



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

BO 1280/96

g-1

"IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS DE UNION O  
CONEXINAS, PRESENTES EN LAS UNIONES  
COMUNICANTES ENTRE CELULAS CULTIVADAS DE  
LEYDIG DE RATON"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

*José C. Luna Muñoz*



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX., DICIEMBRE 1996



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**El presente trabajo se realizó bajo la**

**DIRECCION:**

**Dra. Elia Martha Pérez Armendariz**

**Co-DIRECCION de:**

**Dra. Martha Romano Pardo**

**se realizó en:**

**Department of Neurociences, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N.Y.,  
10461.**

**y**

**Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de  
Investigación y Estudios Avanzados del IPN. México, D. F., 07000.**

Este proyecto fue financiado con fondos de la Dra. E.M. Pérez-Armendariz obtenidos de los donativos, NS07512 (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N.Y.) y DJ38529 (National Institute of Health, Bethesda, MD).

Fue premiado, haciéndose acreedor a un financiamiento de viaje para su presentación en la "Reunión Internacional de Gap Junctions", celebrado en Hiroshima, Japón, 1993.

No existe ningún problema que no te aporte  
simultáneamente un don.

Busca los problemas por que necesitas sus dones.

Richard Bach.

## **DEDICO ESTA TESIS**

Especialmente a mis padres: Yolanda Muñoz Sánchez y Miguel Luna Tinajero de quienes he recibido su apoyo incondicional en todo momento para ver realizado sus anhelos y mis sueños.

A mis hermanos: Yolanda, Eva, Miguel, Ana y Elvia. que siempre nos hemos dado apoyo incondicional en los buenos y malos momentos.

Con gran amor a: mi esposa Amparo Viramontes Pintos. que durante el desarrollo de mis estudios profesionales estuvo siempre a mi lado alentándome en los momentos difíciles y de carestía, alegrándome en los días tristes y duplicando mi felicidad en aquellos alegres, de igual forma seguimos compartiendo nuestras vidas.

A mis hijos: Nabil Itzi y José Emmanuel que son la base de mi existencia y estímulo por ser mejor.

A la memoria de mi abuelita Marcelina Tinajero Caballero.

A mi amiga "Adrian" que me ha brindado su amistad y cariño incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Dra. Martha Pérez Armendariz. Por su valioso apoyo en el desarrollo de este trabajo, por transmitirme gran parte de sus conocimientos que ahora son la base de mi superación. Además por brindarme su amistad y cariño. Del Depto. de Neurociencias. Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N.Y.

A la Dra. Marta Romano Pardo. Por brindarme abiertamente su laboratorio y por las sugerencias y consejos recibidos para mejorar el presente trabajo. Del Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV I.P.N.

Al Dr. Raúl Mena López. Por transmitirme gran parte de sus conocimientos, y alentarme a ser siempre mejor, así como brindarme su valiosa amistad. Del Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV I.P.N.

Al Dr. H. Arechiga, y al Dr. V. Tsutsumi, y al Dr. M. Cereijido, por haberme facilitado el uso de su equipo e instalaciones para el desarrollo de este proyecto. Del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del, I.P.N.

A la Biol. Carolina Miranda. Por su ayuda y enseñanza en los cultivos primarios de células de Leydig. Del Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV I.P.N.

Al Dr. E. Hertzberg. Por haberme provisto de los anticuerpos principalmente utilizados en este estudio. Del Depto. de Neurociencias, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N.Y.

Al Dr. M.V.L. Bennett. Por haber apoyado mi estancia en el laboratorio. Del Depto. de Neurociencias, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N.Y.

Al Dr. Juan Sáez y la Dra. Viviana Berthoud. Por la gran amistad que me brindaron en un país extraño. Del Depto. de Neurociencias, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, N.Y.

A mi gran Amigo Dagoberto Tapia Ramírez, por su gran amistad y consejos durante los curso de la carrera y en el desarrollo de esta tesis.

Al fotógrafo Juan Rivera C. De la unidad de fotografía. Del Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias. CINVESTAV I.P.N.

A Francisco García S., Jorge Guevara F., Rodolfo González D., Rafael Govea, Olga Villegas, Ikuri Alvarez, Lourdes Alarcón e Ivan Erick Mitre. Por su amistad y por el ambiente que hacíamos en el laboratorio. "ya no seré bachiller".

A Bertha Alicia León C., Marisol Galván V. Por sus sugerencias en la redacción del presente trabajo.

Al Ing. Héctor Carpi G. de Fibra glass de México. Por su apoyo durante el término de la licenciatura. ***"La hora más oscura de la noche es un poco antes de que amanezca"***. Así como por la amistad que me brindan el Inge, Joaquín, José Luis, Don Celes y Don Porfis.



## INDICE.

<b>RESUMEN</b>	3
<b>INTRODUCCION</b>	
Comunicación intercelular	5
Uniones comunicantes	5
Células de Leydig	12
Anticuerpos	19
Ventajas y desventajas de los anticuerpos monoclonales y policlonales	22
<b>OBJETIVOS</b>	23
<b>METODOS</b>	
Cultivo de células	24
Identificación celular	25
Evaluación del acople con colorantes fluorescentes entre las células de Leydig en cultivo	26
Criosecciones de tejidos	26
Anticuerpos	27
Inmunofluorescencia indirecta	28
“Immunoblot”	29

Análisis estadístico.	30
<b>RESULTADOS</b>	
Identificación celular	31
Identificación de las conexinas presentes en las células de Leydig	33
Efecto de la LH, hCG, AMPc en la expresión de la Cx43	35
Efecto de la LH, hCG, AMPc en la comunicación intercelular	36
<b>FIGURAS</b>	39
<b>DISCUSION</b>	49
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	54

## ABREVIATURAS

ACS	Anticuerpos
Aac	Aminoácidos
Ag	Antígeno
AL	Amarillo lucifer
c.i	Comunicación intercelular
Cx26	Conexina 26
Cx32	Conexina 32
Cx43	Conexina 43
C <sub>H</sub>	Región constante de la cadena pesada
db-AMPC	Dibutiril-Adenocín monofosfato cíclico
DHT	Dihidrotestosterona
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de ganadotropina
H	Cadenas pesadas
hCG	Hormona gonadotropina coriónica
IF	Inmunofluorescente
KDa	Kilodalton
L	Cadenas ligeras
LBD	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante

p.m	Peso molecular
UC	Uniones comunicantes
V <sub>H</sub>	Región variable de la cadena pesada
V <sub>L</sub>	Región variable de la cadena ligera
WB	Western blots (immuno blots)

## 1.0 RESUMEN

Las uniones comunicantes (UC) son conglomerados de canales que permiten la comunicación intercelular directa. Se sabe, que las células de Leydig del testículo están acopladas eléctricamente (*Pérez Armendariz., et al. 1994*) y que la inyección de marcadores fluorescentes a una célula transfiere a las células vecinas (*Kawa K. 1987*). El objetivo de esta tesis, fue el identificar las conexinas que se expresan entre las células de Leydig tanto *in situ* como *in vitro*, así como estudiar el efecto de las principales hormonas que regulan la secreción de testosterona, la hormona luteinizante (LH) y la hormona gonadotropina coriónica (hCG), en la comunicación intercelular (c.i) y en la expresión de las uniones comunicantes. Para esto se utilizaron testículos aislados y cultivos celulares enriquecidos con células de Leydig de ratón.

Para identificar y mapear la expresión de las conexinas, utilizamos anticuerpos específicos dirigidos contra las conexinas, Cx26, Cx32 y Cx43, en combinación con técnicas de inmunotinción, como la inmunofluorescencia indirecta en secciones congeladas de tejido así como "immunoblots" o "Western blots" (WB). En las secciones congeladas de testículo, así como en cultivo, las zonas de aposición membranal entre las células de Leydig expresaron la Cx43, pero no la Cx 26 ó Cx32. Para estudiar el efecto de las hormonas sobre las UC, se monitorió la c.i y la expresión de la Cx43 en conglomerados celulares (6-10 células) cultivados por 8, 24 y 36 h, en condiciones control y en medio tratado con 100 ng/ml LH, 10 ng/ml

de hCG ó 1 mM de dibutiril AMP cíclico (db-AMPc). Para mapear la expresión de la Cx43 se incubaron las células con un anticuerpo dirigido contra esta proteína y se realizó la inmunofluorescencia indirecta y para la c.i. se utilizó la inyección del colorante amarillo de Lucifer (AL).

En los cultivos control y tratados por 8 h, el AL se transfirió en un 90 % a sus vecinas. Además, se detectó una abundante tinción inmunofluorescente (IF) en las zonas de aposición membranal entre las células de Leydig con el anticuerpo anti Cx43 semejante a la encontrada *in situ*. En cultivos controles a las 24 y 36 h la transferencia del AL se redujo a un 46 y 21% de sus vecinas respectivamente; la tinción IF de las aposiciones membranales disminuyó drásticamente. En contraste, en cultivos tratados por 24 y 36 h con LH, hCG o db-cAMP, la transferencia del AL y la expresión de la Cx43 no disminuyó, e incluso aparentemente se incrementó. Estas observaciones fueron confirmadas por estudios de WB en homogenados de cultivos celulares enriquecidos en células de Leydig.

En conclusión, en este trabajo encontramos que la LH y la hCG estimulan la expresión de las UC y la comunicación intercelular en las células de Leydig, posiblemente a través de la activación de un mecanismo dependiente del AMP cíclico.

## **2.0 INTRODUCCION.**

### **2.1 Comunicación intercelular.**

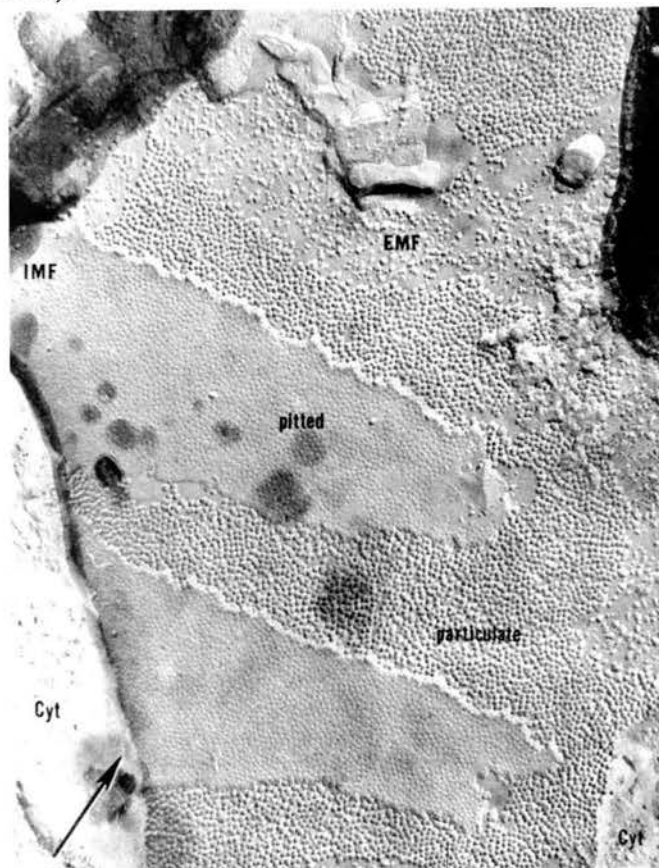
El concepto de comunicación intercelular (c.i) surge en los primeros años del siglo XX cuando Santiago Ramón y Cajal (1933), estableció que las neuronas son entidades independientes. Esta individualidad neuronal, hizo difícil entender, que la función altamente coordinada del sistema nervioso resultara de la simple suma de la actividad de millones de células, por lo cual se introdujo el concepto de c.i. la cual puede participar en la coordinación de las actividades de los componentes celulares, de la proliferación y diferenciación celular (*Ramón et al., 1988*).

Existen diferentes tipos de c.i. en los tejidos, uno de éstos es la liberación de señales moleculares que se transfieren a través del fluido extracelular, las cuales interactúan con los receptores específicos en las células blanco (comunicación hormonal y transmisión química sináptica). Otro tipo es la comunicación directa a través de uniones comunicantes, la cual provee vías directas de comunicación en células acopladas (*Pitts J.D., 1980, Saéz J.C. y Spray D. C., 1991, Bennett et al., 1991*). En este proyecto nos enfocamos al estudio de este último tipo de c.i.

### **2.2 Uniones Comunicantes.**

Actualmente se sabe que en la mayor parte de los tejidos, las células se encuentran interconectadas por uniones comunicantes (UC) ó "Gap Junctions". Las

UC son una especialización de la membrana plasmática, y están formadas por un conglomerado de canales que permiten la comunicación directa entre dos células (Dermietzel et al., 1990).



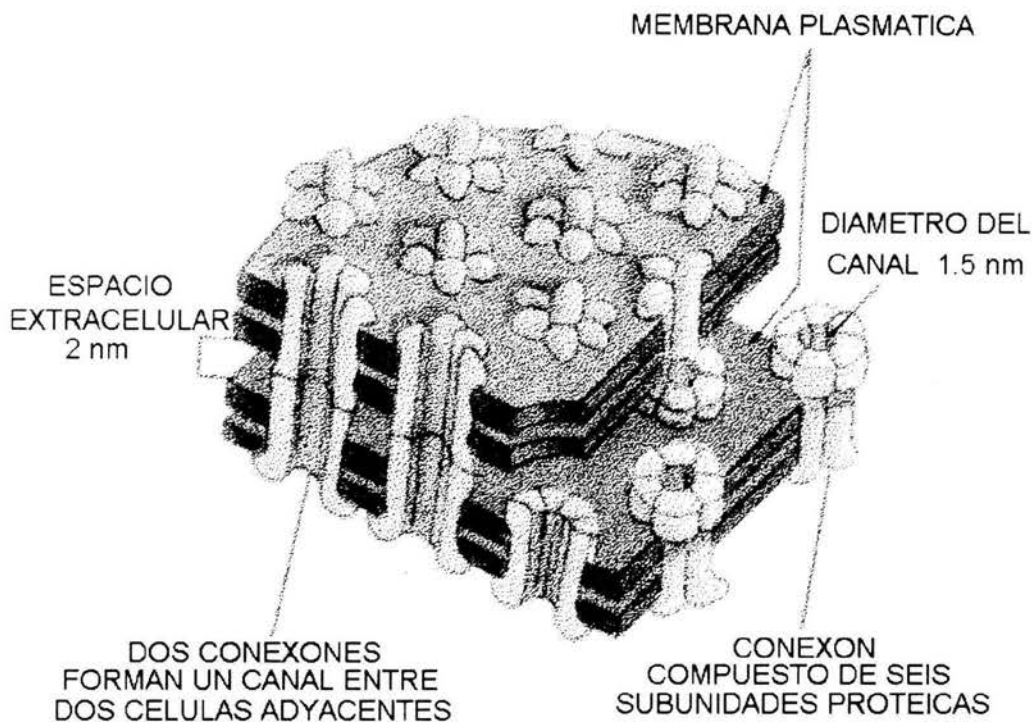
Esquema 1. Réplica de criofractura de la unión comunicante de hígado de ratón. El arreglo hexagonal de depresiones (Pitted) en la cara de la membrana intercelular (IMF) es complementario del arreglo de partículas (particulate) de la fase de la cara de la membrana extracelular (EMF). Se puede ver el citoplasma (Cyt) de dos hepatocitos en aposición. Tomado de Goodenough D. y Revel J. 1970

Las UC están separadas por un estrecho espacio extracelular de aproximadamente 2 nm (Robertson D.J., 1963, Revel J.P. y Karnovski M. J., 1967, Alberts Bruce et al., 1994).



Con respecto a su caracterización estructural, Robertson en 1957, describe por primera vez las primeras imágenes de lo que ahora conocemos como UC. Encontró que estas estructuras en los cortes perpendiculares se veían como zonas densas en las aposiciones membranales, en las regiones de contacto celular, lo que sugería una especialización de la membrana. Furshpan y Potter en 1959 Ahondando en el estudio de estas estructuras registraron por primera vez el acople eléctrico celular, y proponen que las UC son un organelo membranal que constituye la base anatómica de la transmisión eléctrica. (*Ramón et al., 1988, Karrer H.E. y Cox., 1974*).

