

24
2 ej^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DE ALGUNOS FACTORES HORMONALES
SOBRE LA ACTIVIDAD DE AROMATASA EN CELULAS
DE LEYDIG DE RATA NORMAL ADULTA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MA. DEL ROSARIO CALDERON RAMIREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
1996
ENCUENAB

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DE ALGUNOS FACTORES HORMONALES
SOBRE LA ACTIVIDAD DE AROMATASA EN CELULAS
DE LEYDIG DE RATA NORMAL ADULTA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MA. DEL ROSARIO CALDERON RAMIREZ



1986



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Nóm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante Calderón
Ramírez María del Rosario
con número de cuenta 9211736-2 con el título: Influencia de
algunos factores hormonales sobre la actividad de aromatasa
en células de Leydig de rata normal adulta.

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de
Biólogo.

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

M. en B. E. Enrique Mendieta Márquez	<i>E. M. M.</i>
Director de Tesis M. en C. Cristina Revilla Monsalve	<i>[Firma]</i>
M. en G. E. Nicolás Ernesto Rodríguez Aguilera	<i>[Firma]</i>
Dra. en C. María Luisa Fanjul Peña	<i>[Firma]</i>
Suplente Dra. en C. Marcela Esperanza Aguilar Morales	<i>[Firma]</i>
Suplente	

Ciudad Universitaria, D.F., a 25 de marzo de 1996

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DE ALGUNOS FACTORES HORMONALES SOBRE LA ACTIVIDAD DE
AROMATASA EN CELULAS DE LEYDIG DE RATA NORMAL ADULTA.

Tesis para obtener el Título de Bióloga

Presenta

CALDERON RAMIREZ MARIA DEL ROSARIO

México, 1996

Dedicada a:

A mis padres María Ramírez y Angel Calderón
por el amor, paciencia y apoyo que me han dado
a lo largo de toda mi vida.

A mi familia en particular, a mis hermanos Rodolfo,
Mercedes, Angel, Ileana y Carlos por su amor y
estímulo brindado en todo momento.

Reconocimientos

Al M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección.

Al M. en B.E. Joaquín Herrera por las facilidades brindadas en el uso del material y equipo del laboratorio de Andrología de Ginec Obstetricia del I.M.S.S. así como por su valiosa colaboración.

A la M. en C. Cristina Revilla Monsalve por su valiosa intervención en la realización de este trabajo.

A los profesores de la Facultad de Ciencias y de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Izatapalapa en particular a M. en C. Cristina Revilla Monsalve, Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña, Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales y al M. en B.E. Nicolás Ernesto Rodríguez Aguilera, por su valiosa colaboración en la revisión del trabajo y por haber aceptado amablemente ser parte de la comisión dictaminadora.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron para que este trabajo llegara a su realización final. Gracias.

Indice	Pág.
Reconocimientos	
Resumen	
I. INTRODUCCION	1
1.1. Anatomía del aparato reproductor masculino	1
2. Anatomía y fisiología testiculares	2
3. Eje de regulación Hipotálamo-Hipófisis-Testículos	19
4. Regulación intragonadal	22
4.1. Interacciones CS - Células de la línea germinal	22
4.2. Interacciones CS - Células peritubulares	23
4.3. Interacciones CS - CL (Interacciones intercompartamentales)	24
II. ANTECEDENTES	25
III. Planteamiento del problema	28
IV. OBJETIVOS	28
1. Objetivo general	28
2. Objetivos particulares	28
V. HIPOTESIS	28
VI. METODOLOGIA	29
1. Obtención de las fracciones enriquecidas en CL	29
2. Incubaciones celulares	29
3. Cuantificaciones hormonales	29
VII. RESULTADOS	32
1. Tablas	
2. Gráficas	
VIII. DISCUSION	34
IX. CONCLUSIONES	36
X. BIBLIOGRAFIA CITADA	37

Abreviaturas

I	Insulina
EGF	Factor de crecimiento epidermal
T	Testosterona
Preg	Pregnenolona
E ₂	Estradiol
CL	Célula de Leydig
CS	Célula de Sertoli
³ H-Preg	Pregnenolona radioactiva
Prog	Progesterona
3βHSD	3 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
AMPC	3'-5'-adenosin monofosfato cíclico
ABP	Proteína unidora de andrógenos
dbAMPC	Dibutiril 3'-5' adenosin monofosfato cíclico
Sm-C	Somatomedina - C
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
hCG	Gonadotropina
IGF-I	Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I

RESUMEN

En estudios realizados por diversos investigadores se ha intentado determinar cuál es la importancia fisiológica de la síntesis de estrógenos en el testículo, así como el sitio donde ocurre la aromatización y el efecto que presentan diferentes factores hormonales sobre la esteroidogénesis testicular, entre los que se encuentran la Insulina (I) y el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF). Para estos estudios han utilizado una variedad de modelos *in vivo* e *in vitro*, y se han evaluado sobretodo los efectos sobre la formación del estradiol (E_2) sin correlacionar el impacto que estos factores tienen sobre el resto de la vía de síntesis de andrógenos. Por lo expuesto anteriormente, el presente trabajo se realizó con la finalidad de conocer cuál es el efecto de I y EGF sobre la producción de Testosterona (T) y E_2 a partir de la transformación de 3H -Pregnenolona (Preg) adicionada exógenamente a fracciones enriquecidas en células de Leydig (CL) de ratas adultas normales mantenidas en incubación durante períodos cortos de hasta 120 minutos.

De acuerdo con la metodología descrita por Bermúdez y cols, las CL fueron obtenidas a partir de ratas normales de la cepa Wistar de 90 días de edad, las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical. A cada tubo de incubación se le adicionaron 300,000 CL en un volumen final de 0.5 ml y aproximadamente 100,000 cpm de 3H -Preg, y se incubaron a 37°C durante 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos en presencia o ausencia de I (10, 50 y 100 ng/ml) o EGF (10, 25 y 50 µg/ml). Los esteroides Preg, T y E_2 fueron extraídos con éter y separados por cromatografía en capa fina.

Los datos obtenidos mostraron que la I tiende a producir una disminución en la proporción de 3H -Preg, así como un incremento en la cantidad de T presente a los 60 minutos de incubación, y que este efecto desaparece hacia los 120 minutos. Por otra parte, el EGF produjo un efecto semejante al de la insulina para la Preg que se mantuvo durante todo el período de incubación, y una tendencia a la acumulación de T a los 60 minutos y de E_2 durante todo el período bajo las condiciones de incubación que se utilizaron.

Los resultados obtenidos parecen mostrar una estimulación de la actividad de aromatasa en Preg, T y E_2 con ambos factores hormonales, aunque el efecto no es del todo claro, ya que no se observa una relación dosis-respuesta evidente. Por lo anterior, sería conveniente que en trabajos posteriores se evaluaran los efectos sobre todas las enzimas de la vía esteroidogénica de los esteroides Δ_4 , mediante la utilización de precursores radiactivos diferentes a 3H -Preg, para conocer cuáles serían los efectos particulares de ambos factores sobre la vía esteroidogénica testicular.

I. INTRODUCCIÓN

El análisis de los efectos la síntesis y mecanismos de acción de las hormonas secretadas por las glándulas endócrinas es el campo de estudio de la Endocrinología; su enfoque hacia el estudio de la fisiología y bioquímica de los aparatos reproductores tiene una gran importancia, ya que por un lado intenta explicar la diversidad de las especies animales y por otro lado lograr la conservación de las mismas. A partir de la Endocrinología se han derivado dos campos que estudian los fenómenos de la reproducción en el hombre y en la mujer, los cuales se han denominado respectivamente como Andrología y Ginecología (1,2).

La Andrología estudia los mecanismos endócrinos y parácrinos que regulan a las funciones esteroideogénica y gametogénica en los diferentes comportamientos testiculares, los cuales pueden dar luz sobre las causas de infertilidad, así como apoyar la implementación de técnicas que permitan el control de poblaciones de elevado crecimiento.

1. Anatomía del aparato reproductor masculino.

El aparato reproductor masculino se encuentra situado fuera del abdomen, comprendiendo principalmente los órganos copuladores, los cuales son: pene o falo, los testículos y el epidídimo. La parte interna del aparato comprende los conductos deferentes, vesículas seminales, conducto eyaculador, próstata y glándulas accesorias tales como vesículas seminales, próstata y glándula bulbouretral (3,4).

Los testículos son órganos pareados que se encuentran a los lados de la línea media, se encargan de la producción de espermatozoides y de las hormonas sexuales, descienden poco antes del nacimiento por el conducto inguinal hacia la bolsa del escroto que los alberga, maduran completamente después de la pubertad y realizan una doble función endocrina y reproductora (5).

Íntimamente ligado al testículo se encuentra el epidídimo que consta de cabeza, cuerpo y cola; está ubicado en la parte superior y en la cara externa del testículo. Este órgano es el primer segmento de las vías espermáticas, las cuales están constituidas por los conductos deferentes (prolongación de la cola del epidídimo), las vesículas seminales (receptores del líquido espermático) y los conductos eyaculadores (6, 7).

La próstata es una glándula anexa al aparato reproductor masculino, que se ubica por debajo de la vejiga y es atravesada por la uretra; su función es la de segregar un líquido que se mezcla con el contenido de las otras glándulas accesorias en la eyaculación (2).

2. Anatomía y fisiología testiculares.

Cada testículo es un órgano ovoide compacto de 4 a 5 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro; el peso de cada uno varía entre 10 y 15 g en el humano y en la rata los testículos miden más o menos 2 cm de longitud y 1.3 cm de diámetro, el peso de cada uno varía entre 5 y 10 g (7), llevan adosados en su borde superior y posterolateral al epidídimo en forma semilunar. La capa mesotelial representa la porción visceral de la túnica vaginal del testículo y el plano profundo de la capa mesotelial es conocido como túnica albugínea, desde la cual se extienden los tabiques fibrosos al interior del testículo y lo subdividen en lobulillos incompletos, dentro de los cuales se encuentran los túbulos seminíferos donde se forman los espermatozoides. Estos extremos se unen en la rete testis, que se encuentra a la altura del mediastino testicular y desembocan en diferentes conductillos eferentes que se conjuntan en la cabeza del epidídimo formando así el conducto que recibe el nombre de conducto deferente (8) (fig. 1).

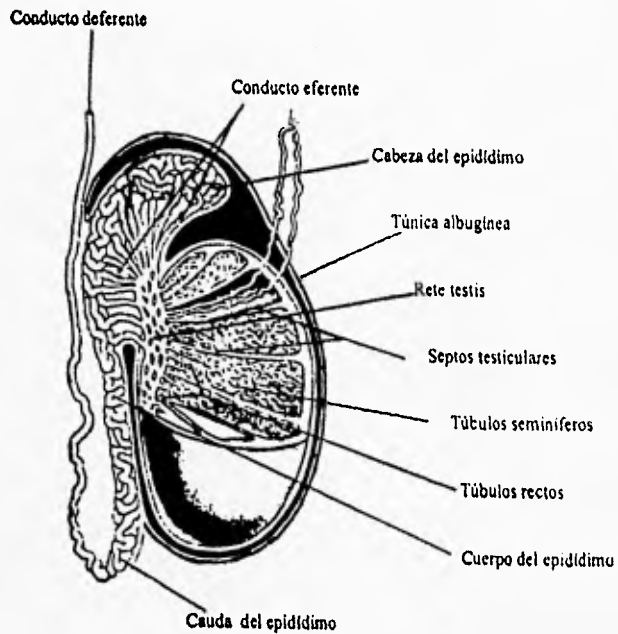


Figura 1.- Corte longitudinal que muestra la anatomía interna del testículos (8) (Adaptado de Bloom y Fawcett).

Dentro de los septos testiculares se encuentran los túbulos seminíferos dispuestos de tal manera que sus extremos se conjuntan en la rete testis, de la cual parten en su extremo superior los conductillos eferentes que conformarán parte de la cabeza del epidídimo.

En el adulto los testículos están formados por túbulos seminíferos y tejido intersticial. El proceso de formación de estos comportamientos se inicia cuando las células primordiales o gonocitos que se originan a partir del endodermo del saco vitelino, se dirigen a lo largo del mesenterio dorsal. Durante esta migración se multiplican y unen con mov ameboides algunas células del epitelio celómico formando estructuras en forma de cordones, a las que se denominan "cordones sexuales primitivos", los cuales más tarde se alargan y se apartan del epitelio, formando los "cordones testiculares primitivos"; dentro de ellos quedan las células germinales primordiales en proliferación y células de soporte precursoras de las células de Sertoli (CS) que se diferencian a partir del epitelio y las células germinales primordiales en proliferación, las cuales permanecen en ese sitio hasta su madurez, momento en el que los cordones adquieren una posición central hueca para formar los túbulos seminíferos.

Asimismo, entre los túbulos seminíferos hay tejido conectivo constituido por células parecidas a los fibroblastos y que algunas pruebas histológicas indican que contienen enzimas que participan en el metabolismo de algunos esteroides y que son los que dan origen a las células de Leydig (Ch). Cada uno de los comportamientos (túbulos seminíferos y tejido intersticial) se encarga de llevar a cabo una de las funciones testiculares: la sección tubular es la encargada de realizar la formación de gametos y la sección intersticial es la encargada de llevar a cabo la función endócrina.

