

128
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"EFECTO Y METABOLISMO DE ANDROGENOS EN
EL EPIDIDIMO DE RATA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ARTURO RICARDO NIETO BARRERA

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION.....	4
OBJETIVO.....	18
HIPOTESIS.....	19
MATERIAL Y METODOS.....	20
RESULTADOS.....	40
DISCUSION.....	52
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	60
APENDICE.....	68

R E S U M E N

El epidídimo es un órgano de tránsito de los espermatozoides, es aquí donde estas células germinales adquieren la maduración fisiológica para fecundar a los óvulos o células sexuales femeninas, fenómeno que se ha denominado maduración espermática (Bedford, 1975; Orgebin-Crist et al. 1975; Courot, 1981; Cameo et al. 1983).

La maduración espermática, depende de algunas proteínas, producidas por las células epiteliales del epidídimo (Killian and Chapman, 1980; Hoffmann and Killian, 1981; Brooks, 1983; Flickinger, 1983) que son dependientes de andrógenos.

Desde el punto de vista histológico, el epidídimo se caracteriza por ser un conducto, revestido por epitelio cilíndrico pseudoestratificado con estereocilios y/o microvellosidades, con una membrana basal. Dicho epitelio está formado por cinco tipos celulares: Células principales, basales, halo, estrechas y claras. De los cinco tipos celulares, las células principales desempeñan el papel más importante, ya que metabolizan testosterona a dihidrotestosterona, siendo este el andrógeno más activo (Tindall et al., 1974; Danzo and Eller, 1978.).

En este trabajo el objetivo fué, determinar en un modelo de cultivo celular en monocapa, la acción de los andrógenos en la diferenciación de las poblaciones celulares en el del epidídimo de rata y mediante un rastreo isotópico, determinar la acción enzimática presente en la formación de DHT a partir de testosterona exógena, relacionando así los cambios morfológicos con los fisiológicos.

En el presente trabajo de tesis, se cultivaron células de epidídimo de ratas (cepa Wistar), recién nacidas y se les administró testosterona (100 nM.), se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37 °C, en condiciones estériles.

Posteriormente, se tomaron fotografías a microscopía de luz (contraste de fases), se procesaron algunas muestras tanto de controles como de tratados para microscopía electrónica de transmisión y se tomaron cultivos posteriores para realizar las pruebas de esteroides no específicas y Acido Peryodico-Schiff.

Por otro lado, se cultivaron células de epidídimo y se les agregó testosterona tritizada [1,2,6,7,16,17-³H(N)]-Testosterona (100 000 cpm) y se tomaron alícuotas de los medios de incubación para determinar por cromatografía de placa fina, los metabolitos producidos a partir de la testosterona, y conocer así el porcentaje de transformación que existe de testosterona a dihidrotestosterona (DHT). A la par, se realizaron bioensayos con fragmentos de epidídimo de ratas adultas incubándolos por un lapso de 6 horas y procesando las muestras para determinar el porcentaje de transformación de testosterona a DHT, con el fin de poder comparar estos resultados (en donde se sabe que existe una buena cantidad de DHT a partir de testosterona), con los resultados que se obtuvieron de los cultivos realizados y los experimentos de recién nacidos.

Los resultados mostraron que en los cultivos tratados con testosterona exógena, las células presentan algunos cambios en su morfología, como son la presencia de inclusiones lipídicas y presencia de mitocondrias con crestas tubulares. Además, estos

cultivos muestran reacción positiva a la prueba de PAS y a la reacción de esterasas no específicas a los siete días, dichos resultados coincidieron con la presencia de DHT a los siete días de cultivo y el hecho de que se presentó una mínima cantidad de DHT en las ratas recién nacidas.

Lo anterior es importante porque mostró la edad aproximada en que las células del epidídimo ya poseen una maquinaria enzimática madura para metabolizar andrógenos como la testosterona hacia DHT (8 horas con células en cultivo) y también se pudieron observar algunos cambios morfológicos en las células que realizan dicho metabolismo (inclusiones lipídicas, mitocondrias con crestas tubulares).

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

El aparato reproductor masculino, cuya función es la producción de espermatozoides y secreción de andrógenos, en general se encuentra integrado por un par de testículos y un sistema de conductos (los conductillos eferentes, el conducto del epidídimo, el conducto deferente y el conducto eyaculador), (fig. A), junto con algunas glándulas accesorias: las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales o glándulas de Cowper, (Bloom y Fawcett, 1988). Además en algunos mamíferos como el ratón, hay otras glándulas como las ampulares y coagulantes. Cada parte integrante del aparato reproductor masculino, cumple funciones específicas que cuando se integran, dan como resultado la producción de los gametos masculinos y por otro lado, la producción de andrógenos.

Parte importante de este proceso, lo constituye el epidídimo, órgano de origen mesonéfrico (a partir del conducto de Wolff), cuyo papel es determinante en la maduración espermática, por lo tanto en la fecundación de los gametos femeninos por parte de los espermatozoides fértiles. Se considera que este órgano ha evolucionado tanto anatómicamente como fisiológicamente, desde un simple tubo para transporte de espermatozoides en peces (Henderson, 1962), hasta una estructura bastante compleja con gran variedad de funciones en mamíferos marsupiales (Temple-Smith y Bedford, 1980), y demás mamíferos.

El epidídimo, es un órgano, integrado por varias estructuras, como son: el conducto del epidídimo (tubo único muy enrollado,

que descansa a lo largo de la superficie posterolateral del testículo), diferentes estructuras tisulares, tejido conjuntivo vascularizado y músculo liso, (Borysenko, M. et. al., 1985).

El conducto se halla revestido por un epitelio columnar pseudoestratificado con estereocilios, y consta de cinco tipos celulares :células principales, estrechas, claras, basales y halo, (Reid, B. L. y Cleland, K. W., 1957).

El epitelio se encuentra rodeado por capas de músculo liso y tejido conjuntivo vascularizado.

Macroscópicamente, el epidídimo se divide en tres regiones:

- a) Cabeza (caput), que continua después de un segmento inicial, descrito por Benoit, que se encarga de unir al epidídimo con la rete testis y los túbulos eferentes.
- b) Cuerpo (corpus), que corresponde a la región media.
- c) Cola (cauda), porción terminal que se continúa con el conducto deferente.

La luz del conducto va disminuyendo conforme se avanza de la cabeza a la cola, de forma contraria a lo que sucede con la musculatura lisa, que aumenta en grosor conforme pasa de cabeza a cola. Al microscopio óptico, el epitelio posee los tipos celulares ya mencionados y cuyas características se describen a continuación:

- CELULAS PRINCIPALES.- la microscopía óptica convencional, permite observar, las células principales del segmento inicial, que muestran un núcleo a diferente nivel, razón por la cual algunas células que poseen su núcleo en la parte superior, han sido referidas como células apicales (Hamilton, 1975, Reid, 1957,

Sun, 1980). En general, las células principales son moderadamente coloreadas con pocas microvellosidades largas, poseen núcleo redondo, pálido con nucleolo pronunciado y algunos gránulos densos supranucleares; existen columnas densas longitudinales entre las células principales adyacentes. Estas características cambian un poco cuando nos referimos a las células principales de la cabeza, cuerpo y cola, ya que estas son menores a las del segmento inicial, su coloración es moderada, núcleos de tamaño irregular con nucleolo prominente y su región supranuclear contiene muchos gránulos densos en la parte basal de las células.

La microscopía electrónica caracteriza a estas células porque su membrana plasmática basal hace contacto con la membrana basal subyacente por medio de procesos celulares, ya sean anchos o delgados. En la región apical de estas células se encuentran pequeñas invaginaciones entre las bases de las microvellosidades en la membrana plasmática y se extienden hasta el citoplasma. Subyacente a la superficie celular apical, se localizan grandes vesículas de superficie membranosa aparente (100 nm. de diámetro), (Hoffer, A. P., et al, 1973; Flickinger, C. J., 1979). Existen también numerosas vesículas grandes sin una envoltura membranosa aparente, tipo endosomas, (150-300 nm. de diámetro), tales elementos o vesículas lisas, son más o menos esféricas y pálidas, las que contienen acúmulos de material. En la región apical también hay mitocondrias, filamentos, polisomas, retículo endoplásmico rugoso, endosomas, cuerpos multivesiculares pálidos y microtúbulos.

La región supranuclear de estas células contiene al aparato de Golgi formado por muchos sáculos y elementos

vesiculares asociados de tamaño pequeño e interconectados. Existe una diferencia entre las células principales de la cabeza y las de la cola ya que las primeras, tienen gran cantidad de lisosomas (Friend, 1969), en el cuerpo también se presentan pero con diferente forma. Otra diferencia es que sólo en el cuerpo hay gotitas de lípidos distribuidas al azar.

-CELULAS ESTRECHAS.- Son exclusivas del segmento inicial y se distinguen por su citoplasma denso, núcleo denso y alargado en la mitad superior de la célula y una base estrecha no bien definida que hace contacto con la membrana basal.

Su ultraestructura muestra células columnares altas y más estrechas que las principales, con su núcleo en la parte media. Son ricas en mitocondrias dispersas por todo el citoplasma, tienen abundantes elementos vesiculares pequeños y sin envoltura en su región apical y poco retículo endoplásmico rugoso. Los cuerpos multivesiculares muestran una matriz pálida, moderada o densa y son evidentes en la región supranuclear con posibles lisosomas.

El aparato de Golgi tiene numerosos sáculos y vesículas asociadas y se encuentra en la región supranuclear a todo lo largo del núcleo. En la región basal hay retículo endoplásmico, polisomas y mitocondrias (Sun y Flickinger, 1980); a través del citoplasma existen muchos gránulos de glucógeno en grupos.

La diferenciación de células precursoras hacia células estrechas, parece ser independiente de andrógenos (Delongas y Gelly, 1985). Estas células son precursoras de las células claras (Sun y Flickinger, 1979).

- CELULAS CLARAS.- Estas células, se identifican en las tres regiones, por su región apical altamente vacuolada y la presencia de numerosos gránulos densos abajo o arriba del núcleo que puede estar en diferente posición. El núcleo es redondo, pálido y con un nucleolo prominente. La región basal, se halla con frecuencia llena de cuerpos moderadamente densos o pálidos.

Desde el punto de vista ultraestructural, se aprecia la región apical con numerosas vesículas pálidas de diferente tamaño; tienen una gran región supranuclear con abundantes cuerpos densos y en su región basal, se encuentra el núcleo con una cantidad variable de gotas de lípidos. Presentan microvellosidades de la membrana plasmática apical hacia el lumen e invaginaciones en dicha membrana. En la región apical, entre la cisterna de retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias hay vesículas no envueltas de diferente tamaño. Grandes vacuolas sin envoltura en la región apical con elementos membranosos de diferente tamaño. Hay ribosomas libres y varios túbulos apicales membranosos. Cuerpos ácido-fosfatasa positivos de naturaleza lisosomal.

En la región basal se encuentra el núcleo pálido y abundantes gotas de lípidos, poco retículo endoplasmático, polisomas y mitocondrias. La membrana plasmática basal constituye una unión uniforme con la membrana basal principal adyacente, y muestra vesículas tanto cubiertas como no cubiertas.

-CELULAS BASALES.- Son células planas, alargadas cercanas a la base del epitelio, donde entran en contacto con la membrana basal. Poseen un núcleo esférico o alargado moderadamente denso con

parches de cromatina condensada periférica, rodeada de citoplasma pálido.

La microscopía electrónica, nos permite caracterizar estas células por ser pequeñas y redondas o alargadas con núcleo grande y poco citoplasma. Tienen una gran superficie de contacto con la membrana basal fundamental. Estas células no tienen contacto con el lumen. Existen algunos desmosomas entre las células basales y las principales (Hamilton, 1975), el poco citoplasma que rodea al núcleo tiene aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso poco desarrollado, pocos lisosomas, cuerpos multivesiculares y gotas de lípidos ocasionales. Vesículas envueltas y sin envoltura a lo largo de la superficie, cuerpos multivesiculares y lisosomas que sugieren endocitosis (Hamilton, 1975).

- CELULAS HALO.- Se hallan distribuidas a todos los niveles del epitelio y se pueden identificar por su núcleo denso con parches de cromatina condensada periférica rodeada por citoplasma pálido. A nivel de microscopía electrónica podemos observar que son semejantes a los linfocitos (Hamilton, 1975; Flickinger, Howards y English, 1978; Goyal, 1985; Hoffer, 1978). Se hallan en la lámina propia fundamental y poseen un núcleo en forma de "C" con numerosos parches de cromatina, su citoplasma es pálido, tienen retículo endoplásmico rugoso poco desarrollado, mitocondrias y ribosomas libres, aparato de Golgi muy desarrollado, asociado a un par de centriolos, vesículas pálidas en su citoplasma y también algunos cuerpos ligados a la membrana rodeados por una región más pálida (estos son fosfatasa-ácida positivos y tienen naturaleza

lisosomal), hay pocos cuerpos multivesiculares y no existen uniones evidentes entre las células.

