 430-2100, el cual contiene L-glutamina, D-glucosa, bicarbonato de sodio y piruvato de sodio) al que se le agregó 0.1 % de albúmina de bovino (Sigma) y 0.1 % de una solución de antibióticos (penicilina 10,000 U /ml y estreptomocina 10,000 mcg / ml) gentamicina a razón de 5 mcg/ml de medio. En algunos casos se agregó suero fetal de bovino (SBF) al 10% .

Con el procedimiento descrito se obtuvo una suspensión celular de la cual se tomaron alícuotas de 200 microlitros (correspondiente a aproximadamente 2 testículos por caja) se adicionaron a cajas de Petri de 35 x 10 mm, calidad cultivo de tejidos (FALCON 300 Becton Dickinson Labware), las cuales contenían 2 ml de medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco preparado en la misma forma explicada con anterioridad.

En nuestros primeros experimentos, como lo veremos más adelante, la albúmina de bovino (ASB) fue sustituida por suero de bovino fetal (1 ml de SBF por cada 100 ml de DMEM).

Las células se cultivaron a 37 grados centígrados, en una atmósfera de 5 % de CO₂, 95 % de aire y 95 % de humedad en una incubadora especial para cultivo de tejidos. (Hotpack, CO₂ Incub., Mod. 351820, Multimode control system).

Después de un tiempo predeterminado de 24 ó 48 horas de cultivo en algunos casos se guardó el medio de cultivo, y previa extracción para la determinación de testosterona; en otros casos se procedió a realizar los experimentos de estimulación aguda con hCG para estudiar la producción estimulada de testosterona. La forma en la cual se trataron los cultivos con las diferentes hormonas estudiadas será explicada para cada caso en particular en la sección de resultados.

PREPARACION DE LAS HORMONAS

Gonadotropina coriónica (hCG). Se utilizó esta hormona de origen placentario (Pregnyl 5000 UI / 5 ml) la cual fue gentilmente proporcionada por los Laboratorios Organon . La hormona se preparó agregando 5 ml agua bidestilada al liofilizado, quedando así una solución de 1000 UI / ml y se utilizó dentro de las dos semanas siguientes.

Hormona Foliculo estimulante (FSH).- Se utilizó una FSH de origen hipofisiario obtenida de bovino (Sigma. 50 UI / vial . No. F-8001) la cual se disolvió en agua bidestilada y se mantuvo en refrigeración a 5 grados C.

También se utilizó FSH de rata la cual fué proporcionada por por NIH (50 unidades de FSH/mg y menos de 0.01 unidades /mg de LH NIH) la cual posee un alto grado de pureza en relación a la contaminación con la LH. Para la preparación de esta hormona se agregó agua bidestilada al liofilizado.

Prolactina (PRL).- Se trabajó con prolactina de hipófisis de bovino (Sigma. 31 UI/mg. No. L-7135) liofilizada, la cual fué disuelta en agua bidestilada.

Técnica de extracción de Testosterona.

- 1.- Se vació el contenido de medio de cada caja en tubos cónicos para extracción conteniendo 8 ml de éter frío. Se agitó 30 seg y se conservó en refrigeración durante 24 horas.
- 2.- Se congeló con hielo seco y acetona para separar la fase

acuosa de la fase etérea.

- 3.- Se decantó todo el éter en otros tubos cónicos y se esperó a que se descongelara la fase acuosa.
- 4.- Se repitieron los pasos 2 y 3
- 5.- Se evaporó todo el éter extraído en cada tubo en baño a 35 grados C .
- 6.- Se puso cada tubo 0.5 ml de amortiguador especial para Radioinmunoanálisis (RIA).
- 7.- Se agitó 1 minuto y se congeló hasta la realización del RIA.

Técnica de Radioinmunoanálisis de Testosterona.

Se preparó un tubo control (por duplicado) de cuentas totales las cuales contenían únicamente la hormona marcada; un tubo para medir la unión inespecífica conteniendo hormona marcada y carbón activado y otro tubo correspondiente a la unión máxima (Bo) al que se le agregó hormona marcada, el anticuerpo antitestosterona y el carbón activado.

La cuantificación de testosterona se realizó por el método de separación con carbón activado. Se utilizó un anticuerpo anti-testosterona 1000 T (Radiobassay Systems Lab., Inc. # 1720) que une, además, 18.75 % de 5-alfa-dihidrotestosterona.

El anticuerpo se utilizó a una dilución final de 1:56,000 y la hormona marcada fué la 1,2,6,7,- H testosterona (Amersham, Int.) la separación de la hormona tritiada libre de la unida al anticuerpo, se realizó absorbiendo aquella con carbón activado (Merck). La

cuantificación del complejo anticuerpo-[H] testosterona se realizó contando las cpm en un contador para emisiones beta (Packard, Tri-Carb # 3255), con 30% de eficiencia, utilizando líquido de centelleo preparado en el laboratorio.

La determinación de la concentración hormonal en los medios se realizó extrapolando de una curva estandar realizada con el logaritmo de las concentraciones conocidas de los estándares (12.5 a 200 pg / tubo) versus el logaritmo y , donde y es la relación entre la unión total y la unión en presencia de la hormona fría (sin marca) y la transformación Logit es igual al $\text{Ln} (y / 100-y)$.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Luego de recoger el medio de cultivo, se lavaron las cajas dos veces con solución salina (NaCl 0.9 %) y se agregó 1 ml de solución de NaOH 0.5 N y se congelaron a -20 grados C.

Después de las 24 horas en que se les adicionó a todas las cajas el hidróxido de sodio, se procedió a levantar la monocapa de células testiculares y se cuantificaron las proteínas utilizando para ello la técnica de Lowry, (1951) .El principio de ésta técnica es en primer lugar la formación de un complejo cromogénico proteína - cobre para reducir el reactivo de Folin el cual pasa de un color amarillo dado por la presencia de fosfomolibdato ~ a un color azul por la reducción del fosfomolibdato en molibdato y fosfato. La intensidad en el color azul depende de las concentraciones de proteína presentes en cada muestra. Para hacer la derminación se prepararon los estándares con albúmina

sérica de bovino (5.0 a 25 microgramos /ml). Las lecturas de absorbancia de las muestras se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Bausch and Lomb (Espectronic 1001).

METODO ESTADISTICO

Los resultados se expresan como la media (\bar{x}) + desviación estándar (DS) de por lo menos tres experimentos diferentes. Se utilizó el análisis de varianza y la prueba "t-student" (Snedecor, 1979).

RESULTADOS

Nos propusimos encontrar un medio de cultivo para las células testiculares del pollo recién nacido en el que, por un lado, se lograra un buen crecimiento y funcionamiento celular y que por otro, no interfiriera con nuestra investigación sobre el efecto de las hormonas. El suero fetal de bovino (SBF) es ampliamente utilizado como un complemento en los medios de cultivo celulares ya que contiene hormonas y factores que favorecen el crecimiento y la función celular. Debido a esto, decidimos utilizar dos tipos de medio de cultivo, con y sin suero, los cuales denominamos : a) Medio NO DEFINIDO y b) Medio DEFINIDO, respectivamente .La composición de cada uno de ellos se puede ver en el siguiente cuadro.

Tipo de medio	Medio de cultivo	Suplemento	Antibiótico
	*		
DEFINIDO	DMEM	Albumina 0.1 %	Penicilina- Estreptomicina 1 %
	*		
NO DEFINIDO	DMEM	SBF 10 %	Penicilina- Estreptomicina 1 %

* Dulbecco Minimum Essential Medium

1.-PRODUCCION DE TESTOSTERONA EN 24 HS, EN MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO Y NO DEFINIDO, EN PRESENCIA O AUSENCIA DE hCG.

Se sembraron alícuotas de la suspensión celular de testículo en presencia del MEDIO de cultivo DEFINIDO al cual se le agregaron 2 UI de gonadotropina coriónica por mililitro de medio. Su control fue incubado en el mismo medio pero sin la presencia de la hCG. Ambos cultivos se incubaron durante 24 h. Otro grupo de cajas fueron incubadas también durante 24 horas en un MEDIO NO DEFINIDO (con SBF) en presencia ó ausencia de hCG.

Transcurrido este periodo se realizó la determinación de Testosterona contenida en el medio y se cuantificaron las proteínas de cada caja.

No se encontraron diferencias significativas en la producción basal de testosterona cuando se usó medio definido y no definido (Fig. 1).

Ambos grupos respondieron a la presencia de gonadotropina coriónica en el medio de cultivo aumentando la producción de testosterona la que fué significativamente diferente a sus propios controles. Además se observó una mayor respuesta a la hCG en el grupo que fué cultivado en el MEDIO DEFINIDO (que incrementó la producción de testosterona en un 80%) cuando se comparó con el grupo en donde se utilizó el MEDIO NO DEFINIDO (el incremento solo alcanzó el 52 %) (** $P < 0.01$) (Fig. 1).

Por otro lado, la cuantificación de las proteínas permitió saber que la presencia del SBF en el medio de cultivo aumenta el contenido de proteínas por caja con respecto al grupo control cultivado sin suero.

Este incremento de las proteínas se observó, tanto en el grupo cultivado con hCG y SBF como en el que recibió solo SBF. La presencia de hCG no modificó el contenido de proteínas de las cajas.

(Fig. 2) ni en el grupo cultivado en presencia de suero ni en el control cultivado con medio definido.

Estos resultados indican que el mayor crecimiento producido por la presencia del SBF en el medio de cultivo durante 24 horas, no se correlaciona con el aumento en la producción de testosterona basal ó estimulada.

2.-CURVA DOSIS RESPUESTA A LA hCG EN CELULAS DE LEYDIG CULTIVADAS EN UN MEDIO "DEFINIDO"

Las células de Leydig fueron cultivadas por 24 horas en un medio carente de SBF, el cual fué sustituido por albúmina. Después de este tiempo, se lavaron las cajas y el medio fué cambiado por otro el cual contenía la gonadotropina coriónica a diferentes dosis (0.5, 1, 2, 4, 8, UI/ml) y se incubaron las células durante tres horas adicionales.

Los resultados se encuentran graficados en la figura 3, en donde se observa la respuesta de estas células a la hCG, evaluada por la liberación de testosterona al medio de cultivo. La producción aumenta a partir de la dosis de 0.5 UI/ml, hasta llegar a un pico de producción de testosterona con 2UI/ml. La respuesta a dosis mayores (4 y 8 UI) prácticamente no difiere de la de 2UI (Fig. 3).

Cuando estos valores de producción de testosterona fueron expresados tomando en cuenta las proteínas de cada caja se observó que el comportamiento de la curva es muy similar (Fig. 3, inserto).

3.-CURVA DOSIS RESPUESTA A LA hCG EN CELULAS DE LEYDIG CULTIVADAS EN MEDIO "NO DEFINIDO".

En la Figura 4 se muestra la producción de testosterona por las células de Leydig las cuales fueron cultivadas 24 horas en un medio que contenía SBF en sustitución de la albúmina utilizada en el experimento anterior. Después de este tiempo las células se estimularon, previo lavado de las cajas con DMEM, con hCG a diferentes dosis (0.5, 1, 2, 4, 8, UI). Se determinó luego la concentración de testosterona en el medio; el tiempo de incubación fué el mismo que se utilizó en el protocolo anterior.

El comportamiento de las células ante dosis de 1 y 2 UI/ml fué muy similar al que se encontró cuando se cultivaron en ausencia de SBF; el pico de máxima estimulación se presentó cuando se utilizó la dosis de 2 UI de hCG (Fig. 4). Sin embargo, en éstos cultivos la respuesta a la hormona decayó a dosis mayores. Este mismo comportamiento se observó cuando se hizo la corrección por proteínas como lo podemos ver en la gráfica 4, inserto.

4.- PRODUCCION DE TESTOSTERONA (2hs) EN CELULAS PREVIAMENTE CULTIVADAS EN MEDIO CON Y SIN SUERO, EN PRESENCIA O AUSENCIA DE hCG.

a) Medio DEFINIDO.

Después de la disgregación celular, se tomaron alícuotas de la suspensión celular y se cultivaron durante 24 hs en medio DEFINIDO, es decir, sin SBF, pero ahora en presencia ó ausencia de gonadotropina coriónica (2 UI/ ml). Después de este periodo se desechó el medio de cultivo y las células se lavaron con DMEM y se agregaron diferentes medios de incubación de acuerdo al siguiente protocolo:

MEDIO DE CULTIVO (24 H)	ESTIMULACION AGUDA (2 H)
	- hCG
DMEM + Albúmina	
	+ hCG
	- hCG
DMEM + ALB. + hCG	
	+ hCG

Después de la estimulación de 2 hs con hCG se midió la concentración de testosterona en el medio. En la figura 5 podemos observar que el grupo que fue cultivado en ausencia de hCG, responde con un ligero incremento ($P < 0.05$) a una subsiguiente estimulación aguda con la misma, cuando lo comparamos con su control no estimulado. Asimismo se observa que la presencia previa de la hCG en el medio de cultivo favoreció la respuesta a un nuevo estímulo agudo con la misma hormona ya que ahora se observa un aumento más importante (30 %) de la secreción de testosterona con respecto al control basal.

Estos resultados indican que es la presencia de la hCG en el medio de cultivo , mejora la capacidad de respuesta de las células del testículo a un nuevo estímulo con la hormona.

b) Medio NO DEFINIDO

En este caso se siguió el mismo protocolo del inciso anterior, solo que ahora se utilizó un medio de cultivo suplementado con 10 % de SBF (Medio NO DEFINIDO) como se señala a continuación.

MEDIO DE CULTIVO (24 H)	ESTIMULACION AGUDA (2 H)
DMEM + SBF	- hCG
	+ hCG
DMEM + SBF + hCG	- hCG
	+ hCG

Con este protocolo observamos que la presencia de SBF por 24 horas en el medio de cultivo mantuvo la capacidad de respuesta de estas células, incrementandose la producción de testosterona en un 91% en respuesta al estímulo con gonadotropina coriónica (Fig.6) ($P < 0.001$). Sin embargo, cuando las células fueron cultivadas con SBF y además hCG, perdieron la capacidad de responder a una nueva estimulación con hCG.

