



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

30
2ij

**EFFECTOS DE VARIOS FACTORES HORMONALES SOBRE
LA ACTIVIDAD DE AROMATASA EN CELULAS DE
LEYDIG DE RATA ADULTA NORMAL**

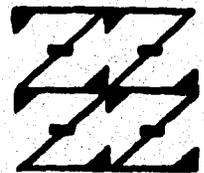
T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

MARIA TERESA VARGAS FLORES



LO BUENANO
DE NUESTRA REFLEXION

México, D. F.

1996

**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.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DE VARIOS FACTORES HORMONALES SOBRE LA ACTIVIDAD
DE AROMATASA EN CÉLULAS DE LEYDIG DE RATA ADULTA NORMAL.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

MARÍA TERESA VARGAS FLORES.

DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN:
LABORATORIO DE MECANISMOS DE REGULACIÓN ENDOCRINA.
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA.

DAD GRACIAS EN TODO,
PORQUE ESTA ES LA VOLUNTAD
DE **DIOS** PARA CON VOSOTROS
EN CRISTO JESUS.
(1 Tes 5:18)

Dios;

Gracias por permitirme llevar a cabo este proyecto que es mi realización como estudiante y una de mis metas como profesionista, gracias por darme el don maravilloso de la vida para apreciarte en todas y cada una de las criaturas del cielo y tierra.

Juana y Mario;

Gracias por permitirme estudiar y prepararme para ser alguien en la vida, gracias por soportarme en mis horas grises y mis horas felices, por ser mis padres gracias.

Alfonso, Luciano y Lorenzo;

Gracias por enseñarme con su ejemplo a realizar lo que uno se propone, por ser mis hermanos gracias.

Cástula, Juliana, Felicitas y Martha;

Gracias por ser mi estímulo, de una u otra manera, para realizar mi proyecto de titulación, por esto hermanas gracias.

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a las profesoras Elvira González Soto e Irma Fernández Herrero por su apoyo e interés mostrado hacia el trabajo realizado en el Laboratorio de Mecanismos de Regulación Endocrina.

Al profesor Joaquín Herrera Muñoz le agradezco su asesoramiento y apoyo recibido en las instalaciones de la Clínica de Ginecoobstetricia No. 4 del I.M.S.S., así como a todo el personal que labora dentro del laboratorio a su cargo.

Agradezco al profesor Enrique Mendieta Marquez el permitirme desarrollar y realizar la presente investigación de tesis bajo su cargo y dirección.

Al jurado calificador designado para fungir en el examen oral y escrito le agradezco las correcciones y mejoras hechas a la presentación del trabajo de tesis.

Un agradecimiento muy especial a las profesoras María José Marques Dos Santos y María del Carmen De Santiago por su apoyo y asesoramiento en el tratamiento de los datos experimentales, así como al profesor Eloy Solano Camacho y a todas y cada una de las personas que laboran en el Herbario de la FES Zaragoza por el apoyo en la preparación, realización, escrito e impresión de la presente tesis.

A todos mis amigos y compañeros les agradezco el haber participado en mi formación como profesionista y persona.

RESUMEN.

El objetivo del presente trabajo fue el determinar la influencia de dibutirilAMPc, insulina y el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) sobre la actividad de la aromatasas en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal para demostrar *in vitro* si esta actividad enzimática es sensible a la estimulación con diversos factores hormonales, a través de la detección de posibles cambios en la producción basal de estradiol.

Fraciones testiculares enriquecidas en células de Leydig obtenidas por medio de centrifugación a través de un gradiente de Ficoll-Albumina fueron sembradas a una densidad aproximada de 500,000 células/ml en DME, preincubadas por 24 hrs y posteriormente tratadas con tres dosis diferentes de dibutirilAMPc, insulina o EGF durante periodos de 12, 24 y 48 hrs. Posteriormente se realizó la cuantificación de testosterona y estradiol en los medios de cultivo mediante radio inmunoanálisis (RIA) específicos.

Los resultados obtenidos permiten observar que la producción de testosterona a las 12 y 24 hrs de cultivo se incrementa al adicionar las dosis máximas empleadas de dibutirilAMPc y EGF presentándose una tendencia aparente a la disminución en la actividad de aromatasas. Al adicionar insulina se observó un decremento general en la producción de testosterona, siendo significativamente diferente al control hasta las 48 hrs de cultivo mientras que la actividad de aromatasas se disminuyó desde el inicio del cultivo a excepción de las 48 hrs, dato no explicable claramente.

ÍNDICE GENERAL

	pg
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	1
Anatomía del aparato reproductor masculino.	1
Histología y Fisiología del Testículo.	3
Regulación de la síntesis hormonal a través del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo.	8
Regulación Intragonadal o Paracrina.	9
Aromatización Testicular.	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
METODOLOGÍA	17
Obtención de las fracciones enriquecidas.	17
Cultivos primarios.	17
Cuantificación de los esteroides.	17
Pruebas estadísticas.	18
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

INTRODUCCIÓN.

La Endocrinología trata del estudio de los efectos y mecanismos de acción de las sustancias humorales secretadas por las glándulas endocrinas; su campo de acción enfocado a la fisiología y bioquímica de los aparatos reproductores tiene una gran importancia, ya que por un lado se contribuye al mejoramiento de los programas que se encargan de la conservación de las especies y por otro lado a la explicación de su gran diversidad. La Endocrinología de la reproducción en el hombre y en la mujer puede estudiarse en forma separada, constituyendo las disciplinas de la Andrología y Ginecología respectivamente (1, 2).

La Andrología estudia los mecanismos endocrinos y paracrinos que regulan las funciones esteroidogénica y gametogénica de los diferentes compartimientos testiculares y puede dar luz sobre las causas de infertilidad, así como apoyar la implementación de técnicas que permitan el control de las poblaciones de elevado crecimiento.

No obstante el conocimiento de que el testículo consta de dos compartimientos; el tubular conformado básicamente por células de Sertoli y el intersticial por células de Leydig. Y de que cada compartimiento desempeña una función específica, así como la existencia de un complejo enzimático llamado aromatasa dependiente de citocromas P450. Aún queda un campo muy amplio de interés científico que es necesario explorar y dilucidar así mecanismos y funciones necesarias para ampliar conocimientos y aplicaciones prácticas de los mismos.

MARCO TEÓRICO.

Anatomía del Aparato Reproductor Masculino.

Una parte del aparato reproductor masculino se encuentra situado fuera del abdomen y comprende el órgano de la cópula (pene) además del escroto que protege a los testículos y epidídimo, mientras que su parte interna comprende los conductos deferentes y eferentes, vesículas seminales, conducto eyaculador, próstata y glándulas accesorias (3).

En mamíferos los testículos son órganos pares que se encuentran colocados a los lados de la línea media y descienden poco antes del nacimiento por el conducto inguinal a la bolsa del escroto; estos maduran completamente después de la pubertad y pueden realizar normalmente su doble función: endocrina (producción de hormonas esteroides) y germinativa (producción de espermatozoides) (4).

El epidídimo se encuentra íntimamente ligado por medio de los conductos eferentes a cada testículo y consta de cabeza,

cuerpo y cola, colocado en la parte superior y en la cara externa del testículo. Este órgano no es más que el primer segmento de las vías espermáticas, las cuales se constituyen por los conductos deferentes, las vesículas seminales y los conductos eyaculadores (5, 6, 9) (fig. 1).

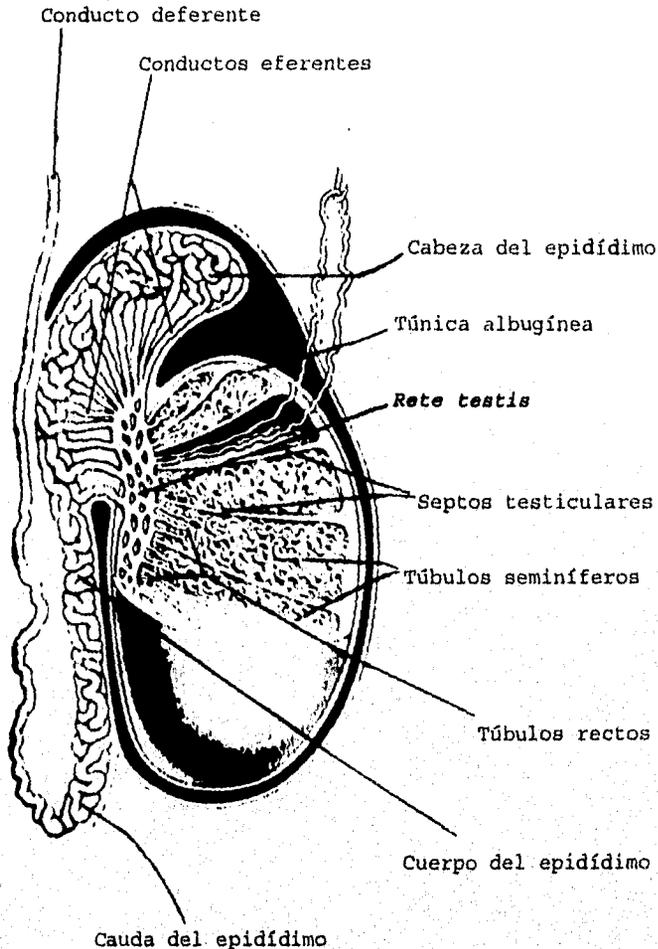


Figura 1.- Corte longitudinal que muestra la anatomía interna del testículo.
 [Tomada de Bloom & Fawcett (9)]
 Dentro de los septos testiculares se encuentran los túbulo seminíferos dispuestos de tal manera que sus extremos se conjuntan en la rete testis de la cual parten en su extremo superior los conductillos aferentes que conformarán parte de la cabeza del epidídimo.

