



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LAS CELULAS DE LEYDIG
DE UN CULTIVO PRIMARIO DE TESTICULO DE
RATA RECIENTE NACIDA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

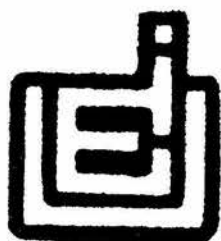
B I O L O G O

P R E S E N T A:

MANUEL SANCHEZ GUTIERREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTA C. ROMANO PARDO



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1995



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.

Dedico esta tesis con todo cariño a mis padres por otorgarme el milagro de la vida.

A mis hermanos Marcos, Blanca, Karla y Ricardo por todos los momentos compartidos.

A Verónica por ser un pilar de mi existencia.

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de esta tesis y a lo largo de mis estudios he tenido el apoyo de mucha gente que me ha ayudado, me ha enseñado, me ha guiado o solo ha estado junto a mi en los momentos importantes, por esto quiero brindar un sincero agradecimiento a todos ellos especialmente a,

La Dra. Marta Romano por todas las enseñanzas que me brindó durante la dirección de esta tesis.

Mis compañeros de la carrera, Oscar, Pablo, Reynaldo, Raúl, Hulk, Toño, Joel, Angel, Estela, Maricela, Reyna, Arodí, Imelda, Pat. y Lidia por su compañía.

Mis amigas, Evelia, Alejandra, Ceyde, Carmen y Verónica por su apoyo y comprensión.

Mis compañeros de laboratorio, Paty, Malú, Dolores, Raúl, Ricardo, Martha, Jesús, Armando, Carolina, Luzma y Alfonso.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera me han ayudado y de manera involuntaria haya omitido su nombre.

RESUMEN

El período perinatal es una etapa crítica en el desarrollo de las características y las funciones sexuales en los mamíferos. En la rata se ha estudiado el funcionamiento testicular en los últimos días de la etapa fetal y después de la primera semana del nacimiento. Se ha observado que existen grandes diferencias en cuanto a la morfología y funcionamiento de las células de Leydig así como también en la secreción y regulación de las hormonas esteroides. En el presente trabajo se estudió el comportamiento y evolución de cultivos de células de testículo de rata recién nacida (1-2 días de edad) por medio de la medición de la secreción de testosterona en condiciones basales y como respuesta al estímulo hormonal, utilizando además la tinción de la actividad enzimática como medio para la identificación y la evaluación de la actividad celular. Para lo cual, se disecaron los testículos y se disociaron con colagenasa. Se obtuvo así una suspensión celular que se incubó en cajas de plástico con medio de cultivo DMEM + suero bovino fetal + antibiótico en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ a 37 °C durante 24 h. Al final del período de incubación se obtuvo el medio y se midió la concentración de testosterona. Se lavaron las células y se incubaron con DMEM de dos maneras, 1) en ausencia o presencia de diferentes dosis de hCG durante 3 h y 2) con una dosis de hCG durante diferentes tiempos a 37 °C. Se midió también la secreción basal de testosterona y se realizó la tinción de la actividad de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa en las células después de 24, 48 y 72 h de cultivo. Se observó que la secreción basal de testosterona declina drásticamente después de 24 h de incubación. El estímulo con hCG mejora la respuesta celular en cuanto a secreción de testosterona de una manera dosis-dependiente. A diferencia de lo observado en las células de rata adulta y al igual que las células de las ratas fetales las células de recién nacido no presentan el fenómeno de regulación-negativa con dosis elevadas de hCG, ni se desensibilizan por la incubación previa con esta hormona.

INDICE

Agradecimientos	I
Resumen	II
Indice	III
1.- Introducción	1
1.2.- Desarrollo sexual de la rata	2
1.3.- Hormonas glicoproteínicas	4
1.3.1.- Gonadotropinas	4
1.3.2.- Efectos y mecanismos de acción de las gonadotropinas en el testículo	5
1.4.- Hormonas esteroides	8
1.4.1.- Biosíntesis	10
1.4.2.- Síntesis de testosterona	12
1.4.3.- Secreción de testosterona	16
2.- Antecedentes	19
3.- Hipótesis	23
4.- Objetivos	24
5.- Materiales y metodos	25
5.1.- Animales	25
5.2.- Cultivo Celular	25
5.3.- Secreción acumulada de testosterona	28
5.4.- Curva dosis-respuesta a hCG	30
5.5.- Desensibilización mediante la preincubación con hCG	30
5.6.- Curva temporal de respuesta a hCG	31
5.7.- Radioinmunoanálisis	31
5.8.- Histoquímica y microscopía	31
5.9.- Análisis estadístico de los resultados	32

6.- Resultados	34
6.1.- Evolución de los cultivos de las células de testículo de ratas recién nacidas	34
6.2.- Secreción basal de testosterona por células testiculares de rata recién nacida a diferentes tiempos de cultivo	34
6.3.- Secreción acumulada de testosterona	37
6.4.- Respuesta a hCG	40
6.5.- Respuesta a la desensibilización con hCG	43
7.- Discusión	45
8.- Conclusiones	50
9.- Literatura citada	51

1.- INTRODUCCION

El período perinatal es una etapa de particular trascendencia en la diferenciación sexual de los mamíferos. En la rata, los testículos producen alrededor del nacimiento una descarga de testosterona que es fundamental para el desarrollo de los mecanismos que controlan la secreción gonadotrópica, la conducta sexual y la diferenciación funcional de las glándulas sexuales accesorias (Corbier et.al.,1992). Durante la diferenciación sexual del feto son necesarias elevadas concentraciones de andrógenos para la estabilización de los conductos wolffianos y la masculinización de los genitales externos (Gordon, 1980; Warren et.al.,1984). La acción fundamental de la testosterona en esta etapa del desarrollo embrionario es promover el desarrollo de los conductos wolffianos, que darán lugar a la formación de los epidídimos, las vesículas seminales, los conductos deferentes y a los conductos eyaculadores. Este evento es seguido por la formación de la dihidrotestosterona (DHT), el producto 5α -reducido de la testosterona a nivel de los órganos blanco. El efecto primordial de este andrógeno es la virilización de los genitales externos del embrión masculino, un proceso que incluye la fusión de los pliegues labioescrotales y el desarrollo del escroto y del pene (Coffey et.al.,1971; Corpechot et.al., 1981; Moore, 1988).

Hacia el final de la vida intrauterina o en los primeros días del nacimiento, los andrógenos producen en el sistema nervioso central del embrión masculino un fenómeno conocido como "virilización hipotalámica", por medio de la cual se establece en la rata macho un patrón de conducta sexual masculina a partir de la pubertad y durante la vida del adulto (Gordon, 1980; George et.al., 1986).

1.2.- DESARROLLO SEXUAL DE LA RATA

El desarrollo sexual en la rata macho se puede dividir en 5 fases: 1.- Período fetal, que comienza alrededor del día 12 gestacional (Aubert et.al., 1985). 2.- Período neonatal, que comprende la primera semana después del nacimiento, durante el cual el sistema portal-hipofisario comienza a estabilizarse y los gonocitos en los túbulos seminíferos terminan su periodo de quiescencia mitótica. 3.- Período infantil comprendido entre los días 8 al 21; en esta edad las células de Sertoli cesan su división y comienzan dos fenómenos, la pérdida de sensibilidad a FSH y la estabilización de la barrera hemato-testicular. 4.- Período juvenil que termina alrededor del día 35 en el que se observa un marcado incremento en el contenido testicular de receptores a LH. Finalmente el período peripuberal, que termina alrededor de los 55 a 60 días de edad, en el que los niveles de testosterona sérica comienzan a aumentar más rápidamente. En este lapso se observan los primeros espermatozoides libres en el lumen tubular (alrededor del día 45) y se completan las separaciones balano-prepuciales (Ojeda et.al., 1980).

La diferenciación sexual comienza muy temprano, en la vida fetal, cuando se forman las cuerdas seminíferas en el día 13 de la gestación. Los receptores a LH en el testículo se detectan en el día 15 de la gestación; en este tiempo la estimulación con LH ocasiona una elevación en la producción de AMPc y testosterona. El número de receptores a LH aumenta después del día 18.5 de gestación y alcanza su nivel máximo alrededor del nacimiento (Feldman et.al., 1978; Warren et.al., 1984). Coincidiendo con este patrón el número de células intersticiales se incrementa junto con el contenido testicular de testosterona.

Después del nacimiento ocurre un aumento gradual en el contenido hipofisiario de LH y FSH acorde con la edad, al igual que en la respuesta de la glándula a la estimulación con LHRH. La respuesta máxima a FSH ocurre entre los días 25 y 35 de edad, mientras que la respuesta máxima a LH ocurre entre los 35 y 45 días de edad. Se ha observado que los receptores hipofisarios a LHRH aumentan durante las 4 primeras semanas de vida, alcanzan un máximo alrededor de los 30 días, y declinan entonces hasta los niveles del adulto entre los 60 y 80 días de edad. La declinación de los receptores a LHRH se encuentra inversamente correlacionada con el aumento de los niveles séricos de testosterona, lo que sugiere la existencia de una creciente acción de *retroalimentación negativa* de los esteroides testiculares sobre la función hipotalámico-hipofisiaria (Ojeda et.al., 1988).

Durante el período neonatal los niveles séricos de gonadotropinas son elevados, pero en pocos días declinan drásticamente. No se ha logrado aclarar por completo el patrón de secreción de LH durante el desarrollo de la rata, ya que la información obtenida es contradictoria. En cuanto al patrón de secreción de FSH la mayoría de los autores coinciden en que los niveles séricos de FSH aumentan durante el período juvenil-peripuberal, alcanzando un máximo entre los 30 y 40 días de edad; a partir de entonces se observa un decremento gradual hasta que se alcanzan los niveles del adulto (Döhler et.al., 1974; Chiappa et.al., 1977; Chan et.al., 1981).

1.3.- HORMONAS GLICOPROTEINICAS

Las hormonas glucoproteínicas de la hipófisis y la placenta comprenden una familia de hormonas estrechamente relacionadas que se encuentran en todos los vertebrados. Debido a que muestran homologías estructurales muy estrechas entre las especies se considera que evolucionaron de un precursor común (Bentley, 1982). En este grupo se encuentran la hormona estimulante de la tiroides (TSH), las gonadotropinas, con sus dos variedades, la estimulante del folículo (FSH) y la luteinizante (LH) de origen hipofisiario, y la gonadotropina coriónica humana (hCG) de origen placentario. Todas ellas tienen dos cadenas peptídicas (α y β), unidas en forma covalente por puentes disulfuro; a cada cadena se unen grupos carbohidratos constitutivos. Los azúcares que constituyen del 15 al 31 % del peso molecular de estas hormonas son la fucosa, la manosa, la galactosa, la glucosamina y la galactosamina. También se puede encontrar ácido siálico de manera inconstante. La secuencia de aminoácidos de la cadena α es idéntica o muy semejante para todas estas hormonas. Las cadenas β son las que confieren especificidad hormonal a la molécula completa, y tienen grandes diferencias en la secuencia de aminoácidos lo que distingue a una hormona de otras (Williams, 1985).

1.3.1.- GONADOTROPINAS

Como se mencionó anteriormente, las gonadotropinas son glicoproteínas formadas por dos cadenas, las subunidades α y β que a su vez llevan unidos grupos carbohidratos y ácido siálico.

Los órganos blanco de las gonadotropinas, son las gonadas masculina o femenina. El tejido gonadal presenta receptores específicos para cada una de estas hormonas. En el caso de la LH, esta hormona comparte su receptor con el de la gonadotropina coriónica (hCG) (Karsch, 1984).

1.3.2.- EFECTOS Y MECANISMO DE ACCION DE LAS GONADOTROPINAS EN EL TESTICULO

En la gónada masculina los receptores a LH/hCG se encuentran en las células de Leydig y los de la FSH en las células de Sertoli. Las gonadotropinas LH y hCG producen efectos rápidos y a largo plazo. La acción a corto plazo consiste en la estimulación máxima de la esteroidogénesis que tiene como consecuencia el aumento en la secreción de testosterona. La unión de la LH o hCG a sus receptores específicos de alta afinidad sobre la superficie de las células de Leydig ocasiona un incremento en la producción de AMPc intracelular y la activación de la proteína-cinasa dependiente de él (Cooke et.al., 1977; Dufau et. al., 1979). Estas hormonas provocan un aumento en la actividad de la esterasa del colesterol, y la fosforilación del sistema del citocromo P-450. También inducen una mayor actividad en las enzimas encargadas de la conversión de la pregnenolona a testosterona: 17α -hidroxilasa y $C_{17,20}$ -liasa (desmolasa); 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Aunque no es conocido el mecanismo exacto, se piensa que la estimulación aguda de la síntesis de AMPc ocasiona una elevación en el rango de asociación del substrato, el colesterol, con la cadena enzimática mitocondrial (P-450_{sc}). El colesterol es cortado por la P-450_{sc} para producir pregnenolona la que es metabolizada posteriormente a testosterona por

enzimas asociadas con el retículo endoplásmico liso (20-liasa, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) (Fig. 1) (Payne et.al., 1985). Asimismo estas hormonas promueven el reciclamiento de los receptores y en determinadas condiciones, la desensibilización de los mismos (Dufau et.al. 1988). En relación a los efectos a largo plazo de LH/hCG, se describe que la administración de estas hormonas en forma crónica, durante 5 semanas, produce la hipertrofia e hiperplasia de las células de Leydig (Tanka, 1986).

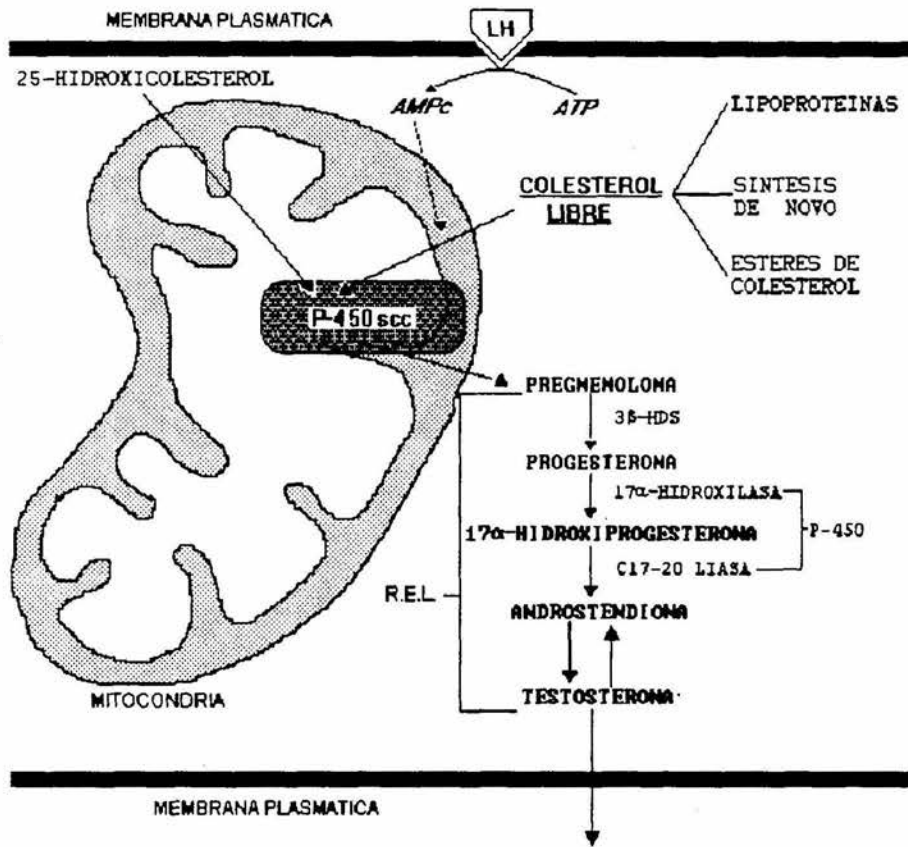


Fig. 1.- Mecanismo de acción de las gonadotropinas sobre la producción de testosterona en las células de Leydig, (Según Payne et.al.; 1990).