Posteriormente, *Revel y Karnovsky., (1967)*, analizando secciones finas de tejido impregnadas con lantano en combinación con microscopía electrónica, confirmaron que las UC están compuestas de múltiples canales (inicialmente descritas por *Robertson en 1963*) los cuales contienen en su centro un poro permeable (que comunica a ambas células). Las subunidades o canales de la placa de unión son estructuras hexagonales, imágenes que ahora sabemos que corresponden al conexón o hemicanal (*Bennett et al., 1991, Dermietzel et al., 1990., Unwin P. N. y Zampighi G., 1980*). El conexón es la mitad del canal que cada célula provee (*Dermietzel et al., 1990*). La distancia de centro a centro entre estas subunidades es de 90 a 95 Å, el diámetro de cada una de estas subunidades es de 70 a 75 Å y el diámetro de un poro que se encuentra en el centro de cada subunidad es de 10 a 20 Å. (*De Robertis., 1990, Alberts Bruce et al., 1994*). Actualmente se sabe que el poro permite el paso de moléculas de pequeño tamaño de aproximadamente 1 KDa (*Simpson I. y Rose B., 1976*). (ver esquema 2)



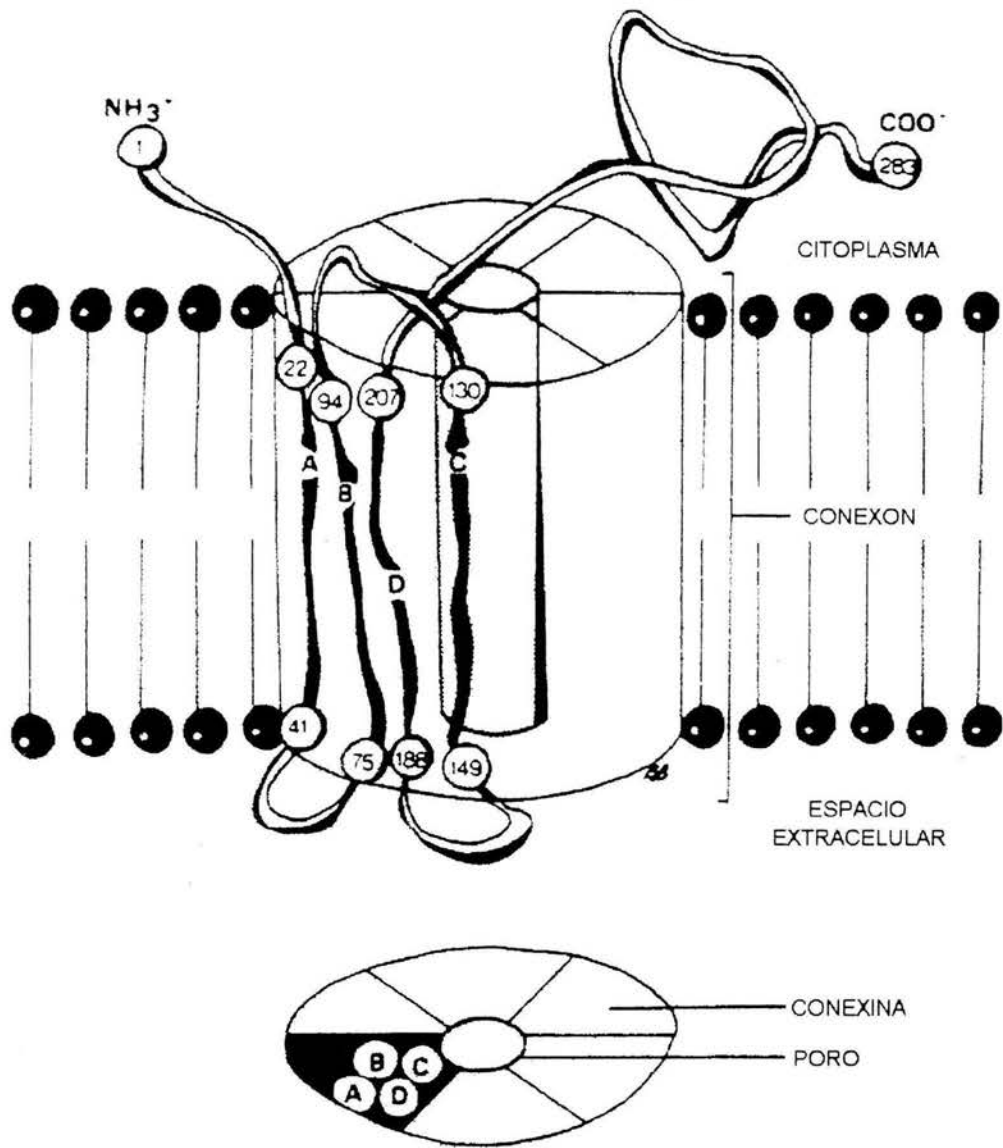
Esquema. 2. **Modelo de la unión comunicante.** El dibujo muestra la interacción de las membranas plasmáticas de dos células adyacentes. La bicapa de lípidos es penetrada por las proteínas ensambladas llamadas conexones, cada uno de los conexones está formado por seis subunidades proteicas idénticas llamadas conexas. Dos conexones forman la comunicación intercelular que es un canal acuoso que conecta a las dos células. (Makowski *et al.*, 1977)

El poro permite el paso de los iones que median el acople eléctrico entre las células, como el ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Saéz *et al.*, 1989) y el AMP cíclico (AMPc) (Saéz *et al.*, 1986, Flagg *et al.*, 1981) que intervienen en el acople metabólico y la homeostasis intercelular de las células de un mismo tejido.

El aislamiento y purificación de las proteínas de UC así como su análisis bioquímico mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS), de las proteínas totales ha demostrado que las UC de hígado están formadas por dos bandas, una banda de 27 KDa y otra con un peso molecular de 21 KDa. En el corazón la banda de las proteínas de la unión comunicante tiene un p.m que varía entre los 43 KDa a 47 KDa,. Posteriormente, con la clonación de la proteína de 27 KDa de hígado (*Paul D.L., 1986, Kumar N.M. y Gilula N.B., 1986*) se encontró que el cDNA de esta proteína codifica para la proteína de 32 KDa por lo que se le llamó a esta proteína conexina 32. En 1987 *Beyer y colaboradores* lograron aislar y clonar el cDNA de la proteína con p.m de 43 KDa a 47 KDa de las UC del corazón y encontraron que su cDNA codifica para una proteína de 43 KDa por lo que se le llamó conexina 43, posteriormente *Zhang J. T. y Nicholson B. J. en 1989* reportaron la clonación de una tercera proteína de UC la de 21 KDa que también se encuentra en el hígado cuyo cDNA codifica para una proteína de 26 KDa por lo que se le llama conexina 26. En la actualidad se sabe que existe una amplia variedad de proteínas de unión (12 en el mamífero), que son miembros de una familia de proteínas relacionadas a las que se les llama conexinas.

Con el aislamiento, secuenciación y clonación de las proteínas de las UC ha sido posible la obtención de anticuerpos. Esto ha permitido la detección cualitativa de las UC en varios tejidos.

Con el análisis de la secuencia de aminoácidos de los cDNAs de las conexinas, se ha propuesto un modelo topológico de la localización de las conexinas en la membrana, la cual se muestra en el esquema 3.



Esquema 3. Modelo topológico de la localización de las conexinas en la membrana. Se propone que la proteína atraviesa la membrana 4 veces (A, B, C y D), la cadena A y B, C y D están unidas por una cadena extracelular y la B y C están unidas intercelularmente, las porciones amino y carboxilo terminales se localizan en el citoplasma. (Dermietzel R., y col. 1990)

Como la secuencia presenta 4 regiones hidrofóbicas, el modelo propone que la proteína atraviesa 4 veces la membrana (A, B, C y D). La tercer región transmembranal de la conexina (C) se cree que forma la línea del canal acuoso. Las regiones transmembranales 1ª y 2ª (A y B) así como la 3ª y 4ª (C y D) están unidas por dos cadena extracelulares, y las regiones transmembranales 2ª y 3ª (B y C) están unidas por una cadena intracitoplasmática. El dominio amino (NH<sub>2</sub>) y el carboxilo (-COOH) terminal se localizan en el citoplasma. La secuencia de aminoácidos entre las diferentes conexinas en las regiones transmembranales tienen un alto índice de homología (90 %) mientras que la mayor divergencia en la secuencia aminoácidos radica en la porción carboxilo (-COOH) terminal (40 %) (*Hertzberg E., Ross G. 1988., Zimmer et al., 1978., Beyer et al., 1990., Heaflyger et al., 1992.*).

En cuanto a la función de las UC, se ha observado que participan en el acople eléctrico entre las células excitables como las nerviosas (*Bennett M.V.L 1963*) y cardíacas (*Beyer et al., 1987., Gourdie R.G., 1991, Yancey., et al. 1989*), así como en mediar el acople metabólico tanto en células excitables como no excitables (*Gilula et al., 1972, Murray y Fletcher., 1984*). También se ha propuesto que participan en la regulación de la diferenciación celular (*Yancey et al., 1992*) y que estas pueden regular la función secretora (*Decker R.S., 1976, Meda et al., 1979, Pérez Armendariz et al., 1991 y 1995*).

## 2.3 Las células de Leydig.

La primera descripción del tejido intertubular del testículo fue realizada por Leydig en 1950, quién reportó que los espacios entre los túbulos seminíferos están ocupados por masas conspicuas de células, los cuales contienen vacuolas de grasa y pigmentos. Kölliker realizó una descripción similar de la composición celular del tejido intertubular, ambos investigadores consideraron a las células de Leydig como una forma especializada del tejido conectivo.

Loisel y Ganfini observaron las inclusiones de lípidos de las células de Leydig, y propusieron que estas eran el sustrato de las hormonas testiculares; Bouin y Ancel obtuvieron evidencia de que estas células proveen el estímulo hormonal para la producción de espermatozoides y para el mantenimiento de las características sexuales secundarias. Posteriormente, se descubrió que las inclusiones de lípidos de las células de Leydig, contienen ésteres de colesterol. Mc. Gee demostró que usando extractos de lípidos del testículo bovino se puede estimular el desarrollo masculino al administrarlo a otros animales. La testosterona se identificó finalmente en este extracto y pronto se sintetizó utilizando el colesterol como materia de partida. Para una revisión ver (*Knobil E. y Neill J.D ., 1988*)

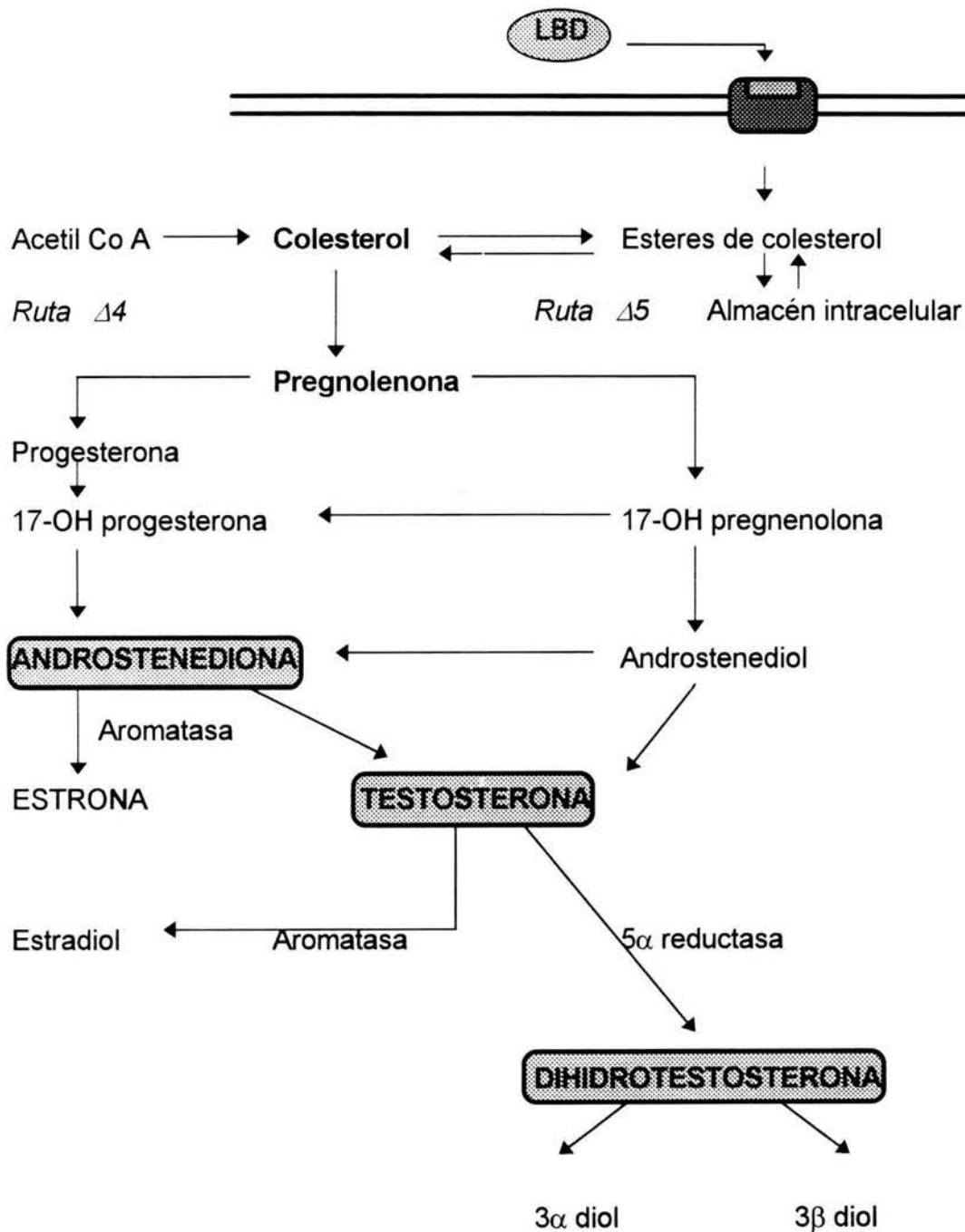
Los túbulos seminíferos están bordeados por el tejido intersticial, el cual está formado por tejido conectivo laxo, macrófagos, linfocitos, células de Leydig, fibrocitos y vasos linfáticos, capilares y arteriolas. Las células de Leydig característicamente se encuentran en grupos entre los espacios angulares formados por los túbulos

seminíferos y alrededor de los vasos sanguíneos (*Dym M., 1983, Pfeiffer D.C. y Vogl A. W., 1991*).

Estas células de Leydig tienen una forma esférica o son irregularmente polihédricas, y un diámetro aproximado de 20  $\mu\text{m}$ ; el núcleo es usualmente redondo y la superficie celular se caracteriza por numerosas microvellosidades. El organelo más abundante es el retículo endoplásmico liso, este rasgo es característico de células secretoras de esteroides, así como también un abundante retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias con crestas alargadas. Además tienen aparato de Golgi, centriolo y vacuolas de lípidos (los cuales contienen colesterol, ac. ascórbico, lipasas, leucilamina, peptidasa succinico deshidrogenasa y  $3\beta$ -ol deshidrogenasa) (*revisado en Knobil E. y Neill J. D. 1988, Dym M. 1983*). El producto de secreción primario de las células de Leydig es la testosterona, la cual es de gran importancia en tres eventos trascendentales: el primero se correlaciona con el estímulo en la diferenciación embrionaria a lo largo de la línea masculina de los genitales internos y externos, el segundo evento es la masculinización neonatal del hipotálamo y el tercer evento se da durante la pubertad para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, así como del sistema muscular esquelético, la inhibición del sistema de retroalimentación hipotálamo-hipófisis-gónada y la estimulación de la espermatogénesis.

Los tres andrógenos de mayor importancia en la etapa reproductiva del macho son la testosterona, la dihidrotestosterona y androstenediona; de estos el más

importante es la testosterona. En el siguiente esquema se muestra la vía de la biosíntesis de los andrógenos en las células de Leydig.