Existen evidencias de la presencia de una barrera anatómico-fisiológica, entre la sangre y los testículos. La primera, fue hecha por Friend y Gilula, en 1972, y posteriormente fue confirmada por otros investigadores (Cavicchia, 1979; Suzuki y Nagano, 1978; Greenberg y Forssmann, 1983; Hoffer y Hinton, 1984). Dicha evidencia consiste en la presencia de uniones estrechas entre células principales adyacentes en el epidídimo de rata; Suzuki y Nagano notaron que la organización geométrica de estas uniones disminuye en número desde el segmento proximal hasta el distal del epidídimo.

La barrera funcional existe debido a la diferencia de concentración de los compuestos orgánicos e inorgánicos entre el fluido luminal y la sangre (Crabo y Gustafson, 1964). Idea que se reforzó después con los experimentos de micropuntura de varios investigadores, (Jenkins, Lechene y Howards, 1980; Turner, et. al., 1984; Johnson y Howards, 1976; Turner, et. al., 1985).

Con respecto a las funciones del epidídimo, se pueden citar las siguientes:

A) Absorción del fluido de la rete testis.

Dicho fluido se absorbe en la cabeza por medio de difusión pasiva (Crabo y Gustafson, 1964), se absorbe agua y están involucrados dos iones dependientes de andrógenos, el ión cloro (en la cabeza) y el ión sodio (en la cola). Se ha observado la endocitosis que realizan las células epiteliales al utilizar varias moléculas en diferentes experimentos realizados, por

ejemplo, la ferritina catiónica, la ferritina nativa y la peroxidasa, mismas que fueron fagocitadas por las células epiteliales. En el segmento proximal de la cabeza, dentro de las células principales, se encuentra la proteína ligadora de andrógenos (Pelliniemi, L. J., et al, 1981; Attramadal, A., et al, 1981). La alfa-2 macroglobulina y la transferrina se hallan secuestradas en vesículas que son recicladas al lumen.

B) Secreción de proteínas.

El epidídimo es capaz de secretar carnitina (porción distal de la cabeza), inositol (cauda) y glicerilfosforilcolina (cabeza) . El epidídimo toma azúcares y los incorpora a sustancias que se liberan al lumen, dicha síntesis y transporte es más rápida en la cabeza y cuerpo que en la cola. Han sido identificadas, una serie de proteínas similares, dicho grupo de proteínas, se relacionan con la maduración espermática y su síntesis, la cual está mediada por andrógenos, tales proteínas son, entre otras: glicoproteína epididimal ácida, proteína de la motilidad de Forward, proteína DE, proteína IV y Proteína F.

C) Síntesis y metabolismo de esteroides.

En el epidídimo, existe biosíntesis de testosterona a partir de acetato, colesterol, pregnenolona, progesterona o dihidroepiandrosterona (Fig. B). La progesterona se convierte en metabolitos 5- α -reducidos.

La enzima 5- α -reductasa, utiliza como sustrato a la testosterona para transformarla en dihidrotestosterona (DHT), compuesto que sirve como sustrato a otra enzima importante, la 3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que transforma la DHT, en 5-

α -androstano-3- α -17- β -ol, andrógeno inactivo y sustrato de la 17 α -hidroxilasa. La 3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, es una enzima que puede ser dependiente del NADP o del NADPH y que no cambia con la edad, además de que permanece constante a lo largo de todo el epidídimo. La 5- α -reductasa se encuentra ligada a la membrana, su pH óptimo es de 6-7 y requiere de NADPH como cofactor, en algunas especies es mayor en el epitelio de la cabeza y se detecta a las 6 u 11 semanas de vida.

Cabe señalar que la dihidrotestosterona (DHT) es precisamente el andrógeno más activo, el cual se ha comprobado que es capaz de estimular la formación de ARNm, que sintetiza la glicoproteína ácida epididimaria (GAE), además de incrementar la síntesis de otras proteínas. Dicho andrógeno, es metabolizado por las células principales a partir de la testosterona.

D) Síntesis y metabolismo de otros compuestos como prostaglandinas.

Existe la síntesis de compuestos como el glutatión, que es mayor en la cola del epidídimo y le sirve como protección de la enzima para los espermatozoides en contra de sulfhidrilos endógenos libres. Las prostaglandinas se presentan en mayor cantidad en la cola del epidídimo y la vitamina "D", que también es mayor en la cola y hasta el momento se desconoce su función en dicho órgano.

E) Espermiofagia.

Los espermatozoides no eyaculados, son eliminados en algunas especies a través de la orina, pero no en todas, por lo tanto se ha

planteado la presencia de macrófagos lumbales o que las células epiteliales epididimales intervienen en la destrucción de éstos, posiblemente estimulados por algún factor químico o mecánico, (Neaves, W. H., 1975; Flickinger, C. J., 1972; Glover, T. D., 1969; Hoffer, A. P., Hamilton, D. W. and Fawcett, D. W., 1975).

COMPOSICION LUMINAL.

Por el lumen circulan algunos elementos importantes como agua, iones, moléculas orgánicas pequeñas, proteínas, glicoproteínas y espermatozoides. El fluido luminal, posee un pH que disminuye de 7.31 en los túbulos seminíferos hasta 6.48 en la cabeza distal y luego aumenta a 6.85 en la porción distal de la cola (Levine y Marsh, 1971).

Entre las moléculas orgánicas que circulan por el lumen, podemos citar la carnitina, glicerilfosforilcolina, fosfocolina, inositol, ácido siálico (Arora, Dinakar y Prasad, 1975), glicerol (Cooper y Brooks, 1981), prostaglandinas, glutation, ácido ascórbico y vitamina D. Los principales iones que se encuentran en el epidídimo, son el sodio, potasio, cloro y fosfato, estos varían en concentración y distribución a lo largo del conducto (Crabo y Gustafson, 1984).

Dentro de las moléculas orgánicas, es importante destacar que la carnitina ha sido propuesta como un posible precursor de la acetilcarnitina, fuente de energía para los espermatozoides (Casillas, Villalobos y González, 1984), o también como molécula promotora de la maduración de los espermatozoides durante su paso por el epidídimo (Casillas y Chaipayungpan, 1979).

Tanto la glicerilfosforilcolina como la fosfocolina

intervienen en la concentración de testosterona y dihidrotestosterona en el epidídimo. Algunas proteínas presentes en el lumen son secretadas por el epitelio, pero se ha propuesto que también pueden ser secretadas o absorbidas por los espermatozoides (Wong, Tsang y Lee, 1981). La albúmina, la α -2-macroglobulina, la transferrina y la proteína ligadora de andrógenos, son algunas de las proteínas que se han encontrado en el fluido luminal del epidídimo (Turner, et. al., 1984; Wong y Yeung, 1978; Skinner y Griswold, 1982). Otras proteínas están presentes pero sólo se tiene evidencia indirecta de su presencia, tal es el caso de glicoproteína epididimal ácida (Lea y French, 1981), la glucoproteína ácida dimérica (Sylvester, Skinner y Griswold, 1984) y la proteína de la motilidad (Brandt, et. al., 1978). Enzimas importantes, presentes en el lumen, son galactociltransferasa (Hamilton, 1980), la α -1,4-glucosidasa (Paquin, 1984), la angiotensina I (Hohlbrugger, et. al., 1982; Hohlbrugger y Dahlheim, 1983) y una glucoproteína de alto peso molecular ($> 1,000,000$) que se ha propuesto que tiene la función de actuar como substancia de inmovilización para los espermatozoides (Usselman y Cone, 1983), a dicha proteína se le ha denominado mucina y es la causa de una viscoelasticidad muy alta del fluido luminal de la porción caudal del epidídimo de rata.

Los espermatozoides, se encuentran en el lumen de la porción caudal del epidídimo.

La regulación de las funciones hasta ahora descritas, tanto epiteliales como lumbinales, se hallan reguladas por andrógenos y en particular, podemos citar a la testosterona y algunos

metabolitos 5 α -reducidos de ésta, la única función que no se encuentra directamente regulada por andrógenos, es la espermiófagia, (Orgebin-Crist, M. C., Danzo, B. J. y Davies, J., 1975).

Se ha confirmado la presencia de receptores citoplásmicos epididimales (Ritzen, et. al., 1971; Hansson, et.al., 1973) que permiten el ligamiento de la DHT (dihidrotestosterona), mismo que puede ser bloqueado por antiandrógenos como el acetato de ciproterona y la flutamida (Tindall, et.al., 1975; Tindall, et. al., 1974; Danzo y Eller, 1975). En 1971, Ritzen et al. reportó una segunda proteína con alta afinidad de ligamiento en el citosol y que es sintetizada por las células de Sertoli y penetra al epidídimo vía conducto eferente, dicha proteína fue denominada Proteína-Ligadora de Andrógenos (ABP).

Además de estas proteínas, se han podido identificar algunas hormonas como la prolactina, el estradiol y otras sustancias como la vitamina D, que posiblemente tengan algún papel importante en el tejido, pero que todavía no está bien establecido. Es importante mencionar el papel que le ha sido atribuido a la aldosterona, mineralocorticosteroide adrenal localizado sobre la células claras, que es el de regular la concentración de los espermatozoides en el epidídimo, (Jenkins, A. D., Lechene, C. P. y Howards, S. S., 1983; Hinton, B. T. y Keeper; D.A., 1985; Turner, T. T. y Cesarini, D. M., 1983).

Otro papel importante es el que juega la vitamina D, que es el de mantener la homeostasis del calcio y fósforo.

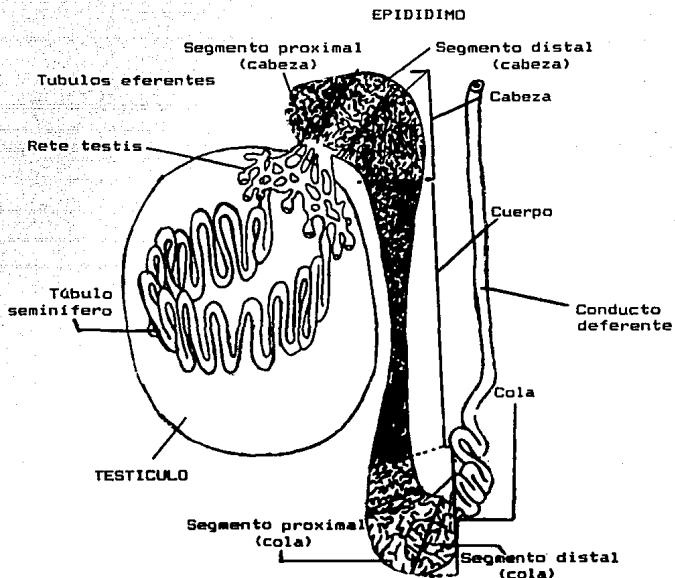


FIGURA A. REPRESENTACION DIAGRAMATICA DEL TESTICULO, MOSTRANDO LA LOCALIZACION DEL EPIDIDIMO Y SUS PARTES.

(Tomado de Knobil, E. The physiology of reproduction, p&g. 1001)

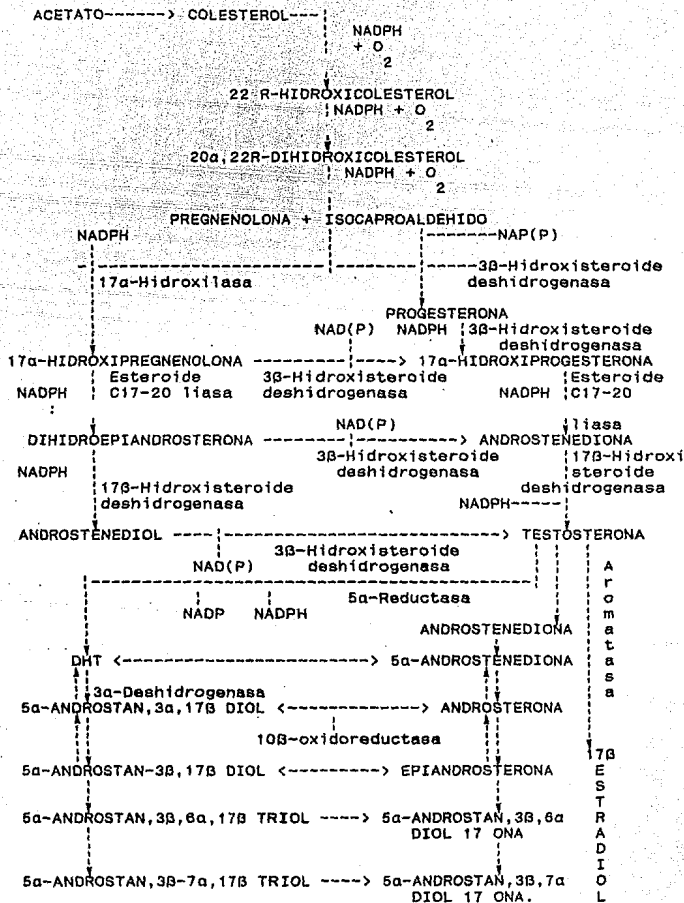


FIG. B RUTA METABOLICA DE HORMONAS ESTEROIDES.

