UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

"EFECTO DEL ESTRADIOL EN IMPLANTES SUBDERMICOS DE POLIDIMETILSILOXANO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS EN LAS DIFERENTES REGIONES DEL EPIDIDIMO DE RATA"

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION ANIMAL

p r e s e n t a

Victoria Jayme Ascencio

Director de Tesis: Dr. Adolfo Rosado García

MEXICO, D. F. MAYO, 1994

GRACIAS A DIOS QUE ME DIO LA VIDA,
QUE ME HA DADO TANTO

A todos aquellos seres que dieron su vida para la realización de esta tesis y permiten el evance de la Ciencia: LOS ANIMALES DE LABORATORIO

A mis padres: Que me criaron con un devoto amor por la vida y el trabajo.

José Jayme García: Que fué bueno conmigo y de él absorví las ideas que mas tarde fueron solidificadas y que, aunque lejos, siento su apoyo y amor.

Teresa Ascencio de J.: Por su apoyo, respeto, confianza y cariño desinteresado

A mis hermanos: José, Artemio, Diana, Laura y Ana que son parte de mi vida y por ser las personas con quien siempre he contado en las buenas y en las malas.

A mis sobrinos: Que son motivo de mi vida y han generado energía positiva en mi, por ser el futuro.

A mis amigos: Que han compartido mis triunfos, mis tristezas y que con su disposición incondicional en los momentos difíciles de mi vida me han ayudado a seguir adelante. Gracias José Sánchez.

A mis compañeros de trabajo: Tomás Quirino, Norberto Manjarrez, Felipe Mendoza y a los alumnos de Servicio Social, que me apoyaron para realizar esta Tesis.

A todas aquellas personas que con su ayuda hicieron posible la realización de este trabajo.

EFECTO DEL ESTRADIOL EN IMPLANTES SUBDERMICOS DE POLIDIMETILSILOXANO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS EN LAS DIFERENTES REGIONES DEL EPIDIDIMO DE RATA

INDICE

Contenido:	Página
- **OBJETIVOS**	1
- **INTRODUCCION**	2
- **ANTECEDENTES**	4
- Espermatogénesis	4
Maduración espermática	5
Tránsito por el epidídimo	5
- Epidídimo	7
Morfología	11
Tipos de celulas	12
Características funcionales del epidídimo	15
- Efecto de los andrógenos sobre el epidídimo	20
Composición total	20
Síntesis de proteínas	23
- Estrógenos y receptores estrogénicos en el epidídimo	31
- **HIPOTESIS**	34
- **MATERIALES Y METODOS**	35
- **ANEXO DE MATERIALES Y METODOS**	42
- **RESULTADOS**	44
- **DISCUSION Y CONCLUSIONES**	64
- **BIBLIOGRAFIA**	68
- **PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTIFICOS**	75

OBJETIVO GENERAL.

DETERMINAR SI EL EPIDIDIMO TIENE RESPUESTAS DIFERENTES EN SUS DIFERENTES REGIONES A LOS MECANISMOS REGULADORES.

OBJETIVO ESPECIFICO.

DETERMINAR SI EL PATRON PROTEICO DE LAS DIFERENTES REGIONES DEL EPIDIDIMO DE RATAS ADULTAS SE MODIFICA SELECTIVAMENTE AL SER TRATADAS CON IMPLANTES SUBDERMICOS DE ESTRADIOL.

INTRODUCCION

La adquisición de la fertilidad de los espermatozoides a su paso por el epidídimo depende del funcionamiento normal de éste. La maduración del esperma (desarrollo de la capacidad de fertilizar al huevo) tiene como lugar principal la región de la cabeza del epidídimo (25), la región de la cola sirve preferentemente como depósito de espermas maduros antes de su liberación por la eyaculación via ductos deferentes o, en algunos casos, desechados en la orina.

Se considera que la maduración del esperma en la cabeza y su almacenamiento, en estado metabólicamente quiescente, en la cola del epidídimo son regulados por el medio específico intraluminal creado por el epitelio epididimal. Con este fin, el epitelio regula el transporte de materiales desde la corriente sanguinea al lumen (y viceversa) y sintetiza un número de sustancias específicas que son secretadas al lumen.

Para el cumplimiento de estas funciones, el epitelio es regulado a su vez por hormonas androgénicas que llegan a él sistematicamente via el torrente sanguineo y tambien localmente por medio del fluído entrante al epidídimo desde el testículo.

En vista de que los espermatozoides tienen una habilidad limitada para síntesizar proteínas, es razonable asumir que algunas nuevas proteínas que se adhieren a su superficie, procedentes del plasma seminal como productos de la capacidad metabólica del propio epidídimo,pueden participar en la adquisición por la célula espermática de las propiedades características que le confieren las propiedades de maduración.

Algunos estudios indican que las proteínas específicas epididimales (PEE) son producidas principalmente en la cabeza del epidídimo, en el epitelio distal de esta región. En el epidídimo la producción de proteínas es diferente en cada segmento y esta regulada por diferentes factores.

Para obtener evidencia directa acerca de la posibilidad de que esta diferencia en la producción de proteínas este regulada diferencialmente por el medio endócrino, estudiamos el efecto de tres dosis de estradiol (administrados crónicamente en implantes subdérmicos de polidimetilsiloxano) en ratas adultas macho sobre el patrón de proteínas de la secreción epididimaria obtenida de las diferentes regiones del epidídimo.

ANTECEDENTES

ESPERMATOGENESIS.

La espermatogénesis se produce en los túbulos seminíferos del testículo durante el periodo de actividad sexual a consecuencia de la estimulación por las hormonas gonadotrópicas de la hipófisis. Los túbulos seminíferos contienen gran número de células pequeñas y medianas, denominadas espermatogonias, situadas dos o tres capas a lo largo del borde externo del epitelio tubular. Estas células proliferan continuamente y se diferencían pasando por etapas definidas del desarrollo para producir espermatozoides. La primera etapa de la espermatogénesis es el crecimiento de las espermatogonias para formar células mucho mas voluminosas denominadas espermatocitos primarios. Después estos se dividen en espermatocitos secundarios, pronto cada una de estas células se divide por división meiótica para formar espermátides. Cuando se han formado las espermátides todavía conservan las características usuales de celulas epiteloides, pero después cada una empieza a alargarse para constituir el espermatozoide. Después de formarse en los túbulos seminíferos, los espermatozoides siguen por los túbulos rectos hasta llegar al rete testis, salen de esta estructura a través de los conductos eferentes (que se unen para formar un solo conducto enrrollado que es el túbulo epididimario) llegando asi a la cabeza del epidídimo.

MADURACION ESPERMATICA.

Cuando el espermatozoide es liberado de los túbulos seminíferos todavía es inmaduro (son completamente inmóviles o bién poseen únicamente movimientos flagelares poco enérgicos que no son capaces de producir ningún desplazamiento de la célula espermática y no son capaces de fertilizar al ovocito). La maduración es la última etapa de la espermiogénesis y se define como "Proceso complejo que se inicia durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo y que confiere al espermatozoide la capacidad funcional, de movilidad y fertilizante, sin la cuál no es capaz de fecundar el ovocito" (64). Algunos autores indican que el sitio en donde el espermatozoide inicia su maduración varía según la especie del animal, pero en general se considera que la cabeza y el cuerpo son el sitio principal de maduración y que la cola funciona preferentemente como depósito (20).

No todos los espermatozoides maduran simultaneamente, algunos maduran mas rápido en la región proximal del epidídimo (cabeza), pero por regla general todos aquellos que entran a la cola estan ya completamente maduros

TRANSITO POR EL EPIDIDIMO.

Los espermatozoides son producidos por meiosis dentro de los túbulos seminíferos de los testiculos. Son liberados del epitelio de estos túbulos hacia el lumen. Transcurren, aparentemente por via a tergo, a lo largo de los tubulos seminíferos hasta la rete testis

y abandonan los testículos por medio de los ductos llamados eferentes para penetrar al epidídimo.