En el compartimento tubular se encuentran células peritubulares adosadas a las membranas de las CS, sintetizando junto con ellas una membrana basal y formando así, las uniones intercelulares de las CS, la llamada barrera hematotesticular (9). A las CS también se les conoce como células "nodriza", de sostén o células en candelabro, por servir de soporte estructural y metabólico a las células de la línea germinal en sus diversos estados de diferenciación. Y son precisamente las células de la línea germinal las que finalmente dan origen a los gametos masculinos llamados espermatozoides. (10)

El citoplasma de las CS contiene abundante retículo endoplásmico tanto liso como rugoso, sus mitocondrias son largas y delgadas, con crestas tubulares transversales. El aparato de Golgi consiste en elementos múltiples dispersos, y sus estructuras lisosomales parecen ayudar a la digestión de las células germinales en degeneración y cuerpos residuales liberados por las espermatides durante la espermiación (1,11).

En la rata el aparato reproductor no difiere mucho del resto de los mamíferos, también está constituido por testículos, epidídimo y pene.

Los testículos pierden contacto con la superficie epitelial y quedan separados por la tónica albugínea que es una cápsula que los cubre, y está compuesta por fibras de colágeno, tejido

conectivo y fibroblastos. En el interior de los testículos se encuentran los túbulos seminíferos que son largos y numerosos, en ellos están la CS y células germinales primordiales.

En el tejido intersticial hay CL y vasos sanguíneos principalmente y se localiza entre los túbulos seminíferos (12)

Los espermatozoides que inician su desarrollo en el interior del testículo se transportan a través de la Rete testis que está unido al conducto eferente, el cual se continúa en un órgano llamado epidídimo compuesto por músculo liso y tejido conectivo, este órgano a su vez se une al conducto deferente y finalmente a la uretra que comunica con la salida (13)

El inicio y mantenimiento de la espermatogénesis en los túbulos seminíferos depende de la presencia de una serie de hormonas, cuyos efectos directos se aprecian en las CS, las cuales a su vez modifican su metabolismo para producir los elementos que las células de la línea germinal requieren para completar su crecimiento y diferenciación.

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular que se lleva a cabo dentro del compartimiento tubular y origina como producto final las células sexuales masculinas o espermatozoides, los cuales después de su maduración en el túbulo se almacenan en el epidídimo que contiene un medio a de pH 5 a 6 (ácido) (fig. 2) (6).

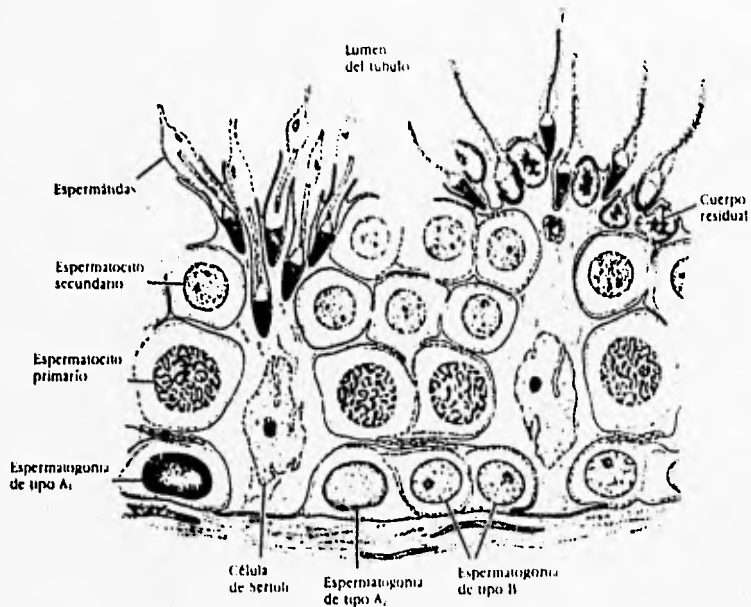


Figura 2.- Ultraestructura de las células de Sertoli (13) (Knobil E.)

Los espermatocitos y las espermátides tempranas ocupan los espacios intercelulares laterales, mientras que las espermátides tardías se encuentran localizadas en la zona apical.

En el comportamiento tubular se encuentran dos tipos celulares: las células germinales primordiales (PGCs) y las ES. Las PGCs después de llegar a la gónada se dividen mitóticamente y dan origen a las espermatogonias tipo A_1 , (células con núcleo oval y presencia de cromatina en el núcleo), estas células se dividen y generan a más espermatogonias tipo A_1 , y además a otro tipo de células las espermatogonias tipo A_2 . La espermatogonia A_2 presenta menos cromatina por lo que al microscopio se observa más clara.

Posteriormente las espermatogonias tipo A_2 por división mitótica producen espermatogonias tipo A_1 , las cuales por el mismo mecanismo generan a las espermatogonias tipo A_1 (14)

En el humano se han reportado una gran variedad de tipos de espermatogonias basándose en su morfología nuclear, (forma de la cromatina) así como presencia o ausencia de cristales de Lubarsch principalmente. En el tipo A se identificaron oscuras y claras dependiendo la cantidad de cromatina en el núcleo. Estas células son importantes porque además de proveer de precursores para el proceso mitótico, se renuevan ellas mismas.

Las espermatogonias tipo A_1 dan origen a un tipo celular llamadas intermedias por presentar características intermedias entre las espermatogonias tipo A_1 y espermatogonias tipo B. Las espermatogonias intermedias por división forman a las espermatogonias tipo B las cuales al dividirse originan a los espermatocitos primarios; las células que inician la meiosis, método por el cual las células reducen su material genético (fig. 3) (13)

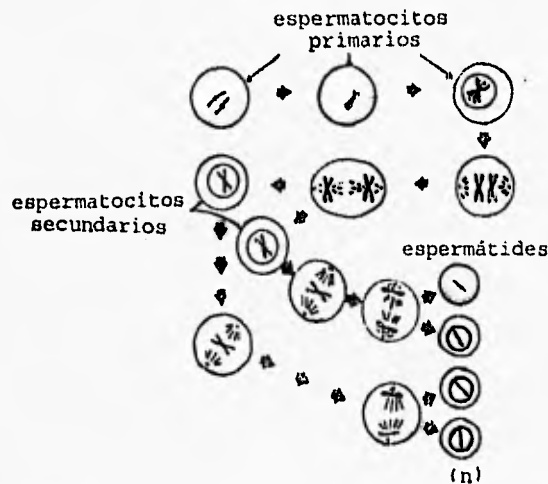


Figura 3.- Meiosis (13) (Knobil)
Indica los cambios ocurridos durante la división meiótica.

Después de la última división mitótica hay un periodo de síntesis de ADN, llamada también fase S, por lo que las células que inician la meiosis tienen el doble del material genético (ADN) en su núcleo.

Cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas unidas a un centrómero común. La meiosis consta de dos divisiones consecutivas, la primera se inicia con una profase larga que consta de cinco etapas: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis.

Leptoteno, en esta etapa las cromátidas se estiran muy finamente de manera que no se pueden identificar los cromosomas por separado (hay que recordar que ya ha tenido lugar la replicación de ADN por lo que cada cromosoma tiene dos cromátidas paralelas).

Zigoteno: los cromosomas homólogos en esta etapa se emparejan; es decir, entran en sinapsis y cada cromosoma reconoce a su homólogo (el mecanismo de reconocimiento aún no se conoce), en este proceso parece necesitar la presencia de la membrana nuclear y la formación de una cinta proteica llamada complejo sinaptonémico (estructura escaleriforme que tiene cromatina asociada a dos barras laterales y las cromátidas son así empalmadas. La configuración formada por la cuatro cromátidas y el complejo sinaptonémico se conoce como tetrada o bivalente).

Paquiteno, las cromátidas se engruesan y acortan (son visibles al microscopio). Ocurre el entrecruzamiento que es un intercambio de material genético (los genes de una cromátida se intercambian con los genes homólogos de la otra cromátida).

Diploteno, en esta etapa continúa el entrecruzamiento, se diluye el complejo sinaptonémico y los cromosomas homólogos comienzan a separarse, sin embargo, generalmente se observa que permanecen unidos en algunos puntos llamados quiasmas (regiones donde aún hay entrecruzamiento). Esta fase se caracteriza por un alto nivel de transcripción génica, las PGCs toman una apariencia "plumada" característica de los cromosomas que sintetizan ARN activamente.

La etapa de diacinesis se caracteriza porque los centrómeros se separan uno del otro y los cromosomas sólo se quedan unidos por los extremos de las cromátidas, acaba con la ruptura de la membrana nuclear y la migración de los cromosomas a la placa metafísica (figura 3b) (14). Llamada así porque los cromosomas se alinean en el centro de la célula (eje ecuatorial).

Fases de la profase I

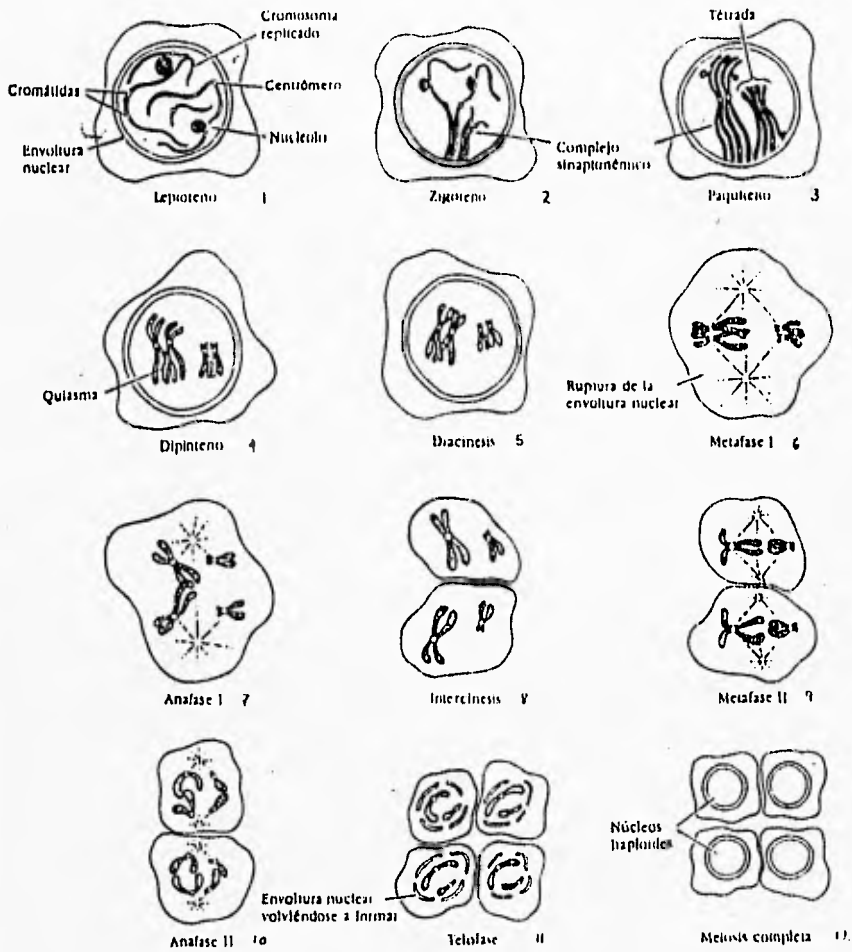


Figura 3a (14) (Gilbert F.)

Los cromosomas durante los estadios de meiosis. Los estadios de leptoteno a diacinesis son subestadios de la primera profase meiótica.

Durante la anafase I los cromosomas homólogos se separan de manera independiente. En la telofase I se forman dos células hijas cada una con un componente de la pareja de cromosomas homólogos a las cuales se les denomina espermatocito secundario. Posteriormente se da una intercinésis muy corta y se inicia la segunda división meiótica, durante la cual se alinean nuevamente los cromosomas en el centro durante la metafase II, en la siguiente etapa que es la anafase II se divide el centrómero, de modo que cada una de las células recibe una de las dos cromátidas dando origen durante la telofase II a cuatro células haploides llamadas espermátides, las cuales están conectadas entre sí mediante puentes citoplasmáticos.

En la rata el proceso de espermatogénesis es semejante al de todos los mamíferos sin embargo, las PGCs inician el periodo de división mitótica a los 14 ó 16 días de la vida fetal y estas primeras células que difieren muy levemente en la estructura de sus progenitoras, reciben el nombre de M-preespermatogonias según Hilscher (13).

Otros autores mencionan a otros periodos de actividad mitótica fetal a las células T-proespermatogonia, que en la vida adulta originan a las espermatogonias tipo A. Durante el decimoquinto día después de su nacimiento entra en meiosis la primera generación de espermatocitos primarios, la espermatogénesis es de 49 días y los espermatozoides aparecen en el testículo a los 50 días (10,13). Regaud () también definió en la rata dos tipos celulares de espermatogonias: las grisáceas claras cuando se observan en el microscopio y las ásperas oscuras por presentar abundantes manchas de cromatina. También se encuentran células intermedias entre las espermatogonias tipo A y espermatogonias tipo B.

En todos los mamíferos podemos encontrar a las PGCs en la base del túbulo seminífero y conforme avanza el proceso de espermatogénesis las células van avanzando hacia el lumen del túbulo (fig. 3b) .

A partir de la formación de espermátides se inicia otro proceso llamado espermiogénesis o espermateliosis. La diferenciación del espermatozoide implica la construcción de la vesícula acrosómica a partir del aparato de Golgi, el acrosoma forma una caperuza que cubre al espermatozoide, a medida que se forma la caperuza el núcleo gira a manera que la caperuza acrosómica que frente a la membrana basal del túbulo. Se forma el flagelo a partir del centriolo sobre el otro costado del núcleo, posteriormente el núcleo se aplana y se condensa, (ADN comprime) se elimina el citoplasma y las mitocondrias forman un anillo alrededor de la base del flagelo (3, 8, 9, 14).