O B J E T I V O

Determinar los efectos morfofuncionales y metabólicos de la administración exógena de testosterona, sobre el epidídimo de ratas recién nacidas y adultas, así como en cultivos celulares de dicha estructura.

H I P O T E S I S

Si la testosterona administrada de manera exógena en bioensayos y cultivos primarios de epidídimo de ratas recién nacidas, produce cambios morfológicos a nivel de organelos, estos podrán ser identificables por técnicas inmunocitoquímicas y ultraestructurales.

MATERIALES Y METODOS.

a) MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron ratas macho recién nacidas de la cepa Wistar, proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

b) MATERIAL NO BIOLÓGICO.

1. Acetato de etilo (Mallinckrodt, Inc. Paris, Kentucky, U.S.A.).
2. Acetato de uranilo (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
3. Acetona (Merck-México, S.A.).
4. Acido sulfúrico (Merck-México, S.A.).
5. Albúmina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
6. Antibióticos (Microlab, México).
7. Araldita 6005 (Ciba-Geigy, S.A. Basilea, Suiza).
8. Azul tripano (Merck-México, S.A.).
9. Benzal (Farmacéuticos Altamirano de México, S.A.).
10. Buffer de fosfatos (Merck-México, S.A.).
11. Citrato de plomo (Merck-México, S.A.).
12. Cloruro de potasio, KCl (J.T. Baker, S.A. de C.V. México).
13. Cloruro de sodio, NaCl (Merck-México, S.A.).
14. DDSA (Dodeceny1 Succinic Anhydride), (Merck-México, S.A.).
15. DMP-30 (2,4,6-tri(dimetilaminoetil) fenol), (Merck-México, S.A.).
16. Diclorometano (Merck-México, S.A.).
17. Estándares: Androstenediona, Testosterona, 5- α -Diona, 5- β -Diona, Androsterona y Dihidrotestosterona (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).

18. Etanol (Merck-México, S.A.).
19. Eter etílico (Merck-México, S.A.).
20. Fosfato de potasio monobásico, KH PO₄ (J.T. Baker S.A. de C.V. México).
21. Glutaraldehído (Merck-México, S.A.).
22. Hexano (Mallinckrodt, Inc. Paris, Kentucky, U.S.A.).
23. Hidrógeno fosfato anhidro, Na HPO₄ (Merck-México, S.A.).
24. Inhibidor de Tripsina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
25. Medio de cultivo: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc. Grand Island, N.Y. U.S.A.).
26. Methyl p-Hidroxybenzoato (Merck-México, S.A.).
27. POPOP (1,4-bis-[4-Methyl-5-phenyl-2-oxazolyl]benzene) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
28. PPO (2,5-diphenyl-oxazole). (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
29. Tetróxido de osmio (Merck-México, S.A.).
30. Suero bovino fetal (S.B.F.) (Microlab, México.).
31. Testosterona fría (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).
32. Testosterona marcada [1,2,6,7,16,17-3H (N)]- Testosterone (0.250 mCi) (Du Pont, NEN Products, Boston, MA.).
33. Tolueno (Merck-México, S.A.).
34. Tripsina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.). (Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc. Grand Island, N.Y. U.S.A.).
35. Triton X 100 (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. U.S.A.).

CULTIVO CELULAR.

Para realizar el cultivo celular, se utilizaron los epidídimos de ratas macho de la cepa Wistar, dentro de un rango de edad de 0 a 6 días. El instrumental adecuado para la disección, se esterilizó en una solución de benzal, durante un lapso de 30 minutos. Las ratas se desinfectaron perfectamente, con benzal por unos minutos y en seguida se colocaron en una campana de extracción, donde fueron decapitadas. Para su disección, se sujetó perfectamente el ejemplar decapitado en un soporte de fondo oscuro, y se procedió a la extracción de los órganos correspondientes. Dicha operación se practicó mediante una incisión en la región posteroventral del ejemplar. Una vez abierto, el ejemplar se colocó en el microscopio de disección y se ubicó la vejiga urinaria, como referencia para identificar los testículos donde a su vez se localiza el epidídimo, que se encuentra en la superficie posterolateral de los mismos. Habiendo localizado los testículos, se extrajeron completos y se colocaron en una caja Petri con solución salina balanceada libre de Ca^{++} y Mg^{++} (S.S.B.), con antibióticos (10,000 unidades/ml. de penicilina y 10,000 micro gramos/ml. de estreptomicina). Posteriormente se disecaron los epidídimos, tratando de eliminar la mayor parte del tejido que rodea al conducto epididimario. Una vez disecado el tejido, se colocó en un tubo cónico con 2 ml. de solución enzimática de tripsina 0.25%, (ver apéndice), para su disociación. La disociación del epidídimo se llevó a cabo por medio de resuspendido mecánico-enzimático del mismo, que consiste en hacer pasar el tejido que se encuentra en solución enzimática de tripsina, por la punta de una pipeta, bombeando varias veces. Se tomaron cinco fracciones de tejido a

intervalos de 5 minutos, es decir se resuspendieron las células en 2 ml. de solución de tripsina, por 5 minutos en el primer tubo, al transcurrir los 5 minutos, se detiene la disociación enzimática, con inhibidor de tripsina y el tejido que no se terminó de disociar, se pasó a un segundo tubo, donde se resuspendió por otros cinco minutos más con 2 ml. de solución de tripsina, al término de los cuales, se agregaron 2 ml. de inhibidor de tripsina para detener la disociación y nuevamente, el tejido que no se alcanzó a disociar, se pasa a otro tubo y se sigue disociando hasta completar 25 minutos, esto tiene la finalidad de detener la acción enzimática sobre las células y evitar así una mayor muerte celular, que se podría presentar si disociamos por un lapso de 25 minutos continuos. El inhibidor de tripsina se utilizó al doble de concentración de la solución de tripsina (0.50%, ver apéndice), para asegurar que se detuviera la acción de la enzima sobre las células, por lo que al final de la disociación, se mezclaron perfectamente las cinco fracciones, y se dejó una sola suspensión celular.

Posteriormente, dicha suspensión, se centrifugó a 1000 rpm. durante 10 minutos para separar el inhibidor y la tripsina de las células, se decantó el sobrenadante y se dió un lavado con 5 ml. de medio de cultivo, resuspendiendo las células y centrifugando por otros 10 minutos a 1000 rpm. Una vez lavadas las células, se procedió a contar las células colocando 50 μ l. de suspensión celular y 50 μ l. de azul tripano (ver apéndice), de esta dilución se tomaron 50 μ l. y se colocaron en la cámara de Neubauer o hemocitómetro, y se contaron las células que se encontraban en las

subdivisiones o cuadrantes de dicha cámara. Sólo se contaron las células que no se tiñen de azul, ya que estas son las únicas vivas, después, el número de células se sustituyó en la fórmula:

$$\text{No. células} = (1 / \text{factor de dilución}) (10^4).$$

Así podemos conocer el número de células que se tienen por cada mililitro, que para este trabajo fueron 750,000 en promedio.

Finalmente, se sembraron 750 000 células para los lotes control y el mismo número para los tratados, sobre cubreobjetos, dentro de las cajas Petri de 10mm. de diámetro, agregándoles 2.5 ml. de medio de cultivo previamente preparado, (ver apéndice).

Las muestras ya sembradas y perfectamente etiquetadas se incubaron a 37°C con 95% de oxígeno (O_2) y 5% de dióxido de carbono (CO_2) por un lapso de dos semanas durante las cuales se les aplicaron las pruebas de esterases no específicas, fotografía a microscopía de luz (contraste de fases) y prueba del Acido Peryódico-Reactivo de Schiff, esta última prueba, también se practicó a la par en cortes de intestino delgado para tomarlos como control y poder compararlos con los cultivos de epidídimo realizados, obteniendo así información cualitativa del contenido de mucopolisacáridos.

El medio de cultivo se cambió cada tercer día, verificando la viabilidad de las células en el microscopio.

a) Muestras tratadas.

Se tomaron cinco cajas Petri que contenían células, además del medio de cultivo, 50 microlitros de testosterona 100 nM, fría, sin marcar, (ver apéndice).

b) Muestras control.

Se utilizaron cinco cajas Petri, conteniendo solamente las células y medio de cultivo.

Los cultivos se incubaron por siete días y se realizaron las pruebas correspondientes cada día, es decir se sacaron una por día.

De estas células sembradas se tomaron muestras tanto de controles como de tratados para realizar diversas observaciones a nivel de microscopía electrónica de transmisión, análisis de esterasas, fotografía y fotomicrografía y análisis cromatográfico de actividad enzimática esteroidogénica, es en este último análisis cuando se utiliza la testosterona marcada.

Cada uno de los estudios antes mencionados se realizaron bajo la misma metodología general, pero fueron manejados bajo condiciones específicas, dependiendo del tipo de estudio realizado. Estas condiciones se especifican en la parte correspondiente.

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

Para este trabajo, se aplicó microscopia electrónica de transmisión sólo a las células en cultivo. Para facilitar su manejo, se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio No. 1, contenidos en cajas Petri de 10 mm. de diámetro.

Los pasos a seguir en este tipo de microscopia son:

Fijación.- Se utilizó técnica de inmersión, ya que sólo se hizo microscopia electrónica de las células en cultivo, tanto controles como tratados con andrógenos (testosterona no marcada).

A las cajas que contenían las células cultivadas, se les agregaron 2 ml. de fijador, se utilizó glutaraldehído 2.5% en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7.2 - 7.4, el tiempo de fijación varió de 30 a 60 minutos, dependiendo de las necesidades del tejido. Las muestras se lavaron por decantación con buffer de fosfatos de sodio 0.15M a pH 7.4, haciendo 3 cambios de 10 minutos cada uno; las muestras se pueden quedar en buffer durante 24 hrs. a 4 grados centígrados.

Postfijación u osmificación.- Se hizo con tetraóxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos 0.2M pH 7.4 de 1 - 2 hrs.

Esto permitió obtener mayor contraste y mayor estabilidad en las membranas. Realizada la postfijación, se procedió a lavar las muestras en buffer de fosfatos 0.15M, con 3 cambios de 15 minutos cada uno.

Deshidratación.- Las muestras se deshidrataron con una serie ascendente de alcoholes. El procedimiento de deshidratación se hizo de la siguiente forma, utilizando alcohol etílico:

Alcohol 50% para lavar las células en cultivo.

Alcohol 70%	1 cambio de 10 mins. En este paso se pueden quedar los tejidos durante 6 hrs.
Alcohol 80%	1 cambio de 10 mins.
Alcohol 95%	2 cambios de 10 mins. cada uno.
Alcohol 100%	3 cambios de 15 mins. cada uno.

El tiempo de deshidratación no debe exceder de 2 hrs.

Infiltración.- Se realizó con una mezcla de resina-solvente en este caso, Araldita-Tolueno en proporción 1:1. Las muestras se decantaron, y se les adicionó solvente, realizando 2 cambios de 10 minutos cada uno, con la finalidad de extraer los residuos de alcohol en los tejidos y obtener mayor penetración de la resina.

Inclusión y polimerización.- Se llevó a cabo con araldita-tolueno, la cual se preparó de la sig. manera:

DDSA	3.5 cc	(endurecedor)
Araldita 6005	5.0 cc	(resina)
Tolueno	5.0 cc	(solvente)
DMP - 30	0.12 cc	(catalizador)

Se adicionaron como se mencionó anteriormente. Es necesario fabricar recipientes de aluminio de 1 cm. de altura y en el fondo colocar una gota de resina, después se colocó el cubreobjetos con las células cultivadas y por último las células se cubrieron con resina. Este recipiente se colocó en una estufa a 60 grados centígrados por 1 hr., es recomendable hacer 2 cambios de resina. Finalmente, se desprende el cubreobjetos y las células son colocadas en cápsulas de plástico que ya vienen con la forma del molde adecuada y se orientan apropiadamente, (parte plana del tejido hacia el fondo de la cápsula), se cubrieron con resina y se etiquetaron para su identificación. La polimerización ocurre

cuando las cápsulas se introducen en la estufa a 60 grados centígrados y el tiempo varía de 12 a 24 hrs.