La próstata es una glándula accesoria al aparato genital masculino, que se halla situada por debajo de la vejiga, y es atravesada por la uretra. Su función es la de segregar un líquido alcalino de aspecto lechoso que contiene ácido cítrico, calcio, fosfatasa ácida, una enzima coagulante y una profibrinolisisina. Este se mezcla con el contenido de las vesículas seminales durante la eyaculación (1, 7).

Histología y Fisiología Testiculares.

El testículo en el adulto está rodeado por una capa mesotelial que representa la porción visceral de la túnica vaginal y cuyo plano profundo es conocido como túnica albugínea, a partir de la cual se extienden tabiques fibrosos hacia el interior del órgano, que lo subdividen en lobulillos incompletos, dentro de los cuales se encuentran los túbulos seminíferos. Sus extremos se conjuntan en la *rete testis*, que se halla a la altura del mediastino testicular, y desemboca en diversos conductillos eferentes que se conjuntan en la cabeza del epidídimo formando así el conducto que recibe el nombre de conducto deferente (8) (fig. 1).

En el compartimiento tubular se pueden encontrar células peritubulares que forman una membrana basal que se asocia con la membrana de las células de Sertoli formando así, junto con las uniones intercelulares de las mismas, la llamada barrera hematotesticular. A las células de Sertoli también se les conoce con los nombres de células nodriza o de células en candelabro, por servir de soporte a las células de la línea germinal en sus diversos estados de diferenciación (espermátides temprana y tardía), que dan origen a los gametos masculinos llamados espermatozoides, los cuales después de su maduración en el túbulo se almacenan en el epidídimo que contiene un medio ligeramente ácido (5, 9, 10) (fig. 2).

En la función gametogénica o espermatogénesis, los estados de diferenciación superiores a los espermatoцитos paquitenos siempre se encontrarán dentro de la parte adluminal del túbulo, más allá de la zona de la barrera hematotesticular. Por debajo de ésta se encuentran las espermatogonias tipo A1-A4, las espermatogonias intermedias y las del tipo B que darán origen a los espermatoцитos (8, 9).

El proceso de espermatogénesis (fig. 3) inicia cuando las espermatogonias o células del epitelio germinativo experimentan divisiones mitóticas, que dan como resultado células conocidas como espermatoцитos de 1er. orden, los cuales experimentan posteriormente una primera división meiótica que origina dos espermatoцитos de 2o. orden, los cuales experimentan una segunda división que produce cuatro espermátides que llevarán a cabo su maduración o espermiogénesis, que consiste en el alargamiento de la cola, migración del núcleo hacia la membrana, aparición de los

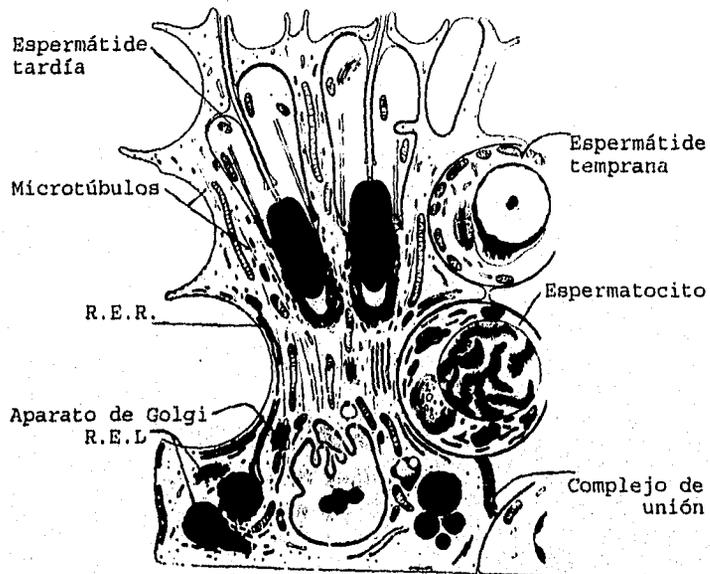


Figura 2.- Ultraestructura de las Células de Sertoli.
(Tomada de Bloom & Fawcett (9))

Los espermatocitos y las espermatídes tempranas ocupan los espacios intercelulares laterales, mientras que las espermatídes tardías se encuentran localizadas en la zona apical. Reticulo endoplásmico rugoso (R.E.R.) y reticulo endoplásmico liso (R.E.L.).

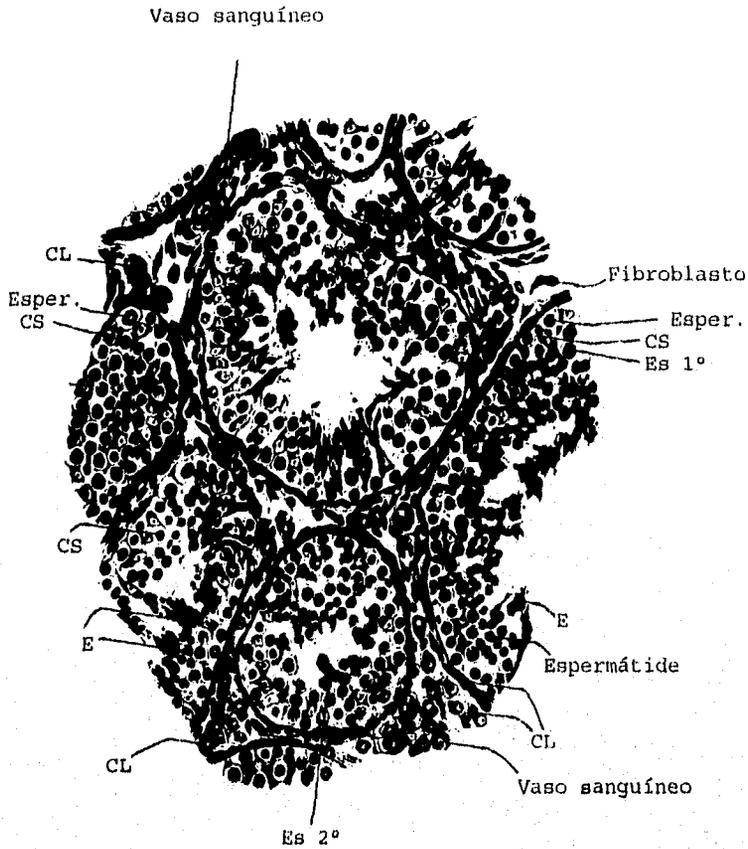


Figura 3.- Sección transversal del testículo.
[Tomada de Bloom & Fawcett (9)]

En este corte transversal dentro del túbulo seminífero se pueden observar diferentes estados de desarrollo de las células de la línea germinal - Espermatogonias (Esper) Espermatocitos primarios (Es 1°) y secundarios (Es 2°) Espermátides y Espermatozoides (E) - y Células de Sertoli (CS). En el intersticio pueden encontrarse células de Leydig (CL), Fibroblastos y Vasos sanguíneos.

ásteres y otra reducción del citoplasma formándose la parte intermedia y el flagelo (2, 8, 9).

Al finalizar la espermiogénesis, los espermatozoides poseen una cabeza oval de 5 μm , de perfil piriforme y su parte anterior se cubre con el capuchón cefálico o acrosoma, la porción intermedia es cilíndrica con un filamento axial envuelto por una formación en espiral de mitocondrias y su cola o flagelo no es más que la parte terminal del filamento axial (6, 8, 9).

Entre los túbulos seminíferos se ubica el compartimiento intersticial donde se encuentran algunas fibras de colágena, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y algunos tipos celulares que incluyen fibroblastos, macrófagos, células cebadas, mesenquimatosas indiferenciadas y células de Leydig que se encuentran en grupos compactos, por lo general en zonas angulares creadas por la disposición íntima de los túbulos seminíferos (fig. 3). El citoplasma de éstas últimas suele ser vacuolado, el núcleo contiene gránulos gruesos de cromatina, un nucléolo y se puede encontrar un retículo endoplásmico liso (10).

Las células de Leydig se encargan de producir las hormonas sexuales masculinas llamadas andrógenos (testosterona y androstenediona) por medio de un proceso biosintético llamado esteroidogénesis, el cual implica la síntesis inicial de colesterol a partir del acetato en la mayoría de los mamíferos. La esteroidogénesis en el humano deriva más del colesterol proveniente de lipoproteínas de baja densidad del plasma, el cual penetra por endocitosis a la célula y puede ser almacenado directamente o ser convertido a colesterol libre que después de una serie de desdoblamientos de la cadena lateral y oxidaciones es convertido en pregnenolona, que es el esteroide pivote del cual derivan todas las demás hormonas esteroideas (11, 12).