Los espermatozoides colectados directamente del testículo son incapaces de fertilizar; esta capacidad es desarrollada o se presenta sólo después de que los espermatozoides han pasado a través del epidídimo.

Los espermatozoides de los mamíferos sufren una serie de modificaciones a su paso por el epidídimo de lo cuál resulta la adquisición de la movilidad vigorosa y progresiva que muestra el espermatozoide eyaculado y la habilidad de fertilizar al ovocito (5).

TABLA 1.- TIEMPO DE TRANSITO EN DIAS DE LOS ESPERMATOZOIDES POR EL EPIDIDIMO EN MAMIFEROS.

ESPECIE	EPIDIDIMO COMPLETO	CABEZA CUERPO	COLA	REFERENCIAS
VERRACO	14.0	5.0	9.0	Singh 1962*
				Swierstra 1968*
TORO	8.0-11.0	4.0	5.0-7.0	Orgebin 1961*
	9.0-12.0			Koefoed 1961*
COYOTE	14.0			Kennely 1972*
HAMSTER	15.6	2.0	13.6	Amann 1976*
CONEJO	9.0-10.0	4.0	5.0-6.0	Orgebin 1965*
	7.0-11.0			Amann 1965*
	8.0-10.0			Swierstra 1965*
	12.7	3.0	9.7	Amann 1976**
BORREGO	11.0-13.0	4.0	7.0-9.0	Ortavant 1959*
				Amir 1968*
RATA	8.4	3.4	5.0	Robaire 1978**
				Dyson 1972*
RATON	9.7	3.9	5.8	Meistrich1975*
	8.7	3.1	5.6	Meistrich1975**
MONO	10.5	4.9	5.6	Amann 1976**
HUMANO	5.5	1.8	3.7	Amann 1981

Calculado por transporte de espermatozoides marcados.
** Calculado por reservas espermáticas.

El tiempo de tránsito del espermatozoide por el epidídimo se puede medir marcando el DNA de las células germinales con timidina ^{32}P o H^3 para seguir así el tránsito del espermatozoide marcado a través del epidídimo por autorradiografía o bién midiendo la radioactividad por cualquier otro método. La duración del tránsito en cada segmento esta dada por la diferencia entre la llegada del primer espermatozoide marcado en el núcleo y su presencia en cada segmento (cuerpo y cola), la duración del tránsito es proporcional a la reserva en cada segmento.

Tambien es posible calcularlo dividiendo el número de espermatozoides en cada segmento entre la producción espermática diaria del testículo. Aunque el largo del conducto epididimario varia con la especie, el tiempo de tránsito es muy semejante, 10-12 días (Tabla 1). En casi todas las especies la maduración dura de 3 a 5 días, con excepción del hombre (Tabla I).

Epidídimo

El término epidídimo tiene su origen en el idioma griego que significa adyacente al testículo. Consiste de un simple y largo tubo intrincadamente enrrollado sobre la superficie del testículo. La longitud del túbulo varia según la especie; en el hombre 3-4 mts, caballo 80 mts, roedores 1 mt (63). El túbulo llamado epididimario se conecta con el testiculo a través de los ductos eferentes formando lo que se conoce como cabeza del epidídimo, el túbulo enrrollado continua sobre la superficie lateral del testículo formando el cuerpo del epidídimo y sobre la superficie caudal formando la cola (Fig 1).

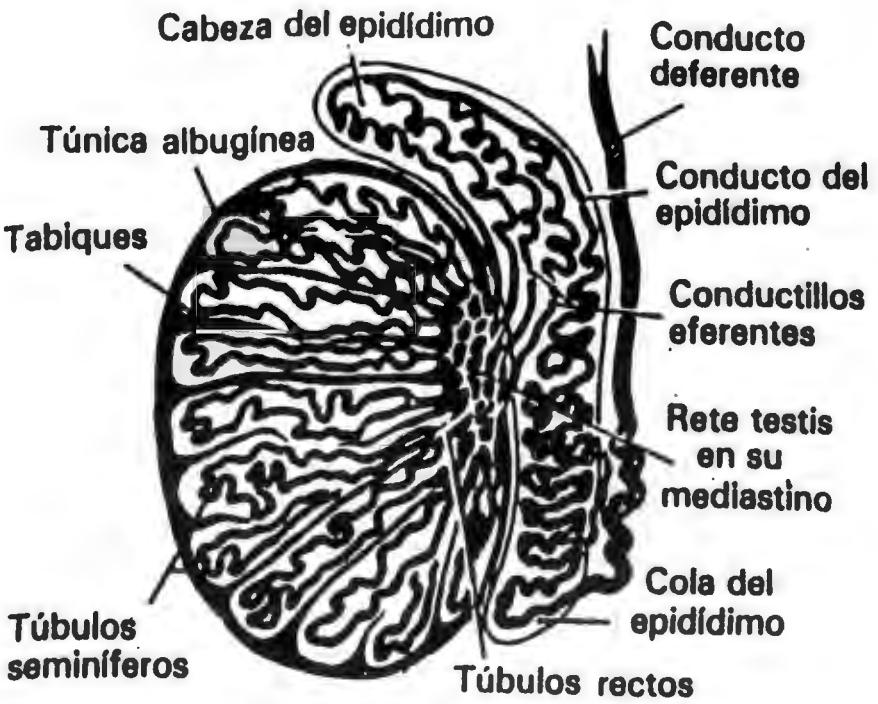


Fig 1. TESTICULO Y EPIDIDIMO

De ahi el túbulo continua através del conducto deferente hasta la próstata (Fig 2).

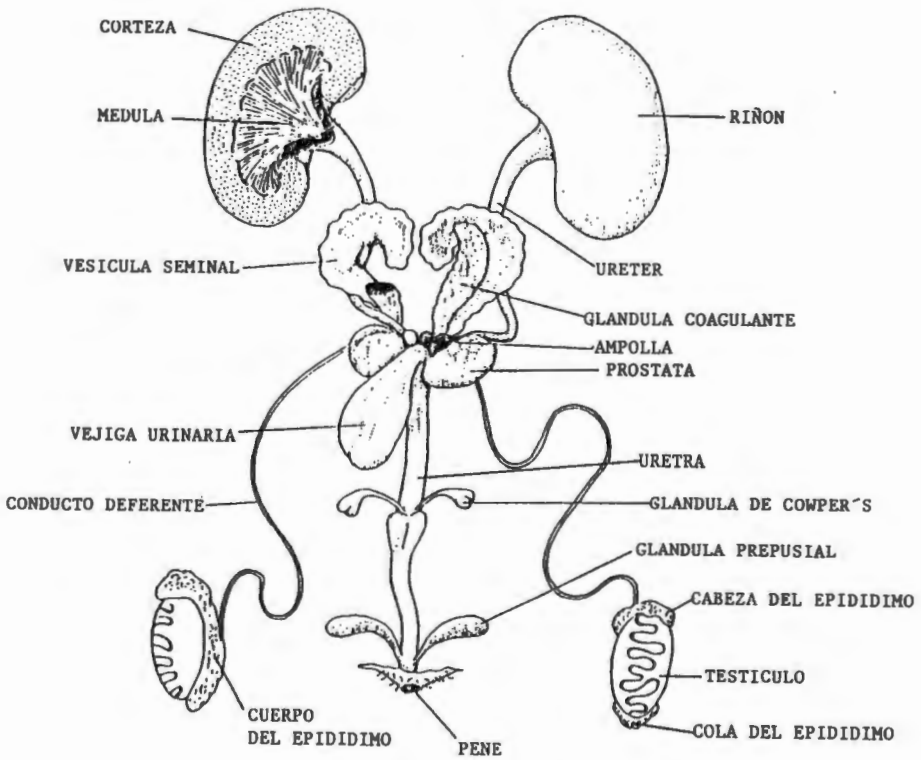


Fig 2. SISTEMA UROGENITAL DE RATA MACHO.