Al término de la espermiogénesis la célula se encuentra completamente diferenciada y recibe el nombre de espermatozoide, el cual cuenta con una cabeza oval de 5 μm , de perfil piriforme; su parte anterior se cubre con el caparazón cefálico o acrosoma, la porción intermedia es cilíndrica con un filamento axial

envuelto por una formación espiral de mitocondrias y su cola o flagelo es la parte terminal del filamento axial (7, 9). (fig. 4)

Cada espermatozoide consta de un núcleo haploide, un sistema de propulsión para transportar al núcleo y un saco de enzimas lo que le permite la entrada al óvulo. Los flagelos son estructuras complejas, la posición motora principal se denomina axonema, cada uno formada por microtúbulos que emanan del centriolo.

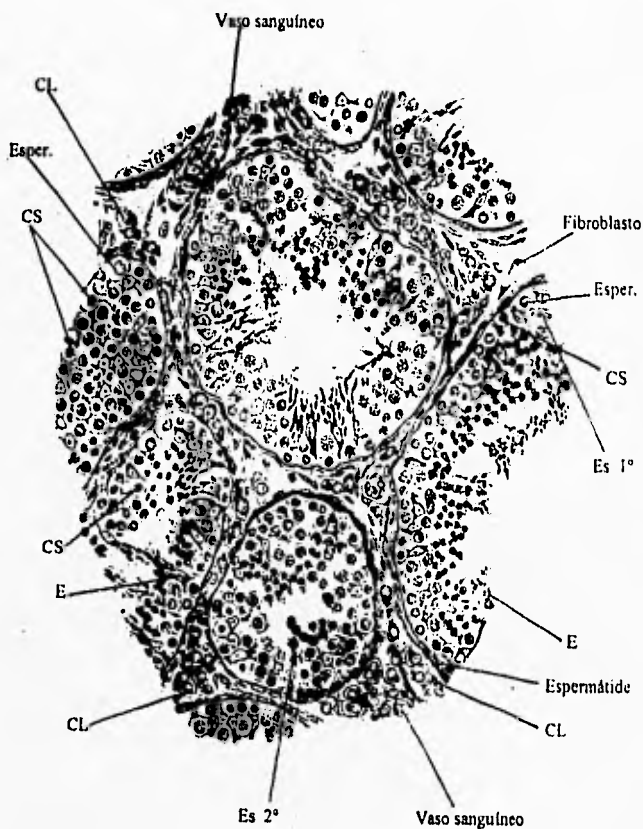


Figura 3b.- Sección transversal del testículo (8) (Bloom y Fawcett)

En este corte transversal dentro del túbulo seminífero se pueden observar diferentes estados de desarrollo de las células de la línea germinal - Espermatogonias (Esper), espermatoцитos primarios (Es 1°) y secundarios (Es 2°), espermátides y espermatoцoides (E), fibroblastos y vasos sanguíneos.

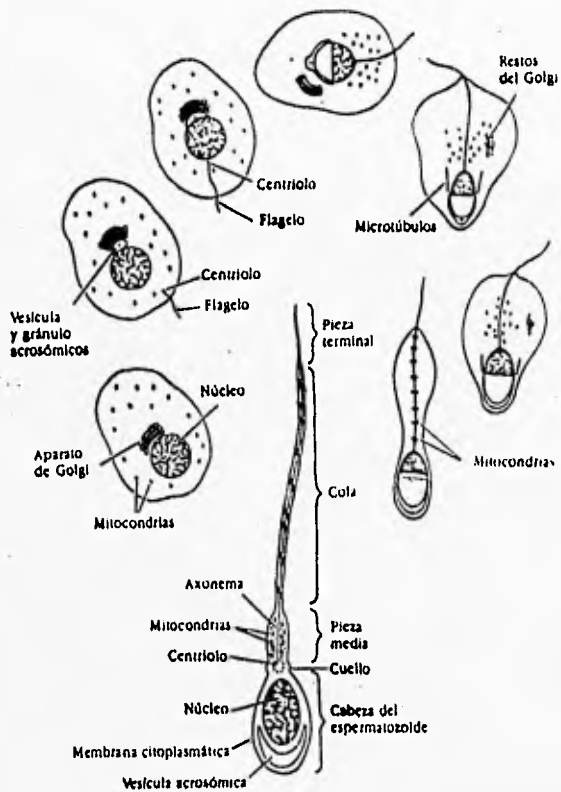


Figura 4. Proceso espermiogénico (14)

El centriolo produce un flagelo, el aparato de Golgi forma la vesícula acrosómica, las mitocondrias se reúnen alrededor del flagelo cerca de la base del núcleo haploide y se incorporan a la pieza media del espermatozoide y se alarga el cuerpo.

En la sección intersticial se encuentran algunas fibras de colágena, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y algunos tipos celulares que incluyen fibroblastos, macrófagos, células cebadas, células mesenquimatosas indiferenciadas y CL, que se encuentran en grupos compactos, formados por la disposición íntima de los túbulos seminíferos.

Las CL en el animal sexualmente maduro presentan una membrana plasmática con muchas especializaciones, incluyendo complejos de unión así como proyecciones citoplasmáticas. Alrededor de las CL existe una membrana basal de grosor y disposición variable que parece funcionar como soporte en combinación con las fibras de colágena. Presentan un núcleo con gránulos gruesos de cromatina, un nucleolo, un retículo endoplásmico liso bien desarrollado, típico de las células secretoras; en el citoplasma hay numerosas inclusiones semejantes a gotitas de lípidos y en algunas ocasiones presenta cristales (llamados cristales de Reinke en el testículo humano) de función desconocida (11).

Los pasos enzimáticos implicados en la biosíntesis de las hormonas esteroideas que se llevan a cabo en las CL recibe el nombre de esteroidogénesis. Utilizando al colesterol (Col) como sustrato inicial, mediante una serie de desdoblamientos de la cadena lateral y oxidaciones subsecuentes, se sintetiza inicialmente la Pregnenolona (Preg), que es el esteroide pivote del cual derivan todas las demás hormonas esteroideas. Hay evidencias de que la Preg puede sintetizarse a partir del acetato por una vía distinta del Col, posiblemente a partir del 24-dehidrocolesterol; sin embargo, en el tejido normal esta vía es poco importante, por lo que la esteroidogénesis se describe usualmente a partir de Preg (15).

En el proceso esteroidogénico existen dos vías sintéticas: la vía de los intermediarios Δ^5 y la vía de los precursores Δ^4 , siendo esta última la más común en la gónada masculina en diversas especies, incluyendo al hombre y a la rata (5, 6, 11). El Col libre, que es insoluble en el citosol, es transportado a la mitocondria por medio de una proteína acarreadora de esteroides (SCP2) y entra en contacto con la C20,22-desmolasa mitocondrial citocromo P450 dependiente (P450 scc), la cual corta la cadena lateral del Col mediante una serie de hidroxilaciones sucesivas, transformándolo en Preg.

A continuación, la Preg es transformada por medio de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) y una Δ^4/Δ^5 Isomerasa, actividades enzimáticas del retículo endoplásmico no dependientes del citocromo P450, en Progesterona (Prog) y posteriormente a través de la actividad de la 17 α -hidroxilasa en 17 α -hidroxiprogestero. Esta última, por medio de la C17,20-desmolasa, dependiente del citocromo P450 17 α , se transforma en androstendiona (A), la cual finalmente por medio de la 17 β -cetoesteroide reductasa es convertida a testosterona (T), la cual es el producto final de la vía.

La T puede ser posteriormente hidroxilada tanto en C3 como en C17 dando origen a la 19-hidroxitestosterona, la que es el principal intermediario en la aromatización testicular que involucra todo un complejo enzimático del retículo endoplásmico llamado de la aromatasa, el cual es dependiente de un citocromo P450 (cyt aro), y se encarga de modificar el anillo A de la T para generar el 17 β -estradiol (E₂), el cual por medio de una reacción reversible que involucra al NADP⁺ como cofactor, puede dar origen a su vez a un segundo estrógeno conocido como estrona (E₁) (15) (fig.5).

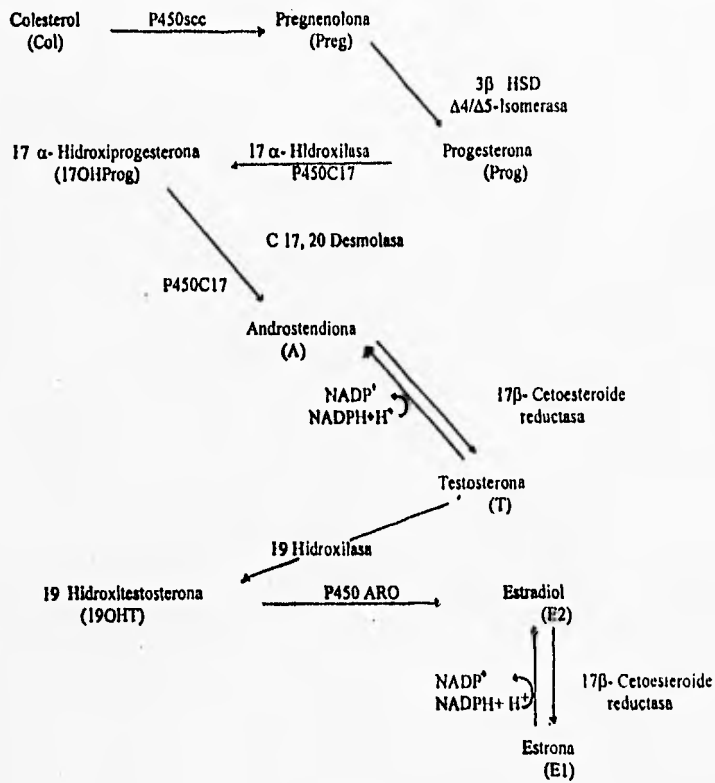


Figura 5.- Via $\Delta 4$ de la esteroidogénesis testicular.

Una gran cantidad de hormonas esteroides son transportadas por el torrente sanguíneo íntimamente ligadas a proteínas plasmáticas; esto les permite aumentar su solubilidad en un medio acuoso como la sangre. Las proteínas de enlace son altamente específicas para cada esteroide; por ello se han utilizado con éxito para cuantificar esteroides en los que se permite que la hormona compita con un esteroide radiactivo por una determinada proteína de enlace (fig. 5a) (16).

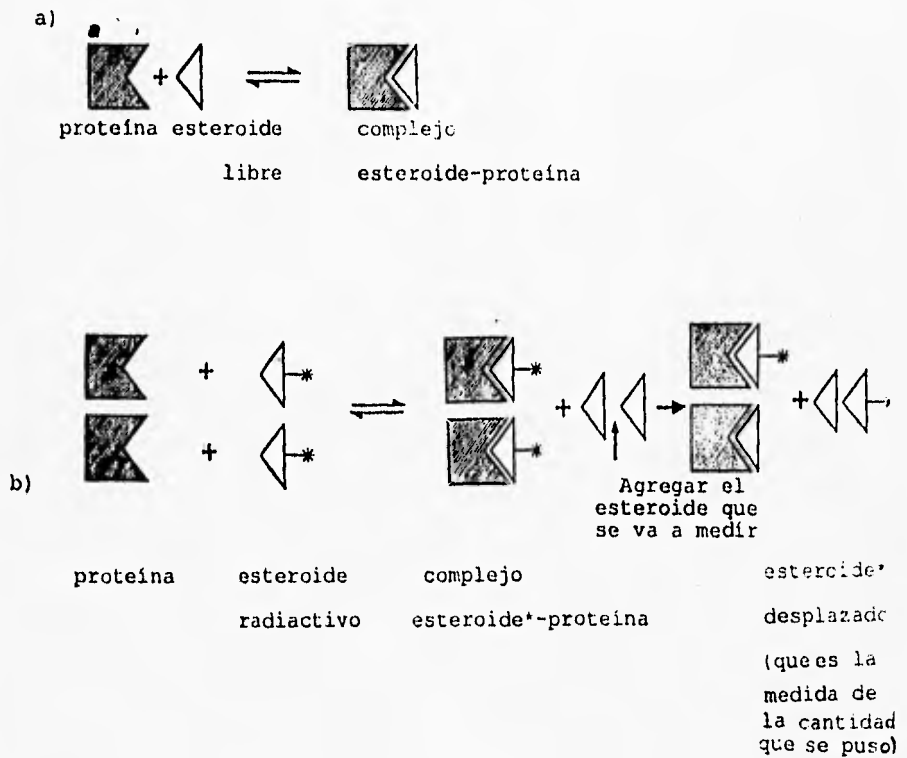


Figura 5a.- a) Conjugación reversible de un esteroide con una proteína plasmática de enlace. b) Competencia para la proteína de enlace por medio de un esteroide radiactivo y uno no radiactivo se puede utilizar como una prueba de laboratorio (15).

3. Eje de regulación Hipotálamo-Hipófisis-Testículo (figs. 6 y 7).

En los últimos años se ha determinado que los sistemas nervioso y endocrino funcionan en realidad como un sistema único interrelacionado. El sistema nervioso central, particularmente el hipotálamo, regula muchas de las funciones del cuerpo y produce una serie de sustancias neurosecretoras llamadas factores liberadores, las cuales regulan a su vez la síntesis y secreción de las hormonas tróficas hipofisiarias, primeros eslabones de los principales ejes de regulación fisiológica en el organismo (fig. 5).