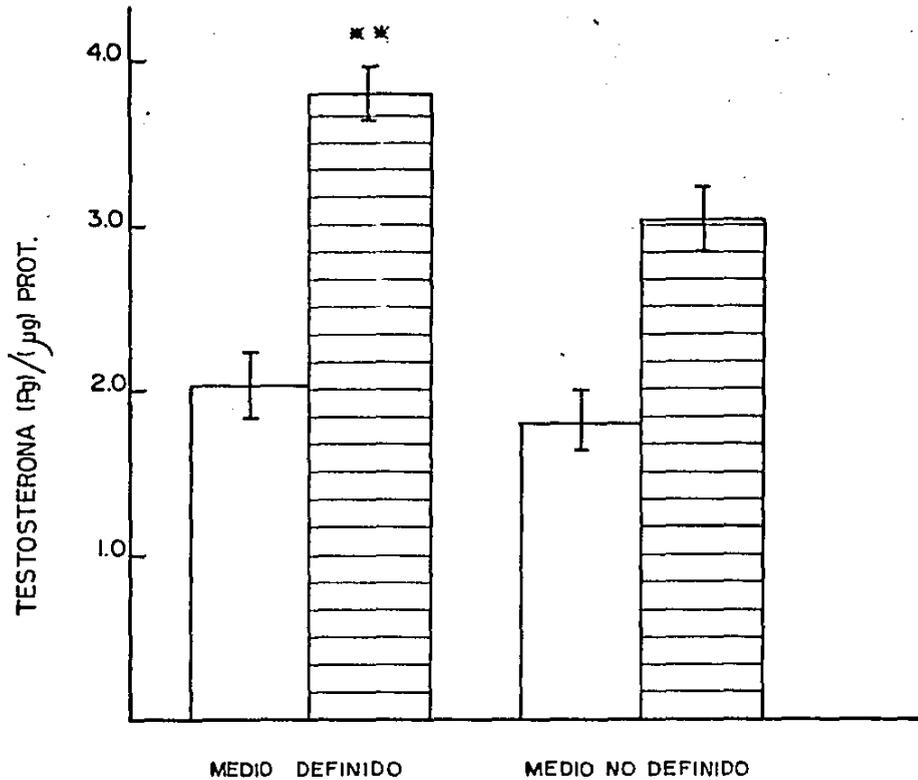


Fig.1 Producción acumulada de testosterona por células cultivadas durante 24 h en presencia (medio no definido) ó ausencia (medio definido). En ambos casos un grupo de cajas recibió además hCG  y otro solamente los medios referidos . Los datos están expresados en pg/mcg de proteína y corresponde a la $\bar{x} \pm DS$ (medio definido vs medio no definido).

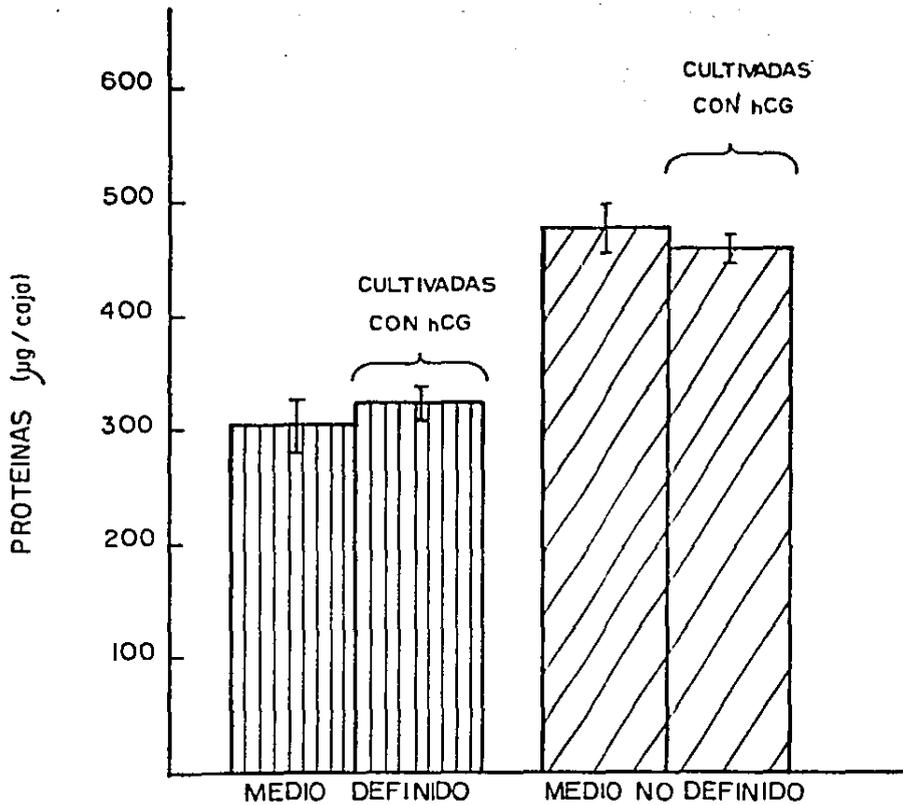


Fig.2 Contenido de proteínas en los cultivos. Se midió el contenido total de proteínas de las células cultivadas en presencia  ó ausencia  de SBF al 10 %. Algunos cultivos recibieron hCG en el medio (2UI/ml). La cantidad de proteína presente se expresa en mcg/caja. ($\bar{x} \pm DS$).

Fig.3 Curva dosis-respuesta a hCG en las células cultivadas en medio definido. Las células fueron cultivadas en DMEM sin SBF durante 24 h y posteriormente estimuladas con dosis diferentes de hCG (●) durante 3 hs. El control no recibió hCG (○). La producción de testosterona se expresa en pg de test/ ml de medio. Inserto: Producción de testosterona expresada en mcg de proteína. Los datos expresan la $\bar{x} \pm DS$.

TESTOSTERONA Pg/ μ g Prot.

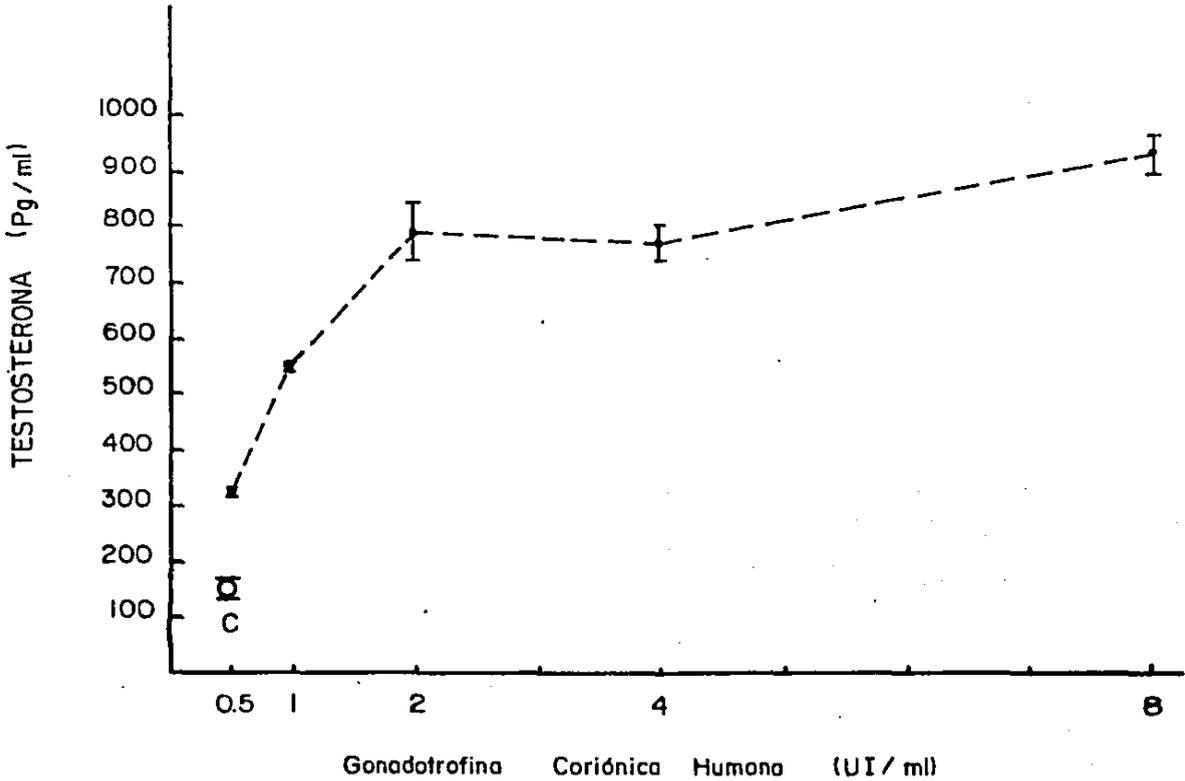
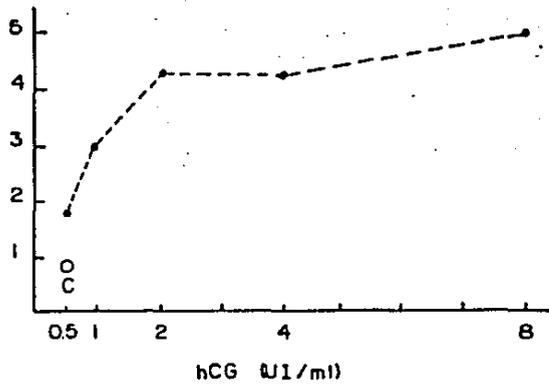
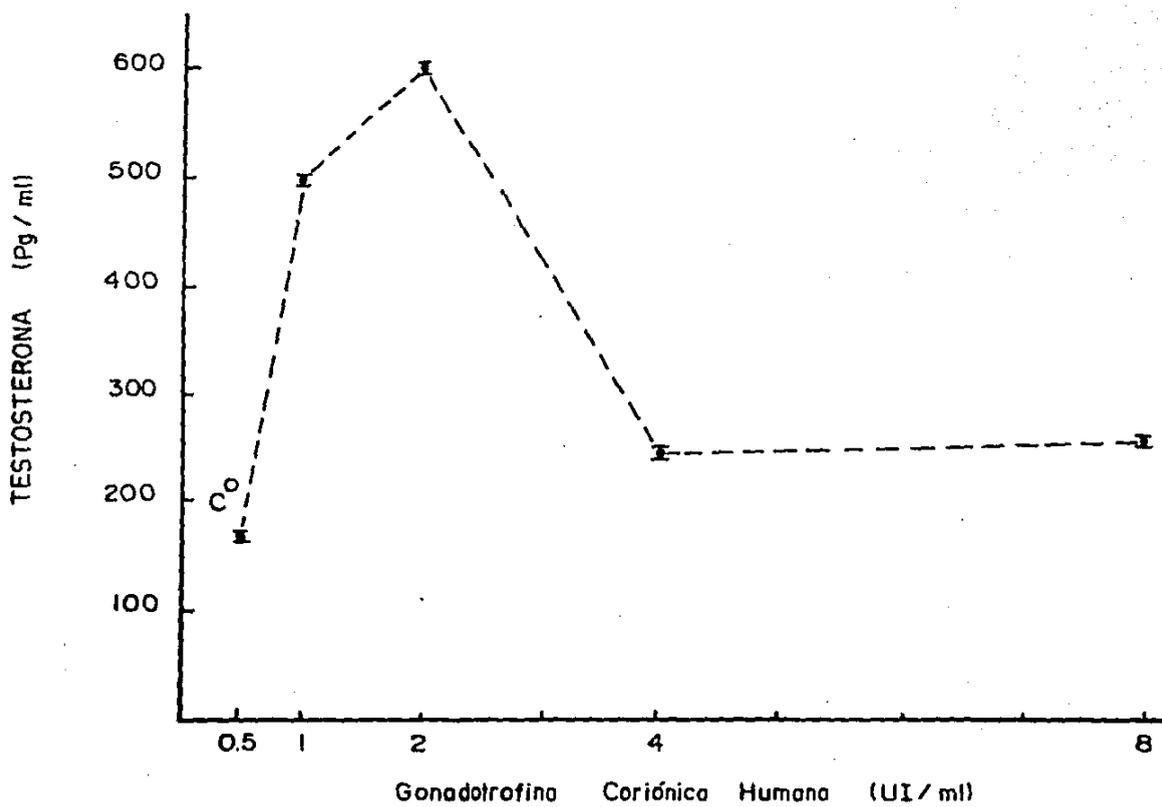
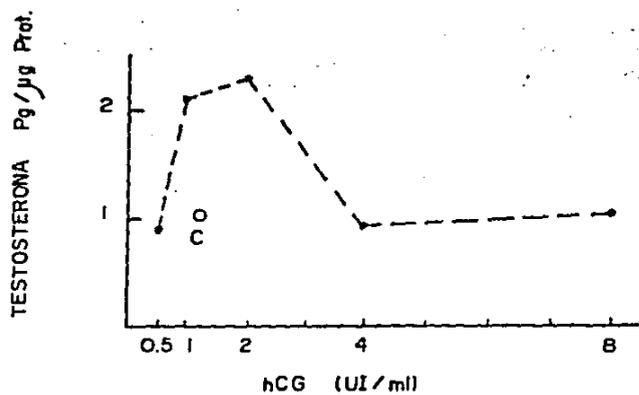


Fig.4 Curva dosis-respuesta a hCG en células cultivadas en medio no definido (con SBF). Las células fueron cultivadas en DMEM + SBF durante 24 h y posteriormente estimuladas con dosis diferentes de hCG (●) durante 3 hs. El control no recibió hCG (○). La producción de testosterona se expresa en pg de test/ml de medio. Inserto: Producción de testosterona por mcg de proteína. Los datos señalan la media \pm DS.