Tomado de Chiasson.B:R. 1978.

La división histológica y citológica del epidídimo no necesariamente ocupa la misma posicion en diferentes especies. (Fig 3).

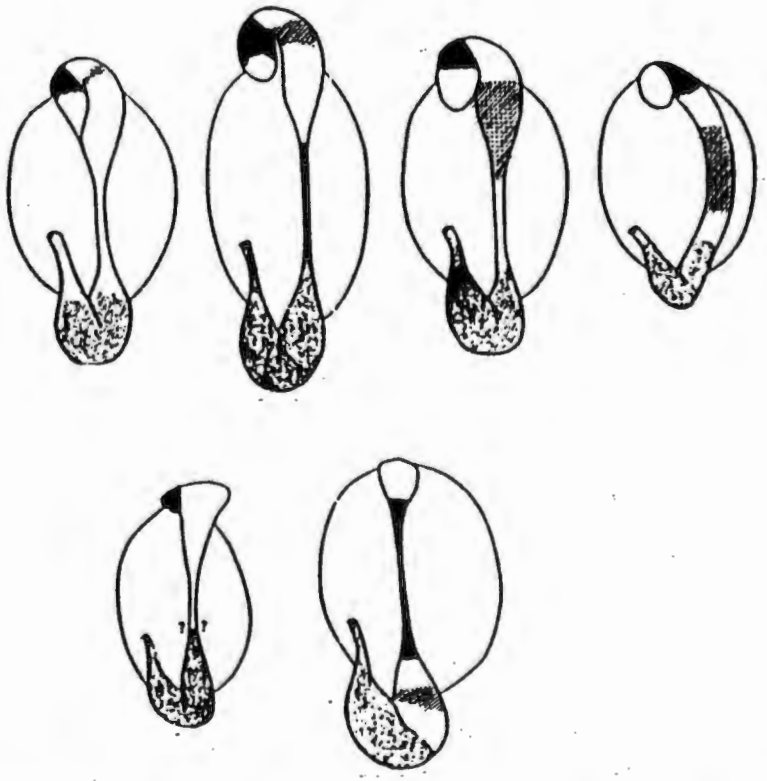


Fig 3. REPRESENTACION DIAGRAMATICA DE LA DIVISION DEL EPIDIDIMO EN TRES SEGMENTOS EN DIFERENTES ESPECIES, DIVIDIDOS EN SEGMENTO INICIAL, MEDIO Y TERMINAL EN BASE A CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS Y CITOLOGICAS LAS CUALES NO NECESARIAMENTE OCUPAN LA MISMA POSICION EN DIFERENTES ESPECIES.

segmento inicial
segmento medio
segmento terminal
2a parte del segmento medio en donde se encuentra una alta concentración de espermatozoides.

MORFOLOGIA

El túbulo epididimario es un tubo angosto rodeado por tejido conectivo que contiene fibroblastos, colágena, fibras elásticas, vasos sanguíneos y una membrana muscular formada por fibras longitudinales, circulares y oblicuas. Las vueltas del túbulo se mantienen unidas entre sí por el tejido conectivo y fibras musculares lisas.

En el interior del túbulo existe un epitelio pseudo-estratificado localizado arriba del tejido conectivo. La relativa proporción del tejido conectivo se incrementa en la región mas distal del ducto.

El largo tubo enrrollado, puede ser subdividido morfológica y funcionalmente en diferentes regiones (Fig 4).

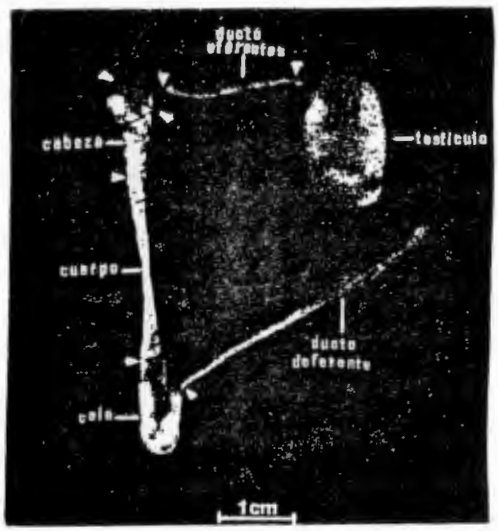


Fig 4. TESTICULO Y EPIDIDIMO DE RATA.
SUBDIVISIONES MORFOLOGICAS.
Tomado de Brooks,E.D. Physiological Review. Vol 61 No 3 (1981).

TIPOS DE CELULAS.

Algunos tipos de células (principales, claras, basales, apicales y halo) estan presentes en el epitelio (37,57).

CELULAS PRINCIPALES: se encuentran en mayor proporción y han sido descritas con mayor detalle por Hamilton (36,37), contienen un núcleo localizaDo basalmente y soportan microvellosidades apicales. El retículo endoplásmico granular esta localizado alrededor del núcleo y cerca de los bordes laterales de la célula. Presenta un aparato de Golgi muy desarrollado que se encuentra por encima del núcleo, las mitocondrias tienden a congregarse en una región por encima del Golgi y tambien debajo del núcleo. Muchas vesículas pequeñas estan presentes en medio del retículo endoplásmico liso en la porción apical de la célula. Se considera que las células principales son activas en los procesos de secreción y absorción. Evidencias morfólógicas de la absorción se han observado en forma de hoyos hacia la superficie apical y vesículas o sacos dentro del citoplasma apical (33,39), estas evidencias no son tan claras como en otras celulas exócrinas ya que no estan presentes grandes vacuolas secretorias (29,39,54).(Fig 5).

CELULAS CLARAS: Se distinguen porque contienen una densa acumulación de gotitas osmofílicas en la porción basal de la célula y muchos cuerpos densos como lisosomas y cuerpos multivesiculares en el citoplasma apical (37). Existen algunas evidencias de que estas células tienen una función de absorción (47,49).

CELULAS APICALES: Tienen características morfológicas similares a las células principales, pero no aparecen tan extensamente en la lámina basal (36).

CELULAS BASALES: Estan localizadas sobre la lámina basal e intercaladas con las células principales. Su citoplasma está esparcido por poblaciones de organelos con la inclusión de micropinocitos del plasmalema lo cuál puede indicar una función absortiva (36).

CELULAS HALO: Estan diseminadas através del epitelio y son consideradas como linfocitos extraviados.

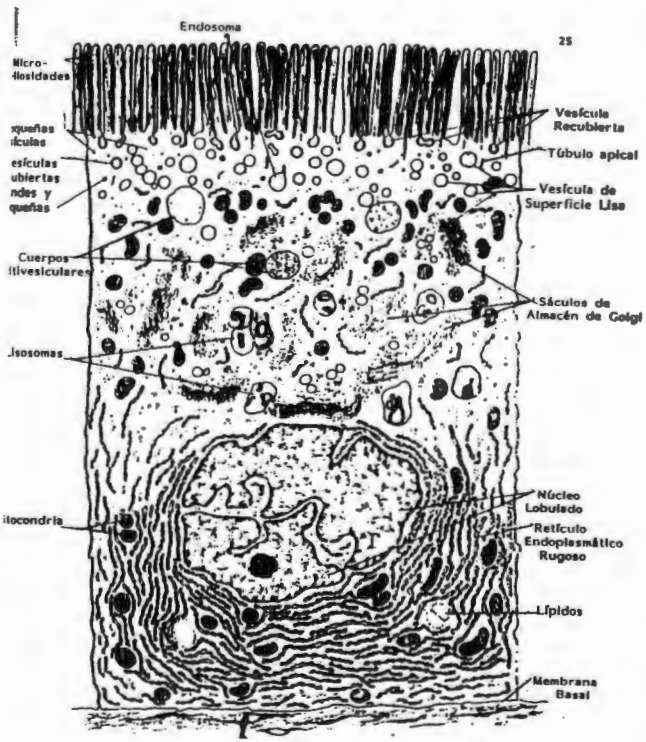


Fig 5.- CELULA PRINCIPAL DE LA CABEZA DEL Epidídimo. (The Physiology of Reproduction. Vol I, 1989).