1.4.- HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides son uno de los componentes fundamentales del sistema endócrino. La importancia de las mismas puede inferirse de su amplia distribución en los seres vivos, desde los insectos hasta los vertebrados, de que es muy difícil de encontrar en los mamíferos un tejido sobre el que no tengan efecto y en que su función es imprescindible para la sobrevivencia del individuo y de la especie (Pedernera, 1993).

La forma estructura química básica de los esteroides son cuatro anillos aromáticos, tres ciclohexanos (A,B y C) y un ciclopentano (D), toda la molécula es conocida como ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 2). Sobre este núcleo se agregan cadenas laterales las que determinan las clases de esteroides.

El compuesto de 27 átomos de carbono (C_{27}) con núcleo colestano y grupos metilo en posición C_{10} y C_{13} y una cadena de ocho carbonos en C_{17} , corresponde al colesterol, compuesto básico a partir del cual se forman todas las hormonas esteroides.

A partir del colesterol se forman los compuestos de 21 átomos de carbono (C_{21}) que corresponden al núcleo de pregnano (Fig. 2), por pérdida de un segmento de la cadena lateral entre C_{20} y C_{22} . Estos compuestos por su actividad biológica se llaman progestinas como, pregnenolona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona, 20-dihidroxiprogesterona.

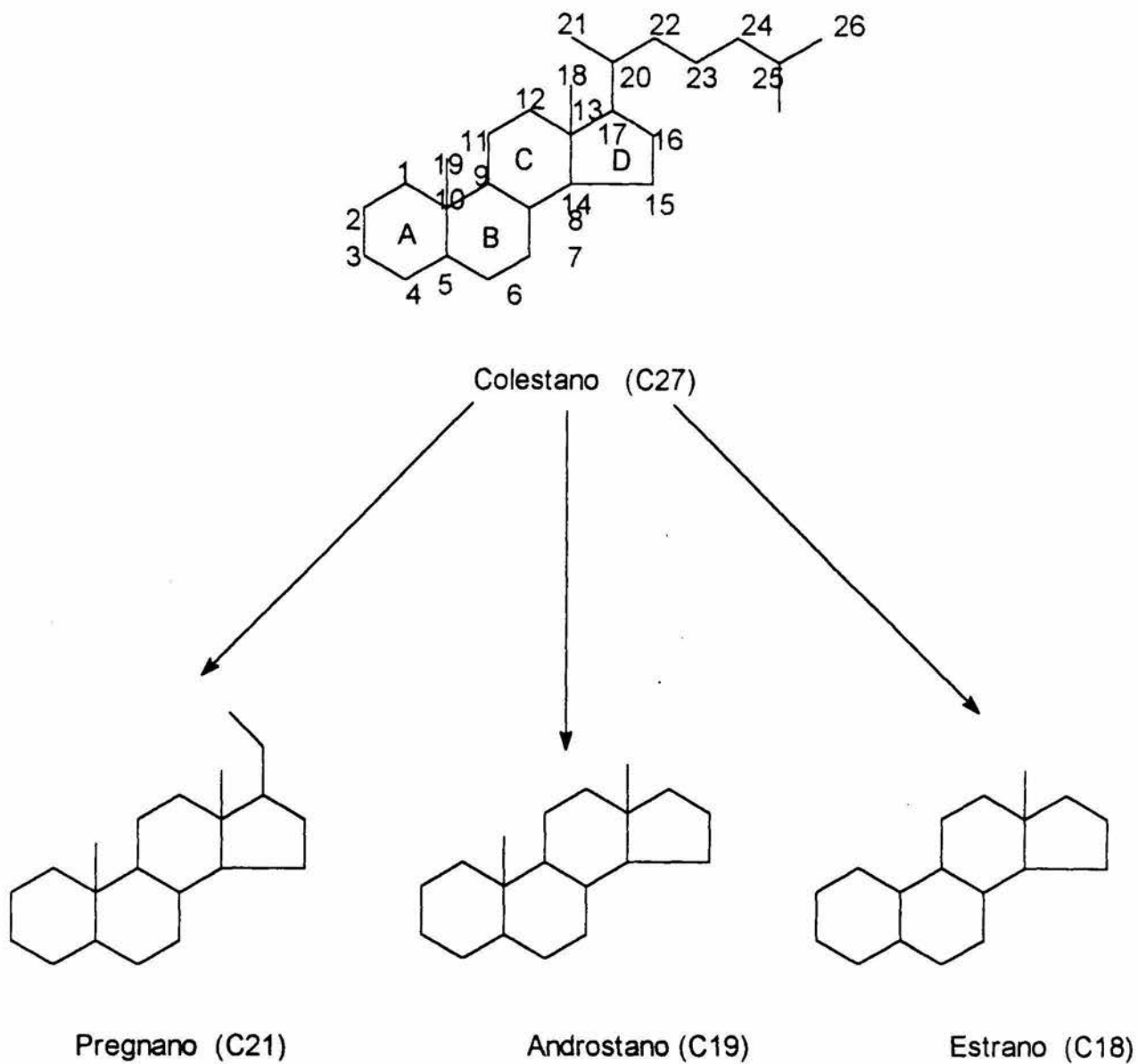


Fig. 2 .- Núcleos básicos de los diferentes tipos de hormonas esteroides.

Las progestinas dan origen a los andrógenos por pérdida de la cadena en C₁₇ lo que origina los compuestos con un núcleo de androstano. Los andrógenos son precursores biosintéticos de los estrógenos porque pueden ser aromatizados. Estos últimos han perdido el grupo metilo del C₁₀, tienen 18 carbonos (C₁₈), su anillo A está aromatizado y su grupo básico es el estrano (Fig. 2) (Baird, 1984).

1.4.1.- BIOSINTESIS

Como ya se mencionó, el colesterol es el precursor de todas las hormonas esteroides. Las células con función esteroideogénica lo pueden obtener de 3 maneras: 1) incorporándolo de la sangre a partir de las lipoproteínas circulantes, 2) utilizando el colesterol almacenado bajo la forma de ésteres en las inclusiones de lípidos del citoplasma, y 3) sintetizándolo "de novo" a partir del acetato (fig. 3). Cada tipo celular puede utilizar estas fuentes de manera preferencial, pero en general las células del testículo obtienen el colesterol de las lipoproteínas circulantes y/o de la síntesis "de novo" a partir del acetato (Morris et.al., 1959; Anderson et.al., 1978; Lipshultz et.al., 1991).

Las lipoproteínas de baja (LDL) y de alta densidad (HDL) se unen a un receptor en la membrana celular, el complejo lipoproteína-receptor es internalizado y degradado en los complejos lisosómicos, liberándose colesterol. Al parecer el colesterol asociado a la HDL es el más utilizado por las células testiculares de la rata (Payne et.al., 1985). El colesterol obtenido de la sangre se almacena en el citoplasma como ésteres de colesterol. El equilibrio entre los ésteres de colesterol de las inclusiones citoplásmicas y el colesterol

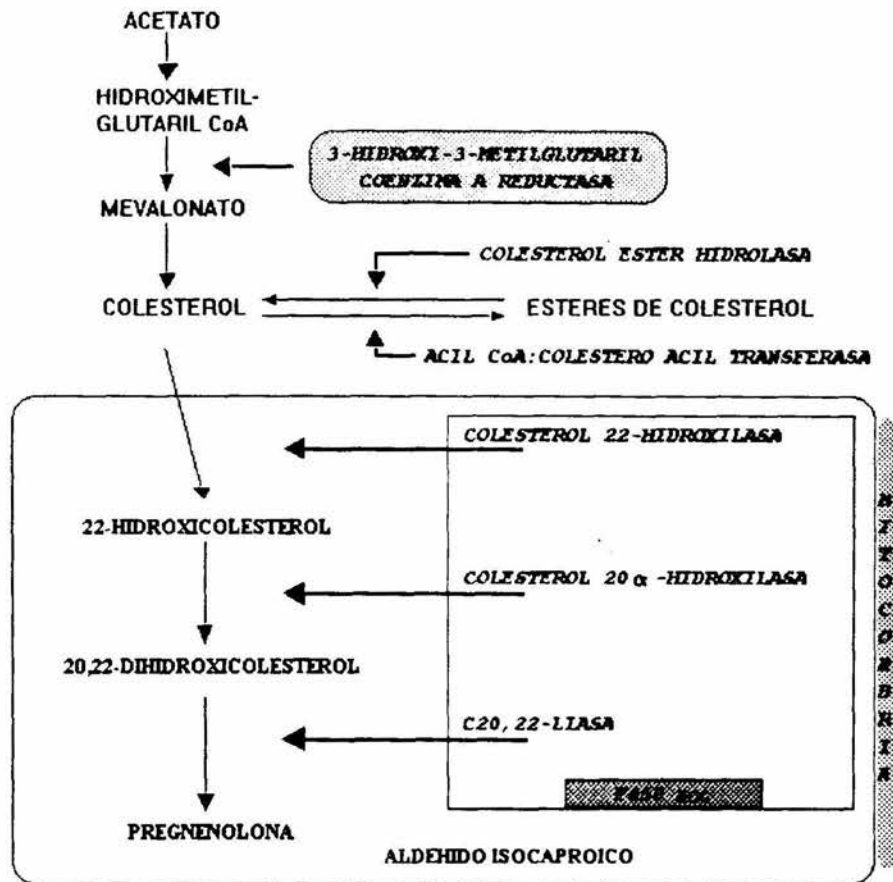


Fig. 3.- Esquema de la biosíntesis del colesterol y de su biotransformación a pregnenolona, el recuadro encierra los pasos metabólicos que ocurren en la mitocondria (Según Hall, 1985).

libre, depende del balance entre 2 enzimas, la colesterol ester sintetasa (ACAT, acil coenzima A colesterol acil transferasa) y la colesterol ester hidrolasa (fig. 3). El paso limitante de la biosíntesis de colesterol a partir de acetato es el catalizado por la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG coenzima A reductasa). Después de que la colesterol ester hidrolasa libera colesterol, este se une a las proteínas acarreadoras de esteroides (SCP₂), por medio de la cual es transportado a la membrana mitocondrial (Vahouny et.al., 1985; Albert et.al., 1980)(Fig. 4).

1.4.2.-SINTESIS DE TESTOSTERONA

El primer paso en la ruta de biosíntesis de la testosterona lo constituye la conversión a nivel mitocondrial del colesterol a pregnenolona. El colesterol es hidroxilado en las posiciones 22 y 20, lo que permite el corte de la cadena lateral formando un compuesto C₂₁ y liberando al aldehído isocaproico (fig. 3); este proceso implica la participación de 3 componentes: 1) una citocromo P-450, proteína de tipo hemo que hidroxila y puede cortar uniones C-C (P-450 scc), 2) una flavoproteína adenina dinucleótido (fAD) como transportadora de electrones, y 3) una proteína de tipo hemo, la adrenodoxina que actúa como intermediario entre la 1 y 2. Se considera que el colesterol se une a la P-450 scc y sufre las dos hidroxilaciones sin que se liberen los compuestos intermedios hasta formar pregnenolona (Miller, 1987; Anderson et.al., 1985).

La biotransformación de pregnenolona a androstendiona y testosterona en los mamíferos puede proceder a través de 2 diferentes rutas o vías metabólicas dependiendo

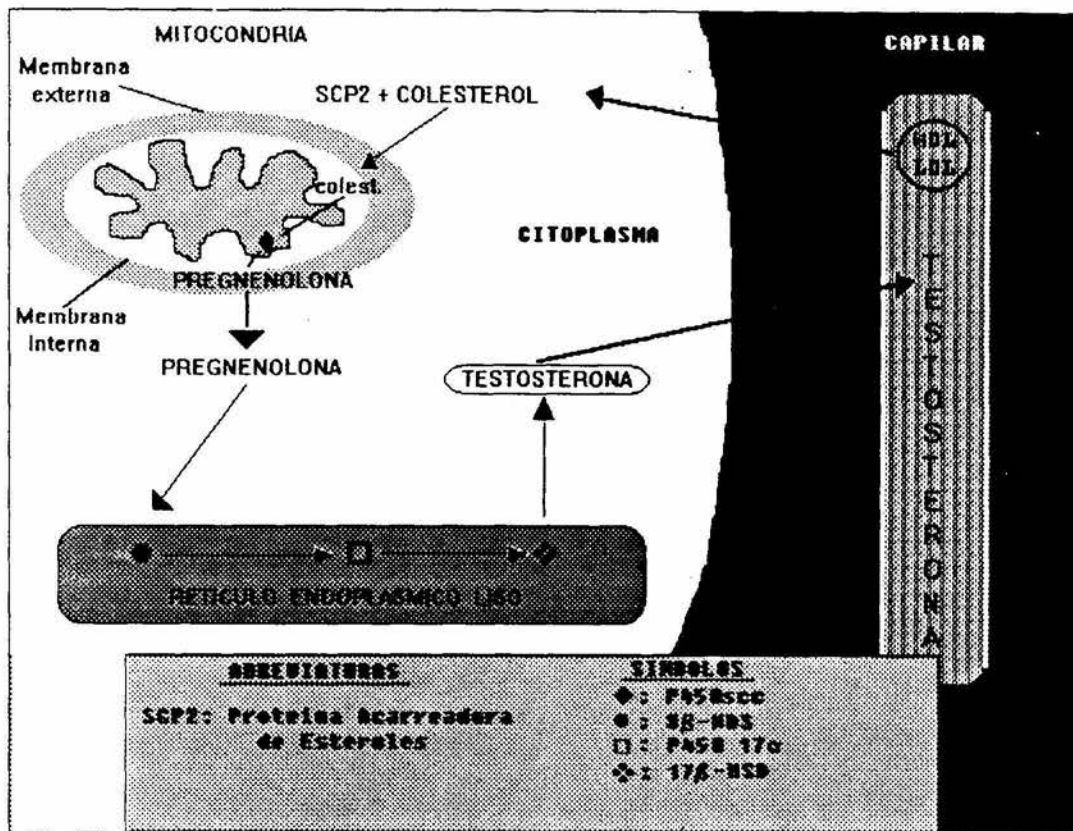


Fig. 4.- Organización hipotética de las enzimas esteroidogénicas y el movimiento intracelular de los esteroides durante la esteroidogénesis (Modificado de Lipshults et.al, 1991).

del órgano endócrino y/o de la especie. Una alternativa es la transformación de la pregnenolona a progesterona (vía Δ^4). Este paso requiere la participación de un complejo enzimático microsomal, la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, Δ^5 -4 isomerasa (3 β -HSD). La reacción es irreversible en condiciones fisiológicas y requiere NAD^+ como aceptor de electrones. La otra alternativa conocida como vía Δ^5 metaboliza la pregnenolona a 17 α -hidroxipregnenolona y posteriormente a Dehidroepiandrosterona (DHEA). Esta reacción se lleva a cabo por el complejo 17 α -hidroxilasa, C₁₇₋₂₀ liasa. Esta es una citocromo P-450 (P-450 C₁₇) que tiene la función de hidroxilar y cortar la unión C-C, tal como sucede en el caso del colesterol, pero en este paso la hidroxilación es en posición C₁₇ y el corte en la unión 17-20 (Fevold et.al., 1989)(fig. 5). La enzima es microsomal y requiere NADPH y solo FAD como transportadora de electrones. Los sustratos de esta enzima pueden ser pregnenolona y progesterona y los productos serán DHEA o androstendiona respectivamente, ambos andrógenos C₁₉. La DHEA puede ser transformada a androstendiona por acción de la 3 β -HSD. La enzima microsomal 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) cataliza la interconversión de androstendiona y testosterona con ayuda de NAD^+ (Hall, 1988; Ewin et.al., 1977)(Fig. 5). Se ha podido establecer que la biosíntesis de testosterona a partir de pregnenolona en las células de Leydig de testículo de humano y de perro operan, principalmente, aunque no de forma exclusiva, por la vía de los Δ^5 , mientras que en los testículos de los roedores, opera fundamentalmente la ruta de los Δ^4 (Hicks, 1988).