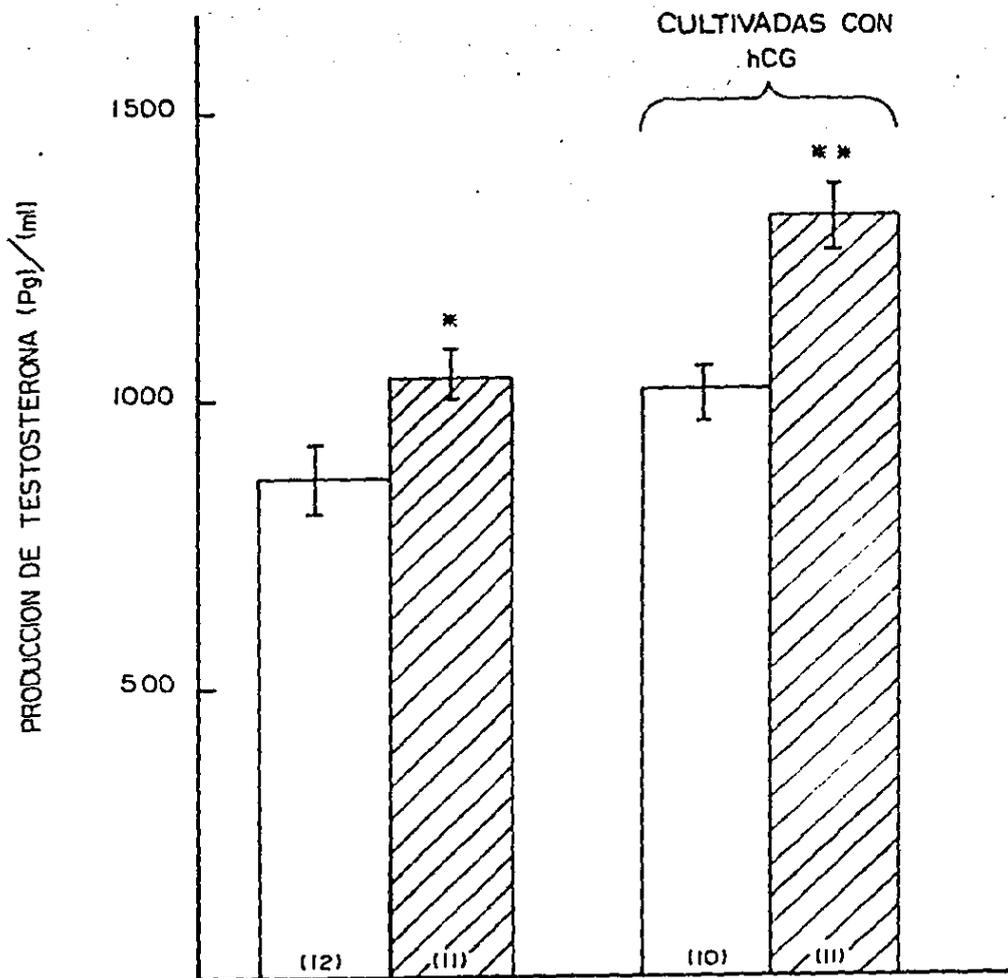


Fig.5 Efecto de la presencia de hCG durante el cultivo de 24 h en células mantenidas en medio definido. Luego de este período se desechó el medio y se reemplazó por DMEM (producción basal de testosterona ) ó bien DMEM + hCG 2UI/ml (producción estimulada de testosterona ) Al cabo de 2 h se midió la testosterona liberada en el medio. Los datos expresan la media \pm DS. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

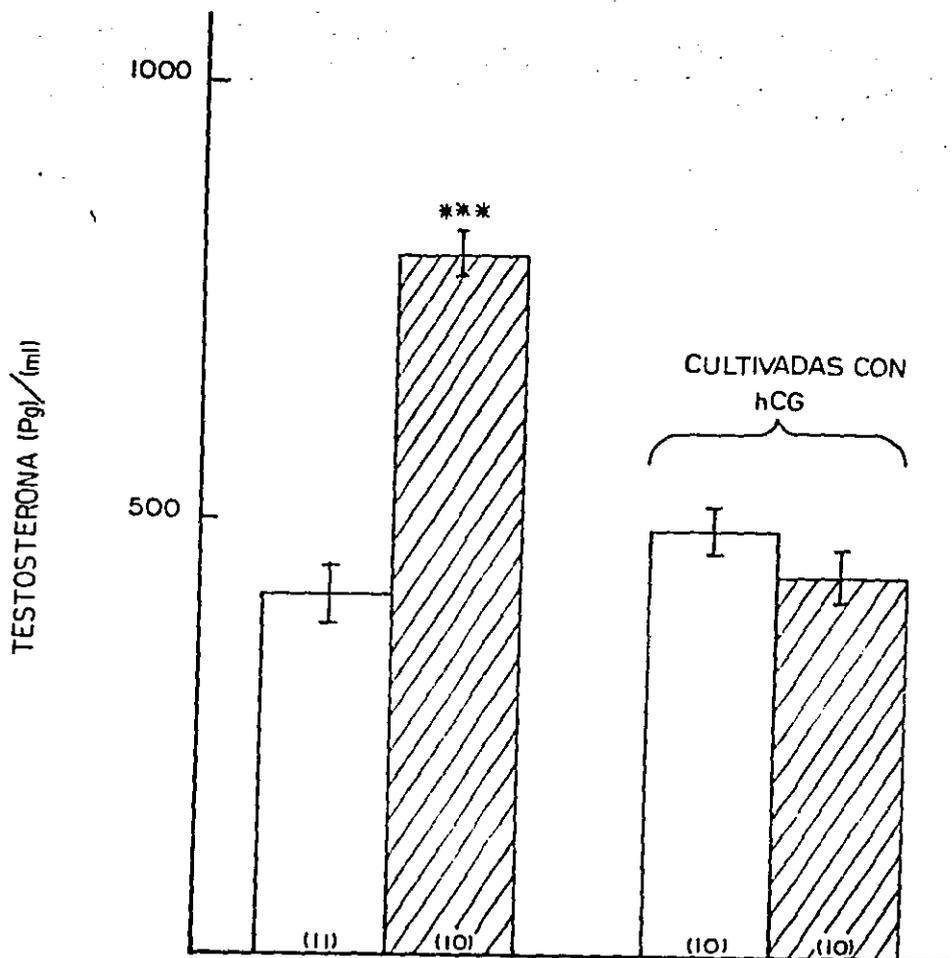


Fig.6 Efecto de la presencia de hCG durante el cultivo de 24 h en células mantenidas en medio no definido. Luego de este período se desechó el medio y se reemplazó por DMEM (producción basal de testosterona □) ó bien DMEM + hCG 2UI/ml (producción estimulada de testosterona ▨). Al cabo de 2 h se midió la testosterona liberada en el medio. Los datos expresan la media \pm DS. (***) $P < 0.001$ producción basal vs estimulada con hCG).

HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE

En esta sección se presentan los resultados encontrados en el laboratorio, sobre el efecto de la FSH sobre la esteroidogénesis testicular en cultivo. Como se mencionó en la sección de material y métodos, se utilizaron dos tipos de FSH: una de origen bovino (Sigma) y otra de rata (NIH). A esta última la llamaremos hormona pura.

A. Efecto de FSH (Sigma).

i. Curva dosis - respuesta a FSH (Sigma)

Células que habían estado 48 horas en un medio definido se expusieron por 6 horas a diferentes dosis (5 - 5000 ng/ml) de FSH. Posteriormente se determinó la cantidad de testosterona secretada por las mismas al medio de incubación durante ese período.

Nuestros resultados indican que la FSH estimuló la producción de testosterona en los cultivos, siendo su respuesta dependiente de la dosis administrada. Dicho efecto fué evidente desde los 5ng/ml de FSH, alcanzándose un pico máximo de producción hacia los 100 ng/ml; dosis mayores no produjeron aumento adicional de la producción de testosterona (Fig. 7).

Para descartar la posibilidad de que la respuesta observada anteriormente se pudiera deber a un aumento en la cantidad de células en

el cultivo se realizó la corrección de estos valores por la cantidad de proteínas por caja. Se observó que la curva no se modificó (Fig. 8) lo que nos indica que el aumento en la producción de testosterona en nuestros cultivos dependió fundamentalmente de un aumento de la capacidad esteroideogénica de las células, ya que no se observaron diferencias en la cantidad de proteínas que contenían las cajas de los grupos tratados y no tratados con FSH.

ii. Curva temporal para FSH (Sigma)

Una vez conocida la dosis estimuladora máxima en nuestros cultivos, se realizó un estudio donde se evaluó la importancia del tiempo en la respuesta a FSH.

Para esto, se utilizaron también cultivos de 48 hs los cuales fueron mantenidos en medio DEFINIDO. Posteriormente a algunas cajas se les agregó una dosis de 100 ng / ml de FSH (otras no recibieron la hormona ,controles). Las células se incubaron en estas condiciones por periodos de 30 minutos hasta 24 horas.

En los diferentes tiempos de incubación se midió la testosterona liberada al medio por RIA. En la Figura 9 se muestran los resultados, encontrándose primeramente que los grupos que no fueron tratados con la hormona, mantuvieron una producción de testosterona mas o menos constante. Por el contrario los grupos que si recibieron FSH respondieron aumentando significativamente la producción de testosterona, en relación directa con el tiempo de permanencia de la

hormona en el medio de incubación. La respuesta a FSH se hace significativa a partir de las 2 horas de incubación y va aumentando en forma gradual hasta las 8 horas. Los niveles de testosterona en presencia de FSH todavía continúan aumentando a las 24 hs de tratamiento.

Por otro lado quisimos investigar si esta hormona era capaz de modificar la respuesta de nuestros cultivos a la estimulación con hCG. Para esto tomamos cultivos también de 48 horas mantenidos en medio DEFINIDO, a los cuales se les cambió dicho medio por otro que contenía además FSH a diferentes dosis (5 - 5000 ng/ml) y se incubaron en el mismo durante 6 horas. Después de transcurrido este tiempo, se lavaron las cajas y se les adicionó nuevamente medio pero ahora conteniendo únicamente DMEM + 2UI de hCG/ ml y se incubaron las células por 2 hs más. Después de éste período se determinó la concentración de testosterona en el medio.

En la figura 10 podemos observar que , la presencia de FSH en el medio de cultivo durante 6 h favoreció la respuesta de las células a la estimulación con la gonadotropina coriónica. Este efecto se hizo más significativo cuando se utilizó la dosis menor de FSH (5 ng/ml).

B. Efecto de FSH de NIH

i. Curva dosis respuesta FSH-NIH

Como en el caso de la FSH Sigma se agregó FSH pura a

diferentes dosis (5 - 500 ng/ml) a las células de testículos que habían sido cultivadas también en medio DEFINIDO durante 48 horas; después de este periodo recibieron el tratamiento por 6 horas con la hormona pura.

En la figura 11 se muestra el efecto de FSH pura sobre los cultivos. Se observó que la hormona pura, al igual que la utilizada en los experimentos anteriores, fue capaz de estimular la esteroidogénesis en el cultivo, siendo esta respuesta también dependiente de la dosis administrada. Sin embargo, en este caso, se observó un efecto significativo hasta los 100 ng de FSH-NIH/ml. Dosis menores a los 100 ng/ml, no aumentaron la producción de testosterona, cuyos valores fueron muy similares a los encontrados para los controles que no fueron expuestos a la hormona.

ii. Curva temporal para FSH-NIH

Después de 48 hs de cultivo en un medio DEFINIDO, éste fue retirado y cambiado por otro conteniendo DMEM + FSH-NIH (100 ng/ml) ó solo DMEM. Las células se incubaron en éste medio durante diferentes tiempos, al cabo de los cuales se tomó el medio para determinar testosterona.

Se encontró que la FSH pura fue capaz de estimular la esteroidogénesis en nuestros cultivos a partir de los 30 minutos, lo que se reflejó en un aumento significativo en la producción de testosterona. La producción basal de testosterona de los controles que no estuvieron

en contacto con la hormona ascendió conforme al tiempo de incubación, sin embargo la diferencia entre éstos grupos y los que recibieron FSH fué altamente significativa.

Por último al medir la cantidad de proteína presente en cada caja no se observaron diferencias entre los células tratadas con FSH y las no tratadas. Cuando se expresaron los valores de testosterona liberados al medio por la cantidad de proteínas, el comportamiento de la curva temporal no varió, lo que nos indica que el aumento en la producción de testosterona observado en presencia de FSH no se debió a un efecto trófico de la hormona (Fig. 12).

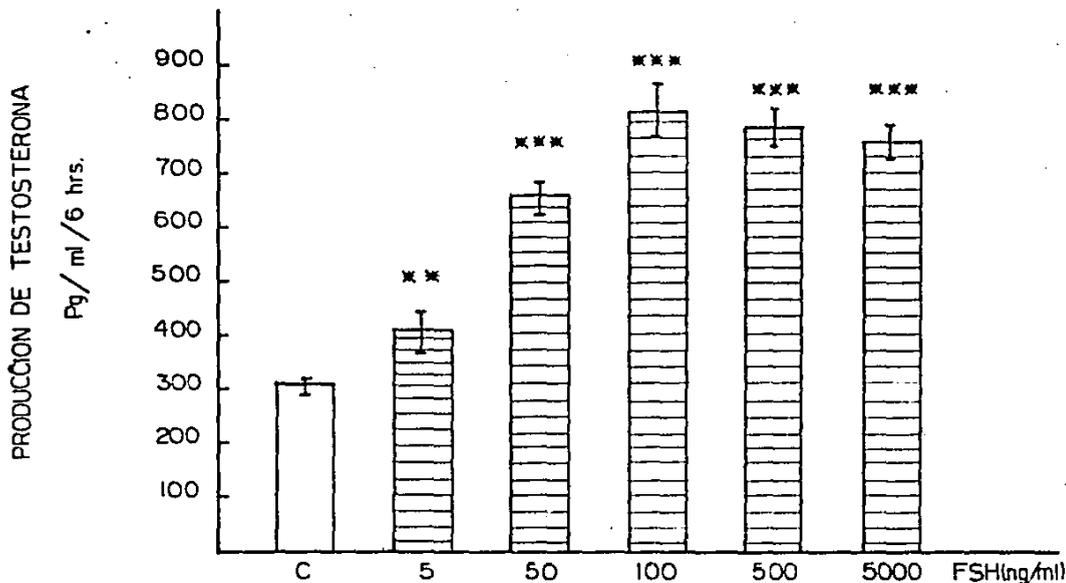


Fig.7 Curva dosis-respuesta a FSH-Sigma. Las células fueron cultivadas 48 h en un medio definido. Posteriormente las células se trataron durante 6 h con FSH-Sigma a diferentes dosis (5-5000 ng/ml) . Control sin FSH . La producción de testosterona se expresa en pg/caja y se expresan como la media \pm DS. (**P<0.01 ; ***P<0.001 FSH vs Control)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