Esquema 4. Vía de la biosíntesis de los andrógenos en las células de Leydig.



Las células de Leydig, aunque pueden sintetizar colesterol a partir de Acetil CoA, lo obtienen fundamentalmente del plasma, a partir de los ésteres de colesterol que forman parte de las lipoproteínas de baja densidad (LBD). Las LBD se introducen dentro de la célula por endocitosis mediada por receptor, los ésteres de colesterol pueden almacenarse en gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre para ser utilizado en la síntesis. El paso de colesterol a pregnenolona se realiza en la mitocondria y los fosfolípidos de membrana intervienen en el transporte intramitocondrial desde la capa externa de la membrana hasta la interna, que es donde se realiza el cambio de colesterol a pregnenolona. Esta última se libera de la mitocondria y pasa a retículo endoplásmico liso. Dos rutas metabólicas conducen a la síntesis de testosterona en testículo, una a partir de 17-hidroxi-pregnenolona, conocida como la ruta  $\Delta 5$ , y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o ruta  $\Delta 4$ .

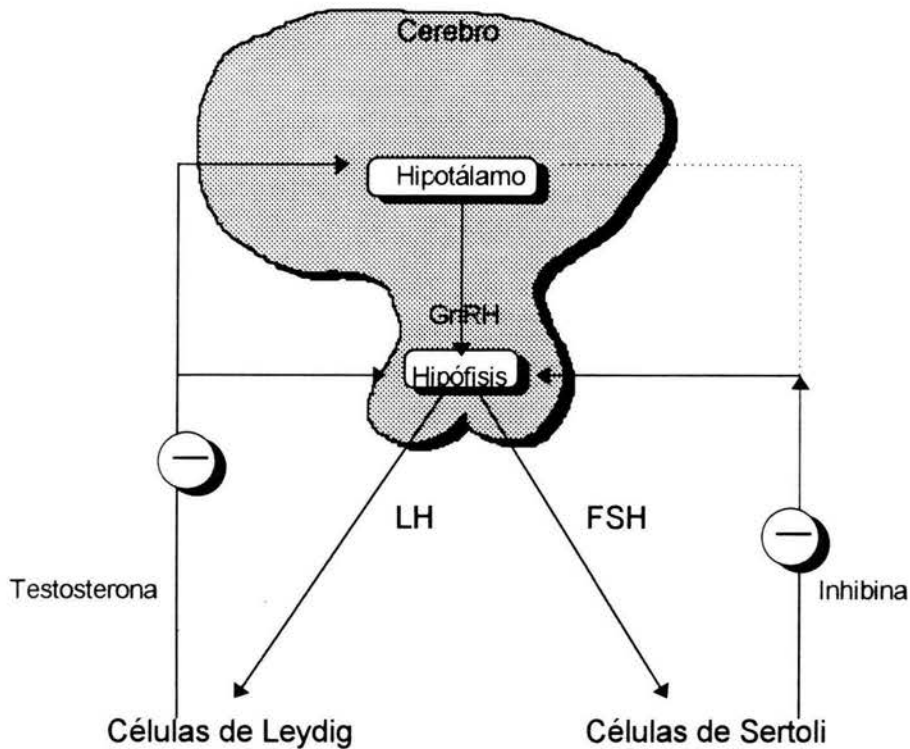
La testosterona (4 androstene, 17- $\beta$ ol,3-ona), puede seguir dos rutas metabólicas y transformarse en otros esteroides biológicamente activos. Por la ruta  $5\alpha$  reductasa se transforma primero en dihidrotestosterona (DHT) y a continuación en  $3\alpha$  diol ó  $3\beta$  diol; y por la ruta de la aromatasa, la testosterona se transforma en estradiol y la androstenediona en estrona. (Bellido C. 1992)

El control de la función testicular se lleva a cabo mediante el sistema de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-células de Leydig (esquema 5). En el hipotálamo se sintetiza un decapeptido, la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) que se secreta en pulsos que llegan a la zona de la hipófisis anterior

uniéndose a receptores específicos en las células gonadotropas, estimulándolas para que liberen la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) en la circulación sistémica. La LH es captada por las células de Leydig (Su acción fundamental es la de incrementar la síntesis y secreción de andrógenos, pero también produce aumento de tamaño de las células), activándose la adenilciclase, la cual aumenta la concentración del AMPc intracelular y consecuentemente la fosforilación de proteínas; este evento culmina con la secreción de andrógenos. Los dos efectos principales de la LH sobre la esteroidogénesis consisten en aumentar la disponibilidad del colesterol (actuando sobre la entrada de colesterol en la célula y en las mitocondrias, sobre la actividad de la enzima colesterolesera que deja el colesterol libre y sobre la síntesis de la proteína intracelular transportadora de colesterol) y acelerar el paso del colesterol a pregnenolona (activando la actividad del complejo enzimático responsable de esta transformación). Cuando hay una elevación en la síntesis de andrógenos se inhibe la secreción de LH de la hipófisis anterior a través de una acción directa sobre la hipófisis y un efecto inhibitorio a nivel hipotalámico.

La FSH es captada por receptores específicos de las células de Sertoli donde se estimula la síntesis de una proteína unidora de andrógenos. La FSH es necesaria para el inicio de la espermatogénesis; sin embargo los espermatozoides requieren tanto de FSH como de testosterona para su maduración. La célula de Leydig también produce la proteína inhibina, la cual actúa a nivel de la hipófisis donde

selectivamente inhibe la secreción de la FSH, los niveles altos de la testosterona también son capaces de inhibir la secreción de la FSH (esquema 5).



Esquema 5. Eje hipotálamo-hipófisis-células de Leydig y Sertoli.

La hormona gonadotropina coriónica (hCG) es una glicoproteína que contiene galactosa y hexamina, es producida por el sincitiotrofoblasto durante el embarazo. Al igual que las hormonas hipofisarias está constituida por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  de la hCG es muy semejante a la subunidad  $\alpha$  de la LH, FSH y TSH difiriendo sólo en que tiene dos aminoácidos (Aac invertidos y faltan tres Aac. en la porción amino terminal, el p.m de la subunidad  $\alpha$  es de 18 000 y la  $\beta$  es de 28 000. Esta hormona (hCG) tiene actividad principalmente luteinizante y poca activida de FSH.

La hCG también puede ser secretada por el hígado fetal y el riñón en pequeñas cantidades. (Bellido C. 1992)

La hCG se detecta 24 h después de la implantación y mantiene al cuerpo lúteo funcionando hasta su relevo por el trofoblásto. Al principio estimula al cuerpo lúteo y después utiliza hormonas fetales y maternas como precursores para su síntesis hormonal propia. Paulatinamente se integra en una verdadera unidad materno-feto-placentaria con funciones endócrinas para regular las cambiantes demandas del feto y los procesos adaptativos de la madre, evita el rechazo inmunológico del feto, mantiene el embarazo e inicia el trabajo de parto.

El embarazo continúa si el cuerpo lúteo sigue secretando estrógenos y progesterona, esto se logra con la estimulación de la hCG. Esta es la primera hormona que secreta la placenta, probablemente desde antes de la implantación, aunque sus niveles no son detectables sino hasta unos 8 días después de la ovulación, es decir, antes de faltar el primer período menstrual.

Al inicio del embarazo la concentración de la hCG se duplica cada 1.7 a 2 días y alcanza concentraciones de 100 mUI/ml a los 14 días después de la ovulación y con niveles pico de 50 000 a 100 000 mUI/ml entre la novena y décima semana de gestación. Después de la décima semana declina gradualmente hasta llegar a los niveles de 10 000 mUI/ml en el primer trimestre.

La función de esta hormona son la inhibición de la acción linfocitaria *in vitro* y contribuye a evitar el rechazo inmunológico del feto, en el primer trimestre del embarazo actúa en suprarrenales y testículos fetales estimulando la síntesis del

sulfato de dihidroepiandrosterona y testosterona respectivamente. (Pérez Peña, 1992)

## 2.4 Anticuerpos

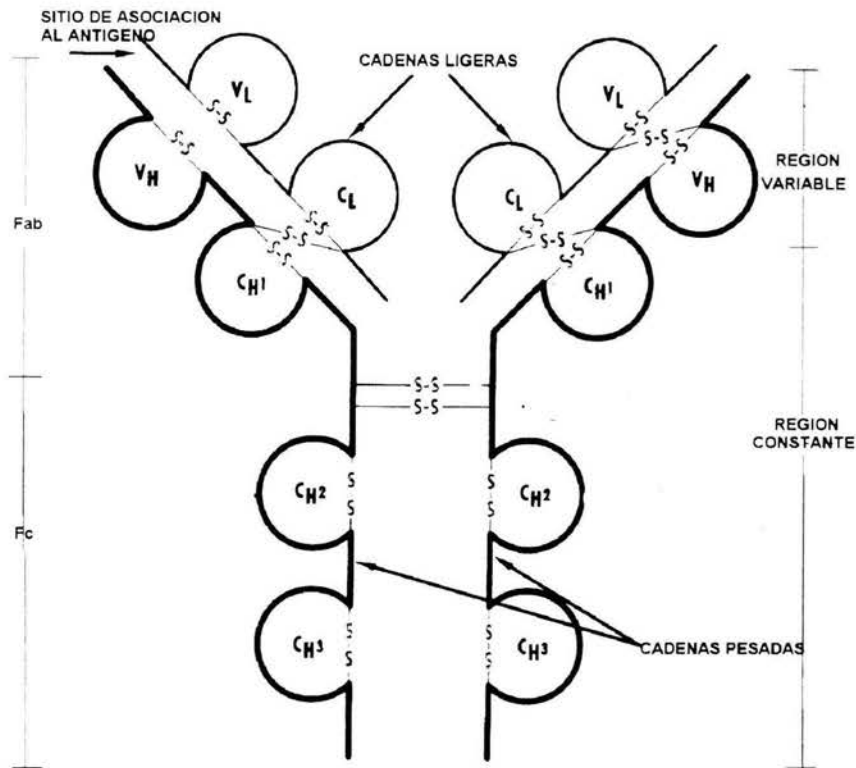
Los anticuerpos (Acs) o inmunoglobulinas son gluproteínas producidas por las células plasmáticas del organismo en respuesta a la presencia de moléculas extrañas al cuerpo llamadas Antigenos (Ag).

Estos anticuerpos son específicos contra el Ag que los indujo. En el complejo Ag-Ac, el Ac fija a los Ags mediante un reconocimiento específico por los sitios Fab. Los complejos Ag-Ac por IgM e IgG son capaces de activar el complemento a través de la vía clásica (unión C1) y ser removidos de la circulación por los macrófagos mediante fagocitosis.

### 2.4.1 Estructura molecular del anticuerpo

Los Acs son glicoproteínas compuestas por una o más subunidades, cada subunidad contiene cuatro cadenas polipeptídicas dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas. La cadena L consiste de una región variable ( $V_L$ ) y una constante ( $C_H$ ), la cadena H consta de una región variable ( $V_H$ ) y tres regiones constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Las cadenas están unidas por puentes disulfuro, formando de esta manera una estructura simétrica bilateral en forma de "Y" (ver esquema 6).

Las regiones variables de la cadena H y la cadena L conforman el sitio de asociación del Ac al Ag (cada molécula de inmunoglobulina presenta dos sitios de afinidad al Ag).



**Esquema 6. Estructura base de los anticuerpos.** El fragmento Fab está formado por una cadena ligera y una parte de la cadena pesada, situado del lado amino terminal. El fragmento Fc está formado por el resto de la cadena pesada del lado carboxilo terminal de la molécula.

Existen 5 clases primarias de inmunoglobulinas las IgG, IgM, IgA, IgE e IgD.

En su estructura varían las cadenas pesadas ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,) y en el número de unidades "Y" que se unen para formar la proteína completa. La presencia de estas inmunoglobulinas en el organismo se debe al tipo y estados de respuesta contra el antígeno que ha invadido al organismo (bacteria, virus, hongo etc.).

## 2.4.2 Anticuerpos en inmunoensayos

Los anticuerpos son biomoléculas muy importantes que son usados en la investigación inmunológica y en el diagnóstico clínico. En Los inmunoensayos se utilizan los anticuerpos monoclonales y policlonales.

Típicamente la respuesta inmunológica a un antígeno es heterogénea, esto es el resultado de la diferenciación celular de muchos linfocitos B (precursor de las células plasmáticas) produciendo anticuerpos contra un antígeno. A un grupo de células semejantes comúnmente se le llama clona, las cuales producen un anticuerpo monoclonal contra un determinante antigénico. En 1975 Köhler y Milstein desarrollaron la técnica que permitió obtener anticuerpos con una selectividad específica a partir de clonas celulares. Los linfocitos B individuales (los cuales producen anticuerpos contra un epítipo específico contra el cual fueron sensibilizados) son fusionados con células de un mieloma que inmortaliza a estas células fusionadas a las cuales se les llama células híbridas o hibridomas. Estas últimas son mantenidas *in vitro* o intraperitonealmente en animales de laboratorio que continuamente secretan anticuerpos (monoclonales). El anticuerpo monoclonal reconoce determinantes conformacionales de un grupo particular de aminoácidos o residuos de azúcares. Los Acs monoclonales se obtienen de dos formas: del suero del animal y de sobrenadante del cultivo. El suero se obtiene del líquido intraperitoneal que se extrae del ratón en donde previamente se implantó un tumor peritoneal, el cual ha sido inducido por la inyección de células del hibridoma en el

peritoneo de este líquido se purifica el Ac monoclonal. El desarrollo del hibridoma produce una elevada concentración de Ac y una secreción continua del mismo.

Los anticuerpos policlonales son producidos por diferentes líneas celulares o clonas de linfocitos B, todos los anticuerpos producidos reaccionan con diferentes epítopes de algún antígeno, la respuesta inmunológica en este caso es heterogénea.

Para la producción de los Acs policlonales se requiere de la inyección de un antígeno extremadamente puro a un animal para su inmunización y como respuesta el organismo producirá anticuerpos específicos contra el antígeno. Posteriormente se administra más antígeno para mantener una buena concentración de anticuerpo

### 2.4.3 Ventajas y desventajas de los Acs monoclonales y policlonales.

<b>Ventajas Acs monoclonales</b>	<b>Acs policlonales</b>
Un solo Ac homogéneo	Múltiples subclases de Acs
Un solo determinante antigénico	Múltiples determinantes antigénicos para una proteína
No varía su especificidad	Puede variar su especificidad
Se obtienen grandes cantidades de Ac	Puede desarrollarse fácilmente por inmunización de un animal
<b>Desventajas</b>	
El proceso es costoso y requiere mucho tiempo	El inmunógeno debe ser altamente purificado
Es necesario equipo de cultivo de tejidos	La cantidad de anticuerpo está limitado por la vida del animal inmunizado
El epítipo reconocido por el Ac puede ser compartido entre muchos otros antígenos diferentes al de interés	Los dominios individuales de antígenos complejos son difíciles de estudiar, por que los múltiples determinantes antigénicos son reconocidos por el suero policlonal
Los hibridomas son inestables	Los diferentes sangrados deben ser caracterizados debido a la especificidad y subclases del Ac

(Dunbar S.B y Schwoebel D.E., 1990, Pierce., 1995, Roitt I. 1994)



### **3.0 OBJETIVOS**

1.- Identificar si las conexinas (Cx26, Cx32 y Cx43) se expresan en las UC de las células de Leydig de ratón tanto *in situ* como *in vitro*, utilizando anticuerpos específicos contra estas conexinas.

2.- Estudiar el efecto de la LH, hCG y AMPc en la expresión de estas conexinas en cultivos de las células de Leydig.