En el proceso esteroidogénico existen dos vías probables de síntesis: la vía de los delta 5 ($\Delta 5$) y la vía de los delta 4 ($\Delta 4$), de las cuales esta última es la más común en el testículo de los mamíferos (fig. 4). El colesterol libre que es insoluble en el citosol, es transportado a la mitocondria por medio de una proteína acarreadora de esterol (SCP-2, por sus siglas en inglés) y entra en contacto con la enzima mitocondrial dependiente de citocromo P450 que corta la cadena lateral del colesterol (P450_{sc}) que mediante una serie de reacciones anteriormente llamadas 20,22 desmolasa, corta la cadena lateral del precursor que pasa a ser pregnenolona, la cual por medio de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) y una $\Delta 4/\Delta 5$ isomerasa, dependiente del P450, pasa a ser Progesterona (10, 12).

Posteriormente un citocromo P450 microsomal (P450 17 α) de la base del retículo endoplásmico media la actividad de la 17 α -hidroxilasa, transformando a la progesterona en 17 α -hidroxiprogestrona que por medio de la C17,20 desmolasa, es

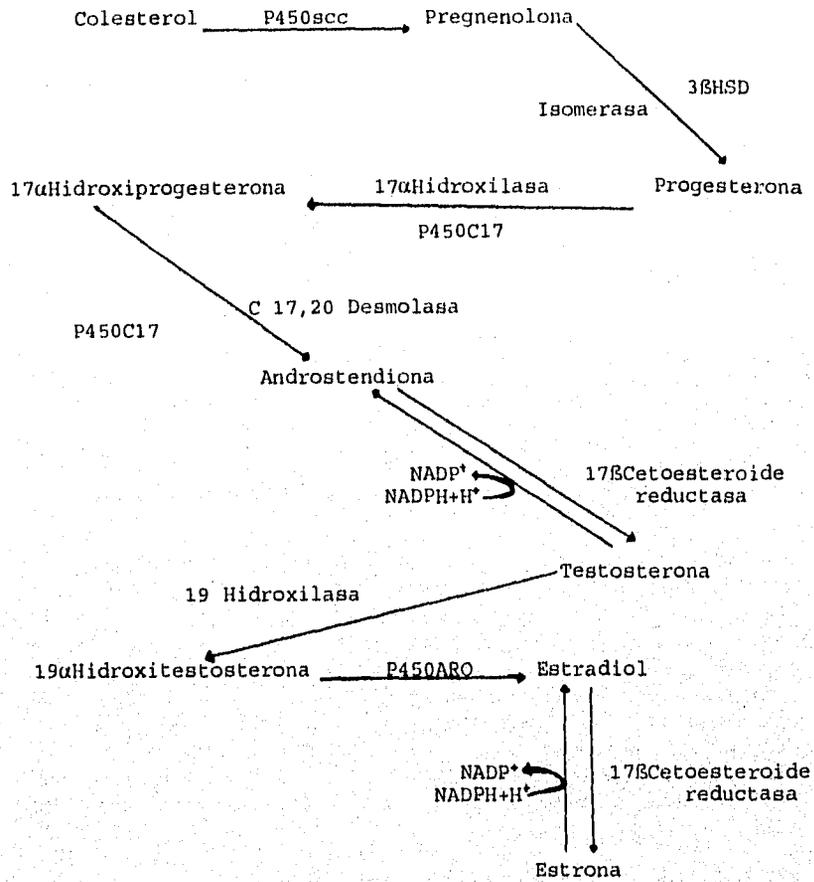


Figura 4.- Vía Δ^4 de la esteroidogénesis testicular.
[Modificada de Martin y col. (12)]

transformada a androstendiona, la cual finalmente es convertida a testosterona por la 17 β -cetoesteroide reductasa (10, 11).

La testosterona puede ser hidroxilada en su C19 originando la 19 α -hidroxitestosterona, la que es el principal participante en la aromatización testicular que involucra todo un complejo enzimático llamado de la aromatasa dependiente de las P450 del retículo endoplásmico (P450aro); que es el encargado de modificar el anillo A de la testosterona para obtener el 17 β -estradiol, que por medio de una reacción reversible que involucra al NADPH como cofactor puede generar un segundo estrógeno conocido como estrona (10, 11, 12) (fig. 4).

Regulación de la Síntesis Hormonal a través del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo.

En los últimos años se ha determinado que los sistemas nervioso y endocrino funcionan en realidad como un sistema único interrelacionado. El sistema nervioso central, particularmente el hipotálamo, juega un papel crucial en el control de la secreción hormonal y a la inversa, las hormonas sexuales alteran notoriamente la función nerviosa e influyen considerablemente en muchos tipos de comportamiento. Estas interrelaciones conforman el área de estudio conocida como Neuroendocrinología (3).

La regulación hormonal del eje hipotálamo - hipófisis - testículo (fig. 5) se realiza por intermedio de la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la cual es secretada dentro del hipotálamo y liberada hacia la eminencia media. Este factor liberador llega a la adenohipófisis a través del sistema porta hipotalámico-hipofisiario desencadenando la secreción por parte de los gonadotropos hipofisarios de la hormona folículo estimulante (FSH), que tiene como células blanco las células de Sertoli en testículo, y la hormona luteinizante (LH) que tiene como células blanco a las células de Leydig (3, 6, 7, 10).

Cuando las gonadotrofinas (LH y FSH) son liberadas hacia la circulación llegan a la membrana plasmática de las células blanco y activan el sistema de la adenilato ciclasa (fig. 6b) que aumenta los niveles intracelulares del 3',5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que actúa como segundo mensajero celular. Se ha sugerido que el AMPc activa una serie de cinasas específicas que al fosforilar diversos substratos modifican varias funciones tanto de las células de Sertoli como de las células de Leydig (12).

Regulación Intragonadal o Paracrina.

Con base en diferentes estudio se ha demostrado que las dos principales funciones testiculares están predominantemente bajo el control de las hormonas adenohipofisarias LH y FSH (fig. 6A); sin embargo, diversas evidencias indican que las funciones

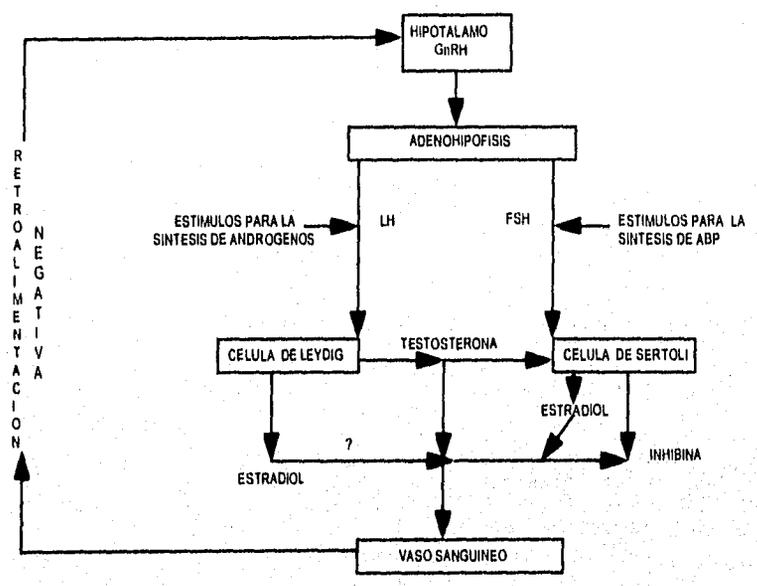


Figura 5.- Eje Hipotálamo - Hipófisis - Testículo.
 [Modificada de Bloom & Fawcett (9)]
 Hormona liberada de gonadotrofinas (GnRH), Eje Hipotálamo - Hipófisis - Testículo.
 Hormona Luteinizante (LH), Hormona folículo estimulante (FSH), Proteína unidorade Andrógenos (ABP), Testosterona (T).

testiculares están moduladas localmente de una manera muy fina. Así, las hormonas adenohipofisarias proveen los estímulos básicos de los que depende cada función testicular, pero el tiempo y la intensidad de respuesta de las células testiculares a estos estímulos parecen ser modulados por complejas interacciones entre las células testiculares (13, 14, 15).

La FSH incrementa la producción de cuando menos cuatro proteínas específicas incluyendo la proteína unidora de andrógenos (ABP) que es una glucoproteína y el activador de plasminógeno, ambas son secretadas hacia el fluido tubular. Las otras dos proteínas no provienen de las células de Sertoli, una es un inhibidor de la proteincinasa citoplasmática y la otra es la glutamiltanspeptidasa (15, 16, 17).

En ratas inmaduras la producción de ABP esta bien caracterizada y aunque con ciertas dificultades se logró determinar su existencia en humanos, hay evidencias de que tiene mayor afinidad en la unión de andrógenos que TeBG. Hasta 1989 solo se había encontrado una pequeña estimulación de FSH en la síntesis de AMPc o ABP en testículos de ratas maduras (15, 18, 19, 20).

Recientemente se ha propuesto que la inhibina es un factor proteico (peso molecular entre 5-7,000) proveniente de túbulo seminífero y es capaz de inhibir selectivamente la secreción de la FSH, así mismo se ha identificado en el fluido folicular del ovario (21, 22).

Se ha mostrado que las células de Sertoli son el sitio de síntesis de la inhibina (fig. 6A); analizando el medio de cocultivo de células hipofisarias y células de Sertoli se encontró una disminución en la concentración de FSH y una respuesta inhibida de GnRH (23, 24).

En ratas sexualmente inmaduras se sabe que la prolactina facilita la transformación de colesterol a pregnenolona además de que sus efectos se reflejan directamente sobre las células de Leydig (25, 26, 27) (fig. 6A).