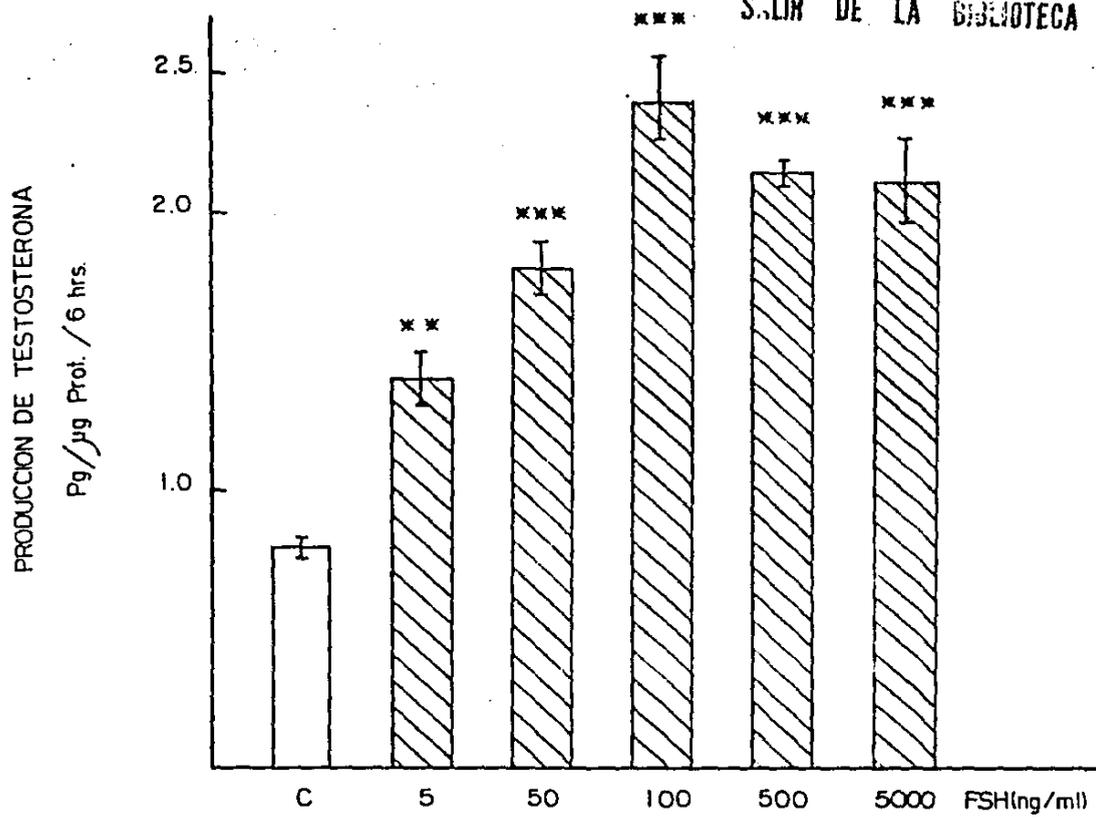
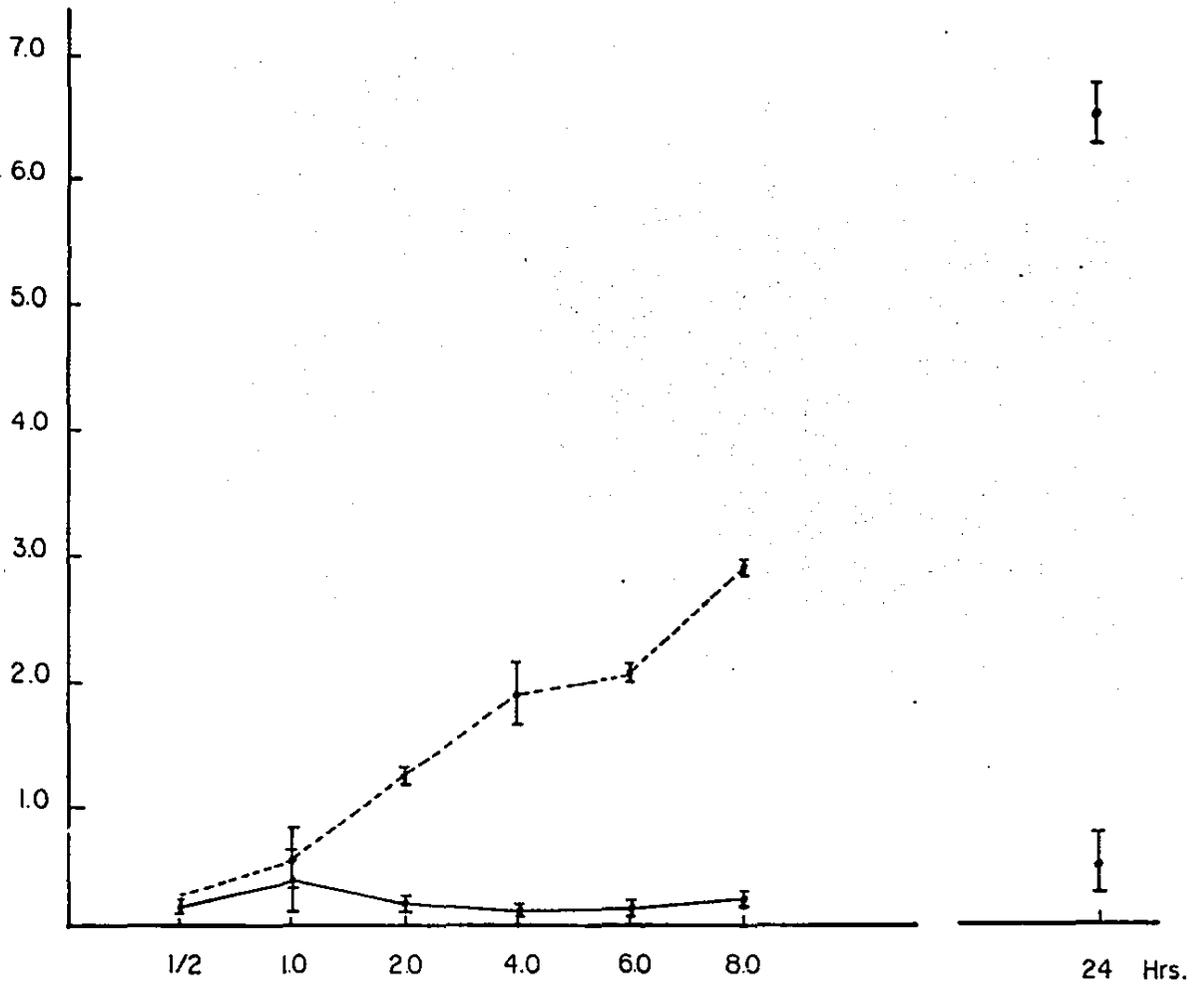


Fig.B Curva dosis-respuesta a FSH-Sigma. Corresponde al mismo tratamiento de la figura anterior (7), sólo que en este caso la producción de testosterona está expresada en pg de testosterona por microgramo de proteína celular. (**P<0.05 ; ***P<0.001, cuando se comparó con el control).

Fig.9 Cinética para FSH-Sigma. Se utilizaron cultivos de 48 h mantenidos en un medio definido. Posteriormente fueron tratados durante diferentes tiempos con FSH (100 ng/ml). Se determinó la concentración de testosterona liberada al medio de incubación (---) FSH , (—)DMEM. Los datos se expresan en pg de testosterona por microgramo de proteína y se grafican como $\bar{x} \pm DS$.

PRODUCCION DE TESTOSTERONA

Pg / μ g Prot.



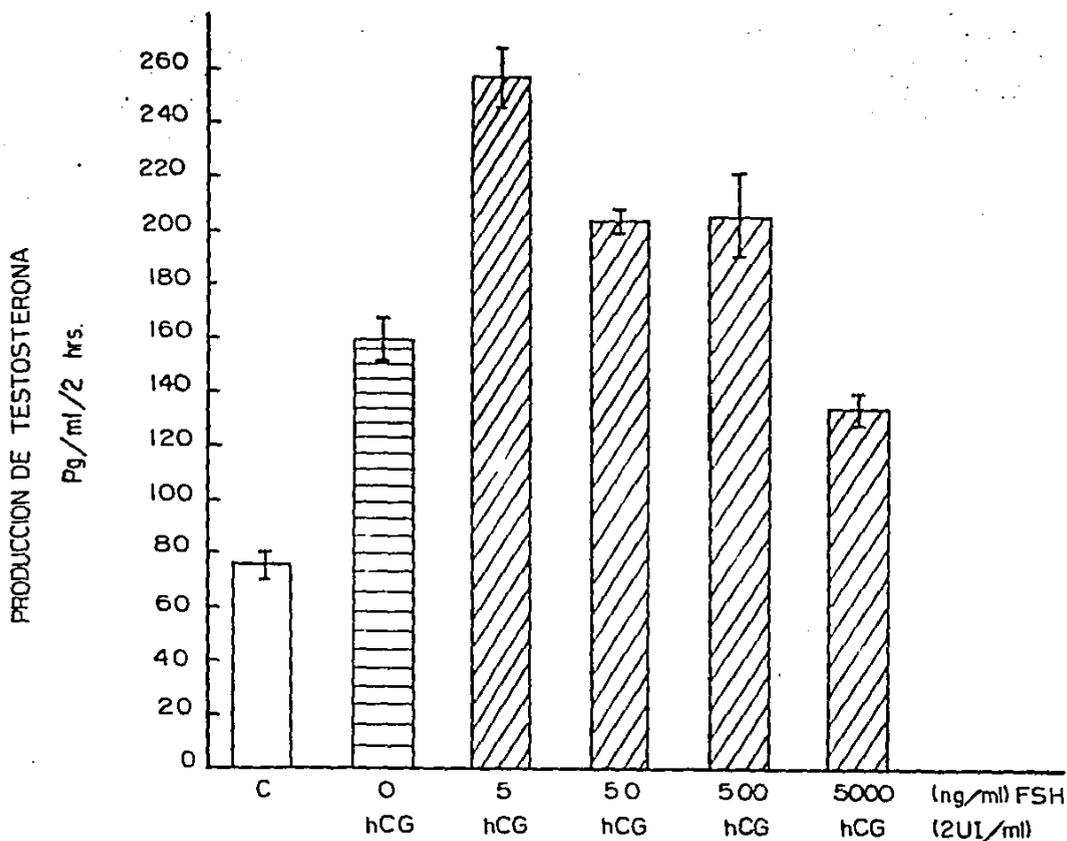


Fig.10 Efecto de la FSH-Sigma sobre la producción de testosterona estimulada con hCG. Las células fueron tratadas por 6 h en presencia de FSH a diferentes dosis  o sin FSH . Posteriormente se incubaron por 2 h con hCG (2UI/ml). La barra blanca indica la producción de testosterona en células que no recibieron hormonas en ningún momento. Los resultados se expresan en pg/caja/6 h. Los datos representan la media \pm DS.

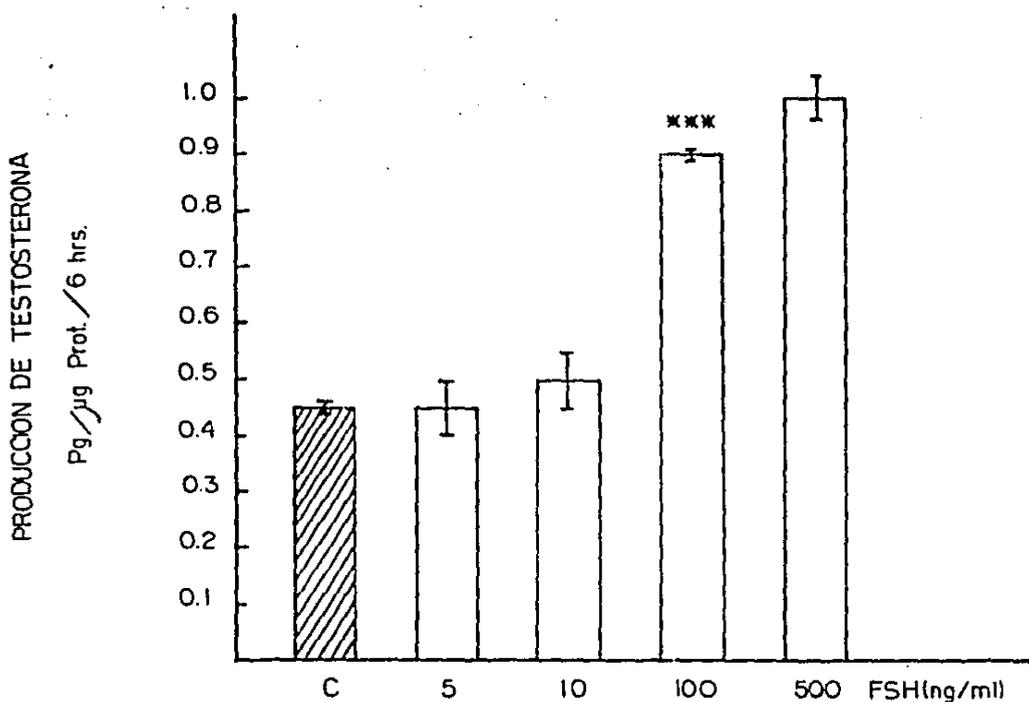


Fig.11 Curva dosis-respuesta a FSH-NIH. Se utilizaron cultivos de 48 hs incubados en un medio definido. Las monocapas fueron posteriormente tratadas con FSH a diferentes dosis (5-500 ng/ml) durante 6 h □. Los datos se expresan en \pm DS. (***) $P < 0.001$ cuando se comparó con el control que no fue tratada con FSH). ▨

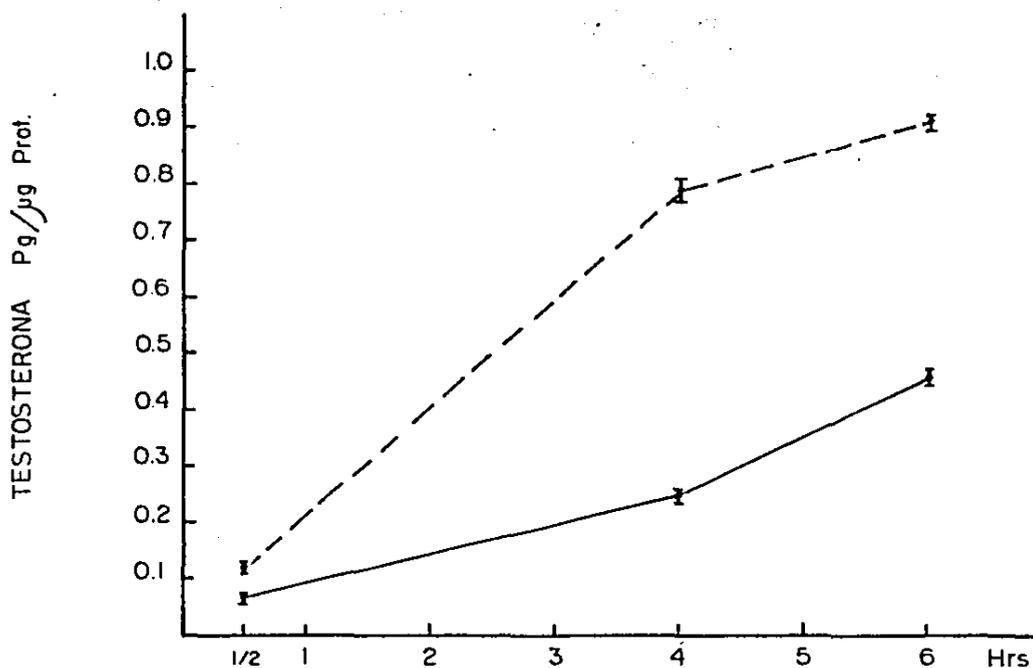


Fig.12 Cinética para FSH-NIH. Se utilizaron cultivos de 48 h cultivados en un medio definido. Posteriormente fueron tratados con 100 ng/ml de FSH. Se tomó el medio a diferentes tiempos y se midió la concentración de testosterona . (---) FSH , (—) Control

PROLACTINA

Todos los experimentos para investigar el efecto de la prolactina sobre la producción de testosterona por las células de testículo de pollo recién nacido fueron realizados en cultivos de 48 horas que habían sido mantenidos en MEDIO DEFINIDO ó bien en este medio adicionando únicamente prolactina ó bien hCG. Las dosis de hormonas utilizadas fueron de 200 ng/ml para la prolactina y de 2 UI/ml para la hCG.

a) Efecto de la prolactina sobre la producción basal de testosterona.