La regulación hormonal a través del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (fig. 6) se realiza mediante la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por las terminaciones nerviosas de la eminencia media del hipotálamo. Este factor liberador llega a la adenohipófisis a través del sistema porta hipotalámico-hipofisiario desencadenando la secreción, por parte de los gonadotropos hipofisiarios, de la hormona foliculo estimulante (FSH) que tiene como células blanco a las CS y la hormona luteinizante (LH) que tiene como células blanco a las CL (4, 7, 11).

Cuando la LH y la FSH son liberadas hacia la circulación llegan a la membrana plasmática de las células blanco y activan al sistema de la adenilato ciclasa que aumenta los niveles intracelulares del 3'5'-adenosin monofosfato cíclico (AMPC), el cual actúa como segundo mensajero intracelular. El AMPC activa una serie de cinasas específicas (Proteín cinasas tipo A [PK-A]) que al fosforilar diversos substratos modifican varias funciones tanto de las CS como de las CL, entre las que se encuentran el aumento en la esteroidogénesis y de la síntesis de proteínas específicas tales como la inhibina, la proteína unidora de andrógenos (ABP) y la transferrina (15) (fig. 6).

La FSH estimula a las CS, las cuales brindan nutrición a los espermatozoides en desarrollo; sin embargo, estas células también liberan una hormona llamada inhibina, la cual tiene un efecto directo sobre la hipófisis para disminuir la producción de FSH y así mantener un equilibrio en la producción espermatogénica.

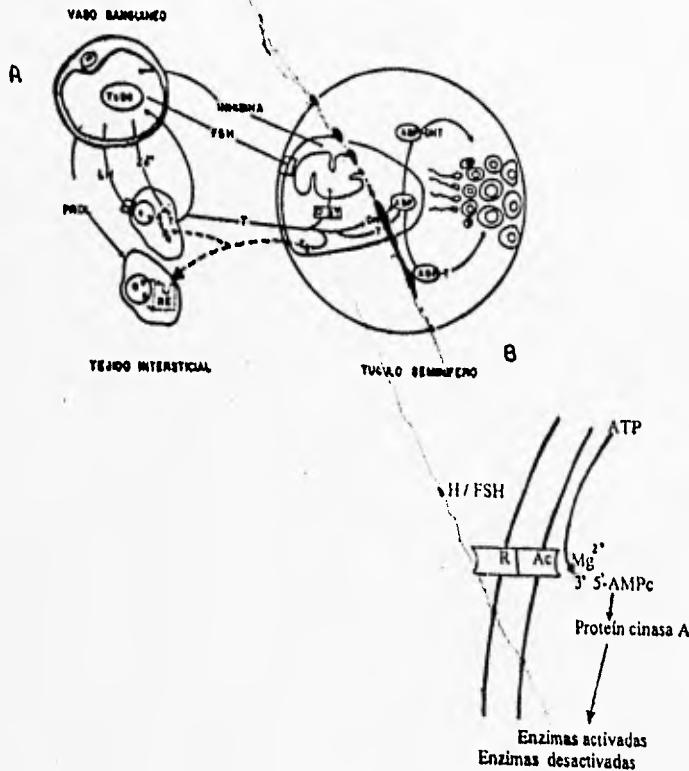


Figura 6.- Regulación intratesticular.

Se han postulado varios mecanismos de regulación parácrina de la función testicular que se ilustran en esta figura. A) La T sintetizada por las CL se puede unir a receptores específicos en las CS modulando la síntesis de proteínas tales como la transferrina y la proteína unidora de andrógenos (ABP), las cuales a su vez pueden influir sobre la diferenciación de las células de la línea germinal. B) Activación del sistema de la enzima adenilato ciclasa después de que la LH o la FSH se han unido a su correspondiente receptor en las CL o la CS respectivamente, lo cual resulta finalmente en la producción de proteínas específicas y en un incremento de los productos de la vía esteroidogénica. (R)receptor específico (Ac) Adenilato ciclasa.

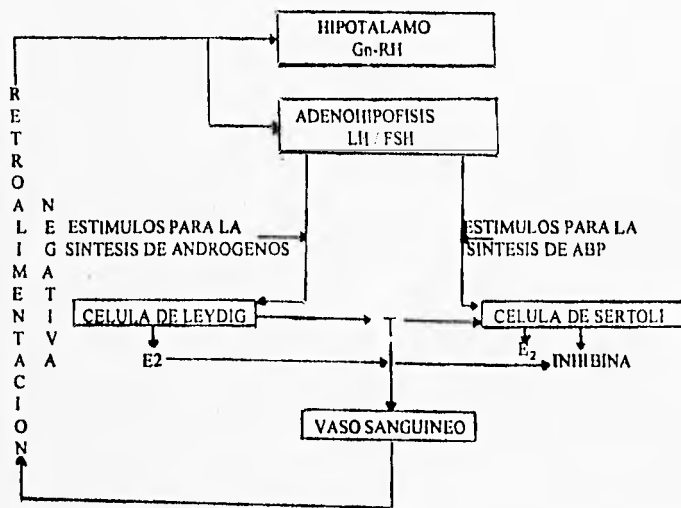


Figura 7.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo

GnRH = Hormona liberadora de las gonadotropinas.
 LH = Hormona luteinizante
 FSH = Hormona folículo-estimulante
 ABP = Proteína unidora de andrógenos

Por otro lado, la secreción de GnRH por parte del hipotálamo estimula la secreción de LH la cual tiene un efecto sobre las CL que producen T; este andrógeno a través de procesos de retroalimentación negativa a niveles hipotalámico e hipofisiario mantiene sus niveles circulantes y testiculares dentro de rangos específicos.

4. Regulación intragonadal.

Existen evidencias cada vez más concluyentes de que los cambios sutiles de la función testicular pueden ser regulados en forma local, a través de interacciones de tipo paracrino y autocrino que involucran contactos intercelulares, así como por interacciones mediadas a través de factores solubles de naturaleza diversa.

Así, las hormonas hipofisiarias proporcionarían el estímulo basal del cual dependen en primera instancia el funcionamiento testicular, mientras que la regulación final del tiempo e intensidad de las respuestas de estirpes celulares particulares, dependería de las complejas interacciones inter e intracompartamentales.

4.1. Interacciones CS-Células de la línea germinal.

Debido a que la espermatogénesis se encuentra principalmente bajo el control de T y FSH, y a que las células de la línea germinal carecen de receptores específicos para estas hormonas, las interacciones entre las CS y las células de la línea germinal parecen jugar un papel esencial para la adecuada maduración de los gametos masculinos.

La viabilidad de las células germinales disminuye rápidamente cuando éstas son aisladas, mientras que en cultivos *in vitro* de fracciones tubulares que incluyan CS, las células de la línea germinal pueden sobrevivir estableciendo contactos con éstas. Estos cocultivos permiten incrementos en la síntesis de DNA y RNA de las células germinales que no pueden ser mimetizados por cocultivos en presencia de otras estirpes celulares de naturaleza epitelial (17).

El desarrollo de las células de la línea germinal está precisamente dirigido en términos temporales y espaciales, y esta organización parecería depender en primera instancia de la serie de puentes citoplasmáticos que se establecen entre las CS y ellas, si bien en número relativamente escaso y artificiales.

Es muy claro el papel de "nodriza" que las CS cumplen con respecto a las células de la línea germinal, ya que el establecimiento de la barrera hematotesticular origina que ellas canalicen los diversos componentes metabólicos esenciales para la

supervivencia celular hacia los diferentes estados de diferenciación con los cuales establece contacto. De igual manera, las grandes limitaciones metabólicas que presentan especialmente los espermatocitos y las espermátides, determinan la elevada dependencia de estas células de los productos que les proporcionan las CS.

Las CS poseen una elevada tasa glucolítica y producen lactato y piruvato que liberan hacia el medio. Las células de la línea germinal, por su parte, son incapaces de subsistir utilizando como sustrato de oxidación a la glucosa a pesar de contar con todas las enzimas glucolíticas, pero sí son capaces de utilizar al lactato y al piruvato para mantener los niveles basales de ATP necesarios para sobrevivir (18).

Un posible mecanismo mediante el cual la CS pudieran afectar la diferenciación de las células germinales es la secreción de factores parácrinos específicos. Debido a que la organización temporal y espacial del epitelio seminífero varía, se esperaría que estos factores variaran, asimismo en función de la etapa específica del ciclo del epitelio seminífero en el cual se encuentran las células germinales que rodean a las CS, lo cual determinaría que las células de la línea germinal tendrían también la capacidad de influir a su vez, sobre el metabolismo de las CS (19).

4.2. Interacciones CS-Células peritubulares.

La presencia de células peritubulares en cultivos de fracciones enriquecidas en CS incrementa la tasa de supervivencia de estas últimas, y permite que las células se organicen en estructuras tubulares, tal como se observa al cultivar las CS en matrices extracelulares y que incluso incrementen su actividad secretora *in vitro* (20).

Diversos estudios han demostrado entre otros aspectos que la membrana basal que limita a los túbulos seminíferos está compuesta de moléculas tales como fibronectina, colágenas I y IV y proteoglicanos ricos en condroitín sulfato que son depositados por las células peritubulares, así como otros proteoglicanos ricos en heparán sulfato y laminina aportados por las CS. El medio de los túbulos seminíferos puede también disminuir la concentración del AMPc intra y extracelular a través de un factor de origen proteico y de peso molecular elevado (mayor a 50 kD), cuya identidad no se conoce (21).

4.3. Interacciones CS-CL (Interacciones intercompartamentales).

Como se ha señalado anteriormente, las CL son capaces de modular la actividad funcional de las CS a través de su producción de T, la cual es captada por éstas a través de receptores específicos, lo que resulta en una estimulación de la actividad de RNA polimerasa y la síntesis y secreción de ABP y transferrina (22).

El concepto de que las CS pudieran a su vez influir sobre la actividad de las CL ha venido afirmándose a partir de la determinación de que daños estructurales a secciones particulares de túbulos seminíferos pueden afectar secundariamente la morfología y capacidad esteroidogénica de las CL adyacentes, pero no de aquéllas ubicadas en regiones más alejadas.

Algunos autores como Verhoeven y Cailleau (23,24) han descrito la actividad de un factor modulador de CL producido por túbulos seminíferos de testículos humanos o de rata o por cultivos primarios de CS que parecen incrementar la síntesis de T en cultivos primarios de CL en períodos cortos de incubación (4 a 5 h). Este factor parece estimular un paso temprano de la vía esteroidogénica, bloqueando a la vez en forma parcial la conversión de los precursores C_{21} en andrógenos.

Por otra parte, se ha reportado la existencia *in vitro* de un factor secretado por túbulos seminíferos de ratas adultas que inhibe la esteroidogénesis dependiente de LH durante períodos de incubación de 6 h, en contraste con reportes previos que mostraban una estimulación de la síntesis de T en CL purificadas con Percoll (25).

Además de estos efectos agudos sobre la esteroidogénesis, las CS parecen tener efectos tróficos a largo plazo sobre las CL. Así, cuando se establecen cultivos primarios de CL de cerdo en medios condicionados de CS (MCCS) cultivadas en presencia de FSH e insulina (I), se observa en las primeras la disminución tanto en el número de receptores para gonadotropina coriónica humana (hCG) como en la respuesta esteroidogénica asociada a esta estimulación (26).

La diversidad de las respuestas evocadas por las CS sobre las CL parece ser debida a la diversidad de condiciones experimentales existentes entre los modelos utilizados por los diferentes grupos de investigación, entre las que se encuentran la edad de los animales y la composición de los medios de cultivo entre otros (27).

De igual manera, la naturaleza del o los factores involucrados en estas interacciones queda por ser determinada. Algunos factores de naturaleza inhibitoria ya descritos son presumiblemente de naturaleza proteica con pesos moleculares que oscilan entre 10 y 30 kD, aunque diversos autores han intentado sin éxito relacionar unívocamente alguna de las proteínas secretadas por las CS con el factor modulador de la esteroidogénesis (19).

II. ANTECEDENTES

Los primeros intentos por determinar cuál es el sitio donde ocurre la aromatización testicular fueron realizados en caballos, posteriormente en humanos, simios, perros y ratas. Estos estudios realizados *in vitro* demostraron que la aromatización ocurre preferentemente en túbulos seminíferos más que en el tejido intersticial. Valladares y Payne investigaron el sitio intratesticular de síntesis de E_2 en ratas adultas mediante incubaciones de homogeneizados testiculares mantenidos a 34°C por 3 hr (28,29). Los resultados obtenidos indicaron que la aromatización a esta edad ocurre principalmente en el tejido intersticial y muy probablemente no se presenta en túbulos seminíferos, concluyéndose que la actividad de aromatasas en ratas maduras está regulada por LH y no por FSH (28). Estos mismos autores (29) confirmaron estos hallazgos utilizando CL aisladas de testículo de ratas adultas normales (65-75 días de edad) incubadas por 4 hr a 34°C . Estas presentan la capacidad de aromatizar T a E_2 y la estimulación con hCG aumenta dicha capacidad, teniendo efectos semejantes *in vitro* para el dibutiril AMPc (dbAMPc).

Otros autores como Valladares 1981 realizaron 30 estudios en CL de ratas inmaduras (15-25 días) y de ratas maduras (60-75 días), incubándolas por 4 hr, en presencia de hGC o AMPc. Los datos obtenidos mostraron que las células de ratas inmaduras tienen la capacidad de aromatizar T; sin embargo, no responden a las estimulaciones de hGC o AMPc. Esta incapacidad de respuesta podría deberse a que hay pocos sitios receptores para hGC/LH, al igual que para dbAMPc.