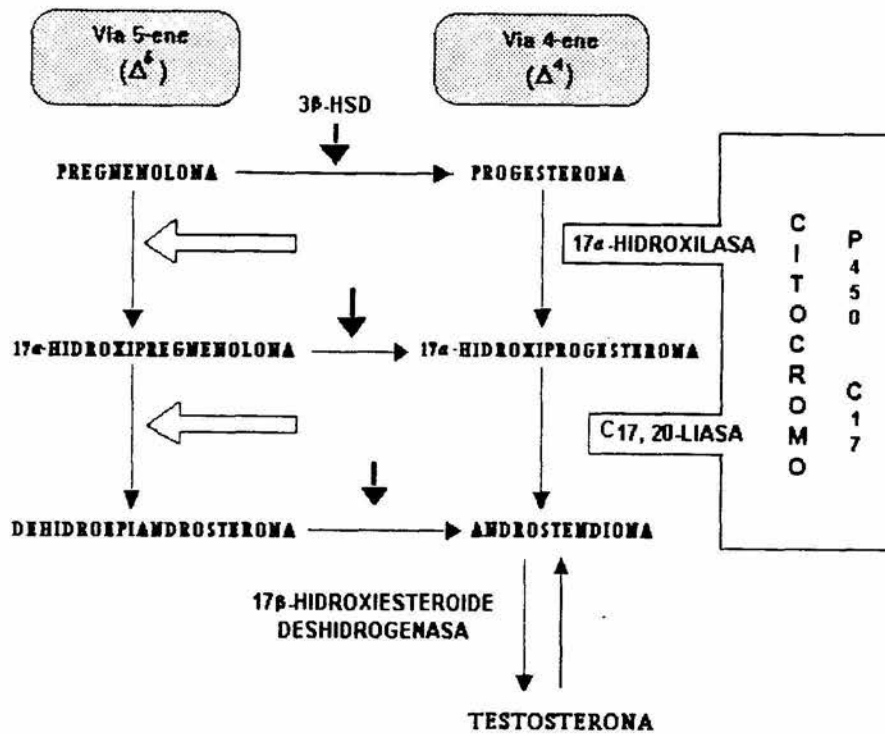


Fig. 5.- Metabolismo de la pregnenolona en la fracción microsomal para la formación de andrógenos mediante dos vías diferentes (Según Hall, 1988).

1.4.3.- SECRECIÓN DE TESTOSTERONA

El andrógeno más importante producido por las gonadas del macho es la testosterona; ésta juega un papel importante en diversos aspectos de la madurez sexual, conducta, espermatogénesis y manutención de los órganos sexuales accesorios. La testosterona también ejerce un control sobre la secreción gonadotrópica mediante un mecanismo de retroalimentación a nivel hipofisiario.

Durante el período fetal la testosterona es el principal andrógeno producido por los testículos, alcanzando su concentración máxima en el día 19 de gestación. Se mantiene este nivel hasta el nacimiento, para declinar posteriormente y alcanzar un nadir en el día 14 de edad (Feldman et.al., 1978; Dufau et.al., 1985). Durante el período infantil-juvenil, la testosterona deja de ser el principal andrógeno producido por los testículos de la rata, ya que los principales andrógenos producidos por los testículos inmaduros son, la androstendiona, 5α -androstendiol y los esteroides 5α -reducidos tales como la dihidrotestosterona; esto se debe a las diferencias en el desarrollo de varias enzimas como la 5α -reductasa en esta edad. Alrededor del día 25 de edad comienza a aparecer la actividad de otras enzimas como la 17α -hidroxilasa, la C17-20 liasa y la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Por lo tanto, pasan más precursores C_{21} a la vía sintetizadora de testosterona. La actividad de la 5α -reductasa declina después de los 40 días de edad, quedando la testosterona como el principal andrógeno en el adulto; el pico de los niveles séricos de testosterona se alcanza entre los 50 y 60 días de edad.

La esteroidogénesis testicular presenta dos fases de actividad durante la vida; la primera comienza durante la vida fetal (fig. 6); la segunda comienza en la pubertad y es característica del adulto. Estos cambios funcionales coinciden con variaciones morfológicas y numéricas en las células de Leydig, que al parecer conforman dos poblaciones con características propias. La primera de ellas aparece durante la vida fetal entre los días 15 y 16. El número de células alcanza un pico en el día 19 de gestación a partir del cual se inicia una disminución gradual que alcanza un nadir al día 15 después del nacimiento (Niemi et.al., 1963; Tapanainen et.al., 1984). La segunda población celular aparece durante el proceso de madurez sexual a donde, alrededor de la segunda semana de vida se observa una transición desde una población de células de Leydig fetales a una población adulta. A partir de este momento, comienza un incremento en el número de células que alcanza los niveles del adulto alrededor de los 30 días de edad (Niemi et.al., 1963; Huhtaniemi et.al., 1984; Habert et.al., 1991). Es de particular importancia lo señalado anteriormente, ya que en la literatura se ha discutido la existencia de estas dos poblaciones de células de Leydig y se ha planteado que existen posibles diferencias en cuanto a su funcionamiento y regulación. Sin embargo, estas diferencias no han sido totalmente aclaradas y existen aún discrepancias entre los autores sobre este punto.

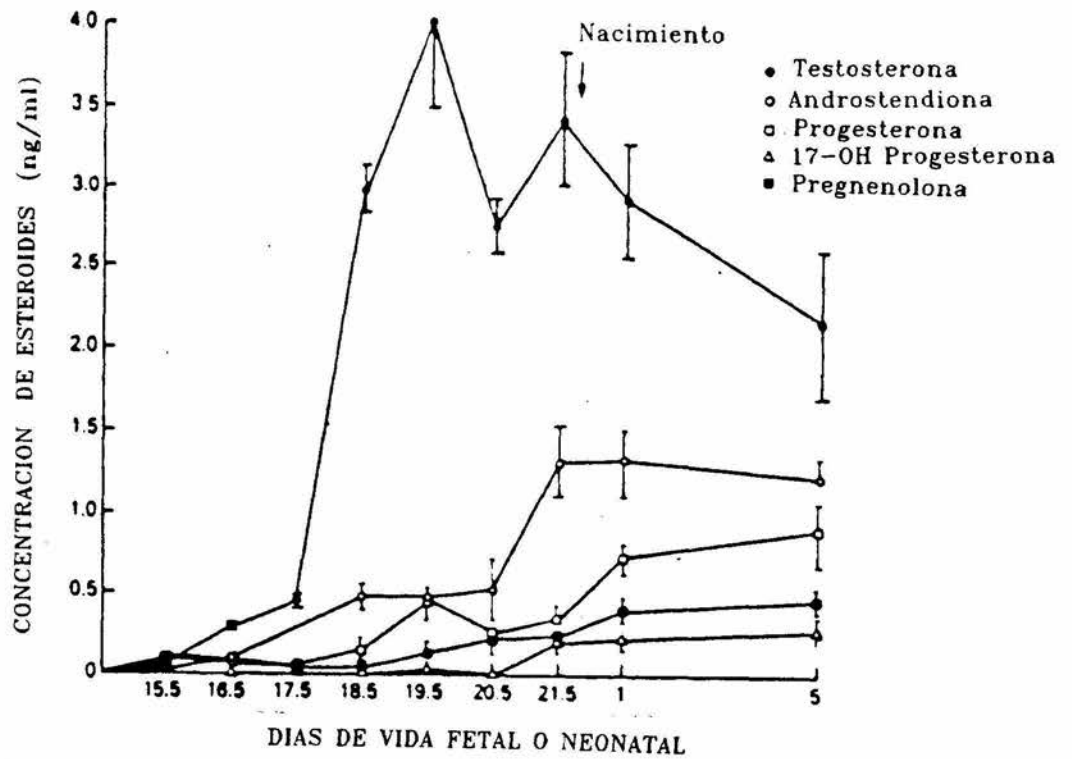


Fig. 6.- Contenido testicular de varios esteroides de la vía androgénica en ratas en el período fetal (Tomado de Huhtaniemi et.al., 1984).

2.- ANTECEDENTES

Roosen-Roungue y cols.(1959), postularon la existencia de dos poblaciones diferentes de células de Leydig en la rata, una fetal-neonatal y otra adulta, esto fue corroborado posteriormente por los estudios histoquímicos de Lording y Kresten (1972) y por Tapanainen y cols. (1984) que dividieron la población de células de Leydig en fetal y adulta en base a criterios morfológicos. En trabajos más recientes, Kuopio y cols. (1989) al estudiar al microscopio electrónico las células de Leydig de ratas durante el período perinatal observaron que después del nacimiento, dichas células forman acúmulos o grupos conspicuos que son rodeados por una capa de células y material extracelular. Después de la 2a. semana de vida las células de estos acúmulos disminuyen su tamaño y contenido de esteroides, mientras que los grupos comienzan a desaparecer. El período en el que se supone se realiza la transición de la población de células de Leydig fetales a adultas, aún no se ha establecido. Autores como Mendis-Handagama y cols. (1987) encontraron un incremento en el número de células de Leydig por testículo entre los 5 y 10 días después del nacimiento. En cambio Kerr y cols. (1988) no hallaron cambios significativos en el número de células durante la primera y segunda semanas de vida, mientras que Bartolussi y cols. (1990) afirman que la población adulta de células de Leydig aparece a partir de los 10 días de edad. En cuanto a la respuesta al estímulo hormonal Huhtaniemi y cols., (1981) al comparar las dos poblaciones de células de Leydig, encontraron marcadas diferencias en la capacidad de sintetizar testosterona como respuesta al estímulo con hCG, la cual es 4 veces más elevada en las ratas neonatas. Por otro lado, se ha observado que la producción de testosterona, pregnenolona y AMPc por unidad de peso de tejido son más elevadas en los testículos de rata neonata (Huhtaniemi

et. al., 1982). Se ha observado también que los testículos de ratas en gestación producen elevadas cantidades de esteroides, las cuales declinan gradualmente después del nacimiento (Tapanainen et.al., 1984; Huhtaniemi et.al., 1984; Habert et.al. 1991). Esta declinación en su producción que se observa después del nacimiento, se atribuye principalmente a la regresión de la población fetal de células de Leydig que ocurre para dar paso a la población adulta.

En los testículos de rata adulta, la habilidad de las células de Leydig para responder a la estimulación sostenida con gonadotropinas está limitada por el desarrollo de un estado refractario asociado con la pérdida de receptores para LH y a lesiones esteroideogénicas, que al parecer son el resultado de un efecto mediado por estrógenos (Hsueh et.al., 1976; Dufau et.al., 1979; Catt et.al., 1980; Cigorraga et.al., 1980; Nozu et.al., 1981; Dufau et. al., 1984 b), (Fig. 7). Esta desensibilización se debe al efecto que producen las gonadotropinas sobre la maquinaria enzimática de la célula, inhibiendo la 17α -hidroxilación y el rompimiento en $C_{17,20}$ que son dos pasos críticos en la ruta biosintética de los andrógenos (Cigorraga et.al., 1978; Dufau et.al., 1984 b), (Fig. 6). Sin embargo, los testículos de ratas en el período fetal y neonatal al parecer son refractarios al proceso de desensibilización, ya que al estudiar los testículos de ratas neonatas inyectadas con diferentes dosis de hCG, Huhtaniemi y cols. (1982) observaron una elevada producción de testosterona *in vitro* pero no encontraron evidencias claras del fenómeno de regulación negativa. En trabajos más recientes, Habert y cols. (1989) estudiaron los testículos de ratas durante los últimos 4 días de vida fetal sin encontrar la presencia de lesiones esteroideogénicas. La falta de este fenómeno tan característico del adulto, en las células de Leydig fetales se ha atribuido a la ausencia de regulación de la vía esteroideogénica por estrógenos, ya que en dicha población se ha encontrado una baja

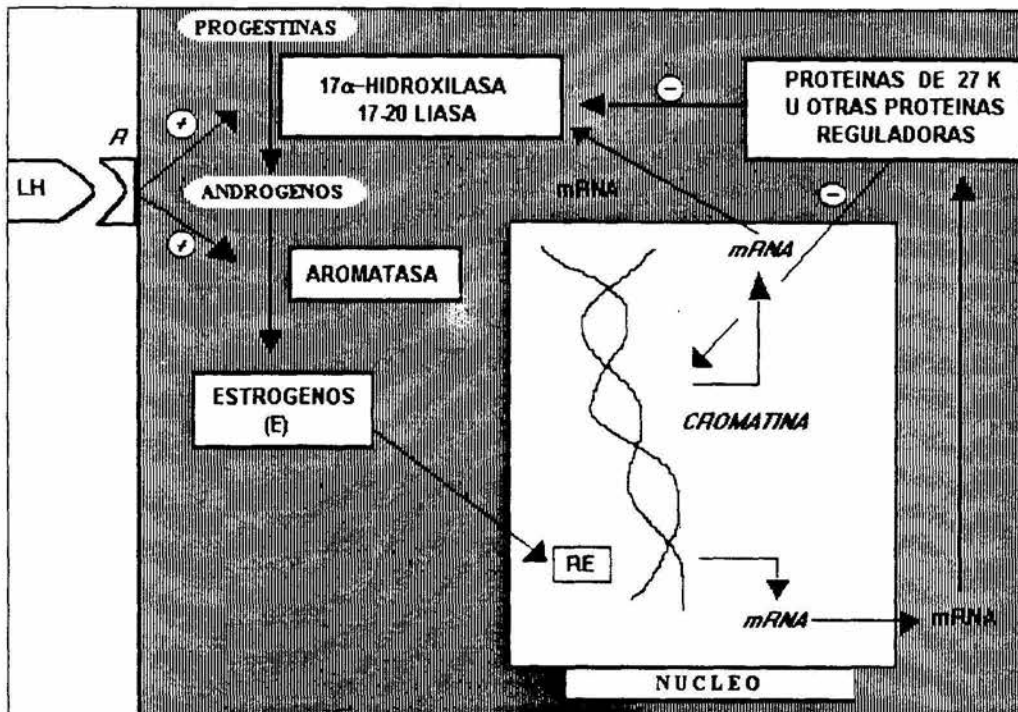


Fig. 7.- Efectos mediados por gonadotropinas (LH y hCG) y lesiones en la vía esteroidogénica mediadas por estrógenos. Las gonadotropinas promueven la actividad de las enzimas de la familia de citocromo P-450, 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa, pero también ocasionan una regulación negativa de estas enzimas a través de los efectos nucleares del estradiol (Tomado de Dufau, 1988).

actividad de aromatasas y la producción de estrógenos es indetectable (Tsai-Morris et al., 1985; Dufau, 1988).

Al hablar de 2 poblaciones celulares diferentes se entiende que funcionan en diferentes ambientes hormonales (in utero vs vida adulta), por tanto es razonable asumir que presenten diferencias en su funcionamiento y en sus características regulatorias. Se conocen a fondo las características funcionales de las células testiculares de rata adulta, ya que se han realizado estudios in vivo, in vitro o en cultivo; pero es poco conocido el funcionamiento y las características de las células testiculares de las ratas recién nacidas, en cultivo.