Después de 48 horas de cultivo en presencia de PRL ó hCG ó medio definido sin hormonas, se cambió el medio por otro que contenía DMEM + ASB 0.1 %; y las células se incubaron por seis horas. Al cabo de éste tiempo se recogió el medio de incubación para la determinación de testosterona. Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 13.

Se observó que la presencia de prolactina durante el cultivo no modificó la producción basal de testosterona y por el contrario, la presencia de hCG si la modifica en forma significativa (** $P < 0.01$) con respecto al control que se incubó en medio DMEM + albúmina (medio definido) sin hormonas.

b) Interacción prolactina/hCG.

Los experimentos que se realizaron siguieron el siguiente protocolo de trabajo:

MEDIO DE CULTIVO (48 H)	MEDIO DE INCUBACION (6 H)
DMEM sólo	DMEM sólo
DMEM sólo	DMEM + hCG
DMEM + hCG	DMEM + hCG
DMEM + PRL	DMEM + hCG
DMEM + PRL + hCG	DMEM + hCG

Las dosis de hormonas utilizadas fueron de 200 ng/ml para la PRL y de 2UI/ml para la hCG. La determinación de testosterona del medio se realizó después de las 6 horas de incubación. Con este protocolo pudimos observar lo siguiente (Fig 14) :

- 1).- El cultivo en presencia de prolactina mantiene la capacidad de respuesta de las células a la posterior estimulación con hCG, en forma similar a lo que se observó cuando la hCG se encontraba enriqueciendo el medio de cultivo. Ambos grupos difieren significativamente del grupo control que no fue cultivado en presencia de hCG ni de PRL, pero que si fue estimulado posteriormente con hCG (* $P < 0.05$)
- 2).- La presencia de la hCG y la prolactina juntas en el medio

de cultivo produjo un efecto sinergista ya que se mejoró significativamente la respuesta de las células a una posterior estimulación con hCG.

Para investigar si este el efecto de la prolactina sobre la respuesta a hCG es dependiente de la dosis de prolactina, se realizaron curvas dosis - respuesta. Encontramos que a dosis bajas, menores de 200 ng/ml esta hormona no modifica la respuesta a hCG. Por este motivo decidimos utilizar las dosis de 200 hasta 1600 ng/ml para el siguiente protocolo:

CULTIVO	(48 HS)	INCUBACION (6 HS)
DMEM sólo		DMEM + hCG
DMEM + PRL	200*	DMEM + hCG
DMEM + PRL	400*	DMEM + hCG
DMEM + PRL	800*	DMEM + hCG
DMEM + PRL	1600*	DMEM + hCG

* ng/ml

En la figura 15 se muestra el efecto de la presencia de PRL en el cultivo sobre la liberación de testosterona inducida por la hCG. Podemos observar que la prolactina únicamente modificó la respuesta cuando es utilizada a la dosis de 200 ng/ml y 400 ng/ml. Dosis mayores tienden a inhibir la respuesta de las células ante el estímulo con hCG.

Por último, siguiendo un protocolo similar al anterior, se cultivaron las células durante 48 horas en presencia de prolactina a

diferentes dosis y una concentración baja de hCG de 2UI/ml. Se observó que la presencia de ambas hormonas mejoró la respuesta a un estímulo posterior con hCG solo cuando la dosis de prolactina fué de 200 ng/ml. Dosis mayores de prolactina inhibieron la respuesta a hCG (Fig.16)

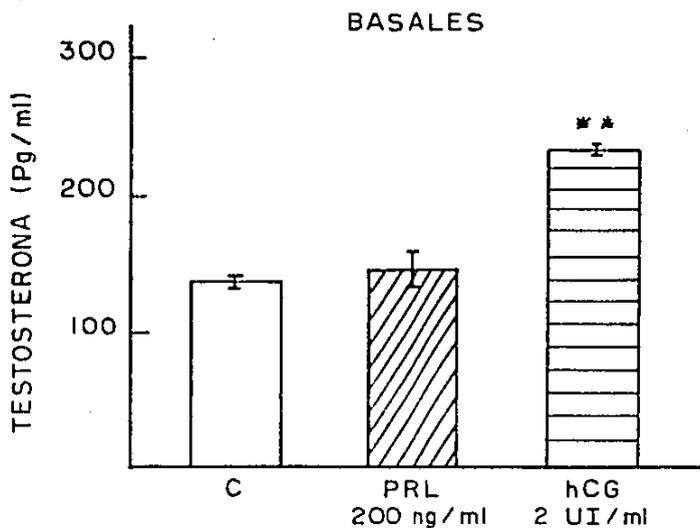


Fig.13 Efecto de la presencia de prolactina en el medio de cultivo. Las células se cultivaron 48 h con prolactina (200 ng/ml) ó hCG (2UI/ml) ó DMEM. Se cambió el medio y las células se incubaron 6 h en DMEM + ASB. Al cabo de este tiempo se recogió el medio y se midió la testosterona liberada. (**P<0.01 cuando se comparó hCG vs control sin hormonas).

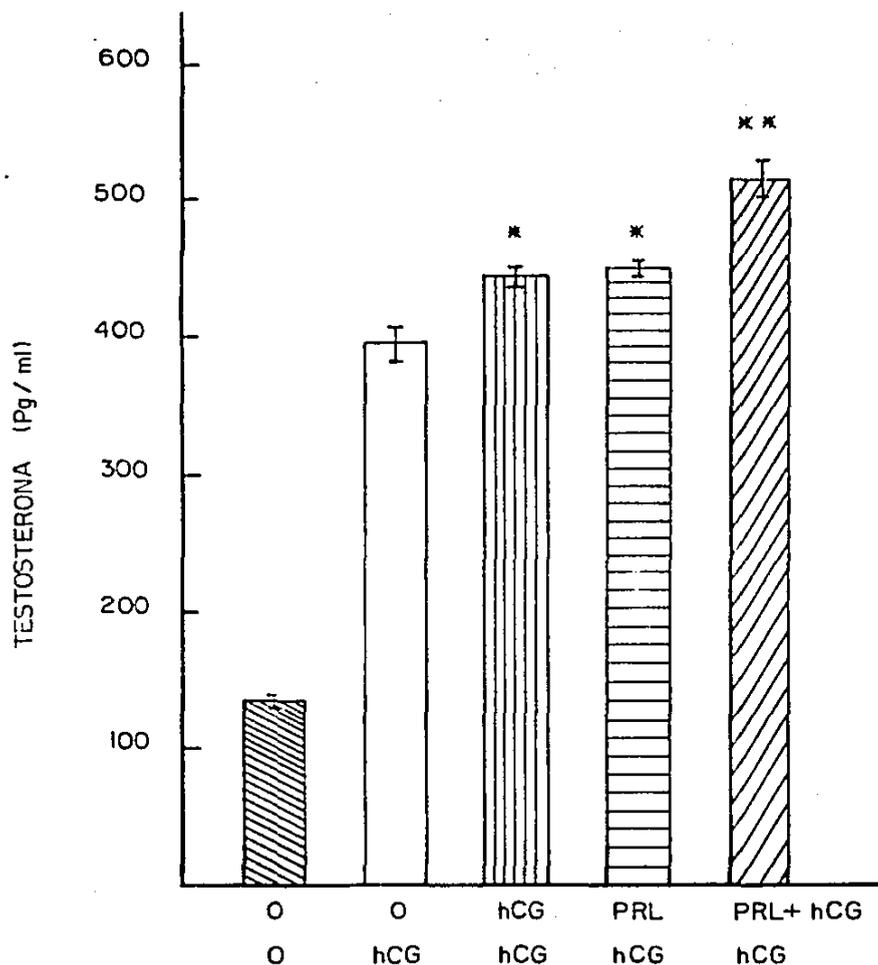


Fig. 14 Efectos comparativos de la presencia de prolactina, hCG ó ambas en el medio de cultivo sobre la respuesta de las células a la hCG. Se utilizaron células de 48 hs, cultivadas en DMEM + ABS / hCG PRL ó PRL+hCG. Posteriormente el medio fué cambiado por otro conteniendo hCG (2UI/ml). Los datos expresan la media \pm DS. (*P<0.05; **P<0.01)

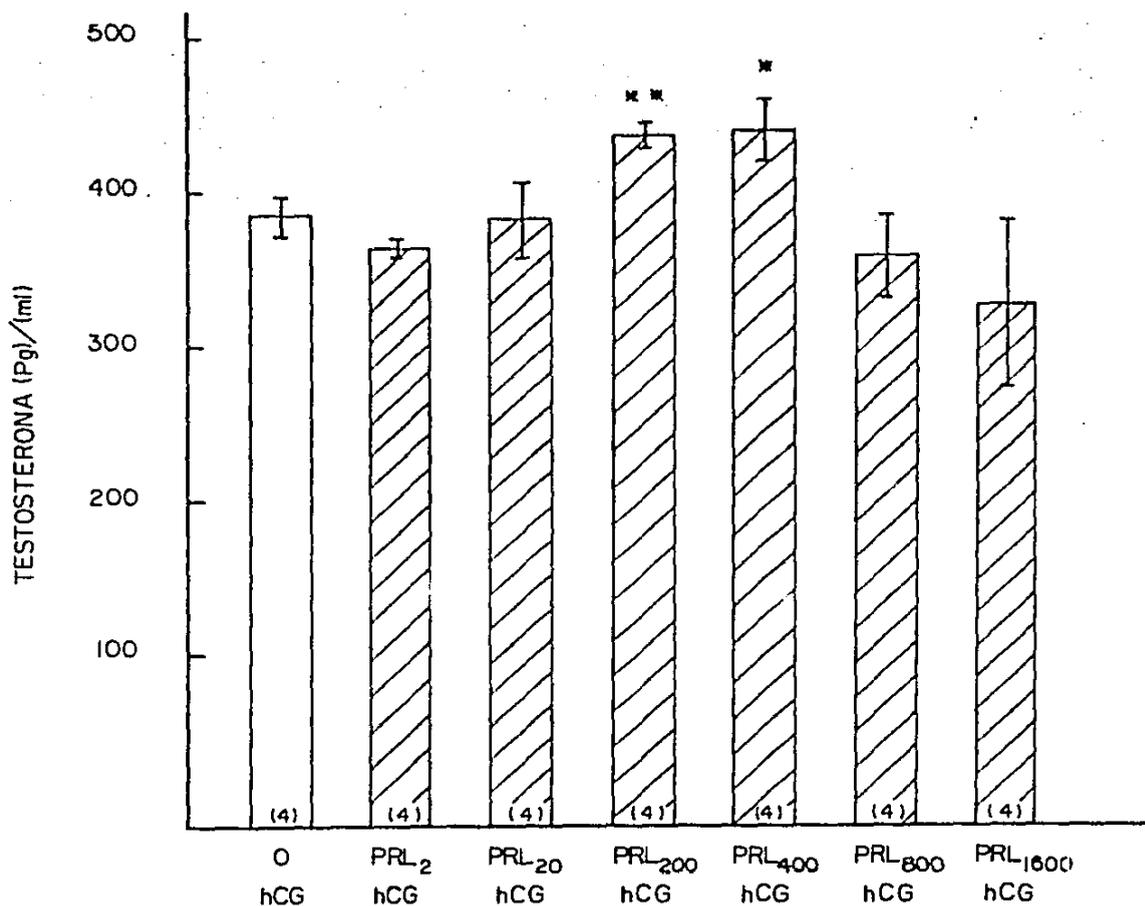


Fig.15 Producción estimulada con hCG de testosterona en células cultivadas previamente durante 48 hs con diferentes dosis de prolactina (200-1600 ng/ml) . El control se cultivó sin PRL en el medio. Los datos representan el $\bar{x} \pm DS$ * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. Ambos grupos fueron comparados con el control.