En la elaboración de las cuchillas se utilizaron barras de vidrio LKB, de 40 cms. de largo, 7 mm. de grosor y 25 mm. de espesor, previamente lavadas y libres de polvo y grasa.

Antes de realizar los cortes, se moldearon los bloques de resina para obtener una pirámide truncada, formando un pequeño cuadrado donde se encuentra el tejido, y una base amplia.

Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo manual Porter-Blum, MT-1.

Las cuchillas contenían un pozo con agua bidestilada para permitir que los cortes flotaran y por refracción de la luz, se supo el grosor de los cortes. Este pozo se logró colocando una cinta engomada y sellada con esmalte transparente para uñas.

El espesor de los cortes fue:

1 micra color verde

90-60nm. color plata

Los cortes adecuados para microscopía electrónica de transmisión son los plateados y los grises, mientras que los cortes semifinos (verde) son empleados para identificar las estructuras a estudiar por medio de microscopía de luz.

Para contrastar, se requirió de metales pesados. Los cortes finos se colocaron en rejillas de cobre pequeñas (300 mesh) y se contrastaron con acetato de uranilo al 2% (alcohólico) en metanol al 50% las muestras se lavaron en metanol 50%, requiriendose de 3 cambios de 1 min. Se dejaron secar las muestras sobre papel filtro durante 10 mins. Y después se colocaron en

citrato de plomo con la cara que contiene las células hacia abajo, en contacto con el citrato de plomo por 10 mins., el citrato es eliminado con agua bidestilada, haciendo 3 cambios de 1 min. cada uno.

Las muestras se dejaron secar sobre papel filtro por 30 min. y por último se observaron en el microscopio electrónico de transmisión (Zeiss, M-109), para identificar estructuras y poder obtener las micrografías correspondientes del tejido.

TECNICA PARA ESTERASAS NO ESPECIFICAS.

Reactivos necesarios:

- | | |
|-------------------------|---------------------------------|
| 1. Na PO _{2 4} | 7. Nitrito de sodio 4% |
| 2. KH PO _{2 4} | 8. Alfa naftil acetato |
| 3. Acetona | 9. Eter monometil etilen glicol |
| 4. Formaldehido 37% | 10. Hematoxilina de Harris |
| 5. Pararosanilina | 11. NH OH ₄ |
| 6. HCl concentrado | |

Todos los reactivos utilizados correspondieron a la marca Merck-México, S.A.

A) Solución fijadora:

20 mg. de Na PO_{2 4} , 100 mg. de KH PO_{2 4} , 30 ml. de agua destilada, 45 ml. de acetona y 25 ml. de formaldehido 37% (guardar en refrigeración).

B) Buffer de fosfatos:

I.- 9.465 g. de Na₂HPO₄ en 1 litro de agua destilada

II.- 9,070 g. de KH₂PO₄ (1/15 M) en 1 litro de agua destilada.

Se mezclan 85 ml. de I y 15 ml. de II.

C) Pararosanilina: (Debe ser reciente)

250 mg. de pararosanilina en 5 ml. de agua destilada y 1.25 ml. de HCl concentrado, calentar suavemente, se deja enfriar y se filtra. Se mezclan igual volúmen de pararosanilina y solución de nitrito de sodio al 4% y se dejan reaccionar por 1 minuto.

D) Solución alfa naftil acetato:

Disolver 50 mg. de alfa naftil acetato en 2.5 ml. de eter monometil etilen glicol.

E) Mezcla de incubación:

3 ml. de pararosanilina hexazotizada con la solución de alfa naftil acetato y 45 ml. de buffer, se ajusta el pH a 6.1 con NaOH 1N. La mezcla se filtra antes de usarse y se le agrega a la muestra y se deja 45 minutos. Se lavan con agua destilada y se observan al microscopio de luz. Los cultivos que tienen color café-rojizo, son las que presentan actividad de esterases.

Esta prueba, sólo se practicó a las células en cultivo, tanto a controles como tratados, cada 24 horas para ver el momento en que presentaban reacción positiva a esterases no específicas.

Todos los reactivos utilizados fueron de la marca Merck-México, S.A.

REACCION DE ACIDO PERYODICO-SHIFF

Esta reacción se llevó a cabo, para detectar la presencia de mucopolisacáridos en los cultivos celulares de epidídimo. La metodología para dicha reacción fue la siguiente:

- 1.- Fijar las células en buffer neutral de formol al 10% .
- 2.- Lavar con agua destilada.
- 3.- Agregar solución de azul alciano pH 1.0 por 30 minutos.
- 4.- Quitar el exceso de azul alciano con un papel secante y lavar con agua por 5 minutos.
- 5.- Oxidar con solución de ácido peryódico por 5 minutos.
- 6.- Lavar con agua circulante por 5 minutos.
- 7.- Agregar solución reactiva de Schiff por 10 minutos.
- 8.- Enjuagar con solución de metabisulfito de sodio, tres cambios de 2 minutos cada uno.

9.- Lavar con agua circulante por 10 minutos.

10.- Deshidratar con alcohol 95% , alcohol absoluto y aclarar con xilol, haciendo dos cambios en cada uno.

También esta prueba se aplicó solamente a las células en cultivo utilizando reactivos de Merck-México, S.A.

CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA.

La cromatografía de capa fina y el uso de radioisótopos, son dos técnicas que permiten conocer el porcentaje de transformación que hay, de un compuesto hacia otro, dentro de la misma ruta metabólica por la acción de enzimas específicas. Los pasos que se siguieron para tal efecto fueron:

INCUBACION.

a) Células disociadas de epidídimo de ratas recién nacidas.

Se incubaron 500 000 células, en viales nuevos perfectamente cerrados, con Medio de cultivo Dulbecco Eagle Modified (DMEM) y albúmina más cien mil cuentas por minuto de hormona marcada (testosterona marcada con tritio o ^3HT), en baño María a 37°C por 30 minutos. Los viales se sacaron de la incubación cada cinco minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación se detuvo esta con 10 ml. de éter frío y se congeló a -20°C .

b) Células de epidídimo de ratas recién nacidas en cultivo.

Se sembraron 1 000 000 de células, de la manera antes descrita. Se utilizaron siete cajas Petri, una por cada día de la semana. A dichas cajas, se les agregaron 10 μl . de hormona marcada y se incubaron en la estufa a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO_2 y 95% de aire. La incubación se llevó a cabo por siete días, se obtuvo una caja cada 24 horas y se procesó por medio de cromatografía.

c) Bioensayos con fragmentos de epidídimos de ratas adultas.

Al mismo tiempo que se elaboraron los cultivos, se hicieron

bioensayos con ratas adultas, extrayendo el epidídimo e incubando fragmentos del mismo en seis viales diferentes con medio de cultivo y testosterona marcada, estos fragmentos fueron pesados para establecer la relación entre porcentaje de transformación por miligramo de tejido, se incubaron fragmentos, procurando que su peso fuera similar. Dichos fragmentos se incubaron por un lapso de seis horas deteniendo la incubación con 10 ml. de éter frío cada hora y se dejaron las muestras listas para su cromatografía correspondiente. El promedio de peso de los fragmentos fue de 3 mg. y en el último vial se colocaron varios fragmentos que en promedio pesaban 10.8 mg., este vial se incubó por 6 horas también.

EXTRACCION.

Se realizaron tres extracciones con 10 ml. de éter cada una. En el éter se encuentra la hormona marcada con radioactividad y corresponde a la fase líquida, la fase acuosa corresponde al medio de cultivo. Primero, se agitaron los viales en forma vigorosa para que el éter extrajera la hormona que se encuentra en el medio de cultivo, después se dejó reposar 5 minutos y se congeló la fase acuosa a -70°C con una mezcla de acetona más hielo seco y se decantó la fase líquida en otro vial limpio.

Se evaporó dicha fase en baño María a 37°C con agitación, dejando los viales destapados en una campana de extracción.

La extracción se realizó de la misma forma, tanto para células, cultivos celulares y fragmentos de epidídimo de ratas adultas.

CORRIMIENTO DE LA PLACA.

Se utilizaron placas de cromatografía de sílica gel de 20 X 20 cms. (Merck-México, S.A.), se activaron a 90 °C durante 30 segundos y se rayaron con lápiz de número 2, como lo muestra la figura D :

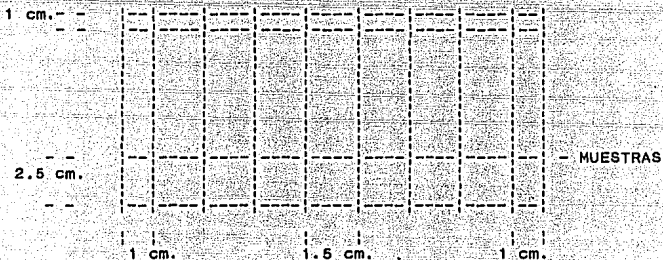


FIGURA D. RAYADO DE LAS PLACAS DE SILICA GEL.

Se dejaron libres los carriles de los extremos (1 cm.) y tanto los estándares como las muestras, previamente resuspendidos en 100 μ l de acetona y 100 μ l de etanol, respectivamente, se colocaron sobre la línea inferior, poniendo una gota de estándar tanto en el carril correspondiente como en el de las muestras. Se aplicó una gota de cada estándar a cada carril de las muestras para que funcionaran como acarreadores (1 gota = 2 μ l. aprox.). Posteriormente, se tomó una alícuota de 30 μ l de los 100 μ l resuspendidos correspondiente a las muestras que se quieran

correr, y se aplicaron sobre la misma línea inferior, una en cada carril. Por otro lado, se preparó un sistema de solventes que consistió en una mezcla de diclorometano-acetato de etilo en una proporción 8:2, (120 ml. de diclorometano y 30 ml. de acetato de etilo) y otro sistema que consistió en una mezcla de Eter-hexano en proporción 3:1 (90 ml. de éter y 30 ml. de hexano) y se colocó en la cámara de cromatografía con un papel filtro que va a ayudar a homogeneizar el medio interno en la cámara. Debe cuidarse que la cámara se encuentre perfectamente bien nivelada para que el solvente ascienda por capilaridad de manera uniforme.

Después, se colocó la placa dentro de la cámara y se tapó perfectamente, sellando la tapa con grasa de vacío, evitando así que se evapore la mezcla y se pierda la proporción calculada.

Se dejó correr y se sacó cuando la mezcla de solventes llegó a la línea superior de la placa. Dicha placa se reveló con ácido sulfúrico (H_2SO_4 al 10 %), en el caso de muestras control y con luz ultravioleta de onda corta cuando corresponden a muestras tratadas, marcadas con tritio, en estas placas con tritio, se señaló con un lápiz del número 2 las zonas en donde se notaban manchas, posteriormente se recortó la zona de los estándares y se reveló con ácido sulfúrico al 10 %, sumergiéndola en dicha solución durante 5 segundos y luego se calentó a $100^{\circ}C$ para revelar las hormonas que no tienen doble enlace y no se observaron con luz ultravioleta. Se colocaron juntas las dos partes de la placa que se recortó (la de los estándares y los tratados) y se raya con lápiz del número 2, haciendo renglones que encierren las manchas de los estándares, procurando que las manchas (marcadas, observadas con luz ultravioleta) queden dentro de un solo renglón

como lo muestra la figura e:

			E			T		4
		E			T		T	3
	E			T				2
E						T		1

ESTANDARES (E)
TRATADOS (T)

FIGURA E. MANERA DE TRAZAR FILAS Y RENGLONES QUE ABARQUEN UNA MANCHA OBSERVADA CON LUZ ULTRA VIOLETA

Se numeraron los renglones comenzando por el punto de aplicación hacia el frente del solvente; las placas se recortaron en filas y posteriormente se recortaron por renglones (fig. E) colocándo los cuadros resultantes en viales limpios y perfectamente identificados, a los cuales se les agregaron 5 ml. de líquido de centelleo (ver apéndice) y se llevaron al contador de centelleo (Beckman, Modelo LS 6000 IC), para saber la cantidad de cuentas por minuto (cpm) que se tenían en dicho cuadro, que corresponden al porcentaje de transformación de la testosterona marcada al estandar (metabolito) que se hallaba en ese renglón.

Para calcular el porcentaje de transformación de las hormonas esteroides sintetizadas por las células, se realizaron los siguientes cálculos:

1.- A las cuentas netas, se les restaron 40 que son las cpm corregidas.