En el presente trabajo se pretende desarrollar y caracterizar un modelo de cultivo de células testiculares con el objeto de estudiar los patrones de secreción de testosterona y la dependencia de dichas células a hormonas y a factores tróficos en la rata recién nacida. El profundo conocimiento de este modelo experimental permitirá asimismo investigar la influencia de los factores que influyen en la función y evolución de esta población celular.

3.- HIPOTESIS

El desarrollo de las células de Leydig en la rata se lleva al cabo en 2 etapas. La primera se presenta en la etapa fetal y la segunda durante la madurez sexual. La existencia de estas dos fases de crecimiento ha llevado a postular la existencia de 2 poblaciones de células de Leydig con diferentes características morfológicas, funcionales y de regulación, por tanto, se espera que las células de testículo de ratas recién nacidas, en cultivo que provienen de la población fetal, también presenten características propias, diferentes a la población adulta, en particular aquellas relacionadas con la secreción de testosterona y con la regulación y respuesta a hormonas gonadotrópicas.

4.- OBJETIVOS

- 1.- Caracterizar el patrón de secreción de testosterona en células de testículo de rata recién nacida en cultivo.
- 2.- Identificar a las células esteroideogénicas cultivadas mediante técnicas histoquímicas y observar la evolución de las mismas en cuanto a la secreción de testosterona y presencia de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.
- 3.- Estudiar la respuesta al estímulo gonadotrópico de las células del testículo de rata recién nacida, en cultivo, investigando el efecto de hCG en tiempos cortos y por 24 horas.

5.- MATERIALES Y METODOS

5.1.- Animales

Se utilizaron 24 ratas Wistar machos de 1-2 días de edad proporcionadas por el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, las cuales se mantuvieron bajo un régimen de luz/obscuridad de 12/12 h, una humedad relativa del 50% y una temperatura de 22 a 25 °C y se sacrificaron por medio de decapitación.

5.2.- Cultivo celular

Para realizar el cultivo de testículo se utilizó una modificación del método propuesto por Dufau y cols., (1975). Para ello se obtuvieron los testículos de las ratas; se lavaron con medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Nueva York) y se extrajo la cápsula y el tejido conectivo. Los órganos enteros fueron expuestos a colagenasa (Gibco, N.Y., 0.5 mg/ml) y albúmina sérica de bovino (ABS, Sigma Chemical Co., St. Louis M.O., 1 mg/ml) durante 20 minutos en un baño María con agitación continua a 37⁰ C (Presicion Shaking incubator, Chicago Illinois). La dispersión se completó utilizando una pipeta Pasteur. Las células disociadas se centrifugaron a 800 rpm. durante 5 minutos en una centrifuga Beckman modelo TJ-6 (Beckman Co. Palo Alto, California). La pastilla se resuspendió en medio DMEM con 10% (V/V) de suero de

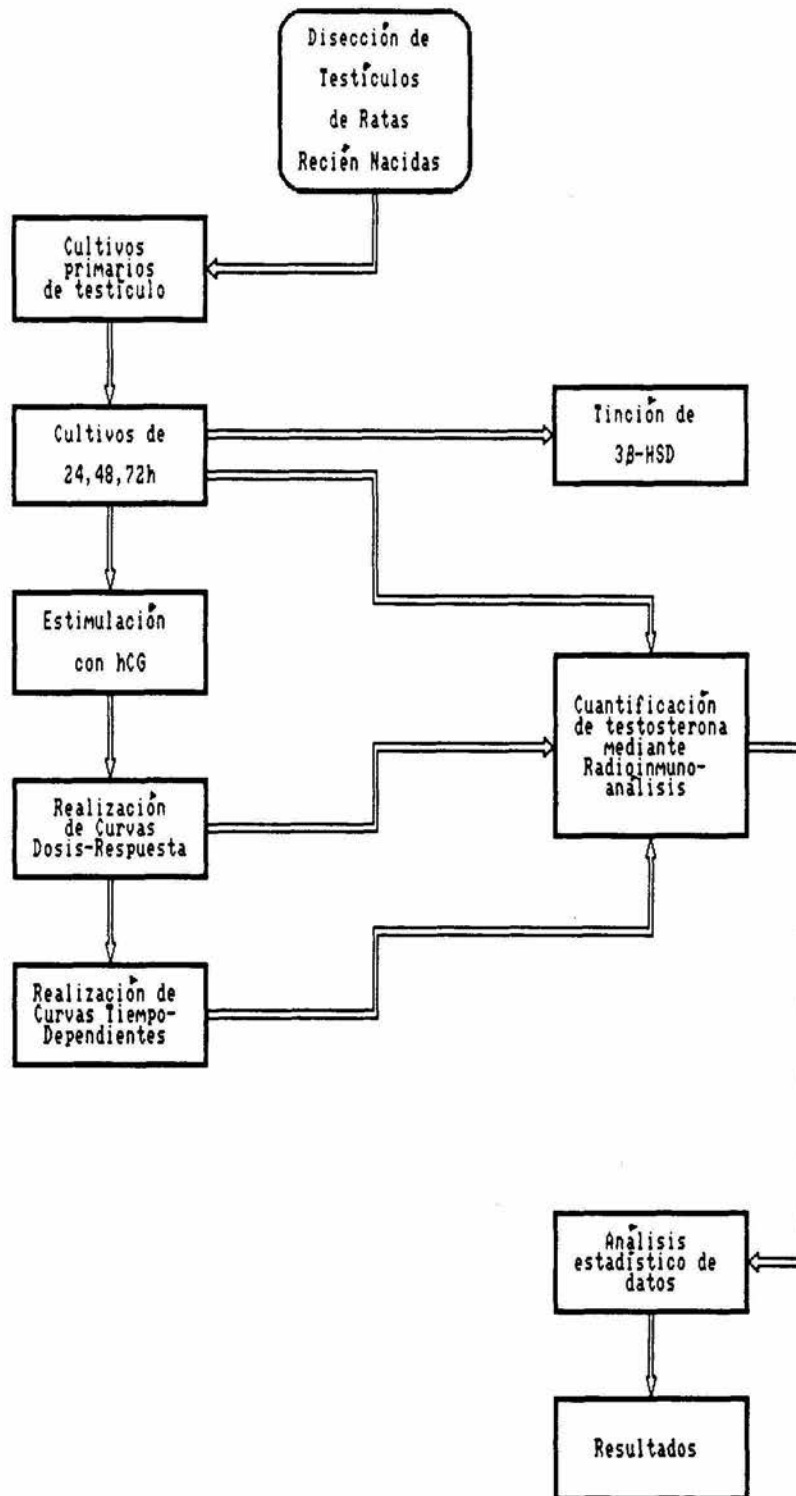


Fig. 8.- Diagrama general de la metodología.

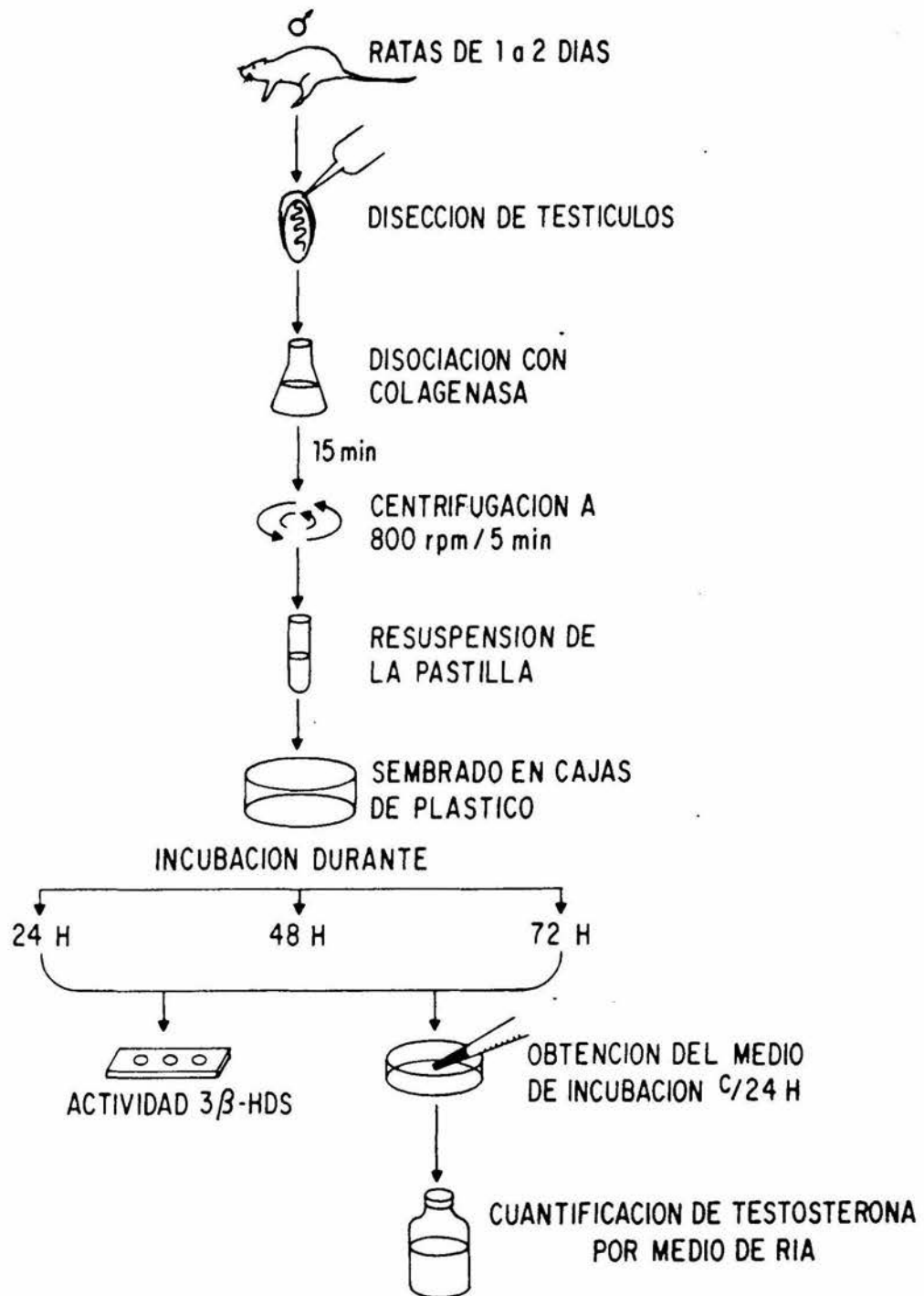


Fig. 9.- Metodología utilizada para realizar el cultivo de células de testículo.

bovino fetal (SBF, BIOEXPORT, México) y 1% (V/V) de antibióticos (Penicilina-estreptomicina; Gibco, N.Y.). Las células se sembraron en cajas de plástico de 35 x 10 mm (Falcon, Oxnard Ca.) y se mantuvieron en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire a 37 °C con una humedad del 95% en una incubadora Steri-cult 200 incubator modelo 3033 S/N 36441-2708 (Forma Scientific Inc. Ohio USA). Para evaluar la viabilidad celular se tomó una alícuota de 50 µl de la suspensión celular la cual se diluyó con 950 µl de DMEM y se agregaron 10 µl de azul de tripan (Sigma), se dejaron reaccionar durante 10 minutos y posteriormente se colocó una muestra en un hematocitómetro para cuantificar el número de células teñidas.

5.3.- Secreción acumulada de testosterona

Después de la realización del cultivo, las células se mantuvieron en las condiciones de incubación antes descritas por períodos de 24, 48 y 72 h. El medio de cultivo se recuperó cada 24 h, las células se lavaron con medio fresco y se siguieron incubando con medio DMEM + 10% de SBF + 1% de antibióticos. El medio de cultivo recuperado se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante se almacenó a -4° C (por un período que no excedió de 1 semana), para el posterior análisis de testosterona.

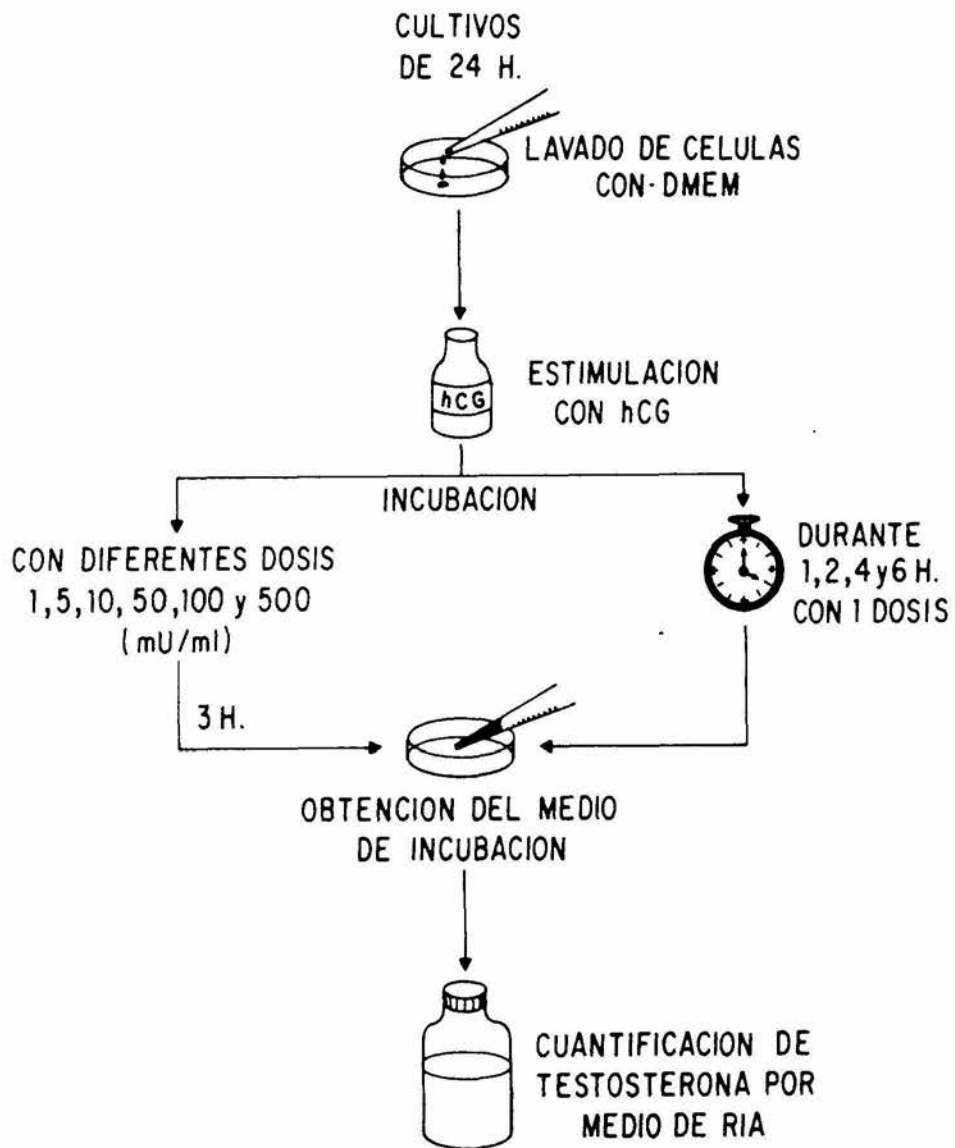


Fig. 10.- Diagrama de la metodología utilizada para la realización de las curvas dosis-respuesta y tiempo-dependientes.

5.4.- Curva dosis-respuesta a hCG

Las células testiculares previamente cultivadas por 24 h fueron lavadas con medio DMEM e incubadas con DMEM + 0.1mM de 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma, St. Louis M.O.) y diferentes concentraciones de gonadotropina coriónica humana (hCG, Sigma, St. Louis M.O., 0, 1, 5, 10, 50, 100 y 500 mU/ml) en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire durante 3 horas a 37⁰ C. Al término del período de incubación se aspiró el medio y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se almacenó a -4⁰ C para el posterior análisis de testosterona.