## 4.0 METODOS

Los ratones empleados en este estudio fueron de la cepa CD1 (*Laboratorios Charles River N.Y.*) de 3 meses de edad (los animales se sacrificaron por decapitación)

### 4.1 CULTIVO DE CELULAS

Se disecaron los testículos de los ratones y se mantuvieron en una caja Petri con una solución salina amortiguadora de fosfatos con  $\text{Ca}^{2+}$  (PBS- $\text{Ca}^{2+}$ ) sobre hielo (*GIBCO, Grand Island N.Y. USA.*). Los testículos se liberaron de la túnica albúginea, se transfirieron a una caja de Petri estéril que contenía medio de cultivo (*Dulbecco's Medio modificado de aguila, DMEM GIBCO*) suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  44 mM (*SIGMA Chemical Co. St. Louis Mo. USA*), suero fetal de bovino al 10% (*FBS, GIBCO*), Penicilina G sódica 100 u/ml (*GIBCO*) pH 7.4

Se drenaron 5 ml de medio de cultivo completo a cada uno de los testículos y se colectaron en tubos cónicos de 15 ml, los cuales se lavaron por centrifugación a 1000 rpm/3min, el sobrenadante se eliminó, la pastilla celular se resuspendió con 120  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo completo (tres testículos) y se sembraron las células sobre cubreobjetos de vidrio circulares del N° 1 (*Tomas scientific. Swesdesboro N.J. USA*), colocados en una caja de cultivos múltiples (*Falcon, Becton and Dickinson. Lincoln park N.J. USA.*) a una densidad de  $1.2 \times 10^6$  células por cultivo. Las células se mantuvieron a 34°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ ; a los 20-30 min se les adicionó 1 ml de medio de cultivo completo y se mantuvieron en las condiciones ya mencionadas por un lapso de 8, 24 y 36 h. Para determinar la

modulación en la comunicación intercelular y la expresión de la conexina, en paralelo a los cultivos control, las células fueron tratadas con LH de ratón (100 ng/ml), hCG (10 ng/ml) o AMPc (1mM) disueltas en el mismo medio de cultivo. Todas las condiciones experimentales se realizaron por duplicado.

## 4.2 IDENTIFICACION CELULAR

Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. Marta Romano. (CINVESTAV. IPN.)

Las células de Leydig en cultivo se identificaron por una reacción en la que está involucrada la enzima  $3\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa. Al término del período de cultivo (8, 24 y 36 h) las células se lavaron con una solución amortiguadora de Tris-HCl (TBS, 0.1 mM, pH 7). Posteriormente se incubaron con 500  $\mu$ l de  $3\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido (1mg/ml), azul nitro de tetrazoleo (0.5 mg/ml) y deshidroepiandrosterona (DHEA 2 mg/ml) a 37°C a baño María y agitación continua durante 3 h. En las muestras control se omitió la DHEA; después de la incubación, las células se fijaron con formol salino al 10% (v/v) durante 10 min. Finalmente se lavaron con TBS, se deshidrataron con etanol-xilol y se montaron los cubreobjetos con resina Permount.

Para cuantificar el número de células positivas y negativas se determinó fotografiando 14 campos al azar (40X) de los cultivos celulares controles y tratados.

### 4.3 EVALUACION DEL ACOPLA CON COLORANTES FLUORESCENTES ENTRE LAS CELULAS DE LEYDIG EN CULTIVO

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Martha Pérez Armendariz.

Después del tiempo de cultivo (8, 24 ó 36 h) los cubreobjetos con las células fueron lavados con una solución de Krebs (KCl 5 mM, NaCl 155 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.0 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM, glucosa 5 mM y Hepes 10 mM, pH 7.2). Esta solución también perfundió a las células durante la inyección del colorante fluorescente. La inyección del colorante fluorescente (amarillo lucifer AL 4 % en 100mM de LiCl pH 7.16) se realizó a temperatura ambiente, con una pipeta del tipo "patch" (forman sellos de alta resistencia en la membrana celular). El AL se inyectó a una célula de un conglomerado de células de Leydig (6-10 células) durante 5 min; después de este tiempo se evaluó el número de células a las cuales transfirió el colorante.

### 4.4 CRIOSECCION DE TEJIDOS

Los tejidos que se utilizaron como control para identificar a las conexinas 43, 32 y 26 fueron; corazón e hígado de rata y páncreas de ratón respectivamente y testículos de ratón, los cuales la expresan abundantemente. Para identificar las conexinas presentes *in situ* se realizaron cortes de testículo.

Una vez disecados los tejidos se mantuvieron en una caja de Petri con PBS-Ca<sup>2+</sup> sobre hielo. Se cortaron pequeños bloques de los tejidos, de aproximadamente

0.5 cm<sup>2</sup> (excepto los testículos, que se congelaron completos). Los bloques de tejido se colocaron sobre un cuadro de corcho de 1 cm<sup>2</sup> que contenía resina de *inclusión* (*Tissue Tek SIGMA Co.*) inmediatamente se sumergieron en 2-metil-etil-butano (*SIGMA Co.*) contenido en una copa de aluminio, sumergido en nitrógeno líquido. Las muestras se pasaron directamente al nitrógeno líquido, se sacaron una vez congeladas y se almacenaron en un ultracongelador *REVCO* a -70°C hasta su posterior uso.

Los cortes histológicos de los tejidos fueron de 4-10 μm y se realizaron en un crióstato mantenido a una temperatura de -23°C (*IEC minotome*).

#### **4.5 ANTICUERPOS.**

Los anticuerpos contra las conexinas 43 y 26 fueron producidos por el Dr Elliot Hertzberg del Departamento de Neurociencias, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University. Bronx. N.Y 10461. USA, quien los donó para este estudio.

1.- Anti-conexina 43 (4991;2.5). Anticuerpo policlonal de conejo IgG, que reconoce al oligopéptido 346-360 del carboxilo terminal de la conexina 43 (Yamamoto 1990 a, b) .

2.- Anti-conexina 26 (192B). Anticuerpo policlonal de conejo IgG, reconoce al oligopéptido 105-119 de la conexina 26.

Ambos anticuerpos fueron evidenciados con el anticuerpo de cabra anti IgG de conejo unido a fluoresceína (FITC) (*Obtenido de Kikergaard and Perry laboratories Gaithersburgo M.D. USA*).

El anticuerpo contra la conexina 32 fue producido y donado por el Dr. Goodenogh D.A para este estudio.

Anti-conexina 32 (R5.21C) Anticuerpo monoclonal de rata IgG (*Stevenson B.R 1988*) el cual fue visualizado mediante su unión al antisuero cabra anti IgG de rata fluoresceinado (FITC) (*Obtenido de Kikergaard and Perry laboratories Gaithersburgo M.D. USA*).

#### **4.6 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA**

Los cortes del tejido y las células cultivadas sobre los cubreobjetos de vidrio se lavaron con PBS-Ca<sup>2+</sup>. Para la conexina 43 las células se permeabilizaron con etanol al 70% a -20°C por 20 min; para la conexina 26 se permeabilizaron con acetona 50 % (5min), 100 % (2min) y 50 % (5min) a -20°C. Para la conexina 32 no se permeabilizaron las células.

Transcurrido el tiempo correspondiente de permeabilización, se lavaron las muestras con PBS-Ca<sup>2+</sup>, posteriormente se incubaron con la solución bloqueadora (0.1% de Albúmina bovina libre de IgG en PBS-Ca<sup>2+</sup>, SIGMA Co.) por 30 min sobre hielo. Se lavaron luego con PBS-Ca<sup>2+</sup> y se incubaron con el anticuerpo primario (diluido en PBS Ca<sup>2+</sup>) durante toda la noche a 4°C, al día siguiente se lavaron las muestras con PBS-Ca<sup>2+</sup> (4 cambios/10 min). Posteriormente se incubaron con el

anticuerpo secundario unido a fluoresceína por una hora a temperatura ambiente, manteniendo las preparaciones aisladas de la luz, posteriormente se realizaron 6 lavados /10 min con PBS-Ca<sup>2+</sup> sobre hielo sin exponerlos a la luz.

Los cubreobjetos se montaron con 1% de p-fenilenediamina en 33% de glicerol en PBS Ca<sup>2+</sup>(10:1) y se observaron bajo microscopio de epifluorescencia (NIKON) con una lámpara de xenón.

La especificidad de la inmunorreactividad se determinó reemplazando el anticuerpo primario por el suero preinmune (suero no inmune o medio de cultivo).

#### 4.7 “IMMUNOBLOT”.

Se realizaron homogenados de testículo de ratón y corazón de ratas adultas así como de cultivos enriquecidos con células de Leydig.

Se extrajeron los tejidos de los animales sacrificados, se lavaron y se mantuvieron en solución con fenil-metil-sulfonil-fluoruro (P.MSF) 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1 mM. Posteriormente se homogenizaron a 4°C en un homogenizador *Brinkmann Politron (Switzerland)* y las muestras se sonicaron durante 3 min a 4°C en un sonicador (*modelo W225R; Heat systems ultrasonics, Inc. Plainview N.J. USA*).

Los “immunoblot” se realizaron como previamente fue descrito por *Towbin H., T. Staehelin y J. Gordon (1979)*. Se utilizaron 50 µg de proteína del homogenizado, que se separaron mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (gel concentrador al 6%, gel separador 10%) mantenidos en un sistema discontinuo de amortiguadores, las proteínas del gel se transfirieron a hojas de nitrocelulosa (blots)

a 30 volts por 18 h. Los blots se incubaron en solución bloqueadora (leche sin grasa 5 %;  $\text{NaN}_3$  10 mM en TBS (Tris amortiguador salino, pH 7.4), por un tiempo mínimo de 30 min a temperatura ambiente, o bien toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo Anti Cx-43 1:1000 diluído en leche sin grasa al 5 %, en TBS durante la noche a 4°C, se lavaron con TBS y se incubaron con ( $^{125}\text{I}$ ) proteína A ( $10^6$  cp.m; ICN, Biomedicals Inc., Costa Mesa. Ca. USA.) diluida en leche sin grasa al 5 % en TBS por 1h. Se lavaron al cabo de este tiempo, y se secaron para exponerlos luego a una película fotográfica XAR-5 Kodak a -70°C por la noche. Finalmente la placa se procesó para su revelado.

#### **4.8 ANALISIS ESTADISTICO.**

Los datos obtenidos en la identificación celular y el acople entre las células de Leydig en los cultivos control y tratados con LH, hCG y db-AMPc se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA (Kruskal-Wallis) utilizando el programa computalizado "SIGMA STAT" (PLOT 50)



## 5.0 RESULTADOS.

### 5.1 Identificación Celular.

Previamente nosotros y otros utilizando estos métodos encontramos un enriquecimiento de  $\cong 70$  % de células positivas en cultivos de 8 h. En el presente trabajo a este tiempo de cultivo no detectamos diferencias entre los cultivos control y tratados, no obstante estas si fueron detectadas en los cultivos de 36 h.

La Fig. 1 A, B muestra las micrografías de cultivos mantenidos en condiciones control (A) o tratados con 100 ng/ml de LH por 36 h (B). En ambos casos pueden observarse células  $3\beta$ -HSD positivas clasificadas con 3, 2 ó 1 cruz dependiendo de su intensidad de tinción (\*\*\*, \*\* o \*) las cuales contrastan con otras negativas (flecha) que se muestra como controles interno negativos. La Figura 1 C muestra la fracción de células  $3\beta$ -HSD positivas. Los resultados que se obtuvieron experimentalmente mostraron que en los cultivos tratados con LH, hCG y db-AMPC el número de células positivas fue del  $85\% \pm 1$  (ES),  $74\% \pm 5$  y  $76\% \pm 2$  respectivamente, mientras que en los cultivos control esta fracción fue del  $56\% \pm 4$ . El análisis estadístico de los valores de las medias entre los cultivos control y tratados señala que estas diferencias son significativas estadísticamente ( $P < 0.001$ ). Además, del incremento total en la fracción de células teñidas, estos tratamientos también incrementaron la fracción de células intensamente teñidas (\*\*\*, barras llenas) con respecto a las débiles o medianamente teñidas (\* ó \*\*, barras semillenas)

comparados con los cultivos control. En otro experimento se obtuvieron resultados semejantes

Estos resultados muestran que nuestros cultivos tratados de 36 h presentan un enriquecimiento considerable de las células de Leydig de aproximadamente un 74 a 85 %, que contrasta con el 56% de células positivas encontrado en los cultivos control de 36 h. El incremento de células  $3\beta$ -HSD positivas inducido por estos tratamientos posiblemente resulta del efecto estimulador de la LH, hCG y db-AMPC en la cantidad de la enzima  $3\beta$ -HSD producida por cada célula, como ha sido propuesto en células de Leydig de otras especies (*O'shaughnessy y Payne 1982; Kenney y Masson, 1992*).

Las células contaminantes que se encontraron con mayor frecuencia fueron eritrocitos que son de diámetro pequeño (7  $\mu$ m), espermatozoides, los cuales tienen una morfología distintiva típica, y algunas espermatogonias y células de Sertoli. Las células de Leydig se identificaron de estos dos últimos tipos celulares, bajo microscopía de contraste de fase por la presencia de una gran cantidad de gotas de lípidos en el citoplasma, los cuales son birrefringentes (**Fig. 8 A** flecha).

Para determinar el estado funcional de los cultivos celulares se midieron los niveles de testosterona en el medio de cultivo de tejidos tratados a las 8, 24 (8+24) y 36 h (8+24+36), con LH, hCG o db-AMPC y así como los cultivos control. La **Fig 1D** muestra que en todos estos tratamientos hay un aumento significativo en la secreción de testosterona a las 8 h (barras vacías), 24 h (no se muestra) y 36 h (barras llenas) al compararse con la secreción basal en tiempos iguales bajo

condiciones control. Los resultados indican que la secreción de la testosterona aumenta en respuesta a las hormonas esteroideas a lo largo del período de cultivo.

## **5.2 Identificación de las conexinas presentes en las células de Leydig.**

Como experimentos control, se incubaron secciones congeladas de tejidos como el hígado y el páncreas que expresan abundantemente la Cx26 y la Cx32, así como el corazón que expresa la Cx43 con los anticuerpos contra estas tres conexinas. La Fig. 2 (a y b) muestra las microfotografías de inmunofluorescencia de secciones de corazón, donde puede observarse que las zonas de aposición membranal que se tiñen intensamente después de su incubación con el anticuerpo contra la Cx43, sobre un fondo citoplasmático claro (a). En contraste, la Fig 2 (b) muestra un corte de corazón después de su incubación con el suero preinmune de la Cx43 en el cual puede observarse que, no hubo inmunoreacción. La Fig 2 (c), muestra una sección de hígado después de su incubación con el anticuerpo contra la Cx32 en donde puede observarse claramente la marca de IF en las zonas de contacto entre las células. La Fig 2 (d) muestra la micrografía de inmunofluorescencia de una sección de páncreas después de su incubación con el anticuerpo contra la Cx26, donde se observa que la marca se encuentra en las zonas de aposición membranal. Los sueros preinmunes de las Cx32 y Cx26 tampoco tiñieron las zonas de aposición membranal entre las células (no se muestran).

La Fig 3 muestra las micrografías de inmunofluorescencia de las secciones de testículo (a, c) y contraste de fase (b, d), después de su incubación con el anticuerpo contra la Cx43. Se puede observar que existe un puntilleo fino abundante en las zonas de aposición entre las células de Leydig. Además también se encontró inmunotinción en el túbulo seminífero entre células de Sertoli, lo cual concuerda con los hallazgos de *Risley y col. (1992)*.

En contraste con la Cx43 la incubación con anticuerpos contra la Cx32 y Cx26, no tiñieron las aposiciones membranales entre las células de Leydig en los cortes de testículo (Fig 4 a y c respectivamente), aunque un ligero puntilleo se detectó con ambos anticuerpos en los conductos seminíferos Cx32 (Fig 5 a), Cx26 (Fig 5 b) . En los cultivos de células de Leydig de 8 h, en forma semejante a los tejidos, se encontró un puntilleo fluorescente entre las aposiciones membranales de las células de Leydig incubadas con el anticuerpo contra la Cx43 (Fig 6 a), pero no se detectó inmunoreactividad fluorescente con los anticuerpos contra la Cx32 (Fig 6 c) y Cx26 (Fig 6 e). Estos resultados indican que de estas tres conexinas, únicamente la Cx43 se expresa entre las células de Leydig.