Welsh y Hsueh en 1982 (31) investigaron el efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) en cultivos primarios de CL provenientes de ratas adultas hipofisectomizadas, mantenidas a 37°C por 10 días y observaron que este factor inhibe la producción de T estimulada por hCG. Asimismo, obtuvieron como resultado que el EGF inhibe la esteroidogénesis gonadal inducida por AMPc y dbAMPc, asociando esto con un efecto inhibitorio sobre la 17α -hidroxilasa y la $C17,20$ -liasa. El efecto inhibitorio que presentó este factor pudiera estar mediado vía un sitio de unión de EGF en CL y pudiera ocurrir independientemente de un efecto supresivo general de EGF sobre el cultivo. Por lo tanto, concluyeron que el EGF influye sobre funciones de diferenciación de tipo celular endócrino especializado *in vitro*.

Estudios realizados (32) en 1982 Rommerts y cols demostraron que las CL y las CS, así como las peritubulares (en menor grado) producen E_2 a partir de T. Las actividades biosintéticas de las CS y de las CL dependen de las condiciones de cultivo, indicando que la producción de E_2 aumenta conforme pasa el tiempo de cultivo en CS de ratas inmaduras, mientras que en las CL de los mismos organismos, se ve disminuida su producción después de 6 días de cultivo.

Adashi y cols. en 1985 (33) estudiaron la capacidad de la somatomedina-C (Sm-C) de potenciar la actividad de aromatasa inducida por FSH, en cultivos primarios de células de la granulosa de ratas inmaduras hipofisectomizadas, mantenidas hasta 80 hrs a 37°C. Los resultados mostraron que la Sm-C induce la actividad de aromatasa producida por FSH de manera dosis y tiempo dependiente, siendo 48 hr el tiempo mínimo requerido y los efectos apreciables únicamente a dosis de magnitud nanomolar, afectándose aparentemente sólo la $V_{máx}$ de la reacción.

Verhoeven y Cailleau en 1986 (34) investigaron el efecto del EGF sobre la esteroidogénesis de CL de rata y ratón adultos, así como en células intersticiales de rata inmadura, incubando las células en presencia o ausencia de LH a 32°C en preparaciones frescas. Se demostró que el EGF estimula directamente la esteroidogénesis con un pequeño efecto en preparaciones frescas y con un efecto ligero en cultivos en presencia de LH.

Lin y cols. en 1986 (35), realizaron sus investigaciones con cultivos de CL de ratas adultas (60-90 días) mostrando que son extremadamente sensibles a la estimulación por hCG. Asimismo observaron que la formación de T aumenta con la adición del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I). Por otro lado determinaron que la estimulación por hCG aumenta la formación del AMPc y ésta es significativamente mayor en presencia de IGF-I, por lo que se concluye que las CL contienen receptores específicos de IGF-I, que pueden modular la esteroidogénesis y que no pueden ser imitados por otros factores de crecimiento.

Payne y cols. en 1987 (36) realizaron estudios intentando determinar el sitio específico de aromatización intratesticular y cuál la posible función del E_2 testicular. CS y CL de ratas inmaduras fueron incubadas durante 4 hr, ratificando los resultados ya obtenidos sobre la estimulación con hCG y dbAMPc en la actividad de aromatasa, cuya actividad máxima cambia con la edad (28). Además de proponer que el E_2 funciona como agente mitogénico para las CL y CS, sugieren que una mayor producción de dicho estrógeno es el responsable del alto rango de actividad mitogénica en las mismas células.

Por otro lado Reaside y cols en 1988 (37), al efectuar estudios con cultivos primarios de CL de cerdo inmaduro, evaluando los efectos del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) observaron una estimulación de la secreción de estrógenos después de las 12 y 48 hr de cultivo, concluyendo que este factor tiene un papel paracrino/autocrino, en el control de la síntesis de estrógenos por esta fracción celular.

Saez y cols en 1989 (26) utilizando un modelo *in vitro* de CL y CS de cerdo inmaduro cultivando las células solas o en cocultivo por 4 días, en presencia o ausencia de hCG o FSH, demostraron que en el cerdo inmaduro, en contraste con la rata inmadura, el principal sitio de aromatización son las CL y que esta actividad es regulada

por hCG y el efecto es potenciado por CS, ya que en el cocultivo el efecto de esa hormona es potenciado por la FSH.

Rigaudière y cols. en 1989 (38) evaluaron los efectos de la I, el IGF-I y la hCG sobre la actividad de aromatasa en incubaciones de CL a tiempos cortos de manera comparativa, observando que estos factores tienen un efecto directo sobre el complejo enzimático de la aromatasa. Por otra parte, en el mismo experimento se determinó que la citocalasina, la actinomicina D y la cicloheximida inhiben la actividad de la I y del IGF-I; aunque estos efectos se observaron desde los 15-30 min de la incubación, los resultados obtenidos sugirieron que el transporte de glucosa, la síntesis de proteínas, y/o la síntesis de un nuevo RNAm son requisitos para la expresión completa del efecto de estos péptidos sobre la aromatización.

Syed y cols en 1991 (39) investigaron el efecto de EGF e IGF-I sobre la producción de T en CL humanas procedentes de pacientes orquitectomizados por tratamiento de cáncer de próstata; las células fueron cultivadas en diferentes tiempos con hCG, dbAMPc, EGF e IGF-I. Los resultados mostraron que el EGF estimula la producción basal de T, mientras que IGF-I no es efectivo en condiciones similares de experimentación. En presencia de hCG, el EGF estimula la producción de T después de 24 hr, pero en presencia de una dosis máxima de hCG y dbAMPc no hay estimulación alguna. Por otra parte, el IGF-I potencia el efecto de hCG sobre la producción de T, por lo que sugieren que EGF e IGF-I tienen un papel regulador de la esteroidogénesis en el testículo humano. Cabe señalar que estos autores no evaluaron el efecto de sus tratamientos sobre la actividad de aromatasa.

Sigrid y cols. en 1992 (40) estudiaron el efecto de IGF-I en la producción de andrógenos por CL altamente purificadas de ratas púberes y adultas en cultivos de 3 días mantenidos a 34°C después de una estimulación máxima final de LH durante 3 hr. Los datos obtenidos mostraron que el IGF-I actúa directamente sobre las CL y optimiza la producción de andrógenos, siendo más marcado el efecto en las células de los animales adultos. Al igual que en el trabajo mencionado anteriormente, no se reportaron datos relacionados con la producción de E₂ en estos experimentos.

Por otro lado, experimentos realizados por Adachi y Kurachi en 1994 (41) parecen involucrar al EGF como un regulador autocrino y paracrino en las células de trofoblasto de humano mantenidas en condiciones *in vitro*.

Cabe señalar que a partir de 1992 a la fecha no se han reportado estudios relacionados con el efecto de I o EGF sobre la función gonadal en los diferentes modelos de estudio.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado una serie de estudios encaminados a dilucidar cuál es el sitio específico donde ocurre la aromatización testicular así como la influencia que tienen diversos factores hormonales sobre ésta, y sobre el funcionamiento global de la vía esteroidogénica en diferentes organismos tanto maduros como inmaduros. Sin embargo, y aún cuando ya se ha evaluado la producción esteroidogénica basal en la mayoría de los casos, existen reportes contradictorios que no han permitido observar el efecto que tienen diversos factores hormonales sobre la síntesis de E₂ en CL *in vitro*.

Tomando en consideración lo anteriormente mencionado, en este trabajo se intenta evaluar el efecto de la I y el EGF sobre el metabolismo de [³H] Preg adicionada a fracciones enriquecidas en CL de ratas adultas normales durante periodos cortos de incubación, con el objetivo de evaluar su transformación a T y E₂, contribuyendo de esta forma a conocer cuál es el papel funcional de estos factores sobre la función testicular.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Determinar la influencia del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y de la Insulina (I) sobre la actividad de aromatasa de CL de rata adulta normal contenidas en incubaciones a tiempos cortos.

2. Objetivos particulares.

- a) Determinar la tasa basal de transformación de [³H]-Preg en T y E₂ en CL de rata adulta normal mantenidas en incubaciones durante periodos cortos hasta de 3 hrs.
- b) Evaluar el efecto de diversas dosis de I y EGF sobre la producción de T y E₂ en CL de rata adulta normal.

V. HIPÓTESIS

La I y el EGF ejercen alguna influencia reguladora sobre la actividad de aromatasa en CL, las proporciones de [³H]-T y [³H]-E₂ producidas a partir de la [³H]-Preg adicionada por lo tanto, serán diferentes a las fracciones celulares no estimuladas con estos factores.

VI. METODOLOGÍA

Ratas macho normales de la cepa Wistar de 90 días de edad fueron sacrificadas por dislocación cervical, extrayéndose los testículos por vía abdominal. La sangre secuestrada en el órgano se eliminó mediante un lavado con solución Krebs-Ringer adicionada con 0.2% de glucosa (KRBG) a pH 7.4. La fracción enriquecida en CL se obtuvo mediante la metodología descrita por Bermúdez y cols. (42).

1. Obtención de las fracciones enriquecidas en CL (fig. 8).

Los testículos se descapsularon y las gónadas se dispersaron inicialmente por medio de digestión con colagenasa tipo I (1 mg/ml en KRBG) durante 18 min a 37°C, con agitación periódica. Posteriormente se adicionaron dos volúmenes de solución isotónica (NaCl 0.9%) dejándolas reposar por 10 min a 5°C. La suspensión celular fue filtrada a través de una malla de diámetro de poro entre 50-100 μm y el filtrado fue centrifugado a 1,500 x g durante 10 minutos a 5°C. El botón de células intersticiales se resuspendió en KRBG y fue colocado sobre una solución de Ficoll-Albúmina (13%-0.2% en KRBG), pH 6.5, centrifugándose a 1000 x g durante 15 min a 5°C. Posteriormente se recuperó la pastilla celular, la cual representa a la fracción enriquecida en CL y se le resuspendió en KRBG, para ajustar la densidad celular final a 6×10^5 CL/ml.

2. Incubaciones celulares.

A cada tubo de incubación se le adicionaron volúmenes totales de 500 μl de la suspensión celular, aproximadamente 100,000 cpm de 6,7-[H]-Preg en un volumen máximo de 10 μl , y en su caso, las correspondientes dosis de I o EGF. Las CL se incubaron a 37°C durante 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 min en presencia o ausencia de I (10, 50 y 100 ng/ml) o EGF (10, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Concluidos los diferentes tiempos de incubación, la actividad enzimática se detuvo por adición de 500 μl de una solución 2 N de NaOH. Cada diferente combinación de tiempo y dosis empleada se repitió por triplicado, y se realizaron 3 experimentos independientes bajo las mismas condiciones señaladas, de forma tal que para cada punto se reunieron en total 9 réplicas.

3. Cuantificaciones hormonales.

La extracción del medio de incubación en cada tubo se realizó agregando 5 ml de éter dietílico y agitando mecánicamente durante 1 min. Después de observar que se habían separado las dos fases orgánica y acuosa, los tubos fueron colocados en un baño de hielo

seco-acetona hasta la congelación de la fase acuosa. La fase orgánica se decantó a un tubo de vidrio para centrifuga de fondo cónico, sin tapón, con capacidad de 15 ml. El procedimiento de extracción se repitió una vez más después de comprobar que la fase acuosa remanente se hubiera descongelado, reuniéndose las dos fases orgánicas en el mismo tubo.

Los disolventes de las soluciones de las fases colectadas fueron evaporados, quedando el extracto sobre las paredes de los tubos; dichos extractos fueron resuspendidos y concentrados al lavarse las paredes internas de los tubos con una mezcla de metanol y éter dietílico (8:2) por tres ocasiones; el extracto resuspendido se transfirió a la línea de origen de una cromatoplaça (Silica DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F 254 0.25 mm de espesor, 20 X 20 cm) en forma tal que no se extendiera más de 3 mm a los lados, transfiriéndose 10 tubos por placa. En cada placa se colocaron los estándares correspondientes a los esteroides que se deseaban separar (Preg, T y E₂).

Las placas se colocaron en forma vertical en una cámara para cromatografía que contenía benceno puro, se tapó la cámara y se dejó que el disolvente ascendiera por la sílica hasta el borde superior de la placa, se sacó de la cámara y después de secarla se colocó en el segundo sistema de desarrollo que contenía una mezcla de benceno-acetato de etilo (8:2); posteriormente la placa se colocó en un tercer sistema que contenía benceno-metanol (95:5).

La placa ya seca se colocó debajo de la luz de una lámpara ultravioleta de 254 nm de longitud de onda y se marcaron sobre la sílica la zona de migración correspondiente a cada esteroide (Preg, T y E₂); por paralelismo se marcaron las zonas correspondientes a cada esteroide y además se marcaron los límites izquierdo y derecho correspondientes a las zonas de aplicación de cada muestra, formando finalmente una serie de cuadros en la placa, en la que cada área delimitada representa la zona de aplicación correspondiente a un esteroide de cada muestra. La sílica de las áreas marcadas se raspó con una navaja para transferir por aspiración a una pipeta Pasteur previamente empacada con fibra de vidrio.

Los esteroides fueron redisoluertos en un disolvente (éter etílico-metanol 8:2) en un vial de conteo. El disolvente se evaporó, se agregó al vial una muestra de líquido de centelleo-tolueno (2:1) y finalmente los viales se contaron en un espectrofotómetro de centelleo que presenta una eficiencia de aproximadamente 55% para tritio (39). Los resultados obtenidos se procesaron y analizaron mediante la prueba estadística de t de Student de dos colas, considerándose diferentes los valores con un límite de P<0.05 (43).