2.- se hizo la sumatoria de cpm corregidas en cada una de las fracciones (fila) obteniendo el 100 % de transformación y por una regla de tres se obtuvo el porcentaje de transformación de cada fracción, ejemplo:

FRACCION 1. MUESTRAS.- DE LA 1 A LA 13.

CUENTAS	NETAS	CPM -40	% TRANSFORMACION	% TRANSF. NETO
1.	8585	8545	25.22	
2.	1025	985	2.27	
3.	759	719	1.60	
4.	2381	2341	8.07	
5.	6032	5992	16.08	
6.	1091	1051	2.68	
7.	1756	1716	6.94	
8.	7413	7373	21.78	
9.	5238	5198	11.71	
10.	763	713	2.5	
11.	189	149	0.47	
12.	188	148	0.30	
13.	191	151	0.36	

$\Sigma = 35\ 081$

$\Sigma = 35\ 081$ ----- 100 %

8 545 ----- X

X = 25.22 % (primer valor de % de transformación en la primer muestra).

3.- El porcentaje de transformación neto, se obtuvo calculando el porcentaje de transformación del blanco que es únicamente medio de cultivo y hormona marcada y este se le restó al porcentaje de transformación, esto se realiza haciendo corresponder cada valor del blanco con cada valor de nuestras muestras para T₁, después, cada valor del blanco con cada valor de las muestras para T₂, etc.

Con ésta última columna es con la que se trabajó.

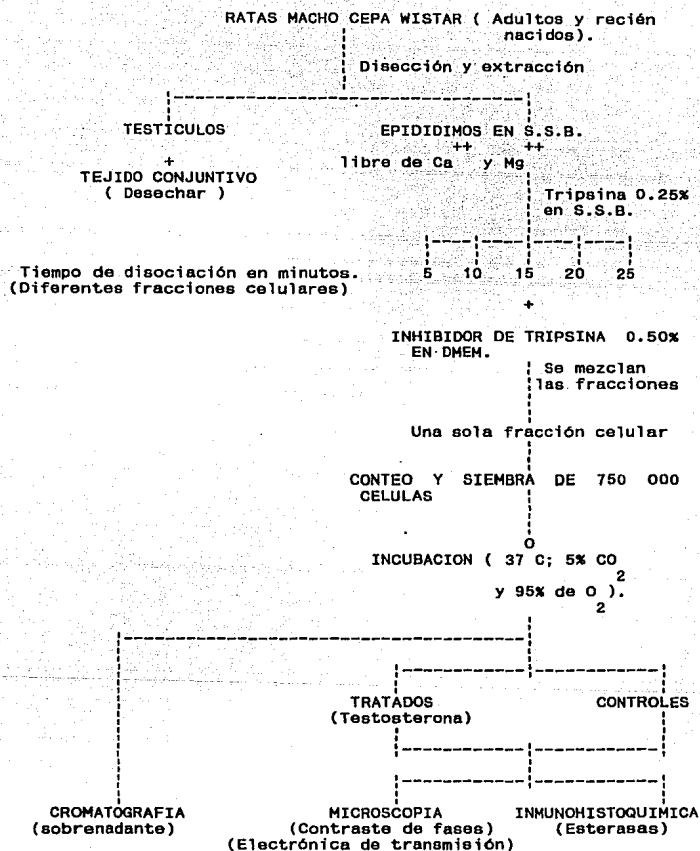


FIG. C METODOLOGIA GENERAL DEL PRESENTE TRABAJO.

RESULTADOS.

MICROSCOPIA.

En los cultivos celulares realizados, se pudo observar la formación de pequeños acúmulos de células epiteliales del epidídimo, presentándose (a simple vista) un mayor tamaño en los cultivos que fueron tratados con testosterona. Estos acúmulos forman islotes que se encuentran asociados a fibroblastos. Mediante microscopia de luz (contraste de fases), se observó que las células de estos acúmulos, presentan varias inclusiones lipídicas (fig. 2A, 2B), también se pudo apreciar con ayuda del microscopio que dichas inclusiones lipídicas, eran más numerosas en los cultivos tratados con testosterona. La microscopia electrónica de transmisión, permitió observar, además de dichas inclusiones, en los cultivos tratados con testosterona, la presencia de mitocondrias con crestas tubulares, que son características de las células que se encargan de producir hormonas esteroides, (Dahl, 1971 a,b,c), (fig. 4).

HISTOQUINICA.

Las células epiteliales de los cultivos en monocapa del epidídimo, exhibieron reacción positiva a la prueba de esterasas no específicas (fig. 5A, 5B) Dicha reacción fue más intensa en los cultivos tratados con testosterona que en los controles (además se pudo apreciar una coloración más intensa en el centro de los acúmulos epiteliales tratados), (fig. 6A, 6B).

Las pruebas histoquímicas para glucoproteínas, como la del Acido Peryódico-Shiff (P.A.S.) que se practicaron desde el

primer día de cultivo, resultaron positivas hasta los siete días de cultivo. Dicha reacción se practicó también en cortes de intestino delgado como control de la reacción.

en los cultivos, como método de control. Al igual que la prueba anterior, también fue más intensa en los cultivos tratados con testosterona.

METABOLISMO DE ANDROGENOS.

Con respecto al metabolismo de andrógenos, en las placas se obtuvieron patrones de corrimiento muy similares en todos los diferentes experimentos que se realizaron (fig. 1 y 1a), y con respecto a los metabolitos encontrados, principalmente se hallaron androstenediona y dihidrotestosterona.

Los experimentos realizados con epidídimos de ratas recién nacidas, mostraron muy poca transformación de testosterona a dihidrotestosterona, ya que se encontró bajo porcentaje de DHT (fig. 7). En cuanto a los epidídimos de ratas adultas, se observó la presencia de DHT desde la primera hora de incubación con un buen porcentaje de transformación, además, se observó también aunque en menor proporción la presencia de androstenediona, (fig. 8). Por otro lado, los experimentos en los que se utilizaron varios fragmentos de epidídimo, se observó casi el mismo porcentaje de transformación tanto de testosterona como de DHT y muy poco porcentaje de transformación de androstenediona.

En lo referente a los cultivos tratados con testosterona marcada se observó que a partir de las seis horas, comenzó a incrementarse el porcentaje de DHT y androstenediona y se

mantuvo constante durante los 5, 6 y 7 días. La testosterona disminuyó en su porcentaje de transformación conforme transcurre el tiempo, (fig. 9).

									10		
									9		
									8		
									7		
		X							6		
X			X	X	X	X	X	X	5		
	X		X	X	X	X	X	X	4		
D-4	T	DHT		M	U	E	S	T	R	A	S

D-4 = ANDROSTENEDIONA.
 T = TESTOSTERONA.
 DHT = DIHIDROTESTOSTERONA.

FIG. 1 . Localización de los principales metabolitos, contenidos en las diferentes muestras (controles y tratados), dentro de la placa cromatográfica.

PLACA CROMATOGRAFICA.

Fecha:		Experimento:												
														12
														11
														10
														9
		○												8
			○											7
		○						○	○	○	○	○	○	6
							○							5
				○										4
					○			○	○	○	○	○	○	3
														2
														1
	5 α -Androstano- diona.	Androstano- dion.	5 β -Androstano- diona.	Androsteno.	Testosterona.	DHT	Blanco	T ₁ (Muestra Fracción D ₁)	T ₂ (Muestra Fracción D ₂)	T ₃	T ₄	T ₅		

FIG. 1a. CORRIMIENTO DE LOS DIFERENTES METABOLITOS EN LA PLACA DE SILICA GEL

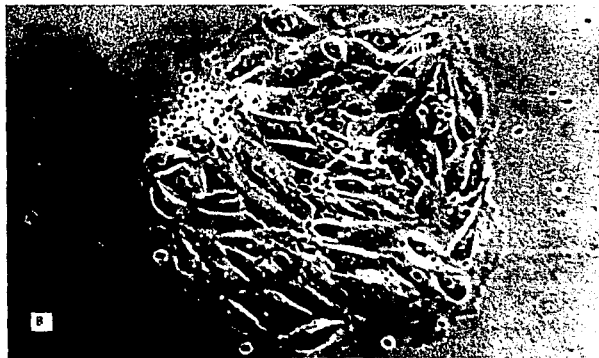
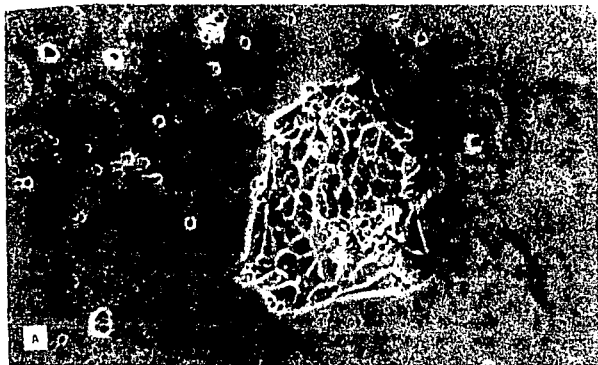


FIG.2 FOTOMICROGRAFIAS DE CELULAS EPITELIALES DE EPIDIDIMO EN CULTIVO, (CONTROLES). i.l.- Inclusiones lipídicas.
A. Acúmulos epiteliales a las 24 horas de cultivo (320 X).
B. Acúmulos epiteliales a las 48 horas de cultivo (320 X).

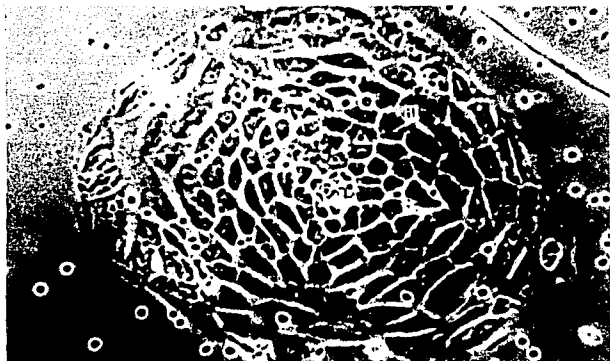


FIG. 3 FOTOMICROGRAFIA DE CELULAS EPITELIALES DE EPIDIDIMO DE RATA EN CULTIVO, TRATADAS CON TESTOSTERONA EXOGENA A LAS 48 HORAS, (800 X). 1.1.- Inclusiones lipídicas.

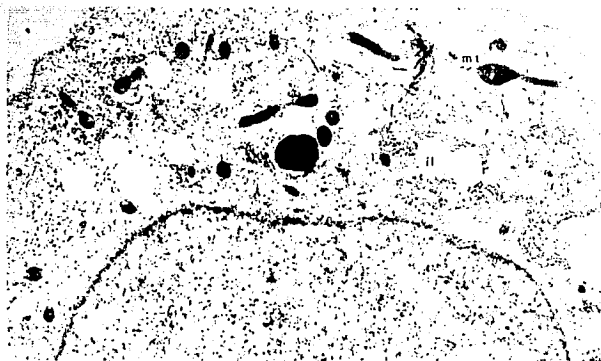


FIG. 4 MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE CELULAS EPITELIALES PROPIAS DEL EPIDIDIMO EN CULTIVOS PRIMARIOS (17600 X). i.l.- Inclusiones lipidicas. m.t.- Mitochondrias con crestas tubulares.

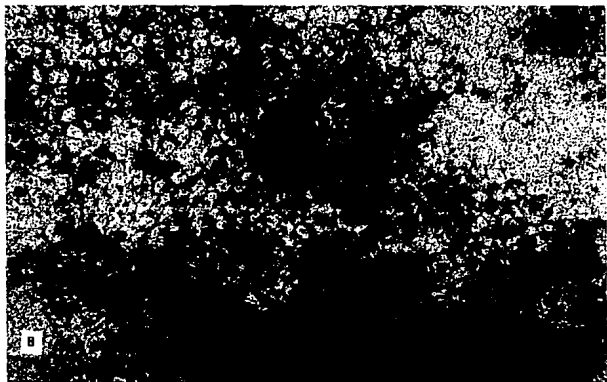
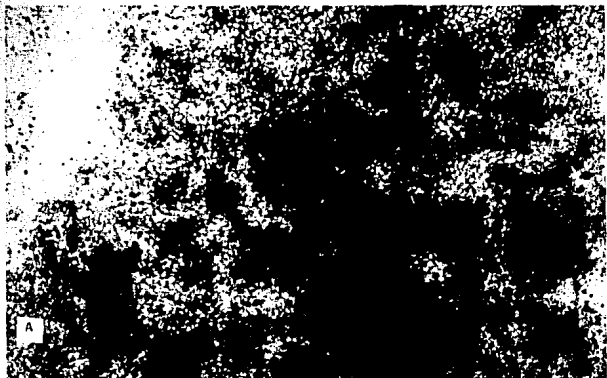


FIG. 5 FOTOMICROGRAFIAS DE CULTIVOS PRIMARIOS DE EPIDIDIMO, CON LA TECNICA HISTOQUIMICA-ENZIMATICA PARA ESTERASAS (CULTIVOS CONTROL). A. 120 X Y B. 300 X.