La unión del anticuerpo contra la Cx43 fue específica debido a que estos patrones de tinción no se observaron cuando las secciones de testículo fueron incubados con el suero pre-inmune (Fig 3 a, b). No obstante para confirmar la especificidad de la unión del anticuerpo contra la Cx43 a la UC, se hicieron estudios de WB (Fig 7) de las proteínas totales de homogenados de testículo carril (a), corazón carril (b) y de cultivos enriquecidos en células de Leydig (Fig 10). Tanto en

el testículo como en las células cultivadas se encontraron bandas de 40 y 43 KDa, que son características de la conexina 43 (*Musil, et al., 1990, Laird et al., 1991*).

### 5.3 Efecto de LH, hCG, AMPc, en la expresión de la Cx43.

Para estudiar el efecto de la LH y hCG en las UC de las células de Leydig inicialmente se monitorio el efecto del tiempo de cultivo en la expresión de la Cx43 en cultivos de 8, 24 y 36 h. En la **Fig. 8** se muestra las micrografías de contraste de fase (**A, C**) así como fluorescencia (**B, D**) de las células de Leydig mantenidas en cultivo por 8 (**A, B**) y 36 h (**C, D**) después de la incubación con el anticuerpo contra la Cx43. En los cultivos de 8 h se observó un abundante puntilleo inmunofluorescente en las membranas celulares en aposición (**A**), sobre un fondo claro intracelular. En los cultivos de 24 h la cantidad de puntos fluorescentes en las membranas de aposición disminuyó (no se muestra) para decaer importantemente en las células cultivadas por 36 h. A este último tiempo de cultivo, la inmunotinción decayó hasta cerca de un 80 % y la fluorescencia basal intracelular en algunas células se incrementó (**D**). Cuando se examinaron bajo contraste de fase los cultivos celulares, la mayoría de las células presentaron gotas de lípidos, (**A, flechas**) características de las células de Leydig

Para detectar si la LH, hCG, y el db-AMPc, alteran el decaimiento de la expresión de la Cx43 en paralelo se realizaron estudios de IF en cultivos tratados. En la **Fig 8** se muestra las micrografías fluorescentes de células mantendidas en cultivo en presencia de 100 ng/ml LH (**E**), 10 ng/ml hCG (**G**) y 1 mM de db-AMPc (**F**) por 36 h.

Todos estos tratamientos previnieron completamente el decaimiento de la expresión de la Cx43. El número y tamaño de las placas inmunoteñidas fueron incluso aparentemente mayor con respecto al encontrado en cultivos de 8 h.

Para confirmar la especificidad de la unión del anticuerpo a la Cx43 y el aparente efecto estimulador de la LH, hCG y db-cAMP en la expresión de esta proteína, se realizaron estudios de WB en cultivos de 36 h, utilizando el mismo antisuero contra la Cx43. En la Fig. 9 se muestra un inmunoblot obtenido después de la electroforesis de las proteínas totales de homogenados de los cultivos celulares testiculares enriquecidos con células de Leydig tratados y no tratados. El carril (a) corresponde al cultivo de 36 h sin tratamiento, los carriles (b, c y d) corresponden a los cultivos de 36 h tratados con hCG, LH y db-AMPc respectivamente. En todos los casos se detectaron dos bandas de 40 y 43 KDa características de la Cx43, también puede observarse un incremento relativo en la proporción de la Cx43 en las preparaciones de los cultivos tratados respecto a los cultivos control. El carril (e) corresponde al tejido control positivo (corazón) para esta conexina, El carril (f) corresponde al tejido control negativo (hígado) el cual no expresa esta conexina.

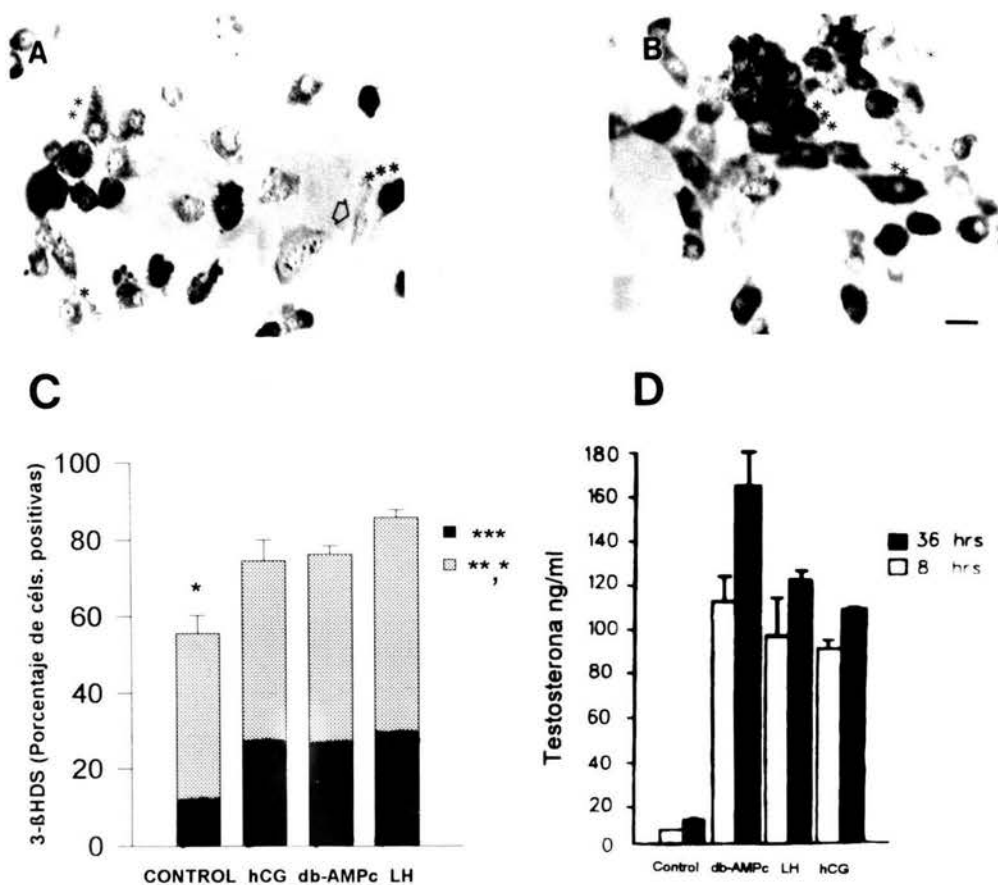
#### **5.4 Efecto de la LH, hCG, db-AMP en la comunicación intercelular.**

El colorante fluorescente amarillo lucifer (AL) (*Stewart W.W. 1981*) se transfiere extensamente entre las células de Leydig recién dispersadas (*Kawa K., 1987*). Para evaluar el efecto del tiempo de cultivo sobre la transferencia intercelular del colorante; el AL se microinyectó a través de una micropipeta de "patch" dentro de

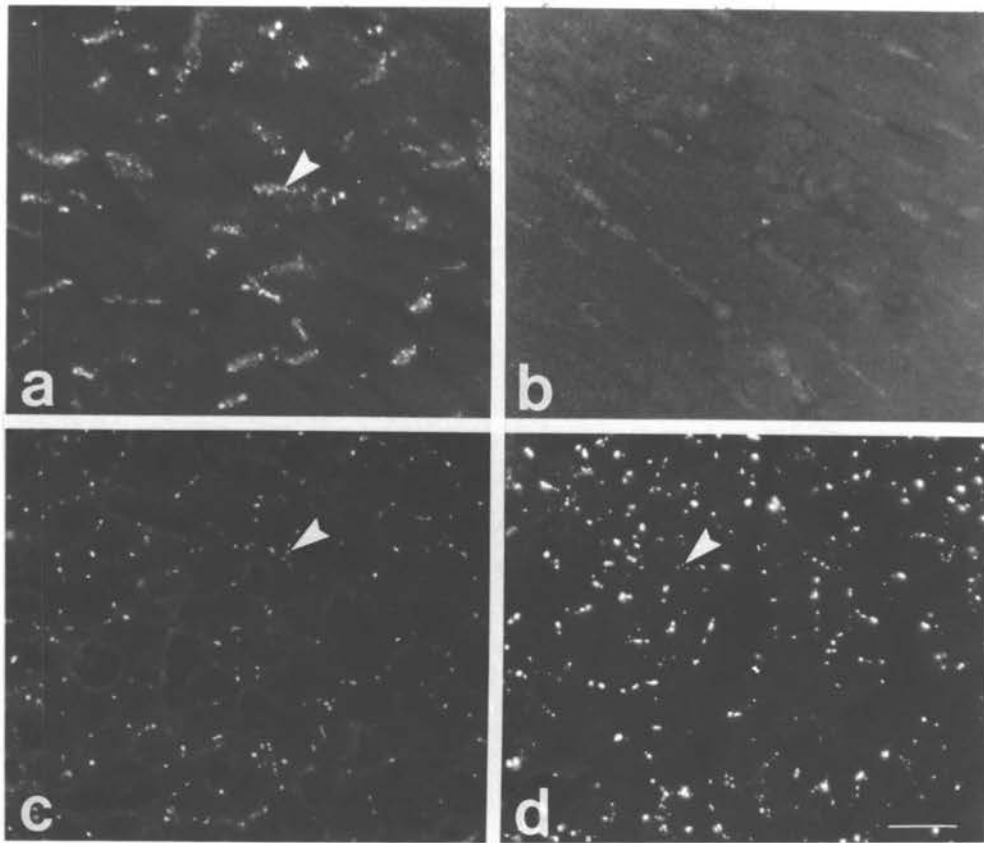
una célula de conglomerados de 6-10 células, cultivados por 8, 24 y 36 h. El AL únicamente se inyectó en aquellos grupos celulares en los cuales la mayor parte de las células (>70 %) se identificaron como células de Leydig mediante la visualización de las gotas de lípidos bajo contraste de fase. En la Fig. 10, panel A se muestran las micrografías en contraste de fase (arriba), y fluorescencia (abajo) de células cultivadas por 8 h y 36 h así como aquellas células tratadas por 36 h con LH, hCG y db-AMPc como se indica. En los cultivos de 8 h, cinco minutos después de haber microinyectado el AL, el colorante se transfirió a todas las células del grupo, en contraste, en los conglomerados de células que se mantuvieron en cultivo por 36 h el AL no pasó a las células vecinas. El panel B de la Fig 10) muestra el porcentaje de decaimiento del número de células acopladas con el AL registrado de los conglomerados celulares con respecto al tiempo de cultivo. Cinco minutos después de su inyección a una de las células el número de células donde el AL fue detectado se normalizó con respecto al número total de de células del conglomerado. A las 8 h el 90 %  $\pm$  3 (ES) de las células se encontraron acopladas mientras que a las 24 h y 36 h hubo un decaimiento significativo progresivo en la fracción de células comunicadas con este colorante (46%  $\pm$  6 y 21%  $\pm$  2 respectivamente n= tres cultivos). Las diferencias en la fracción promedio de transferencia del AL registrados a los cultivos control a los diferentes tiempos de cultivo (8, 24 y 36 h) son estadísticamente significativas (P < 0.001). Para probar si las hormonas que regulan la expresión de la Cx43 también regulan la c.i en las células de Leydig se microinyectaron conglomerados celulares control y cultivados con LH, hCG o AMPc

por 36 h. En la Fig 10, panel A) se muestra micrografías en contraste de fase (arriba) y de fluorescencia (abajo) de cultivos tratados con LH, hCG, AMPc por 36 h como se indica. Puede observarse que todos los tratamientos previnieron el decaimiento en la transferencia del colorante. La Fig 10 C muestra el incremento porcentual en la fracción de células acopladas con el colorante en conglomerados celulares tratados por 36 h. Las barras representan el promedio normalizado de la fracción de células donde el AL se transfirió. Encontramos que hubo un incremento significativo en la fracción promedio de células que se encontraban acopladas, que para los cultivos tratados con LH fue del  $98 \% \pm 2$  (ES), para los tratados con hCG fue de  $72 \% \pm 10$  y  $87 \% \pm 4$  para los cultivos en presencia de db-AMPc. En los cultivos control el colorante sólo transfirió a un  $21.5 \% \pm 2$  de las células vecinas. El análisis estadístico de los valores de las medias entre los cultivos tratados y control son diferentes estadísticamente ( $P < 0.001$ )