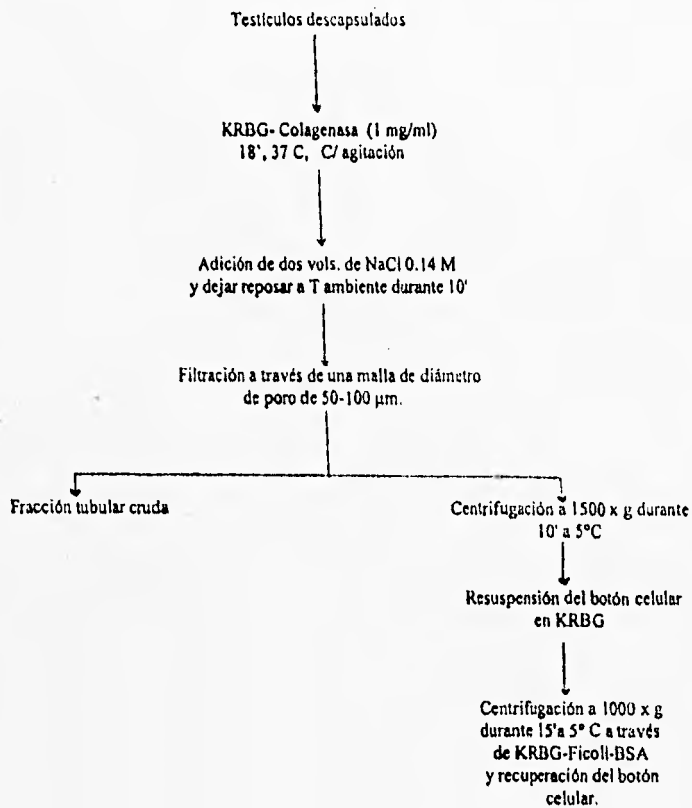


Figura 8.- Obtención de fracciones enriquecidas en CI a partir de testículos de ratas adultas normales.

VII. RESULTADOS

En las tablas I y II se observa la variación con respecto al porcentaje de radiactividad inicial adicionada en forma de ^3H -Preg a fracciones enriquecidas de CL de testículo de rata que va siendo transformada tanto a T como a E_2 , en fracciones mantenidas tan solo en presencia de KRBG, y en aquellas tratadas con las diferentes dosis de los factores hormonales I o EGF durante períodos máximos de incubación de 120 minutos.

De acuerdo a lo mostrado en la tabla I puede señalarse que a través de la adición de concentraciones máximas de I (100 ng/ml), la proporción de Preg transformada en T y en E_2 fue mayor con respecto al control, particularmente hacia los 45 minutos de incubación. Las dosis menores empleadas (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) muestran también efectos diversos sobre la producción de T durante todo el período de incubación; sin embargo, las proporciones relativas de E_2 , disminuyeron en presencia de dosis crecientes de I principalmente durante los primeros 15 minutos, prolongándose este efecto hasta los 45 minutos de incubación, mientras que en los últimos minutos estas proporciones se incrementaron.

Tomando en consideración los datos contenidos en la tabla II, se observa que la cantidad de ^3H -Preg transformada en T en presencia de EGF no presenta un comportamiento homogéneo, lo que parece sugerir un efecto inespecífico sobre la producción del andrógeno; efectos semejantes se aprecian con respecto a la transformación hacia E_2 . Cabe mencionar que en general se observan cambios estadísticamente significativos para ambos esteroides cuando se usa una dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF.

En las tablas III y IV se aprecia el efecto de adicionar diferentes concentraciones de I y EGF respectivamente, a las fracciones enriquecidas en CL durante períodos de 60 y 120 minutos. De acuerdo a los datos obtenidos, se observa que las cantidades de T producidas muestran una diferencia significativa con respecto al control ya que se incrementan casi al doble a los 60 minutos de incubación con las diferentes dosis de I, mientras que el E_2 no muestra el mismo comportamiento, a excepción de cuando se adiciona la dosis más alta de este factor que presenta diferencia significativa al realizar la prueba estadística. Hacia los 120 minutos el efecto ha desaparecido prácticamente para ambos esteroides y sólo se observa un incremento en la producción de T con la adición de la dosis intermedia de la I (Tabla III).

En la tabla IV se puede apreciar que la cantidad de Preg transformada a T se ve disminuida de manera no significativa con las dosis mayores de EGF (50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hacia los 60 minutos de incubación; sin embargo, el E_2 sólo muestra incrementos significativos a este tiempo con la dosis intermedia del factor de crecimiento. Hacia los 120 minutos de incubación, la producción de T no se ve claramente modificada, aunque simultáneamente la

síntesis del estrógeno parece estar incrementada para todas las dosis de EGF empleadas.

Los resultados mencionados anteriormente también han sido representados gráficamente comparando el porcentaje de células transformadas en los diferentes esteroides con respecto a los controles correspondientes (figs. 8-10). La concentración de Preg no transformada en CL tratadas con I tiende a incrementarse hacia los 60 minutos de incubación, efecto que desaparece hacia los 120 minutos, de forma tal que se encuentra tan solo aproximadamente el 60% de los correspondiente a las células control (figs. 8a y 8b). En lo que toca a las CL tratadas con EGF, la acumulación inicial de ^3H -Preg se mantiene a lo largo de todo el período de incubación (figs. 8c y 8d).

Por su parte, la T muestra un incremento cercano al 100% con respecto al control cuando las CL son tratadas con I a todas las dosis durante 60 minutos (fig. 9a), pero este efecto desaparece hacia los 120 minutos de incubación (fig. 9b). Las CL tratadas con EGF sólo muestran diferencias significativas para la dosis más baja del factor durante los primeros 60 minutos de incubación, y para la dosis intermedia hacia el final del período de 2 horas (figs. 9c y 9d).

En lo que toca al E_2 , sólo la dosis más alta de I incrementa un 150% su producción con respecto al control hacia los 60 minutos de incubación (fig. 10a), mientras que el EGF presenta un efecto cuando se utiliza la dosis intermedia, la cual provoca un incremento en la concentración del estrógeno que alcanza un 50% con respecto al control para ambos períodos de incubación (figs. 10c y 10d).

Al expresar los datos anteriores como las relaciones Preg/T y T/E_2 (figs. 11 y 12) puede observarse que a los 60 minutos de incubación, solamente la primera de éstas se incrementa significativamente en el caso de la dosis intermedia de EGF (fig. 12a), mientras que hacia los 120 minutos de incubación, todas las dosis de I disminuyen la relación Preg/T (figs. 11a). En comparación, la relación T/E_2 se incrementa con dosis intermedias de I y disminuye para todas las dosis de EGF al inicio del período de incubación, sin que se modifique apreciablemente a los 120 minutos, a excepción de las CL tratadas con dosis mayores de I (figs. 11b y 12b).

INSULINA

Dosis		Pregnenolona	Testosterona	Estradiol
15'	C	2.7 % ± 0.2	11.6 % ± 0.7	19.2 % ± 0.7
	1	2.2 % ± 0.2	11.3 % ± 0.5	13.6 % ± 0.8
	2	2.9 % ± 0.1	13.1 % ± 0.8	10.2 % ± 0.6
	3	4.2 % ± 0.3	15.7 % ± 0.7	7.5 % ± 0.5
30'	C	3.6 % ± 0.2	4.4 % ± 0.5	22.8 % ± 1.0
	1	2.9 % ± 0.2	7.9 % ± 0.6	17.7 % ± 0.8
	2	2.5 % ± 0.2	4.2 % ± 0.3	12.7 % ± 0.9
	3	3.7 % ± 0.2	10.0 % ± 0.6	16.6 % ± 0.7
45'	C	2.7 % ± 0.4	10.2 % ± 0.5	4.3 % ± 0.2
	1	2.0 % ± 0.1	10.8 % ± 0.7	10.0 % ± 0.3
	2	1.8 % ± 0.2	16.2 % ± 0.4	17.0 % ± 0.8
	3	3.2 % ± 0.3	18.5 % ± 0.8	11.0 % ± 0.7
60'	C	2.5 % ± 0.2	5.0 % ± 0.4	5.8 % ± 0.8
	1	5.8 % ± 0.4	8.7 % ± 0.7	8.5 % ± 0.7
	2	3.9 % ± 0.3	9.1 % ± 0.8	18.0 % ± 0.7
	3	4.8 % ± 0.3	13.4 % ± 0.6	15.6 % ± 0.2
90'	C	5.6 % ± 0.3	5.7 % ± 0.6	3.9 % ± 0.3
	1	6.3 % ± 0.4	4.6 % ± 0.4	3.2 % ± 0.2
	2	7.6 % ± 0.4	7.7 % ± 0.5	2.9 % ± 0.2
	3	5.7 % ± 0.3	5.3 % ± 0.5	2.4 % ± 0.1
120'	C	6.6 % ± 0.4	6.8 % ± 0.3	4.6 % ± 0.5
	1	4.3 % ± 0.3	6.0 % ± 0.3	3.4 % ± 0.4
	2	5.9 % ± 0.4	9.2 % ± 0.5	4.5 % ± 0.3
	3	4.2 % ± 0.2	6.9 % ± 0.5	5.9 % ± 0.4

Tabla I. Porcentaje de radiactividad inicial adicionada como ³H-(6,7)-Preg a fracciones enriquecidas en CL de testículo de rata, incubadas en presencia de diferentes dosis de insulina (Las dosis utilizadas son: D1 10 ng/ml, D2 50 ng/ml, y D3 100 ng/ml).

EGF

DOSIS		PREGNENOLONA	TESTOSTERONA	ESTRADIOL
15'	C	3.6 % ± 0.3	3.2 % ± 0.2	4.0 % ± 0.3
	1	8.9 % ± 0.5	3.9 % ± 0.3	9.6 % ± 0.1
	2	4.7 % ± 0.3	2.6 % ± 0.2	11.0 % ± 0.3
	3	2.1 % ± 0.3	3.4 % ± 0.4	7.4 % ± 0.5
30'	C	2.0 % ± 0.3	2.1 % ± 0.1	4.8 % ± 0.4
	1	3.8 % ± 0.6	3.1 % ± 0.3	7.0 % ± 0.5
	2	2.9 % ± 0.4	4.1 % ± 0.4	3.7 % ± 0.2
	3	4.8 % ± 0.2	4.5 % ± 0.3	5.3 % ± 0.5
45'	C	0.6 % ± 0.1	4.4 % ± 1.2	6.7 % ± 0.2
	1	1.0 % ± 0.1	3.3 % ± 0.7	9.1 % ± 0.2
	2	1.7 % ± 0.1	4.6 % ± 0.6	11.2 % ± 0.3
	3	3.1 % ± 0.2	1.9 % ± 0.3	5.1 % ± 0.4
60'	C	1.8 % ± 0.2	2.5 % ± 0.2	9.0 % ± 0.6
	1	3.3 % ± 0.3	4.4 % ± 0.4	11.7 % ± 0.7
	2	7.0 % ± 0.5	2.9 % ± 0.1	16.0 % ± 0.5
	3	8.2 % ± 0.6	2.2 % ± 0.1	10.3 % ± 0.4
90'	C	1.8 % ± 0.1	3.2 % ± 0.2	1.9 % ± 0.1
	1	2.7 % ± 0.3	4.9 % ± 0.4	4.3 % ± 0.7
	2	4.9 % ± 0.2	3.3 % ± 0.2	1.4 % ± 0.3
	3	3.1 % ± 0.1	2.2 % ± 0.1	3.6 % ± 0.4
120'	C	1.3 % ± 0.05	2.6 % ± 0.2	8.0 % ± 0.5
	1	2.1 % ± 0.1	3.5 % ± 0.4	9.5 % ± 0.4
	2	2.6 % ± 0.2	5.0 % ± 0.5	15.3 % ± 0.1
	3	1.5 % ± 0.1	3.3 % ± 0.4	11.5 % ± 0.4

Tabla II. Porcentaje de la radiactividad inicial adicionada como ^3H -(6,7)Preg a fracciones enriquecidas en CL de testículo de rata adulta incubadas en presencia de diferentes dosis de EGF (Las dosis utilizadas son: D1 10 $\mu\text{g/ml}$, D2 25 $\mu\text{g/ml}$, y D3 50 $\mu\text{g/ml}$).

INSULINA

Dosis		60'		120'	
		cpm ± EEM	% control	cpm ± EEM	% control
P	C	257.2 ± 26.1	100 ± 10.1	693.8 ± 63.6	100 ± 9.1
P	1	601.5 ± 86 *	233.8 ± 33.4	449.8 ± 44.4 *	64.8 ± 6.3
P	2	407.5 ± 65.6 *	158.4 ± 25.4	617.5 ± 55.4	89.0 ± 7.9
P	3	505.6 ± 69 *	196.5 ± 26	437.3 ± 33.9 *	63.0 ± 4.8
T	C	518 ± 77.9	100 ± 15	714 ± 61.6	100 ± 8.6
T	1	909.2 ± 142.4 *	175.5 ± 27	627.1 ± 56.4	87.8 ± 7.8
T	2	953 ± 179.6 *	183.9 ± 34.6	957.5 ± 69 *	134.1 ± 9.6
T	3	873.2 ± 78.4 *	168.5 ± 15.1	723.1 ± 60.4	101.2 ± 8.4
E	C	605.6 ± 83	100 ± 13.7	478.3 ± 56.6	100 ± 11.8
E	1	888.5 ± 81.5	146.7 ± 13.4	357.1 ± 45.6	74.6 ± 9.5
E	2	497.8 ± 72.3	82.1 ± 11.9	466.4 ± 40.8	97.5 ± 8.5
E	3	1626.2 ± 221.0 *	268.5 ± 36.4	618.8 ± 45.8	129.3 ± 9.5

Tabla III. Efecto de las diferentes concentraciones de insulina a los 60 y 120' sobre la producción hormonal de fracciones enriquecidas de CL de rata adulta normal.