Por otra parte se ha demostrado que el fluido intersticial también participa en la regulación paracrina de las células testiculares de forma independiente a la GnRH, aunque con dosis máxima de estimulación de LH o gonadotropina coriónica humana (hCG) o GnRH el efecto estimulador del fluido es sinérgico, mientras que es de tipo aditivo para dosis submáximas (14).

En los estudios realizados anteriormente por Bustos Rosas (28), García Castro y Rodríguez Maldonado (29) se ha encontrado que las fracciones enriquecidas de células de Sertoli mantenidas en cultivo primario secretan factores de naturaleza proteica

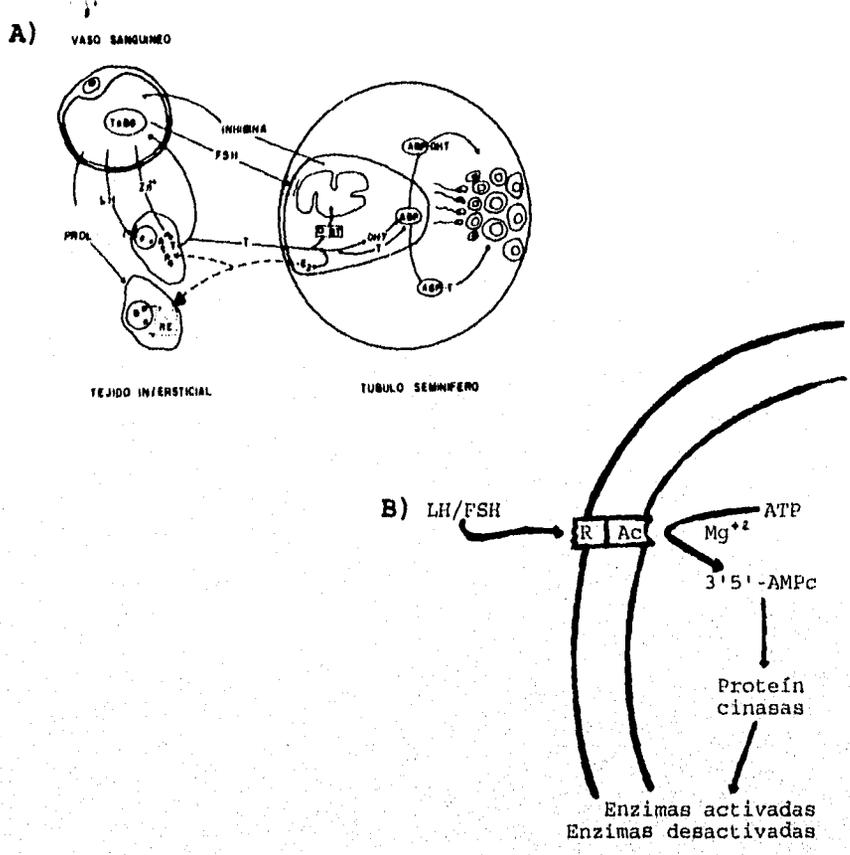


Figura 6.- Regulación intratesticular.

Mecanismos de regulación paracrina de la función testicular:
A) La testosterona (T) sintetizada por células de Leydig se puede unir a sus receptores específicos (RT) en las células de Sertoli modulando la síntesis de proteínas tales como transferrina y la proteína unidora de andrógenos (ABP) las cuales pueden influir sobre la diferenciación de las células de la línea germinal. B) Activación del sistema Adenilato ciclasa (Ac) después de unirse LH o FSH al receptor específico (R) y que resulta finalmente en la producción de proteínas específicas.

moduladores de la síntesis de esteroides en células de Leydig que incrementan la síntesis de pregnenolona y disminuyen la producción de testosterona en células de Leydig de manera dosis dependiente.

En otros estudios de regulación se ha encontrado que las interacciones entre células de Sertoli y las germinativas y/o peritubulares así como el medio condicionado de células de Sertoli pueden disminuir los niveles de AMPc intra y extra celular a través de factores difusibles de origen proteico y de peso molecular diverso (30, 31, 32).

Aromatización Testicular.

Los primeros intentos por demostrar cuál es el sitio de aromatización testicular fueron realizados en caballos, posteriormente en humano, simios, perros y ratas. Más tarde, por medio de estudios *in vitro* se llegó a saber que las células de Sertoli son la fuente principal de aromatización, Callard y col. (33) puntualizan que testosterona es un andrógeno aromatizable y que la aromatasa se asocia con las células de Sertoli durante los estadios críticos de proliferación espermatogónica en ratas inmaduras y con células de Leydig de ratas maduras (34).

Payne y col. (35) y otros autores mencionan a las células de Sertoli como la principal fuente de aromatización en ratas neonatales y que su producción de estradiol aumenta conforme pasa el tiempo de cultivo, así mismo se menciona a las células de Leydig como el principal o único sitio de aromatización durante el desarrollo de la pubertad (36, 37, 38, 39).

Las posibles funciones de los estrógenos en individuos púberes incluye un efecto local en túbulo seminífero para preparar las condiciones adecuadas para el inicio de la espermatogénesis y provocando un segundo efecto sobre la producción de testosterona además de proponer que el estradiol funciona también como agente mitogénico para las células de Leydig (35, 40).

Otros estudios *in vitro* indican que la aromatización a una edad madura ocurre principalmente en el tejido intersticial por lo que se menciona a la LH como factor regulador de la aromatasa y la producción de estradiol por células de Leydig depende de las condiciones de cultivo, la cual puede disminuir después del sexto día de cultivo (37, 38, 31).

Puede encontrarse insuficiencia testicular después de cirugía, traumatismos, infección, radiación, intoxicación química, alteración en el desarrollo del órgano, posición intrabdominal, criptorquidia artificial, restricción del ingreso

dietético (insuficiencia energética) y exposición al frío (-5°C). Los principales factores hormonales que influyen en la esteroidogénesis son la LH/hCG y la FSH, la actividad esteroidogénica de las células de Leydig depende tanto a largo como a corto plazo de los efectos estimuladores de las gonadotropinas siendo la LH quien tiene un papel importante en ambos procesos, además de existir evidencias de que existen factores de producción local que pudieran ser importantes para el funcionamiento normal de las células de Leydig (1, 2, 28, 29, 34).

Syed y col. (41) han señalado que la producción de testosterona inducida por dibutirilAMPc aumenta después de 24 hrs de manera dosis dependiente en células de Leydig humanas en cultivo. Es ampliamente conocido que el AMPc es el segundo mensajero del mecanismo de regulación de células de Leydig dependiente de LH, por lo que la acción de esta gonadotropina o de la hCG conlleva el aumento del AMPc para inducir la producción de testosterona y también del sulfato de estrona mientras que en las células de Leydig de ratas inmaduras no se presenta respuesta a los estímulos con hCG o dibutirilAMPc (30, 36, 38, 40).

En incubaciones a tiempos cortos (3 a 4 hrs) se ha encontrado que las células de Leydig de rata adulta normal tienen la capacidad de aromatizar testosterona a estradiol aumentando esta capacidad al ser estimuladas con hCG, efecto similar al utilizar dibutirilAMPc, demostrando que es en el tejido intersticial en donde ocurre la actividad de la aromatasa y es regulada por la LH y no por la FSH ya que es muy probable que la aromatización no se presente en los túbulos seminíferos a una edad madura (28, 29).

La insulina es una hormona de uso terapéutico muy importante y se tienen reportes de que en las células de la granulosa de rata y humano puede estimular la actividad de la aromatasa, pero inhibe o no presenta efecto en el modelo correspondiente al porcino (42). Esta hormona al establecer contacto con su receptor de membrana, genera una señal o resultado final podría ser una modificación en todas las funciones conocidas de membrana o de una actividad enzimática ligada a ésta. Algunos de los procesos que pueden verse afectados por la adición de insulina son el transporte de glucosa, transporte de aminoácidos, modificación del ambiente iónico y /o un descenso en la concentración intercelular de AMPc (2, 5, 6).

Estudios realizados en 1978 empleando células de Sertoli de cerdo inmaduro corroboraron el hecho de que la insulina estimula tanto la síntesis de ADN como la multiplicación celular y 10 años más tarde empleando células de Leydig en incubaciones a 3 o 4 hrs se vislumbró el hecho de que la insulina y el factor de crecimiento similar a insulina tipo-I (IGF-I) presentan un efecto directo sobre la actividad del complejo enzimático de la aromatasa requiriendo de un adecuado transporte de glucosa,

síntesis de proteínas y del RNA mensajero para una expresión completa de sus efectos (43, 44).