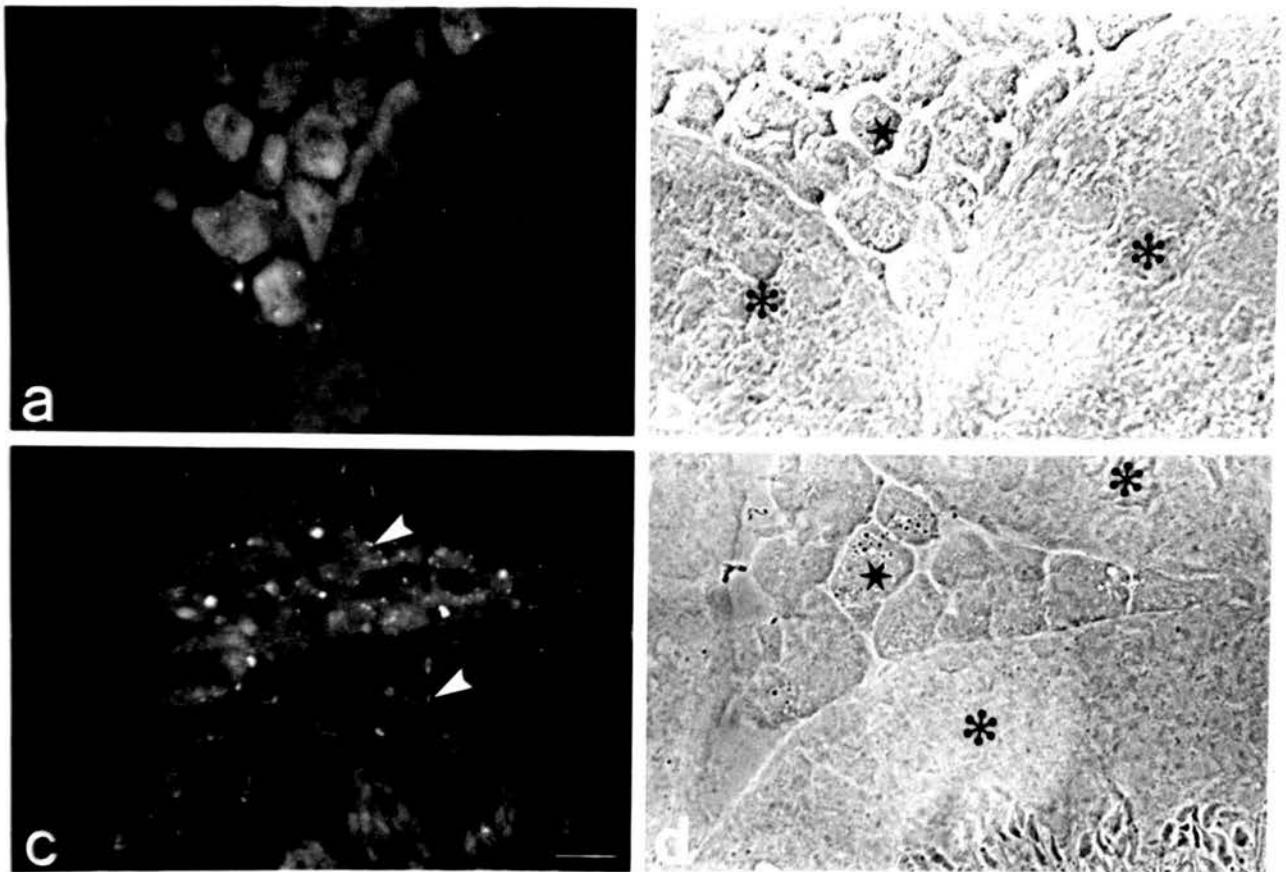




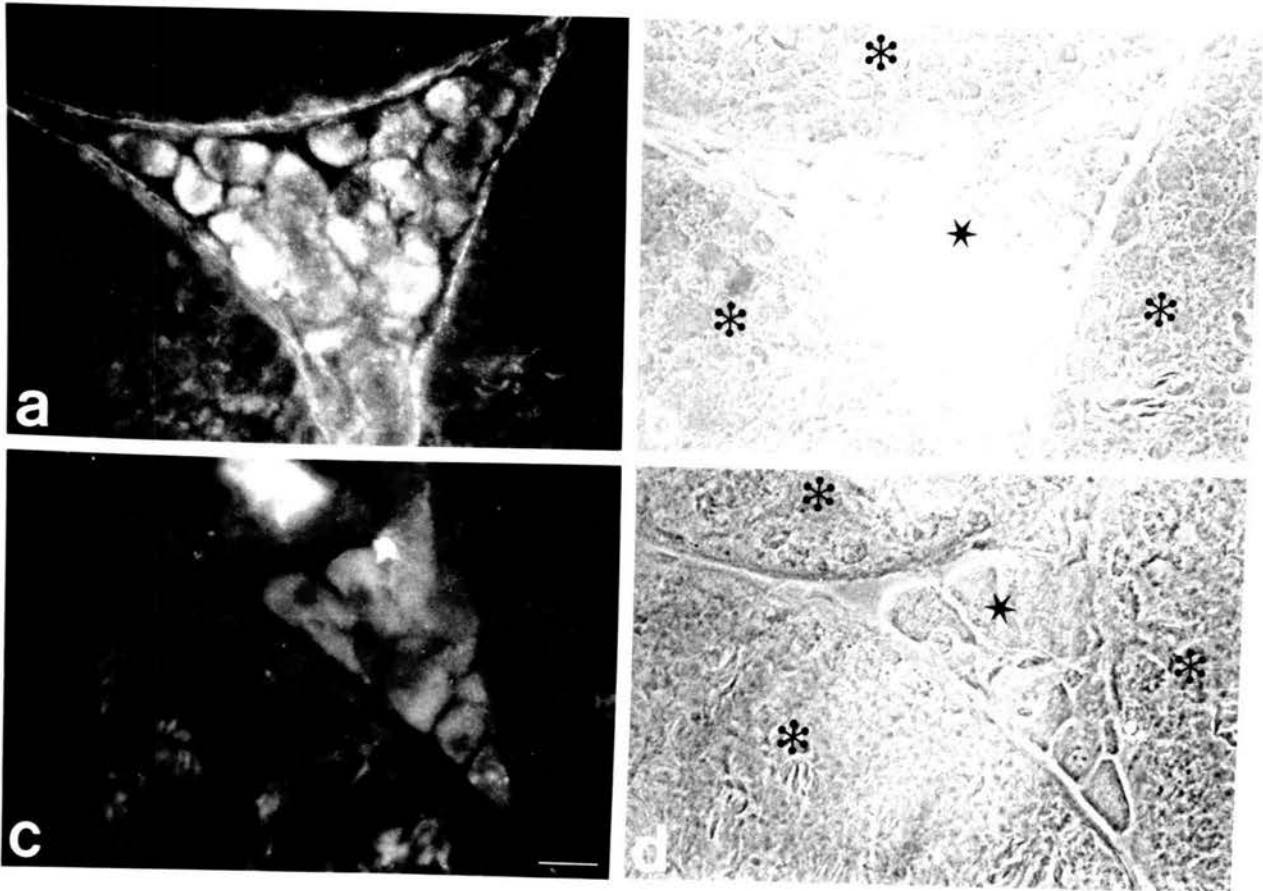
**Fig1.- Identificación y estado funcional de las células de Leydig.** Micrografía de contraste por interferencia diferencial (Nomarski) de cultivos celulares mantenidos por 36 h en condiciones control (A) y tratadas con LH 100 ng/ml por 36 h de cultivos (B) después de la tinción de la 3β-HSD, pueden observarse células alargadas y redondas, fuertemente teñidas (\*\*\*), células ligeramente teñidas (\* o \*\*), así como algunas células negativas (Flecha). barra de calibración 20 μm. (C) Histograma de frecuencia de células 3β-HSD positivas detectadas en las condiciones control y tratadas por 36 h. La media y la desviación estándar del número de células encontradas en 14 campos diferentes seleccionados al azar, en los cultivos control ( $53.6 \pm 14$  DS) y en las células tratadas db-AMPc ( $54.8 \pm 15$ ), LH ( $55.0 \pm 7.3$ ) o hCG ( $42.5 \pm 11.3$ ) fue semejante. La amplitud de las barras representa la media porcentual de las células intensamente teñidas (barras negras) y células ligeramente positivas (barra sombreada) a la reacción de la 3 β-HSD. Las líneas representan el error estándar (ES). La LH, hCG y db-AMPc induce un incremento en la fracción de células de 3β-HSD positivas, la cual varía entre  $74 \% \pm 5$  y  $85 \% \pm 1$  comparado con el  $56 \% \pm 4$  encontrado en los cultivos control. En el análisis estadístico la fracción promedio de los cultivos control (\*) es estadísticamente diferente ( $P < 0.001$ ) a la de los tratados. Además a estos tratamientos también aumenta la fracción de células intensamente teñidas con respecto a las ligeramente positivas, comparadas con el control. (D) la secreción de la testosterona en cultivos de 8 y 36 h. La amplitud de las barras representan la media acumulada de los niveles de testosterona detectados en el medio de cultivo. Las líneas respresentan la desviación estándar (DE). La adición de LH, hCG o db AMPc estimulan significativamente la liberación de la testosterona tanto en los cultivos de 8 h (barras vacía) como en los de 36 h (8+24+36) (barras negras).



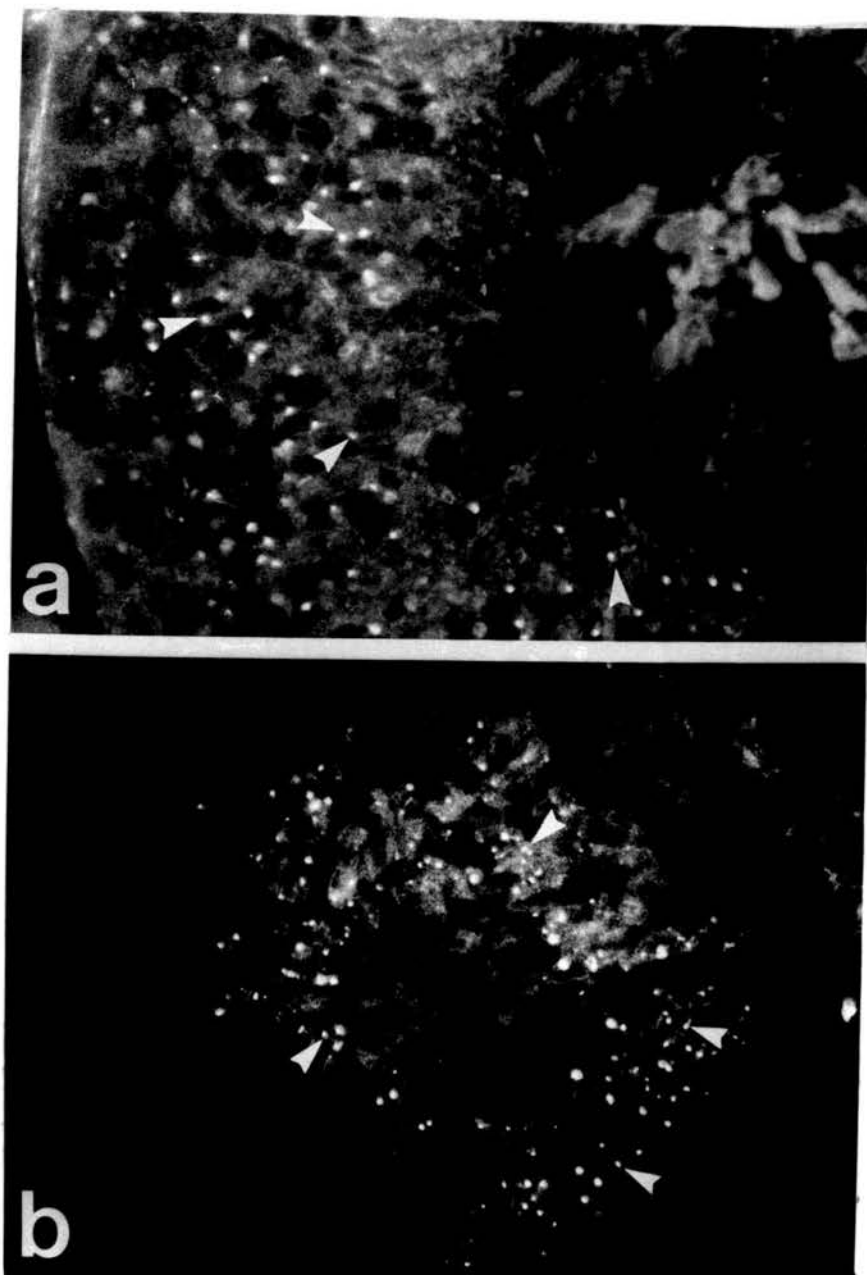
**Fig 2.- Inmunotinción de las conexinas que se expresan en los tejidos control.** **a)** Micrografía de una criosección de corazón, obtenida después de su incubación con el suero inmune (4991; 2.5) que reconoce al oligopéptido 346-360 del carboxilo terminal de la Cx43. En el corazón la inmunoreacción se localiza entre los discos intercalares de las fibras cardiacas (cabezas de flecha). **b)** Micrografía de una sección de corazón después de su incubación con el suero preinmune, esta imagen es típica del control negativo, en el cual no se detectan puntos fluorescentes (característicos de la inmunoreacción). **c)** Micrografía de una sección de hígado usando el anticuerpo contra la Cx32. **d)** sección de páncreas después de su incubación con el anticuerpo contra la Cx26 (este reconoce al oligopéptido 105-119). **c y d)** la inmunoreacción se localiza entre las membranas plasmáticas celulares en aposición (cabezas de flecha). Barra de calibración corresponde a 25  $\mu$ m.



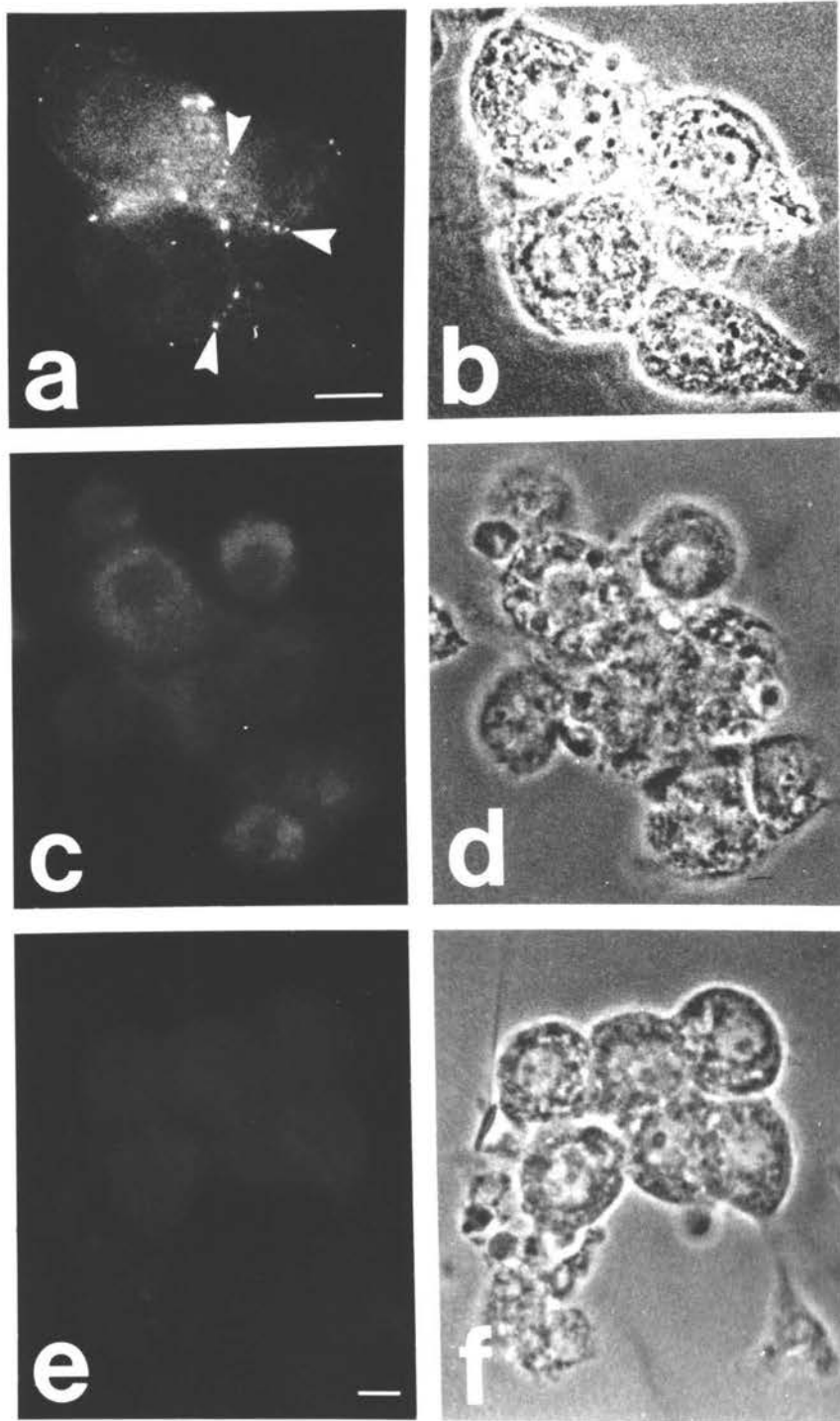
**Fig 3.- La Cx43 se expresa entre las células de Leydig in vivo.** Micrografías de contraste de fases (Nomarski) (b y d) y fluorescencia (a y c) de secciones de testículo obtenidas después de su incubación con el suero preinmune (a y b) y con el suero inmune contra la Cx43 (c y d). Puede observarse que existe una tinción positiva en forma de puntos fluorescentes entre las células Leydig, así como entre algunas células del túbulo seminífero probablemente células de Sertoli (c), que no se observa en las secciones incubadas con el suero preinmune. La barra de calibración corresponde a 20 µm.



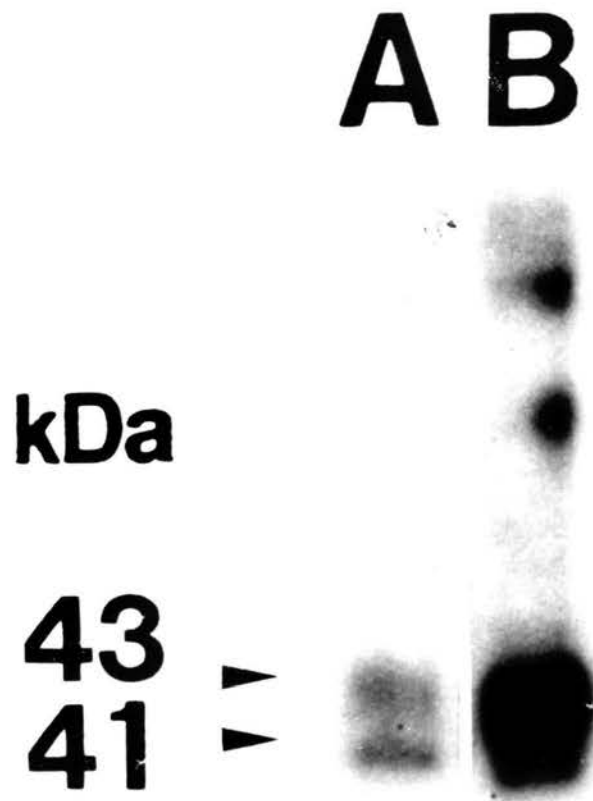
**Fig. 4. La Cx26 y Cx32 no se expresan en las células de Leydig.** Micrografías de fluorescencia (a,c) y con óptica de Normanski (b,d) de secciones de testículo de ratón después de su incubación con los anticuerpos contra la Cx32 (a y b) y Cx26 (c y d). b y d) Puede observarse el arreglo celular de las células de Leydig o Intersticiales (★), con respecto a las células de los túbulos seminíferos (\*). a y b) Puede observarse que no se detectó tinción inmunofluorescente en las células de Leydig después de su incubación con los anticuerpos contra la Cx32 (a) y Cx26 (b). Barra de calibración 20 µm.



