



11282
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
SEDE CENTRO**

**IDENTIFICACIÓN DE LA CITOCROMO
P450 *aromatasa*, LA EXPRESIÓN DE SU mRNA
Y SU DISTRIBUCIÓN EN TESTÍCULO Y
EPIDÍDIMO DE MONOS *Rhesus*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS
P R E S E N T A :
M. C. ADA CELIA PEREYRA MARTÍNEZ**

**ASESORES ACADÉMICOS:
DR. VICENTE DÍAZ SÁNCHEZ
DR. JOHN A. RESKO
DR. REX A. HESS**

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE DE 2003

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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité Académico de las Ciencias Médicas del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, según acuerdo AA39(CM/SCA/SO/30/02) acordó designar y se formaliza por el Comité Académico del Programa, el jurado para el examen de grado de **Doctora en Ciencias**, (Plan 5006) de la C. **Ada Celia Pereyra Martínez**, quien defenderá la tesis denominada **"Identificación de la citocromo P-450 aromataasa, la expresión de su mRNA y su distribución en testículo y epidídimo de monos Rhesus"**.

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
VOCAL
VOCAL
SUPLENTE
SUPLENTE

DR. JUAN CUAUHTÉMOC DÍAZ ZAGOYA
DR. FERNANDO LARREA GALLO
DR. JOSÉ VICENTE DÍAZ SÁNCHEZ
DR. JOSÉ RAMÓN PANIAGUA SIERRA
DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
DRA. SUSANA HELENA KOFMAN EPSTEIN
DR. ARTURO ZÁRATE TREVIÑO

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 4 de septiembre de 2002.

DR. LUIS FELIPE ABREU H.
El Coordinador

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

LFAH/TGT/MEMK

NOTA: Por acuerdo del Subcomité Académico, la formalización de este Jurado de Examen de Grado, tiene una vigencia de 6 (seis) meses a partir de la fecha de aprobación del mismo. Excedido el tiempo, el alumno deberá someter a consideración del Subcomité Académico una nueva propuesta de jurado.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
COORDINACION DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS
SEDE CENTRO

Tesis que la M.C. Ada Celia Pereyra Martínez somete a la consideración del Jurado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Médicas.

Título de la Tesis: Identificación de la citocromo P450aromatasa, la expresión de su mRNA y su distribución en testículo y epidídimo de monos Rhesus.

Asesores Académicos: Dr. Vicente Díaz Sánchez. Instituto Nacional de la Nutrición y Ciencias Médicas.
Dr. John A. Resko, Ph. D. Oregon Health and Sciences University
Dr. Rex A. Hess. Ph. D. University of Illinois

México, D. F. noviembre de 2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A LA FUNDACIÓN INTERNACIONAL FOGARTY POR HABERME OTORGADO DURANTE 2 AÑOS CONSECUTIVOS LA BECA D43 TW00668 DEL INTERNATIONAL TRAINING PROGRAM IN POPULATION AND HEALTH . GRACIAS A ESTE PROGRAMA PUDE ENTRENARME EN DIFERENTES TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA REALIZAR EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DEL DOCTORADO.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA POR PROPORCIONARME EL APOYO ECONOMICO PARA FINALIZAR MI DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS.

A LA UNIVERSIDAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE OREGON POR DARME TODAS LAS FACILIDADES PARA MI ESTANCIA POSTDOCTORAL.

AL DR. MICHAEL CONN POR CONSEGUIR ESTA BECA TAN IMPORTANTE PARA LOS MEXICANOS Y POR TODO SU INVALUABLE APOYO.

AL DR. JOHN RESKO POR SUS ENSEÑANZAS, SU APOYO Y POR PROPORCIONARME TODO LO NECESARIO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. REX HESS POR TODAS SUS ENSEÑANZAS Y SUS CONSEJOS Y POR BRINDARME SIEMPRE LA CONFIANZA Y EL ALIENTO PARA CONTINUAR CON ESTE TRABAJO.

A Mr. HENRY STADELMAN POR SU PACIENCIA Y SUS ENSEÑANZAS PERO PRINCIPALMENTE POR SU GRAN SENTIDO DE LA LEALTAD Y LA AMISTAD.

QUIERO AGRADECER DE MANERA MUY ESPECIAL A LOS DOCTORES VICENTE DÍAZ SÁNCHEZ, ENRIQUE PEDERNA ASTEGIANO Y ALEJANDRO REYES POR HABER ACEPTADO FORMAR PARTE DE MI COMITÉ TUTORAL. GRACIAS POR TODAS LAS HORAS DE TRABAJO QUE DEDICARON A ESTA TESIS

QUIERO TAMBIÉN AGRADECER a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a mi preparación y a la realización de este proyecto: A LA DRA. OLINNE RONNEKLIEV, AL DR. CHARLES ROSELLI, MRS. MARTHA BOSCH, MR. BARRY NAYLOR, DR. KEN THORNBURG, DEL DEPTO. DE FISIOLÓGIA DE OHSU, AL DR. ARTHUR HALL Y DR. BRYAN OGDEN DEL DEPTO. DE CUIDADO DE ANIMALES DE OHSU, A LA DRA. PATRICIA AYALA DEL DEPTO. DE MICROBIOLOGÍA DE OHSU. A todos ustedes mi gratitud.

A MI QUERIDOS HIJOS HADA AURORA SALINAS PEREYRA Y JOHN CONNELL MARIBONA POR APOYARME COMO SIEMPRE EN ESTA NUEVA AVENTURA. POR SOPORTARME Y ALENTARME EN LOS MOMENTOS MAS DIFÍCILES. POR TU AMOR QUE HA LLENADO CADA INSTANTE DE MI VIDA.

A MIS QUERIDOS PADRES Y HERMANOS QUE COMO SIEMPRE APOYARON ESTA NUEVA ETAPA DE PREPARACIÓN. MUY ESPECIALMENTE A TI, MALE, POR LLENAR MI VIDA DE AMOR. GRACIAS POR SU AMOR Y APOYO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS PARCIALES DE ESTE TRABAJO SE PRESENTARON EN EL 87th CONGRESO DE ENDOCRINOLOGIA, en la Ciudad de New Orleans, Louissiana, 1998.

RESULTADOS PARCIALES DE ESTE TRABAJO SE PRESENTARON EN EL CONGRESO ANUAL DE LA FUNDACIÓN INTERNACIONAL FOGARTY, EN LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA en feb. De 1998.

RESULTADOS PARCIALES DE ESTE TRABAJO SE PRESENTARON EN EL 88th CONGRESO DE ENDOCRINOLOGIA, en la ciudad de San Diego California, 1999.

RESULTADOS PARCIALES DE ESTE TRABAJO SE PRESENTARON EN LA CONFERENCIA INTERNACIONAL DE AROMATASA EN NOVIEMBRE DEL AÑO 2000, en Port Douglas, Australia.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INTRODUCCION:

Los testículos son un órgano par situados en el escroto y tienen dos funciones reconocidas: la producción y secreción de espermatozoides y la síntesis y secreción de andrógenos necesarios para el inicio y el mantenimiento de la espermatogénesis, para la conservación de los caracteres sexuales secundarios y para el inicio y mantenimiento de la vida sexual reproductiva. Están compuestos de dos compartimientos funcionalmente interrelacionados, los túbulos seminíferos y el espacio intersticial. Estos dos compartimientos incluyen, principalmente, tres tipos de células: las células Germinales, las cuales se encuentran en los túbulos seminíferos en diferentes estadios de maduración, las células de Leydig, las cuales sintetizan esteroides sexuales, principalmente testosterona y están presentes en el espacio intersticial, y las células de Sertoli, el tercer tipo de células del testículo, las cuales protegen y nutren al testículo (1).

Tanto la actividad esteroidogénica como la espermatogénica son reguladas por el complejo sistema neuroendocrino llamado eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La producción y maduración de las células germinales hasta alcanzar el estadio de espermatozoide depende de un perfecto equilibrio en la producción de hormonas por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo (función endocrina), así como de regulación paracrina y autocrina por diferentes hormonas y factores producidos por el testículo. La función endocrina depende a su vez de retroalimentación positiva y negativa entre los productos finales del testículo, (espermatozoides y hormonas) y el eje hipotálamo-hipófisis (2). La Hormona Luteinizante (LH) producida por la hipófisis bajo la estimulación de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH hipotálamica), estimula a las células de Leydig del testículo para la producción de testosterona (T). La testosterona a su vez actúa sobre los receptores de andrógenos en el epitelio seminífero para control de la espermatogénesis. De igual manera, la Hormona Folículo Estimulante (FSH) se une a sus receptores específicos sobre las células de Sertoli para regular el inicio de la espermatogénesis, estimulando la producción de numerosos factores por las células de Sertoli. También estimula la producción de Inhibina y junto con T la producción de la Proteína Unidora de Andrógenos (ABP). Los niveles circulantes de T, inhiben la producción de LH en la hipófisis y de GnRH en el hipotálamo. La liberación de FSH, es a su vez controlada por los niveles circulantes de Inhibina y la población de células germinales en el testículo (1, 3), (Fig. 1).

La función endocrina del testículo reside principalmente en la población de células de Leydig que sintetizan y secretan Testosterona, el principal andrógeno circulante. La vía predominante en la síntesis de T por el testículo humano parece ser la vía Δ^5 (4). La cantidad de T que se almacena dentro de las células de Leydig es pequeña, debido a que la nueva hormona sintetizada difunde rápidamente hacia el plasma. La principal ruta de salida para los esteroides desde el testículo a la circulación general, es a través de la vena espermática, donde las concentraciones tanto en humanos como en primates no humanos son mayores que los niveles en sangre periférica (5, 6). Sin embargo, Testosterona por sí sola tiene muy pocos efectos directos, ya que es necesaria su conversión a otros metabolitos a través de los cuales ejerce su acción, entre los cuales se reconoce a la 5- α -dihidrotestosterona como el andrógeno más potente, y el estradiol-17- β que es el principal estrógeno producido por la aromatización de la testosterona. Dicha conversión se realiza en su mayor parte en tejidos periféricos y cerebro (2).

Las hormonas del testículo son responsables de la diferenciación del sistema nervioso central y de la inducción del desarrollo masculino durante la embriogénesis. Estas hormonas causan la diferenciación de los tejidos que sirven como los principales sitios de acción de los andrógenos y que producen el fenotipo masculino. La conducta masculina es el resultado de la exposición a estas hormonas durante la vida fetal (7, 8). Durante la pubertad, los andrógenos producidos por el testículo son los responsables de los cambios que determinan la maduración sexual, estos son; la aparición de los caracteres sexuales secundarios, desarrollo de la libido, de la potencia sexual, y junto con la secreción de gonadotropinas el inicio de la espermatogénesis. En la edad adulta, la T es esencial para el mantenimiento de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

espermatogénesis y de los caracteres sexuales secundarios, los conductos genitales y las glándulas accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales), (1, 2).

Desde el punto de vista histológico, los testículos están constituidos por una red de túbulos llamados, túbulos seminíferos, donde se producen y maduran los espermatozoides, y desde donde son transportados por los conductos eferentes al epididimo donde terminan su maduración, adquieren movilidad y la capacidad fecundante; y por un espacio intersticial donde se encuentran las células de Leydig que contienen las enzimas necesarias para la biosíntesis de andrógenos. El interior de los túbulos seminíferos está formado por epitelio columnar compuesto por células mioides, membrana basal, células germinales y células de Sertoli y están rodeadas por tejido peritubular formado por colágena, elastina y miofibrillas.

Uniones herméticas entre las células de Sertoli, células mioides, la membrana basal, las espermatogonias y los espermatocitos primarios forman una barrera de difusión denominada barrera hematotesticular, la cual funciona de una manera semejante a la barrera hematoencefálica, esto es, altamente selectiva con las moléculas y divide al testículo en 2 compartimientos funcionales, el basal y el adluminal. El compartimiento basal está constituido por las células de Leydig rodeando al túbulo, el tejido peritubular y la capa externa que contiene a las espermatogonias, las células de Sertoli y espermatocitos primarios en los estadios más tempranos de la meiosis. El compartimiento adluminal, consiste en los 2/3 internos del túbulo incluyendo los espermatocitos primarios y estadios más avanzados de la espermatogénesis. Conforme maduran, las células germinales avanzan a través de las uniones herméticas de las células de Sertoli, alcanzando el estado maduro en el compartimiento adluminal (Fig. 2) (9).

Espermatogénesis:

La espermatogénesis es un proceso muy complejo de diferenciación celular, en el cual las espermatogonias sufren cambios morfológicos y bioquímicos progresivos hasta alcanzar el estadio de espermatozoides maduros. Los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero para ser transportados al epididimo donde terminan su maduración, adquieren motilidad y la capacidad para fecundar al óvulo. Se inicia después de la pubertad bajo la regulación neuroendocrina del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, así como también bajo regulación paracrina y autocrina de hormonas y factores locales a nivel testicular (2, 9).

Las células germinales, primero sufren mitosis para producir un número necesario de células madre llamadas espermatogonias, de las cuales han sido descritas 6 tipos diferentes en primates no humanos (*A* oscuras, *A* pálidas, *B*₁, *B*₂, *B*₃ y *B*₄) y 4 en humanos (*A* alargada, *A* oscura, *A* pálida y *B*). Tanto en primates no humanos como en humanos, las espermatogonias tipo *A* pálida dan origen a las espermatogonias tipo *B* que son células bien diferenciadas y estas a su vez, dan origen a los espermatocitos primarios. Las espermatogonias *A* poseen un núcleo redondo con 1 o 2 nucleolos localizados sobre la cara interna del nucleolema, y las espermatogonias *B* contienen un núcleo redondo con un nucleolo central.

Las *espermatozonias A* son células madre, que sufren mitosis, algunas de ellas permanecen como células madre, mientras que las demás se diferencian a *espermatozonias B*. Las *espermatozonias B* son células diferenciadas que no pueden retroceder al estadio de células madre y dan origen a nuevas *espermatozonias B* por mitosis. Después de la última mitosis de las *espermatozonias B*, se diferencian a *espermatozonios primarios*. Estos son células redondas, más grandes y se caracterizan por tener un núcleo esférico con varios nucleolos; se desplazan en dirección luminal y se encuentran en la capa celular más cercana a la luz. Aumentan de tamaño y entran enseguida en la profase de la primera división meiótica, la cual dura 22 días (10, 11).

La meiosis es un tipo de división nuclear restringida a los gametos, esto es, los espermatozoides y los ovocitos, donde el número diploide de cromosomas característico de las células somáticas (2n), es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

reducido a la mitad, a un número haploide $1n$. La meiosis involucra 2 divisiones nucleares sucesivas con 1 división de cromosomas.

Durante el período inmediatamente previo a la profase de la primera división meiótica, los espermatocitos primarios, llamados espermatocitos en preleptoteno, duplican la síntesis de DNA en preparación para la primera división meiótica la cual reduce el número de cromosomas a la condición haploide. Después de la incorporación de nucleótidos y otras sustancias para la síntesis de DNA, los espermatocitos en preleptoteno migran de la membrana basal. La profase de la primera división es subdividida en 5 estadios sucesivos denominados, leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diaquinesis. Estos estadios están caracterizados por progresión de la espiralización de los cromosomas en el núcleo. El estadio de paquiteno es muy largo, en el humano es de aproximadamente 16 días, por lo tanto estas células pueden observarse en casi todos los cortes histológicos de los túbulos seminíferos(12, 13).

La primera división meiótica da como resultado la segregación de los cromosomas homólogos y la formación de pequeños espermatocitos secundarios que permanecen muy brevemente en interfase. Pueden ser diferenciados de los espermatocitos primarios por el tamaño más pequeño y por su núcleo esférico que contiene cromatina granular pálida. Debido a que su duración es muy corta (aproximadamente 8 h), no es frecuente observarlos en los cortes histológicos del testículo. En este paso, cada cromosoma homólogo consiste de 2 cromátides. Los espermatocitos secundarios entran rápidamente a la profase de la segunda división de maduración sin duplicar su DNA. Durante la metafase II, los cromosomas se alinean sobre el plano ecuatorial, mientras que en la anafase II, los centrómeros se dividen y cada cromátide se mueve al polo opuesto. Después de la telofase II, son formadas las espermátides, cada una conteniendo un número haploide de cromosomas.

La segunda división de maduración resulta por lo tanto, en la segregación de las cromátides de cada cromosoma homólogo formando células haploides separadas llamadas espermátides. Espermiogénesis es el proceso mediante el cual las espermátides inmaduras sufren los cambios morfológicos que resultan en espermatozoides maduros los cuales son vertidos en el lumen de los túbulos. El proceso de la espermiogénesis se ha dividido en 8 diferentes etapas en el humano, 10 en el baboon, 16 en el ratón y 19 en la rata. La espermiogénesis incluye reorganización nuclear, formación del sistema acrosómico originado del aparato de Golgi, ensamblamiento de las estructuras de la cola y reorganización citoplásmica. La etapa final de la espermiogénesis termina con la liberación de los espermatozoides al lumen de los túbulos seminíferos, evento denominado espermiación (Fig. 3) (10, 13).

Expresión del genoma durante la espermiogénesis:

Ciertos genes activados durante la meiosis pueden ser expresados postmeióticamente mientras que otros son transcritos exclusivamente del genoma haploide. Niveles altos de RNAs mensajeros transcritos de protooncogenes han sido encontrados en espermatogonias tipo A y B, espermatocitos en paquiteno, espermátides redondas, espermátides alargadas y cuerpos residuales.

La tasa de síntesis de RNA alcanza un pico en espermatogonias tipo A y espermatocitos en paquiteno, antes de declinar considerablemente en la etapa de diaquinesis, hasta niveles indetectables durante las 2 divisiones de reducción. Los RNA sintetizados durante la profase meiótica son encontrados en las espermátides (10).

TESIS COM
FALLA DE

El Epidídimo:

Cuando los espermatozoides son liberados a la luz de los túbulos seminíferos, son fisiológicamente inmaduros, es decir todavía no tienen movilidad ni la capacidad para fecundar un óvulo. Estas capacidades así como cambios en su membrana basal y su metabolismo, los adquieren en su paso por el epidídimo, que es el sitio de maduración, concentración y almacenamiento de los espermatozoides.

El epidídimo es un órgano par situado en la parte posterior de los testículos y unido a él por tejido conectivo laxo. Inicia en el polo superior del testículo y termina en el polo inferior, donde se continúa para formar el vas deferens o conducto deferente. Está formado por un solo conducto muy contorneado, denominado el conducto del epidídimo. Su longitud varía según la especie desde 2 m en los cobayos, 7 m en los hombres, hasta 80 m en los caballos sementales. El peso puede variar desde 1 g en los ratones, 4g en los hombres, hasta 20g o 30 g en los carneros (Fig. 4a).

Basado en criterios morfológicos e histológicos se le ha dividido en 3 porciones anatómicas denominadas, caput o cabeza, corpus o cuerpo y cauda o cola del epidídimo. Se cree que cada región del epidídimo sirve para funciones fisiológicas diferentes y específicas para la maduración de los espermatozoides (Fig. 4b).

El epitelio básicamente consiste en una sola capa de células pseudoestratificadas que contactan y recubren la lámina basal. Presenta 2 tipos de células, unas células columnares altas llamadas células principales, y unas células basales redondas u ovoides situadas entre las células principales. Las células basales son similares a las de los conductos eferentes. Las células columnares son más altas en la cabeza del epidídimo y van disminuyendo progresivamente su tamaño a través del cuerpo y la cola del epidídimo, donde tienen forma cuboidea (Fig. 5). Estas células contienen microvellosidades largas y ramificadas en la parte luminal llamadas estereocilios, debido a que son muy largas como cilios, pero inmóviles. El núcleo de las células columnares es alargado y está localizado cerca de la base de la célula. Pueden diferenciarse fácilmente de los núcleos redondos de las células basales que están situados muy cerca de la membrana basal. Las características histológicas de la membrana apical y el citoplasma sugieren que estas células absorben fluidos del lumen por pinocitosis. Los conductos eferentes y el epidídimo, absorben el 90% del volumen del fluido del lumen proveniente del testículo. El núcleo de las células principales es muy irregular y el complejo de Golgi situado supranuclear, es excepcionalmente grande. Sin embargo se desconoce su papel fisiológico exacto. Se ha establecido que estas células incorporan aminoácidos y carbohidratos a una glicoproteína que es liberada al lumen y se cree participa en la maduración de los espermatozoides (14, 15).

Las células basales y apicales están apoyadas sobre una lamina basal rodeada por células de músculo liso, la cual se vuelve más gruesa en la porción terminal del epidídimo y cuyas contracciones peristálticas ayudan a mover a los espermatozoides en su paso por el epidídimo. También se encuentran fibras longitudinales. Por debajo de la capa de músculo liso, hay una pequeña cantidad de tejido conectivo que une los contornos de los conductos y contiene los vasos sanguíneos y los nervios.