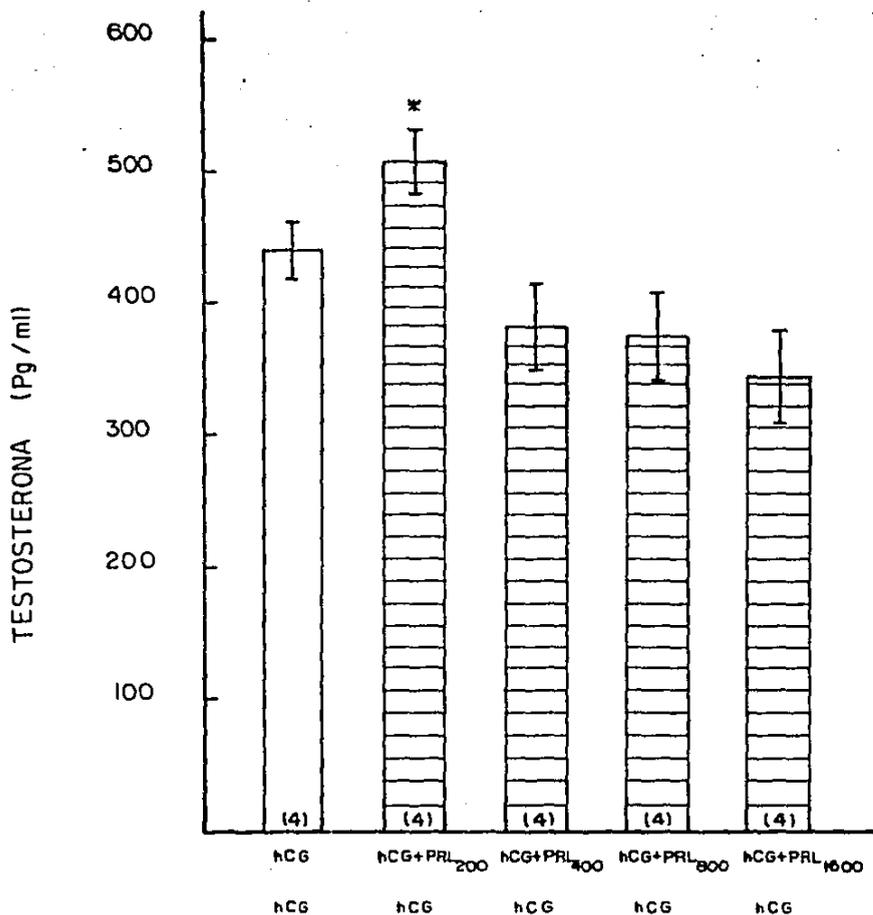


Fig.16 Producción estimulada con hCG de testosterona en células cultivadas previamente durante 48 hs con diferentes dosis de Prolactina y una dosis fija de hCG (2UI/ml)  ó con hCG sola. posteriormente todos los grupos recibieron una dosis única de hCG (2UI/ml). Los datos representan la media ± DS. (*P<0.05).

DISCUSION

En nuestro laboratorio nos interesamos en estudiar la función y los mecanismos regulatorios de la esteroidogénesis en las células de Leydig de pollo en la etapa posnatal, en especial en el primer día después del nacimiento. Existe muy poca información en la literatura sobre este periodo del desarrollo testicular que consideramos importante porque es un momento de activa esteroidogénesis producida por células que entran rápidamente a un periodo de quiescencia, que se extiende casi hasta la pubertad.

Se utilizó un sistema de cultivo de células en monocapa, ya que así es posible que las mismas células se mantengan libres de interacción con otros sistemas involucrados en la regulación homeostática "in vivo", principalmente el sistema endócrino y el nervioso. Sin esta interacción, el funcionamiento celular puede ser controlado. Además, a diferencia de los sistemas de cultivo de órganos, el cultivo de células dispersas favorece la interacción con el medio de incubación, manteniendo en esta forma una mejor nutrición de las células y por consiguiente un mejor desarrollo de éstas. Asimismo se facilita que las hormonas utilizadas en los experimentos se pongan en contacto con los receptores membranales de un mayor número de células, pudiéndose realizar investigaciones sobre los efectos hormonales tanto en tiempos cortos como prolongados de exposición. Otra de las ventajas que tiene el cultivo en monocapa es el control que podemos tener sobre el ambiente fisicoquímico en el cual se desarrollaron las células, tales como el pH, temperatura, tensiones de oxígeno y bióxido de carbono. Un aspecto importante que se debe considerar al realizar experimentos con cultivos "in vitro", es la

composición de los medios de cultivo los que se complementan frecuentemente con sueros de origen animal. Actualmente se conoce que estos sueros contienen hormonas y factores de crecimiento, necesarios para el buen desarrollo y función celular. Sin embargo se ha observado que también pueden influir en la función de algunas células, modificando su respuesta a un estímulo hormonal (Orly y Cols, 1980).

En nuestro laboratorio encontramos que el suero de bovino fetal (SBF) en el medio de cultivo puede ser sustituido por la albúmina de bovino sin que las células pierdan su capacidad para producir testosterona, tanto en condiciones basales como bajo estímulo con hCG. La posibilidad de mantener a las células esteroidogénicas en ausencia de suero es ventajosa porque permite estudiar la influencia de hormonas sin las interferencias de factores de crecimiento y de hormonas presentes en el suero. Es decir, se utiliza un medio de cultivo de composición absolutamente conocida libre de otras hormonas que las que se agregan intencionalmente para estudiar su efecto sobre las células. Sin embargo se observó una disminución significativa en el contenido de proteínas de cultivo cuando las células testiculares se mantuvieron durante 24 horas en este medio (definido), en comparación con aquellos cultivados en presencia de SBF, indicando que las células del testículo del pollo recién nacido son sensibles a la influencia trófica del suero.

Considerando que los cultivos que no recibieron SBF contienen menor cantidad de proteínas, podría esperarse que la producción hormonal por microgramo de proteína también decayera; sin embargo los resultados obtenidos indican que la producción basal es muy similar en el grupo que recibió SBF y en el que solo tuvo DMEM, lo que sugiere que el déficit del suero afecta al crecimiento celular, en general pero no la capacidad

esteroidogénica de las células de Leydig en particular (Fig. 1).

Estos resultados en conjunto sugieren : a) que la presencia de SBF en el cultivo de células testiculares de pollo recién nacido produce un efecto trófico que se manifiesta en un significativo aumento de las proteínas celulares, b) que el aumento en proteínas no conlleva un aumento en la esteroidogénesis basal, aunque es probable que esto ocurriera en periodos más prolongados de cultivo.

Será necesario realizar otros experimentos para aclarar este punto. Será también importante obtener poblaciones enriquecidas en células de Leydig ó Sertoli para estudiar el efecto del suero en ellas ya que él mismo podría estar afectando más el crecimiento de un tipo celular que de otro ,por ejemplo a las de Sertoli, lo que explicaría que la presencia del SBF en el cultivo no mejorara la capacidad esteroidogénica basal.

Por otra parte cuando se agregó hCG al medio de cultivo, la producción de testosterona por microgramo de proteína respecto del control fué significativamente mayor en el grupo cultivado en medio libre de suero que en el grupo que recibió SBF en el medio de cultivo, indicando que la presencia de SBF cambia la capacidad de respuesta de las células de Leydig a la hormona estimulante (Fig.1) . Este efecto se puede deber a la presencia de gonadotropinas ó de otras hormonas en el suero las cuales estarían produciendo una regulación negativa sobre la esteroidogénesis , ó sobre los receptores a LH/hCG. Esta hipótesis se refuerza con los resultados obtenidos al estimular por 2 hs con hCG las células cultivadas con SBF + hCG, ya que en este caso se anuló la respuesta a la hormona estimulante, probablemente por la suma de efectos de la gonadotropina del suero mas la que se agregó al medio de cultivo.

Estos resultados en conjunto indican que las células del testículo del pollo recién nacido en cultivo se comportan de una manera bastante similar a las del mamífero adulto, sugiriendo que en ésta etapa del desarrollo de las aves, la población de las células de Leydig es funcionalmente madura.

El estudio del comportamiento de los cultivos en 24 horas en un medio definido permitió saber que las células pueden mantener la capacidad de responder a un estímulo posterior con hCG, en este periodo. Sin embargo, el agregado de SBF ó de hCG al cultivo, hizo que las células respondieran mejor al subsiguiente estímulo con hCG, lo que sugiere que las células del testículo del pollo recién nacido son moduladas por ambos elementos y específicamente por la gonadotropina; por lo cual esta población se comportaría en forma similar a las células testiculares de la rata adulta. De los múltiples componentes del SBF, las gonadotropinas LH/hCG podrían ser las responsables de mantener la respuesta celular al estímulo con la hormona homóloga, ya que el solo agregado de hCG al cultivo imita el efecto de la presencia del SBF. El hecho de que la presencia del SBF mejore más la respuesta que la hCG sola, podría indicar que las otras hormonas (FSH, PRL, etc.) y factores de crecimiento presentes en el suero también son necesarios directa ó indirectamente para el funcionamiento de las células de Leydig.

La comparación de las figuras 3 y 4 muestran que las células que se cultivaron en presencia de SBF, pierden su capacidad de respuesta a la hCG, que se manifiesta en una caída en la producción de testosterona, a diferencia de la respuesta observada en las células que no fueron cultivadas con suero (Fig. 4). Este efecto solo se observa con dosis mayores de 2UI/ml (fig.5) y podría explicarse por desensibilización de

las células provocado por las hormonas del suero.

El mecanismo de acción para la LH/hCG en el testículo del pollo necesita ser investigado más profundamente, ya que en la actualidad no existe información en la literatura que nos asegure de la presencia de receptores a esta hormona en la célula de Leydig de esta especie mediante estudios de unión de hormona marcada. Sin embargo teniendo en cuenta el efecto estimulador que esta hormona produce sobre la esteroidogénesis en nuestros cultivos, podemos suponer la existencia de estos receptores en la membrana de las células del testículo del pollo recién nacido.

La demostración en las células testiculares aisladas de codorniz de un aumento en la producción de ANFc y andrógenos luego de un estímulo con LH (Maung y Follet, 1977) hace suponer que también en el pollo, la hCG podría estar actuando por este mecanismo, ya que la codorniz y el pollo pertenecen a un mismo phylum y ambas células testiculares responden al estímulo con LH ó hCG. Sin embargo, creemos que es necesario realizar experimentos tendientes a definir el mecanismo de acción de esta hormona sobre las células testiculares en esta especie.

Otra de las hormonas glucoproteicas de origen hipofisiario que ha sido involucrada en la función endócrina del testículo en la rata, tanto en la etapa neonatal como en la etapa adulta, es la hormona foliculo estimulante (FSH) (Kerr, 1985; Odell, 1976; Chen, 1977; Moger, 1982; Benahamed, 1984), sin embargo en las aves existe muy escasa información acerca del efecto(s) de esta hormona sobre la regulación de la función testicular. En el presente trabajo se utilizó FSH de rata y de bovino

ya que no se encuentra en el mercado una preparación de FSH de aves.

Se utilizaron dos tipos de preparaciones, una de ellas de la máxima pureza alcanzada actualmente (NIH) para deslindar al máximo la influencia que sobre los resultados pudiera tener la presencia de LH y así poder estudiar con menos interferencia los efectos de FSH.

Respecto al efecto de éstas dos preparaciones hormonales sobre la esteroidogénesis en nuestros cultivos, se encontró que ambas son capaces de estimular la secreción de testosterona, en forma dependiente de la dosis administrada y del tiempo de permanencia de ésta en contacto con la monocapa celular.

El utilizar dos tipos de preparaciones de FSH fue interesante, ya que permitió observar que a una dosis relativamente baja de 100 ng/ml, la FSH de rata (pura) duplicó la producción de testosterona, mientras que esa misma dosis de FSH de bovino (menos purificada) triplicó la producción del esteroide. Estos resultados diferentes pueden deberse muy probablemente a la presencia de LH en la preparación de Sigma, la cual interaccionaría con la FSH a nivel de la célula de Leydig mejorando la esteroidogénesis ó a una mayor afinidad de la hormona al receptor. Es necesario destacar que la FSH de la rata también mejoró significativamente la producción de testosterona, por lo que se puede afirmar que esta hormona juega un papel importante en la esteroidogénesis alrededor del nacimiento en el testículo del pollo recién nacido. Con estos resultados también podemos afirmar que con respecto al efecto de FSH, existe cruzamiento entre las especies, ya que tanto la FSH de bovino como la de rata son capaces de modular la esteroidogénesis de la células de Leydig del testículo del pollo recién nacido en forma dependiente de la dosis de FSH y del tiempo de

permanencia de ésta en el medio de cultivo.

Por otra parte, los resultados sugieren que a esta edad, la FSH juega un rol que puede ser directo ó indirecto en el mecanismo regulador de la producción de testosterona por las células de Leydig del pollo ya que la presencia de esta gonadotropina en el medio de cultivo favorece la esteroidogénesis. En ratas inmaduras se ha reportado también éste efecto de la FSH, en experimentos "in vivo" e "in vitro" (Kerr, 1985; Odell, 1976). Sin embargo los resultados de estos autores no concuerdan con los reportados por Maidan (1985), quien agregó la dosis de 100 ng/ml de FSH de bovino (NIH-FSH) durante tres días a un cultivo de células dispersas de testículo de ratas de 7 días de edad, y no encontró incremento alguno en la producción de testosterona; tampoco observa ningún cambio morfológico ni en el número de células intersticiales.

Esta diferencia probablemente se deba a la edad de las células que de acuerdo a estudios de Huhtaniemi y cols. se encuentran en firme regresión a esa edad: se suma a este hecho el tiempo mas prolongado en cultivo, aunque se define en sólo 24 hs, las células podrían haber perdido la capacidad de respuesta por la ausencia ó disminución de los receptores.

En el presente trabajo no encontramos cambios en el contenido de proteínas de los cultivos tratados con FSH durante 6 horas por lo que se descarta que los resultados obtenidos se deban a crecimiento celular. Este hallazgo aunado al aumento en la producción de testosterona en los cultivos tratados con la FSH, aún en ausencia de hCG nos llevó a la conclusión de que esta hormona ejercería su efecto a través de mejorar la maquinaria esteroidogénica de la célula de Leydig por algún mecanismo directo ó bien indirecto a través de un efecto sobre otro tipo celular

que podría ser la célula de Sertoli como se discute más adelante.

Asimismo investigamos si de alguna manera la FSH interacciona con hCG, pensando en una modulación por parte de aquella hormona sobre los receptores a LH/hCG presentes en las células de Leydig. Los resultados obtenidos apoyan esta idea, ya que la presencia de FSH en el cultivo mejoró substancialmente la respuesta a la hCG, lo que podría sugerir que como ocurre en la rata adulta y en las inmaduras hipofisectomizadas, la FSH es importante para la aparición y mantenimiento de los receptores a LH/hCG en ovario y en testículo, así como para aumentar la capacidad de unión de la LH a su receptor, lo que trae como consecuencia que la respuesta de estas células a una segunda estimulación con hCG sea mayor.