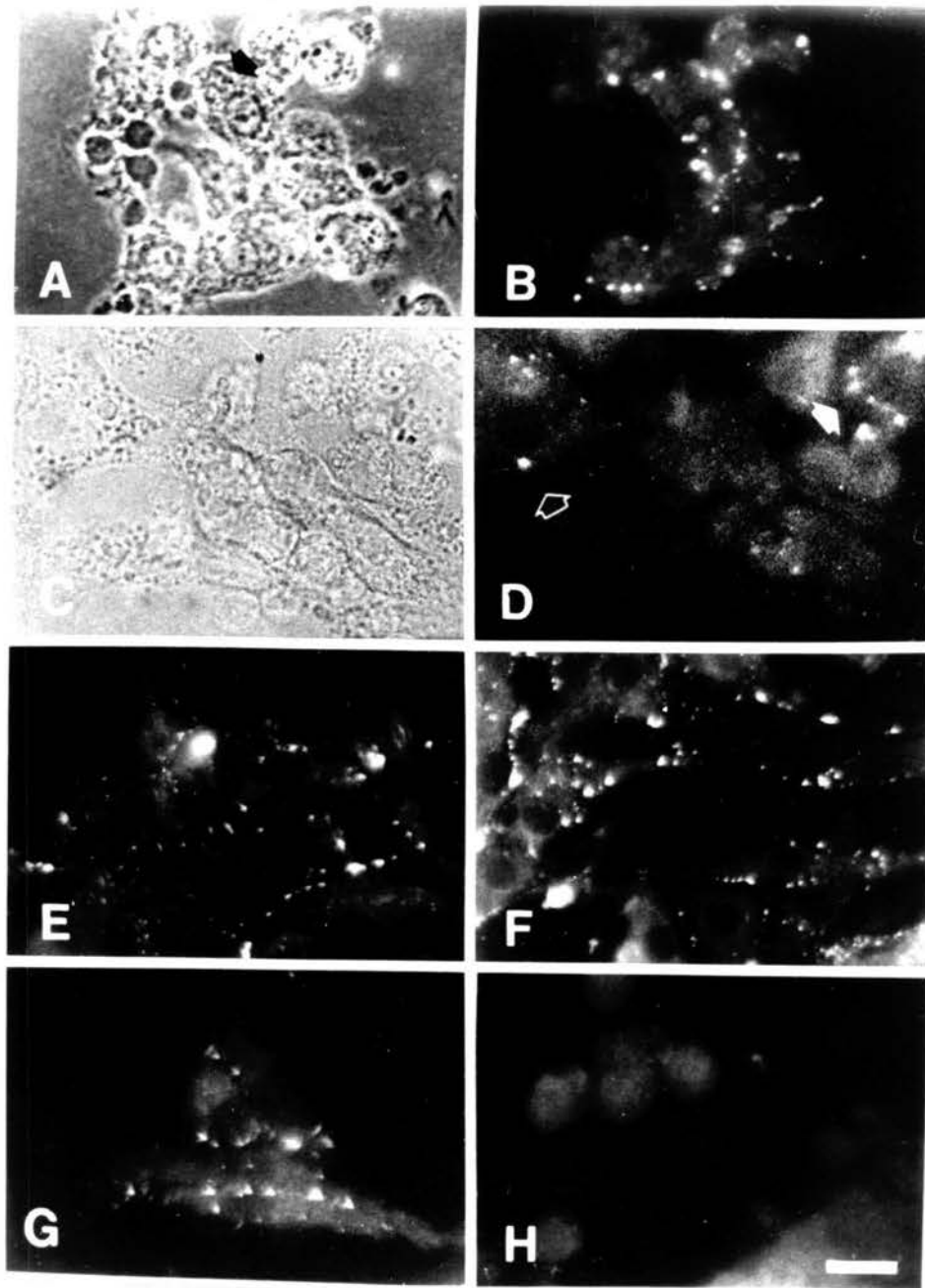
**Fig 5.- La Cx32 y 26 se expresan en el túbulo seminífero.** Micrografías de secciones de testículo inmunoteñidos con los anticuerpos contra las Cx32 (a) y Cx26 (b), se detectaron puntos inmunofluorescentes en algunos túbulos seminíferos (cabezas de flecha), lo cual sugiere la presencia de estas conexinas entre algunas de las células del túbulo. Barra de calibración 20  $\mu$ m.



**Fig. 6. Las células de Leydig expresan la Cx43 pero no la Cx26 y Cx32.** Micrografías fluorescentes (a,c,e) y de contraste de fase (b,d,f) de cultivos primarios enriquecidos en células de Leydig de testículo de ratón. **a)** Cultivo celular después de su incubación con el anticuerpo contra la Cx43, donde se observan puntos fluorescentes en las aposiciones membranales intercelulares (cabecitas de flecha). **c)** Cultivo celular observado después de su incubación con el anticuerpo contra la Cx32. **e)** Células tratadas con el anticuerpo contra la Cx26. En las dos últimas micrografías puede observarse que no hubo evidencias de inmunotinción en las zonas de aposición membranal. Barra de calibración 20  $\mu$ m.

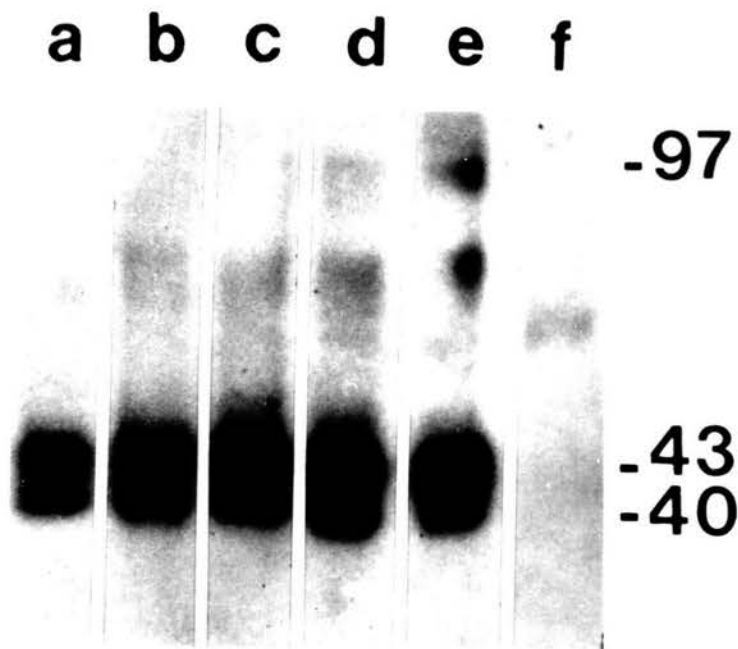


**Fig 7.- "Immuno blot" de proteínas totales de testículo (carril A) y corazón (carril B).** Obtenidos usando el mismo anticuerpo utilizado en los estudios de inmunofluorescencia, en ambos casos se encontraron bandas de 41 y 43 KDa, características de la Cx43.

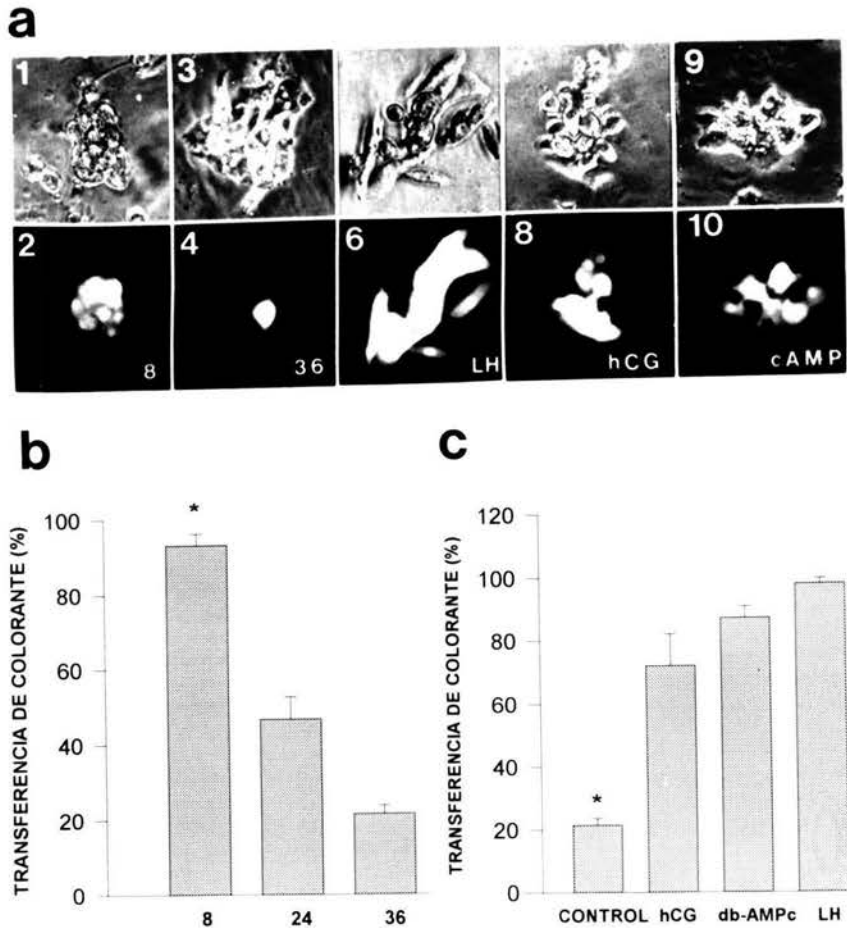


**Fig. 8. La Cx43 entre las células de Leydig decae con el tiempo de cultivo y este decaimiento es prevenido por la acción de la LH, hCG y el db-cAMP.** Micrografías en contraste de fase (A y C) y de fluorescencia (B, D, E, F, G y H) de cultivos celulares mantenidos por 8 (A, B, H) y 36 h (C, D) en condiciones control y tratados por 36 h con LH (E), hCG (G) o db-cAMP (F), después de su incubación con un antisuero contra los Aac 346-360 de la Cx43. Las células de Leydig bajo microscopía de contraste de fase, pueden identificarse por contener abundantes inclusiones lipídicas, que se observan como cuerpos birefringentes en los agregados celulares (A flecha). En los cultivos de 8 h se observa una tinción abundante de la Cx43 en las membranas de aposición sobre un fondo citoplasmático basal claro (B). En contraste, después de la incubación de las células con suero preinmune, no se detectó marca IF en estas zonas (H). En los cultivos control de 36 h se observa un importante decaimiento de la tinción IF (D). En estas condiciones de cultivo, en algunas células pudo detectarse un puntillero IF positivo para la Cx43 en las zonas de aposición membranal (flecha cerrada), aunque este no pudo detectarse en la mayoría de las células, las cuales presentaron un elevado fondo fluorescente basal o puntos fluorescentes intracitoplásmicos (D flechas abiertas). El tratamiento de los cultivos celulares de 36 h con LH (E), hCG (G) o db-AMP (F) previenen el decaimiento de la tinción IF de la Cx43 en las zonas de aposición membranal.





**Fig 9.- Los niveles de expresión de la Cx43 en células de Leydig control y tratadas con LH, hCG o db-AMPC.** Se ilustra un "immunoblot" obtenido después de la electroforesis de proteínas totales de un homogenado de células en cultivo enriquecidos en células de Leydig mantenidas por 36 h bajo condiciones control (**carril a**) o en presencia de hCG (**carril b**), LH (**carril c**) o db-AMPC (**carril d**), así como corazón (**carril e**) e hígado (**carril f**). Las bandas de 40 y 43 KDa se detectaron en las células de Leydig y en corazón (tejido control positivo), pero no en hígado, el cual mantiene la expresión de la Cx32 y Cx26. En los cultivos celulares, los niveles relativos de expresión de ambas bandas de la Cx43 se incrementaron en comparación con las no tratadas.



**Fig. 10. La comunicación intercelular en las células de Leydig decae con el tiempo de cultivo y es prevenida por la LH y hCG. A)** Micrografía en contraste de fase (superior) y fluorescencia (inferior) de cultivos de células de Leydig de 8 y 36 h como se indica. Las células de Leydig recién dispersadas presentan una morfología esférica (8 hr), y con el tiempo en cultivo estas tienden a alargarse (36 h). La microinyección del AL se realizó en conglomerados de células formados principalmente por células de Leydig, las cuales fueron previamente identificadas bajo microscopía de contraste de fase, por sus abundantes gotas de lípidos. El AL se inyectó a una célula de conglomerados de 6-10 células a través de una pipeta de "patch" por 5 min. En los cultivos control de 8 hr el AL transfirió a las células adyacentes sin embargo en los cultivos control de 36 h el AL no pasó a sus vecinas. El tratamiento con LH, hCG o db-cAMP de los cultivos celulares por 36 hrs, previno completamente el decaimiento en la transferencia del AL. **En B)** se grafica el decaimiento en la fracción de acople detectada con el AL entre las células de Leydig a los diferentes tiempos de cultivo que se indican. La amplitud de la barras representa la media porcentual de la fracción de células acopladas. El porcentaje del acople en cada conglomerado celular se calculó normalizando el número de células en las cuales se detectó el AL con respecto al número total de células del agregado. El número superior corresponde al total de conglomerados celulares inyectados. Puede observarse que a las 8 h casi todas las células se encontraban acopladas ( $93 \pm 3\%$ ), fracción de acople que decae drásticamente en los cultivos celulares de 24 ( $43 \pm 6\%$ ) y 36 h ( $21 \pm 2\%$ ). **C)** Incremento en la fracción de acople con el AL, detectada en conglomerados celulares tratados con LH hCG o db-cAMP por 36 h. Puede observarse que hay un aumento considerable en la fracción de acople detectada en los conglomerados celulares cultivados en presencia de db-cAMP ( $87 \pm 4\%$  ES) LH ( $98 \pm 2\%$ ) o hCG ( $72 \pm 10\%$ ) comparado con la detectada en cultivos control de 36 h ( $21.5 \pm 2\%$ ).

## 6.0 DISCUSION

Hemos demostrado usando técnicas de inmunotinción que la Cx43 pero no la Cx26 y Cx32 se expresa en las UC entre las células de Leydig. Además la Cx43 se expresa abundantemente entre las células de Leydig tanto *in vivo* como *in vitro*. También probamos que las principales hormonas que controlan la síntesis y liberación de la testosterona modulan la expresión de las UC y la comunicación intercelular formadas por la Cx43 en las células de Leydig.