Transporte de los espermatozoides por el epidídimo:

La duración del tránsito de los espermatozoides por el epidídimo varía de acuerdo a la especie, desde 1 a 12 días en el humano, 8 a 10 días en los monos Rhesus, hasta 10 a 15 días en los cobayos. El paso de los espermatozoides por el epidídimo, aparentemente es influenciado por la producción diaria de espermatozoides en el testículo. La frecuencia de relaciones sexuales, únicamente afecta el tiempo de estancia de los espermatozoides en la cauda, que en este caso actúa como un reservorio, afectando la concentración final de los espermatozoides en el eyaculado (14, 15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuando los espermatozoides entran al epidídimo, tres cambios muy importantes se llevan a cabo:

1. Reducción en el volumen del flujo del epidídimo, debido a la reabsorción de iones y agua, que da como resultado aumento en la concentración de los espermatozoides.
2. Formación de un medio diferente al plasma sanguíneo, el cual favorece la inmovilización de los espermatozoides y su sobrevivencia. Los siguientes cambios han sido observados: aumento de la presión osmótica (400 mosmol), disminución del pH (de 7.3 a 6.5), disminución rápida de cloruro y bicarbonato y disminución lenta de Na^+ correlacionada con un fuerte aumento de K^+ y fosfato.

La inmovilidad de los fluidos en la cauda del epidídimo, aparentemente es el resultado de un pH bajo, poca disponibilidad de O_2 , y disminución de la temperatura del epidídimo comparada con la temperatura corporal.

3. Síntesis de proteínas específicas del epidídimo: estas proteínas son secretadas en las microvellosidades de las células principales del epidídimo. Su síntesis es dependiente de T y se unen a regiones particulares de la cabeza y el flagelo de los espermatozoides (14).

Diferenciación de los espermatozoides en el epidídimo:

1. En el epidídimo, el núcleo de los espermatozoides desarrolla una resistencia a la descondensación. Se ha observado aumento de las uniones disulfuro de los residuos de cisteína de las nucleoproteínas de los espermatozoides. Estos cambios aparentemente protegen el núcleo de los espermatozoides y aumentan la rigidez de su cabeza para favorecer la penetración de la zona pelúcida del ovocito.
2. El acrosoma se une más estrechamente al núcleo.
3. La membrana plasmática sufre reorganización molecular induciendo nuevas propiedades antigénicas indispensables para que el espermatozoide adquiera la habilidad fertilizante.
4. Se presentan cambios en los lípidos de la bicapa lipídica de la membrana, tales como aumento de la fosfatidilcolina y de la proporción esteroles/fosfolípidos. Estos cambios estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide en su paso por el epidídimo (14)

Cambios funcionales en el espermatozoide relacionados a la adquisición de la habilidad fertilizante:

1. Movilidad progresiva: en el caput, los espermatozoides son inmóviles, el movimiento del flagelo está limitado a movimientos vibratorios. En la porción inicial del corpus, los movimientos son circulares o de patrón irregular, en la porción distal del corpus ya son capaces de moverse linealmente y en la cauda, aunque ya tienen la capacidad de moverse progresivamente, permanecen inmóviles debido a las características de los fluidos de la cauda mencionados anteriormente (pH bajo, proporción de iones, etc.).
2. Habilidad para unirse a la zona pelúcida: La unión específica de la cabeza del espermatozoide a la zona pelúcida es un prerequisite para la fertilización. Las glicoproteínas que median la unión especie-específica son componentes intrínsecos de la membrana plasmática de los espermatozoides. Sin embargo, los espermatozoides adquieren la capacidad de unirse a la zona pelúcida únicamente después de pasar por el caput y entrar al inicio del corpus. Esta capacidad de unión depende de proteínas de membrana de origen testicular las cuales aparecen como proreceptores y se vuelven funcionales en el epidídimo por la acción de proteínas dependientes de andrógenos secretadas al fluido del epidídimo y depositadas sobre la membrana plasmática. Esta capacidad de unión a la zona pelúcida es independiente de la movilidad.

TESIS CON
FALLA DE ORDEN

3. Habilidad de Fertilización y sobrevivencia del embrión: La maduración de los espermatozoides en el epidídimo incluye 2 potencialidades: Aptitud para fertilizar y aptitud para iniciar el desarrollo del embrión hasta su término. Ambas capacidades son expresadas únicamente por espermatozoides de la cauda del epidídimo y son adquiridas progresiva e independientemente durante su paso por el epidídimo. La excepción son los humanos y los monos marmoset (12, 14).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Biosíntesis de estrógenos:

La biosíntesis de estrógenos es catalizada por la enzima citocromo P450 aromatasa. En humanos, varios tejidos tienen la capacidad de expresar la aromatasa y por lo tanto de sintetizar estrógenos. Entre ellos se encuentran las células de la granulosa y el cuerpo lúteo del ovario, células de Leydig del testículo, el sinciciotrofoblasto de la placenta, varios sitios en el cerebro incluyendo el hipotálamo, amígdala e hipocampo, así como también en tejido adiposo, los condrocitos y los osteoblastos, la piel y el hígado en la etapa fetal (16).

Testosterona y androstenediona son los principales sustratos para la síntesis de estrógenos. En el testículo, las células de Leydig son las responsables de la producción de andrógenos a partir de colesterol, este evento es dependiente de estimulación por la LH. Las gotas de lípidos que se encuentran en el citoplasma de las células de Leydig están compuestas principalmente de colesterol esterificado, el cual deriva en parte de las lipoproteínas circulantes y en parte del colesterol sintetizado localmente en el retículo endoplásmico de las células de Leydig. Esta poza de colesterol esterificado sirve como sustrato de reserva para la síntesis de T. Después de la hidrólisis de los ésteres de colesterol, el colesterol libre se mueve a la mitocondria, donde se lleva a cabo la reacción limitante en la biosíntesis de las hormonas esteroides.

La conversión de colesterol a pregnenolona en la mitocondria es la primera reacción en la síntesis de todas las hormonas esteroides, dicha reacción es el paso limitante de la reacción y es regulado por hormonas (17). En el testículo, se encuentran involucrados 5 procesos enzimáticos en la conversión de colesterol a testosterona. La cadena lateral del colesterol es escindida en 2 pasos para reducir el tamaño de 27 a 19 carbonos, y el anillo A del esteroide es oxidado a la configuración Δ_4 -3-Ceto. La reacción inicial en el proceso involucra la escisión de la cadena lateral del colesterol por la 20, 22-desmolasa en la mitocondria para formar pregnenolona. La conversión subsecuente de pregnenolona a testosterona involucra en parte al azar y en parte de una manera ordenada una serie de reacciones enzimáticas. Para que la segunda escisión de la cadena se lleve a cabo es necesario que ocurra 17α -hidroxilación antes que se termine la reacción de la 17,20-desmolasa y ambas reacciones deben realizarse antes de la reducción de la 17-cetona por la 17β -hidroxisteroide deshidrogenasa. En contraste, la oxidación del anillo A del esteroide por el complejo de la 3β -hidroxisteroide deshidrogenasa- $\Delta^{4,5}$ -isomerasa puede realizarse en cualquier etapa del proceso (18) (Fig. 6). Por lo tanto, el momento en el cual la oxidación del anillo A ocurre, depende de la cantidad y afinidad de las enzimas por los diferentes sustratos y la compartimentalización de las enzimas dentro del retículo endoplásmico. La vía predominante en el testículo humano normal parece ser la vía Δ^2 (4) con la liberación final de ácido fórmico y formación del anillo A fenólico, característico de los esteroides de 18 carbonos.

Aunque la 17α -hidroxilasa y la 17,20-desmolasa eran tradicionalmente consideradas como enzimas separadas, la purificación y reconstitución in vitro de la actividad de la enzima, indica, que ambas actividades residen en una sola enzima citocromo P-450 ($P-450_{c17}$). Mendelson y Cols. Reportaron que una sola cadena polipeptídica tiene la capacidad para catalizar la secuencia completa de pasos involucrados en la conversión de esteroides C_{19} con una estructura Δ^4 -3-ona, a un esteroide C_{18} con un anillo A fenólico (19).

Familia de la Citocromo P-450:

La aromatasa es un miembro de la superfamilia de enzimas denominadas citocromo P-450, estas son enzimas microsomales involucradas en el metabolismo de oxidación de los esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, leukotrienos, aminas biogénicas, ferohormonas, y metabolitos de plantas. La mayor parte de las enzimas esteroidogénicas son miembros del grupo de la citocromo P-450 oxidasas. Citocromo es un nombre genérico para un gran número de enzimas con propiedades oxidativas, las cuales tienen

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

alrededor de 500 amino ácidos y contienen un solo grupo heme. Se les denomina P-450 (pigmento 450) debido a que todas exhiben un corrimiento característico en el pico de absorbanza Soret de 420 a 450 nm posterior a reducción con monóxido de carbono. Todas las enzimas P-450 reducen O₂ molecular con electrones donados por NADPH de acuerdo a la siguiente reacción:



Los electrones donados por NADPH llegan a la P-450 a través de uno o dos transportadores intermediarios de electrones, uno de los cuales es siempre una flavoproteína. Los sitios de unión del grupo heme de todas las enzimas P-450 tienen ciertos amino ácidos en común, pero estas enzimas son bastante heterogéneas.

Dos enzimas citocromo P-450 están involucradas en la biosíntesis de andrógenos en las células de Leydig, llamadas P450_{sec} (colesterol side chain cleavage) y P450_{17α} (17 α-hidroxilasa/C₁₇₋₂₀liasa). El efecto agudo de LH o cAMP es incrementar el transporte del colesterol a la membrana interna de la mitocondria donde el colesterol se asocia con la P450_{sec} la cual cataliza la ruptura de la cadena lateral del colesterol para dar lugar al esteroide de 21 carbonos pregnenolona. La conversión de esteroides de 21 carbonos para formar andrógenos C₁₉, requiere de la actividad de la P450_{17α}, la cual se encuentra en el retículo endoplásmico liso.

P450_{17α} cataliza 2 reacciones, la hidroxilación de esteroides de 21 Carbonos a partir de progesterona o pregnenolona (actividad de 17α-hidroxilasa), seguida por la ruptura de la cadena lateral de carbonos (actividad C_{17,20} liasa) para dar lugar a los esteroides de 19 carbonos androstenediona o dehidroepiandrosterona, respectivamente (17, 20).

Sistema de la Aromatasa:

La aromatasa es la enzima responsable del último paso en la biosíntesis de esteroides de 18 Carbonos a partir de andrógenos C₁₉ en las células de Leydig. Este paso es catalizado por el mismo complejo de aromatasa que opera en placenta y ovario. La formación de estrógenos involucra hidroxilaciones secuenciales, oxidación y remoción del carbono de la posición 19 de la molécula del respectivo andrógeno (Testosterona o Androstenediona) y la consecuente aromatización del anillo A del esteroide. P450 *arom* convierte andrógenos a estrógenos por 2 hidroxilaciones en el grupo metil del C-19 y una tercera hidroxilación en el C-2, resultando en la pérdida del carbono 19 y la consecuente aromatización del anillo A el cual produce la estructura fenólica característica de los estrógenos. Esta serie de reacciones requieren 3 pares de electrones donados por 3 moléculas de NADPH a través de la P-450 *reductasa*, para convertir cada mol de androstenediona o testosterona a estrona o estradiol respectivamente, todo esto ocurre en un mismo sitio activo (17).

Asociada con la P450 *arom* se encuentra una flavoproteína, NADPH-citocromo P450 *reductasa*, la cual es una proteína esencialmente ubicua en el retículo endoplásmico de la mayor parte de las células, y es la responsable de transferir equivalentes reducidos de la NADPH a cualquier forma microsomal de la citocromo P450. Mientras que la reductasa puede ser el producto de un solo gen, la citocromo P450 *aromatasa* pertenece a la superfamilia de genes, llamados la familia de la citocromo P450.

El complejo de la aromatasa, parece estar presente en toda la escala filogenética de los vertebrados incluyendo mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (21). Se encuentra en el retículo endoplásmico de casi todos los tejidos, principalmente en cerebro, gónadas, placenta y tejido adiposo (16). A la fecha, se han aislado y caracterizado insertos de DNA complementario (cDNA), complementarios para el RNA mensajero (mRNA) que codifica para la citocromo P-450 *arom*, a partir de placenta humana (22-24), de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ratón (25), de células de la granulosa de ovario de ratas (26), gónadas de peces, y cerebro de algunas aves.

El gen CYP19:

La citocromo P450 arom es producto del gen CYP 19, el cual fue clonado y caracterizado hace ya algunos años (27). Este gen es inusual comparado con otros genes que codifican otras enzimas P450, debido a que tiene numerosos exones I no traducidos que dan lugar a transcritos de aromatasas de manera tejido-específica, como resultado del uso de promotores tejido-específicos .

Forma parte de la superfamilia de genes de la citocromo P450, la cual hasta hoy día tiene mas de 481 miembros que pertenecen a 74 familias de genes. Está localizado en la región q21.1 del cromosoma 15. Este gen tiene mas de 75 kb de largo, está compuesto de 17 exones, de los cuales, 9 están traducidos. El gen incluye además, 8 exones no traducidos, situados en la región 5'. La transcripción del gen está controlada por promotores tejido-específicos, los cuales a su vez son regulados endocrina o paracrinamente. La citocromo P450arom, es hasta la fecha, el único miembro de la familia del gen 19, designado CYP19. Esta designación se basa en el hecho de que el grupo metil angular del C₁₉ es el sitio de ataque por el oxígeno (28, 29).

La región codificante comprende los exones II al X. El exón X contiene la región de unión del grupo heme (HBR) que es donde se encuentra el sitio activo de la enzima. En humanos, se encuentran además, 2 sitios de poliadenilación que dan origen a 2 mRNA que difieren en el tamaño de su región 3' no traducida, uno de 3.4 kb y el otro de 2.9 kb. Río arriba del exón II hay una serie de exones I alternativos los cuales son cortados en la región 5' no traducida del transcripto de una manera tejido-específica. De acuerdo al tejido, el tipo de exón I traducido es diferente, por lo tanto los mRNA de la citocromo P450arom serán de diferentes tamaños dependiendo del exón I que se traduzca (fig. 7).

Usando clonas de cDNA generadas a través de RACE (rapid amplification of cDNA ends) derivadas a partir de transcritos de P450 arom presentes en diferentes tejidos, revelaron que la region 5'-terminal de estos transcritos difieren una de otra de una manera tejido-específica, río arriba de un sitio común en la región 5'- no traducida. También se encontró que estas regiones 5'-terminal corresponden a exones no traducidos, los cuales son cortados y empalmados para formar transcritos de la P450 arom de una manera tejido-específica debido al uso de promotores que se activan de una manera tejido-específica.

La eliminación de intrones y empalme de estos exones no traducidos para formar el transcripto maduro se lleva a cabo en un sitio común 3', el cual está situado río arriba del sitio de inicio de la traducción. Esto significa que aunque los transcritos en los diferentes tejidos tienen diferentes regiones 5' terminal, la región codificante y por lo tanto la proteína expresada en los diferentes tejidos es siempre la misma. Sin embargo, las regiones de los promotores situados río arriba de *c/u* de los diferentes exones I no traducidos, tienen diferentes cohortes de elementos de respuesta y por lo tanto la regulación de la expresión de la aromatasas en cada tejido que sintetiza estrógenos es diferente. Este patrón de expresión tiene gran importancia desde el punto de vista filogenético y ontogenético, así como también desde el punto de vista fisiológico y fisiopatológico de la formación de estrógenos (30, 31)

La expresión de la aromatasas en las gonadas es regulada por cAMP y gonadotropinas debido a una interacción del promotor II gonadal con los factores de transcripción CREB (proteína unidora del elemento de respuesta del cAMP) y la SP1 (32, 33). El promotor I.4 del tejido adiposo, es regulado por citocinas clase I tales como interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 /IL-11), oncostatina M, así como por el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (34).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La expresión del gen en ovarios y testículo utiliza un promotor proximal, el promotor II y por lo tanto los transcritos en el tejido gonadal contienen una secuencia en su región 5' terminal que está inmediatamente río arriba del sitio de inicio de la traducción (35, 36) (fig. 7).

Los transcritos de placenta contienen en su región 5' terminal, un exón I.1 no traducido el cual está localizado al menos 100 kb río arriba del sitio de inicio de la traducción en el exón II. Esto se debe a que la expresión de la aromatasa en la placenta es dirigida desde un poderoso promotor placentario distal, I.1, río arriba del exón I.1 no traducido. En contraste, los transcritos en el tejido adiposo tienen otro exón distal no traducido, el I.4, el cual está localizado en el gen, a 20 kb río abajo del exón I.1, utiliza el promotor I.4, y el tejido aberrante utiliza los promotores I.3 y el II (37). En cerebro, ovarios y testículo se encuentra otro exón no traducido denominado exón 1f, el cual se encuentra río abajo del exón I.4 (38) (fig. 7).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES:

Aunque la testosterona es reconocida como el principal esteroide sexual en el varón, se sabe que los testículos son capaces de sintetizar tanto estrógenos como testosterona. Esta capacidad biosintética de los testículos para producir estrógenos ha sido reconocida en casi toda la escala filogenética de los vertebrados incluyendo mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (21). Los estrógenos son producidos en pequeñas cantidades en el testículo y han sido reportados en el semen de diversas especies incluyendo aves, roedores, perros, monos, y humanos (39-41); mas aún, en la mayor parte de los vertebrados que se han estudiado, se ha reportado tanto actividad de aromatasa como también la expresión de su mRNA en gónadas y en cerebro (39, 42, 43).

En humanos y en la mayor parte de primates no humanos, se ha encontrado biosíntesis de estrógenos en diferentes tejidos, tales como, placenta, ovarios, glándula suprarrenal, testículos, tejido adiposo y en menor cantidad en el cerebro. Estos tejidos tienen la capacidad de sintetizar uno o más de los tres principales estrógenos a partir de su respectivo sustrato, esto es, estradiol-17 β , estrona y estriol son producidos a partir de testosterona, androstenediona y 16 α -hidroxandrostenediona, respectivamente.

También se sabe que la biosíntesis de estrógenos es tejido-específica, es decir, cada tejido posee la o las enzimas involucradas en la biosíntesis de cada estrógeno en particular, de tal manera que el principal estrógeno producido por los testículos y los ovarios es estradiol-17 β , el tejido adiposo produce principalmente estrona, mientras que la placenta produce principalmente estriol (17, 44, 45).

La capacidad de los testículos para producir estrógenos se conoce desde 1934, cuando Zondek reportó que un alcohol crudo extraído de testículos de caballo tenía actividad estrogénica (46), Beall en 1940, demostró que la actividad estrogénica contenida en dichos extractos era debido a la presencia de estrona y estradiol cuyas concentraciones eran muy altas (47). La capacidad de los testículos para sintetizar estrógenos a partir de precursores de 2 carbonos fue demostrada después del desarrollo de técnicas con marcadores radiactivos; Rabinowitz en 1956 reportó que homogenados de testículo de humanos, perros y gatos eran capaces de incorporar acetato marcado a colesterol, T, y 17 β -estradiol (48). Posteriormente, Baggett y colaboradores en 1959, obtuvieron evidencia directa de la conversión de T a estradiol a partir de homogenados de testículos de sementales (49). Estos reportes, fueron las primeras evidencias de la producción de estrógenos por los testículos.

Años más tarde se demostró que tanto las células de Leydig como las de Sertoli son las responsables de la producción de estrógenos bajo la regulación de las gonadotropinas hipofisarias. En 1978, Dorrington y colaboradores reportaron que células de Sertoli aisladas de testículos de ratas de 5 a 30 días de nacidas, fueron capaces de sintetizar estrógenos cuando fueron estimuladas con FSH y que dicha producción era edad-dependiente (50). Estos hallazgos fueron confirmados por Pomerantz (51). Valladares y Payne en 1979, reportaron actividad de aromatasa en homogenados de testículos de ratas adultas, al estimularlas tanto con LH como con hCG, que esta estimulación fue dependiente de tiempo y dosis de estimulación. Uno de los hallazgos más importantes en este reporte fue sin lugar a dudas el hecho de que FSH no fue capaz de estimular la actividad de aromatasa (52).

Más tarde Tsai-Morris y Dufau trabajando con purificados de células de Leydig y de Sertoli provenientes de ratas inmaduras (5 y 15 días de nacidas), y ratas adultas (60 días de nacidas), confirmaron que ambos tipos de células tienen capacidad de aromatización pero que la actividad de aromatasa se incrementa en las células de Leydig y disminuye en las células de Sertoli conforme avanza la maduración del testículo (53). Inkster y colaboradores en 1995, reportaron actividad de aromatasa en células de Leydig de testículos humanos, a través de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo generado contra la aromatasa humana (54).

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

Aunque la función de los estrógenos producidos por los testículos no es totalmente conocida, actualmente se reconoce que juegan un papel fundamental en el varón. Durante la vida fetal son los responsables de la masculinización del cerebro, lo cual induce la conducta de monta en los machos. En la pubertad y durante la vida adulta regulan la secreción de LH (8, 55, 56). Más aún, estudios publicados por diferentes grupos de investigación han demostrado la presencia de receptores para estrógenos (ER) en todo el tracto reproductor masculino de aves, roedores, primates no humanos y humanos (57 - 60), cuya importancia biológica se encuentra actualmente bajo estudio. Estudios recientes utilizando ratones ERKO (Estrogen Receptors Knock Out mouse) demostraron que la ausencia de receptores de estrógenos produce infertilidad (61).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACION:

Aún cuando los estrógenos han sido clasificados como hormonas típicamente femeninas, existen muchas evidencias que apoyan fuertemente la capacidad de los testículos para sintetizar estrógenos y cuya importancia biológica en los varones todavía no ha sido totalmente establecida.