La relativa proporción de estos tipos de células tambien varia en las diferentes regiones del epidídimo (Fig 6).

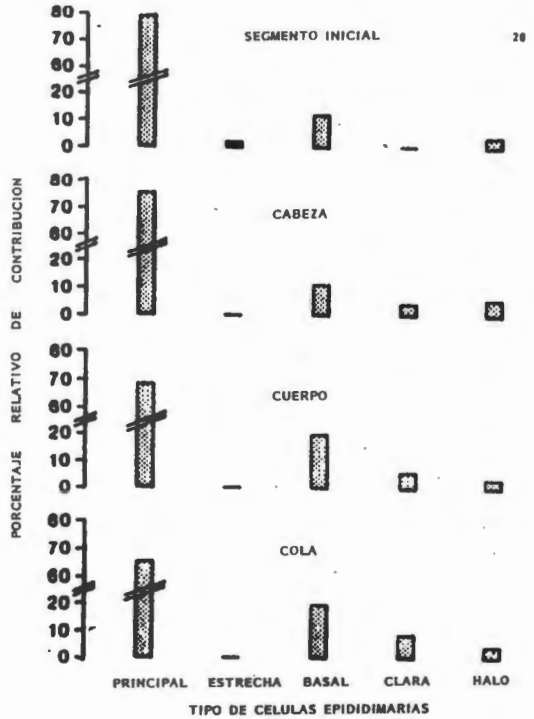


Fig 6.-Concentracion de las diferentes célula en cabeza, cuerpo y cola del epidídimo (conteo aproximado de 1000 celulas en cada segmento determinando el numero relativo de células principales, estrechas, basales, claras y halo.(The Physiology of Reproduction,Vol II, 1989).

En la rata se presenta una gran acumulación de tejido graso alrededor de la region proximal del epidídimo y constituye el paquete graso epididimario. El epidídimo al igual que el testículo tiene una temperatura mas baja que las demás partes del cuerpo (65). Después de la castración el epidídimo se retrae pero el grado de regresión es menor que el de otras glándulas accesorias del tracto reproductivo del macho, sin embargo las células principales se hacen mas pequeñas después de la castración. El ancho de las células disminuye mas que el alto provocando la reducción del diámetro del túbulo.

Uno de los cambios morfológicos mas evidentes es la reducción del número de microvellosidades apicales sobre las células principales (43), la cantidad de retículo endoplásmico rugoso se reduce después de retirar los andrógenos, cambio que es menor en el aparato de Golgi y en las mitocondrias.

La estructura morfológica de otras células es aparentemente inafectada por la castración (49).

CARACTERISTICAS FUNCIONALES DEL EPIDIDIMO

El epitelio del epidídimo posee una gran capacidad reabsortiva, el líquido proveniente del testículo es bastante diluído al llegar a la cabeza del epidídimo y es en esta zona en donde se convierte en un fluído mas concentrado (reabsorción de hasta el 95% del líquido).

Turner y Col (1990) midieron el movimiento del fluído en el lumen del epidídimo de rata encontrándo que el flujo mas rápido se lleva a cabo en la parte proximal de la cabeza del epidídimo (aproximadamente 18.5 3.7 mm/hr) y el flujo mas lento es en la parte distal de la cola (2.5 0.5846Xmm/hr).

La capacidad reabsortiva del túbulo epididimal es selectiva y varía de un segmento a otro. Esta capacidad se observa claramente por el movimiento de iones Na^+ y K^+, el líquido testicular contiene grandes concentraciones de estos iones, mientras que en el líquido del epidídimo son bajas.

Otros cambios ocurren en el epidídimo como el pH, que va de 7.4 a 6.5 o 6.6, lo cuál se puede deber a la acción de la anhidrasa carbónica y el transporte de iones H^+ y HCO_3 (70).

El epitelio del epidídimo produce una alta concentración de proteínas específicas PEE que secreta al fluído epididimal, que no aparecen en sangre (45) y que han sido relacionadas directamente con la maduración del espermatozoide.

Muchos de los cambios sufridos por el espermatozoides a su paso por el epidídimo son mediados por factores producidos y secretados por el epidídimo en respuesta a la estimulación por andrógenos (6, 55). Estos eventos de maduración estan asociados con la modificación de las características de la superficie del esperma. Algunos estudios indican que la membrana plasmática del espermatozoide es el sitio en donde algunos de los cambios mas notorios ocurren durante la maduración epididimal (3,4,31,54).

En este contexto estudios inmunológicos han presentado variaciones en las propiedades antigénicas de la superficie del esperma (1,39,-40,46) usualmente atribuídas a la disminución de antígenos que revisten al esperma o a la adhesión de secreciones en diferentes segmentos del epidídimo. La maduración tambien acarrea un aumento en el número y la distribución de los sitios que reaccionan con lectinas, las cuales son capaces de unirse selectivamente a algunos sitios sobre la superficie del esperma (30,35,50). Estos datos se hacen más interesantes porque esta unión específica de las lectinas a la superficie del espermatozoide ha podido ser correlacionada con el incremento de la carga neta que experimenta la membrana plasmática del espermatozoide durante el tránsito epididimal (2,19). Se sabe que las células principales contienen abundantes organelos necesarios para la actividad secretoria de esta células como son el retículo endoplásmico liso y rugoso y la gran extensión del aparato de Golgi (35). Estudios ultraestructurales no revelaron la formación de gránulos secretorios y su liberación de la célula, sin embargo hay considerables evidencias histológicas y bioquímicas de que el epidídimo es autónomo en la producción de su medio interno.

Algunos estudios reportan la interacción de las proteínas epididimales (PEE) con los espermatozoides contenidos en el túbulo epididimario (44). En 1980 Kohane y col (45) señalaron que las PEE son producidas principalmente por el epitelio de la porción distal del segmento inicial del epidídimo, siendo pués la región cefálica de este órgano el principal sitio de síntesis de PEE.

Por inmunofluorecencia demostraron, además, que las PEE se unen a los espermatozoides y abandonan con ellos el segmento inicial, permaneciendo unidas a las células espermáticas durante el transcurso del resto del epidídimo.

Estas evidencias se basan tambien en los datos presentados por Lea et al (1978) con respecto a la secreción de una glicoproteína ácídica epididimal (GAE) en la rata, que sigue el mismo patrón mencionado en el parrafo anterior.

Esta producción de proteínas junto con las propiedades fisicoquímicas del epidídimo sugieren que ambas, PEE y GAE, pueden ser las mismas moléculas.

Estas glicoproteínas, adicionadas al espermatozoide durante el tránsito epididimal, pueden ser parte de los componentes antigénicos del esperma (1,35,36,38) y su unión a la superficie del espermatozoide durante el tránsito epididimario puede ayudarnos a explicar los cambios en el número y distribución de lectinas que se han señalado como parte de la maduración epididimaria de la célula espermática (30,35,50,) y, tal vez, participen también en los cambios que ocurren en la carga neta y las propiedades de aglutinación del espermatozoide durante este mismo proceso (2,19).

Estas proteínas pueden jugar un papel muy importante en la maduración del esperma, lo cuál fué sugerido por Orgebin-Crist y Johad (1975) quienes fueron los primeros en demostrar que la inhibición de la síntesis de RNA y proteínas bloquea la maduración del esperma inducida por andrógenos en cultivos in vitro de túbulos epididimales de conejo. Esta evidencia fué reforzada por datos de los mismos

autores en 1981 (56), los cuales apoyaron la idea de que el efecto de andrógenos en este sistema podría ser reproducido utilizando un extracto citoplásmico epididimal (con gran cantidad de proteínas) libre de andrógenos. Muchos estudios se han hecho acerca de la regulación de la síntesis de PEE y su destino después de la eyaculación, para establecer su papel fisiológico en el proceso de maduración espermática.