Resumiendo en base a nuestros resultados podemos decir que la FSH administrada a las células testiculares del pollo recién nacido "in vitro" estimula la síntesis y liberación de testosterona y regula la respuesta de éstas a la hCG. El mecanismo por el cual se llevan a cabo estos efectos aún no se conoce en esta especie, pero existe la posibilidad de que este sea muy similar al encontrado en los mamíferos.

Se describen en la literatura varios mecanismos a través de los cuales podría estar actuando FSH, pero la mayoría coinciden en una acción de tipo "parácrino", es decir, una interacción entre células de Sertoli y células de Leydig, como se mencionó anteriormente. Nosotros estamos de acuerdo en principio con este razonamiento, ya que se sabe, que al menos en mamíferos, no existen receptores a FSH en las células de Leydig. Por otra parte en nuestro modelo están presentes las células de Sertoli, ya que se trata de un cultivo de células obtenido a partir de la dispersión de testículos completos, en las cuales se ha demostrado

(al menos en mamíferos) la presencia de receptores para esta hormona.

La acción de la FSH podría llevarse a cabo a través del siguiente mecanismo: la FSH se uniría primeramente a su receptor en la célula de Sertoli e induciría la formación de uno o más factores que serían liberados al espacio intersticial. Estos factores estarían actuando sobre las células de Leydig en tres formas diferentes: 1) induciendo la formación de nuevos receptores a la LH/hCG en la membrana, 2) aumentando la afinidad de la LH/hCG por su receptor ó, 3) actuando directamente sobre la ruta esteroidogénica.

Otro posible mecanismo de acción para esta hormona, reportado muy recientemente por Benahmed y cols (1986) es la supresión por parte de FSH, de la actividad inhibitoria que ejerce una proteína sobre la esteroidogénesis testicular, lo que trae como consecuencia que la célula de Leydig mantenga indemne la capacidad de síntesis de testosterona. A pesar de que estos estudios fueron realizados en un modelo de cultivo de células de Leydig de porcino, creemos que es un hallazgo interesante que aportaría otra posible explicación para el efecto de esta hormona sobre nuestros cultivos. Consideramos que aún falta mucho por explorar en el campo del efecto de FSH sobre la célula de Leydig inmadura, ya que existe muy poca información en general y en esta especie en particular.

Por otro lado y continuando con el estudio de la influencia de las hormonas de origen hipofisario sobre la función de las células de Leydig del pollo recién nacido en cultivo, encontramos que la prolactina (PRL), al igual que las gonadotropinas, es capaz de regular el funcionamiento de éstas células durante la etapa neonatal. Este efecto es similar al que ejerce la prolactina sobre las células de

Leydig del testículo de la rata y se manifiesta como cambios en la producción de testosterona dependiendo de la dosis y de las condiciones del medio de cultivo.

De los resultados expuestos en la figura 13, se deduce que el solo agregado de prolactina al medio de cultivo no es suficiente para mejorar la producción de testosterona como ocurre con la hCG, lo que sugiere que la prolactina no actúa per se sobre la esteroidogénesis testicular. Pero la respuesta a un estímulo de 2 h con hCG, sí aumento cuando el cultivo se realizó en presencia de PRL durante 48 h: en este caso la respuesta fue muy similar a la obtenida cuando se cultivó con hCG (Fig. 14). Más aún, se sumaron los efectos favorecedores de hCG y PRL cuando ambas hormonas se pusieron simultáneamente en el medio de cultivo, lo cual indica que existe un sinergismo funcional de éstas sobre las células del testículo de pollo durante el período neonatal (Fig. 14 y 16). Según se ha demostrado en la rata, la acción de la prolactina sobre la función testicular se lleva a cabo a través de la inducción o exposición de receptores a LH/hCG membranales y no en forma directa sobre la ruta esteroidogénica. Sin embargo con nuestros resultados, aún no podemos descartar lo último, ya que se ha observado en la rata macho adulta, que la prolactina aumenta la concentración de colesterol testicular (Dufau, 1978), lo que estaría favoreciendo la biosíntesis de testosterona ante el estímulo con hCG.

Por otro lado, también se observó que este efecto sobre la esteroidogénesis es muy dependiente de la dosis de hormona administrada al medio; encontramos que únicamente la dosis de 200 y 400 ng/ml de prolactina fueron capaces de inducir a las células de Leydig para

responder en la misma magnitud que lo hace la hCG (Fig.15).

Por otro lado, la disminución en la producción de testosterona secundaria a la administración de dosis altas de prolactina al medio de cultivo que observamos en el testículo de pollo recién nacido en cultivo, también se puede explicar por una disminución en el número de receptores a LH/hCG, con lo que estas células estarían otra vez comportandose como una población madura ya que se ha observado en ratas macho adultas (Dufau,1978; Belanger,1979 Sharpe, 1979; Chan, 1980) que la presencia de dosis altas de prolactina provocó una caída en el número de receptores para LH/hCG.

Nuestros resultados sugieren entonces que la prolactina, al igual que las gonadotropinas, juega un papel importante en la regulación de la esteroidogénesis de la célula de Leydig en la etapa neonatal. Al influir sobre la respuesta a hCG tal vez aumentando el número de receptores ó incrementando la sensibilidad de unión de la hCG al receptor la prolactina favorece que los niveles de testosterona se mantengan estables y en la cantidad necesaria para el desarrollo testicular.

Debido a la falta de información en la literatura sobre el papel de esta hormona sobre la función gonadal masculina en aves, consideramos que nuestros hallazgos son un primer paso para la continuación de otros proyectos dentro de este campo. Será necesario realizar otras investigaciones, tendientes a la identificación y/o cuantificación de receptores para la PRL en esta especie, tanto en el testículo adulto como durante el desarrollo mismo. Asimismo será importante estudiar el efecto de prolactina en el testículo adulto del pollo.

CONCLUSIONES

- 1.- Con los resultados obtenidos hasta ahora, es posible afirmar que el suero de bovino fetal (SBF), utilizado ampliamente como un suplemento en el medio de cultivo no es imprescindible para que las células testiculares del pollo recién nacido puedan desarrollarse en el cultivo y mantener la capacidad esteroidogénica que las caracteriza, tanto en condiciones basales como bajo estímulo con gonadotropina coriónica humana (hCG). se demostró asimismo en el presente trabajo, que la adición de hCG al medio definido, sustituye el efecto que ejerce el SBF sobre las células.
Por otra parte, es importante señalar que la presencia de SBF más hCG en el medio de cultivo produjo una disminución de la respuesta esteroidogénica a una segunda estimulación con hCG, lo cual nos hace suponer que existen factores y/o hormonas capaces de producir desensibilización en las células de Leydig del testículo del pollo recién nacido. Esto último nos indica que debe descartarse el uso del SBF como suplemento del medio de cultivo, cuando se desea realizar estudios relacionados a efectos hormonales.
- 2.- Si bien no es posible con los resultados obtenidos hasta ahora, explicar el mecanismo de acción de las gonadotropinas y la prolactina sobre el testículo del pollo recién nacido, consideramos que los mismos demuestran que estas hormonas son capaces de modular la esteroidogénesis en estas células, actuando directamente sobre el testículo. Esta influencia moduladora puede

ser de tipo inhibitorio ó estimuladorio, dependiendo de la dosis administrada y del tiempo de permanencia de las mismas en el medio de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- Adashi, E., and A.J.W. Hsueh (1981) Autoregulation of androgen production biosynthesis by organic - vasopressin. *Endocrinology* 109: 1973-95.

- Aguilar, M.C., M. Romano, and E. Pedernera (1981) Ultrastructure of Leydig cell in the testis of chicken submitted to early embryonic surgical bursectomy. *J. Anat.* 133: 543-553.

- Aragona, C., H.G. Bohnet, and H.G. Friesen (1977) Localization of prolactin binding in prostate and testis. The rol of serum prolactin concentration on the testicular LH receptors. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 84: 403-409.

- Aragona, C., and H.G. Friesen (1975) Specific prolactin binding sites in the prostate and testis in rats. *Endocrinology* 97: 677.

- Barash, I., C. Wanda, and F. Barry (1988) Prolactin (PRL) receptor induction in cultured rat hepatocytes: Dual regulation by PRL and Growth Hormone. *Endocrinology* 122: 1151-1158.

- Bartke, A. (1976) Pituitary-testis relationships: role of prolactin in the regulation of testicular function. *Prog. Reprod. Biol.* 1: 136.
- Bartke, A. (1980) Role of prolactin in reproduction in male mammals. *Fed. Proc.* 39: 2577-2581.

- Bartke, A., B.T. Croft, and Dalterio (1975) Prolactin restores plasma testosterone levels and stimulates testicular growth in

hamsters exposed to short day-length. *Endocrinology* 97: 1601,
1604.

Browning, Y., J.J. Hendel, and E. Grotjan (1983) Primary culture of purified Leydig cells isolated from adult rat testes. *Endocrinology* 112-2: 543-549.

Catt, K.J., T.F.D. Baukal, and M. Dufau (1979) Luteinizing hormone-releasing hormone-induced regulation of gonadotropin and prolactin receptors in the rat testis. *Endocrinology* 104-1: 17-25.

Catt, K.J., A.J. Baukal, and T.F. Davis (1979) Luteinizing hormone-releasing hormone-induced regulation of gonadotropin and prolactin receptors in the rat testis. *Endocrinology* 104: 17-25.

Catt, K.J., and L.M. Dufau (1980) Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Recent Progress in Hormone Research* 36: 557-622.

Catt, K.J., and M.L. Dufau (1978) Gonadotropin receptors and regulation of interstitial cell function in the testis. *Receptors and Hormone Action* 3: 291-339.

Catt, K.J., J.M. Ketelslegers, and L.M. Dufau (1976) Receptors for gonadotropic hormone. *Methods in Receptor Research* 1: 176-244.

Chan, V., T. Katikinemi, and K.J. Catt (1981) Hormonal regulation of testicular luteinizing hormone and prolactin receptors. *Endocrinology* 108: 1607-1612.

- Chang, P.J., S.S. Stojilkovic, G.S. Janelle, and J.K. Catt (1988) Gonadotropin-releasing hormone stimulates luteinizing hormone secretion by extracellular calcium-dependent and - independent mechanisms. *Endocrinology*. 123-1: 87-97.
- Charreau, E.H., A. Attramadal, P.A. Torjesen, K. Purvis, R. Calandra, and V. Hansson (1977) Prolactin binding in rat testis: specific receptors in interstitial cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 6: 303-307.
- Charreau, H.E., and J.C. Calvo (1980) Mecanismos basicos de accion molecular de las gonadotropinas luteinizante y foliculo estimulante. In (ed): *Endocrinologia molecular*. Argentina: El Ateneo, pp. 23-38.
- Chase, J.D., Dixon, and A.H. Payne (1982) Development of Leydig cell function. *Recent Advances in Fertility Research.* : 209-219.
- Chase, J.D., and H.A. Payne (1983) Changes in distribution and androgen production of Leydig cells of two populations during sexual maturation in the rat. *Endocrinology* 112-1: 29-34.
- Chemes, H.F., M. Dym, and H.G.M. Raj (1979) Hormonal regulation of Sertoli cell differentiation. *Biol. Reprod.* 21: 251-262.
- Chen, Y.D.I., A.H. Payne, and R.P. Kelch (1976) Follicle stimulating hormone stimulation of Leydig cell function in the hypophysectomized immature rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 153: 473-475.

- Chen, Y.D.I., M.J. Shaw, and A.H. Payne (1977) Steroid and FSH action of LH receptors and LH sensitive testicular responsiveness during sexual maturation of the rat. *Mol. Cell Endocrinol.* 8: 291-299.
- Chieffi, G., H. Manelli, V. Botte, and L. Matroliia (1964) Diferenziamento chimico dell' interrenale e dei tessuti somatici della gonade embrionale di pollo. *Acta Embryol. Exp.* 7: 89-91.
- Cigorruga, B.S., M. Dufau, and J.K. Catt (1978) Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. *The Journal of Biological Chemistry* 253-12: 4297-4304.
- Cigorruga, S.B., S. Sorvell, S. Bator, K.J. Catt, and M.L. Dufau (1980) Estrogen dependence of a gonadotropin-induced steroidogenic lesion in rat testicular Leydig cells. *J. Clin. Invest.* 65: 699-705.
- Clayton, R.N., and K.J. Catt (1981) Regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors by gonadal hormones. *Endocrinology* 108: 887-895.
- Connell, M.G., J.C. Connell, and K.B. Eik-Nes (1966) Testosterone synthesis by the two-day-old chick testis in Vitro. *Gen. Comp. Endocrinology* 7: 158-165.

- Cooke, B.A., A.D. Habberfield, C.J. Dix, and M.H.F. Sullivan (1984) Control of steroidogenesis in Leydig cells: role of Ca²⁺ and lypoxigenase products in LH and LHRH agonist action. Ann. N. Y. Acad. Sci. 438: 269-282.
- Corbier, P., B. Kerdelhue, R. Picon, and J. Roffi (1978) Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during, and after birth in the perinatal rat. Endocrinology. 103-6: 1985-1991.
- Dalterio, S.A., A.B. Bartke, and D. Mayfield (1983) Effects of testosterone, estradion, aromatase inhibitor, gonadotropin and prolactin on the response of mouse testes to acute gonadotropin stimulation. J. Steroid Biochem. 18: 391-396.
- De Philip, R.M., M. Feldman, W.A. Spruill, F.S. French, and A.L. Keirszenbaum (1982) The secretion of androgen-binding protein and othr proteins by rat Sertoli cells in culture: a structural and electrophoretic study. Ann. N. Y. acad. Sci. 383: 360-371.
- Dorrington, H.J., and D.T. Armstrong (1979) Effects of FSH on gonadal functions. Recent Progress in Hormone Research. 35: 301-342.
- Dufau, M. (1988) Endocrine regulation and communicating functions of Leydig cell. Ann. Rev. Physiol. 50: 483-508.
- Dufau, M.L., A.J. Baukal, and K.J. Catt (1980) Hormone - induced guanyl nucleotide binding and activation of adenylate cyclasa in the Leydig cell. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 5837-11.