5.5.- Desensibilización mediante la preincubación con hCG

Se realizó un cultivo con las condiciones antes mencionadas en el cual se las células de testículo de rata recién nacida se incubaron con o sin hCG (20 mU/ml) durante 24 horas. Al término de este período de tiempo, se lavaron las células con medio DMEM fresco y se incubaron nuevamente con o sin hCG (20 mU/ml) durante 3 horas a 37⁰ C . En este caso se comparó la secreción estimulada de testosterona por células preincubadas durante 24 horas con hCG y las que no habían sido expuestas a la hormona. Después del período de incubación se recuperó el medio y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, se desechó la pastilla y el sobrenadante se almacenó a -4⁰ C para el posterior análisis de testosterona.

5.6.- Curva temporal de respuesta a hCG

Las células testiculares previamente cultivadas por 24 horas se incubaron en ausencia o presencia de una dosis máxima de hCG durante diferentes tiempos (1, 2, 4 y 6 h) utilizando el método descrito anteriormente.

5.7.- Radioinmunoanálisis

Las concentraciones de testosterona en el medio de incubación se determinaron por medio de radioinmunoanálisis (RIA). Se utilizó un anticuerpo antitestosterona de ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, Ca.) que une, además, 18.75% de 5 α -dihidrotestosterona. El anticuerpo se utilizó en una dilución final de 1:56,000 y la hormona marcada fue la (1,2,6,7-³H) testosterona (New England Nuclear Boston, M.A.). 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-³H testosterona se realizó en un contador para emisiones β (Packard, 2000 CA tri-carb). La sensibilidad del ría fue de 6.25 pg/ml. Los datos del RIA se analizaron por computadora utilizando el análisis de regresión descrito por Rodbard y Lewald (1970).

5.8.- Histoquímica y microscopía

En algunos cultivos se realizó la técnica de identificación de la células esteroideogénicas por medio de la reacción para Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa,

utilizando una modificación del método propuesto por Steinberger y cols., (1964). Se sembraron 500µl de la suspensión celular (Aprox. 1.5×10^5 cel.) obtenida con la metodología descrita anteriormente, sobre cubreobjetos de vidrio colocados en una placa de 24 pozos (Costar, Cambridge M.A. USA) y se mantuvo en condiciones de cultivo durante 24, 48 y 72 h. Al término de cada periodo de cultivo las células fueron lavadas con amortiguador Trizma HCl (Microlab, México. 0.1 M, pH 7) e incubadas con 500 µl de β-nicotinamida adenina dinucleótido (NAD Sigma, St. Louis M.O., 1mg/ml), azul nitro de tetrazolio (Sigma, 0.5mg/ml) y dehidroepiandrosterona (DHEA Sigma, 2mg/ml), a 37° C en un baño María y agitación continúa durante 3 h. En las muestras control se omitió la DHEA. Después de la incubación las células que se encontraban pagadas en los cubreobjetos se fijaron con formol salino al 10% (V/V) durante 10 min. Posteriormente se lavaron con Trizma HCl 0.1 M, pH 7, se deshidrataron en pasos sucesivos de etanol-xilol y se montaron con Permount. Se evaluó la reacción enzimática positiva en un microscopio Nikon modelo YS2-H, estimándose cualitativamente el porcentaje de células esteroideogénicas.

La evolución de los cultivos de células testiculares se observó y fotografió en un microscopio invertido (Zeiss MC 63, West Germany) utilizando óptica de contraste de fases.

5.9.- Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos, se analizaron por computadora utilizando el programa estadístico INSTAT.

En el caso de los datos de la curva dosis-respuesta, tiempo dependiente y de secreción acumulada se les aplicó la prueba de ANOVA y solo en el caso de las 2 primeras se les aplicó posteriormente la de Bonferroni para discernir las diferencias entre grupos. A los datos de la secreción acumulada de testosterona se les aplicó la prueba de "t" de Student.

6.- RESULTADOS

6.1.- Evolución de los cultivos de las células del testículo de ratas recién nacidas.

Al realizar la prueba de viabilidad en las células testiculares obtenidas mediante la dispersión enzimática, se observó un porcentaje elevado de células vivas (95%).

Después de 24 horas de incubación, las células cultivadas formaron una monocapa, en la cual se encontraban distribuidas de manera uniforme diferentes tipos celulares (Fig. 11). La identificación de las células de Leydig se realizó mediante la detección de la actividad de la Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), (Fig. 12). Las zonas oscuras representan los depósitos de formazan los cuales indican la actividad enzimática de las células esteroideogénicas, que se encuentran fundamentalmente en acúmulos junto a otros tipos celulares que no presentan depósitos de formazan.

6.2.- Secreción basal de testosterona por células testiculares de rata recién nacida a diferentes tiempos de cultivo.

Se estudió la actividad secretora de las células del testículo de animales recién nacidos en cultivos, los cuales se mantuvieron en incubación durante 24, 48 y 72 h. Los medios se recolectaron cada 24 h y se reemplazaron por uno fresco que se mantuvo otras 24 h en contacto con las células.

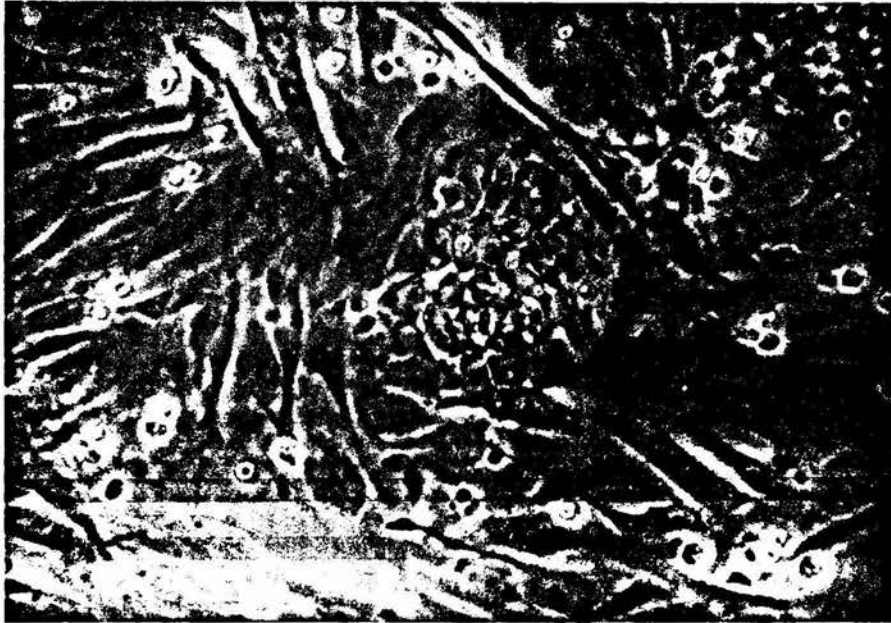


Fig. 11.- Cultivos de células de testículo de rata recién nacida después de 24 horas de incubación 165X.

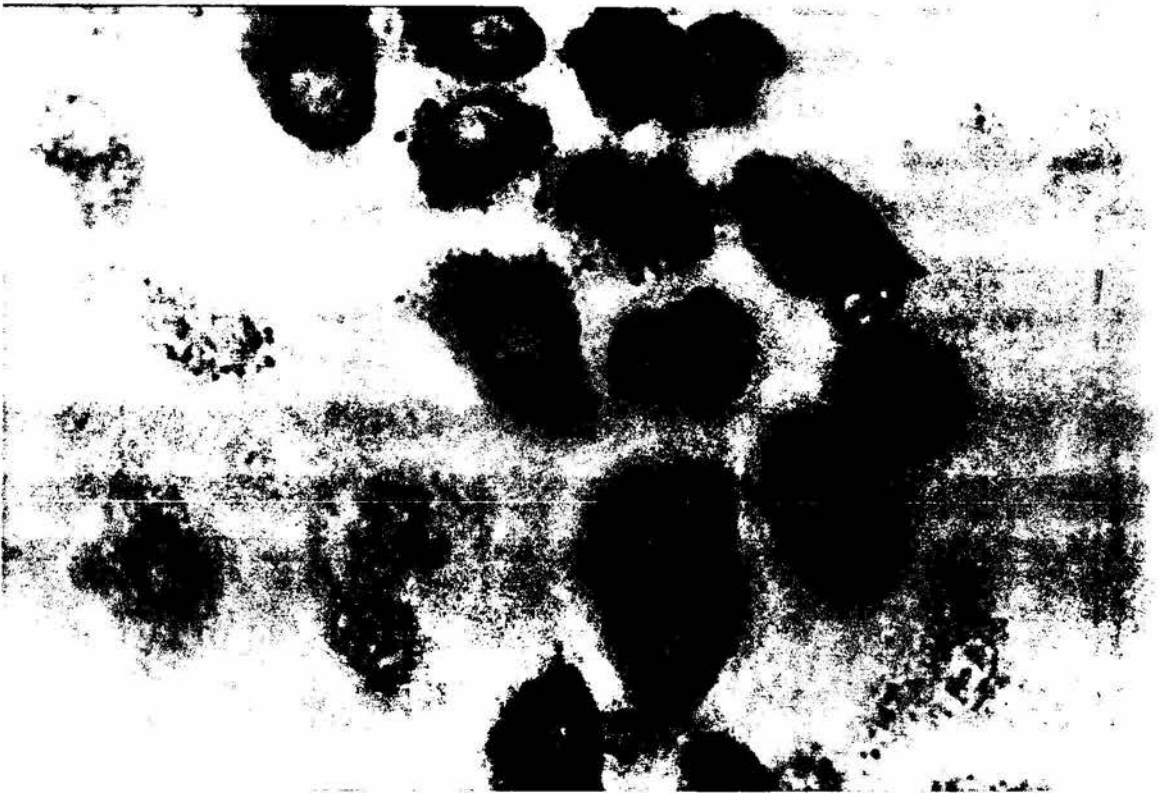


Fig. 12.- Tinción histoquímica para detección de Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en células de testículo de rata recién nacida. Se puede apreciar el depósito de granos de formazan en el citoplasma. Foto superior en contraste de fases 250X; foto inferior 500X.

En la fig. 13, se observa que existe una elevada producción de testosterona en los medios obtenidos de los cultivos de 24 horas que alcanzaron en este período una concentración de 47 ng/ml. La secreción de testosterona disminuye significativamente 24 horas después hasta alcanzar un nivel de 0.7 ng/ml/24 h en los cultivos de 72 horas. Esta diferencia observada en la producción de testosterona es muy marcada ya que en el caso de los cultivos de 24 horas dicha concentración fue de 10 y 30 veces mayor que la observada para los cultivos de 48 y 72 horas respectivamente.

6.3.- Secreción acumulada de testosterona.

En lo que respecta a la secreción acumulada de testosterona en los cultivos, se observó una secreción significativa en las primeras 24 h, que superó los 40 ng/ml. En las siguientes 48 h de cultivo se observó poco cambio en la secreción de testosterona, con respecto a las 24 h aumentando únicamente 6 ng en este período de tiempo (Fig. 14).

Para profundizar en los resultados obtenidos, se comparó la actividad de la enzima 3β -HSD, evaluada por histoquímica en cada uno de los tiempos de cultivo mencionados anteriormente. Las observaciones realizadas indican que se produce una disminución en el número de células teñidas positivamente al transcurrir el tiempo de cultivo, ya que en las preparaciones de las células cultivadas durante 24 h se tiñeron el 35%, mientras que en las células cultivadas durante 48 y 72 h se tiñeron el 15 y el 5%, respectivamente.

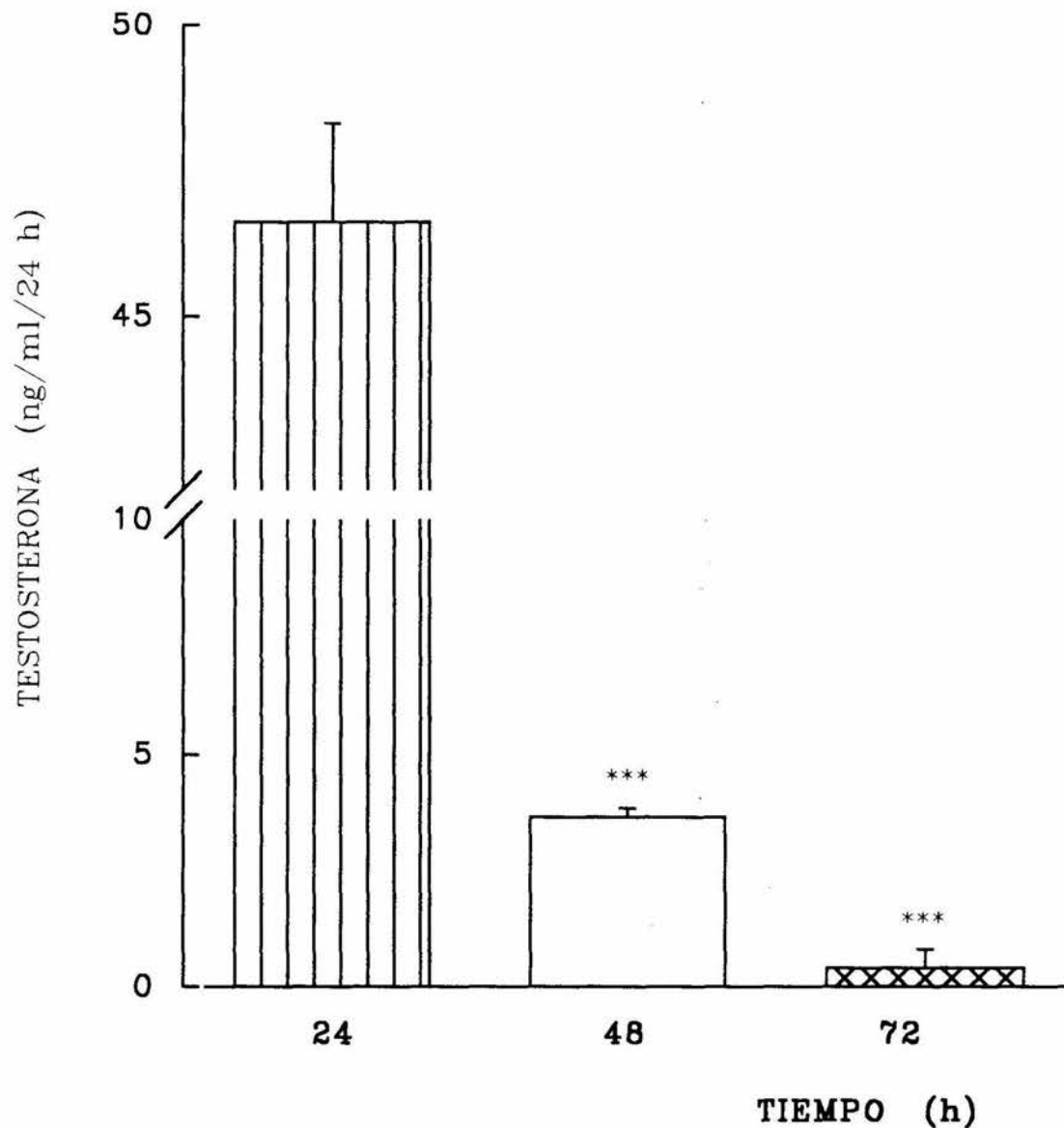


Fig.- 13 Concentración de testosterona en el medio de cultivo de las células del testículo de rata recién nacida. Las muestras se recolectaron cada 24 h de cultivo. En cada ocasión se reemplazó el medio por uno fresco que estuvo otras 24 h en contacto con las células, al final de cada periodo se tomó el medio para determinar la cantidad de testosterona por medio de radioinmunoanálisis. Se observa una elevada producción basal de testosterona en los cultivos de 24 h la cual disminuye significativamente a las 48 y 72 h. Cada barra muestra la media \pm DE de las mediciones realizadas por triplicado en 4 cultivos. Al comparar estadísticamente los resultados se obtuvo una diferencia significativa entre 24 y 72 h. (***, $p < 0.001$).