Algunos estudios (19,52) en rata han demostrado la existencia de proteínas específicas epididimales (PEE) que son andrógeno dependientes, glicoproteínas de bajo peso molecular se adhieren a los espermatozoides caudales. Algunas proteínas específicas son producidas por los testículos en el carnero, humano, rata, toro y ratón. Proteínas específicas epididimales han sido encontradas en verraco, rata, toro y cuyo.

Con excepción de la proteína que fija andrógenos (Androgen Binding Protein, ABP) la cuál se produce en las células de Sertoli y es concentrada en la cabeza del epidídimo, poco se conoce sobre estas proteínas epididimales, su síntesis, liberación y su impacto sobre la maduración espermática es todavía poco clara.

Muchas proteinas secretadas por el epidídimo presentan homología con proteínas que unen y transportan iones, retinoides y glicolípidos y pueden modificar la actividad de algunas enzimas. Estas pueden ser responsables de los cambios en la estructura y propiedades físico-químicas de la membrana plasmática de la célula espermática. Otras proteínas secretadas están más directamente involucradas con el reconocimiento del vitelo por el espermatozoide,

o en inhibir la expresión prematura del potencial fertilizante durante el periodo de almacenamiento. Algunos péptidos han sido localizados alrededor de el borde apical de las células principales, pero el papel de estas proteínas es aún desconocido. Algunos estudios (51) para localizar antígenos sobre el tejido epididimal y sobre los espermatozoides revelaron la existencia de 17 proteínas epididimales. La cabeza fué la región mas activa y los niveles de 8 de estas proteínas decrecen a lo largo del órgano.

EFECTO DE LOS ANDROGENOS SOBRE EL EPIDIDIMO

A.- COMPOSICION TOTAL:

Sin andrógenos el epidídimo reduce su tamaño (Fig 7) y su peso declina a cerca del 25% del normal. La administración de testosterona a animales castrados en los cuales el epidídimo a sufrido regresión, promueve el incremento en el peso epididimal, pero el peso nunca es totalmente restaurado hasta alcanzar el de los animales normales, independientemente de la cantidad de andrógeno dado (12).

Los epidídimos privados de andrógenos presentan una disminución importante de su contenido acuoso, de manera que aumenta significativamente el porcentaje de peso seco. Además contienen concentraciones menores de proteínas solubles y fosfolípidos que los epidídimos mantenidos con andrógenos (11). Tambien existen diferencias aparentes en el contenido de DNA y RNA. La concentración relativa

de DNA se incrementa después de la castración lo cual es posiblemente debido a la disminución del volumen de agua tisular. Sin embargo la cantidad total en el organo se reduce por cerca del 25% (11), indicando alguna baja en el número de células de la población epitelial. En contraste con el incremento relativo de DNA después de la castración, la concentración relativa de RNA decrece (11), lo cual se manifiesta en una disminución notable del contenido de RNA por célula, el cual es reducido a cerca de la tercera parte. Hay tambien cambios en otros componente de bajo peso molecular, como carnitina y glicerofosfocolina, los cuales son normalmente secretados dentro del lumen epididimal. El efecto de los andrógenos sobre la secreción de estos compuestos ha sido ya descrita en detalle (13,14).

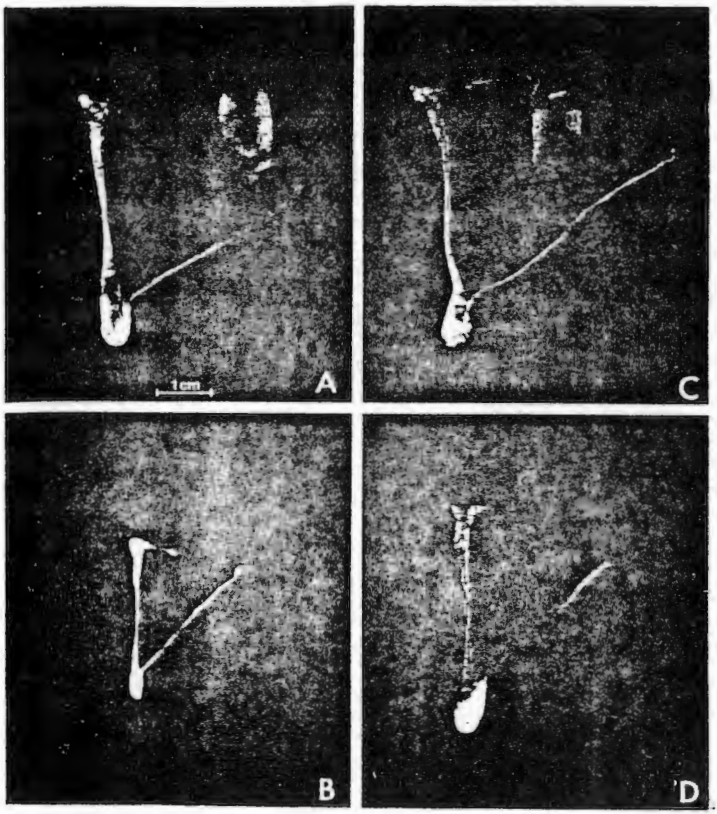


Fig.7. Efecto de los andrógenos sobre el sistema reproductor de ratas macho.
A.- Testículo y epidídimo de rata normal.
B.- Epidídimo de rata 6 semanas después de la castración.
C.- Testículo y epidídimo de rata después de 6 semanas de ligadura de ductos eferentes.
D.- Epidídimo de rata tratada durante 4 semanas con propionato de testosterona despues de 6 semanas de castración.
Tomado de Brooks,D.E.(1981). Physiological Review. Vol 61.No 3.

B.- *SINTESIS DE PROTEINAS.*

El grado de síntesis de proteínas por el epidídimo ha sido estimado in vivo e in vitro midiendo el grado de incorporación de varios aminoácidos radioactivos. En estudios in vitro algunos autores encontraron (57) que la actividad especìfica de las proteínas epididimales después de una inyección intravenosa de ^{3}H fenilalanina fué de 4 a 5 veces mayor en animales normales que en animales castrados. Sin embargo, debemos señalar, que no se ha estudiado con precisión la concentración de precursores, tanto marcados como no radiactivos que proceden directamente del torrente sanguineo y puede ser diferente en los animales mantenidos con andrógenos que en aquellos en los que no se adiciona esta hormona. Esto podrá afectar la actividad específica de precursores radioactivos específicos que pueden encontrarse presentes en el epidídimo durante la manipulación experimental.

Por otra parte la cantidad específica de los precursores en sangre podrá no permanecer constante pero podrá declinar durante el curso del experimento, posiblemente en diferentes grados y con diferentes velocidades en diferentes estados endócrinos.

Similarmente la cantidad y la actividad específica del precursor dentro de las células del tejido pueden diferir en dos estados endócrinos. Finalmente el precursor incorporado puede ser reciclado dentro de las células o entre éstas y el ambiente epididimario, esto es, que el grado de síntesis neta de proteínas efectivo no puede ser medido con exactitud.

Algunas (pero no todas) estas incertidumbres pueden ser obviadas midiendo la incorporación de precursores in vitro. Puesto que la actividad específica del precursor en el medio puede ser cuidadosamente controlada in vitro de manera que su concentración no se modifique durante el tiempo que dura el experimento.