Las UC se encuentran bajo el control de múltiples mecanismos, los cuales pueden inducir un incremento o una reducción en la comunicación intercelular con amplio espectro temporal que varía de segundos (modulación a corto plazo) hasta horas y días (modulación a largo plazo) (Stagg R. B. y Flecher W. H., 1990). En este trabajo mostramos que hay un importante decaimiento en el acople intercelular de las células de Leydig, después de que éstas se han mantenido en cultivo por 24 h y 36 h, esto ocurre en paralelo con un decremento en la localización de la Cx43 en las membranas de unión. La correlación del decaimiento en ambos procesos indica que la expresión de la Cx43 es necesaria para el mantenimiento del acople intercelular. Estos resultados concuerdan con observaciones electrofisiológicas previamente reportadas por nosotros en pares de células de Leydig (Pérez Armendariz., et al 1994), los cuales también indican que la Cx43 es la principal conexina que se expresa entre éstas células ya que se registraron corrientes de unión unitarias con características semejantes a las descritas entre otros pares de células que expresan principalmente la Cx43

El decaimiento en la comunicación intercelular y la expresión de la Cx43 observados bajo condiciones de cultivo puede resultar de alteraciones en la expresión del gen responsable de la producción de la Cx43 debido a la pérdida de factores que normalmente se presentan *in situ*. La expresión de las UC en otros sistemas celulares es afectada por hormonas y componentes de la matriz extracelular (Pérez Armendariz., et al 1995, Stagg R. B y Fletcher W. H., 1990, Rosenberg et al., 1993). La LH y hCG son hormonas tróficas cuyos efectos a largo plazo involucran la síntesis de proteínas (p.e. incrementan el volumen celular, inducen el desarrollo de organelos intracelulares, así como la síntesis de enzimas esteroidogénicas Payne A. H. 1980, O'shaughnessy P.J. y Payne A. H. 1982), posiblemente cuando estas hormonas están ausentes o en concentraciones bajas en el medio del cultivo inducen una alteración en la síntesis de la Cx43. De acuerdo a esta idea cuando se adicionó la LH, hCG al medio de cultivo se mantuvo la comunicación intercelular y la expresión de la Cx43 demostrándose así que estas hormonas juegan un papel importante en la regulación de la expresión de la Cx43. La LH y la hCG se ligan al mismo receptor y aumentan la concentración del AMPc (Seggalof D. L. y Ascoli M., 1993). La adición del db-AMP a los cultivos celulares, causó el mismo efecto de las hormonas, incrementa la expresión de la Cx43 y el acople intercelular entre las células de Leydig con el mismo curso temporal. Por lo anterior es posible que el efecto de la LH y hCG estén siendo mediadas a través del efecto del AMPc. El recambio o vida media de la Cx43 es de entre 2 a 5 h (Crow et al., 1990, Mussil et al., 1990, Lair et al., 1991). Por lo tanto los cambios en las UC o

en la comunicación intercelular que ocurren durante el transcurso de las horas, pueden involucrar cualquier paso en la biosíntesis de las conexinas, tales como: Alteraciones en la síntesis de las conexinas, así como en la estabilidad de su RNAm, alteraciones en la velocidad de transcripción y/o traducción de la conexina, así como además inducir su velocidad de inserción de los canales a la membrana plasmática y/o su ensamble en la placa unión comunicante. Finalmente, la regulación también puede ocurrir alterando la velocidad de la remoción de las proteínas de las membranas plasmáticas y/o en su velocidad de degradación.

El AMPc tiene efectos múltiples en la regulación de las conexinas. En otros sistemas celulares, en los cuales la Cx43 se expresa predominantemente se ha encontrado que el AMPc tiene un efecto estimulador (*Stagg R. B. y Flettcher W. H., 1990*) aunque también puede ser inhibitorio como en las células del miometrio (*Cole W.C. y Garfield R. E., 1986*). En otros sistemas celulares, el AMPc puede estimular la transcripción de la Cx43 y aumentar la estabilidad del RNAm. La Cx43 es una fosfoproteína que en la mayoría de los sistemas celulares exhibe dos bandas, con movilidad electroforética cercanas, una banda es de 40-41 KDa, la que corresponde a la forma defosforilada de la proteína, la otra es de 43 KDa y corresponde a la forma fosforilada (*Crow et al., 1990, Musil et al., 1990, Lair et al., 1991*). La fosforilación de la Cx43 se ha asociado con la inserción de esta conexina a la membrana plasmática y con el aumento de la comunicación intercelular (*Musil et al., 1990*). Nosotros mostramos que la LH y hCG incrementan los niveles relativos de ambas formas electroforéticas de la Cx43 en comparación con los niveles detectados en los cultivos

control y este efecto es también producido por el AMPc. Estos datos confirman el papel modulador de estas hormonas y apoyan la hipótesis de que el AMPc está actuando como un mediador de los efectos hormonales. El aumento de los niveles de la Cx43 inducido por estos tratamientos sugiere que el AMPc y las hormonas incrementan la velocidad de síntesis de la Cx43. También es posible que estos tratamientos incrementen la inserción de los canales a la membrana ya que las placas individuales teñidas con el anti-conexina 43 fue mayor en las células tratadas, con respecto a las no tratadas. Además las células no tratadas presentaron un elevado fondo basal con respecto a las tratadas así como unos puntos fluorescentes intracitoplasmáticos, lo cual sugiere que la tinción interna puede resultar de la internalización de la conexina.

La estimulación de la expresión de la Cx43 en las células de Leydig inducida por la LH, la hCG y el AMPc se detectó entre las 24 y 36 h . Este aparente curso temporal lento se encuentra dentro del rango observado en otros sistemas celulares. El cual se ha encontrado que varía entre 6 h a 7 días (Stagg y Fletcher 1990). Las grandes diferencias en el curso temporal del efecto estimulador del AMPc en los diferentes tejidos celulares mencionados se ha explicado como el resultado de una modulación específica de la conexina en cada tipo celular. Las células de Leydig *in situ* están conectadas entre sí a través de grandes placas de unión comunicante y están extensamente comunicadas por lo que es posible que a las 8 h el tratamiento hormonal haya inducido cambios discretos en estas células, los cuales no fueron detectados por la técnica de inmunofluorescencia o de transferencia del colorante

utilizadas en el presente trabajo. De lo anterior, se concluye que las hormonas que estimulan el aumento de la liberación de la testosterona, también controlan el incremento en la comunicación intercelular y la expresión de la Cx43 en las células de Leydig. Estos hallazgos sugieren que las uniones comunicantes pueden participar en el control de la secreción.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alberts Bruce, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (1994). *Molecular Biology of the cell*. 3ª edit. Garland Publishing Inc. New York and London p 957-962.
- 2.- Bellido C. (1992). Reproducción en el varón. edit. TRESGUERRES J.A.F. En *Fisiología humana*. 1ª edic. McGraw-Hill. España. p 1079-1086
- 3.- Bennet M.V., Aljure E., Nakajima Y. and Pappas G.D., (1963). Electrotonic junctions Between teleost spinal neurons: Electrophysiology and ultraestructure. *Science*. 141:262-264.
- 4.- Bennet M.V., Barrio L.C., Bargiello T.A., Spray D.C., Hertzberg E. and Saéz J.C. (1991). Gap junctions: New tools, new answers, new questions. *Neuron*. 6:305-320.
- 5.- Beyer E.C., Paul D.L. and Goodenough D.A. (1990). Connexins family of gap junctions protein. *J. Memb. Biol.* 116: 187-194.
- 6.- Beyer E.C., Paul D.L. and Goodenough D.A. (1987). Connexin 43: A protein from rat heart homologous a to gap junctions protein from liver. *J. Cell Biol.* 105: 2621-2629.
- 7.- Cole, W.C., Garfield, R.E. (1986). Evidence for physiological regulation of myometrial gap junction permeability. *Am J. Physiol.*, 251:C411-C420.
- 8.- Crow, D.S., Beyer, E.C., Paul, D.L., Kobe, S.S., and Lau, A.F. (1990). Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblast. *Mol. Cell Biol.*, 10:1754-1763.
- 9.- Decker R.S. (1976). Hormonal regulation of gap junctions differentiation. *J. Cell Biol.* 69:669-685
- 10.- Dermietzel R., Hwang T.K. and Spray D.S. (1990). The gap junctions family: structure, functions and chemistry. *Anat. Embriol.* 182:517-528.
- 11.- De Robertis. (1990). *Biología celular y molecular*. Ateneo. 3ª reimpresión. Argentina. pp. 113-133.
- 12.- Dumber B. S. and Schwoebel E.D. (1990). Preparation of polyclonal antibodies. In *Methods in enzymology*. V.182. Edit. Academic Press Inc. p 663-678.
- 13.- Dym M. (1983). The male reproductive sistem. In: *Histology cell and tissue Biology*. Weiss Leon (Edit). Elsevier Biomedical New York. USA.



- 14.- Flagg-Newton, J.L., Dahl, G., and Loewenstein, W.R. (1981). Cell junction and cyclic AMP: I. Upregulation of junctional membrane permeability and junctional membrane particles by administration of cyclic nucleotide or phosphodiesterase inhibitor. *J. Membr. Biol.*, 63:105-121.
- 15.- Gilula N.B., Reeves R.O. and Steinbach A. (1972). Metabolic Coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature*. 235: (4):262-265.
- 16.- Goodenough D.A. and Revel J.P. (1970). A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J Cell Biol.* 45: p 272-290
- 17.- Gourdie R.G., Green C.R. (1991). Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J. cell Science.* 99. 41-55.
- 18.- Haefliger J.A., Bruzzone R., Jenkins N.A., Gilberts D.J., Copeland N. and Paul D.L. (1992). Four novel members of the connexins family of gap junctions protein. *J. Biol. Chem.* 267 (3):2057-2064.
- 19.- Hertzberg E., Ross G. (1988). Gap junctions. In: *Modern cell Biology*. Vol.7. Eds. Birgit H. Stair. New York. pp. 1-166.
- 20.- Kawa K. (1987). Existence of calcium channels and intercellular coupling in the testosterone secreting cell of mouse . *J. Physiol.* 393:647-666.
- 21.- Kenney D.S. and Masson J.I. (1992). Expression of testicular 3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase/5-4 isomerase regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cell of adult rats. *Endocrinology.* 130:2007-2015
- 22.- Knobil E., Neill J.D. (1988). *The physiology of reproduction*. Ed. Raven Press. v I. New York p 897-902
- 23.- Karrer.H.E, Cox. (1974). The strained musculature of bloods vassels II cell interactions on cell surface. *J. Biophys. Biochem.* 8:135-150.
- 24.- Kumar N.M. and Gilula N.B. (1986). Cloning and characterization of human and Rat liver cDNAs coding for a gap junctions proteins. *J. Cell Biol.* 103:767-776.
- 25.- Laird, D.W, Puranam, K.L., and Revel, J.P. (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.*, 273:67-72.
- 26.- Makowski L., Caspar D.L., Phillips W.C. and Goodenough D.A. (1977). Gap junctions structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J.cell Biol.* 74:629-645

- 27.- Meda P., Perrelet, A. and Orci L., (1979). Increased of gap junction between pancreatic B-cell during stimulation of insulin secretion. *J. cell Biol.*, 82:441-448.
- 28.-Metha, P.P., Yamamoto, M., and Rose, B., (1992). Transcription of the the gene for the gap junctional protein connexin43 and expression of functional cell-to-cell channels are regulated by cAMP. *Mol. Biol. Cell.*, 3:839-850.
- 29.- Murray S.A. and Flecher W.H. (1984). Hormone-induced intercellular signal transfer dissociates cyclic AMP-dependent protein kinase. *J cell Biol.* 98:1710-1719.
- 30.-Musil, L. S., Cunningham, B.A. Edelman, G.M., and Goodenough D.A. (1990). Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell. Biol.*, 111:2077-2088.
- 31.- O'Shaughnessy, P.J., and Payne, A.H. (1982). Differential effects of single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzymes in Leydig cell populations. *J. Biol. Chem.*, 257:11503-11509.
- 32.- Paul D.L. (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J.cell Biol.* 103:123-134.
- 33.- Payne, A.H., Wong, K.-L., and Vega, M.M. (1980). Differential effects of single and repeated administration of gonadotropins on luteinizing hormone receptor and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells. *J. Biol. Chem.*, 255:7118-7122.
- 34.-Pérez-Armendariz, E.M., Roy, C., Spray, D.C., and Bennett, M.V. L. (1991). Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells. *Biophys. J.*, 59:76-92
- 35.- Pérez-Armendariz, E.M., Tapia, D., J. Luna, Bennett, M.V.L, Hall, D. (1995b). Gap junctions expressed in mammary glands In: "Intercellular communication through gap junctions", Kanno, Y., Kataoka, K., Shiba, Y., Shibata, Y., and Shimazu, T. (Eds), Elsevier Science B.V, Amsterdam, *Progress in Cell Res.*, 4:413-417.
- 36.- Pérez-Armendariz, E.M., Romano, M. C., Luna, J., Miranda, C., Bennett, M. V. L., and Moreno, A. P., (1994). Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *A. J. Physiol.*, 267:C570-580.
- 37.- Pérez Peña E. (1992). *Endocrinología del embarazo*. Endocrinología. Edrs. Flores Lozano F. y Cabeza de F.A., Méndez Editores. México.p467-471
- 38.- Pfeiffer D.C. and Vogl A.W. (1991). Evidence for the presence of actin-associated intercellular adhesion junctions between interstitial cell of leydig in the ground squirrel testis. *Anat. Rec.* 230:473-480.

- 39.- Pitts J.D. (1980). The role of junctional communication in animal tissue. *In vitro*. 16(12):1049-1056.
- 40.- Ramon F., Rivera A. y Zampighi G. (1988). Un bosquejo histórico del descubrimiento de las uniones comunicantes. *Avance y perspectiva*. IPN. 34:3-8.
- 41.- Revel J.P. and Karnovsky M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell. Biol.* 33:C6-C18.
- 42.- Risley, M.S., Tan, I.P., Roy, C., and Saéz, J.C. (1992). Cell -, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J. Cell Sci.*, 103:81-96.
- 43.- Robertson D. J. (1963). The occurrence of a subunit patterns in the unit membranes of clulo ending in the mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. cell. Biol.* 19: 201-222.
- 44.- Roitt I.M. (1994). Antibodies. In *Essential immunology*. Blackwell scientific publication. 8<sup>a</sup> Edic. London. p467-471
- 45.- Rosenberg E., Spray D. C., and Reid L.M. (1983). Matrix regulation of gap junction and of excitability in cell. In: *Extracellular Matrix. Chemistry, Biology and Pathology with emphasis on the liver*. Zern, M.A., and Reid L.M. (eds.), New York, N.Y., Marcel Decker Inc. p 449-462
- 46.- Saéz J.C., Connor J.A., Spray D.C and Bennett M.V.L. (1989). Hepatocyte gap junction are permeable to the second messenger, inositol, 1,4,5 triphosphate and to calcium ion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:2708-2712.
- 47.- Saéz J.C., Spray D.C. (1991). Cell junctions. *Encyclopedia of human Biology*. V.2. Academic Press USA. p. 267-278.
- 48.- Saéz J.C., Spray D.C., Nair A.C., Hertzberg E., Greengard P. and Bennett M.V.L. (1986). cAMP increased junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27 KDa principal gap junction polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*. 83:2473-2477.
- 49.- Segaloff, D.L., and Ascoli, M. (1993). The Lutropin/Choriogonadotropin receptor 4 years later. *Endocr. Rev.*, 14:324-347.
- 50.- Simpson I., Rose B. (1976). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science*. 195:294-296.
- 51.- Stagg, R.B., and Fletcher, W.H. (1990). The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. *Endoc. Rev.*, 11:302-325.

- 52.- Stevenson B.R., Anderson J.M., Goodenough D.A., and Mooseker, M.S.(1988). Tight junctions structure and ZO-1 content are identical in two strains of medin-Darby canine kidney cell which differ in transepithelial resistance. *J. cell. Biol.* 107:2401-2408.
- 53.- Stewart W.W. (1981). Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature.* 292:17-21.
- 54.- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gel into nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
- 55.- Unwin P.N. and Zampighi G. (1980). Structure of the junctions between communicating cell. *Nature London.* 283:537-549.
- 56.- Yancey B.S., Biswal S. and Revel P.J. (1992). Spatial and temporal patterns of distribution of the gap junction protein connexin 43 during mouse gastrulation and organogenesis. *Develop.ment.* 114:203-212.
- 57.- Yancey B.S., John S.A. , Austin B.,J. and Revel J.P. (1989). The 43 KDa . polipeptide of heart gap junctions: Immunolocalization (I), topology (II), and functional Domains (III). *J. cell Biol.* 108:2241-2254
- 58.- Yamamoto T., Ochalski A., Hertzberg E. and Nagy J. (1990a). On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by L.M and E.M immunohistochemistry of connexins 43 expression. *J.Comp. Neurol.* 302:853-883.
- 59.- Yamamoto T., Ochalski A., Hertzberg E. and Nagy J. (1990b). L.M and E.M immunolocalization of the gap junctional protein connexins 43 in the rat brain. *Brain Res.* 508:313-319.
- 60.- Zhang J.T. and Nicholson B.J. (1989). Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junction, Cx 26, as deduced from its cDNA. *J Cell Biol.* 109:3391-3401.
- 51.- Zimmer D.B., Green C.R., Evans H.W. and Gilula N.B. (1978). Topological analysis on the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *J. Biol.Chem.* 262(16):7751-7763.