Estudios realizados en diferentes laboratorios para localizar la o las células productora (s) de estrógenos en los testículos han demostrado que esta capacidad biosintética depende de la edad, de la especie estudiada, y del método de laboratorio que se utilice (50 - 54). Así mismo los resultados pueden variar dependiendo del tipo de material biológico con el que se trabaje, es decir con homogenados de testículos completos (50), o con células de Sertoli y células de Leydig aisladas del testículo (51-53). Entre los diferentes métodos de laboratorio empleados se encuentran estudios radiométricos (49), de inmunocitoquímica (54), y también a través de RT-PCR (Transcripción Reversa a través del método de Reacción en Cadena de Polimerasa) (62). Estos trabajos han sido realizados principalmente utilizando como modelo animal, especies inferiores, tales como, aves, ratas, y ratones, cuyos resultados, en términos de filogenética, podrían ser muy diferentes de una especie a otra. En la mayor parte de los estudios realizados utilizando testículos humanos se han utilizado testículos con alguna patología, lo cual no puede evitar el sesgo que implica el trabajar con tejido patológico. Actualmente generalmente se acepta que las células de Leydig son las responsables de la producción de los estrógenos en el testículo, sin embargo, se ha publicado la presencia de la P450 aromataasa en las células germinales de testículo de gallos y ratones (39, 63).

Con el desarrollo de nuevas técnicas de Biología Molecular, hoy día, es posible obtener resultados más precisos, para determinar la localización y distribución exacta de las células responsables de la aromatización de andrógenos a estrógenos en el testículo. Con el uso de técnicas de hibridación in situ, utilizando un DNA complementario (cDNA) para el RNA mensajero (mRNA) que codifique para la citocromo P 450 *arom* es posible determinar con exactitud el o los sitios donde se lleva a cabo la aromatización así como también es posible cuantificar el RNA mensajero producido en estos tejidos a través de técnicas de hibridación en solución y mas específicamente usando un método protegido contra ribonucleasa (ribonuclease protection assay) (64).

En años recientes, en el laboratorio del Dr. Resko, clonaron parcialmente un cDNA para el mRNA de la citocromo P450 *arom* a partir de RNA total extraído de placenta de mona rhesus. Este cDNA ha sido utilizado con éxito para localizar la distribución del mRNA de la citocromo P450 aromataasa en cerebro de mono rhesus (65).

Hasta la fecha se desconoce el papel que los estrógenos juegan en el tracto reproductor masculino en primates humanos y no humanos, así como sus acciones específicas. Aún mas, la distribución, actividad y expresión de la citocromo P450 aromataasa no ha sido estudiada en el tracto reproductor de primates humanos y no humanos. El estudio del tracto reproductor en el humano, es prácticamente inaccesible, debido a las condiciones anatómicas y fisiológicas de los tejidos, así como las implicaciones de tipo ético para la investigación en seres humanos.

En la actualidad existe gran interés en diferentes grupos de investigación en conocer la participación de los estrógenos en la regulación de la espermatogénesis, pues hasta la fecha ese rol se le ha atribuido exclusivamente a las gonadotropinas hipofisarias y a la testosterona. Nuestro interés en realizar este estudio fue tratar de reconocer la capacidad de los testículos y epidídimos para producir citocromo P450 aromataasa, la enzima responsable de la producción de los estrógenos (a través de la localización del mRNA), su actividad (midiendo la actividad de aromataasa), así como también reconocer a la o a las células que producen esta enzima (a través de la técnica de Hibridación In Situ).

TESTIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por tal motivo pensamos en la posibilidad de trabajar con un modelo animal que fuera anatómica, bioquímica y fisiológicamente lo más cercano al ser humano. Nuestro interés en trabajar con monos rhesus machos como modelo animal es debido a que pertenecen a la familia de los primates, siendo estos filogenéticamente, la relación más cercana a los humanos.

Los tejidos, material de laboratorio y equipo utilizado en este trabajo de investigación fueron donados por el Dr. John A. Resko, del depto. de Fisiología de la Universidad de Ciencias de la Salud de Oregon, en los Estados Unidos de América. El entrenamiento en histología y manejo del tejido de testículo y epidídimo fue proporcionado por el Dr. Rex A. Hess, de la escuela de Veterinaria en la Universidad de Illinois, en Urbana, Illinois. La sonda de 185 bp de la ciclofilina fue donada por el Dr. Sergio Ojeda del centro de investigación en primates no humanos de Beaverton, Oregon.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS:

- 1.- Validar y cuantificar la actividad de aromatasa en testículo y epidídimo de Monos Rhesus.
- 2.- Determinar la distribución de la citocromo P450 aromatasa en testículo y epidídimo de monos Rhesus.
- 3.- Cuantificar las concentraciones del mRNA que codifica para la citocromo P450 aromatasa en testículo y epidídimo.
- 4.- Determinar la o las células que producen el mRNA para la citocromo P450 aromatasa en testículo y epidídimo.

HIPOTESIS:

- 1.- Los testículos y el epidídimo de los monos Rhesus tienen actividad de Aromatasa.
- 2.- Los testículos y el epidídimo de los monos Rhesus expresan el mRNA que codifica para la citocromo P450 aromatasa.
- 3.- Las concentraciones del mRNA de la citocromo P450 aromatasa son mayores en el testículo que en el epidídimo.
- 4.- El mRNA que codifica para la citocromo P450 aromatasa se encuentra heterogéneamente distribuido en el testículo y el epidídimo.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGIA:

I. Diseño del estudio: Experimental, transversal, comparativo.

II. Animales, Materiales y Métodos:

a) Animales:

Para los experimentos se utilizaron testículos y epidídimos de 10 monos Rhesus (*macaca mulata*) adultos, sanos, edad entre 5 y 10 años, peso promedio de 8.8 ± 2.2 kg., certificados por el grupo de Veterinarios del Centro de Primates donde se adquirieron (Tulane, Nueva Orleans o el centro de primates de Beaverton, Oregon). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, a temperatura constante de 25° C, con periodos controlados de luz-oscuridad de 12 horas cada uno (7:00 AM a 7:00 PM) (fig. 8^a). Se les administró una dieta especial para monos manufacturada por los Laboratorios Purina, recibieron complemento de fruta fresca y agua *ad libitum*. Estuvieron bajo la supervisión del grupo de Veterinarios del Departamento de Cuidado de Animales de Laboratorio de la Universidad de Ciencias de la Salud del Estado de Oregon (OHSU). Todos los procedimientos que se realizaron durante el manejo de los animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el cuidado de los animales de OHSU, de acuerdo a las normas establecidas por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos.

Los testículos y epidídimos se obtuvieron a través de orquiectomía, bajo anestesia general con hidrocloruro de Ketamina a la dosis de 10 mg/Kg/I.V. Se realizó una incisión en la línea media supraescrotal, se cortó el músculo cremáster y la túnica vaginalis. Posterior a la orquiectomía los vasos se ligaron con la técnica de triple ligadura en masa.

b) Manejo de los Tejidos:

Inmediatamente después de la orquiectomía, los testículos y epidídimos se colocaron en hielo y se separaron en cada una de las regiones anatómicas. El epidídimo a su vez se dividió en sus 3 componentes, caput, corpus y cauda (fig. 8b-h). Una vez separados se cortaron en pedazos de aproximadamente 1.5 cm². El tejido que se utilizó para probar la actividad de aromatasa y la cuantificación del mRNA se congeló inmediatamente en hielo seco y posteriormente se colocó en viales y se guardó a -80° C hasta el momento de su utilización. El tejido que se utilizó para la Hibridación In Situ se procesó de 2 maneras diferentes. 1) Tejido fijado por inmersión: Se cortaron pedazos de 2 cm² y se fijaron en paraformaldehído (PFD) al 4% por 4 horas, posteriormente se colocaron en viales conteniendo sacarosa al 20% en buffer de fosfato toda la noche (aproximadamente 18 horas) en un rotor con agitación constante y a temperatura constante de 4° C. Al día siguiente el tejido se cortó nuevamente en porciones de aproximadamente 0.5 cm² y se incluyeron en criomoldes, embebidos en O.C.T. (es un compuesto a base de polivinilalcohol y polietilenglicol). Posteriormente, el tejido se congeló en isopentano enfriado en hielo seco a -56° C. Se envolvieron en papel aluminio debidamente etiquetado con el número del mono y el tejido, finalmente se guardó a -80° C hasta el día que se cortó en el criostato. 2) Tejido congelado en fresco: Se cortaron pedazos de 0.5 cm² sobre hielo, posteriormente se colocaron en los criomoldes con O.C.T., se etiquetaron y se congelaron a -80° C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE COPIA

c) Metodologías :

Cuantificación de Hormonas Esteroides:

Para comparar la concentración de, estrona (E_1), estradiol (E_2), androstenediona (Δ), dihidrotestosterona (DHT) y testosterona (T) de la vena espermática, versus sangre periférica, se obtuvieron muestras de sangre el día de la orquiectomía. La muestra de sangre periférica se obtuvo a las 8 de la mañana, a través de un catéter cardíaco y la muestra de la vena espermática se obtuvo al momento de la castración (fig. 8b). El suero se separó centrifugando las muestras a 2500 rpm, por 10 minutos y se guardaron a -20°C hasta el día de su análisis. Las muestras se procesaron de la siguiente manera: Los esteroides se extrajeron de cada muestra agregando 7 ml de éter a cada muestra, mezclando por inversión durante 2 minutos, posteriormente se centrifugaron a 1 500 rpm a 4°C por 5 min. Los esteroides se separaron a través de una columna de sephadex L-20 y se eluyeron con una mezcla de 3 solventes, Hexano:benzeno:Acetato de Etilo 65:20:15. Con las fracciones recolectadas, se realizó Radioinmunoanálisis de cada esteroide, utilizando anticuerpos proporcionados por los Institutos Nacionales de Salud de los EUA, de acuerdo a los procedimientos y lineamientos proporcionados por dicho Instituto

Ensayo Radiométrico con agua Tritiada para cuantificar la Actividad de la Aromatasa:

Esta prueba está basada en la cuantificación del agua tritiada formada a partir de la androstenediona marcada con Tritio en la posición 1- β , ($1-\beta\text{-}^3\text{H}-\Delta_4$). El tritio en la posición 1- β , es perdido estereoespecíficamente durante la aromatización, ya que se produce una molécula de agua por cada estrógeno formado. La estequiometría de la reacción puede validarse, comparando la cantidad de agua tritiada generada a partir de la androstenediona con la cantidad de $7\text{-}^3\text{H}-E_1$ y $7\text{-}^3\text{H}-E_2$ producida a partir de la androstenediona (66).

Para validar la prueba en estos tejidos, se realizó una comparación entre la cantidad de estrógeno formado por los microsomas del testículo con la prueba del agua tritiada vs la cantidad determinada por producto aislado de estradiol-17- β (E_2) y Estrona (E_1). Encontramos 99.1 ± 20 fmoles de estrógeno producido/mg de proteína/h con la prueba de producto aislado vs 108.0 ± 3.5 fmoles de agua tritiada producida/mg de proteína.h ($n=10$, los valores representan el $X \pm \text{EEM}$). No hubo diferencia significativa entre los valores obtenidos en ambas pruebas, $p > 0.05$, t de student.

Para determinar la concentración de sustrato, la temperatura y el tiempo de incubación, así como la cantidad de microsomas por cada región estudiada, se realizaron curvas de saturación previamente a los ensayos. Se incubaron concentraciones crecientes de sustrato en la presencia de un sistema generador de NADPH. Se obtuvo una concentración de 300 nM para la androstenediona, 37°C de Temperatura, dilución de los microsomas 1:100 en los testículos y 1:200 en el epidídimo y el tiempo de incubación fue de 1h. La constante de Michaelis Menten (K_m) para los microsomas del testículo fue de 100.4 nM (fig.9).

Para la prueba de la actividad de la aromatasa se utilizaron homogenados de testículo, caput, corpus y cauda del epidídimo, en una proporción 1:10 w/v, 100 μg de tejido: 1000 μl de buffer de homogenización (Fosfato de Potasio 10 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, EDTA 1mM), pH 7.4. La aromatasa es una enzima que se encuentra en los microsomas, por lo tanto se obtuvieron microsomas, centrifugando los homogenados a 1000 X g X 10 min a 4°C . El sobrenadante se centrifugó a 107, 000 X g X 10 min a 4°C . Para obtener los microsomas, la pastilla se resuspendió con 100 μl de buffer de incubación (Glucosa-6-Fosfato 5 mM, NADP+ 1mM, Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa 2U/ml, KOH 2N) y se sonicó por 20 segundos. Los microsomas se incubaron durante 1 hora, a 37°C con 300 nM de $1-\beta\text{-}^3\text{H}$ -Androstenediona preincubada durante 30 min. La reacción se detuvo, agregando ácido tricloroacético al 10% y 20 mg de carbón neutro/ml. Las muestras se centrifugaron a 1000 X g X 10 min a 4°C . El sobrenadante se separó a través de una columna empacada con resina de intercambio iónico grado analítico AG 50W-X4, 50-100 y

100-200 mesh, (Biorad), y se eluyó con 1 ml de agua desionizada (fig. 10). La elusión se recuperó en un vial de centelleo y se contó durante 10 min. en un contador de centelleo β . Para mayores detalles del procedimiento ver descripción de la técnica en la Ref. (66). Cada muestra se corrió por duplicado, usando como control positivo, microsomas de placenta y como control negativo, microsomas de músculo femoral. El coeficiente de variación intraensayo fue de 1.9%.

La actividad de aromatasa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{dpm de la muestra} - \text{dpm del blanco}}{^3\text{H}_2\text{O recuperada}} = \text{dpm corregida de la muestra}$$

$$\frac{\text{dpm corregida de la muestra}}{2.22 \times 10^{13} \text{ Ci/ dpm}} = \text{Ci del producto}$$

$$\frac{\text{Ci del producto}}{22.5 \text{ Ci/mmol (Actividad Específica)}} = \text{mmol de producto}$$

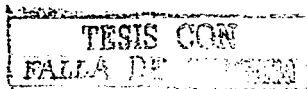
$$\frac{\text{mmol}}{1000} = \text{mol, mol}^{-15} = \text{fmol}$$

$$\frac{\text{fmol}}{\text{mg de proteína por ensayo}} = \text{fmol/mg de proteína/h}$$

Hibridación en solución e Hibridación in situ:

Síntesis de la ribosonda:

Para sintetizar el sentido y el antisentido de la citocromo P450 aromatasa, se utilizó un cDNA específico para la citocromo P450arom clonado de placenta de mona rhesus, del tercer trimestre, generado por RT-PCR, de los exones II al V. Esta sonda fue clonada previamente en el laboratorio del Dr. Resko. El templete de cDNA para el sentido se linearizó con 100 U de la enzima de restricción HIND III /10 μg del cDNA circular. El templete de cDNA para el antisentido se linearizó cortando el cDNA con 60 U de la enzima de restricción xhoI/10 μg del cDNA circular. El día anterior a la hibridación in situ se sintetizaron las ribosondas utilizando 500 μg del respectivo templete de cDNA linearizado. La transcripción del antisentido se realizó con RNA polimerasa sp6 y el sentido se transcribió con RNA polimerasa T7. Se utilizó como marca radiactiva UTP marcado con ^{33}P (actividad específica 2000Ci/mmol), 125 μCi para el sentido y 125 μCi para el antisentido, respectivamente. Las ribosondas generadas in vitro, se purificaron a través de una columna de sephadex G-50 (Nick Column, Pharmacia), se eluyeron con SET buffer (SDS 1%, TRIS 10 mM, EDTA 1mM, pH: 7.4). La concentración de cada ribosonda se calculó contando 1 μl de cada una en un contador de centelleo β y se guardaron a -80°C . El día de la hibridación se desnaturalizaron a 90°C por 10 minutos y se diluyeron con 75 μl de buffer de hibridación para obtener una concentración final de 1.5×10^6 dpm. (La concentración final de las ribosondas se obtuvo de una curva de saturación que realicé previamente) La Ribosonda para la Hibridación en solución se marcó con ^{32}P a una concentración final de 500 000 cpm/10 μg de RNA total/30 μl de buffer de hibridación.





Hibridación en Solución:

Para la hibridación en solución, usamos el ensayo protegido con ribonucleasas (Ribonuclease Protection Assay). Este ensayo utiliza una técnica altamente sensible desarrollada para detectar y medir la abundancia de un mRNA específico a partir de RNA total extraído de algún tejido en particular. La prueba utiliza la transcripción *in vitro* del antisentido de una sonda de mRNA marcada con ^{32}P que se hibrida en solución a su mRNA complementario. Posteriormente, las cadenas de RNA que no hibridaron son digeridas con ribonucleasa T1, 900U/350 μl de buffer de digestión, seguidos por remoción de las RNAsas con proteinasa K. Para obtener los complejos cRNA:mRNA se realiza una extracción con fenol y los fragmentos de cRNA se aíslan a través de electroforesis. Esta prueba es quizá la más exacta para medir mRNA ya que se requiere una secuencia perfecta de nucleótidos entre el mRNA y la sonda para obtener una protección completa del híbrido formado, contra las ribonucleasas que se utilizan para remover todo el RNA que no hibridó con su complementario, para mayor detalles de la técnica ver Ref. (64). La sonda de RNA que utilizamos en estos ensayos, es una sonda de 456 bp clonada en el laboratorio del Dr. Resko a partir de placenta de mona Rhesus, ha sido utilizada en numerosos trabajos y reconoce de manera específica a la citocromo P450*arom*. Como control intraensayo se utilizó una sonda de ciclofilina de 185 bp marcada con ^{32}P , 500 cpm/10 μg de RNA total.

Procedimiento de la Hibridación *In Situ*:

Hibridación *In Situ*:

La hibridación es un proceso por el cual dos cadenas de ácidos nucleicos de una sola cadena, se unen a través de uniones de hidrógenos para formar pares de bases complementarias. La técnica de Hibridación *In Situ* tiene los mismos principios de Biología Molecular que los usados en las técnicas de hibridación en solución o el Northern blot, que implica el uso de una sonda de cRNA que se hibrida al mRNA específico localizado en el tejido o la célula de interés. Sin embargo la hibridación *in situ*, ofrece la ventaja de combinar los resultados de Biología Molecular con la Histología del tejido o la célula bajo estudio de tal manera que es posible obtener la localización precisa y exacta de la o las células que producen el RNA mensajero de interés. Para realizar la hibridación *in situ* de los tejidos, generamos una ribosonda de 456 bp marcada con ^{33}P . La metodología utilizada en este trabajo, es una mezcla de diferentes metodologías (67, 68).

Preparación de las laminillas: Los tejidos se cortaron en un criostato enfriado a -20°C y se obtuvieron cortes de 10, 15 y 20 micras. Los cortes de tejido se montaron en laminillas cargadas positivamente para facilitar la adhesión de los tejidos. Las laminillas se fijaron por 20 minutos en PFD al 4%, posteriormente se secaron al vacío y se guardaron a -80°C hasta el día de la hibridación.

El día de la hibridación, las laminillas que no habían sido fijadas previamente, se fijaron en PFD al 4% por 20 minutos. Posteriormente se trataron con 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K, se acetilaron y posteriormente se prehibridaron en buffer de hibridación por 1 hora a 56°C . El buffer de hibridación contiene 65% de formamida, 50% de Sulfato de dextran, 100 mM de EDTA, 100 μM de DTT, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAt de levadura.

Las ribosondas sintetizadas el día anterior y marcadas con ^{33}P , se desnaturalizaron a 90°C por 10 minutos y posteriormente se diluyeron con buffer de hibridación a una concentración final de 1.5×10^6 dpm/75 μl . Cada una de las laminillas se hibridaron con 1.5×10^6 dpm de la respectiva ribosonda (sentido o antisentido) durante 18 horas a 56°C . Al día siguiente de la hibridación las laminillas se lavaron con buffer de astringencia (cloruro de sodio, citrato de sodio) a 60°C . Las cadenas de RNA que no hibridaron se digirieron con Ribonucleasa A. Para remover lo que se hubiese unido inespecíficamente, las laminillas fueron sometidas a lavados astringentes con una solución de cloruro de sodio + citrato de sodio. Finalmente, los tejidos se deshidrataron utilizando diferentes concentraciones de etanol (50 a 100%).

Para obtener la autoradiografía de la reacción, las laminillas se expusieron por 10 días a una película para autoradiografía de alta resolución (hiperfilm β -max).