Al adicionar IGF-I en cultivos de células de Leydig humanas estimuladas con hCG y procedentes de pacientes maduros orquidectomizados se observó un efecto potenciado por IGF-I sobre la producción de testosterona sugiriendo un papel regulador en la esteroidogénesis, en células de Leydig de rata adulta se ha evidenciado la existencia de receptores específicos para este factor además de ser importante en la maduración testicular (40, 45, 46).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un potente agente mitogénico, siendo sus principales células blanco las células del epitelio, mesenquimatosas y de la glia. Sin embargo, en otros tipos celulares puede no estimular la proliferación, pero si regular funciones específicas. Tal es el caso de los cultivos primarios de células testiculares y algunas líneas clonales de células de Leydig tumorales, en donde provocan la disminución en la producción de testosterona estimulada por gonadotrofinas en células de rata o en la producción de progesterona en células de Leydig tumorales de rata. En cultivos primarios de células testiculares disminuye la actividad de 17 α hidroxilasa y C17,20 liasa; en células de Leydig tumorales reduce el número de receptores para hCG y también inhibe la biosíntesis de estrógenos estimulada por la FSH en cultivos primarios de células de la granulosa de rata (47, 48, 49).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la actualidad sabemos que la aromatización testicular en animales maduros ocurre principalmente en el tejido intersticial y que la actividad de aromatasa es regulada básicamente por la LH. Sin embargo, es necesario considerar que las células de un organismo vivo se hallan expuestas a otros estímulos hormonales, que en combinación, llegan a ejercer un efecto específico como lo puntualiza el trabajo de algunos investigadores, quienes concluyen que el dibutirilAMPC en combinación con la hCG aumenta la actividad de la aromatasa en las células de Leydig maduras; mientras que en cultivos de células tumorales estimuladas con hCG la insulina aumenta la producción de testosterona y el factor de crecimiento epidérmico la disminuye.

El proponer cultivos primarios de células de Leydig maduras normales y sin tratamiento previo pero estimulados con dibutirilAMPC, insulina y EGF a tres dosis y tiempos de cultivo diferentes supone el registrar variaciones en la producción basal de estradiol y testosterona que sirvan de base para dilucidar el mecanismo de acción del complejo aromatasa.

HIPÓTESIS.

Si la actividad de la aromatasa de las células de Leydig en cultivo primario es sensible a la estimulación con diversos factores hormonales, entonces será posible detectar cambios dependientes del tiempo y de la concentración indicada de cada factor hormonal sobre la producción basal del estradiol.

OBJETIVOS.

Objetivo General:

Estudiar la influencia de diversos factores hormonales sobre la actividad de la aromatasa en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal.

Objetivos Particulares:

Cuantificar la producción basal de testosterona y estradiol por cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal.

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de dibutirilAMPc, Insulina y el Factor de Crecimiento Epidérmico sobre la producción de testosterona y estradiol en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal.

METODOLOGÍA.

1. Obtención de las Fracciones Enriquecidas.

Se utilizaron ratas macho adultas normales de la cepa Wistar de 70-90 días de edad, las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical, extrayéndoles los testículos por vía abdominal, en condiciones de esterilidad. La sangre retenida en los órganos se eliminó por medio de lavados con solución amortiguadora de fosfatos Krebs-Ringer adicionada con 2% de glucosa (KRBG) a pH 7.4, la fracción enriquecida en células de Leydig se obtuvo por medio de la metodología descrita por Bermúdez y col. (50). Los testículos se descapsularon y las células se dispersaron por medio de digestión con colagenasa tipo I en KRBG (1 mg/ml) durante 18 min. a 37°C con agitación periódica. Posteriormente se adicionaron dos volúmenes de solución isotónica (NaCl 0.9%) dejándolos reposar 10 min. a temperatura ambiente. Pasado éste lapso, la suspensión celular se filtró a través de una malla plástica (50-100 μ m de poro) recuperando la fracción intersticial cruda por centrifugación a 2800 x g a 5°C por 10 min. El botón se resuspendió en KRBG y se centrifugó nuevamente a 2500 x g a 5°C por 15 min. en una solución de Ficoll-Albumina (13%-0.2%) con pH 6.5 en KRBG. El botón de células de Leydig se resuspendió en Medio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DME) y se sembraron las células a una densidad promedio de 500 000 cel/ml en cajas multipozos con un volumen final de 2.5 ml por pozo (28).

2. Cultivos Primarios.

Las células fueron preincubadas por 24 hrs a 37 °C en una atmósfera aire-CO₂ (95:5) en DME y posteriormente el medio se reemplazo por medio fresco o adicionado con tres concentraciones diferentes de dibutirilAMPc (0.05, 0.25 y 0.50 mM), insulina (10, 50 y 100 ug/ml) y EGF (10, 25 y 50 ng/ml). Las células de Leydig se mantuvieron en incubación bajo las mismas condiciones por 12, 24 y 48 hrs. Los medios de cultivo se recuperaron y se guardaron en refrigeración para su posterior cuantificación.

3. Cuantificación de los esteroides.

Se prepararon curvas patrón para radioinmunoanálisis (RIA) específico para testosterona y para estradiol con intervalos de medición de 10 a 10 000 pg respectivamente. A las muestras se les agregó una mezcla de reacción testosterona radiactiva-anticuerpo específico o estradiol radiactivo-anticuerpo específico respectivamente y se les dejó reaccionar por 24 hrs a 5°C; pasado este lapso, se separaron las fracciones libre y unida utilizando una mezcla de carbón dextran y se centrifugó a 3000 x g por 10 min. a 5°C (51, 52, 53). Se decantaron las muestras en viales agregándoles 5 ml de líquido de centelleo (Instagel-Tolueno 1:1) y se contaron en un espectrofotómetro beta con una eficiencia para tritio del 55%. La concentración de testosterona y estradiol se calculó en pg/millón de células de Leydig.

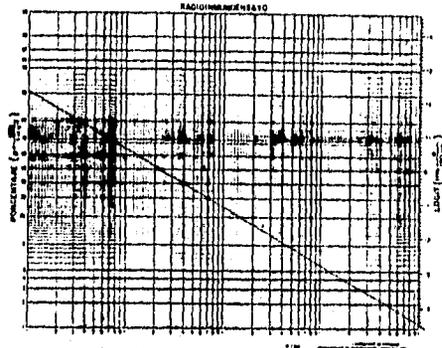
4. Pruebas Estadísticas.

Los datos de las curvas se procesaron para obtener las cuentas por minuto (cpm) promedio y sus respectivos errores estándar, datos necesarios para obtener el porcentaje de unión, el cual junto con la masa de esteroide frío en la curva permitieron construir la curva patrón. Estos datos se ajustaron por medio del método de mínimos cuadrados para obtener una recta de pendiente negativa que representa la curva patrón (54) (fig. 7). Los datos de las muestras se procesaron de igual manera hasta obtener el porcentaje de unión, el cual se interpoló en la curva y se obtuvieron así los picogramos de esteroide presentes en las muestras. Los datos correspondientes a las células tratadas se compararon con sus controles respectivos con la prueba de t de Student de dos colas (55) a una $p < 0.05$.

A

Testosterona

Exactitud: 100.36 %
 Precisión: 1.905 C.V. blancos
 2.0 general
 Sensibilidad: 10 pg (92 % U)
 Rango: de 10 a 10 000 pg
 Dil Ac 1 : 5 000
 Coef reg lin R= 0.97



B

Estradiol

Exactitud: 101.4 %
 Precisión: 1.125 C.V. blancos
 1.5 general
 Sensibilidad: 10 pg (84 % U)
 Rango: de 10 a 10 000 pg
 Dil Ac 1 : 3 000
 Coef reg lin R= 0.11

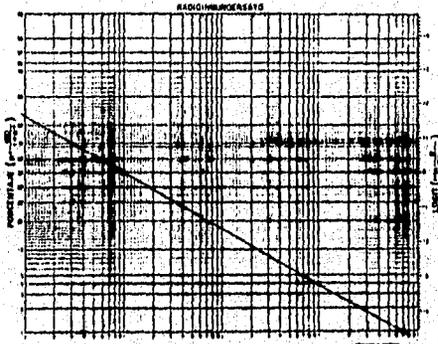


Figura 7.- Curvas estándar y datos del Control de Calidad de los radioinmunoanálisis realizados.

RESULTADOS.

En la Tabla I se muestran las concentraciones de testosterona cuantificadas en el medio de cultivo primario de células de Leydig tratadas con diferentes dosis de dibutirilAMPc. La concentración de la hormona disminuyó de manera significativa a las 12 ó 48 hrs. de cultivo cuando se empleó la dosis mínima (0.05 mM) o media (0.25 mM) de dibutirilAMPc, en comparación con su respectivo control. En cambio, en el período de incubación de 48 hrs. la concentración de testosterona fue similar a su control con las tres dosis utilizadas de dibutirilAMPc.

Tomando en consideración los datos contenidos en la Tabla II, se puede observar que la síntesis de testosterona por las células de Leydig mantenidas en medio de cultivo y tratadas con insulina disminuyó a las 48 hrs. de incubación, cuando se empleó la dosis mínima (10.0 µg/ml), media (50 µg/ml), y máxima (100 µg/ml). Sin embargo a las 12 hrs. de cultivo se observó la tendencia al incremento en la concentración de la hormona, pero cuyo aumento no alcanzó a ser estadísticamente significativo en comparación a su control.

En los medios de cultivo de las células de Leydig suplementados con el factor de crecimiento epidérmico, se observó que la síntesis de testosterona disminuyó de manera significativa a las 48 hrs. de cultivo, en presencia de la dosis mínima o media (10 ó 25 ng/ml, respectivamente) del factor de crecimiento epidérmico. En cambio a las 12 hrs. de incubación se presentó la tendencia al aumento en la concentración de la hormona, con las tres dosis del factor de crecimiento empleadas, pero únicamente fue diferente estadísticamente cuando se empleó la dosis máxima (50 ng/ml). (Tabla III).