Los tratamientos cuyos valores muestran diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$) se indican con asterisco (*).

cpm = cuentas por millón

EEM = error estándar de la medida

EGF

Dosis		60'		120'	
		cpm \pm EEM	% control	cpm \pm EEM	% control
P	C	232.7 \pm 31.5	100 \pm 13.5	162.8 \pm 6.7	100 \pm 4.1
P	1	427.5 \pm 105.7	183.7 \pm 45.4	272.1 \pm 23	167.1 \pm 14.1
P	2	898 \pm 88 *	385.9 \pm 37.8	340.7 \pm 33.8	209.2 \pm 20.7
P	3	272 \pm 17.2	117.3 \pm 7.3	192.6 \pm 17.6 *	118.3 \pm 10.8
T	C	319.8 \pm 31.2	100 \pm 9.7	329.5 \pm 32.8	100 \pm 9.5
T	1	566.4 \pm 58.1 *	177.1 \pm 18.1	444.7 \pm 53.9	134.9 \pm 16.3
T	2	376.7 \pm 22.7	117.7 \pm 7.0	641.8 \pm 69.3 *	194.7 \pm 21.0
T	3	286.7 \pm 24	89.6 \pm 7.5	423.6 \pm 53.3	128.5 \pm 16.1
E	C	162.2 \pm 182.3	100 \pm 15.6	1026.7 \pm 99	100 \pm 9.6
E	1	1511.5 \pm 184.6	130.0 \pm 15.8	1227 \pm 75.3 *	119.5 \pm 7.3
E	2	2059.4 \pm 161 *	177.1 \pm 13.8	1966.7 \pm 43.0 *	191.5 \pm 4.1
E	3	1332 \pm 133	114.6 \pm 11.4	1485 \pm 65.0 *	144.6 \pm 6.3

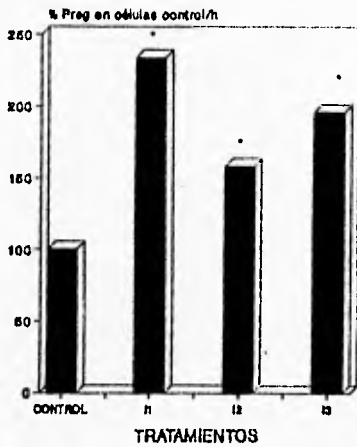
Tabla IV. Efecto de las diferentes concentraciones de EGF a los 60 y 120' sobre la producción hormonal de fracciones enriquecidas de CL de rata adulta normal.

Los tratamientos cuyos valores muestran diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$) se indican con asterisco (*).

cpm = cuentas por millón

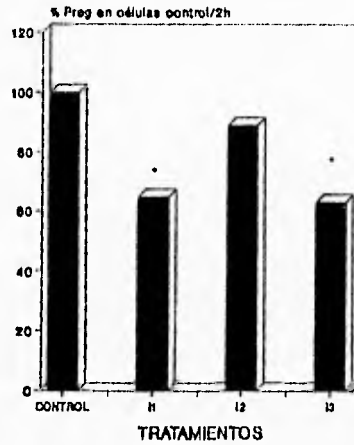
EEM = error estándar de la medida

FIG. 8A
EFECTO DE I SOBRE PREG



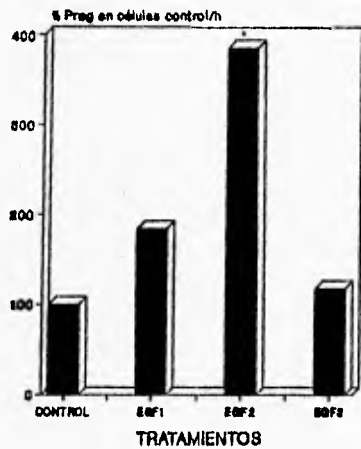
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 8B
EFECTO DE I SOBRE PREG



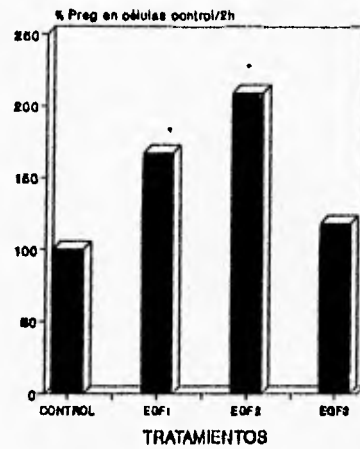
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 8C
EFECTO DE EGF SOBRE PREG



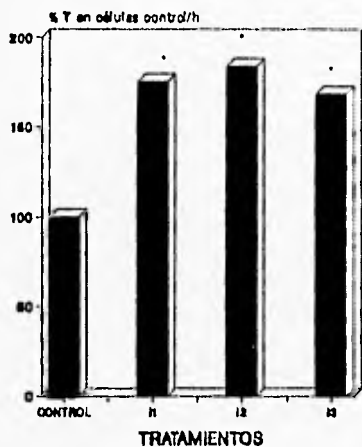
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 8D
EFECTO DE EGF SOBRE PREG



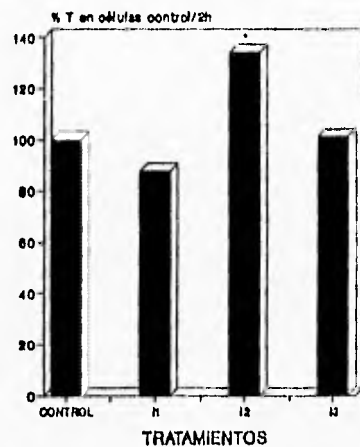
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 9A
EFFECTO DE I SOBRE T



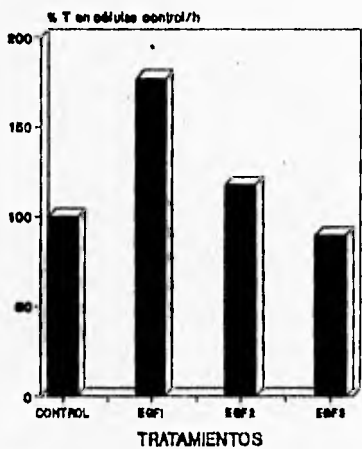
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 9B
EFFECTO DE I SOBRE T



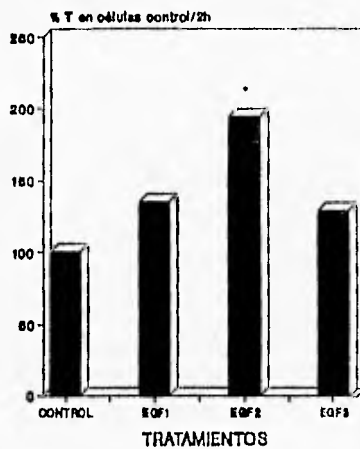
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 9C
EFFECTO DE EGF SOBRE T



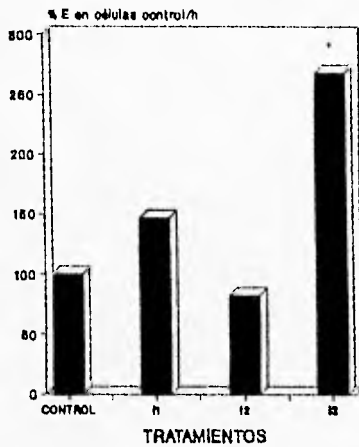
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 9D
EFFECTO DE EGF SOBRE T



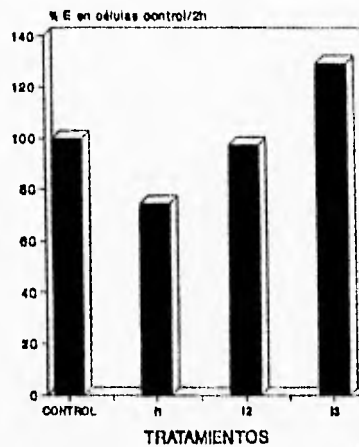
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 10A
EFECTO DE I SOBRE E



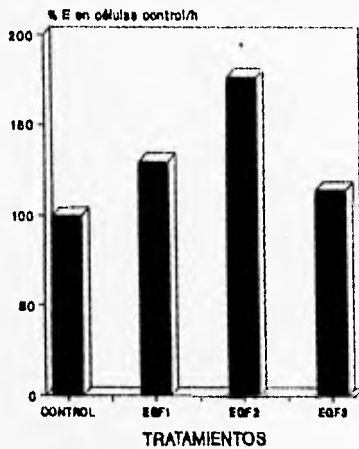
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 10B
EFECTO DE I SOBRE E



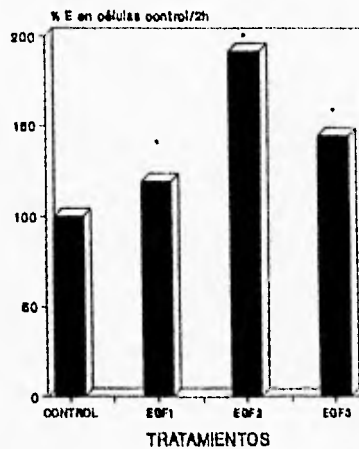
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 10C
EFECTO DE EGF SOBRE E



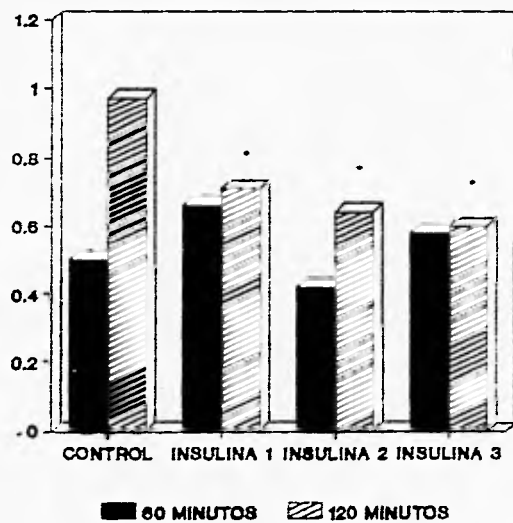
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 10D
EFECTO DE EGF SOBRE E



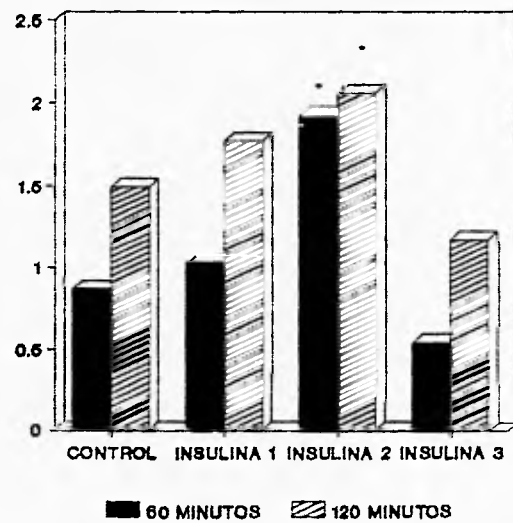
* Diferente respecto al control (p<0.05)

FIG. 11A
I SOBRE LA RELACION P/T



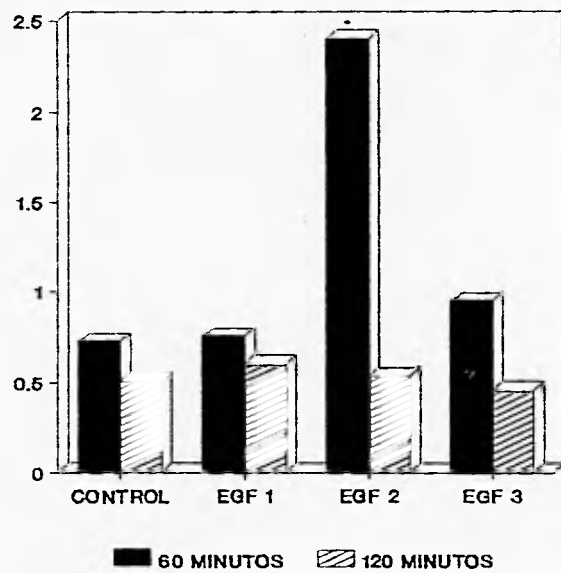
* Diferencia al control (p < 0.05)

FIG. 11B
I SOBRE LA RELACION T/E



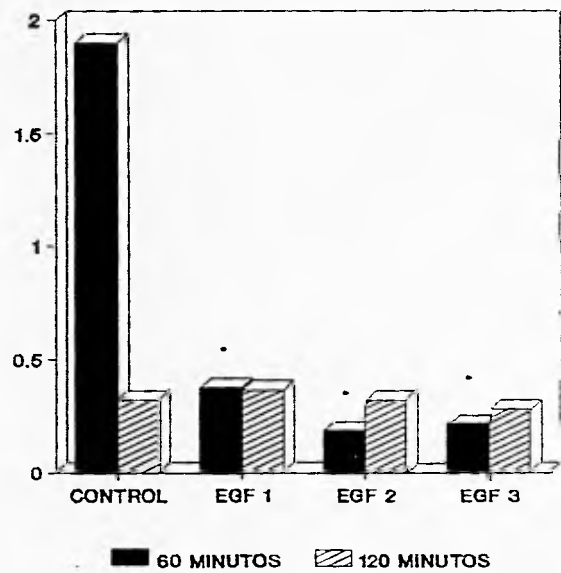
* Diferencia al control (p < 0.05)

FIG. 12A
EGF SOBRE LA RELACION P/T



* Diferentes al control ($p < 0.05$)

FIG. 12B
EGF SOBRE LA RELACION T/E



* Diferentes al control ($p < 0.05$)

VIII. DISCUSIÓN

Diversos autores tales como Risbridger (27) Valladares, Payne (28) Welsh (31) entre otros han propuesto la existencia de numerosos factores que tendrían la capacidad de estimular o inhibir la esteroidogénesis testicular, entre los que se incluyen la hormona luteinizante (LH), algunos factores de crecimiento tales como EGF y el factor de crecimiento y transformación β , y otros factores de naturaleza hormonal como la I y sus factores de crecimiento asociados (IGFs). Es importante señalar que se ha observado que los factores de crecimiento pueden funcionar como agentes mitogénicos y/o regulatorios, a través de su unión a receptores específicos que se encuentran en la membrana de las células blanco para servir como elementos importantes de la regulación autocrina y paracrina (32,34).