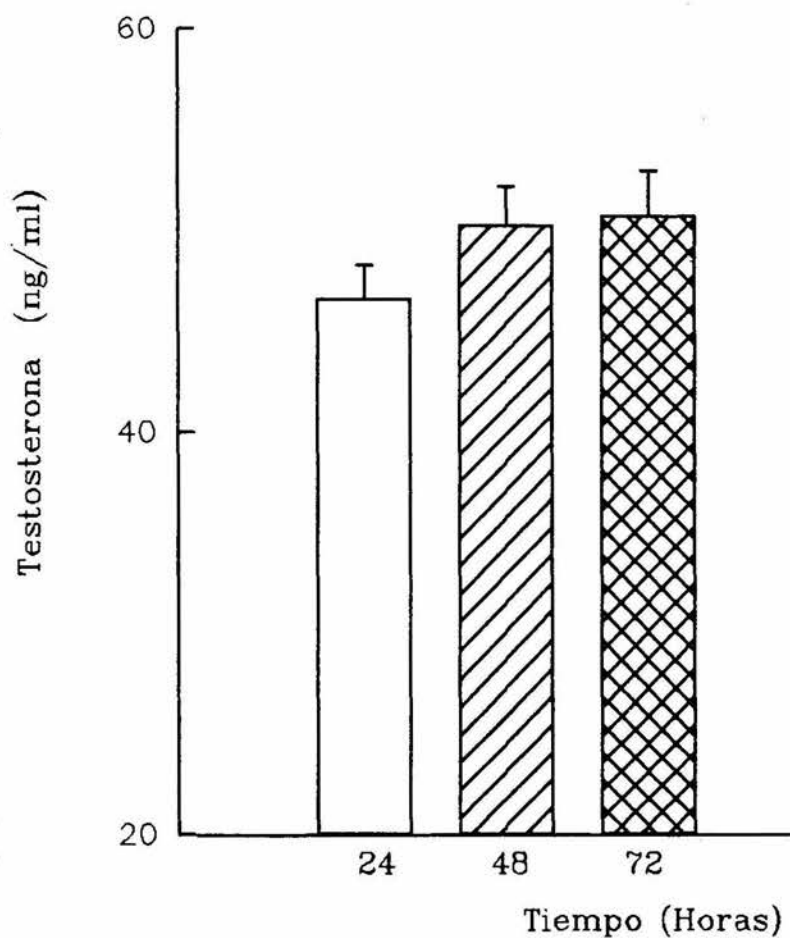


Fig. 14.- Secreción acumulada de testosterona en cultivos de testículo de rata recién nacida. Al transcurrir las primeras 24 horas se observa una importante secreción (mayor de 40 ng/ml), mientras que a las 48 y 72 h de cultivo no se observa un aumento significativo en la secreción de testosterona. Cada triángulo representa la media \pm la desviación estandar de las concentraciones obtenidas en 3 experimentos realizados por triplicado. El análisis estadístico de los datos indicó que no existen diferencias significativas en la secreción de testosterona entre 24 y 72 h.

En base a estos resultados se decidió utilizar el modelo de 24 h de cultivo para la realización de los experimentos posteriores, ya que este período parece ser el más adecuado para lograr los objetivos planteados en este estudio en particular.

6.4.- Respuesta a hCG

Se estudió la secreción de testosterona en cultivos de 24h de células testiculares de rata recién nacida incubados durante 3 h en presencia de diferentes dosis de hCG o bien en ausencia de la hormona (Fig. 15); se observó una buena respuesta celular a la hCG ya que la secreción basal de testosterona fue de 5.25 ng/ml mientras que la secreción de testosterona estimulada con hCG alcanzó un máximo de 13.7 ng/ml lo que representa más del doble de la cantidad inicial. La gráfica muestra que la secreción estimulada de testosterona es dependiente de la dosis y es significativa a partir de 1mU. La respuesta máxima se alcanzó con la dosis de 10 mU, después de la cual se observa una meseta que se mantiene con las dosis más elevadas. Se probaron dosis altas de hCG (500 y 1000 mU) para evidenciar o descartar la presencia del fenómeno de regulación negativa, el cual no se presentó en ninguno de los experimentos realizados.

Se midió la secreción de testosterona en cultivos de 24 h incubados en ausencia o presencia de una dosis máxima de hCG (10 mU/ml) durante diferentes tiempos (Fig. 16). En lo que respecta a la secreción basal de testosterona no se observaron cambios significativos a través del tiempo de incubación, a pesar de que existe una tendencia al aumento en la secreción, a medida que transcurre la incubación. Por el contrario, la secreción estimulada de testosterona aumenta notablemente a medida que transcurre el

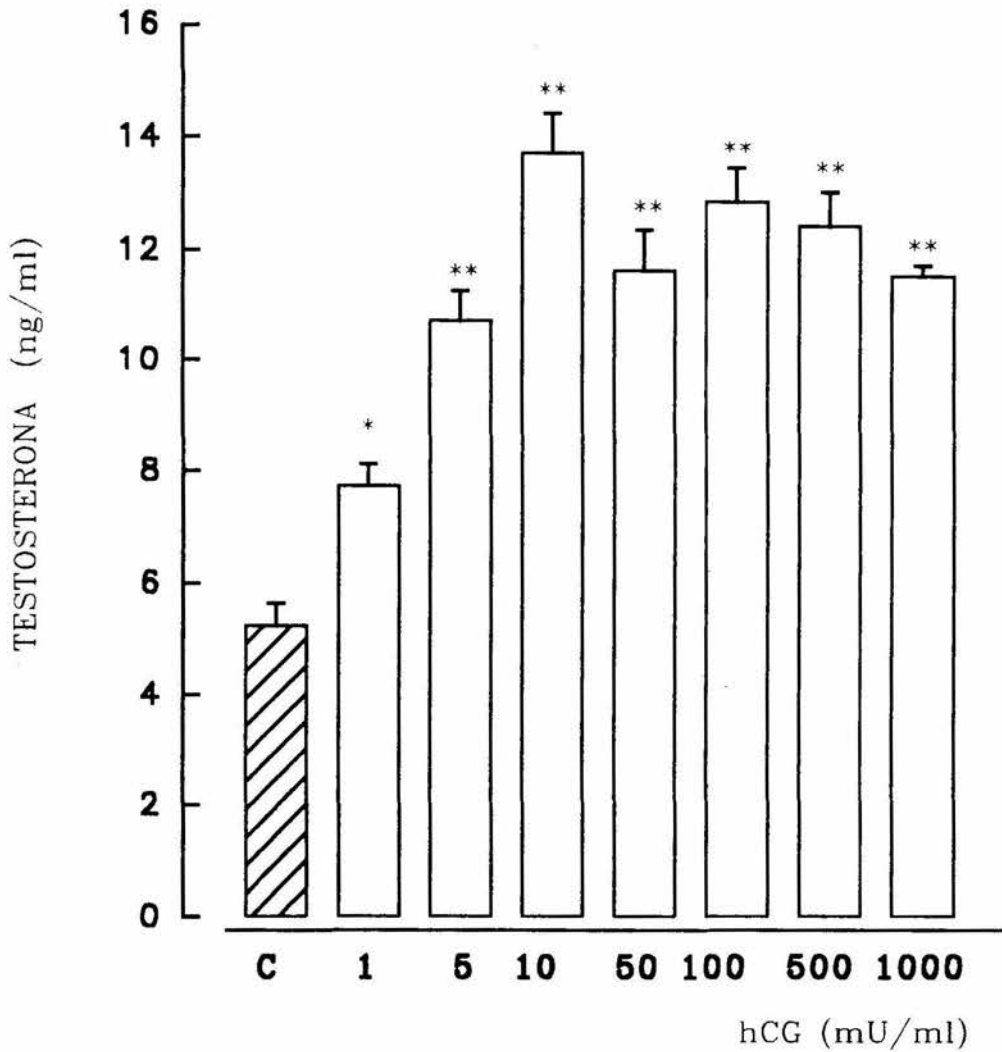


Fig. 15.- Secreción de testosterona en cultivos de 24 horas de testículo de rata recién nacida incubados durante 3 horas en ausencia (▨) o presencia (□) de diferentes dosis de hCG. La gráfica muestra que la secreción estimulada de testosterona es dependiente de la dosis y es significativa con la dosis de 1 mU. La respuesta máxima se alcanza con la dosis de 10 mU, después de la cual se observa una meseta que se mantiene hasta las dosis más elevadas. No se observaron evidencias del fenómeno de regulación negativa con dosis elevadas de hCG (500 y 1000 mU). Cada barra representa la media \pm la desviación estandar de las mediciones realizadas en 3 cultivos, donde cada punto se estudió por triplicado. Los asteriscos indican la significación estadística de los grupos estimulados con respecto al control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

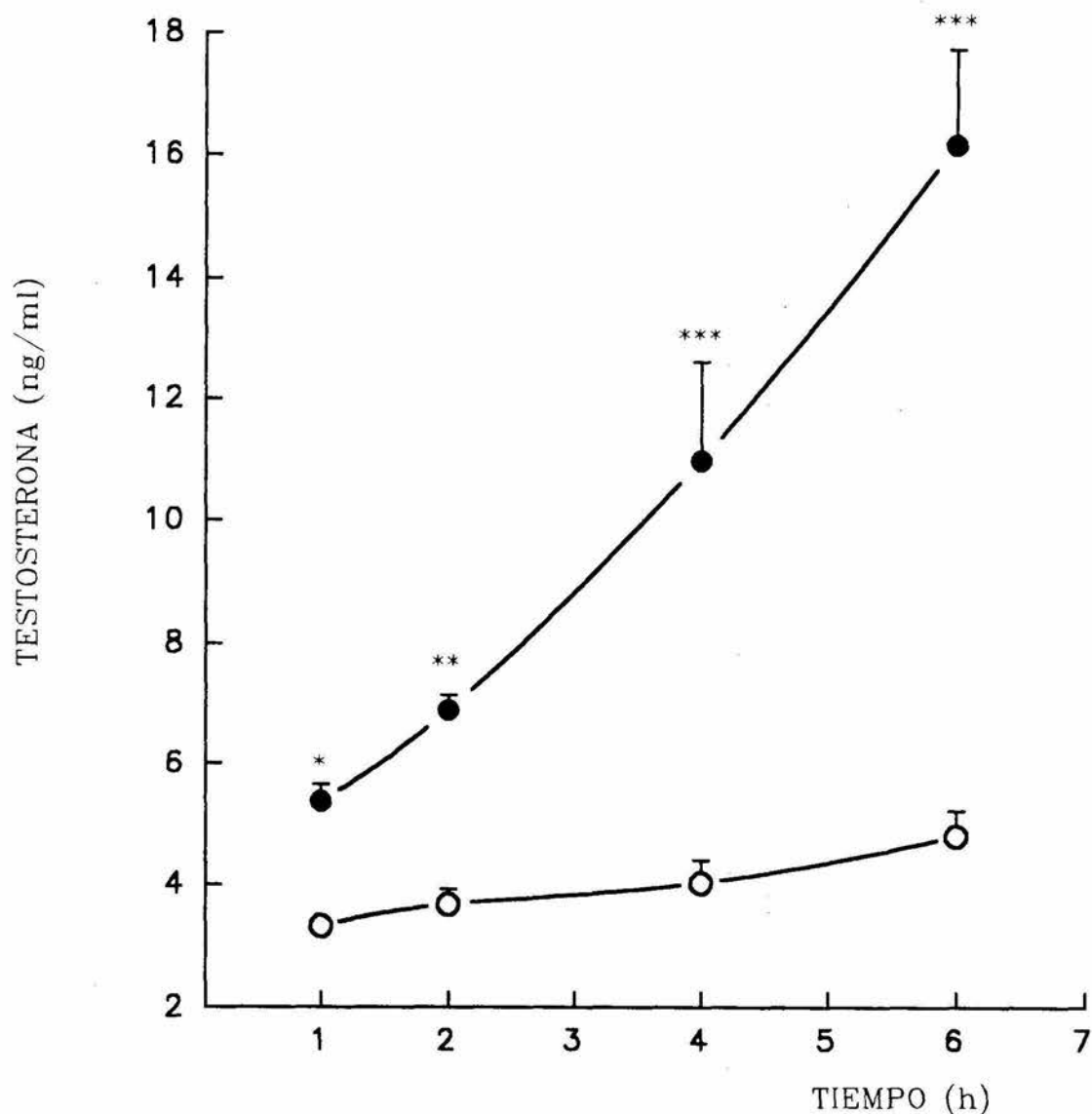


Fig. 16.- Secreción de testosterona en cultivos de 24 h de testículo de rata recién nacida incubados en ausencia (O) o presencia (●) de una dosis máxima de hCG (10 mU) durante diferentes tiempos. No se observan cambios significativos en la secreción basal de testosterona a través del tiempo, a pesar de que existe una tendencia al incremento. El efecto de la hCG comienza a ser significativo a la hora de incubación y aumenta con el transcurso del tiempo aunque sin alcanzar una meseta durante el período estudiado. Cada círculo representa la media \pm la desviación estandar de las mediciones realizadas en tres cultivos. Los asteriscos indican la significancia estadística de los grupos con respecto al control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

tiempo de incubación. El efecto de la hCG comienza a ser significativo en la primera hora de incubación y continúa aumentando con el transcurso del tiempo; sin presentar desensibilización por la incubación con hCG ya que no alcanza una meseta durante el periodo de tiempo estudiado.

6.5.- Respuesta a la desensibilización con hCG

Al estudiar la respuesta de las células a la desensibilización con gandotrofinas (fig. 17), se observa que las células preincubadas durante 24 h con hCG presentaron una mayor secreción de testosterona (3.62 ng/ml/3h) como respuesta a la segunda incubación con la hormona, en comparación a las células que no tuvieron estímulo previo (2.03 ng/ml/3h), diferencia que alcanza la cantidad de 1.6 ng/ml de testosterona, lo que representa casi el doble de la secreción, esto nos indica que en estas células no se ve afectada de manera negativa la secreción estimulada de testosterona por la previa incubación con hCG; por el contrario, esta preincubación con hCG aumenta la respuesta al estímulo gonadotrópico.