Una vez obtenida la autoradiografía, las laminillas se cubrieron con una emulsión de granos de plata (NTB-3 emulsión de kodak) y se expusieron por 4 semanas. Este paso es muy importante, ya que los granos de plata revelan el sitio donde se encuentra la sonda ya hibridada. Una vez que se terminó el tiempo de exposición, se revelaron las laminillas con solución reveladora de Kodak, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se deshidrataron con diferentes concentraciones de etanol. Finalmente se cubrieron con un portaobjetos utilizando medio de montaje y se observaron al microscopio de luz y de campo oscuro para evaluar la reacción de hibridación. Como control positivo se hibridaron cortes de placenta de mona rhesus de 130 días de gestación con la ribosonda antisentido de la citocromo marcado con ^{33}P -UTP. Como controles negativos se hibridaron cortes de testículo, epidídimo y placenta con el sentido de la ribosonda, marcado con ^{33}P -UTP y/o buffer de hibridación con marca radiactiva, sin la ribosonda. La concentración de las ribosondas, la temperatura, el tiempo de hibridación, la temperatura para los lavados de astringencia y el tiempo de exposición de la autoradiografía a los granos de plata, se estandarizaron previamente.

III. Análisis Estadístico: La actividad de aromatasa y la concentración de mRNA en testículo, caput, corpus y cauda fue analizada a través de Analisis de la Varianza entre grupos seguido por la prueba de rangos múltiples de Newman Keull. Las diferencias en la concentración de la aromatasa vs la forma truncada de la enzima (transcriptos de 300 y 456 nt), así como las concentraciones de esteroides en vena espermática y vena periférica se analizaron utilizando t de student. Se realizó previamente, prueba de homogeneidad de las varianzas. Si las varianzas eran diferentes, los datos se transformaron logarítmicamente. Para el análisis de los datos se utilizó el programa para análisis estadístico, GB STAT(Dynamic Microsistems Inc., Silver Spring, MD).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS:

Radioinmunoanálisis de Hormonas Esteroides (RIA):

Las concentraciones de esteroides sexuales, determinados por RIA, estrona (46 ± 11 pg/ml vs. 11 ± 3 pg/ml), estradiol (66 ± 20 pg/ml vs. 12 ± 2 pg/ml), androstenediona (1.66 ± 0.64 ng/ml vs. 0.46 ± 0.09 ng/ml), y testosterona (22.68 ± 7.03 ng/ml vs. 8.54 ± 1.25 ng/ml), fueron significativamente mayores en vena espermática, comparadas con los valores obtenidos en sangre periférica y son mostrados en el cuadro 1 y en la Fig. 11.

Ensayo Radiométrico del $^3\text{H}_2\text{O}$ para medir la Actividad de Aromatasa:

El cuadro 2 y la Fig. 12 muestran los resultados obtenidos en este ensayo. No se encontraron diferencias entre la AA en testículo vs. el caput del epidídimo (259 ± 17 vs. 214 ± 31). Se encontró una diferencia significativa entre los valores encontrados en testículo y caput vs. los encontrados en corpus (83 ± 5) y cauda (44 ± 4) $p < 0.001$, ANOVA, seguido por Newman Keull. Para nuestra sorpresa, el músculo femoral (37.4 ± 5.5) también presenta AA en una concentración semejante a la encontrada en la cauda del epidídimo. Como era de esperarse la actividad de aromatasa en placenta fue muy alta ($22\ 285 \pm 405$). Los valores son el promedio y el error estándar de la media, con una $n=10$, (fig. 12).

Hibridación en solución (ensayo protegido con ribonucleasas):

Los resultados del ensayo protegido con ribonucleasas (RPA) son mostrados en el cuadro 3 y en la Fig. 13A y 13B. La sonda de 456 bp clonada de los exones II al V del gen de la citocromo P450aromatasa, protegió 2 transcritos en testículo. Uno que puede corresponder al transcripto completo de la aromatasa y otro más pequeño que de acuerdo a reportes previos de otros autores (38, 65) podría corresponder a una forma truncada de la aromatasa. Con base en estos antecedentes, utilizamos una sonda de 254 bp, clonada de los exones II y III, por el grupo del Dr. Charles Roselli, en OHSU. Esta sonda fue clonada para detectar únicamente al transcripto completo de la aromatasa. Los resultados pueden observarse en la Fig. 13B y demuestran la presencia de la forma completa de la aromatasa en testículo, corpus y cauda del epidídimo.

Hibridación *In Situ*:

Los resultados de la hibridación *in situ* en testículo, claramente demuestran la presencia del mRNA de la citocromo P450arom en el espacio intersticial, específicamente en las células de Leydig, donde la señal es fuertemente positiva. También encontramos una señal menos intensa (comparada con las células intersticiales) en el área basal que rodea a los túbulos seminíferos, específicamente en las espermatogonias y estadios tempranos de la espermatogénesis. En algunos túbulos pudimos detectar la señal en espermaticitos en estadio de paquiteno. También pudimos encontrar una señal de hibridación más débil en algunas células que por su situación dentro del túbulo y por su morfología corresponden a las células de Sertoli (Fig. 14). Sin embargo, durante el desarrollo de la técnica de la hibridación *in situ*, el tejido es sometido a temperaturas muy altas, así como a astringencias muy altas y bajas, lo cual hace difícil en algunos casos obtener una excelente resolución de las células. Como era de esperarse, se obtuvo una fuerte señal de hibridación en los cortes de placenta hibridados con la sonda antisentido marcada con ^{33}P (Fig. 15 A1, A2), en contraste con la ausencia de hibridación en los cortes de placenta hibridados con la sonda sentido marcada con ^{33}P (Fig. 15 A3, A4). No encontramos ninguna señal de hibridación cuando incubamos cortes de testículo con la ribosonda sentido marcada con ^{33}P (Fig. 15 B1-4) o con el buffer de hibridación sin marca radiactiva (Fig. 15 C1-4).

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

La Fig. 16 muestra cortes subsecuentes de testículo hibridados con la sonda antisentido (A, campo claro, B, campo oscuro, C, campo claro 100X o sentido (D, campo claro, E, campo oscuro, F, campo claro 100X) marcadas con ^{33}P . La señal de hibridación puede observarse en las células de Leydig, en las células germinales rodeando al túbulo, en las células de Sertoli, así como también en espermatoцитos en paquiteno.

Con respecto al epidídimo, los resultados obtenidos fueron muy difíciles de interpretar ya que el músculo liso que rodea al túbulo presenta una alta autofluorescencia. Sin embargo pareciera ser que en el caput, la señal se encuentra principalmente en las células basales y en las células del músculo liso que rodean al túbulo (Fig. 17 C, D, E). En corpus y cauda la señal pareciera estar en la cabeza de los espermatoцитos (Fig. 17 G-L).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN:

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, claramente demuestran que los testículos de los monos rhesus son el principal sitio de síntesis de estrógenos. Esta afirmación es apoyada en la evidencia de que las concentraciones de estrona y estradiol fueron significativamente mayores en la vena espermática comparada contra las concentraciones encontradas en sangre periférica.

Nuestros resultados también demuestran que los testículos y el epidídimo de los monos Rhesus metabolizan andrógenos a estrógenos ya que ambos presentan actividad de la aromataasa (AA), la cual disminuye paulatinamente del caput a la cauda del epidídimo. Estos hallazgos sugieren la presencia de una enzima activa en estos tejidos, cuya síntesis y/o actividad podrían estar reguladas de manera tejido-específica.

Nitta y cols. reportaron en ratones, la presencia de AA en células germinales, espermátides redondas y elongadas y en el flagelo de espermátides tardías (63). Este mismo grupo de investigación, trabajando con ratas, reportó la presencia de AA en espermatoцитos en paquitenio, en espermátides redondas, y en una mezcla de espermátides redondas y elongadas. Así mismo encontraron que la AA estuvo presente en espermatozoides recuperados del epidídimo y que esta actividad disminuía del caput a la cauda (62). Levallet y cols. de igual manera, demostraron la presencia de una proteína de 55 kDa en túbulos seminíferos de ratas maduras y en preparaciones de células germinales, así como AA en células germinales, espermatoцитos en paquitenio y en espermatozoides maduros (69). Este grupo también encontró que de acuerdo al estadio de maduración de las células germinales había una relación inversa entre la cantidad de mRNA y la actividad biológica de la enzima.

El papel fisiológico de los estrógenos sintetizados en el epidídimo no se conoce por completo, especialmente en primates no humanos. Sin embargo, en monos Rhesus, se han encontrado receptores para estrógenos (RE) en concentraciones altas en las células no ciliadas, abortivas, de los conductos eferentes (c. e.) y están presentes también en el epidídimo en concentraciones más bajas (58). La presencia de RE en estos tejidos podría significar que los estrógenos sirven para alguna función específica en los testículos y en el epidídimo de primates no humanos como sucede en otras especies animales.

Saunders y cols. reportaron en humanos y en monos, la presencia de β -RE en células de Leydig, células mioideas peritubulares y células germinales del testículo incluyendo, espermatogonias, espermatoцитos en paquitenio y células de Sertoli. También estuvieron presentes en el núcleo de las células epiteliales y del estroma en los conductos eferentes, epidídimo, vas deferens y vesículas seminales. Con respecto a los α -RE, se encontraron en las células no ciliadas de los conductos eferentes y escasamente en las células epiteliales, las basales y del estroma del epidídimo (70). Algo muy notable en ese trabajo fue que encontraron pérdida de la expresión del α -RE en la transición del epitelio de los c. e. a la cabeza del epidídimo lo cual contrastó con la persistencia de los β -RE. De igual manera, Mäkinen y cols. reportaron la presencia de β -RE en el núcleo de las espermatogonias, espermatoцитos y espermátides tempranas lo cual sugiere que los estrógenos a través de sus receptores, pueden estar involucrados en la maduración de los espermatozoides (71).

Los estrógenos aparentemente regulan la reabsorción de fluidos en el lumen de la cabeza del epidídimo, de acuerdo a los trabajos realizados por Hess y cols. los ratones sin RE no pueden reabsorber los fluidos del lumen de la cabeza del epidídimo, ya que presentan presión negativa asociada con dilatación del lumen del epidídimo y de la rete testis, además de atrofia testicular y trastornos de la espermatogénesis (72).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los estrógenos aparentemente modulan la expresión de algunas proteínas que participan directamente en la reabsorción de fluidos, y en la concentración de sales y iones. Tal sería el caso de la aquaporina-1, cuya expresión en los conductos eferentes es modulada por estrógenos. Fisher y cols. reportaron que la administración de dietilelbestrol (DES) en la etapa neonatal a ratas y monos marmoset, no solamente disminuye la síntesis de aquaporina-1, sino que también disminuye la reabsorción de fluidos en el epidídimo y la rete testis (73). Las células principales y las células apicales, que son las responsables de la reabsorción de líquidos, iones, proteínas y gota citoplásmica en el epidídimo, tienen receptores para estrógenos (74).

Otro estudio demostró que los estrógenos a través del α -RE son los responsables de la expresión del Intercambiador Na/H3 (NHE3), en los conductos eferentes y por lo tanto influye en la reabsorción y transporte pasivo de agua. Otro hallazgo importante en este mismo trabajo es el hecho de que los estrógenos aparentemente son necesarios para mantener la arquitectura celular en estas células epiteliales (75)

Oliveira y cols. utilizando el antiestrógeno ICI 182780 en ratas adultas, durante 100 y 150 días, encontraron dilatación del lumen de los túbulos seminíferos, de la rete testis y de los conductos eferentes, además de atrofia testicular e hipoespermatogénesis severa con predominio de células de Sertoli. Este compuesto inhibe tanto al α -RE como al β -RE. Estos resultados proporcionan claras evidencias del papel de los estrógenos en el tracto reproductor de los machos (76).

Los estrógenos en el epidídimo podrían participar en la maduración de los espermatozoides, específicamente en la adquisición de motilidad y la capacidad para fecundar un óvulo. Los espermatozoides que llegan al epidídimo son, inmóviles y no tienen la capacidad para fertilizar al óvulo. Estas 3 características las adquieren en su paso por el epidídimo. Hinrichsen y Blaquier demostraron en humanos, que únicamente los espermatozoides recuperados de la región de la cauda son capaces de penetrar ovocitos de Hamster (77). Cummings, demostró en ratas, que los espermatozoides recuperados de la cauda son fértiles, presentan reacción acrosomal y motilidad, en contraste con los espermatozoides recuperados del caput los cuales eran infértiles, no presentaron reacción acrosomal y la movilidad casi nula (78). Ya desde el siglo XIX, Hammar y Walker demostraron que los espermatozoides de la parte más distal del epidídimo (cauda) son más móviles comparados con los obtenidos de la región del caput. Young más tarde en 1929 y 1930 demostró que no únicamente aumentan su motilidad sino también su fertilidad. El reporte reciente de un ER en la cola de los espermatozoides en humanos, de alguna manera sugiere que los estrógenos, específicamente el 17- β -estradiol, pudieran participar directa o indirectamente en la motilidad de los espermatozoides (79).

Nuestros resultados de la hibridación in situ (ISH) demostraron como era de esperarse, una señal de hibridación muy intensa en las células de Leydig y una señal de hibridación menos intensa en las células germinales, espermatoцитos en paquiteno y en células de Sertoli. Estos hallazgos sugieren que los estrógenos aparentemente participan de manera activa en diferentes etapas de la espermatogénesis.

Por ejemplo, en ratones en los cuales se les anula experimentalmente el α -RE (α ERKO mouse), o ambos, $\alpha\beta$ -ERKO, presentan dilatación de los túbulos seminíferos, trastornos de la espermatogénesis, astenozoospermia y son incapaces de fertilizar óvulos *in vitro* (61, 80, 81). De igual manera los ratones modificados genéticamente y en los cuales se anula el gen que codifica para la citocromo P450arom (ARKO mouse), desarrollan infertilidad de manera progresiva con la edad. A pesar de que las concentraciones de gonadotropinas y testosterona son normales o ligeramente elevadas, presentan detención de la espermatogénesis en la etapa de espermiogénesis temprana (espermátides redondas y alargadas) sin cambios en las células germinales ni las de Sertoli. Al año de edad, estos ratones presentan disminución severa del número y de la movilidad de los espermatozoides maduros (oligoastenozoospermia), especialmente en la cauda del epidídimo. Algunos presentan ausencia de

TESIS CON
1997

espermatozoides (azoospermia). También presentan disminución muy importante o ausencia de cópula (82, 83).

De igual manera, el tratamiento de monos bonnet con el inhibidor de la aromatasas CGP 47645 por un periodo de 150 días provocó aumento de la Testosterona basal y nocturna, además de oligoastenozoospermia severa con detención de la espermatogénesis en etapa de espermiogénesis (84)

En humanos, se han reportado mutaciones de los genes que codifican para los RE y también para el de la aromatasas (85-87). Quizá las evidencias clínicas más contundentes para esta aseveración son los reportes de Morishima (86), quien reportó a un varón con ausencia genética de la aromatasas que es estéril y Smith y cols. quienes reportaron un varón estéril con una mutación en el gen del ER en el codon 157, que resultó en una proteína truncada con la consecuente insensibilidad a los estrógenos (85). A pesar de que la concentración de espermatozoides es normal en este paciente (25 millones/ml), la vitalidad es solamente del 18% y no reportaron la movilidad, la cual seguramente se encuentra alterada.

La deficiencia de la aromatasas en un segundo paciente, se acompañó de niveles sanguíneos bajos de estrógenos, oligoazoospermia severa (1 millón/ml e inmóvil) y detención de la espermatogénesis a nivel de espermatozocito primario, a pesar de que las concentraciones hormonales estaban en límites superiores normales (87). Estos 3 varones reportados hasta hoy, no solamente cursan con esterilidad sino además con todas las secuelas clínicas de la ausencia de estrógenos como son, la presencia de osteoporosis, ausencia de cierre de las epifisis, hiperlipidemias y alteración de la tolerancia a la glucosa. Estos datos sugieren que la acción de los estrógenos es necesaria para el desarrollo normal de la espermatogénesis en humanos.

Nuestros resultados también demuestran que los testículos y el epidídimo de los monos rhesus sintetizan el mRNA que codifica para la aromatasas. Nuestra sonda de 456 bp protegió 2 transcritos en ambos tejidos. Creemos que el transcripto protegido en 456 nt es el completo y el activo porque en el cerebro correlaciona también con la actividad de la aromatasas. El transcripto protegido más pequeño, de aproximadamente 300 nt, es más abundante que el de 456 nt, en testículo y epidídimo, y también se encuentra en el cerebro. Este transcripto, encontrado en la corteza cerebral, aparentemente no correlaciona con la actividad de aromatasas (65).

Se ha postulado que la expresión de la aromatasas en los diferentes tejidos, en humanos y otras especies animales, es regulada por el uso de múltiples promotores alternativos y exones I no traducidos (29, 88). Resko y cols. describieron la presencia de una forma más pequeña de aromatasas presente en la corteza cerebral de los monos Rhesus y la discordancia con la actividad de la enzima en este tejido (65). En contraste con estos resultados, Yamada-Mouri y cols., reportaron la presencia de AA en este mismo tejido(38).

Kato y cols, retomando los hallazgos anteriores, encontraron una forma truncada de la aromatasas a la cual llamaron aromatasas tipo cerebral. Esta forma truncada de la aromatasas, la cual no tiene los exones I-III, y por consiguiente, presenta pérdida de la zona de anclaje a la membrana del retículo endoplásmico, es expresada en cerebro, testículos y ovarios, es transcrita por el promotor 1f y algo muy importante es el hecho de que conserva los exones IX y X, que es donde se encuentra la región de unión del grupo heme y por lo tanto la actividad catalítica de la enzima (89).

Kao y cols, (90) expresaron esta forma truncada de la aromatasas en células CHO y la incubaron con NADPH, citocromo P450 reductasa y dilauroyl L--fosfatidilcolina, y encontraron que bajo estas condiciones in vitro, la forma truncada de la enzima es catalíticamente activa. Otro de los avances importantes en este trabajo es el hecho de que se necesitaron concentraciones 20 veces mayores del anticuerpo para inhibir la AA comparada con la aromatasas típica. Se ha postulado que esta forma truncada de la aromatasas pudiera no estar asociada al retículo endoplásmico y por lo tanto quizá estará

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

desconectada de su contraparte Redox, citocromo P450 NADPH-reductasa, una asociación necesaria para que ocurra la aromatización. Sin embargo a la fecha se desconocen las condiciones en que opera *in vivo* esta forma truncada de la enzima.

En los alcances de este trabajo, no sabemos cuál es la relación entre la forma truncada de la aromatasa y su contraparte la citocromo P450 reductasa, en testículo y muy especialmente en el epidídimo. Si estuvieran acopladas, podría ser activa. Quizá las concentraciones de los 2 transcritos y su proteína en el testículo y en el epidídimo no son estáticos sino están constantemente cambiando. Si esto fuera así, la habilidad de acoplamiento entre las dos partes del complejo enzimático, podría ser parte de un mecanismo regulatorio para limitar la producción local de estrógenos. Esta hipótesis es compatible con la idea de que pequeñas cantidades de estrógenos son requeridas en los diferentes estadios de la espermatogénesis pero la sobre expresión de la aromatasa conlleva a patología (91).

Entre los mecanismos de control del gen en los eucariotes se encuentran 1) Control de la frecuencia de la transcripción de un gen determinado 2) Controlando como el transcripto primario es cortado, empalmado y procesado y 3) activando, inactivando o compartamentalizando selectivamente, moléculas de una proteína específica después de que han sido elaboradas (92).

Por otra parte, Kitawaki y cols. quienes trabajaron con placenta humana, demostraron que la actividad catalítica de la aromatasa no necesariamente correlaciona con el nivel de proteína de la P450arom, ya que la catálisis puede ser afectada por diversos factores endógenos, tales como la concentración de NADPH-citocromo P450 reductasa, fosfolípidos y otros citocromos, la tasa de incorporación del grupo HEME, o activación posterior de la P450arom a nivel conformacional (93).

El hecho de que el RNAm de la aromatasa no correlaciona con la actividad de la enzima, en el epidídimo, podría indicar que la actividad de la aromatasa no está estrictamente regulada a nivel de la expresión del RNA y que otros mecanismos para esta regulación deben ser considerados. Otra explicación sería que factores presentes en el epidídimo pudieran modificar la actividad de la enzima.