La síntesis neta de proteínas por el tejido epididimal in vitro ha sido medida en tres sistemas diferentes: túbulos epididimales aislados y cultivados (7,8,), piezas de tejido (15,42) y células epididimales aisladas.El grado de síntesis de proteínas por túbulos aislados del epidídimo de ratas castradas, pero mantenidas con andrógenos, fué valorada midiendo la incorporación de una mezcla de ^{14}C-aminoácidos durante tiempos variables de incubación (7,8). En estos experimentos se encontró que el tiempo máximo de incorporación del aminoácido marcado a las proteínas se realizó a las 2 horas de incubación. La adición de dihidro-testosterona en el medio de cultivo (7,8), cuando se comparó con los resultados obtenidos mediante la incubación en un medio excento de andrógenos, dió como resultado solamente un cambio pequeño en la síntesis de proteínas después de 24 horas de incubación (8).

El estado endócrino tiene un efecto pequeño en el grado neto de síntesis de proteínas en piezas de tejido epididimal en cortos periodos de incubación in vitro con ^{35}S metionina como precursor (15). Estos resultados fueron obtenidos cuando la comparación fué hecha tomando como parámetro basal para expresar los resultados tanto la cantidad de peso humedo, como la cantidad de proteínas o la cantidad de DNA tisular; cambios mayores se notan cuando los resultados

son expresados por organo total (42). Este método de comparación incluye componentes sustanciales atribuíbles a diferencias en el tamaño del organo.

Cuando las proteínas totales formadas en esta incubación fueron separadas por electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Fig 8), presentaron pocas diferencias cualitativas entre los animales mantenidos con andrógenos y los que fueron obtenidos en animales privados de ellos, con una excepción, la presencia en los tejidos incubados en presencia de andrógenos de una banda correspondiente a una proteína de peso molecular aproximadamente igual a 16000 daltones, que es sintetizada en la región cefálica del epidídimo.

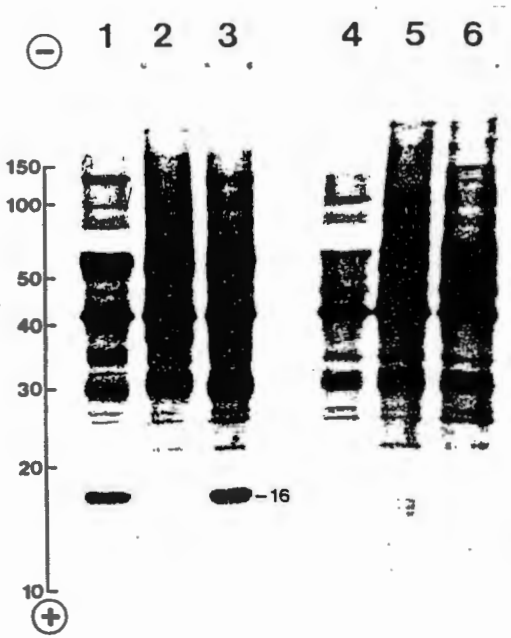


Fig.8. Efecto del estado androgénico sobre el perfil radioactivo de proteinas sintetizadas de 36S-metionina por piezas de tejido epididimal in vitro y separadas por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes. Las proteínas fueron de cabeza (bandas 1-3) y cola (bandas 4- 6). Bandas 1 y 4, ratas normales;bandas 2 y 5 ratas con dos semanas de castración; bandas 4 y 6 ratas tratadas diariamente durante dos semanas después de la castración con 2 mg de propionato de testosterona por via subcutanea.(De Brooks and Higgins (15)).

La síntesis de esta banda, la cual corresponde a dos proteínas (B y C), separadas una de otra sobre geles no desnaturalizantes (10, 15), es altamente andrógeno dependiente. El sistema de gel no desnaturalizante, tambien revela la síntesis, andrógeno-dependiente, de otras proteínas menos importantes (D y E; 30000 y 32000 daltons respectivamente) (Fig 9).



FIG.9. Efecto del estado androgénico sobre el perfil radioacivo de síntesis de proteínas después del marcaje mediante la incorporación de ^{35}S-Metionina por piezas de tejido epididimal incubadas in vitro y separadas después de la incubación por electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes. Proteínas radioactivas de cabeza (banda 1, castrada; banda 2, normal) y cola (banda 3, castrada; banda 4, normal).

Este hecho ha sido mostrado previamente (15) y se presume que corresponde a la síntesis, andrógeno-dependiente, de moléculas de prealbumina, efecto que ha sido descritas previamente por otros autores (Tabla 2) (18,30,34,47).

Una separación bidimensional de las proteínas del fluído luminal de cabeza y cola de epidídimo (Fig 10) claramente revela estas proteínas prealbúminas B,C que han sido purificadas en algunos laboratorios (39,47,53). Característicamente ellas son relativamente pequeñas sin subunidades, con bajos puntos isoeléctricos y estan generalmente glicosiladas (tabla 2). Anticuerpos contra algunas de ellas han sido usadas para demostrar que estas proteínas secretadas llegan a unirse a la superficie del esperma (44,47) y presumiblente estas representan un importante componente dela maduración espermatica en el epidídimo.

TABLA 2.CARACTERISTICAS DE PROTEINAS (PREALBUMINA) ANDROGENO-DEPENDIENTES SECRETADAS DEL FLUIDO LUMINAL DE LA RATA.

Proteina	Peso Molecular	pI	Glicosi-ladas	Nom
B	27,900			B
	16,000	5.9	-	B
	18,500-21,000	5.9	+	II
C	23,100			C
	22,400	5.56,5.79		
		5.38	+	C
	16,000	5.7	-	C
	19,000-23,000	5.7	+	III
D	34,000			D
	33,000		+	AEG
	37,000	5.13	+	D
	30,000	4.6	+	D
	32,000	4.2	+	IV
E	37,000	4.95	+	E
	32,000	4.4,4.35	+	E

Basadas en la mobilidad electroforética y características físicas. pI, punto isoeléctrico. (tomado de D.E.Brooks Physiological Reviews Vol.61, No.3, julio 1981).

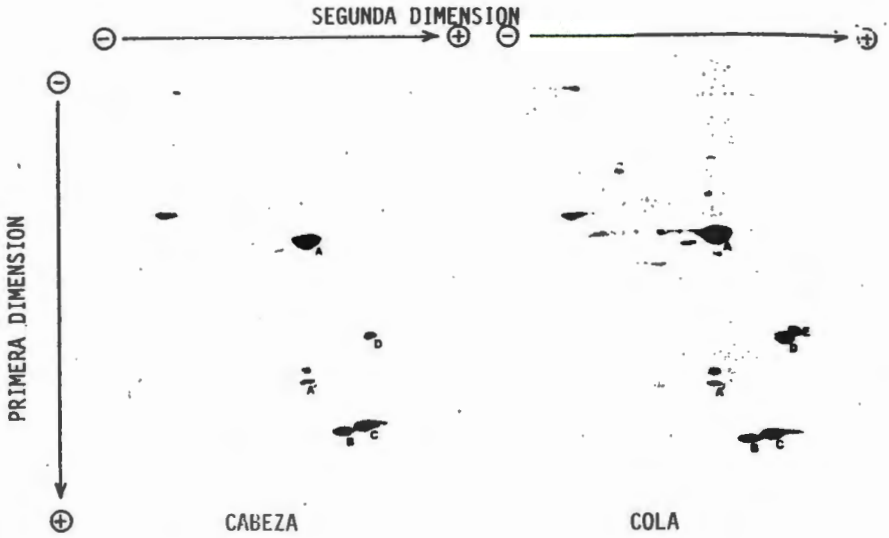


Fig.10.Separación de proteinas del fluído luminal epididimal por electroforesis bidimensional. Proteinas aisladas del fluido luminal de cabeza y cola del epidídimo separadas en la electroforesis de primera dimensión bajo condiciones no desnaturalizantes, la segunda dimensión bajo condiciones desnaturalizantes.(Courtesy of S.J.Higgins and F.M.Fuller, University of Leeds).