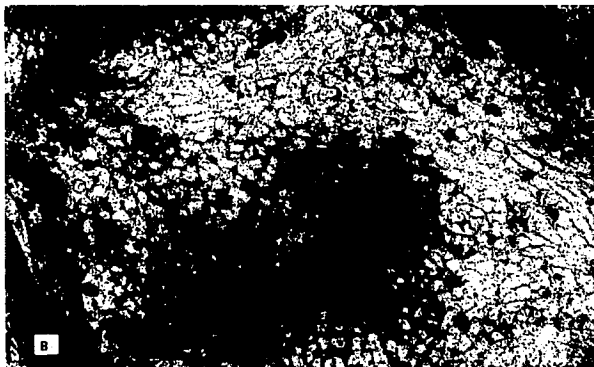
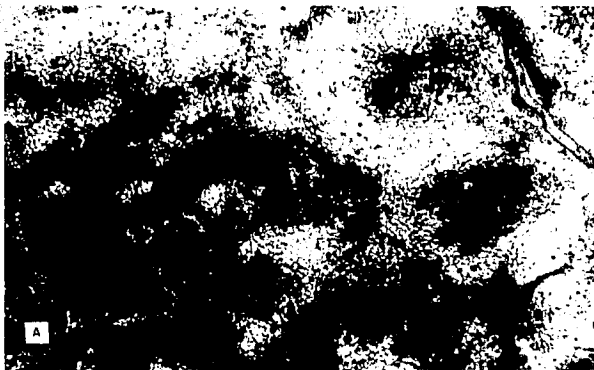


FIG. 6 FOTOMICROGRAFIAS DE CULTIVOS PRIMARIOS DE EPIDIDIMO, CON LA TECNICA HISTOQUIMICA-ENZIMATICA PARA ESTERASAS (CULTIVOS TRATADOS CON TESTOSTERONA). A. 120 X Y B. 300 X. (LA REACCION COLORIDA ES MAS INTENSA EN EL CENTRO DE LOS ACUMULOS)

METABOLISMO ANDROGENOS

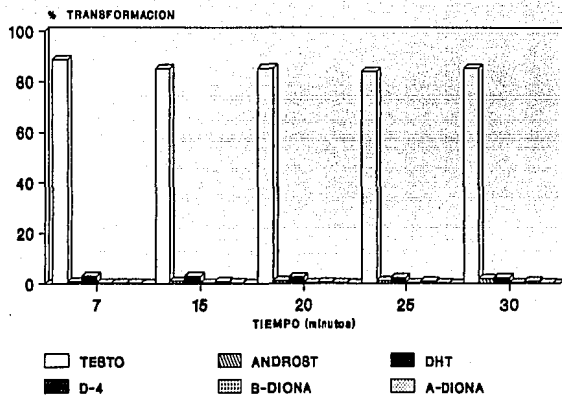
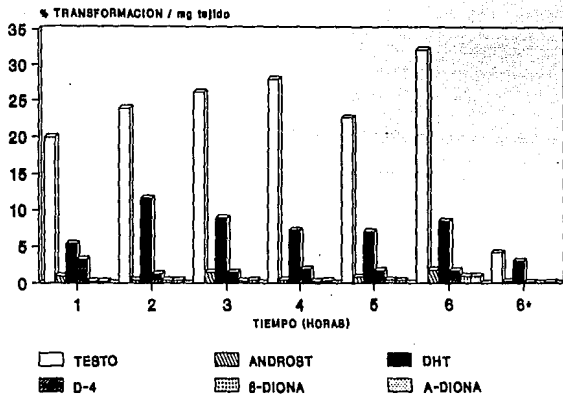


FIG. 7. PORCENTAJE DE TRANSFORMACION DE LA TESTOSTERONA HACIA OTROS METABOLITOS EN EPIDIDIMOS DE RATAS RECIEN NACIDAS.

METABOLISMO ANDROGENOS

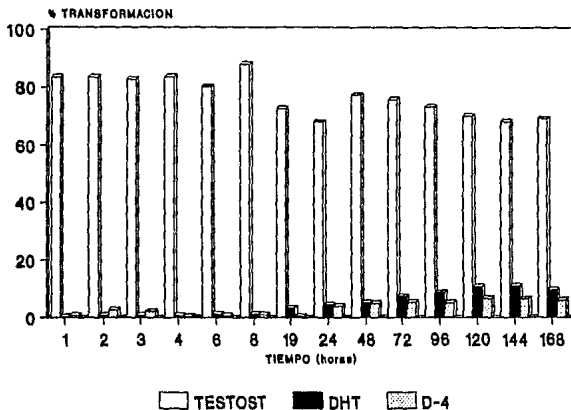


ADULTO

FIG. 8. PORCENTAJE DE TRANSFORMACION DE LA TESTOSTERONA HACIA OTROS METABOLITOS EN EPIDIDIMOS DE RATAS ADULTAS.

*Se incubaron aproximadamente 6 fragmentos bajo las mismas condiciones.

METABOLISMO (androgenos) celulas cultivadas



EPIDIDIMO (ratas recién nacidas)

FIG. 9. PORCENTAJE DE TRANSFORMACION OBTENIDO MEDIANTE LA ADMINISTRACION DE TESTOSTERONA EXOGENA EN CULTIVOS CELULARES DE EPIDIDIMO DE RATAS RECIEN NACIDAS DURANTE SIETE DIAS.

D I S C U S I O N .

En los cultivos celulares realizados, se lograron obtener diversas imágenes conforme transcurrieron los días de incubación, inmediatamente después de concluido el cultivo, se observaron células de forma esférica, debido al proceso de dispersión enzimática. En las primeras 24 horas de cultivo, se observaron algunas células aplanadas que se comenzaron a adherir a la caja Petri en forma gradual, hasta formar pequeñas colonias de acúmulos epiteliales. A las 48 horas de cultivo, los acúmulos epiteliales fueron más grandes en tamaño y número de células, adquiriendo una forma poligonal. La microscopía de contraste de fases, permitió observar inclusiones lipídicas en el citoplasma de las células epiteliales.

En general, todas las observaciones antes mencionadas, concuerdan con la descripción de las imágenes encontradas por Kierszenbaum, A.L. et. al. 1980, en un modelo celular de rata; así como las fotografías tomadas a diferentes horas de cultivo, en las cuales, Kierszenbaum observó, también con contraste de fases, abundantes gránulos en el citoplasma de las células en sus cultivos. La presencia de estos gránulos, sugiere actividad esteroidogénica por parte de estas células, ya que una de las características que poseen las células productoras de hormonas esteroides, son las inclusiones lipídicas en su citoplasma, (Dahl, 1971 a,b,c). La otra evidencia de una posible actividad esteroidogénica se manifestó, al observar las células cultivadas utilizando la

microscopia electrónica de transmisión, ya que se encontraron mitocondrias con crestas de tipo tubular, también características de células esteroidogénicas (Dahl, 1971 a,b,c). Es muy probable que la mayoría de estas células del epidídimo, correspondieran a células principales, ya que se ha propuesto que son el primer tipo celular en diferenciarse (Delongas, J. and Gally, J., 1985). La probabilidad de que correspondan a este tipo celular es mayor ya que se encontró una gran proporción de estas células (71%) en un trabajo realizado por Klinefelter, G.R. and Amann, R.P., 1980, y además, se ha establecido una dependencia diferencial de andrógenos entre los diferentes tipos celulares del epidídimo para adquirir sus características definitivas, es decir, no todos los tipos celulares del epidídimo requieren la misma concentración de andrógenos para diferenciarse completamente y madurar (Delongas, J. and Gally, J., 1985); así, se menciona que cuando los cultivos de epidídimo, poseen bajas concentraciones de andrógenos, se diferencian primero, las células estrechas (Resko, et al., 1968; Döhler and Wuttke, 1975).

En los cultivos del epidídimo, tratados con testosterona, se observó que existen colonias celulares de mayor tamaño, comparadas con los controles. Esto puede relacionarse con los trabajos ya antes reportados por algunos investigadores (Blaquier, J.A., 1973, 1975; Klinefelter, G.R. and Hamilton, D.W., 1985), en los que se menciona que los andrógenos como la testosterona y en especial la Dihidrotestosterona (DHT), ejercen una influencia directa sobre la síntesis de proteínas en modelos de cultivos de tejidos de epidídimo de ratas, siendo esta estimulación,

proporcional al tiempo de incubación. Hay proteínas presentes en epidídimos de ratas adultas, cuya secreción es dependiente de andrógenos (Orgebin-Crist, M.C., Eller, B.C. and Danzo, B.J., 1983), y que son idénticas tanto en epidídimos poco diferenciados como en epidídimos de ratas adultas, sugiriendo una acción reguladora y estructural en ambos tipos de individuos (Toney, T.W. and Danzo, B.J., 1989). El epidídimo de conejos adultos, requiere más tiempo de exposición que el epidídimo de conejos sexualmente inmaduros, para responder a estímulos de tipo hormonal con cambios en la síntesis de proteínas (Brooks, D.E., 1987), debido a que las células indiferenciadas están en proceso de maduración, crecimiento y diferenciación (Orgebin-Crist, M.C., Eller, B.C. and Danzo, B.J., 1983) y por lo tanto son más susceptibles a cualquier tipo de estimulación.

Está bien establecido que la DHT influye en la síntesis de RNA por parte de las células, (Tuohimaa and Niemi, 1968). Esto se reforzó, cuando se administró antibiótico (Actinomicina-D) y observaron que se inhibía la síntesis de RNA (Blaquier, J.A., 1973). Sin embargo, no todas las proteínas requieren de la presencia de andrógenos para poder ser sintetizadas.

Los resultados indicaron la presencia de mucopolisacáridos a los siete días de incubación (reacción de PAS), misma que fue más marcada en los cultivos de células de epidídimo, tratadas con testosterona que en los controles, y que puede deberse a la estimulación por parte de la testosterona. Esto nos indica que ya existe secreción de estos compuestos por parte de las células en cultivo (muy probablemente las células principales), además de indicar cierto grado de maduración de las células, que les permite

secretar no sólo estos compuestos sino muy posiblemente, algunos otros.

Las esterasas no específicas, comprenden un gran grupo de enzimas (carboxilesterasas, arilesterasas, acetilesterasas y colinesterasas) que son marcadores muy usuales para el estudio de diferenciación metabólica y modulación hormonal en el epidídimo (Abou-Haïla, A. and Fain-Maurel, M.A., 1987).

La reacción a la prueba de esterasas no específicas, en este trabajo, se presentó positiva tanto en los cultivos sin testosterona, como en los cultivos tratados con testosterona, exhibiendo estos últimos, una coloración más intensa en el centro del acúmulo que en la periferia, lo cual es consistente con los trabajos de Abou-Haïla, A. y Fain-Maurel, M.A., 1987, quienes encontraron que la testosterona estimula la actividad de enzimas esterasas, esto, fue comprobado en ratones castrados a los que se administró testosterona, dando como resultado, la restauración de la actividad de esterasas. En el epidídimo de ratón, las carboxilesterasas, exhiben la mayor parte de la actividad de las enzimas esterasas no específicas. La acción y aparición de nuevas esterasas, es gradual en el epidídimo de ratón y se debe a la activación de un patrón de genes que controlan su expresión conforme transcurre el tiempo (Masters and Holmes, 1975; Moss, 1979), esto se relaciona con la diferenciación celular y la actividad funcional que marca así, una diferenciación progresiva del epidídimo a través del tiempo. La reacción menos intensa en la periferia de los acúmulos celulares, posiblemente se deba a un menor grado de maduración en estas células, ya que se encuentran

en constante, proliferación y expansión para formar la monocapa.

El metabolismo de testosterona a dihidrotestosterona, fue determinado en dos sistemas diferentes (Diclorometano-Acetato de etilo 8:2 y Eter-Hexano 3:1), para asegurar la separación completa de los diferentes metabolitos en el corrimiento de la placa cromatográfica, para obtener así, un porcentaje de transformación más preciso. Los principales metabolitos encontrados (androstenediona y dihidrotestosterona), coinciden con los reportados por Klinefelter, G.R. y Amann, R.P., 1980, quienes compararon el metabolismo de células principales con el de células basales en el epidídimo de rata. Su trabajo mostró que las células principales son las que juegan un papel esencial en la transformación de testosterona a DHT, y por lo tanto, intervienen en la capacitación espermática, debido a la presencia de las enzimas que llevan a cabo dicha reacción (... 5 α -reductasas). También lograron establecer que las células principales son más sensibles a la supresión de DHT administrada, que las células basales, ya que cuando retiraron la DHT administrada normalmente a sus cultivos purificados, se percataron de que el epitelio tiende a reducirse en las células principales (Orgebin-Crist, M.C. and Ménéz, Y., 1980).