Con base en todo lo anteriormente descrito, podríamos postular que los estrógenos producidos por el testículo y el epidídimo, participan en alguna función biológica. En testículo podrían regular algún o algunos estadios de la espermatogénesis y ejercer una regulación paracrina sobre las células de Leydig para modular la síntesis de testosterona. El hallazgo de un receptor de estrógenos en las células de Leydig apoyaría esta última hipótesis (74, 94, 95). En epidídimo, los estrógenos podrían participar, de manera directa o indirecta, en la maduración y la capacitación de los espermatozoides, (modulando la expresión de proteínas, o activando factores locales), así como también en la regulación de iones y fluidos que determinan en parte, la concentración y movilidad de los espermatozoides.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Bibliografía:

1. DeKretser DM, Risbridger GP, and Kerr JB. Basic endocrinology of the testis. En *Endocrinology*, DeGroot LJ, Besser M, Burger HG, Jameson JL, Loriaux DL, Marshall JC, Odell WD, Potts Jr JT and Rubenstein AH eds., Saunders, Philadelphia, pp. 2307-2335, 1995.
2. Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the testes and the male reproductive tract En: *Williams Textbook of Endocrinology*, Wilson JD, Foster DW eds., 8th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, pp 799-852, 1992.
3. Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews* 1991; 12(1): 45-77.
4. Yanaihara T, Troen P. Studies of the Human Testis. I. Biosynthetic Pathways for Androgen Formation in Human Testicular Tissue In Vitro. *J Clin Endocr* 1972; 34: 783-792.
5. Resko JA, Quadri SK, Spies HG. Negative feedback control of gonadotropins in male rhesus monkeys: effects of time after castration and interactions of testosterone and estradiol-17 β . *Endocrinology* 1977; 101: 215-24.
6. Hammond GL, Ruokonen A, Kontturi M, Koskela E, Vihko R. The simultaneous Radioimmunoassay of seven steroids in human spermatic and peripheral venous blood. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 16-27.
7. Wilson JD, George FW, Griffin JE. The hormonal control of sexual development. *Science* 1981; 211: 1278-1284.
8. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211:1294-1302.
9. Santen RJ. The testis. En *Endocrinology and Metabolism*, Felig Ph, Baxter JD, Frohman LA eds., McGraw-Hill, Inc. New York, pp. 885-972, 1995.
10. Dadoune J-P, Demoulin A. Structure and functions of the testis. En: *Reproduction in Mammals and man*. Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF eds, Ellipses, Oaris, pp. 227-255, 1993.
11. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963; 112: 35-52.
12. Muller CH. Germ Cell Development and fertilization. En *Textbook of Physiology*. Patton HD, Fuchs AF, Hille B, Scher AM, Steiner R eds., 21rst ed, W B Saunders, vol 2, cap 69, pp. 1343-1380
13. Fawcett DW. Male Reproductive system. En *A textbook of histology*. Fawcett DW and Raviola E, eds., 12th ed. Chapman & Hall, New York, pp. 768-815; 1994.
14. Fournier-Delpech S, Thibault C. Adquisition of sperm fertilizing ability. Epididymal maturation, accessory glands and capacitation. En: *Reproduction in Mammals and man*. Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF eds, Ellipses, Oaris, pp. 257-279, 1993
15. Schlegel PN, Chang TSK. The testis, epididymis, and ductus deferens. En: *Infertility in the male*. Lipzhults, LI, Howards SS, eds. 3rd ed, Mosby, pp. 190-224, 1997.
16. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45 (3 suppl): S116-24.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

17. Miller WL. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocr Rev* 1988; 9 (3): 295-318.
18. Payne AH. Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ Lyase in Leydig cells. *Biol Reprod* 1990; 42: 399-404.
19. Mendelson CR, Means GD, Mahendroo MS, y cols. Use of molecular probes to study regulation of aromatase cytochrome P-450. *Biol Reprod* 1990; 42: 1-10.
20. Nebert DW. P450 Genes: Structure, evolution, and regulation. *Ann Rev Biochem*, 1987; 56: 945-93.
21. Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system, *Endocrinology* 1978; 103:2283-2290.
22. Evans CT, Ledesma D, Schulz T, Simpson E, Mendelson C. Isolation and characterization of a complementary DNA specific for human aromatase-system cytochrome P-450 mRNA. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 6387-91.
23. Harada N. Cloning of a complete cDNA encoding human aromatase: Immunochemical Identification and sequence analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156: 725-32.
24. Yoshida N, Osawa Y. Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization. *Biochemistry* 1991; 30: 3003-3010.
25. Terashima M, Toda K, Kawamoto T, y cols. Isolation of a full-length cDNA encoding mouse aromatase P450. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285: 231-37.
26. Hickey GT, Krasnow JS, Beattie WG, Richards JS. Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3, 5-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 3-12.
27. Chen S, Besman M, Sparkes R, Zollman I, Klizak I, y cols. Human aromatase: cDNA cloning, Southern analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA* 1988; 7: 27-38.
28. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, y cols. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6:1-42.
29. Shozu M, Zhao Y, Bulun SE, Simpson ER. Multiple splicing events involved in regulation of human aromatase expression by a novel promoter, 1.6. *Endocrinology* 1998; 139 (4): 1610-7.
30. Simpson ER, Davis SR. Minireview : Aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis-some new perspectives. *Endocrinology* 142 (11): 4589-94.
31. Simpson ER, Michael MD, Agarwal VR, Hinshelwood MM, Bulun SE, Zhao Y. Cytochromes P450 11: expresión of the CYP19 (aromatase) gen: an unusual case of alternative promoter usage. *FASEB J* 1997 Jan; 11 (1): 29-36.
32. Carlone DL, Richards JS. Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3'5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 292-304.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

33. Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA. Steroidogenic factor-1 an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 776-86.
34. Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, y cols. Aromatase expresión in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:185-214.
35. Jenkins C, Michael D, Mahendroo M, Simpson E. Exon-specific northern analysis and rapid amplifications of cDNA ends (RACE) reveal that the proximal promoter II (PII) is responsible for aromatase cytochrome P450 (CYP19) expression in human ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 97: R1-6
36. Bulun SE, Rosenthal IM, Brodie AM, Inkster SE, Zeller WP, DiGeorge AM. Use of tissue-specific promoters in the regulation of aromatase cytochrome P450 gene expression in human testicular and ovarian sex cord tumors, as well as in normal fetal and adults gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1616-21.
37. Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem* 1993; 268: 19463-70
38. Yamada-Mouri N, Hirata S, Kato J. Existence and expression of the unstralated first exon of aromatase mRNA in the rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 58(2):163-66.
39. Kwon S, Hess RA, Bunick D, y cols. Rooster testicular Germ Cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biol Reprod* 1995; 53: 1259-1264.
40. O'Donnell, Robertson KM, Jones ME, Simpson E R. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 2001; 22(3): 289-318.
41. Kelch RP, Jenner MR, Weinstein RL, Kaplan SL, Grumbach MM. Estradiol and testosterone secretion by humans, simian, and canine testes, in males with hypogonadism, and in male pseudohermaphrodities with the feminizing testes syndrome. *J Clin Invest* 1972; 51(4): 824-30.
42. Harada N, Abe-Dohmae S, Loeffen R, Foidart A, Balthazart J. Synergism between androgens and estrogens in the induction of aromatase and its messenger RNA in the brain. *Brain Research* 1993; 622: 243-56.
43. Lephart ED. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain research-Brain research review* 1996; 22(1): 1-26.
44. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, y cols. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Review* 1994; 15: 342-55.
45. Simpson ER, Bulun SE, Nichols JE, Zhao Y. Estrogen biosynthesis in adipose tissue: regulation by paracrine and autocrine mechanism. *Journal of endocrinology* 1996; 150 Suppl:S51-7.
46. Zondek, B. Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of stallion. *Nature* 1934; 133:209-210.
47. Beall, D. The isolation of alpha-oestradiol and oestrone from horse testes. *Biochem J* 1940; 34: 1293-1298.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

48. Rabinowitz JL. The biosynthesis of radioactive 17β -estradiol. II. Synthesis by testicular and ovarian homogenates. *Arch Biochem Biophys* 1956; 64: 285-290.
49. Baggett B, Engel LL, Balderas L, Lanman G, Savard K, Dorfman RI. Conversion of C^{14} -Testosterone to C^{14} -estrogenic steroids by endocrine tissues. *Endocrinology* 1959; 64: 600-608.
50. Dorrington JH, Fritz IB, Armstrong DT. Control of testicular estrogen synthesis. *Biol Reprod* 1978; 18: 55-64.
51. Pomerantz DK. Effects of in vivo gonadotropin treatment on estrogen levels in the testis of the immature rat. *Biol Reprod* 1979; 21: 1247-1255.
52. Valladares LE, Payne AH. Induction of testicular aromatization by luteinizing hormone in mature rats. *Endocrinology* 1979; 105: 431-36.
53. Tsai-Morris, Chon-Hwa, Aquilano DR, Dufau ML. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology* 1985; 116: 38-46.
54. Inkster S, Yue W, Brodie A. Human testicular aromatase: Immunocytochemical and biochemical studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1941-47.
55. Westfahl P, Stadelman H, Horton L, Resko J. Experimental induction of estradiol positive feedback in intact male monkeys: Absence of inhibition by physiologic concentrations of testosterone. *Biol Reprod* 1984; 31: 856-62.
56. Ellinwood WE, Hess DL, Roselli C, Spies H, Resko J. Inhibition of aromatization stimulates luteinizing hormone and testosterone secretion in adult male rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 1088-1096.
57. Murphy JB, Emmott RC, Hicks LL, Walsh PC. Estrogen Receptors in the Human Prostate, Seminal Vesicle, Epididymis, Testis, and Genital Skin: A Marker for Estrogen-Responsive Tissues?. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 938-948.
58. West NB, Brenner RM. Estrogen Receptor in the Ductuli efferentes, Epididymis, and Testis of Rhesus and Cynomolgus Macaques. *Biol Reprod* 1990; 42: 533-538.
59. Cooke PS, Young P, Hess Ra, Cunha GR. Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules, and other male reproductive organs. *Endocrinology* 1991; 128: 2874-2879.
60. Greco TL, Furlow JD, Duello TM, Gorski J. Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal male mouse reproductive tracts. *Endocrinology* 1992; 130: 421-29.
61. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11162-11166
62. Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Bunick D. P-450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells: detection by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *J Androl* 1996; 17(6): 651-58.
63. Nitta H, Bunick D, Hess R, y cols. Germ Cell of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 1993; 132:1396-1401.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

64. Gilman, M. Ribonuclease Protection Assay. En: Current protocols in Molecular Biology , Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K eds., Greene and Wiley-Interscience, New York, vol 1, pp. 4.7.1-4.7.8, 1993.
65. Abdelgadir SE, Roselli CE, Choate JVA and Resko JA. Distribution of aromatase cytochrome P450 messenger Ribonucleic Acid in adult Rhesus Monkey Brains. Biol Reprod 1997; 57: 772-77.
66. Resko JA, Roselli CE. Brain steroid synthesis and metabolism. Neuroprotocols: Methods in Neurosciences 1992; 1: 27-34.
67. Angerer LM, Stoler MH, Angerer RC. In situ Hybridization with RNA probes: An annotated recipe. In situ Hybridization, applications to Neurobiology; Valentino KL, Eberwine JH, Barchas JD eds., Oxford University Press, Inc, pp. 42-70.
68. Altar CA, Ryan S, Abood M, Eberwine JH. In Situ Hybridization: Standard procedures and Novel approaches. En Gene probes, Methods in Neurosciences, Conn M ed., Academic Press, INC, San Diego Cal, Vol. 1, pp. 238-281.
69. Levallet J, Bilinska B, Mitre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. Biol Reprod 1998; 58: 919-926.
70. Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, y cols. Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. Mol Hum Reprod 2001; 7(3):227-36
71. Mäkinen S, Mäkelä S, Weihua Z, Warner M, Roselund B, Salmi S. Testis and spermatogenesis. Localization of estrogen receptors alpha and beta in human testis. Mol Hum Reprod. 2001;7(6):497-503.
72. Hess RA, Bunick D, Lee KO, y cols. A role for estrogens in the male reproductive system. Nature 1997; 390: 509-512.
73. Fisher JS, Turner KJ, Fraser HM, Saunders PT, Brown D, Sharpe RM. Immunoexpression of aquaporin-1 in the efferent ducts of the rat and marmoset monkey during development, its modulation by estrogens, and its possible role in fluid resorption. Endocrinology 1998; 139:3935-3945.
74. Hess RA, Gist DH, Bunick D, y cols. Estrogen receptor (α & β) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. J Androl 1997; 18:602-11.
75. Zhou Q, Clarke L, Nie R, y cols. Estrogen action and male fertility : Roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(24):14132-7.
76. Oliveira CA, Carnes K, Franca LR, Hess RA. Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. Biol Reprod 2001; 64: 913-920.
77. Hinrichsen MJ, Blaquier JA. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. J Reprod Fertil 1984; 72(2):509-14.
78. Cummins JM. Effects of epididymal occlusion on sperm maturation in the hamster. J Exp Zool 1976; 197 (2): 183-90.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

79. Durkee TJ, Mueller M, Zinaman M. Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 1288-1295.
80. Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, y cols. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 1996; 137: 4796-4805.
81. Couse JF and Korach KS. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 1999; 20(3): 358-417.
82. Robertson KM, O'Donnell L, Jones MEE, y cols. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7986 - 7991.
83. Robertson KM, Simpson ER, Lacham-Kaplan O, Jones ME. Characterization of the fertility of male aromatase knockout mice. *J Androl* 2001; 22(5):825-30
84. Shetty G, Krishnamurthy H, Krishnamurthy HN, Bhatnagar AS, Moudgal NR. Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). *Steroids* 1998 Jul-Aug; 63(7-8):414-20
85. Smith EP, Boyd J, Frank GR, y cols. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994; 331: 1056-61.
86. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80 (12): 3689-98.
87. Carani C, Qin K, Simoni M, y cols. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1997; 337: 91-95.
88. Sebastian S, Bulun SE. Genetics of endocrine disease. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (Aromatase) gene revealed by the human genome project. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (10): 4600-2.
89. Kato J, Yamada-Mouri N, Hirata S. Structure of aromatase mRNA in the rat brain. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997; 61: 381-385.
90. Kao Y-E, Higashiyama T, Yarborough C, Osawa Y, Chen S. Functional characterization of 102-amino acid - deleted form of human aromatase (Δ 102-aromatase). *Steroids* 1999; 64: 422-29.
91. Control of gene expression en: *Molecular Biology of the Cell*. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JM eds. 3a ed. Parte II. Molecular Genetics, Garland Science, New York; 1294 pp., 1994.
92. Fowler KA, Gill K, Kirma N, Dillehay DL, Tekmal RR. Overexpression of aromatase leads to development of testicular leydig cell tumors : an in vivo model for hormone-mediated Testicular Cancer. *Am J Pathol* 2000 Jan; 156(1):347-53
93. Kitawaki J, Inoue S, Tamura T, y cols. Increasing aromatase cytochrome P-450 level in human placenta during pregnancy: Studied by immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Endocrinology* 1992; 130: 2751-2757.

TESIS CCM
FALLA DE ORIGEN

94. Shetty G, Krishnamurthy H, Krishnamurthy HN, Bhatnagar S, Moudgal RN. Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 61(3-6):157-66

95. Abney TO. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids* 1999; 64(9):610-17.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Concentración de esteroides en la vena espermática y sangre periférica

Esteroides promedio \pm EEM	Vena Espermática promedio \pm EEM	Vena Periférica
Testosterona *	22.68 \pm 7.03 ng/ml	8.54 \pm 1.25 ng/ml
Androstenediona	1.66 \pm 0.64 ng/ml	0.46 \pm 0.09 ng/ml
Estradiol **	66 \pm 20 pg/ml	12 \pm 2 pg/ml
Estrona **	46 \pm 11 pg/ml	11 \pm 3 pg/ml

* $p < 0.0001$, t de student, entre las concentraciones en vena espermática y Periférica

** $p < 0.001$, t de student, entre las concentraciones en vena espermática y Periférica

Cuadro 2. Actividad de Aromatasa en Testículo y Epidídimo.

Tejido promedio \pm EEM	fmoles $^3\text{H}_2\text{O}/\text{mg}/\text{proteína}/\text{hora}$
Testículo *	259 \pm 17
Caput *	214 \pm 31
Corpus **	83 \pm 5
Cauda **	44 \pm 4
Placenta	22 285 \pm 405
Músculo femoral	37.4 \pm 5.5

* NS Entre Testículo vs. caput (epidídimo)

** $p < 0.001$ entre testículo vs. corpus y cauda, entre caput vs. corpus y cauda. ANOVA, Newman Keull.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Resultados del Ensayo Protegido con Ribonucleasas en Testículo y Epidídimo de monos Rhesus.

Tejido	transcriptos protegidos	fg P450 arom/ μ g rRNA
Testículo 300	455 51.0 ± 5.8	$40.1 \pm 1.9^*$
Caput 300	455 $4.4 \pm 0.3^{**}$	ND
Corpus 300	455 $13.2 \pm 0.3^{**}$	ND
Cauda 300	455 $13.9 \pm 1^{**}$	ND

ND = no detectable

* $p < 0.01$, t de student, entre el transcripto completo y la forma truncada de la enzima

** $p < 0.01$, ANOVA, Newman Keull, entre la concentración de la forma truncada en el caput, comparado vs. corpus y cauda.

TESIS CON

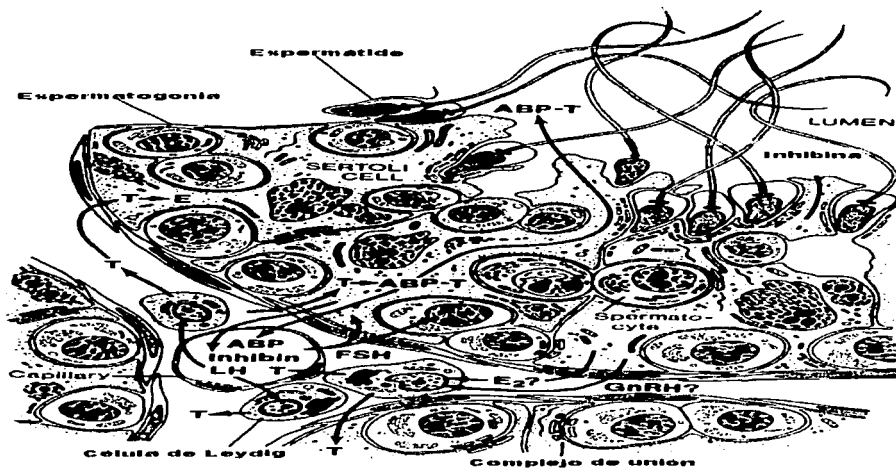
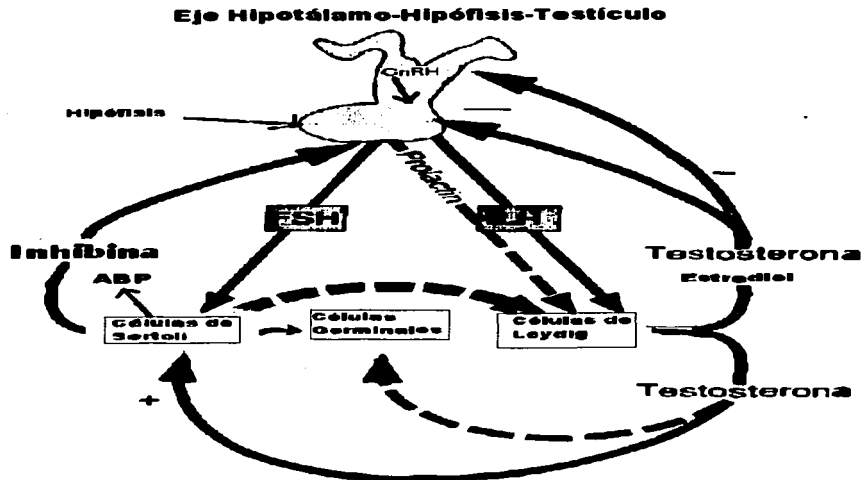


Fig. 1. Regulación endocrina, paracrina y autocrina de la espermatogénesis por las hormonas hipotalámicas, hipofisiarias y testiculares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

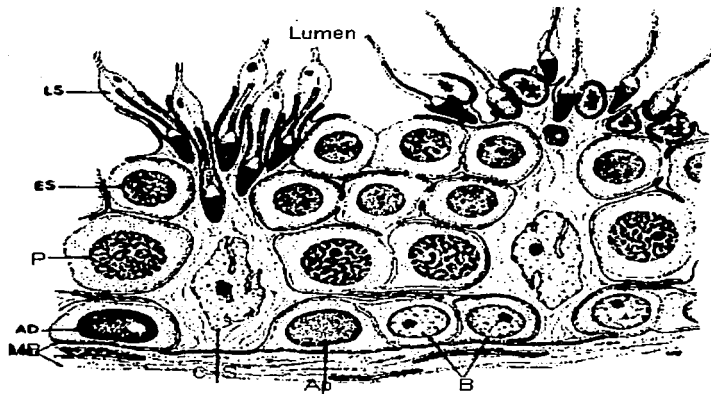


Fig. 2. Epitelio seminífero. El compartimento basal constituido por la membrana basal (MB), las células de Sertoli (CS), espermatogonias A pálidas (Ap), espermatogonias B (B), espermatocitos en paquíteno (P). Compartimento adluminal constituido por estadios más avanzados de la espermatogénesis. Espermatíde temprana (ES), espermatíde tardía (LS).