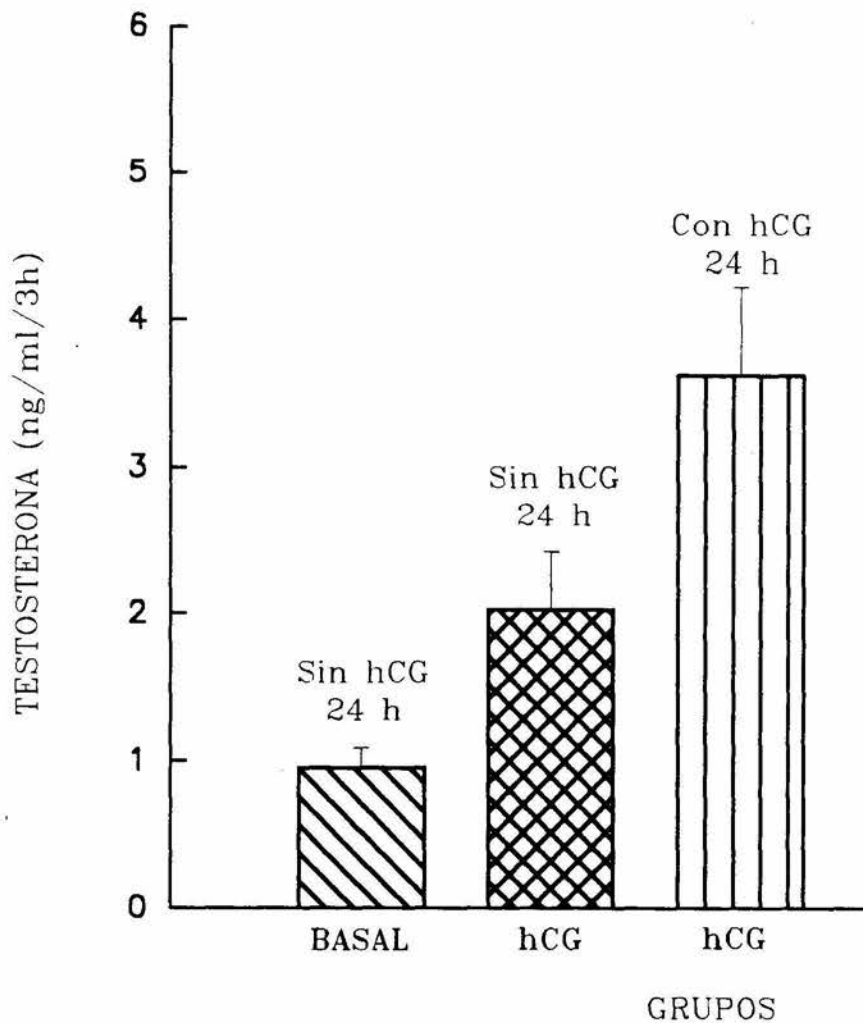


Fig. 17.- Respuesta de las células testiculares de rata recién nacida a la incubación con o sin una dosis de hCG (20 mU/ml). Se cambió el medio de cultivo después de una preincubación durante 24 horas sin o con una dosis de hCG (20 mU/ml). La mayor secreción de testosterona se obtuvo en las células que fueron incubadas previamente con hCG mientras que las células que se incubaron durante 24 horas sin hCG tuvieron una respuesta menos evidente. Cada barra representa la media \pm la desviación estandar de las mediciones realizadas en 3 cultivos.

7.- DISCUSION

En el presente trabajo se estudió el comportamiento y evolución de cultivos de células de testículo de rata recién nacida por medio de la medición de la secreción de testosterona en condiciones basales y como respuesta al estímulo hormonal, utilizando además la tinción de la actividad de una enzima esteroidogénica como medio para la identificación y la evaluación de la actividad celular.

Se observaron diferencias muy marcadas en la producción basal de testosterona entre los cultivos mantenidos en incubación por 24, 48 y 72 h. Los cultivos de 24 h presentaron una secreción 10.5 y 30 veces menor que la observada en los cultivos de 48 y 72 h, respectivamente. Esta disminución en la secreción de testosterona fue también observada por Paz y cols. (1980), en células de testículo de rata en período fetal mantenidas en cultivo durante 3 días. Se ha comprobado que en cultivos de células testiculares de ratón adulto se produce una disminución en la actividad de las enzimas 17α -hidroxilasa y C_{17-20} -liasa con el transcurso del tiempo, siendo esta casi indetectable al 3er. día de cultivo. Sin embargo no se encontraron cambios en la actividad de la 3β -HSD en el mismo período de tiempo (Quinn et.al., 1984). Por otra parte, Murphy y cols. (1982), observaron que los cultivos de células testiculares de ratón adulto presentan una declinación en la producción basal de testosterona después del cuarto día de incubación que ellos atribuyen a la pérdida de la actividad del citocromo microsomal P450, ocasionada por la peroxidación microsomal de los lípidos. Sin embargo, no se puede asegurar que la declinación en la secreción de testosterona observada a las 48 y 72 h

de cultivo en el presente trabajo, se deba a la declinación de la actividad enzimática observada por Quinn y cols. (1984) o a la observada por Murphy (1982), ya que al parecer cuando se alcanza la producción máxima de testosterona la pérdida de la actividad enzimática en las células de Leydig solo alcanza el 10% del valor normal (Anawake y col., 1987). Se ha comprobado que existen otros factores limitantes para la producción de testosterona en células testiculares mantenidas en cultivo o *in vitro*, como por ejemplo la disponibilidad del precursor de esteroides. Payne y cols. (1985) observaron que el mayor efecto que ocasiona una dosis elevada de hCG o de AMPc (Georgiou et.al., 1987) en estas células, es la deplección del colesterol endógeno disponible para la síntesis de esteroides, lo que ocasiona una disminución en la capacidad de sintetizar testosterona, y que la adición de colesterol en forma de HDL y LDL restaura dicha capacidad. Este fenómeno había sido corroborado en células de Leydig de tumor (MA-10) (Freeman et.al., 1983) y en testículos de cerdo (Benahmed et.al., 1981).

Además, se ha comprobado recientemente que la secreción de testosterona por el testículo estudiada *in vitro* y en condiciones de cultivo no es dependiente únicamente de la actividad de las células esteroideogénicas, sino que tal actividad secretora es afectada también por las posibles interacciones parácrinas entre los diferentes tipos de células testiculares y además por los componentes del medio. Al estudiar la influencia del suero bovino fetal (SBF) sobre los cultivos de células de testículo de pollos recién nacidos, Castro y Romano. (1994) observaron una influencia trófica del SBF sobre el desarrollo de los cultivos, que se atribuye a que este es rico en hormonas y factores del crecimiento. Dentro de estos últimos se puede mencionar el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), que puede modular la respuesta hormonal de las células testiculares (Gospodarowicz et.al., 1989). Fauser y cols. (1988), argumentan que el FGF disminuye la secreción de

testosterona en cultivos de células testiculares de rata estimulados con LH por medio de la inhibición de la actividad de la 17α -hidroxilasa y de la 3β -HSD (Muroño et.al., 1990). Pero no se descartan los posibles efectos de otros factores y componentes del medio, así como la importancia de hormonas gonadotrópicas en el mismo, ya que se ha comprobado que son el factor principal involucrado en la conservación y estimulación de las actividades secretoras y de crecimiento en las células de Leydig de rata (Mazzocchi et.al., 1990). En el presente trabajo se utilizó SBF que es rico en factores de crecimiento. Sin embargo el aporte de suero no fue suficiente para mantener los niveles de secreción de testosterona observados en las primeras 24 horas de incubación. En cambio, el agregar hCG durante el cultivo mejoró la producción de este esteroide, lo cual indica que cumple como en el testículo del adulto una función trófica. Trabajos como el de Anderson y col. (1985), demuestran que el tratamiento de células de Leydig de ratón con hCG o AMPc aumentan la síntesis del complejo enzimático P450_{scc} y de la adrenodoxina, una proteína que está involucrada en el transporte de electrones desde NADPH a P450_{scc}. Sobre este punto, Malaska y col. (1984), observaron que es necesario el tratamiento con LH o AMPc para inducir la actividad enzimática del complejo P450_{17 α} en cultivos de células de Leydig del ratón adulto; mientras que Anawake y col. (1987), utilizando también cultivos de células de Leydig de ratón adulto, encontraron que la síntesis *de novo* de P450_{17 α} es absolutamente dependiente de AMPc. Estudios en células adrenocorticales presentaron evidencias de que la estimulación con AMPc incrementa los niveles de los RNAs mensajeros de las enzimas P450_{scc} y P450_{17 α} , los cuales se reflejan en un aumento del nivel de transcripción de estos genes (John et.al., 1986). Asimismo Risbridge y col. (1992), utilizando cultivos de testículo de ratas adultas, observaron que es necesario suplementar el medio de cultivo con LH para mantener la respuesta celular a las gonadotropinas.

En este estudio no se observaron evidencias del fenómeno de regulación negativa cuando se probaron dosis elevadas de hCG (500 y 1000 mU/ml) en las células de testículo de rata recién nacida, ni tampoco desensibilización ocasionada por la incubación previa durante 24 horas con hCG. La regulación negativa es característica de las células del testículo de la rata adulta, en las que se observa que la aplicación crónica de dosis bajas de gonadotropinas mantiene a los receptores y a las enzimas esteroideogénicas en un estado de "regulación positiva" (Tsuruhara et.al., 1977; O'Shaughnessy et.al., 1982; Barañao et.al., 1983). Por el contrario dosis elevadas de gonadotropinas ocasionan regulación negativa de los receptores (Zipf et.al., 1978; Cigorruga et.al., 1980) y desensibilización de las células ante estímulos como LH o hCG. Esto se debe a que las gonadotropinas inducen lesiones en la vía esteroideogénica que afectan la conversión de colesterol a pregnenolona (lesión temprana) y la conversión de progesterona a andrógenos, con la consiguiente acumulación de esteroides intermediarios por una disminución en la actividad y síntesis de las enzimas 17α -hidroxilasa y $17,20$ -liasa, que está mediado por estrógenos (lesión tardía) (Cigorruga et.al., 1978; Charreau et.al., 1981; Dufau et.al., 1984 b). Tampoco se ha demostrado desensibilización en células de Leydig fetales. Por ejemplo en el trabajo de Habert y cols. (1989), donde se utilizaron células fetales de testículo de rata las cuales se incubaron con dosis elevadas de LH, no se observó desensibilización a dicha hormona. Esta incapacidad de las gonadotropinas para desensibilizar a las células fetales de testículo de rata se atribuye a la baja actividad de aromatasa en este período del desarrollo, en el que la producción de estrógenos es indetectable y existen bajos niveles de receptores para LH/hCG (1/10 de la cantidad encontrada en el adulto) (Tsai-Morris y cols., 1985, 1986; Dufau, 1988). Aunque no existen trabajos al respecto es probable que las células de Leydig de recién nacido

tampoco presente una importante capacidad de aromatización. A este respecto sería importante estudiar si la presencia de hCG en el cultivo, al mejorar el trofismo celular y tal vez el número de receptores a hCG, hiciera posible provocar desensibilización en células inmaduras.

Las células cultivadas de testículo de rata en el período neonatal, cuyo funcionamiento declina durante el cultivo como se ha mostrado en este estudio, son un modelo interesante para investigar los factores que pueden estar involucrados en la involución celular durante este período de transición, adonde desaparecen factores moduladores placentarios y maternos.

Al mismo tiempo, este modelo de cultivo aporta datos sobre el comportamiento que presentan las células de Leydig en este importante período de desarrollo en el que se da la transición de una vida en estado fetal a una con características diferentes de regulación y desarrollo, período del cual se tiene poca referencia bibliográfica.

8.- CONCLUSIONES

Los resultados anteriormente analizados indican que las células de testículo de rata recién nacida en las condiciones de cultivo:

1.- Producen espontáneamente testosterona. La secreción de esta hormona varía con el tiempo de cultivo, observándose una disminución gradual en la producción basal de testosterona después de 24 h de incubación.

2.- La presencia de hCG en el medio de cultivo causó una respuesta celular medida en términos de secreción de testosterona, respondiendo al estímulo con hCG de manera dosis-dependiente. El fenómeno de estimulación se observa a partir de la primera hora de incubación en presencia de la hormona.

3.- A diferencia de lo observado en las células de rata adulta, pero en forma similar a las células del feto, células del recién nacido, no presentan el fenómeno de regulación negativa cuando son estimuladas con dosis elevadas de hCG ni se desensibilizan por la incubación previa durante 24 h con esta hormona.

4.- Por último, el cultivo de células del testículo de rata recién nacida desarrollado en este trabajo es un excelente modelo para estudiar los factores que intervienen en la transición de una población celular de tipo fetal a una de tipo adulto en esta particular etapa de vida.

9.- LITERATURA CITADA

- Albert D.H., Ascom M., Puett D., Conigmo J.G. 1980. Lipid Composition and Gonadotropin-Mediated Lipid Metabolism of The M5480 Murine Leydig Cell Tumor. J. Lipid Res. 21:862-867.

- Anawake O.O., Payne A.H. 1987. Noncoordinate Regulation of *de novo* Synthesis of Cytochrome P450 Cholesterol Side Chain Cleavage and Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase, C₁₇₋₂₀ Lyase in Mouse Leydig Cells Cultures: Relation to Steroid Production. Mol. Endocrinol. 1:595-603.

- Anderson C.M., Mendelson C.R. 1985. Regulation of Steroidogenesis in Rat Leydig Cells in Culture: Effect of Human Chorionic Gonadotropin and Dibutiryl Cyclic AMP on the Synthesis of Cholesterol Side Chain Cleavage Cytochrome P450 and Adrenodoxin. Arch. Biochem. Biophys. 238:378-387.

- Andersen J.M., Dietschy J.M. 1978. Relative Importance of High and Low Density Lipoproteins in The Regulation of Cholesterol Synthesis in The Adrenal Gland, Ovary and Testis of The Rat. J. Biol. Chem. 253:9024-9032.

- Aubert M.L., Begeot M., Winiger B.P., Morel G., Sizonenko P.C., Dubois P.M. 1985. Ontogeny of Hypothalamic Luteinizing Hormone-releasing Hormone (GnRH) and Pituitary GnRH Receptors in fetal and Neonatal Rats. Endocrinology 116:1565-1576.

- Baird D.T. 1984. The Ovary. En: Austin C.R., Short R.V. (Eds). *Reproduction in Mammals. Libro 3, Hormonal Control of Reproduction.* Cambridge University Press. p. 91-114.

- Barañao J.L.S., Dufau M.L. 1983. Gonadotropin-Induced Changes in The Luteinizing Hormone Receptors of Cultured Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 258:7322-7330.

- Bartolussi M., Zanchetta R., Belvedere P., Colombo L. 1990. Sertoli and Leydig Cell Numbers and Gonadotropin Receptors in Rat Testis from Birth to Puberty. *Cell Tissue Res.* 260:185-191.

- Benahmed M., Dellamonica C., Haour F., Saez J.M. 1981. Specific Low Density Lipoproteins Receptors in Pig Leydig Cells. Role of This Lipoprotein in Cultured Leydig Cells Steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99:1123-1130.

- Bentley P.J. 1982. *Comparative Vertebrate Endocrinology.* 2^a Edic. Cambridge University Press. p. 15-123.

- Catt K.J., Harwood J.P., Clarton R.N., Davies T.F., Chan V., Katikinemi M., Nozu K., Dufau M.L. 1980. Regulation of Peptide Hormone Receptors and Gonadal Steroidogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 36:557-622.

- Chan V., Clayton R.N., Knox G., Catt K.J. 1981. Ontogeny of Pituitary GnRH Receptors in The Rat. *Endocrinology* 108:2086-2092.

- Charreau E.H., Calvo J.C., Nozu K.J., Dufau M.L. 1981. Hormonal Modulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in Gonadotropin-Stimulated and Desensitized Testicular Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 256:12719-12724.

- Chiappa S.A., Fink G. 1977. Releasing Factor and Hormonal Changes in The Hypotalamic-Pituitary-Gonadotrophin and Adrenocorticotrophin Systems Before and After Birth and Puberty in Male and Female Rats. *J. Endocrinol.* 72:211-224.

- Cigorruga S.B., Dufau M.L., Catt K.J. 1978. Regulation of Luteinizing Hormone Receptors and Steroidogenesis in Gonadotropin-Desensitized Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 253:4297-4304.

- Cigorruga S.B., Sorell S., Bator J., Catt K.J., Dufau M.L. 1980. Estrogen Dependence of a Gonadotropin-induced Steroidogenic Lesions in Rat Testicular Leydig Cells. *J. Clin. Invest.* 65:699-705.

- Coffey J.D., French F.S., Nayfeh S.N. 1971. Metabolism of Progesterone by Rat Testicular Homogenates. IV. Further Studies of Testosterone Formation in Immature Testes *in vitro*. *Endocrinology* 89:865-872.