En las tablas IV, V y VI se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de estradiol endógeno producido por las células de Leydig, que fueron tratadas con los tres diferentes factores hormonales. Cuando se administró la dosis mínima de dibutirilAMPc, la producción de estradiol disminuyó de manera significativa a las 12 hrs., y este mismo comportamiento se observó a las 24 hrs. de cultivo cuando se utilizó la dosis media del mismo factor. A las 48 hrs. de incubación la síntesis del estradiol se incrementó significativamente con la dosis mínima y media, mientras que con la dosis máxima la concentración de la hormona disminuyó hasta por debajo de su control correspondiente (Tabla IV).

La producción endógena de estradiol en el medio de cultivo suplementado con la dosis media y máxima de insulina disminuyó de manera significativa a las 12 hrs. de cultivo, en comparación con su respectivo control y a las 48 hrs. este evento se presentó con las tres dosis de la hormona, en cambio a las 48 hrs. la síntesis de estradiol disminuyó únicamente en los medios de cultivo suplementados con la dosis mínima y media (Tabla V).

Tabla I.- Producción de testosterona en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal (pg/millón de células) tratadas con diferentes dosis de dibutirilAMPc.

Dosis (mM)	Tiempos de Cultivo		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs
0.0	120.0 ± 13.2	81.5 ± 9.0	150.2 ± 12.3
0.05	42.2 ± 9.5*	54.5 ± 8.3*	158.7 ± 19.6
0.25	53.2 ± 9.7*	56.3 ± 8.4*	132.3 ± 6.1
0.50	77.1 ± 16.2	108.9 ± 21.1	128.2 ± 10.7

Los datos de muestra corresponden a la $\bar{X} \pm \text{EEM}$

* $P < 0.05$ vs. grupo control.

Tabla II.- Producción de testosterona en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal (pg/millón de células) tratadas con diferentes dosis de insulina.

Dosis ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Tiempos de Cultivo		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs
0.0	120.0 \pm 13.2	81.5 \pm 9.0	150.2 \pm 12.3
10.0	144.4 \pm 20.7	93.0 \pm 17.0	84.8 \pm 13.0*
50.0	147.2 \pm 12.5*	108.6 \pm 11.7	77.4 \pm 9.3*
100.0	139.8 \pm 11.8*	84.2 \pm 9.4	81.0 \pm 14.8*

Los datos de muestra corresponden a la $\bar{X} \pm \text{EEM}$

* $P < 0.05$ vs. grupo control.

Tabla III.- Producción de testosterona en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal (pg/millón de células) tratadas con diferentes dosis de EGF.

Dosis (ng / ml)	Tiempos de Cultivo		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs
0.0	120.0 ± 13.2	81.5 ± 9.0	150.2 ± 21.3
10.0	157.5 ± 30.7	77.9 ± 11.2	85.0 ± 9.7*
25.0	156.5 ± 29.4	81.9 ± 8.0	101.4 ± 17.1*
50.0	235.0 ± 44.6*	109.9 ± 22.5	114.5 ± 20.1

Los datos de muestra corresponden a la $\bar{X} \pm \text{EEM}$

* $P < 0.05$ vs. grupo control.

Tabla IV.- Producción de estradiol en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal (pg/millón de células) tratadas con diferentes dosis de dibutirilAMPc.

Dosis (mM)	Tiempos de Cultivo		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs
0.0	40.8 ± 5.9	35.6 ± 4.9	30.9 ± 4.7
0.05	22.2 ± 0.5*	26.8 ± 6.3	43.0 ± 4.1*
0.25	44.7 ± 17.7	28.1 ± 3.1*	49.3 ± 2.4*
0.50	41.2 ± 12.8	20.8 ± 5.3	17.5 ± 3.2*

Los datos de muestra corresponden a la $\bar{X} \pm \text{EEM}$

* $P < 0.05$ vs. grupo control.

Tabla V.- Producción de estradiol en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal (pg/millón de células) tratadas con diferentes dosis de insulina.

Dosis ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Tiempos de Cultivo		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs
0.0	40.8 ± 5.9	35.6 ± 4.9	30.9 ± 4.7
10.0	32.6 ± 6.4	$24.0 \pm 1.6^*$	$19.7 \pm 3.4^*$
50.0	$16.4 \pm 2.6^*$	$27.7 \pm 1.7^*$	$21.8 \pm 2.6^*$
100.0	$22.6 \pm 2.9^*$	$18.9 \pm 4.3^*$	40.3 ± 9.3

Los datos de muestra corresponden a la $\bar{X} \pm \text{EEM}$

* $P < 0.05$ vs. grupo control.

Tabla VI.- Producción de estradiol en cultivos primarios de células de Leydig de rata adulta normal (pg/millón de células) tratadas con diferentes dosis de EGF.

Dosis (ng / ml)	Tiempos de Cultivo		
	12 hrs	24 hrs	48 hrs
0.0	40.8 ± 5.9	35.6 ± 4.9	30.9 ± 4.7
10.0	27.8 ± 3.2	20.0	26.5, 26.5
25.0	15.3 ± 1.7*	13.0, 28.5	40.0
50.0	13.3 ± 1.7*	14.5a	12.0, 13.0

Los datos de muestra corresponden a la $\bar{X} \pm EEM$

* $P < 0.05$ vs. grupo control.

En la Tabla VI se observa que existe una tendencia a la disminución de manera significativa en la producción de estradiol a las 12 hrs. de incubación con todas las dosis empleadas del factor de crecimiento epidérmico. En los otros dos periodos de incubación no es posible hacer comparaciones estadísticas dado que la mayoría de las muestras fueron no detectables en la curva patrón (Figura 7B) ya que se encontraron fuera de los límites de sensibilidad del ensayo.

En el panel superior de la figura 8 se pueden apreciar los efectos de las dosis máximas de los tres factores empleados en el ensayo. Cuando se administra dibutirilAMPc (0.50 mM) se estimula la producción de testosterona desde 64% a las 12 hrs. hasta 134% a las 24 hrs., no obstante registrarse posteriormente un descenso hacia las 48 hrs. (85%). En cuanto al efecto de la insulina administrada (100 µg/ml); a las 12 hrs. de incubación se registra 116% en la producción disminuyendo hasta 54% a las 48 hrs. de incubación. El efecto del factor de crecimiento epidérmico (50 ng/ml) es el de disminuir la producción endógena desde 196% a las 12 hrs. hasta 76% a las 48 hrs.

Por lo que respecta a los efectos de las dosis máximas de los factores sobre la producción de estradiol (figura 8 panel inferior), al agregar dibutirilAMPc e incubar por 12 hrs. no se aprecia cambio alguno (100%), mientras que a las 24 y 48 hrs. se aprecia una disminución de casi el 50% en la producción endógena de estradiol. El efecto de la insulina marca un aumento en la producción endógena de estradiol ya que va desde 55% a las 12 hrs. hasta 130% a las 48 hrs. de incubación. En cuanto a los efectos de la dosis máxima del factor de crecimiento epidérmico se observa la tendencia al estímulo en la producción de estradiol partiendo de 33% a las 12 hrs. hasta 40% para las 24 y 48 hrs., sin embargo estos datos corresponden a las únicas muestras detectables, una y dos respectivamente, para cada período de incubación.

Comparando las gráficas de la producción porcentual de los esteroides (figura 9) en el panel A correspondiente al efecto del dibutirilAMPc se aprecia un 64% de la producción control de testosterona a las 12 hrs. mientras que de estradiol se presenta un 100%, sin embargo hacia las 24 hrs. la producción de estradiol se disminuye casi al 50% y se mantiene hasta las 48 hrs. mientras que la producción de testosterona se aumenta para las 24 hrs. a más del doble de las 12 hrs. (134%) registrando un descenso a las 48 hrs. hasta 85% de la producción control.

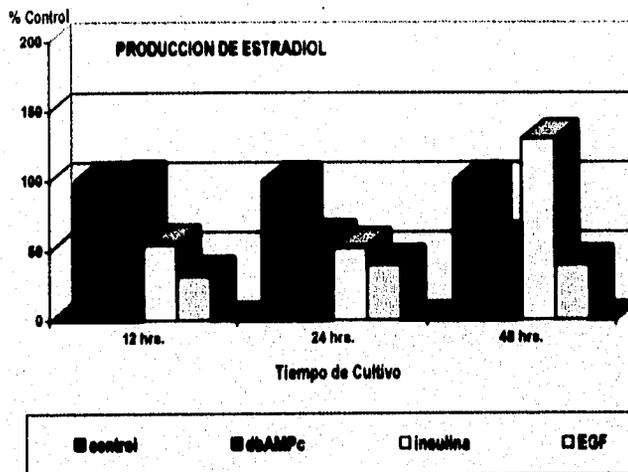
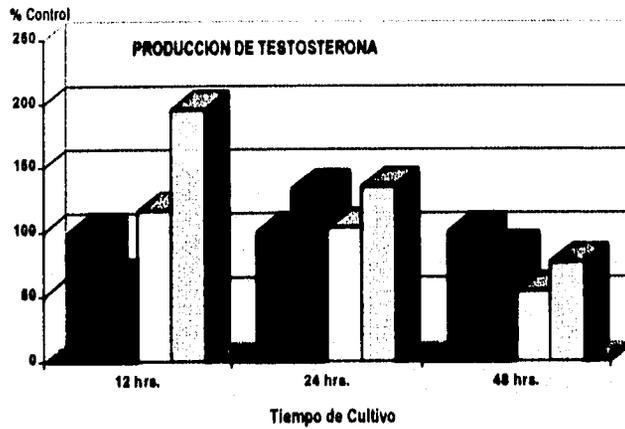


Figura 8.- Comparación porcentual de la producción de testosterona y estradiol por células de Leydig estimuladas por concentraciones máximas de dibutililAMPc, insulina, y EGF comparadas con el control a las 12, 24 y 48 hrs de cultivo.