- Dufau, M.L., and K.J. Catt (1978) Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitamines and Hormones* 36: 461-592.
--
- Dufau, M.L., A. Khanum, C.A. Winters, and C.H. Tsai-Morris (1987) Multistep regulation of Leydig cell function. *J. Steroid Biochem.* 26: (in press).
--
- Dufau, M.L., and G.F. Knox (1985) Fetal Leydig cell culture an "in vivo" system for the study of trophic hormone and GnRH receptors and action. *J. Steroid Biochem.* 23: 743-55.
--
- Dufau, M.L., C.A. Winters, M. Hattori, D. Aquilano, J.L.S. Baranao, K. Nozu, A. Baukal, and K.J. Catt (1984) Hormonal regulation of androgen production by Leydig cell. *J. Steroid Biochem.* 20: 161-173.
--
- Galli, E.F., O. Irsuta, and G.F. Wassermann (1973) Androgen production by testes of *Gallus domesticus* during postembryonic development. *Gen. Comp. Endocrinology.* 21: 262-266.
--
- Galli, F.E., and G.F. Wassermann (1972) Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinology* 19: 509-514.
--
- Galli, F.E., and G.F. Wassermann (1973) Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick testis in Vitro. *Gen. Comp. Endocrinology* 21: 77-83.
--

Godden, M.P., and C.G. Scanes (1975) Studies on the purification and properties of avian gonadotropin. Gen. Comp. Endocrinology 27: 538-542.
--

Guichard, A., L. Cedard, and K. Haffen (1973) Aspect comparatif de la synthése de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet a' différents stades du développement (étude en culture organo typique a' partir de précurseur radioactifs). Gen. Comp. Endocrinology 20: 16-28.
--

Guichard, A., K. Haffen, L. Cedard, and T.M. Mignot (1979) Effects of hCG and of season on "in vitro" steroidogenesis by 18-days chick embryo gonads. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19: 1317 - 1325.
--

Guichard, A., K. Haffen, L. Cedard, and T.M. Mignot (1979) Effects of hCG and of season on in Vitro steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19: 1317-1325.
--

Hall, P.H., S. Osawa, and C. Thomasson (1981) The influence of calmodulin on steroid synthesis in Leydig cells from rat testis. J. Cell Biol. 90: 402-7.
--

Hapur, F., B. Kouznetzova, F. Dvay, and J.M. Saez (1979). Life Science 24: 2151.
--

Hapur, F., and J.M. Saez (1977) Regulation by hCG of gonadotropin receptors in testicular Leydig cells. Evidence for a down regulation. Mol. Cell. Endocrinol. 7: 17-24.
--

- Hodgson, Y., and B. Hudson (1983) Leydig cell function. In Kretser and H.G. Burger (eds): The Pituitary and Testis. New York: Springer-Verlag, pp. 107-132.
- Hsueh, A.J.W., and M.L. Dufau (1976) Regulation of Luteinizing hormone receptors in testicular cells by gonadotropins. Biochem. Biophys. Res. Comm. 72: 1145-52.
- Hsueh, A.J.W., M.L. Dufau, and K.J. Catt (1974) Gonadotropin - induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3',5'-cyclic APM and testosterone responses. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 592-595.
- Hsueh, A.J.W., M.L. Dufau, and K.J. Catt (1976) Regulation of luteinizing hormone receptors in testicular cells by gonadotropins. Biochem. Biophys. Res. Comm. 72: 1145-52.
- Hsueh, A.J.W., M.L. Dufau, and K.J. Catt (1976) Immunofluorescence labelling of gonadotropin receptors in enzyme dispersed interstitial cells. Nature 261: 710,711.
- Hsueh, A.J.W., and P.B.C. Jones (1983) Gonadotropin releasing hormone. Extrapituitary action and paracrine control mechanisms. Ann. Rev. Physiol. 45: 83-94.
- Huhtaniemi, I., and K.J. Catt (1981) Induction and maintenance of gonadotropin and lactogen receptor in hypoprolactinemic rats. Endocrinology 109: 483.
- Huhtaniemi, I., M. Katikinemi, and K.J. Catt () Regulation of LH receptors and steroidogenesis in the neonatal reat testis. .:

- Huhtaniemi, I., M. Katikinemi, and K.J. Catt (1981) Regulation of LH receptors and steroidogenesis in the neonatal rat testis. *Endocrinology* 109: 588-595.

- Huhtaniemi, I.T., K. Nozu, W.D. Warren, and M. Dufau (1982) Acquisition of regulatory mechanisms for gonadotropin receptors and steroidogenesis in the maturing rat testis. *Endocrinology*. 111-5: 1711-1720.

- Huhtaniemi, W.D., D.W. Warren, and J.K. Catt (1984) Functional maturation of rat testis Leydig cells. In (ed): *Ann. N.Y. Acad. Sci.* :, pp. 283-303.
- Kerr, J.B., and R.M. Sharpe (1985) Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. *Endocrinology* 116-6: 2592.

- King, J.A., and R.F. Millar (1982) Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 257: 10722-10728.

- Lin, T. (1985) The role of calcium / phospholipid dependent protein kinase in Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 117: 119-

126.
- Lording, D.W., and D.M. Kretser (1972) Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J. Reprod. Fertil.* 24: 261-269.
--
- Lowry, H.O., J.R. Nira, A.L. Farr, and R.J. Randal (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:

265-275.

Maidan, R., P. Lim, J. Meallister, and A.J. Hsueh (1985) Hormonal regulation of androgen biosynthesis by primary cultures of testis cells from neonatal rats. *Endocrinology* 116-6: 2473.

Mather, J.F., J.M. Saez, and F. Haour (1982) Regulation of gonadotropin receptors and steroidogenesis in cultured porcine Leydig cells. *Endocrinology* 110: 933-40.

Maung, Z.W., and B.K. Follet (1977) Effects of chicken and ovine luteinizing hormone on androgen release and AMP production by isolated cells from the quail testes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33: 242 - 253.
--

Moger, W.H. (1984) Acute stimulation of rat Leydig cell steroidogenesis by gonadotropin-releasing hormone: investigation of the mechanism of action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 438: 629-631.

Moger, W.H., and P.R. Murphy (1982) Reevaluation of the effect of follicle-stimulating hormone on the steroidogenic capacity of the testis: The effects of neuroaminidase-treated FSH preparations. *Biol. Reprod.* 26: 422.

Nakamura, T., and Y. Tanabe (1972) In vitro steroidogenesis by testes of the chicken (*Gallus domesticus*). *Endocrinology* 19: 432-440.
--

Narbaitz, R., and R. Adler (1966) Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J. Embryol. exp. Morph.* 16: 41-47.

- Narbaitz, R., and D. Sabatini (1963) Histochemical demonstration of cholesterol in differentiating gonads. *Z. Zellforsch.* 59: 1-5. ---
- Nozu, K., M.L. Dufau, and K.J. Catt (1981) Estradiol receptor mediated regulation of steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 256: 1915-22. ---
- O'Shaughnessy, P.J. (1980) FSH receptor autorregulation and Cyclic AMP production in the immature rat testis. *Biology of Reproduction* 23: 810-814. --
- Odell, W.D., and R.S. Swerdloff (1976) Etiologies of sexual maturation in male rat. *Rec. Prog. Horm. Res.* 32: 245-275. --
- Papadopoulos, V., M.A. Drosdowsky, and S. Carreau (1986) In Vitro effects of Prolactin and Dexamethasone on rat Leydig cell aromatase activity. *Andrologia* 18: 79-83. --
- Patrilli-Lombarde, N., and M.D. Odell (1984) Effects of short-term hypoprolactinemia in the endocrine reproductive system in male rabbits. *Fertil. Steril.* 42: 459-465. --
- Pedernera, E., and Y. Gomar (1984) Onset of the response to chorionic gonadotropin in chick embryo testis. *Endocrinology* 54: 344-349. ---
- Pedernera, E., H. Mendoza, M.C. Aguilar, and M. Romano (1980) Postnatal development of Leydig cells in the testis of domestic fowl. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1987: 340-343. ----

- Pickering, A.J.M.C., and G. Fink. (1976) Priming effect of luteinizing hormone releasing factor: in vitro and in vivo evidence consistent with its dependence upon protein and RNAs synthesis. *J. Endocrinology* 373: 379.

- Pickering, A.J.M.C., and G. Fink. (1977) A priming effect of luteinizing hormone releasing factor with respect to release of follicle-stimulating hormone in vitro and in vivo. *J. Endocrinology* 75: 155-159.
--
- Pierce, J.G., and T.F. Parson (1981) Glicoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 465-495.
--
- Pomerantz, D.K. (1979) Effects of in vivo gonadotropin treatment on estrogen level in testis of immature rat. *Biol. Resprod.* 21: 1247-1255.
--
- Posner, and I. Barry (1974) Studies of insulin, Growth hormone and Prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology* 94: 521-531.
--
- Purvis, K., O.P.F. Clausen, and Hansson (1979) Luteinizing hormone contamination may explain FSH effects on rat Leydig cells. *J. Reprod. Fertility.* 56: 657-665.
--
- Rajaniemi, H.J., M. Manninen, and I.T. Huhtaniemi (1979) Catabolism of human 125-I iodochorionic gonadotropin in rat testis. *Endocrinology.* 105: 1208-1214.

- Ryan, R.J., H.T. Keutman, M.C. Charlesworth, D.J. Mc Cormic, R.P. Milius, F.O. Calvo, and T. Votyavanich (1987) Structure-function relationships of gonadotropins. Recent. Progress in Hormone Research. 43: 383-429.

- Schulbi (1970) Sur la presence de cellules "interstiellles primaires" dans les cordons du testicule de l'embryo de Poulet. C.R. Acad. Sci. Paris. 270: 123-125.

- Shah, G.V., C.E. Grosvenar, S.W. Shyr, and W.R. Crowley (1988) Hiperprolactinemia after neonatal prolactin (PRL) deficiency in rats: evidence for altered anterior pituitary regulation of PRL secretion. Endocrinology 122-5: 1883-88.

- Sharpe, R.M. (1976) hCG - induced decrease in availability of rat testis receptors. Nature 264: 644.

- Sharpe, R.M., and I. Cooper (1982) Stimulatory effect of LHRH and its agonist in Leydig cell steroidogenesis in vitro. Molec. Cell Endocrinol. 26: 141-50.

- Sharpe, R.M., H.M. Fraser, and F.F.G. Rommerts (1981) Sertoli-Leydig cell communication via an LHRH-like factor. Nature 290: 785-789.

- Sharpe, R.M., H.M. Fraser, and J. Sandow (1979) Effect of treatment with an agonist of Luteinizing hormone releasing on early maturation changes in pituitary and testicular function in rat. J. Endocrinology 80: 249-257.

- Snyder, H.S. (1985) The molecular basis of communication between cells. 253: 132.
- Steinberger, E. (1971) Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol. Rev. 51: 1-22.
- Tahka, K.M. (1986) Current aspects of Leydig cell function and its regulation. J. Reprod. Fert. 78: 367-380.
- Tanabe, Y., T. Nakamura, K. Fujioka, and E. Doi (1979) Production and secretion of sex steroid hormones by the testes, the ovary and the adrenal glands of embryonic and young chickens. Gen. Comp. Endocrinology 39: 26-33.
- Tapaniemi, T. Kuopio, L.J. Pelliniemi, and I. Huhtaniemi (1984) Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. Biology of Reproduction 31: 1027-1035.
- Tixier-Vidal, A., and M.G. Farquar (1975) Ultrastructure in biological system. In (ed): The anterior pituitary. : Academic, Press., pp. 83-135.
- Tsuruhara, T., M.L. Dufau, S. Cigorruga, and K.J. Catt (1977) Hormonal regulation of testicular luteinizing hormone receptors. J. Biol. Chem. 252: 9002-9.
- Valladares, E.L., and A.H. Payne (1981) Effects of hCG and AMPc on aromatization in purified Leydig cells of immature rats. Biology of Reproduction 25: 752-758.

Valladares, L.E., and H.A. Payne (1979) Acute stimulation of aromatization in Leydig cells by human chorionic gonadotropin in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4460-4463.

Wahlstrom, T., I. Huhtaniemi, H. Outi, and M. Seppala (1983) Localization of luteinizing hormone, Follicle-stimulating hormone, Prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay. Journal of clinical endocrinology and metabolism. 57-4: 825-830.

Wang, G.J., and P.C.K. Leung (1988) Role of arachidonic acid in luteinizing hormone-releasing hormone action: stimulation of progesterone production in rat granulosa cells. Endocrinology 122: 906-911.

Warren, D.W., G.C. Hallymeyer, and K.B. Erik-Nes (1975) The effect of gonadotropin on the fetal and neonatal rat testis. Endocrinology 96: 1226-1229.

Warren, D.W., I.T. Huhtaniemi, M. Dufau, and K.J. Catt (1987) Regulation of LH receptors and steroidogenesis in the foetal rat testis in vivo. Acta endocrinologica (Copenh). 115: 189-195.

Warren, W.D., M. Dufau, and K.J. Catt (1982) Hormonal regulation of gonadotropin receptors and steroidogenesis in cultured fetal rat testes. Science 218: 375-377.

Warren, W.D., I.T. Huhtaniemi, J. Tapaniemi, M. Dufau, and J.K. Catt (1984) Ontogeny of gonadotropin receptor in fetal and neonatal rat testis. 114-2: 470.

- Woods, E.J. (1987) Maturation of the hipothalamo-adenohypophyseal-gonadal Axes (HAG) in the chick embryo. The Journal of experimental zoology Suppl 1: 265-271.

- Woods, E.J., and S. Edward (1977) Establishment of the adenohypophyseal testicular axis in the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinology 32: 390-394.

- Woods, E.J., and E.M. Julie (1981) The hipotalamic-adenohypophyseal-gonadal axes in developing chick embryo. Gen. Comp. Endocrinology 45: 66-73.

- Woods, J.E., and L.H. Ertou (1978) The syntesis of estrogns in the gonads of the chick embryo. Gen. Comp. Endocrinology. 36: 360-
--
370.
- Woods, J.E., and E.S. Podczaski (1974) Androgen synthesis in the gonads of chick embryo. Gen. Comp. Endocrinol. 24: 413-423.

- Woods, J.E., and E.S. Podeczaski (1974) Androgen syntesis in the gonads of the chick embryo. Gen: Comp. Endocrinology 24: 413-423.