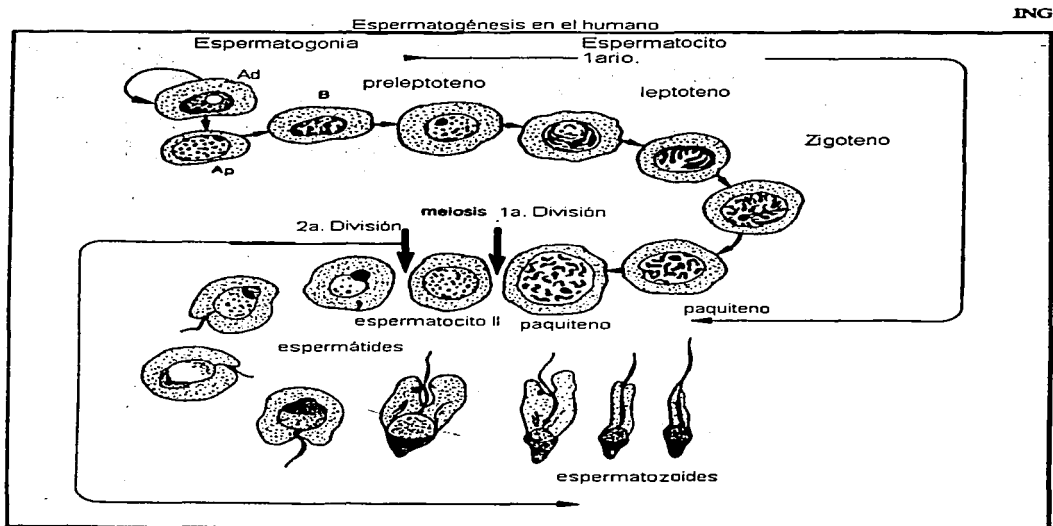


Fig. 3. Muestra la secuencia en la diferenciación de las células del epitelio seminífero durante la espermatogénesis en el humano.

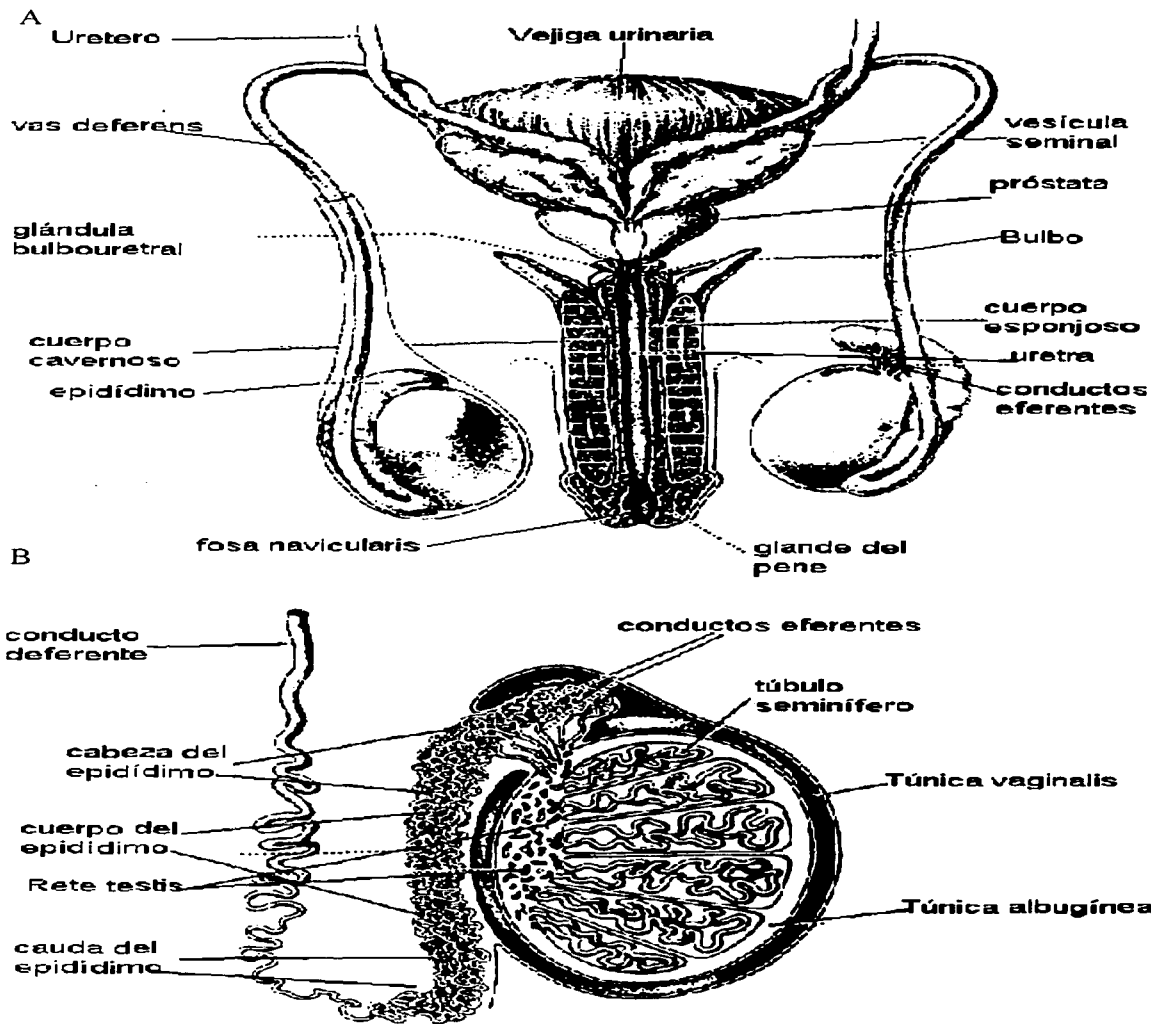


Fig. 4A. Muestra la relación anatómica del epidídimo con los testículos y el tracto reproductor masculino.
 Fig. 4B. Muestra el epidídimo y sus divisiones anatómicas. Los c.e. desembocan en el caput y la cauda se continúa para formar el conducto deferente

Cortes de Epidídimo

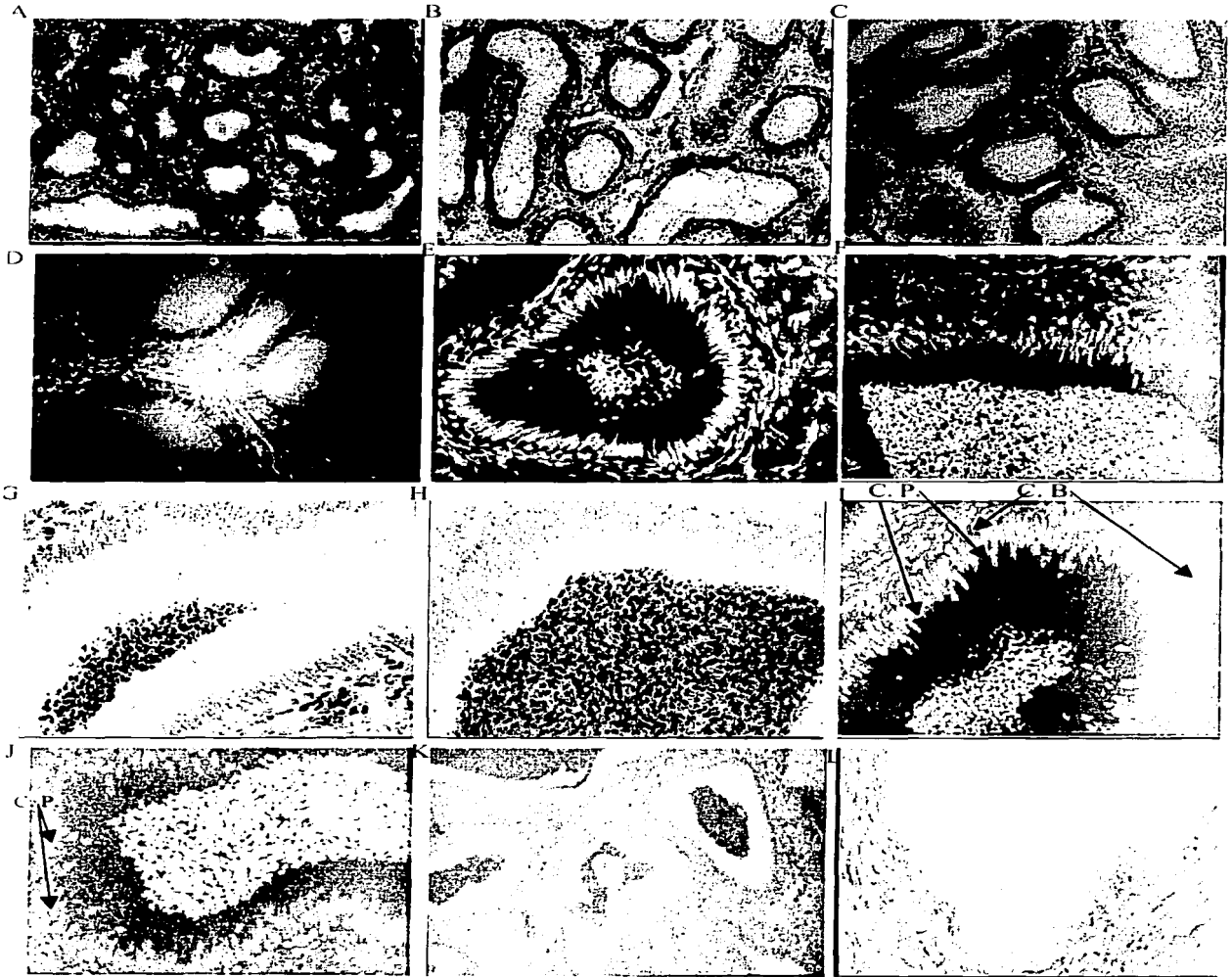


Fig. 5. A). Cond. Eferentes. B) Transición C. E. – Caput. C, D, E,). Caput. F). Transición Caput-Corpus, G, H, I.). Corpus, J). Transición Corpus-Cauda, las células principales adquieren forma cuboidea K). Cauda, L). Conducto deferente. En la luz del túbulo pueden observarse espermatozoides.

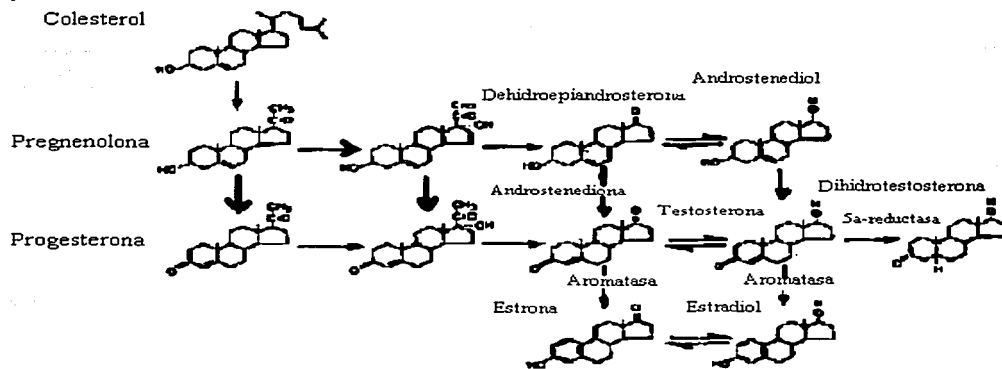


Fig. 6. Esquema de la biosíntesis de esteroides. La vía predominante en testículo es la vía Δ^5 .

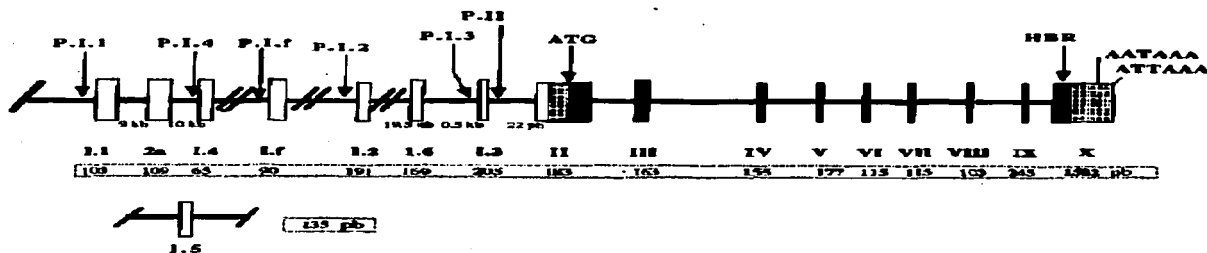


Fig. 7. Representación esquemática del gen CYP19 humano. La región codificante comprende los exones II al X, las barras abiertas representan los exones I no traducidos con sus respectivos promotores, y el tamaño de cada exón. // = tamaño desconocido, ATG = sitio de inicio de la transcripción, HBR = región de unión del grupo heme. En el exón 10 puede apreciarse el sitio de poliadenilación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Testículo y epidídimo de monos Rhesus

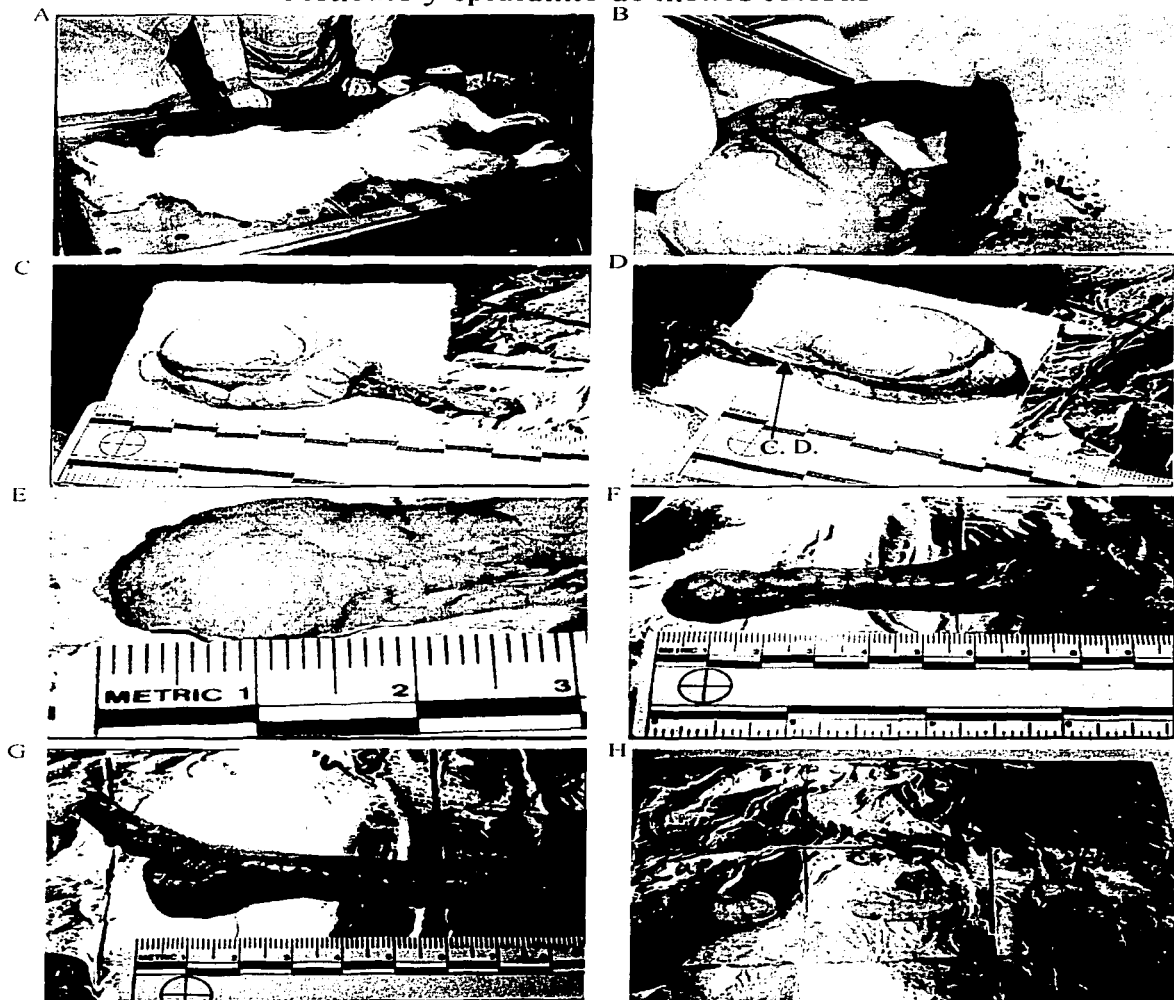


Fig. 8. A). Mono Rhesus, B) Vena Espermática. C). Testículo y epidídimo. D). Conducto Deferente. E). Cauda del epidídimo, F, G y H). Epidídimo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

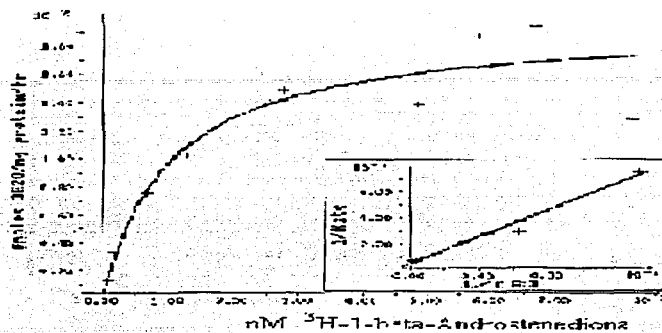


Fig. 9. Muestra la curva de saturación en microsomas de testículo de monos Rhesus. Dilución 1:100, $K_m = 100.4 \text{ nM}$, Usando Androstenediona marcada con Tritio como Substrato.

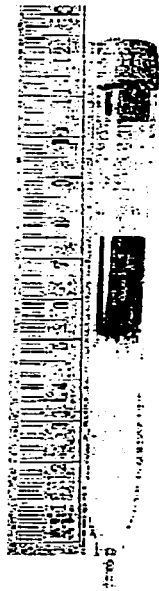


Fig. 10. Columna empacada con resina de intercambio iónico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

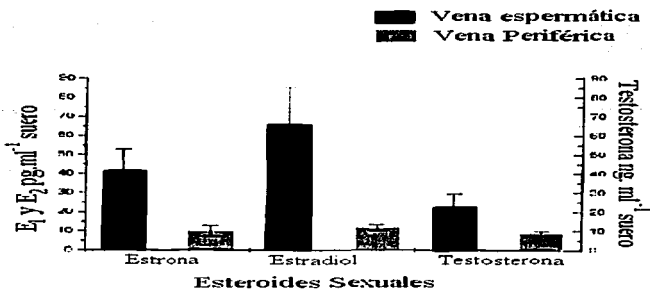


Fig. 11. Concentración de esteroides en Vena Espermática y Vena Periférica. $P < 0.001$ t de student.

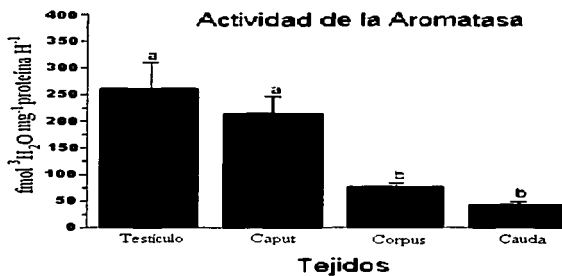


Fig. 12. Actividad de la aromatasa en Testículo y Epidídimo. La AA en el Testículo y Caput del epidídimo, fue significativamente mayor comparada contra el cuerpo y la cauda del epidídimo. $P < 0.001$, ANOVA, seguido de Newman Keull

Citocromo P450 aromatasa en testículo y Epididimo de Monos Rhesus

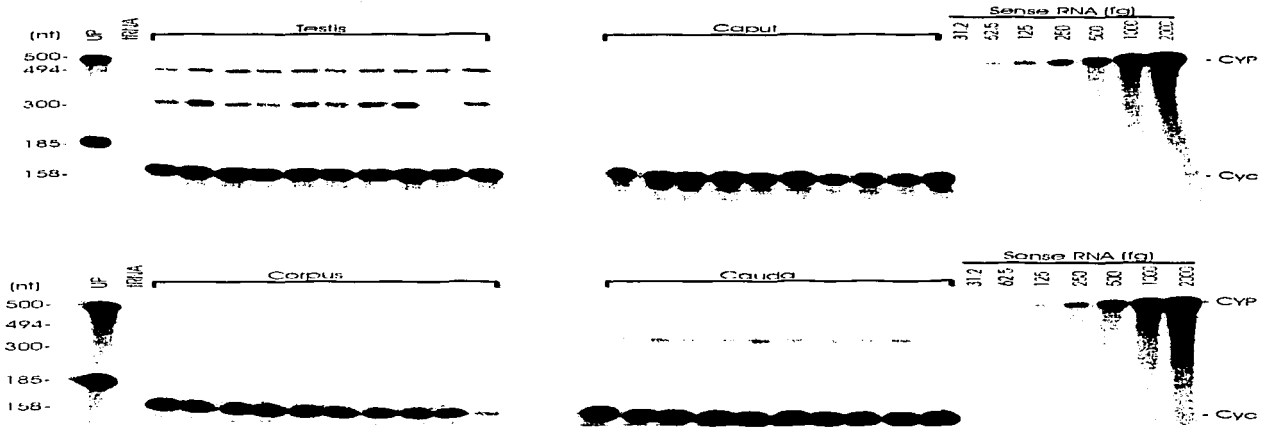


Fig. 13A. Resultados de la hibridación en solución, en testículo y epidídimo, utilizando la ribosonda de 456bp En testículo protegí 2 mRNA. En epidídimo puede observarse la forma truncada de la enzima.