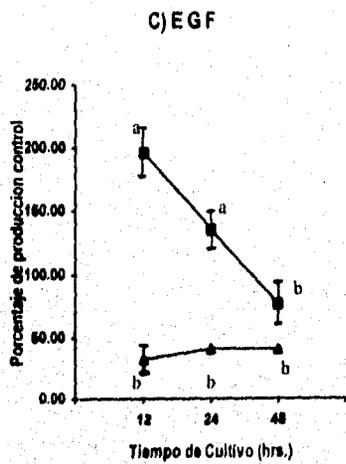
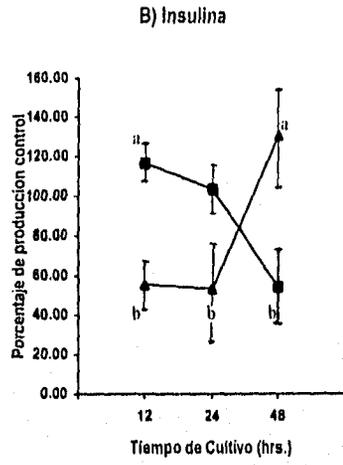
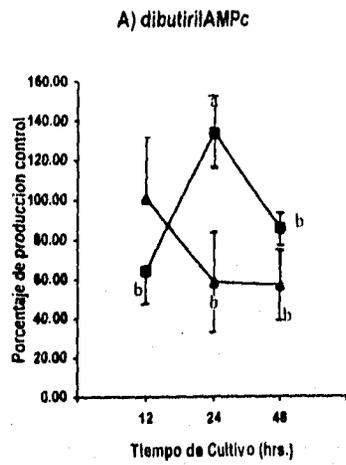


Figura 9.- Porcentajes de producción control de esteroides por células de Leydig estimuladas con dosis máximas de dibutirilAMPc, insulina y EGF.

■ --- ■ Testosterona
 ▲ --- ▲ Estradiol

a: Mayor que el control respectivo.

b: Menor que el control respectivo

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

En el panel correspondiente a la estimulación con insulina (figura 9B), se observa un decremento en la producción de testosterona que va desde 116% a las 12 hrs. hasta un 54% a las 48 hrs., efecto contrario se observa en la actividad de aromatasa ya que la producción de estradiol se aumenta desde 55% a las 12 hrs. hasta 130% a las 48 hrs. de incubación.

En cuanto al panel inferior de la misma figura podemos observar que al estimular a las células de Leydig con una dosis máxima del factor de crecimiento epidermal se aprecia un decremento en la producción de testosterona de 12 a 24 hrs. (196% a 76%) mientras que se observa una tendencia a quedar constante la síntesis de estradiol en todos los tiempos de incubación (33 a 40%).

DISCUSIÓN.

Con dosis máxima de dibutirilAMPc (0.5 mM) se observó un aumento en la síntesis de testosterona de las 12 a las 24 hrs mientras que para las 48 hrs parece haberse terminado la poza de pregnenolona mientras a esa misma dosis la producción de estradiol se disminuyó durante todo el periodo de incubación, lo cual confirma la capacidad estimuladora del dibutirilAMPc sobre la síntesis de testosterona reportada por otros autores (30, 36, 40, 41) y se refleja una disminución aparente de la actividad de aromatasa, efecto semejante al que Valladares y Payne (38) reportan para células inmaduras, pero contrastando con lo reportado para células de Leydig maduras incubadas a tiempos cortos y estimuladas con hCG (28, 29)

Estos datos nos permiten observar que a la dosis máxima utilizada la producción basal de testosterona parece incrementarse de 12 a 24 hrs pero la actividad de aromatasa parece inhibirse casi hasta un 50%.

En cuanto a los resultados de adicionar insulina o factores de crecimiento análogos a los cultivos de células de Leydig, Lin y col (45), Syed y col (41) y Gelber y col (46) sustentan que el IGF-I potencia el efecto de hCG y LH de manera dosis dependiente, mientras que adicionándolo en forma separada no presenta efecto sobre la producción de esteroides. Estos autores han sugerido que pudiera actuar sinérgicamente con LH ya que en cultivos primarios de células de Leydig la respuesta celular se ve incrementada, subiendo los niveles de AMPc y por consiguiente la respuesta esteroidogénica se incrementa. Aquí sería necesario tomar en cuenta que la insulina no actúa directamente en la biosíntesis de esteroides, sino que al parecer su efecto es debido a que acelera las respuestas fisiológicas de las células y por consiguiente su efecto sobre la esteroidogénesis es indirecto.

Al analizar la producción de las hormonas esteroides cuantificadas, la insulina pareciera no tener efecto sobre la síntesis de testosterona durante las primeras 24 hrs (figs. 8 y 9), ya que el incremento de producción a las 12 hrs apenas si es diferente significativamente con respecto a su control, mientras que es capaz de disminuir la producción casi hasta un 50% para todas las dosis hacia las 48 hrs (tabla II). Por otro lado, la producción de estradiol se disminuyó aproximadamente un 50% de manera significativa desde el inicio del cultivo con la excepción del punto de la dosis máxima a 48 hrs, en donde se observa un incremento no muy claramente explicable (figs. 8 panel inferior y 9 panel superior derecho).

Cabe señalar que los efectos inhibitorios de insulina reportados sobre la síntesis de testosterona se presentan hasta

las 48 hrs de cultivo, período que no se había reportado hasta el momento. Por lo que respecta a la producción de estradiol, los datos aquí presentados son el primer reporte de células de Leydig en cultivo primario.

Nuestros resultados muestran un aumento en la producción basal de testosterona a 12 y 24 hrs mientras que la producción de estradiol disminuye en todos los tiempos de cultivo utilizando una dosis máxima de EGF (fig. 9C). Comparando estos resultados con lo reportado en la bibliografía, podemos observar que la producción de testosterona se modifica de una manera similar a lo señalado por Syed y col. (41), ya que según sus estudios, EGF aumenta la producción basal de testosterona y no tiene efecto sobre la testosterona inducida por LH o dibutirilAMPc. Esto último concuerda con lo reportado por Welsh y Hsueh (48) que mencionan un efecto de EGF en un punto distal de la formación de AMPc, lo cual explicaría por qué no hay efecto sobre la producción de testosterona inducida por dibutirilAMPc.

Por otra parte existe una contradicción entre lo estipulado por Welsh y Hsueh (48) y Syed y col (41) en cuanto a la producción basal de testosterona, ya que los primeros sostienen que ésta se mantiene igual después de adicionar EGF mientras que la concentración de testosterona en células de Leydig estimuladas con hCG disminuye, lo que sugiere una inhibición parcial de la actividad de 17α -hidroxilasa y C17,20 liasa, mientras que Syed y col. sostienen que existe un aumento en la producción basal de testosterona y ningún efecto sobre la testosterona inducida por LH. Tales diferencias se pueden deber a que sus estudios se realizaron en células de Leydig de organismos de diferente especie y diferentes condiciones experimentales. En este sentido, nuestro trabajo se realizó en células de rata adulta normal mientras que Welsh y Hsueh utilizaron rata adulta hipofisectomizada y Syed y col. utilizaron células de Leydig humanas de pacientes orquidectomizados, con cáncer de próstata, de 63 a 81 años de edad.

Dado que no existe más información referente al efecto de EGF sobre células de Leydig de rata adulta normal no podemos hacer una comparación más extensa de los resultados obtenidos y sólo podemos señalar que en nuestro modelo el EGF aumentó la producción de testosterona a 12 hrs y también a las 24 hrs, tendiendo a disminuir la actividad de aromatasa en todos los tiempos de cultivo analizados (tablas III y VI, fig. 9C).

Sería conveniente en estudios posteriores realizar diferentes mediciones metabólicas (consumo de glucosa, concentraciones de lactato y piruvato, etc...) que pudieran apoyar la hipótesis de que los efectos de los factores ensayados en el trabajo, están dirigidos primeramente hacia modificaciones del metabolismo celular general, y sólo secundariamente hacia los cambios en la actividad esteroideogénica.

CONCLUSIONES.

* Es posible cuantificar las concentraciones de testosterona y estradiol por medio de RIA en medios de cultivo de células de Leydig de rata adulta normal mantenidas en cultivos de hasta 48 hrs de incubación.

* El dibutirilAMPc a una concentración de 0.50 mM estimuló la producción de testosterona a 12 y 24 hrs de cultivo y aparentemente disminuyó la actividad de aromatasa de las 24 a las 48 hrs de incubación.

* La insulina afecta a toda la vía esteroidogénica disminuyendo la producción de testosterona de manera significativa a las 48 hrs de cultivo mientras que la producción de estradiol se disminuyó desde el inicio del cultivo a excepción de las 48 hrs, dato no explicable claramente.