- Cooke B.A., Lindh L.M., Janszen H.A. 1977. Role of Cyclic AMP in Steroidogenesis in Leydig Cells: "Discrepancies" Between Effects of Luteinizing Hormone and Cholera Toxin. *FEBS Lett.* 73:67-71.

- Corbier D., Edward D.A., Roffi J. 1992. The Neonatal Testosterone Surge: A Comparative Study. *Arch. Intern. Physiol. Bioch. Biophys.* 100:127-131.

- Corpechot C., Baulieu E.E., Robel P. 1981. Testosterone, Dihydrotestosterone and Androstendiols in Plasma, Testes and Prostates of Rats During Development. *Acta Endocrinol. (Copenh).* 96:127-135.

- Döhler K.D., Wuttke W. 1974. Serum LH, FSH, Prolactin and Progesterone From Birth to Puberty in Female and Male Rats. *Endocrinology* 94:1003-1008.

- Dufau M.L., Cigorruga S.B., Baukal J.A., Sorrel S., Bator J.M., Neubauer J.F., Catt K.J. 1979. Androgen Biosynthesis in Leydig Cells After Testicular Desensitization by Luteinizing Hormone-Releasing Hormone and Human Chorionic Gonadotropin. *Endocrinology* 105(6):1321-1341.

- Dufau M.L., Cigorruga S.B., Baukal A.J., Bator J.M., Neubauer J.F., Catt K.J. 1979. Steroid Biosynthetic Lesions in Gonadotropin-desensitized Leydig Cells. *J. Steroid Biochem.* 11:193-199.

- Dufau M.L., Warren D.W., Knox G.F., Loumaye E., Castellon M.L., Luna S., Catt K.J. 1984 a. Receptors and Inhibitory Actions of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Fetal Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 259(5):2896-2899.

- Dufau M.L., Winters C.A., Hattori M., Aquilano D., Barano J.L. et.al. 1984 b. Hormonal Regulation of Androgen Production by the Leydig cell. *J. Steroid Biochem.* 20:161-173.

- Dufau M.L., Knox G.F. 1985. Fetal Leydig Cell Culture an *in vitro* System for The Study of Tropic Hormone and GnRH Receptors and Actions. *J. Steroid Biochem.* 23:743-755.

- Dufau M.L. 1988. Endocrine Regulation and Communicating Functions of the Leydig Cells. *Ann. Rev. Physiol.* 50:483-508.

- Ewin L.L., Brown B.L. 1977. Testicular Steroidogenesis. En: Johnson A.D., Gomes W.R. (Eds). *The Testis. Vol. 4.* New York Academic Press p. 239-387.

- Fauser B.C.J.M., Baird A., Hsueh A.J.W. 1988. Fibroblast Growth Factor Inhibits Luteinizing Hormone-Stimulated Androgen Production by Cultured Rat Testicular Cells. *Endocrinology* 23(6):2935-2941.

- Fevold R.H., Lorence M.C., Mc Carthy J.L., Trant J.M., Kagimoto M., Waterman M.R., Mason J.I. 1989. Rat P450-17 α From Testis: Characterization of a Fulllength cDNA Encoding a Unique Steroid Hydroxylase Capable of Catalyzing Both Δ^4 and Δ^5 -Steroid-17,20 Lyase Reactions. *Mol. Endocrinol.* 3:968-975.

- Feldman S.C., Bloch E. 1978. Developmental Pattern of Testosterone Synthesis by Fetal Rat Testes in Response to Luteinizing Hormone. *Endocrinology* 102(4):999-1007.

- Freeman D.A., Ascoli M. 1983. The Low Density Lipoproteins Pathway of Cultured Leydig Tumor Cells. *Biochim. Biophys. Acta* 754:72-81.

- George F.W., Wilson J.D. 1986. Hormonal Control of Sexual Development. *Vitam. and Horm.* 43:145-196.

- Georgiou M.G., Perkins L.M., Payne A.H. 1987. Steroid Synthesis-Dependent, Oxygen-Mediated Damage of Mitochondrial and Microsomal Cytochrome P450 Enzymes in Rat Leydig Cells Cultures. *Endocrinology* 121:1390-1399.

- Gondos B. 1977. Testicular Development. En: Johnson A.P., Gomez W.R, (Eds). *The Testis Vol. 4. Advances in Physiology, Biochemistry and Function.* Academic Press New York. p. 1-37.

- Gordon B. 1980. Development and Diferentiation of The Testis and Male Reproductive tract. En: Steinberger and E. Steinberger (Eds). *Testicular Development, Structure and Function.* Raven Press, New York. p. 3-20.

- Gospodarowicz D., Ferrara N. 1989. Fibroblast Growth Factor and The Control of Pituitary and Gonad Development and Function. *J. Steroid Biochem.* 32(1B):183-191.

- Habert R., Veniard P., Gangnerau M.N., Picon R. 1989. Absence of Development of Late Steroidogenic Lesions in Rat Testis During the End of Fetal Life. *Arch. Androl.* 22:41-48.

- Habert R., Brignaschi P. 1991. Developmental Changes in *in vitro* Testosterone Production by Dispersed Leydig Cells During Fetal Life in Rats. *Arch. Androl.* 27:65-71.

- Hall P.F. 1985. Cytochrome P-450: Physiology of Steroidogenesis. *Annal. NY. Acad. Sci.* 458:203-215.

- Hall P.F. 1988. Testicular Steroid Synthesis: Organization and Regulation. En: Knobil E., Neill J.D., Ewin L.L., Greenwald G.S., Markert C.L., Pfaff D.W. (Eds). *The Physiology of Reproduction. Vol. 1.* Raven Press. N.Y. p. 975-978.

- Hardy M.P., Zirkin B.R., Ewin L.L. 1989. Kinetic Studies on The Development of The Adult Population of Leydig Cells in Testes of The Prepubertal Rat. *Endocrinology* 124:762-768.

- Hicks J.J., Díaz Z.J.C. 1988. *Bioquímica e Inmunología. Vol. 2.* Facultad de Medicina UNAM. México. p. 53-139.

- Hsueh A.J.W., Dufau M.L. Catt K.J. 1976. Regulation of Luteinizing Hormone Receptors in Testicular Cells by Gonadotropins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72:1145-1152.

- Huhtaniemi I.T., Katikineni M., Catt K.J. 1981. Regulation of Luteinizing-hormone-receptors and Steroidogenesis in the Neonatal Rat Testis. *Endocrinology* 109(2):588-595.

- Huhtaniemi I.T., Nozu K., Warren D.W., Dufau M.L. Catt K.J. 1982. Acquisition of Regulatori Mechanisms for Gonadotropin Receptors and Steroidogenesis in the Maturing Rat Testis. *Endocrinology* 111(5):1711-1720.

- Huhtaniemi I.T., Warren D.W., Dufau M.L., Catt K.J. 1984. Functional Maturation of Rat Testis Leydig cells. En: Catt K.J., Dufau M.L. (Eds). *Hormone Action and Testicular Function*. New York Acad. Sci. 438:283-303.

- Huhtaniemi I.T., Rajaniemi H.J., Catt K.J. 1986. Kinetic and Autoradiographic Studies on Binding of hCG to The Testicular LH Receptors of Neonatal Rats. *J. Reprod. Fertil.* 78:73-82.

- Johon M.E., Johon M.C., Boggaram V., Simpson E.R., Waterman M.R. 1986. Transcriptional Regulation of Steroid Hydroxilase Genes by Corticotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4715-4719.

- Karsch F.J. 1984. The Hypothalamus and Anterior Pituitary Gland. En: Austin C.R., Short R.V. (Eds). *Reproduction in Mammals. Libro 3, Hormonal Control of Reproduction.* Cambridge University Press. p. 1-20.

- Kerr J.B., Knell C.M. 1988. The Fate of Fetal Leydig Cells During the Development of the Fetal and Postnatal Rat Testis. *Development* 103:535-544.

- Kretser D.M., Kerr J.B. 1988. The Cytology of The Testis. En: Knobil E., Neill J.D., Ewin L.L. et.al. (Eds). *The Physiology of Reproduction. Vol. 1.* Raven Press New York. p. 837-932.

- Kuopio T., Tapanainen J., Pelliniemi L.J., Huhtaniemi I. 1989. Developmental Stages of Fetal-Type Leydig Cells in Prepubertal rats. *Development* 107:213-220.

- Lipshultz L.I., Howards S.S. 1991. *Infertility in The Male. 2ª Edic.* Mosby-Year Book. St. Louis MO. p. 37-53.

- Lording D.W., Kretsa D.M. 1972. Comparative Ultrastructural and Histochemical Studies of Interstitial Cells of Rat Testis During Fetal and Posnatal Development. *J. Reprod. Fertil.* 29:261-269.

- Malaska T., Payne A.H. 1984. Luteinizing Hormone and Cyclic AMP-Mediated induction of Microsomal Cytochrome P450 Enzymes in Cultured Mouse Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 259:11654-11657.

- Mazzochi G., Cavallini L., Kasprzak A., Rebuffat P., Nussdorfer G.G. 1990. Effects of Prolactin on The Morphology and Function of Rat Leydig Cells: Short-Term Versus Long-Term Administration. *Cell Tiss. Res.* 462:41-46.

- Mendis-Handagama S.M.L.C., Risbridger G.P., De Kretser D.M. 1987. Morphomeric Analysis of The Components of The Neonatal and the Adult Rat Testis Interstitium. *Int. J. Androl.* 10:525-534.

- Miller W.L. 1987. Structure of Genes Encoding Steroidogenic Enzymes. *J. Steroid Biochem.* 27:759-766.

- Moore K.L. 1988. *Embriología Básica*. 2a. Edición. Edit. Interamericana. México. p. 174-194.

- Morris M.D., Chaikof I.L. 1959. The Origin of cholesterol in Liver, Small Intestine, Adrenal Gland and Testis of The Rat: Dietary *Versus* Endogenous Contributions. *J. Biol. Chem.* 234:1095-1097.

- Muroño E.P., Washburn A.L. 1990. Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Δ^5 -3 β -Hidroxy steroid Dehydrogenase-Isomerase Activity in Cultured Immatured Leydig Cells. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 168(1):248-253.

- Murphy P.R., William H.M. 1982. Short-Term Primary Culture of Mouse Interstitial Cells: Effects of Culture Conditions on Androgen Production. *Biol. of Repr.* 27:38-47.

- Niemi M., Ikonen M. 1961. Steroid-3 β -ol-Dehydrogenase Activity in Fetal Leydig Cells. *Nature* 189:592-593.

- Niemi M., Ikonen M. 1963. Histochemistry of The Leydig Cells in The Postnatal Prepuberal Testis of Rat. *Endocrinology* 72:443-448.

- Nozu K., Matsuura S., Catt K.J., Dufau M.L. 1981. Modulation of Leydig Cells Androgen Biosynthesis and Cytochrome P-450 Levels During Estrogen Treatment and hCG Induced Desensitization. *J. Biol. Chem.* 256:10012-10017.

- Ojeda S.R., Andrews W.W., Advis J.P., Smith-White S. 1980. Recent Advances in The Endocrinology of Puberty. *Endocrinology Reviews* 1(3):228-257.

- Ojeda S.R., Urbanski H.F. 1988. Puberty in The Rat. En: Knobil E., Neill J.D., Ewin L.L., Greenwald G.S., Markert C.L., Pfaff D.W. (Eds). *The Physiology of Reproduction*. Vol. 2. Raven Press. N.Y. p. 1699-1737.

- O'Shaughnessy P.J., Payne A.H. 1982. Differential Effects of Single and Repeated Administration of Gonadotropins on Testosterone Production and Steroidogenic Enzymes in Leydig Cells Populations. *J. Biol. Chem.* 257:11503-11509.

- Paz G.F., Thliveris J.A., Winter J.S.D., Reyes F.I., Faiman C. 1980. Hormonal Control of Testosterone Secretion by the Fetal Rat Testis in Organ Culture. *Biol. Reprod.* 23:1087-1095.

- Payne A.H., Quinn P.G., Rani C.S.S. 1985. Regulation of Microsomal Cytochrome P-450 Enzymes and Testosterone Production in the Leydig Cells. *Recent Prog. Horm. Res.* 41:153-197.

- Payne A.H. 1990. Hormonal Regulation of Cytochrome P-450 Enzymes, Cholesterol Side-Chain Cleavage and 17 α -Hydroxylase/C₁₇₋₂₀ Lyase in Leydig Cells. *Biol. Reprod.* 42:399-404.

- Pedernera E.A. 1993. Cooperación Celular en la Biosíntesis de Hormonas Esteroides. En: Carmen Clapp, Gonzalo M. de la Escalera (Eds). *Comunicación Neuroendócrina. Bases Celulares y Moleculares.* México. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Secretaría de Educación Pública. p. 33-46.

- Quinn P.G., Payne A.H. 1984. Oxygen-Mediated Damage of Microsomal Cytochrome P-450 Enzymes in Cultured Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 259(7):4130-4135.

- Risbridger G.P., Hedger M.P. 1992. Adult Rat Leydig Cell Cultures: Minimum Requirements for Maintenance of Luteinizing Hormone Responsiveness and Testosterone Production. *Mol. Cell. Endocrinol.* 83:125-132.

- Robard D., Lewald J.E. 1970. Computer Analysis of Radioligand Assay and Radioimmunoassay data. In *Steroid Assay by Binding Protein.* *Acta Endocrinol.* 64(Supl. 147):79-103.

- Roosen-Runge E.C., Anderson D. 1959. The Development of The Interstitial Cells in The Testis of The Albino Rat. *Acta Anat.* 37:125-137.

- Steinberger E., Steinberger A., Vilar O. 1966. Cytochemical Study of Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Testicular Cells Grown *in vitro*. *Endocrinology* 79:406-410..

- Steinberger A., Steinberger E., Perloff M. 1964. Mammalian Testes in Organ Culture. *Exp. Cell. Res.* 36:19-27.

- Tanka K. M. 1986. Current Aspects of Leydig Cell Function and its Regulation. *J. Reprod. Fert.* 78:367-380.

- Tapanainen S., Kuopio T., Pelliniemi, Huhtaniemi I.T. 1984. Rat Testicular Endogenous Steroids and Number of Leydig Cells Between the Fetal Period and Sexual Maturity. *Biol. of Reprod.* 31:1027-1035.

- Tsai-Morris C-H., Aquilano D.R., Dufau M.L. 1985. Cellular Localization of Rat Aromatase Activity During Development. *Endocrinology* 116(1):38-46.

- Tsai-Morris C-H., Knox G., Luna S., Dufau M.L. 1986. Acquisition of Estradiol-Mediated Regulatory Mechanism of Steroidogenesis in Cultured Fetal Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 261(8):3471-3474.

- Tsuruara T., Dufau M.L., Cigorruga S., Catt K.J. 1977. Hormonal Regulation of Testicular Luteinizing Hormone Receptors. *J. Biol. Chem.* 252:9002-9009.

- Vahouny G.V., Chanderbhan R., Noland B.J., Scallen T.J. 1985. Cholesterol Ester Hydrolase and Sterol Carrier Proteins. *Endocr. Res.* 10:473-475.

- Warren D.W., Huhtaniemi I.T., Tapanainen J., Dufau M.L., Catt K.J. 1984. Ontogeny of Gonadotropin Receptors in the Fetal and Neonatal Rat testis. *Endocrinology* 114(2):470-476.

- Williams R.H. 1985. *Tratado de Endocrinología*. 7a. Edición. Edit. Interamericana. México. p. 80-128.

- Zip W.B., Pane A.H., Kelch R.P. 1978. Dissociation of Lutropin-Induced Loss of Testicular Lutropin Receptors and Lutropin-Induced Desensitization of Testosterone Synthesis. *Biochem. Biophys. Acta* 540:330-336.