El presente trabajo intenta dar continuidad a los experimentos realizados por otros autores mencionados previamente, a través de la determinación del efecto de la I y el EGF sobre la vía esteroidogénica de síntesis de andrógenos en CL in vitro, evaluando el efecto de diferentes dosis de estos factores sobre la transformación de ^3H -Preg en T y eventualmente en E_2 , durante periodos cortos de incubación que no excedieron los 120 minutos.

En este trabajo se puede observar el efecto que tiene la I sobre las CL es más notorio hacia los 60 minutos de incubación, ya que en este periodo la proporción de ^3H -Preg no transformada es prácticamente el doble que en el control respectivo, con un efecto paralelo de incremento en la aparición de T a todas las dosis utilizadas, y del E_2 solamente para la dosis más elevada de I (figs. 8a-10a), lo cual no modifica la relación Preg/T (fig. 11a), pero sí lo hace para la proporción T/ E_2 de manera irregular (fig. 11b). Este efecto tiende a desaparecer hacia los 120 minutos de incubación, llegando incluso a revertirse en el caso particular de la Preg (fig. 8b), disminuyendo significativamente la relación Preg/T (fig. 11a), aunque sin afectar significativamente la relación T/E (fig. 11b).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la I tiende a incrementar la transformación de ^3H -Preg en T desde los 60 minutos de incubación, aunque este efecto tiende a desaparecer hacia las 2 horas, de forma tal que la relación Preg/T parece disminuir de manera dosis dependiente al final de este periodo. Sin embargo, a diferencia de lo señalado por Rigaudière y cols (35), el E_2 parece no verse afectado, lo que se ve reflejado por un incremento dosis dependiente en la relación T/ E_2 después de los 120 minutos de incubación, efecto que no es constante durante todo el periodo de incubación (figs. 11b).

En lo que respecta al EGF, las proporciones de Preg y E_2 tendieron a incrementarse de manera dosis dependiente para las primeras dos concentraciones utilizadas (10 y 25 $\mu\text{g/ml}$) tanto a los 60 como a los 120 minutos de incubación (figs. 8c,d y 10c, d), mismo efecto que se presentó para la T, pero sólo de manera más notoria hacia el final del periodo de incubación (fig. 9d). Cabe señalar que el EGF causa un incremento inicial en la proporción de T seguido de un regreso a valores no significativamente diferentes del control cuando se evalúan las CL incubadas durante periodos de 60 minutos (fig. 9c). Este factor provocó un incremento en la relación Preg/T sólo para la dosis intermedia y una disminución general de la relación T/ E_2 a los 60 minutos, sin observarse efecto alguno sobre estas relaciones al final del periodo de incubación (figs. 12a y b).

Experimentos previos realizados para determinar el efecto del EGF sobre la esteroidogénesis ovárica y testicular han generado resultados contradictorios. Así, Hsueh y cols (44) reportaron que el EGF es capaz de inhibir la producción de E_2 y T estimulada por gonadotropinas, toxina de cólera o dibutirilAMPc en cultivos primarios de células de la granulosa y de CL respectivamente, mientras que Verhoeven y Cailleau (31) y Syed y cols (36) señalaron que este factor es capaz de estimular la producción basal de T en CL humanas in vitro.

Estudios posteriores serán necesarios para definir con mayor claridad la naturaleza precisa de los mecanismos de acción del I y del EGF sobre la actividad de aromatasa en CL de ratas adultas normales, así como para establecer su importancia dentro del esquema global de la regulación paracrina de la función testicular.

IX. CONCLUSIONES

- La transformación de la ^3H -Preg adicionada a fracciones enriquecidas en CL de rata adulta normal hacia T y E_2 permite determinar que bajo las condiciones de incubación utilizadas, la actividad de aromatasa se encuentra presente.
- La I tiende a incrementar la producción de T y E_2 durante los primeros 60 minutos de incubación, efecto que disminuye hacia el final del período de 2 horas, mientras que el EGF sólo aumenta T a la dosis menor a los 60 minutos y a la dosis media a los 120, siendo el efecto sobre la aromatasa más notorio al final de la incubación.
- Las relaciones Preg/T se ven modificadas por la I aparentemente de forma dosis dependiente a los 120 minutos, pero no por el EGF, al menos de forma consistente. Por otra parte, las relaciones T/ E_2 tienden a incrementarse en presencia de I, pero disminuyen cuando las células son tratadas con EGF.
- La producción hormonal muestra diferencia significativa con insulina principalmente a los 60' en Preg y T así como con la dosis más alta utilizada en E. En cambio con EGF solo muestra diferencia significativa a los 120' en E con las tres dosis empleadas
- Sería conveniente cuantificar las concentraciones presentes de los demás ^3H -intermediarios de la vía esteroidogénica con el objeto de determinar con mayor seguridad los efectos que tienen sobre la regulación de la esteroidogénesis testicular en los cuales pudieran participar los factores analizados en este trabajo.

X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. MCDONALD LE (1978). *Reproducción y Endocrinología Veterinaria*, 2a. edición. Interamericana, México, pp. 18-32 y 201-234.
2. TEPPERMAN J (1980). *Fisiología Metabólica y Endocrinología*, 3a. edición. Interamericana, México, pp. 64-80.
3. VANDER AJ, SHERMAN JH & LUCIANA D (1980). *Fisiología Humana*, Mc. Graw-Hill, México, pp. 283-288 y 334-340.
4. QUEVAUVILERS J (1979). *Cuadernos de la enfermera No. 5: Endocrinología*, Toray-Masson, Madrid, pp. 1-2 y 150-152.
5. SÁNCHEZ SO & LIMA GS (1980). *Biología*, 2o. curso, Herrera, México, pp. 185-186.
6. BECK WS (1977). *Fisiología*, Publicaciones Culturales, México, pp. 214-229, 629-638 y 715.
7. CORMACK HD (1978). *Histología de Ham*, 9a. edición, Harla, México, pp. 725-731 y 797-824.
8. BLOOM W & FAWCETT DW (1990). *A Textbook of Histology*, 20th edition, Saunders Company, Philadelphia, pp. 802-857.
9. LESSON R & LESSON TS (1985). *Histología*, 4a. edición, Interamericana, México, pp. 517-554.
10. AUSTIN C & SHORT R (1982) *Células germinales y fertilización*, 1a. edición, Prensa Médica Mexicana, México, pp. 1-14, 49-89.
11. STEINBERGER A & STEINBERGER E. *The Sertoli cell*. In: Johnson AD & Gomes WR (ed). *The testis*, vol IV, Academic Press, NY, 1977, pp. 371-399.
12. EAKIN R (1978). *Laboratory Manual: Vertebrate Embryology*, 3a. edición, University of California Press, EE.UU., pp. 29-35
13. ERNSTE KNOBIL, JIMMY D. NEILL, GILBERT S. GREENWALD, CLEMENTE MARKERT, DONALD PFAFF (1994). *The Physiology Of Reproduction VI*, 2a. edición, De. Raven Press, New York pp. 1177-1240.
14. SCOTT F. GILBERT (1994). *Development Biology*, 4a. edición, De. Sinaver Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, pp. 13-15, 798 - 801, 758 - 759, 797 - 798.
15. MARTIN A, MAYES P & RODWELL V (1989). *Bioquímica de Harper*, 9a. edición, Harla, México, pp. 497-514.

16. AUSTIN C & SHORT R (1982). Hormonas en la reproducción, Prensa Médica Mexicana, pp. 1-71.
17. SAEZ J, PERRARD-SAPORI M, CHATELAIN P, TABONE E & RIVAROLA M (1987). Paracrine regulation of testicular function, J Steroid Biochem 27: 317.
18. JEGOU B (1992). The Sertoli cell, Baillière Clin Endocrinol Metab 6: 37.
19. SKINNER MK (1991). Cell-cell interactions in the testis, Endocr Rev 12: 45.
20. VERHOEVEN G (1992). Local control systems within the testis, Baillière Clin Endocrinol Metab 6: 313.
21. SKINNER MK (1990). Mesenchymal (Stromal)-epithelial cell interactions in the testis and ovary which regulate gonadal function, Reprod Fertil Dev 2: 237.
22. ROMMERTS FFG, TEERDS K, THEMEN APN & VAN NOORT M (1987). Multiple regulation of testicular steroidogenesis, J Steroid Biochem 27: 309.
23. VERHOEVEN G & CAILLEAU J (1985). A factor in spent media from Sertoli cell-enriched cultures that stimulates steroidogenesis in Leydig cells, Mol Cell Endocrinol 40: 57.
24. VERHOEVEN G & CAILLEAU J (1986). Specificity and partial purification of a factor in spent media from Sertoli cell-enriched cultures that stimulates steroidogenesis in Leydig cells, J Steroid Biochem 25: 393.
25. SYED V, KHAN SA, LINDH M & RITZEN EM (1988). Mechanism of action of the factor(s) secreted by rat seminiferous tubules and inhibiting interstitial cell testosterone production in vitro, Acta Endocrinol 119: 427.
26. SAEZ J, SÁNCHEZ P, BERTHELON M & AVALLET O (1989). Regulation of pig Leydig cell aromatase activity by gonadotropins and Sertoli cells, Biol Reprod 41: 813.
27. RISBRIDGER GP (1992). Local regulation of Leydig cell function by inhibitors of steroidogenic activity, Cell Biol Int Rep 16: 399.
28. VALLADARES L & PAYNE AH (1979). Acute stimulation of aromatization in Leydig cell by human chorionic gonadotropin in vitro, Proc Nat Acad Sci USA 76: 4460.
29. VALLADARES L & PAYNE AH (1979). Induction of testicular aromatization by luteinizing hormone in mature rats, Endocrinology 105: 431.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

30. VALLADARES L & PAYNE AH (1981). Effects of hCG and cyclic AMP on aromatization in purified Leydig cell of immature and mature rats. *Biol Reprod* 25: 752.
31. WELSH TH & HSUEH AJW (1962). Mechanism of the inhibitory action of epidermal growth factor on testicular androgen biosynthesis in vitro, *Endocrinology* 110: 1498.
32. ROMMERTS FFG, DEJONG FH, BRINKMANN AO & VAN DER MOLEN HJ (1982). Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity, *J Reprod Fertil* 65: 281.
33. ADASHI EY, RESNICH CE, BRODIE AMH, SVGBODA ME & VAN WYK JJ (1985). Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone induced aromatase activity of cultured rat granulosa cell, *Endocrinology* 117: 2313.
34. VERHOEVEN G & CAILLEAU J (1986). Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cell, *Mol Cell Endocrinol* 47: 99.
35. LIN T, HASKELL J, WINSON N & TERRACIO L (1986). Direct stimulatory effects of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary culture, *Biochem Biophys Res Commun* 137: 950.
36. PAYNE A, PERKINS L, GEORGIU G & QUINN P (1987). Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol, *Steroids* 50: 435.
37. RAESIDE J, BARTHELON M, SÁNCHEZ P & SAEZ J (1988). Stimulation of aromatase activity in immature porcine Leydig cell by fibroblast growth factor (FGF), *Biochem Biophys Res Commun* 151: 163.
38. RIGAUDIERE N, GRIZARD G & BOUCHER D (1989). Aromatase activity in purified Leydig cell from adult rat. Comparative effects of insulin, IGF-I and hCG, *Acta Endocrinol* 121: 277.
39. SYED V, KHAN V & NIESCHLAG E (1991). Epidermal Growth Factor stimulates testosterone production of human Leydig cell in vitro, *J Endocrinol Invest* 14(2): 93.
40. GILBER S, HARDY M, MENDIS-HANDAGAMA S & CASTELLA S (1992). Effects of Insulin-like Growth Factor-I on androgen production by highly purified pubertal and adult rat Leydig cell. *Journal of Andrology* 13(2): 125.
41. H. ADASHI & H. KURASHI (1994). Involvement of epidermal growth factor (EGF) / EGF receptor autocrine and paracrine mechanism in human trophoblast cell: functional differentiation in vitro *Journal of Endocrinology* 143 : 291.

42. BERMÚDEZ J, HERRERA J & MENDIETA E (1989). Evaluación de los métodos de aislamiento y purificación de las células de Leydig y Sertoli, Arch Invest Méd Méx 19: 291.

43. HOEL PG (1981). Estadística Elemental, Ed. Continental S. A., México, pp. 211-250.

44. HSUEH AJW, WELSH TH & JONES PBC (1981). Inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis by epidermal growth factor, Endocrinology 108: 2002.