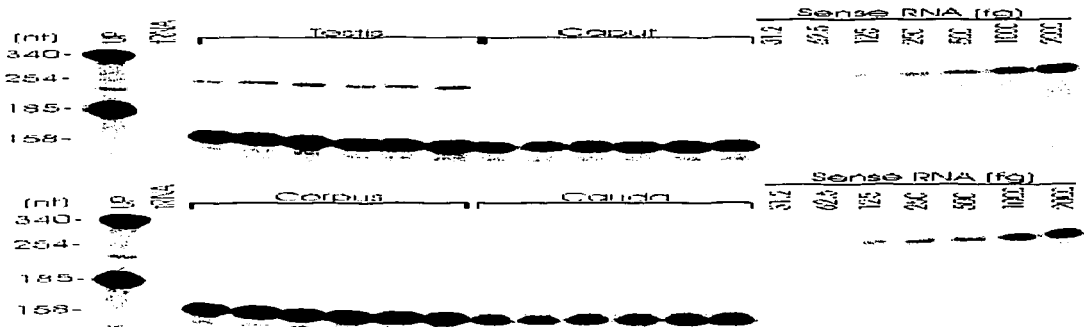
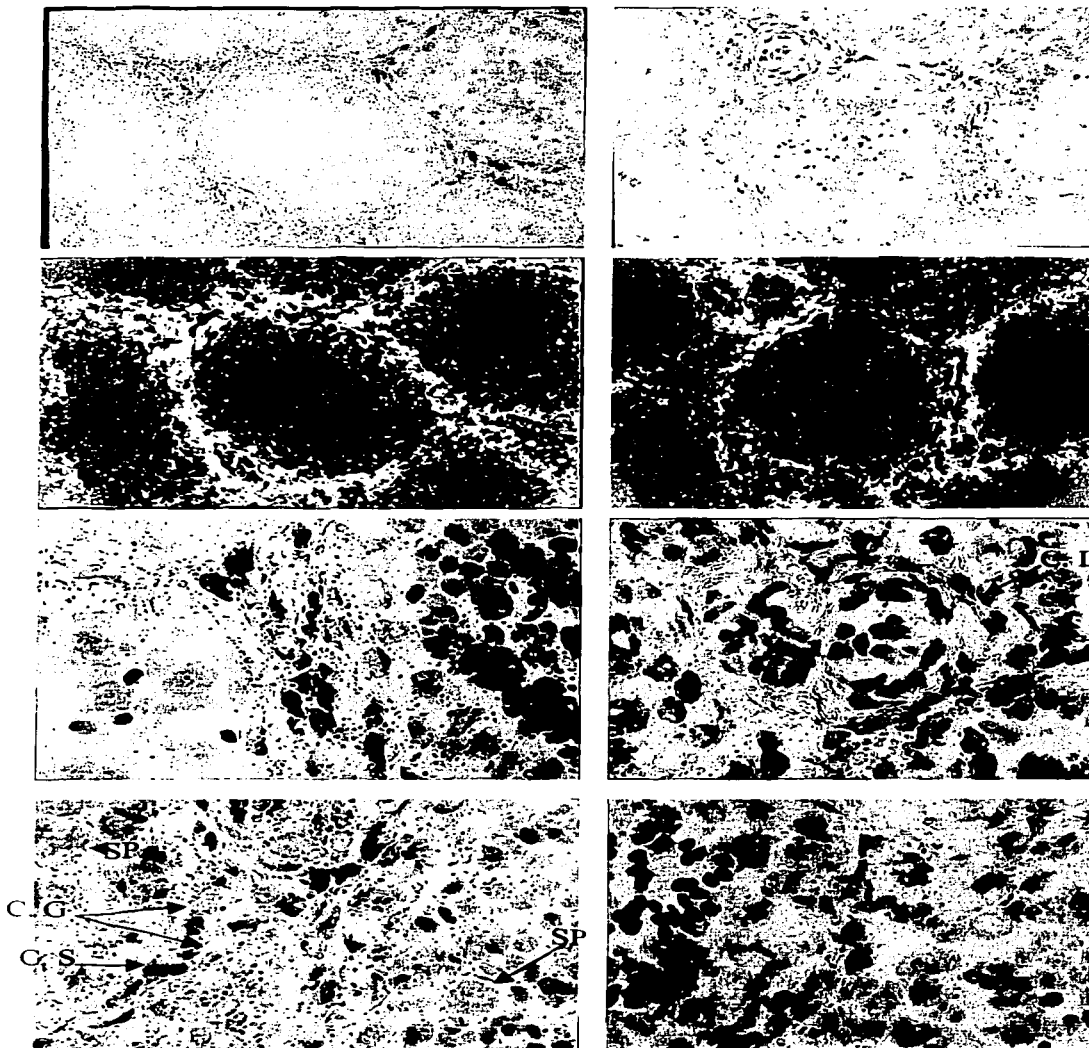


Fig. 13B. Resultados de la hibridación en solución, en testículo y epidídimo, utilizando la ribosonda de 254bp, clonada de los exones II y III. Puede observarse el transcrito completo de la aromatasa en testículo, corpus y cauda del epidídimo.

Cortes de Testículo hibridados con la Ribosonda antisentido



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 14. La señal de hibridación se observa principalmente rodeando los túbulos seminíferos y disminuye a medida que avanza la espermatogénesis. LC= Células de Leydig, CS= Células de Sertoli, CG=Células germinales, SP= espermatozoides en paquíteno.

CONTROLES

TESIS CON

A. Cortes de placenta

B. Cortes de testículo

C. Cortes de testículo

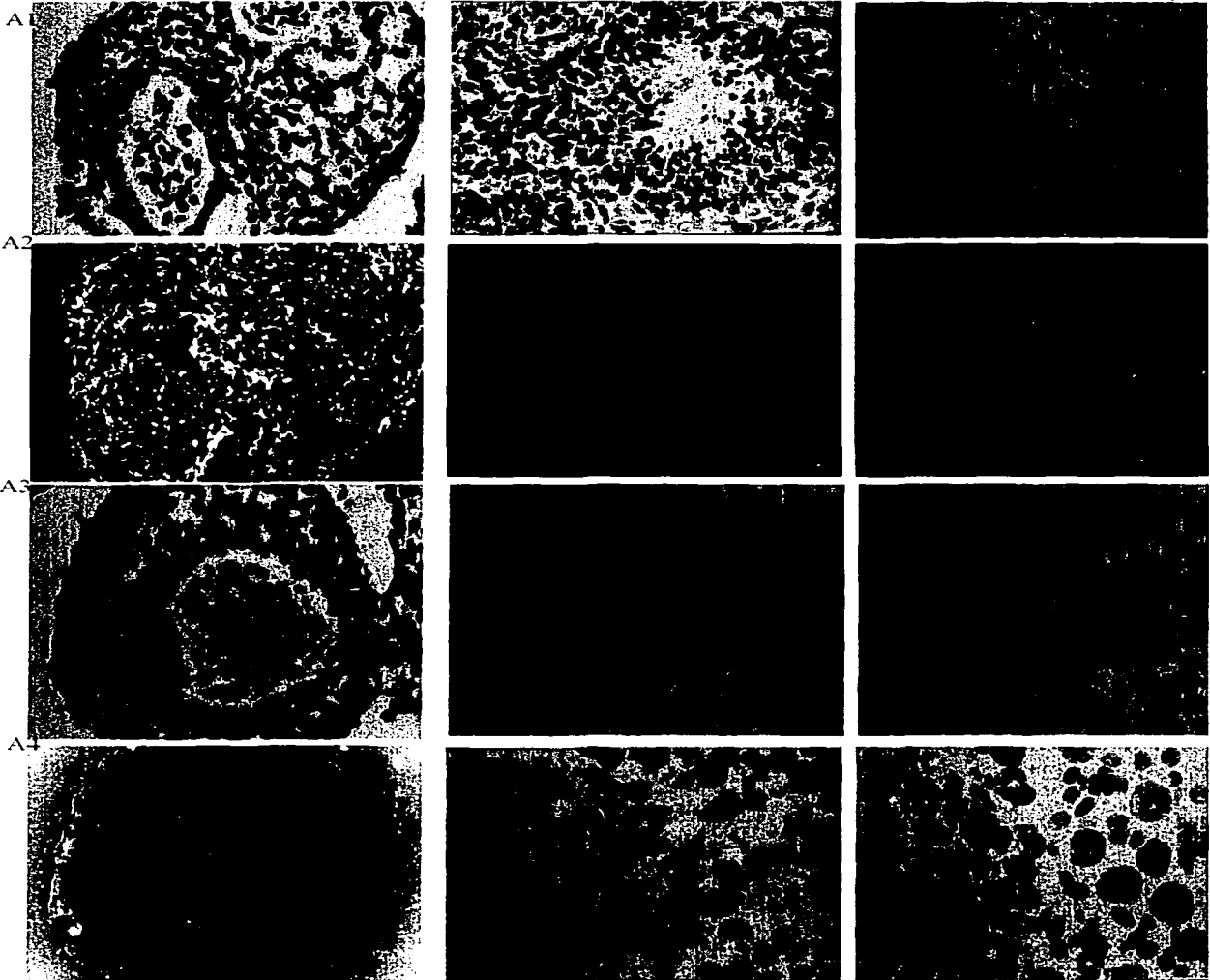


Fig. 15 A. Cortes de placenta hibridados con la sonda antisentido (A1 y 2) y con la sonda sentido (A3 y 4). B. Cortes de testículo hibridados con la sonda sentido marcada con ^{33}P . C. Cortes de testículo hibridados con buffer de hibridación marcado con ^{33}P sin ribosonda.

CONTROLES

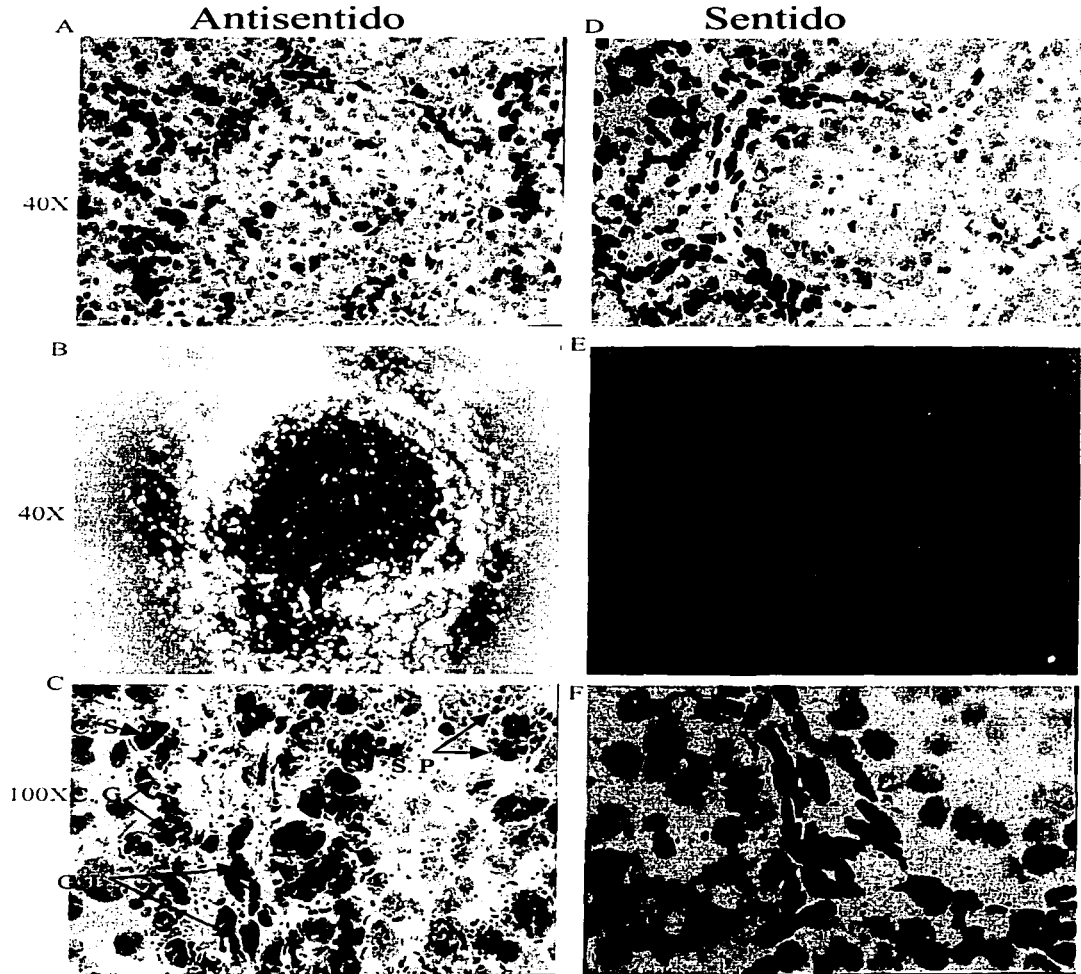


Fig. 16. Cortes de testículo hibridados con la ribsonda Antisentido y Sentido marcados con ³³P. A y D campo claro, B y E campo oscuro. C y F campo claro 100X. Puede observarse la señal de hibridación muy aparente en las células de Leydig y las células germinales.

Cortes de Epidídimo Hibridados con la Ribosonda antisentido marcada con ³³P

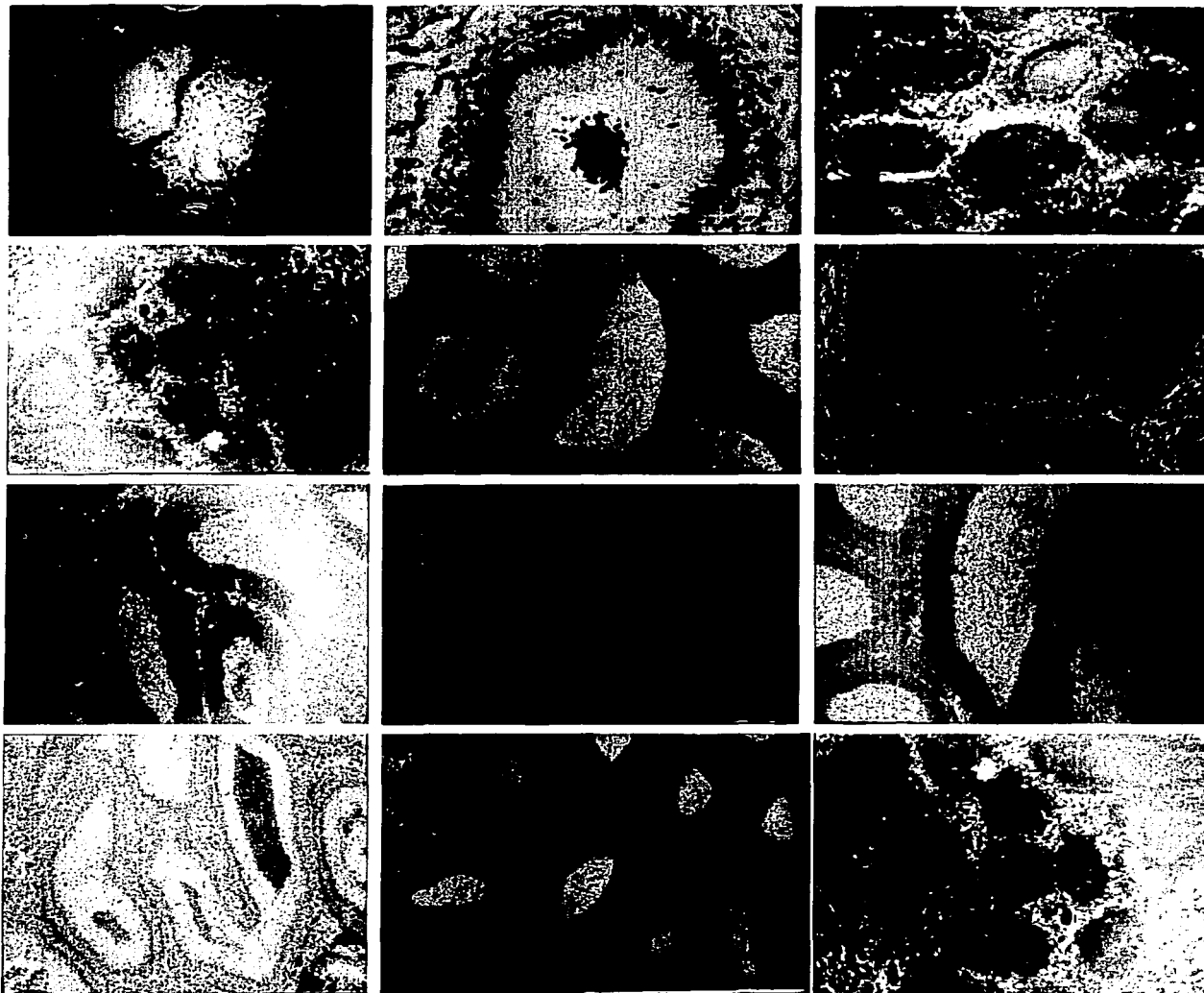


Fig. 17. Muestra resultados de la hibridación In Situ en caput, corpus y cauda del epidídimo.

Cytochrome P450 Aromatase in Testis and Epididymis of Male Rhesus Monkeys

Ada Celia Pereyra-Martinez, Charles E. Roselli, Henry L. Stadelman, and John A. Resko

Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Oregon Health Science University, Portland, OR

To understand the role of estrogen in testicular and epididymal function of rhesus monkeys, we measured steroids in the spermatic and peripheral venous circulation and aromatase activity and its mRNA in testis and epididymis. Testosterone, estradiol-17 β , and estrone, but not androstenedione, were elevated in the spermatic vein serum compared to the peripheral circulation. Aromatase activity in testis and in caput epididymis (259 ± 16 [SEM] vs 274 ± 47 fmol of $^3\text{H}_2\text{O}$ /mg of protein/h [$n = 10$], respectively) was significantly higher ($p < 0.01$) than in corpus and cauda (124 ± 28 and 113 ± 33 fmol of $^3\text{H}_2\text{O}$ /mg of protein/h [$n = 10$], respectively). In the ribonuclease protection assay, two P450_{arom} mRNA transcripts were identified in testis and epididymis. One corresponded with the aromatase full-length transcript and the other was a truncated isoform. The latter was significantly more abundant than the former ($p < 0.01$). Our results demonstrate that the monkey testis and, to a lesser extent, the epididymis can aromatize androgens. However, in the epididymis, like in some areas of the brain, there was a discrepancy between the aromatase activity and the mRNA. The fact that P450_{arom} mRNA and aromatase activity do not correlate in the epididymis may indicate that aromatase activity is not strictly regulated at the level of RNA expression and that other mechanisms for this regulation should be considered.

Key Words: Messenger RNA; aromatase; rhesus monkey; testis; epididymis.

Introduction

Estrogens are synthesized in tissues of many vertebrates including mammals, birds, reptiles, amphibians and fish (1). The synthesis of estrogen from androgen is catalyzed by an enzyme complex that is comprised of a cytochrome P450 aromatase (P450_{arom}) and a flavoprotein NADPH-

cytochrome P450 reductase. In those species in which it has been studied, aromatase activity (AA) and its messenger RNA have been found in many different tissues [reviewed by Simpson et al. (2)], including adipose tissue, placenta, granulosa cells of the ovaries, different areas of the brain, and Sertoli and Leydig cells of the testes (3-5). Recent studies have also demonstrated immunoreactive cytochrome P450_{arom} in testicular germ cells from several animal species (4,6,7). Immunostaining first appeared in pachytene spermatocytes (4,7) and in round spermatids, elongated spermatids, and flagella of late spermatids (6,7). Immunostaining was also found in rat testicular spermatozoa (4) and avian epididymal sperm (7).

In addition to the above, male mice which lack a functional aromatase gene (*ArKO*) (8) or α -estrogen receptors (*ER α -KO*) (9) have impaired spermatogenesis, which is age dependent (10). Other direct actions of estrogen mediated through β -receptors that are found in spermatogonia, pachytene spermatocytes, and Sertoli Cells may also be involved (11). Thus, it appears that local expression of aromatase and the presence estrogen receptors both α and β are necessary for germ cell development. In a recent study, it has been shown that estrogen action in efferent ductules is, also, necessary for normal testicular function (12).

Although the capacity of the testis to produce estrogens has been demonstrated in many different animal species, including men (13), the distribution of P450_{arom} among male reproductive tract tissues has not been reported in nonhuman primates. The purpose of this work was to investigate the capacity of the testis and three segments of the epididymis (caput, corpus, and cauda) to aromatize androgens in nonhuman primates; to compare aromatase activity with the expression of P450_{arom} mRNA in the rhesus monkey testis and epididymis; and to quantify estrogens and their precursors in serum from the spermatic vein and compare these quantities with amounts found in blood obtained through a cardiac catheter (peripheral blood).