ESTROGENOS Y RECEPTORES ESTROGENICOS EN EL EPIDIDIMO

Estradiol y estrona son los estrógenos que se encuentran en pequeña proporción en la sangre del macho .Se ha observado que después de la orquidectomía los niveles de estos estrógenos decrecen. Algunos estudios han indicado que hombres que padecen hipogonadismo, a los cuales se les administraron grandes dosis de testosterona, desarrollaron ginecomastia (Yen y Jaffe 1986).(71)

Algunos autores sugieren que la presencia de estrógenos en el macho tiene su origen principal en las gónadas (10-20%); estudios en sangre adrenal sugieren que esta glándula aporta pequeñas cantidades del total en sangre y finalmente otra pequeña cantidad es aportada después de la conversión de testosterona en estradiol (71).

Los estrógenos en el macho suelen ser sintetizados en las células testiculares de Sertoli y Leydig en donde se encuentran las proteínas transmembranales (P450 arom) homóloga de la familia de monooxigenasas del citocomo P450 (61) y la NADPH-citocromo 450 reductasa en el retículo endoplásmico de las células y que son estimulantes de la actividad de aromatasa para biosíntesis de estrógenos a partir de testosterona.

En hombres y mujeres postmenopausicos la principal fuente de estrógenos es el tejido adiposo en el cuál la estrona es sintetizada a partir de dehidroepiandrosterona.

Danzo y Col (1979) demostraron que en conejos existen receptores citoplásmicos a 17-ß-estradiol a lo largo del ducto epididimal, tanto en animales maduros como en inmaduros (22) asi como en ratas

inmaduras (21) y la mayor concentración de estos sitios receptores se encuentra en la cola de ambos grupos (23).

Se ha demostrado que el epidídimo de conejos (22) y ratas (23) inmaduros contienen receptores cotoplásmicos a 17B estradiol. En conejos inmaduros estos receptores citoplásmicos se encuentran transferidos al nucleo (23), en conejos adultos no se han detectado receptores a estrógenos en el citosol epididimal (22).

Danzo y Col (1979) demostraron que los receptores a estrógenos estan presentes en el epidídimo de conejos sexualmente maduros después de 3 días de castrados. Los receptores a estrógenos en conejos maduros e inmaduros se distribuyen a lo largo del ducto epidídimal, encontrándose la mayor concentración de estos sitios citoplásmicos de unión a estrógenos en la cola de ambos grupos de conejos (24).

Existen altas concentraciones de receptores a estrógenos durante el tiempo de la diferenciación. En los conejos maduros la concentración de receptores citoplásmicos a estrógenos en el epidídimo decrece y este decremento es especialmente marcado en la región de la cola. Las alteraciones en los parámetros fisicoquimicos de los receptores epididimales a estrogenos, dependientes de la edad, estan relacionados con los cambios fisiológicos en el epidídimo o por el estado endócrino del animal al momento de ser determinados (23).

La presencia de altas concentraciones de receptores citoplásmicos a estrógenos en la cola del epidídimo de conejos maduros e inmaduros, sugieren que los estrógenos pueden estar relacionados con algunos procesos de maduración espermática en esta región del epidídimo. El hecho de que la cola mantenga altas concentraciones de re-

ceptores citoplásmicos a estradiol aún en edad adulta sugiere que puede ser un requerimiento del proceso mediado por estrógenos en el epidídimo a través de la vida.

Los estrógenos han sido utilizados ya sea solo o asociados con testosterona como métodos de anticoncepción en machos (27,60). esta convinación puede sinergizar la inhibición de la espermatogénesis y decrece la fertilidad en rata (27) y mono (48). Bajas dosis de estradiol han sido propuestas en formulaciones anticonceptivas en machos, presentándose pocos efectos significativos en el sistema reproductor. Sin embargo con altas dosis de estrógenos se han reportado efectos en la fertilidad (26, 58,67), en la inhibición de la espermatogénesis (27,60), cambios en los pesos y función de los orga-nos sexuales accesorios (59,60,63), disminución de la conducta sexual (10,30) y ginecomastia (10). Robaire y col. en 1977 concluyen que los efectos del estradiol no son solamente mediados por una supresión del eje hipotálamo-pituitaria-testículo, sino que pueden ser mediados por mecanismos directos o por otros mecanismos.

Otro uso de los estrógenos es en el tratamiento de cancer de próstata, aunque se requieren altas dosis para producir efectos antitumorales. En estas condiciones los estrógenos incrementan la formación de factores de la coagulación, lo cual induce un estado hipercoagulable que tiene una influencia adversa sobre el sistema cardiovascular, incrementando la incidencia de eventos tromboembolicos.

HIPOTESIS

LA LIBERACION CONTINUA DE ESTRADIOL EN IMPLANTES SUBDERMICOS EN RATAS ADULTAS MACHO INDUCE UNA MODIFICACION DIFERENCIAL DEL PATRON PROTEICO EN LAS DIFERENTES REGIONES DEL EPIDIDIMO.

MATERIALES Y METODOS.

1. *Material Biológico.*

Se hicieron experimentos con duración de 6 y 12 semanas de tratamiento utilizando ratas Wistar adultas macho (300-350 g) obtenidas del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, las cuales fueron marcadas (con el sistema de muescas en las orejas), distribuidas de manera aleatoria en 4 grupos (n=6/grupo), alimentadas *ad libitum* con nutricubos purina, agua desinfectada con Microdyn (plata coloidal estable 0.32%) 1 gota y mantenidas en ciclos de 14 horas de luz, 10 horas de obscuridad a temperatura controlada de 21 C. 4 grupos fueron utilizados para el tratamiento de 6 semanas y otros 4 para 12 semanas.

2.- *Implantes.*

Las cápsulas para implante fueron hechas con tubo de polidimetilsiloxano (PDS) de diámetro externo de 3.18 mme interno de 1,98 mm (Dow Corning 601-305, Midland, MI) y longitudes de 3,5,y 7mm rellenas de 17B estradiol (Steraloids, Wilton,NH), selladas con adhesivo de silicón médico tipo A (Dow Corning 891).

3.- *Implantación.*

Bajo anestesia con eter etílico (Backer) las ratas fueron implantadas subdérmicamente en la región dorsal por encima del cuello, se aplicó en la zona alcohol etílico y se hizo una pequeña incisión en la piel, se separó la serosa de la piel y se depositó

el implante en el espacio formado entre estas dos capas, se suturó la incisión (1 punto de sutura) y se desinfecto con alcohol etílico. Después de terminada la implantación, se dejaron reposar a las ratas hasta recuperación de la anestesia. Tres grupos fueron implantados con capsulas de polidimetilsiloxano (PDS) conteniendo 1,3,y 7 mm de estradiol, las ratas del grupo control fueron implantadas de la misma manera que las tratadas pero con implantes vacios de 7 mm de longitud.

Después de efectuar la implantación, los animales fueron colocados en jaulas de acrílico transparente tamaño jumbo (3 ratas/caja con tapa de alambre galvanizado, bebedero de vidrio y cama de viruta de madera. A partir de este momento, los animales fueron pesados durante 6 y 12 semanas cada semana a la misma hora.

4.-*Obtención de organos.*

a) Al finalizar el tiempo de tratamiento (6 y 12 semanas) los animales controles y tratados se sacrificaron por decapitación dejándolas desangrar.

b) Después de desangrado el animal se colocó sobre una tabla de disección con la región ventral hacia arriba, se le aplicó alcohol etílico sobre la piel y la región abdominal fué abierta y expuesta para la obtención de organos.

c) Los testículos, vesículas seminales, próstata y epidídimos de ambos lados fueron removidos, limpiados (quitar grasa) con ayuda de pinzas y tijeras.

d) Las vesículas seminales y próstata fueron depositados en solución Krebs (ver anexo) y se pesaron (Balanza analílica digital Sartotius A 210 P).

e) Los testiculos y epidídimos fueron perfundidos por la arteria espermática del testículo (Baker y Col, 1980) para eliminar la sangre excedente.

f) Los epidídimos y testículos fueron pesados y medidos.