Los resultados que se obtuvieron de epidídimos de ratas recién nacidas, mostraron muy bajo porcentaje de transformación de testosterona a DHT, lo que se traduce en una muy baja actividad de las enzimas 5 α -reductasas, encargadas de dicha reacción. Este fenómeno puede deberse a que la maquinaria enzimática no se encuentre todavía preparada o madura, a esta edad, para llevar a cabo tal proceso metabólico (fig. 7). En lo que a epidídimos de

ratas adultas se refiere, se encontró un buen porcentaje de transformación debido a la producción de las enzimas necesarias por parte de las células principales, ya bien diferenciadas. En experimentos alternos a las incubaciones de fragmentos aislados de epidídimo de rata adulta, se hicieron incubaciones, utilizando varios fragmentos de epidídimo, que nos permitieron evidenciar aún más la actividad de las enzimas 5 α -reductasas, al contener mayor número de células principales en los fragmentos. La testosterona se consumió casi a la mitad, produciendo un mayor porcentaje de transformación (fig. 8). Los cultivos de epidídimo realizados, mostraron que aproximadamente, a partir de las seis horas de incubación, comienzan a incrementarse los niveles de DHT, lo cual puede indicar que las células ya se encuentran maduras y por lo tanto, ya pueden producir la proporción adecuada de enzimas 5 α -reductasas, capaces de transformar testosterona a DHT; esto concuerda con los datos encontrados para epidídimo de ratas adultas, en las que a las seis horas de incubación, existe ya, una actividad metabólica bien definida por parte de dichas enzimas. A la par se observa en la gráfica, un decremento de testosterona que coincide con un incremento de la DHT, conforme transcurrió el tiempo de incubación (fig. 9). En los mismos cultivos, a los siete días, todavía se mantuvo la actividad enzimática que transforma testosterona a DHT, lo cual se puede relacionar con los resultados a la prueba de esterases, que indicaron la presencia de esterases no específicas hasta los siete días de cultivo.

Algunos investigadores mencionan que a los tres días de cultivo, el tejido es ya metabólicamente activo, pero con los

resultados de este trabajo, podría decirse que dicho metabolismo se presenta un poco antes (fig. 9).

La cantidad de androstenediona presente, tal vez, se deba a la actividad de otras enzimas diferentes de las 5 α -reductasas, que actúan sobre los productos liberados al medio, en los cultivos estáticos, ya que estos productos se acumulan y pueden ser metabolizados y degradados. Si se utilizara un cultivo de flujo continuo (Orgebin-Crist, M.C. and Ménézo, Y., 1980), se tiene la ventaja de que el aire y el medio que necesitan las células, para desarrollarse, se difunden mucho mejor que en los cultivos estáticos, además de que se puede coleccionar el medio y analizarlo continuamente. Este sistema, diseñado por los autores antes mencionados, ya se ha usado en cultivo de fragmentos de epidídimo y presentó las ventajas antes descritas (Orgebin-Crist and Tichenor, 1972; Hoffman et al., 1976).

CONCLUSIONES

La testosterona administrada de manera exógena a células indiferenciadas de epidídimo de rata, en cultivo primario, mostró influencia directa sobre el aumento de tamaño de las colonias epiteliales, la secreción de mucopolisacáridos y de enzimas esterases no específicas, la síntesis de proteínas y la maduración y diferenciación de las células principales, hacia células con características de células esteroidogénicas y actividad metabólica.

El tejido en cultivo, comenzó a ser metabólicamente activo, a los tres días de incubación.

En el epidídimo de ratas recién nacidas no hubo transformación bien establecida de DHT a partir de testosterona ya que las células a esta edad, carecen de un grado de maduración que les permita realizar dicho proceso.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Abou-Haila, A. and Fain -Maurel, M.A. (1987). " Postnatal differentiation and endocrine control of esterase isoenzymes in the mouse epididymis". *Reprod. Fert.* 79: 437-446.
- 2.- Arora, R., Dinakar, N. and Prasad, M. R. N. (1975). "Biochemical changes in the spermatozoa and luminal contents of different regions of the epididymis of the Rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *Contraception*.11: 689-700.
- 3.- Attramadal, A., et al. (1981). "Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in rat Sertoli and epididymal cells". *Biol. Reprod.* 25: 983-988.
- 4.- Balbontin, J. B. and Bustos-Obregon, E. (1989). "Identification of androgen binding-protein (ABP) from testis and epididymis of the seasonal rodent *Octodon degus* (Molina, 1972)". *J. Androl.*10(4): 289-295.
- 5.- Blaquier, J. A. (1973). "An in vivo action of androgens on protein synthesis by epididymal tubules maintained in organ culture". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 1177-1183.
- 6.- Blaquier, J. A. and Breger, D. (1974). "The in vivo effects of androgens on RNA synthesis by cultured rat epididymal tubules". *Endocr. Res. Commun.* 1: 247-260.
- 7.- Blaquier, J. A. et al. (1975). "The activation of cultured epididymal tubules by androgens". *J. Steroid Biochem.*6: 573-578.
- 8.- Blaquier, J. A. (1975). "The influence of androgens on protein synthesis by cultured rat epididymal tubules". *Acta Endocrinol.* 79: 403-416.
- 9.- Borysenko, M. et al. Histología funcional. Edit. Limusa, S.A. México, 1985. pp 209-226.
- 10.- Brandt, H., et al. (1978). "Evidence for epididymal origin of bovine sperm forward motility protein. *Biol. Reprod.* 19: 830-835.
- 11.- Brooks, D. E. (1975). "The isolation of epithelial cells from the rat epididymis". *Andrologia.* 7: 241-253.
- 12.- Burgos, M. H. and Cavicchia, J. C. (1988). "Plasma membrane changes during epididymal transit in the guinea pig spermatozoa". *Micr. Electr. Biol. Cel.* 12(2): 197-216.
- 13.- Cafilisch, C. R. and Dubose, T. D. (1990). "Effect of vasectomy on in situ pH in rat testis and epididymis". *Contraception* 42(5): 589-595.

- 14.- Casillas, E. R. and Chaipayungpan, S. (1979). "The distribution of carnitine and acetylcarnitine in the rabbit epididymis and the carnitine content of rabbit spermatozoa during maturation". *J. Reprod. Fertil.* 56: 439-444.
- 15.- Casillas, E. R., Villalobos, P. and Gonzales, R. (1984). "Distribution of the carnitine and acetylcarnitine in the hamster epididymis and in epididymal spermatozoa during maturation". *J. Reprod. Fertil.* 72: 197-201.
- 16.- Cavicchia, J. C. (1979). "Fine structure of the monkey epididymis: A correlated thin-section and freeze-cleave study". *Cell Tissue Res.* 201: 451-458.
- 17.- Coffey, D. S. Androgen action and the sex accessory tissues. In: Knobil, E. and Neill, J. et al. The physiology of reproduction. Raven Press. New York. 1988. pp. 1081-1119.
- 18.- Cooper, T. G. and Brooks, D. E. (1981). "Entry of glycerol into the rat epididymis and its utilization by epididymal spermatozoa". *J. Reprod. Fertil.* 61: 163-169.
- 19.- Crabo, B. and Gustafsson, B. (1984). "Distribution of sodium and potassium and its relation to sperm concentration in the epididymal plasma of the bull". *J. Reprod. Fertil.* 7: 337-345.
- 20.- Cuasnicú, P. S. et al. (1984). "Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa". *J. Reprod. Fert.* 70: 541-547.
- 21.- Danzo, B. J. and Eller, B. C. (1975). "Androgen binding to cytosol prepared from epididymides of sexually mature castrated rabbits: Evidence for a cytoplasmic receptor". *Steroids.* 25: 507-525.
- 22.- De las Heras, M. A. et al. (1988). "Ornithine decarboxylase activity as a marker of androgen and antiandrogen action in the rat epididymis". *J. Reprod. Fert.* 83: 177-183.
- 23.- Delongcaas, J. L. and Gelly, J. L. (1985). "Differentiation of the rat epididymis after withdrawal of androgen". *Cell Tissue Res.* 241: 657-662.
- 24.- Dufaure, J. P., Gigon, A. and Gathier, C. (1972). "L'épididyme de lézard en culture in vitro: un nouveau système pour étudier le mode d'action des hormones androgènes". *CR Soc. Biol.* 166: 366-379.
- 25.- Fain-Maurel, M. A., Dadoune, J. P. and Jauzein-Leau, F. (1983). "Protein secretion by the principal cells of mouse epididymis evidenced by in vitro incorporation of tritiated leucine". *Reprod. Nutr. Dev.* 23: 175-182.

- 26.- Fawcett, D. W. Tratado de histología, Edit. Interamericana, México, 1988. Cap. 31.
- 27.- Flickinger, C. J. (1972). "Alterations in the fine structure of the rat epididymis after vasectomy". *Anat. Rec.* 173: 277-300.
- 28.- Flickinger, C. J., Howards, S. S. and English, H. F. (1978). "Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster". *Am. J. Anat.* 152: 557-586.
- 29.- Flickinger, C. J. (1979). "Synthesis, transport and secretion of protein in the initial segment of the mouse epididymis as studied by electron microscope radioautography". *Biol. Reprod.* 20: 1015-1030.
- 30.- Friend, D. S. (1969). "Cytochemical staining of multivesicular bodies and Golgi vesicles". *J. Cell Biol.* 41: 269-279.
- 31.- Geneser, F. Histología, Editorial Médica Panamericana, S.A. México, 1988. pp 564-592.
- 32.- George, F. W. and Wilson, J. D. Sex determination and differentiation. In: Knobil, E. and Neill, J. et al. The physiology of reproduction, Raven Press. New York. 1988. pp 3-26.
- 33.- Glover, T. D. (1969). "Some aspects of function in the epididymis". *Int. J. Fertil.* 14: 215-221.
- 34.- Goyal, H. O. (1985). "Morphology of the bovine epididymis". *Am. J. Anat.* 172: 155-172.
- 35.- Greenberg, J. and Forssmann, W. G. (1983). "Studies of the guinea pig epididymis. II Intercellular junctions of principal cells". *Anat. Embryol.* 168: 195-209.
- 36.- Hall, P. F. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: Knobil, E. and Neill, J. et al. The physiology of reproduction, Raven Press. New York. 1988. pp. 975-998.
- 37.- Hamilton, D. W. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens in the rat. In: Handbook of physiology, sec. 7, vol. 5, edited by R. O. Greep and E. B. Astwood, 1975. pp. 259-301. American Physiological Society, Washington, D.C.
- 38.- Hamilton, D. W. (1980). "UDP-galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in fluids from rat rete testis and epididymis". *Biol. Reprod.* 23: 377-385.
- 39.- Hansson, V., et al (1973). "Intracellular receptor for 5 α -dihydrotestosterone in the epididymis of the adult rats. Comparison with the androgenic receptor in the ventral prostate and the androgen binding protein (ABP) in the testicular and

epididymal fluid". Steroids. 22: 19-33.

40.- Henderson, N. E. (1962). "The annual cycle in the testis of the eastern brook trout, *Salvelinus fontinalis mitchill*". Can. J. Zool. 40: 631-641.

41.- Hinton, B. T. and Keeper, D. A. (1985). "Binding of [³H]-Aldosterone to a single population of cells within the rat epididymis". J. Steroid Biochem. 23: 231-233.

42.- Hoffer, A. P., Hamilton, D. W. and Fawcett, D. W. (1973). "The ultrastructure of principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis". Anat. Rec. 175: 169-202.

43.- Hoffer, A. P., Hamilton, D.W. and Fawcett, D. W. (1975). "Phagocytosis of spermatozoa by the epithelial cells of the ductuli efferentes after epididymal obstruction in the rat". J. Reprod. Fertil. 44: 1-9.

44.- Hoffer, A. P. (1976). "The ultrastructure of the ductus deferens in man". Biol. Reprod. 14: 425-443.

45.- Hoffer, A. P. and Hinton, B. T. (1984). "Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity". Biol. Reprod. 30: 991-1004.

46.- Hohlbrugger, G., Schweisfurth, H. and Dahlheim, H. (1982). "Angiotensin I converting enzyme in rat testis, epididymis and vas deferens under different conditions". J. Reprod. Fertil. 65: 97-103.