Results

Aromatase activity (fmol of $^3\text{H}_2\text{O}$ /mg of protein/h) was similar in the testis and in the caput epididymis (259 ± 16 [SEM] vs 274 ± 47 fmol of $^3\text{H}_2\text{O}$ /mg of protein/h [$n = 10$], respectively), but it was significantly higher ($p < 0.01$) in both of these tissues compared to the corpus and

Received August 14, 2001; Revised September 27, 2001; Accepted September 27, 2001.

Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Dr. Ada C. Pereyra-Martinez, Escuela de Medicina, Universidad Autonoma de Chiapas, Calle central y10a Sur S/N, Col. Centro, Tuxtla Gutierrez, Chiapas 29000. E-mail: pereyram@yahoo.com

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

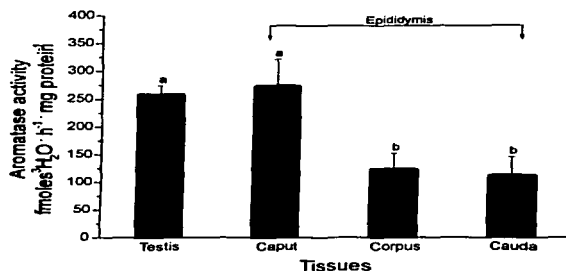


Fig. 1. Aromatase activity in testis and regions of epididymis (caput, corpus, and cauda) from rhesus monkeys ($n = 10$). Data are presented as means (bars) \pm SEM (vertical lines). Bars marked with dissimilar letters differed significantly ($p < 0.01$, analysis of variance [ANOVA], followed by a Newman-Keuls multiple range test). The ^3H -water assay was performed on sonicated microsomal pellets (diluted 1/100 for testicular and 1/200 for epididymal tissues) derived from homogenized tissues. See Materials and Methods for other details.

cauda epididymis (124 ± 28 and 113 ± 33 fmol of $^3\text{H}_2\text{O}$ /mg of protein/h [$n = 10$], respectively) (Fig. 1).

Figure 2A is a representative phosphoimage of the amount of P450_{arom} mRNA in the testis and epididymis as well as in the placenta (positive control) and muscle (negative control). This assay in which we used 10 μg of total RNA protected two mRNA transcripts in testis, one transcript was the expected size of 455 nucleotides (nt) and a second transcript was approx 300 nt long. In the epididymis, however, the 455-nt transcript was not detectable on the phosphoimage even after exposure for 78 h (data not shown), but small amounts of the truncated form appeared on the gels. Because of these results, in a second experiment, we analyzed 50 μg of total RNA in various parts of the epididymis obtained from 4 of the 10 males used in Fig. 2A; these results are shown in Fig. 2B. When larger amounts of RNA were used, both transcripts (455 and 300 nt) were detectable.

Table 1 gives the data for P450_{arom} mRNA (10 μg of total RNA analyzed) in testis and epididymis. The mean concentration of the 455-nt transcript in testis was significantly lower than that observed for the 300-nt one (40.1 ± 1.9 [SEM] vs 51.0 ± 5.8 fg/ μg of total RNA, respectively) ($p < 0.01$, $n = 10$). In the epididymis, only the 300-nt transcript was protected. The mean concentrations of this transcript/ μg of total RNA were higher in the corpus and cauda epididymis compared to the caput ($p < 0.01$).

In a second experiment, we increased the amounts of total RNA used in the protection assay from 10 to 50 μg . The data obtained from this experiment clearly showed that both the 455- and 300-nt transcripts were present in all segments of the epididymis when greater amounts of total RNA were used in the assay (Fig. 2B).

Table 2 gives the mean concentrations of estradiol-17 β (E_2), estrone (E_1), androstenedione, and testosterone in sera from the spermatic vein and the heart ($n = 10$). Significantly higher concentrations of these steroids were found in the spermatic vein compared to the peripheral circulation ($p < 0.01$), except for androstenedione.

Discussion

Our results clearly demonstrate that the testes of rhesus monkeys secrete estrogens because the concentrations of both E_1 and E_2 were significantly higher in serum from the spermatic veins, which drain the testes, compared to the peripheral venous circulation.

Our data also show that both the testis and epididymis are capable of aromatization. The physiologic role of estrogen synthesized in the epididymis is not known, especially in nonhuman primates. However, in rhesus males, estrogen receptors (ERs) are found in high concentrations in the nonciliated absorptive cells of the ductuli efferentes and are present in relatively low amounts in the epididymis (14). The presence of ERs in these tissues could mean that estrogen serves some function in the testis and epididymis of nonhuman primates as it does in other species. For example, mice in which the functional aromatase gene has been experimentally deleted have impaired spermatogenesis (8). A similar result has been observed in mice in which the ER α has been deleted (9). It appears that estrogens regulate reabsorption of luminal fluids in the caput epididymis of mice (12). Males lacking the ER α cannot reabsorb luminal fluids; hence, there is back pressure associated with testicular atrophy (12). In addition, testicular cells of rats, such as spermatogonia, pachytene spermatocytes, and Sertoli cells, all contain ER β , which suggests that estrogens are involved in sperm maturation (11).

In men, naturally occurring mutations of ER and aromatase genes have been reported (15–17). In one man with a mutated ER, gonadotropins and estrogen concentrations were elevated in the systemic circulation (15). Even though sperm counts were normal in this case, infertility occurred because of low sperm viability (15). Aromatase deficiency in a second man was accompanied by low levels of estrogen in the systemic circulation and low sperm count, and spermatogenesis was arrested at the level of the primary spermatocyte (16). These data suggest that the action of estrogen is required for human spermatogenesis.

We also found P450_{arom} mRNA in the testis in which our 455-bp monkey probe protected two mRNA transcripts 455 and 300 nt in length, respectively. The 455-nt transcript is probably the active one because it correlates with aromatase activity in the brain (23). The alternate transcript, which is found in relatively large amounts in the monkey testis, is also found in the monkey brain. This transcript does not correlate with the capacity of monkey brain to aromatize androgens (23). A truncated form of human aromatase

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

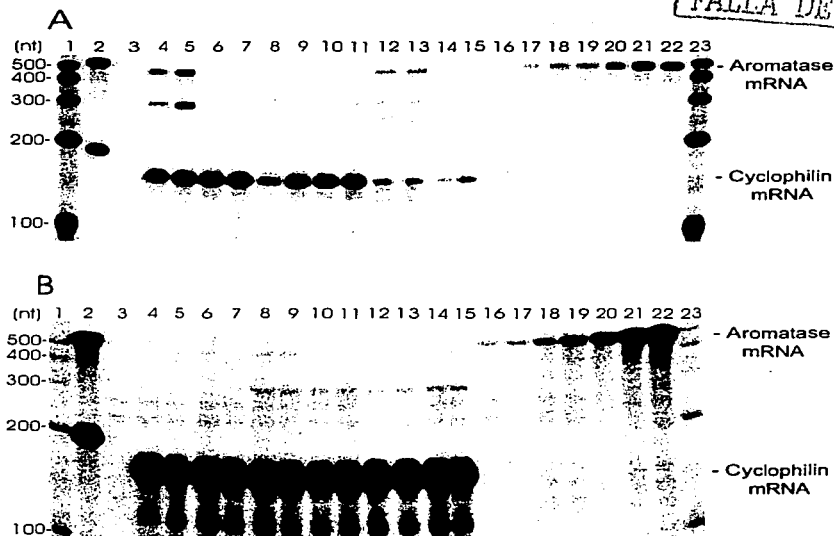


Fig. 2. (A) Representative ribonuclease protection assay phosphoimage showing distribution of P450_{αrom} mRNA (10 μg of total RNA/lane) in testis, epididymis, placenta (positive control), and femoral muscle (negative control). Lanes 1 and 23, nucleotide ladder; lane 2, incubated undigested probe; lane 3, incubated ribonuclease digested probe; lanes 4 and 5, testis; lanes 6 and 7, caput epididymis; lanes 8 and 9, corpus epididymis; lanes 10 and 11, cauda epididymis; lanes 12 and 13, placenta (139 d of gestation, rhesus monkey); lanes 14 and 15, muscle (rhesus monkey femoral); lanes 16–22, P450_{αrom} mRNA sense RNA standard curve (31.2, 62.4, 125, 250, 500, 1000, and 2000 fg, respectively). Exposure time was 15 h. (B) Representative ribonuclease protection assay phosphoimage showing the distribution of P450_{αrom} mRNA (50 μg of total RNA/lane) in epididymis. Lanes 1 and 23, nucleotide ladder; lane 2, incubated undigested probe; lane 3, incubated ribonuclease digested probe; lanes 4–7, caput epididymis of four males; lanes 8–11, corpus epididymis of the same four males; lanes 12–15, cauda epididymis of the same four males; lanes 16–22) P450_{αrom} mRNA sense RNA standard curve (31.2, 62.4, 125, 250, 500, 1000, and 2000 fg, respectively). Exposure time was 71 h.

Table 1
Distribution of P450_{αrom} mRNA
in Testes and Epididymides of Rhesus Monkeys
as Determined by Ribonuclease Protection Assays

Tissue	RNA assayed (μg)	N ^a	fg/μg of total RNA ± SEM ^b	
			455 nt transcript	300 nt transcript
Testis	10	10	40.1 ± 1.9*	51.0 ± 5.8 [†]
Epididymis				
Caput	10	10	ND	4.4 ± 0.3 [‡]
Corpus	10	10	ND	13.2 ± 0.3 [§]
Cauda	10	10	ND	13.9 ± 1.0 [§]

^aN, number of animals from which tissues were obtained.

^bND, not detectable. * and [†]. Differed significantly from one another ($p < 0.01$, by Student's *t*-test). Different superscript symbols for epididymis indicate that those means differ significantly ($p < 0.01$, ANOVA followed by Neuman-Keuls, multiple range test).

Table 2
Steroid Concentrations
in Sera from Spermatic Veins
and Heart of Rhesus Macaques

Steroid	N ^a	Mean ± SEM	
		Spermatic vein	Heart
Testosterone	10	22.7 ± 7.0 (ng/mL)	8.5 ± 1.3 (ng/mL) ^b
Androstenedione	10	1.7 ± 0.6 (ng/mL)	0.5 ± 0.1 (ng/mL)
Estradiol-17β	10	66.0 ± 20.0 (pg/mL)	12.0 ± 2.0 (pg/mL) ^b
Estrone	10	46.0 ± 11.0 (pg/mL)	11.3 ± 3.0 (pg/mL) ^b

^aN, number of animals from which sera were obtained.

^bSera concentrations differed significantly ($p < 0.01$, Student's *t*-test) between spermatic veins and blood obtained through a cardiac catheter.

when expressed in Chinese hamster ovary cells and incubated with an excess of NADPH cytochrome P450 reductase and diluoroyl L- α -phosphatidylcholine can aromatize androgen in vitro in a time-dependent manner (18). It has been postulated that the truncated form of aromatase may no longer be associated with the endoplasmic reticulum; thus, it is disconnected from its redox partner, NADPH-cytochrome P450 reductase, an association that is necessary for aromatization to occur (18). We do not currently know what the relationship is between the truncated form of aromatase and NADPH-cytochrome reductase in the monkey testis and epididymis. If it is coupled to the reductase, it could be active. Perhaps the relative amounts of the two transcripts and their respective encoded proteins in the primate testis and epididymis are not static but constantly changing. In this way, the ability to couple with cytochrome P450 reductase could be part of a regulatory mechanism for limiting local estrogen formation. This hypothesis is compatible with the idea that small amounts of estrogen are necessary for gamete formation but that overexpression of aromatase leads to pathology (e.g., development of testicular Leydig cell tumors) (19).

The fact that P450_{arom} mRNA and aromatase activity do not correlate in the epididymis may indicate that aromatase activity is not strictly regulated at the level of RNA expression and that other mechanisms for this regulation should be considered.

In summary, we have shown that several important elements for the biosynthesis of estrogen, such as the ability to aromatize androgens and the presence of P450_{arom} mRNA, are present in the testes and epididymis of rhesus monkeys and that the testes secrete both E₁ and E₂ into the systemic circulation. Local production of estrogen may be important for sperm maturation in the testis and fluid transport in the epididymis, as it appears to be in other species such as the mouse.

Materials and Methods

Animals and Tissue Preparation

Ten healthy adult male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*, 5–10 yr of age, weighing on average 8.8 ± 2.0 kg) were used. Animals were housed in individual cages and the temperature of the room where the animals were kept was maintained at 22°C. During the experiment, they were exposed to 12 h of light from 7:00 AM to 7:00 PM and 12 h of darkness from 7:00 PM to 7:00 AM. The males were fed a diet of Purina Lab Monkey Chow supplemented with fresh fruit and provided with water ad libitum. All experimental procedures and animal care were conducted under the supervision of the Veterinary Staff of the Oregon Health Science University in accordance with the principles and procedures outlined by the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Following anesthesia with ketamine hydrochloride (10 mg/kg/intravenously), venous blood

samples were obtained from the spermatic vein by venipuncture and the heart through a cardiac catheter. Placement of the catheter to obtain blood remotely has been described previously (20). The serum was collected and stored at -20°C until assayed for steroid hormones by radioimmunoassay (RIA). Castration was then performed through a suprapubic midline incision. After castration, the testes were rapidly decapsulated, cut into approx 0.5-cm² pieces, immediately frozen on dry ice, and stored at -80°C until they were assayed. The epididymis was obtained at the time of castration, cleaned of connective tissue, rinsed with saline, and blotted, and the caput, corpus, and cauda were dissected before being stored at -80°C for later use in the various assays.

Radiometric ³H₂O Assay for Aromatase Activity

Aromatase activity was measured by a radiometric ³H₂O assay. This assay quantifies the stereospecific production of ³H₂O from [1β -³H]androstenedione as an index of estrogen formation (21). The details of this assay have been described previously (21). The apparent Michaelis-Menton (K_m) for testicular tissue averaged $0.15 \mu M \pm 0.02$ (SE) ($n = 4$). The amount of estrogen formed by testicular microsomes as determined by the water assay was compared vs the amount determined by product isolation of E₂ and E₁. The details of the procedure for product isolation have been published previously (22). We found 99.1 ± 20 (SEM) fmol of estrogen produced/mg of protein/h ($n = 10$ assays) by product isolation vs 108.0 ± 3.5 fmol of ³H water produced/mg of protein/h ($n = 10$ assays). These values did not differ significantly by a *t*-test ($p > 0.05$). In addition, aromatase activity of testicular and caput epididymis microsomes incubated with $20 \mu M$ of the aromatase inhibitor 1,4,6-androstatriene-3,17-dione, was reduced by 88 and 34%, respectively, over untreated control samples in vitro.

Ribonuclease Protection Assay

Ribonuclease protection assays were performed to identify the P450_{arom} mRNA in testis, and three segments of the epididymis (caput, corpus, and cauda) using a 455-bp cDNA insert cloned from first-trimester placenta of rhesus monkey. Details of cloning have been described previously (23). Total RNA was extracted from testis and the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis by the guanidium thiocyanate method followed by centrifugation through a 5.7 M cesium chloride gradient (24). An antisense ³²P complementary P450_{arom} RNA ([³²P]cRNA) probe was synthesized in vitro from the DNA template by using SP6 RNA polymerase. Purification of the [³²P]cRNA probe and other procedures used in preparing the samples for analysis in ribonuclease protection assays have been published previously (23). Third-trimester placenta and femoral muscle of monkeys were used as positive and negative controls, respectively. Cyclophilin mRNA, which was used as a control for RNA loading on gels, was measured using a 185-nt [³²P] cRNA probe transcribed from a rhesus monkey p1B15 cyclo-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

philin cDNA cloned into pGEM-3Z vector (provided by Dr. Sergio Ojeda at the Oregon Regional Primate Research Center). The protected cyclophilin mRNA fragment was 158 nt long.

We used a Molecular Imaging System (Bio-Rad GS-525; Bio-Rad, Hercules, CA) to quantify protected bands on the polyacrylamide gels as described previously (25). The amount of P450_{arom} mRNA in each sample was determined from the ribonuclease protection assay standard curve and normalized to the cyclophilin mRNA value (25).

Steroid RIA

Serum steroid concentrations were measured by RIA. Sera were extracted with ether and partitioned by chromatography on Sephadex LH-20 columns. E₁, E₂, androstenedione, and testosterone were assayed as previously described (26).

Statistical Analyses

Statistical comparisons of aromatase activity and P450_{arom} mRNA in the testes and the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis were performed by an ANOVA followed by Newman-Keul's multiple range tests if the ANOVA was statistically significant. Differences in concentrations between the 455- and 300-nt transcripts of the testis and of steroids in peripheral vs spermatic vein serum were determined by *t*-tests. Before analysis, the groups to be compared were tested for homogeneity of variances. If the variances were not the same, the data were log transformed and the transformed data used in the analysis. The statistical program GB STAT (Dynamic Microsystems, Inc., Silver Spring, MD) was used for these analyses.

Acknowledgments

This work was supported by Fogarty International Training Program in Population and Health, D43 TW00669 and NIH grant HD-18196.

References

- Callard, G. V., Petro, Z., and Ryan, K. J. (1978). *Endocrinology* **103**, 2283-2290.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., et al. (1994). *Endocr. Rev.* **15**, 342-355.
- Valladares, L. E. and Payne, A. H. (1979). *Endocrinology* **105**, 431-436.
- Lavallet, J., Bilinska, B., Mitre, H., Genissel, C., Fresnel, J., and Carreau, S. (1998). *Biol. Reprod.* **58**, 919-926.
- Tsai-Morris, C.-H., Aquilano, D. R., and Dufau, M. L. (1985). *Endocrinology* **116**, 38-46.
- Nitta, H., Bunick, D., Hess, R., Janulis, L., Newton, S. C., Millette, C. F., Osawa, Y., Shizuta, Y., Toda, K., and Bahr, J. M. (1993). *Endocrinology* **132**, 1396-1401.
- Kwon, S., Hess, R. A., Bunick, D., Nitta, H., Janulis, L., Osawa, Y., and Bahr, J. M. (1995). *Biol. Reprod.* **53**, 1259-1264.
- Robertson, K. M., O'Donnell, L., Jones, M. E. E., Meachem, S. J., Boon, W. C., Fisher, C. R., Graves, K. H., McLachlan, R. L., and Simpson, E. R. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7986-7991.
- Eddy, E. M., Washburn, T. F., Bunch, D. O., Goulding, E. H., Gladen, B. C., Lubahn, D. B., and Korach, K. S. (1996). *Endocrinology* **137**, 4796-4805.
- Fisher, C. R., Graves, K. H., Parlow, A. F., and Simpson, E. R. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6965-6970.
- Saunders, P. T. K., Fisher, J. S., Sharpe, R. M., and Millar, M. R. (1998). *J. Endocrinol.* **156**, R13-R17.
- Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. O., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S., and Lubahn, D. B. (1997). *Nature* **390**, 509-512.
- Inkster, S., Yue, W., and Brodie, A. (1995). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 1941-1947.
- West, N. B. and Brenner, R. M. (1990). *Biol. Reprod.* **42**, 533-538.
- Smith, E. P., Boyd, J., Frank, G. R., Takahashi, H., Cohen, R. M., Specker, B., Williams, T. C., Lubahn, D. B., and Korach, K. S. (1994). *N. Engl. J. Med.* **331**, 1056-1061.
- Carani, C., Qin, K., Simoni, M., Faustini-Fustini, M., Serpene, S., Boyd, J., Korach, K. S., and Simpson, E. R. (1997). *N. Engl. J. Med.* **337**, 91-95.
- Morishima, A., Grumbach, M. M., Simpson, E. R., Fisher, C., and Qin, K. (1995). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 3689-3698.
- Kuo, Y.-E., Higashiyama, T., Yarborough, C., Osawa, Y., and Chen, S. (1999). *Steroids* **64**, 422-429.
- Fowler, K. A., Gill, K., Kirma, N., Dillehay, D. L., and Tekmal, R. R. (2000). *Am. J. Pathol.* **156**, 347-353.
- Cameron, J. L., McNeill, T. H., Fraser, H. M., Bremner, W. J., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. (1985). *Biol. Reprod.* **33**, 147-156.
- Roselli, C. E., Stadelman, H., Horton, L. E., and Resko, J. A. (1987). *Endocrinology* **120**, 97-106.
- Roselli, C. E., Ellinwood, W. E., and Resko, J. A. (1984). *Endocrinology* **114**, 192-200.
- Abdelgadir, S. E., Roselli, C. E., Choate, J. V. A., and Resko, J. A. (1997). *Biol. Reprod.* **57**, 772-777.
- Gilman, M., Ausubel, F., Brent, R., et al., eds. (1993). In: *Ribonuclease protection assay*. Current Protocols in Molecular Biology. Green and Wiley-Interscience: New York.
- Resko, J., Pereyra-Martinez, A., Stadelman, H., and Roselli, C. (2000). *Biol. Reprod.* **62**, 1818-1822.
- Resko, J. A., Ellinwood, W. E., Pasztor, L. M., and Buhl, A. E. (1980). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **50**, 900-905.