* A la dosis máxima utilizada de EGF (50 ng/ml) la producción de testosterona se incrementa a las 12 y 24 hrs mientras que a todos los tiempos de cultivo la actividad de aromatasa presenta una tendencia aparente a la disminución.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Mc Donald L.E. (1978). Reproducción y Endocrinología Veterinaria, 2a. edición, Interamericana, México, p.p. 18-32 y 201-234.
- 2) Tepperman J. (1980). Fisiología metabólica y Endocrinología, 3a. edición, Interamericana, México, p.p. 64-80.
- 3) Vander A.J., Sherman J.H. y Luciano D.S. (1980). Fisiología humana, Mc Graw-Hill, México, p.p. 283-288 y 334-340.
- 4) Quevauvillers J. (1979). Cuadernos de la enfermera No. 5 Endocrinología, Toray-Masson, Madrid, p.p. 1,2 y 150-152.
- 5) Sánchez S.O. y Lima G.S. (1980). Biología, 2o. curso, Editorial Herrera, México, p.p. 185 - 186.
- 6) Beck W.S. (1977). Fisiología, Publicaciones Culturales, México, p.p. 214-229, 629-638 y 715.
- 7) Guyton A.C. (1986). Tratado de Fisiología Médica, 7a. edición, Interamericana, México, p.p. 868-873 y 876-878.
- 8) Cormack H.D. (1987). Histología de HAM, 9a. edición, Harla, México, p.p. 725-731 y 797-824.
- 9) Bloom W. & Fawcett D.W. (1975). A Textbook of Histology, 20th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, p.p. 805-857.
- 10) Leeson R. y Leeson T.S. (1985). Histología, 4a. edición, Interamericana, México, p.p. 517-554.
- 11) Miller W.L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Rev* 2:295.
- 12) Martin A.W., Mayes P.A. y Rodwell V.W. (1989). Bioquímica de Harper, 9a. edición, Harla, México, p.p. 479-514.
- 13) Saez J.M., Perrard-Sapori M.H, Chatelain P.G., Tabone E. y Rivarola M.A. (1987). Paracrine regulation of testicular function. *J Steroid Biochem* 27:317.
- 14) Sharpe R.M. (1985). Intratesticular regulation of testosterone secretion: Comparison of the effects and interactions of hCG, an LHRH agonist and testicular fluid on Leydig cell testosterone secretion *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 41:247.

- 15) Means A.R., Dedman J.R., Tindall D.J. y Welsh M.J. (1978). Hormonal regulation of Sertoli cell. *Int J Androl Suppl* 2:403.
- 16) Lacroix M., Smith F.E. y Fritz I.B. (1977). Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell-enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol* 2:227.
- 17) Krueger P.M., Hodgen G.D. y Sherins R.J. (1974). New evidence for the role of the Sertoli cell and spermatogonia in feedback control of FSH secretion in male rats. *Endocrinology* 95:955.
- 18) Thanki K.N. y Steinberger A. (1977). Effects of age and hypophysectomy on FSH binding by rat testis. *Andrologia* 2:307.
- 19) Vigersky R.A., Loriaux D.L., Howards S.S., Hodgen, G.D., Lipsett M.B. y Chambach A. (1976). Androgen binding proteins of testis, epididymis and plasma in man and monkey. *J Clin Invest* 58:1061.
- 20) Hsu A-F y Troen P. (1978). An androgen binding protein in the testicular cytosol of human testis. *J Clin Invest* 61:1611.
- 21) McCullagh D.R. (1932). Dual endocrine activity of the testis. *Science* 72:19.
- 22) Schwartz N.B. y Channing C.P. (1975). Evidence of ovarian "inhibin": Suppression of the secondary rise by injection of porcine follicular fluid. *Proc Nat Acad Sci USA* 74:5721.
- 23) Steinberger A. y Steinberger E. (1976). Secretion of an FSH inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 99:912.
- 24) Steinberger E. y Chowdhury M. (1974). Control of pituitary FSH in male rats. *Acta Endocrinol* 76:235.
- 25) Bartke A, Hafiez A.A., Bex J.F. y Dalterio S. (1978). Hormonal interactions in regulation of androgen secretion. *Biol Reprod* 18:44.
- 26) Besser G.M. y Thorner M.D. (1975). Prolactin and gonadal function. *Pathol Biol (Paris)* 23:179.
- 27) Dufau M., Hsueh J., Cigorruga S., Backal A.J. y Catt K.J. (1978). Inhibition of Leydig cell function through hormonal regulatory mechanism. *Int J Andrology Suppl* 2:19.

28) Bustos Rosas J. (1991). Efecto de los tratamientos térmico y enzimático sobre la actividad moduladora de la esteroidogénesis de células de Leydig presente en el medio condicionado de células de Sertoli. Tesis para obtener el título de Biólogo ENEP Zaragoza UNAM, 33 p.p.

29) García Castro J.R. y Rodríguez Maldonado E. (1989). Evaluación del efecto de medio condicionado de células de Sertoli sobre la función esteroidogénica de células de Leydig del testículo de rata adulta normal. Tesis para obtener el título de Biólogo ENEP Zaragoza UNAM, 46 p.p.

30) Saez J.M., Sánchez P., Berthelon M.C. y Avallet O. (1989). Regulation of pig Leydig cell aromatase activity by gonadotropins and Sertoli cells. *Biol Reprod* 41:813.

31) Rommerts R.F., de Jong F., Brinkmann A.O. y Van der Molen M.J. (1982). Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fert* 65:281.

32) Janecki A., Jakubowiak A. y Lukaszyc A. (1985). Stimulatory effects of Sertoli Cell secretion products on testosterone secretion by purified Leydig cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 14:227.

33) Callard G., Mak P. y Dubois W. (1989). Regulation of spermatogenesis: The shark testis model. *J Exp Zool Suppl* 2:23.

34) Rommerts F.F.G., Teerds K., Themmen A.P.N. y Van Noort M. (1987). Multiple regulation of testicular steroidogenesis. *J Steroid Biochem* 27:309.

35) Payne A.H., Perkins L.M., Georgius G. y Quinn P.G. (1987). Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol. *Steroids* 50:435.

36) Rommerts F.F.G. y Brinkman O.A. (1981). Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 21:45.

37) Valladares L.E. y Payne A.H. (1979). Acute stimulation of aromatization in Leydig cell by human chorionic gonadotropin *in vitro*. *Proc Nat Acad Sci USA* 76:4460.

38) Valladares L.E. y Payne A.H. (1981). Effects of hCG and cyclic AMP on aromatization in purified Leydig cell of immature and mature rats. *Biol Reprod* 25:752.

- 39) Dorrington J.H., Fritz I.B. y Amrmstrong A.T. (1978). Control of testicular estrogen synthesis. *Biol Reprod* **18**:55.
- 40) Valladares L.E. y Payne A.H. (1979). Induction of testicular aromatization by luteinizing hormone in mature rat. *Endocrinology* **105**:431.
- 41) Syed V., Khan S.A. y Nieschlag E. (1991). Epidermal growth factor stimulates testosterone production of human Leydig cells *in vitro*. *J Endocrinol Invest* **14**:93.
- 42) Adashi E.Y., Resnick C.E., Brodie A.M.H., Svoboda M.E. y Van Wyk J.J. (1985). Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **117**:2313.
- 43) Jaillard C., Chatelain P.g. y Saez J.m. (1987). *In vitro* regulation of pig Sertoli cell growth and function; Effects of fibroblast growth factor and Somatomedin-C. *Biol Reprod* **27**:665.
- 44) Rigaudiere N., Grizard G. y Boucher D. (1989). Aromatase activity in purified Leydig cells from adult rat. Comparative effects of insulin, IGF-I and hCG. *Acta Endocrinol* **121**:677.
- 45) Lin T., Haskell J., Winson N. y Terracio L. (1987). Direct stimulatory effects of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **137**:950.
- 46) Gelber S.J., Hardy M.P., Mendis-Handagama S.M.L.Ch y Casella S.J. (1992). Effects of insulin-like growth factor-I on androgen production by highly purified pubertal and adult rat Leydig cells. *J Andrology* **13**:125.
- 47) Holding C.H. y Westermark B. (1989). Growth factors as transforming proteins. *Eur J Biochem* **184**:478.
- 48) Welsh T.H. Jr y Haueh A.J.W. (1982). Mechanism of the inhibitory action of epidermal growth factor on testicular androgen biosynthesis *in vitro*. *Endocrinology* **110**:1498.
- 49) Verhoeven G. y Cailleau J. (1986). Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cell. *Molecular and cellular Endocrinology* **47**:99.
- 50) Bermúdez J.A., Herrera J. y Mendieta E. (1988). Evaluación de los métodos de aislamiento y purificación de células de Leydig y Sertoli. *Arch Invest Med Méx* **19**:291.

51) Reeves B.D. y Calhoun D.W. (1970). Reliability criteria for saturation analysis of steroids by competitive protein binding. Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology. Stockholm, p.p. 61-78.

52) Bermúdez J.A., León C. y Herrera J. (1973). Fundamento y estudio comparativo de dos métodos de análisis por saturación. Rev Med IMSS 12:11.

53) Lee-Benítez D., León C., Herrera J., González-Bárcena D. y Bermúdez J.A. (1973). Métodos de análisis por saturación para cuantificar cortisol y testosterona. Archiv Inv Med 4:7.

54) Freund J.E. y Manning S.R. (1988). Estadística, 4a edición, Prentice Hall Hispanoamericana S.A., México, p.p.458-473.

55) Caballero D. (1973). Estadística práctica para Dasonomos. Subsecretaría Forestal y de la Fauna. Dirección General de Inventario Nacional Forestal. S.A.G. No. 26, México, p.p. 45-57.