47.- Hohlbrugger, G. and Dahlheim, H. (1983). The effect of age, mating and vasoligature on angitensin I converting enzyme in rat testis and epididymis. In: Kinins-III, edited by H. Fritz, N. Back, G. Dietze and G. L. Haberland. Plenum Press, New York. pp. 845-853.

48.- Jenkins, A. D., Lechene, C. P. and Howards, S. S. (1980). "Concentrations of seven elements in the intraluminal fluids of the rat seminiferous tubules, rete testis and epididymis. Biol. Reprod. 23: 981-987.

49.- Jenkins, A. D., Lechene, C. P. and Howards, S.S. (1983). "The effect of spironolactone on the elemental composition of the intraluminal fluids of the seminiferous tubules, rete testis and epididymis of the rat". J. Urol. 129: 851-854.

50.- Johnson, A. L. and Howards, S. S. (1976). "Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after long-term vasectomy in the guinea pig". Biol. Reprod. 14: 371-376.

51.- Joshi, M. S. (1985). "Isolation and cell culture of the epithelial cells of cauda epididymis of the bull". Biol. Reprod.

33: 187-200.

52.- Kierszenbaum, A. L. et al. (1981). "Isolation, culture and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(3): 1675-1679.

53.- Killian, G. J., Amann, R. P. and Synder, J. (1976). "Isolation of principal and basal cells from the epithelium of the hamster caput epididymidis by unit gravity sedimentation". Biol. Reprod. 15: 266-279.

54.- Killian, G. J., Snyder, J. and Amann, R. P. (1977). "Unit gravity sedimentation separation of cells comprising the caput epididymidis of the rat". Cell Tissue Res. 183: 371-378.

55.- Killian, G. J. (1981). "A rapid and simple method for isolating principal cells from the rat caput epididymidis". J. Androl. 5: 255-258.

56.- Klinefelter, G. R. and Amman, R. P. (1980). "Isolation of principal cells and basal cells by elutriation of suspensions of rat epididymal tissue". Int. J. Androl. 3: 287-300.

57.- Klinefelter, G. R. and Amman, R. P. (1980). "Metabolism of testosterone by principal cells and basal cells isolated from the rat epididymal epithelium". Biol. Reprod. 22: 1149-1154.

58.- Klinefelter, G. R. and Hamilton, D. W. (1984). "Organ culture of rat caput epididymal tubules in a perfusion chamber". J. Androl. 5: 243-258.

59.- Klinefelter, G. R. and Hamilton, D. W. (1985). "Synthesis and secretion of proteins by perfused caput epididymal tubules, and association of secreted proteins with spermatozoa". Biol. Reprod. 33: 1017-1027.

60.- Lea, O. A. and French, F. S. (1981). "Characterization of an acidic glycoprotein secreted by principal cells of the rat epididymis". Biochim Biophys. Acta. 668: 370-376.

61.- Lee, G. L. 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology. Third edition. Mc Graw-Hill Book company, U.S.A. pag. 168-169.

62.- Levine, N. and Marsh, D. J. (1971). "Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and vas deferens in rats". J. Physiol. 213: 557-570.

63.- Neaves, W. H. Biological aspects of vasectomy. In: Handbook of Physiology, sec. 7, vol. 5, edited by R. O. Greep and E. B. Astwood, 1975. pp. 383-404. American Physiological Society, Washington, D.C.

64.- Neuwinger, J. et al. (1990). "The influence of relaxin on motility of human sperm in vitro". *Andrologia* 22(4): 335-339.

65.- Olson, G. E. et al. (1983). "Structural features of cultured epithelial cells from the adult rat epididymis". *J. Androl.* 4: 347-360.

66.- Orgebin-Crist, M. C., Danzo, B. J., and Davies, J. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Handbook of physiology, sec. 7 vol. 5 edited by R. O. Greep and E. B. Astwood, 1975. pp. 319-338. American Physiological Society, Washington, D.C.

67.- Orgebin-Crist, M. C., Jahad, N. and Hoffman, L. H. (1977). Effects of antiandrogens on 5 α -dihydrotestosterone induced maturation of epididymal spermatozoa in organ culture. In: Androgens and antiandrogens, Edited by Martini, L. and Motta, M. Raven Press, New York. pp. 105-113.

68.- Orgebin-Crist, M. C. and Jahad, N. (1978). "The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: Inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis". *Endocrinology*. 103: 46-53.

69.- Orgebin-Crist, M. C. and Jahad, N. (1979). "The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: Stimulation by epididymal cytoplasmic extracts". *Biol. Reprod.* 21: 511-515.

70.- Orgebin-Crist, M. C. and Ménézo, Y. (1980). "A continuous flow method for organ culture of rabbit epididymis: Morphology, amino acid utilization, glucosa uptake, RNA and protein synthesis". *J. Androl.* 1: 289-298.

71.- Paquin, R., et al. (1984). "Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal α -1-4-glucosidase". *J. Androl.* 5: 277-282.

72.- Pelliniemi, L. J., et al. (1981). "Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in the male rat reproductive tract". *Endocrinology*. 108: 925-931.

73.- Reid, B. L. and Cleland, K. W. (1957). "The structure and function of the epididymis. The histology of the rat epididymis". *Aust. J. Zool.* 3: 223-246.

74.- Ritzen, E. M. et al (1971). "Demonstration of androgen binding components in rat epididymis cytosol and comparison with binding components in prostate and other tissues". *Endocrinology*. 89: 143-151.

75.- Robaire, B. and Buchanan, L. J. (1985). The use of epididymal cell and organ culture in toxicology. In: In vitro Embryotoxicity and Teratogenicity Tests, edited by F. Homburger and A. M. Goldberg. Karger, Basel. pp. 114-129.

- 76.- Robaire, B. and Hermo, L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: Structure, functions, and their regulation. In: Knobil, E. and Neill, J. et al. The physiology of reproduction. Raven Press. New York. 1988. pp. 999-1080.
- 77.- Rommerts, F. G. and Van der Molen, H. J. Testicular steroidogenesis. In: Burger, H. and Dekretser, D. The testis. Raven Press. New York. 1982. pp. 303-321.
- 78.- Saeed, A. et al. (1990). "Structure-Activity relationship of antiestrogens. Studies on 2,3-Diaryl-1-benzopyrans". J. Med. Chem. 33: 3210-3216.
- 79.- Schleicher, G., Drews, U. and Stumpf, W. E. (1989). "No evidence for aromatization of [H] Testosterone in Oestrogen receptor containing cells of the epididymis". J. Steroid Biochem. 32(2): 299-302.
- 80.- Skinner, M. K. and Griswold, M. D. (1982). "Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids". Biol. Reprod. 27: 211-221.
- 81.- Sun, E. L. and Flickinger, C. J. (1979). "Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis". Am. J. Anat. 154: 27-55.
- 82.- Sun, E. L. and Flickinger, C. J. (1980). "Morphological characteristics of cells with apical nuclei in the initial segment of the adult rat epididymis". Anat. Rec. 196: 285-293.
- 83.- Suzuki, F. and Nagano, T. (1978). "Regional differentiation of cell junctions in the excurrent duct epithelium of the rat testis as revealed by freeze-fracture". Anat. Rec. 191: 503-520.
- 84.- Sylvester, S. R., Skinner, M. K. and Griswold, M. D. (1984). "A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. Biol. Reprod. 31: 1087-1101.
- 85.- Temple-Smith, P.D., and Bedford, J. M. (1980). "Sperm maturation and the formation of sperm pairs in the epididymis of the opossum, *Didelphis virginiana*". J. Exp. Zool. 214: 161-171.
- 86.- Tindall, D. J. et al. (1974). "Further studies on the accumulation and binding of androgens in rat epididymis". Endocrinology. 95: 1119-1128.
- 87.- Tindall, D. J. et al (1975). "Androgen-binding proteins in rat epididymis: Properties of a cytoplasmic receptor for androgen similar to the androgen receptor in ventral prostate and different from androgen-binding protein (ABP)". Mol. Cell. Endocrinol. 3: 83-101.

effects on protein synthesis by the adult rabbit epididymis". *Endocrinology*. 125(1): 243-249.

89.- Turner, T. T. and Cesarini, D. M. (1983). "The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa: Responsiveness to aldosterone". *J. Androl.* 4: 197-202.

90.- Turner, T. T., Jones, C. E., et al. (1984). "On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa". *Endocrinology*. 115: 1925-1932.

91.- Turner, T. T., et al. (1985). "Androgens in various fluid compartments of the rat testis and epididymis after hypophysectomy and gonadotropin supplementation". *J. Androl.* 6: 353-358.

92.- Usselman, M. C. and Cone, R. A. (1983). "Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin", a high molecular weight glycoprotein". *Biol. Reprod.* 29: 1241-1253.

93.- Viysiere, C. et al. (1989). "Evidense for reversible and irreversible biochemical defects in accessory sex organs and kidney of neonatally androgenized male mice". *Acta Endocr. Copenh.* 121: 121-128.

94.- Wagley, L. M. et al. (1984). "Culture of principal cells from the ram epididymis. A comparison of the morphology of principal cells in culture and in situ". *J. Androl.* 5: 389-408.

95.- Wassan, W. C. et al. (1990). "Zona drilling Enhances fertilization by mouse caput epididymal sperm". *Molecular Reproduction and development.* 27: 332-336.

96.- Wong, P. Y. D. and Yeung, C. H. (1978). "Absorptive and secretory functions of the perfused rat cauda epididymis". *J. Physiol.* 275: 13-26.

97.- Wong, P. Y. D. et al. (1980). "The isolated duct of the rat cauda epididymis as a model for isosmotic transport studies". *Japanese Journal of Physiology.* 30(1): 1-15.

98.- Wong, P. Y. D., Tsang, A. Y. F. and Lee, W. M. (1981). "Origin of the luminal fluid proteins of the rat epididymis". *J. Androl.* 4: 331-341.

A P E N D I C E.

PREPARACION DE SOLUCIONES Y REACTIVOS.

a) Solución de azul tripano.

Azul tripano	400 mg.	_____	0.400 gr.
NaCl	810 mg.	_____	0.810 gr.
KH PO ₃	60 mg.	_____	0.060 gr.
2 4			
Metil p- hidroxibenzoato	50 mg.	_____	0.050 gr.
H O	90 ml.		
2			

Calentar a punto de ebullición y enfriar a temperatura ambiente, ajustar el pH a 7.4 con NaOH 1N. (aprox. 8 gotas) y ajustar el volúmen final a 100 ml.

b) Solución salina balanceada (S.S.B.) libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

NaCl	8.0 gr.
KH PO ₃	2.0 gr.
2 4	
KCl	0.2 gr.
Na HPO	1.15 gr.
2 4	
EDTA o EGTA (opcional)	0.02 gr.
Agua bidestilada	1000 ml.

c) Medio de cultivo (DMEM) + Suero bovino fetal.

Medio de cultivo	8.5 gr.
NaHCO ₃	3.7 gr.
3	
Suero bovino fetal	150 ml.
Antibiótico	0.5 ml./ cada 100 ml.
Agua ultrapura	1000 ml.

d) Medio de cultivo (DMEM) + Albúmina.

Medio de cultivo	10.3 gr.
Albúmina bovina	0.1 gr.
NaHCO ₃	3.7 gr.
3	
Agua ultrapura	1000 ml.

Se ajusta el pH a 7.5 con el bicarbonato de sodio (coloración rojiza, espuma rosada), y se afora a 1000 ml.

e) Solución enzimática de tripsina 0.25%.

Pesar 0.25 gr. de tripsina y disolverlos en 20 ml. de S.S.B.
⁺⁺ ⁺⁺
 libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

f) Inhibidor de tripsina 0.50%.

Pesar 0.50 gr. de inhibidor de tripsina y disolverlos en 20 ml. de DMEM + S.B.F. o DMEM + Albúmina.

g) Líquido de centelleo (1 litro).

PPO (2,5-diphenyl-oxazole)	4 gr.
POPOP (Dimethyl POPOP)	200 mg.
Tolueno	667 ml.
Tritón X 100	333 ml.

h) Testosterona 100nM

Pesar 4×10^{-4} g. de testosterona, disolver en 10 ml. de etanol absoluto. Tomar una alícuota de 500 μ l. y diluir en 250 ml. de agua destilada. Aforar a 500 ml. y conservar en refrigeración.

i) Testosterona tritiada.

Tomar 100 μ l. de testosterona marcada y disolverlos en 2 ml. de etanol absoluto, de aquí, tomar una alícuota de 10 μ l. para obtener 100 000 cpm.

69

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**