5.- *Obtención de fluído epididimal para determinación de proteínas.*

a) Después de pesados y medidos los epidídimos fueron divididos anatómicamente en cabeza, cuerpo y cola para ser pesadas y procesadas independientemente.

b) Cada una de las regiones del epidídimo fué colocada en vasos de precipitado de 10 ml conteniendo 2 ml de solución Krebs fría y cortadas en pequeñas fracciones con tijeras para iris de acero inoxidable.

c) Las muestras se filtraron a través de una malla (98% Nylon y 2% de lycra) para eliminar el tejido.

d) Las soluciones obtenidas fueron colocadas en tubos de 5 ml (10mm x75mm) y centrifugadas a 1000 r.p.m. durante 5 minutos (Centrifuga Solbat Mod.J12) para obtener fluídos libres de células.

e) Los sobrenadantes fueron sacados con pipeta Pasteur colocados en tubos de 5 ml y congelados.

Estos fluidos se utilizaron para la determinación total de proteínas y electroforesis. Las operaciones anteriores fueron hechas a temperaturas bajas para evitar la desnaturalización de las proteínas.

DETERMINACION DE PROTEINAS.

Para la determinación total de proteínas se utilizó el método de Lowry et al (1951).

a) Las muestras fueron descongeladas.

b) Muestras de 100 μl de los fluidos de las fracciones de los epidídimos fueron colocadas en tubos de ensayo (15mm x 125mm) y aforadas a 1 ml con agua desionizada.

c) Se mezclaron con 3 ml de reactivo I (ver anexo), se agitaron (agitador para tubos de ensayo tipo Vortex Mixer Lab-Line) y se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

d) Se agregaron 0.3 ml de reactivo de Folin diluido 1:1 con agua destilada (ver anexo), se agitaron y se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

e) Se utilizó como estandar albúmina sérica bovina (ABS fraccion V, Backer) en solución a diferentes concentraciones (por duplicado) que fueron tratadas de la misma manera que las muestras problema.

f) Se utilizó un blanco conteniendo agua destilada y los reactivos para determinación de proteínas.

g) Los valores de concentración de proteínas totales fueron obtenidas utilizando un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 20 a una longitud de onda de 540 nm.

PATRON DE PROTEINAS EPIDIDIMALES.

El patrón proteínico de cada región del epidídimo fué determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando el sistema discontinuo de Laemmli (72) en condiciones desnaturalizantes y en ausencia de agentes reductores.

a) La muestras de los fluidos de las diferentes regiones del epidídimo fueron descongeladas.

b) Alicuotas que contenían 5µg de proteínas totales se mezclaron con 50µl de cocktail de muestra (ver anexo), en tubos de microcentrífuga de 500µl.

c) Las mezclas se aplicaron en el tope de los carriles de las placas de gel.

d) Los geles para la electroforesis fueron hechas con placas de vidrio de una dimensión de 14x16 cm que contenían 12 cm (13.5 ml) de gel separador al 10% y el resto gel concentrador al 4% (ver anexo), con un grosor de 0.75 cm.

e) Después de aplicadas las muestras en los carriles, estos se rellenan con buffer de corrida (ver anexo).

f) Se colocaron los geles con las muestras en el equipo de electroforesis LKB Biorad.

g) Se adiciona el buffer a la cámara.

h) Se aplica una corriente de 60 mA para el gel concentrador hasta llegar al gel separador.

i) En el gel separador se aplica una corriente de 80 mA hasta el final.

TINCION CON NITRATO DE PLATA.

a) Terminado el tiempo de corrida, los geles se sacan y las proteínas se fijan con una mezcla de metanol 50% y acido acético al 12% por un tiempo mínimo de 30 minutos.

b) Se lavan 3 veces durante 15 minutos con una mezcla de etanol 10% y Acido acético 5%.

c) Los geles se colocan en 200 ml de una solucion de dicromato de potasio 3.4 mM y ácido nítrico 3.2 mM, durante 10 minutos.

d) Lavar 4 veces durante 1 minuto con agua desionizda.

e) Colocar las geles en 100 ml de una solución de Nitrato de Plata 20 mM, durante 30 minutos (se obtiene mayor sensibilidad cuando el gel se expone a una fuente de luz intensa y uniforme durante los primeros 5 minutos).

f) Lavar durante un minuto con agua desionizada.

g) La imagen se desarrolla adicionando a los geles 100 ml de una solución de carbonato de sodio 0.28 M y formaldehído 0.037%. El tiempo de exposición depende del desarrollo de la imagen.

h) El desarrollo de la imagen se detiene con ácido acético 1% durante 30 minutos.

i) Se lavan los geles durante 5 minutos 2 veces con agua desionizada y se guardan en bolsas de plástico selladas.

ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos obtenidos de los pesos de los organos y la concentración de proteínas fueron analizadas estadísticamente urilizando la prueba de "t" Student, considerando el nivel de significancia de $p < 0.05$.

ANEXO

SOLUCION KREBS.

NaCl (Merck)	6.9 g
KCl (Merck)	0.35 g
MgSO4·7H2O (Merck)	0.29 g
KH2PO4 (Merck)	0.16 g
Glucosa anhidra (Merck)	2.0 g
NaHCO3 (Backer)	2.1 g
CaCl2 (Merck)	2.8 g
Agua destilada	1.0 l

GEL CONCENTRADOR 10%.

Acrilamida 30% Bis 0.8%	10.0 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	7.5 ml
Agua destilada	14.7 ml
SDS (dodecil sulfato de sodio) 10%	0.6 ml
Temed	20.0 µl
Persulfato de amonio 10%	0.2 ml

Se mezclan los reactivos y se colocan en la placa de vidrio limpia sin residuos de grasa hasta 12 cm de altura (13.5 ml).

GEL SEPARADOR 4%.

Acrilamida 30% Bis 0.8%	2.0
Tris 0.5M pH 6.8	3.75 ml
Agua destilada	9.2 ml
SDS 10%	0.15
Temed	15.0 µl
Persulfato de amonio 10%	100.0 µl

BUFFER DE CORRIDA (Stock).

Glicina	144 g.
Tris base	30 g.
SDS	10 g.
Agua destilada	1 l.

Solución de Trabajo 1:10.

COCKTAIL DE MUESTRA.

Tris HCl 0.5M pH 6.8	5.5 ml
SDS 10%	5.0 ml
Glicerol	2.5 ml
Azul de bromofenol	0.1 ml
Agua destilada	11.9 ml

SOLUCIONES PARA TINCION DE GELES CON NITRATO DE PLATA.

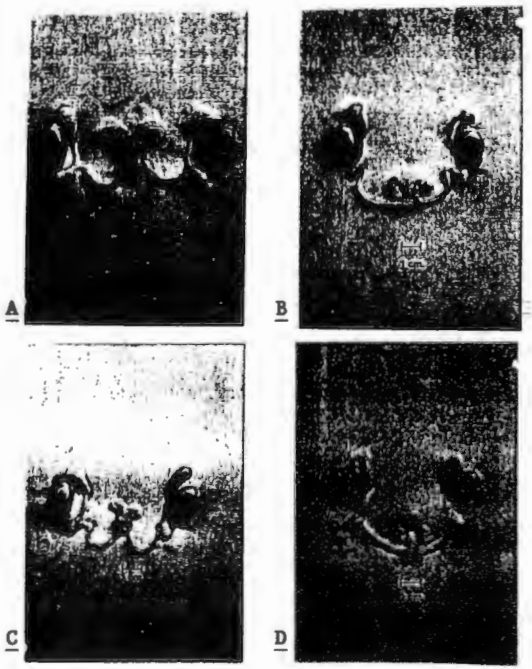
K2Cr2O7 (Merck) ----------100mg/100ml
HNO3 (Merck) ----------21mcl/100 ml
AgNO3 (Backer) ----------397.7 mg/100 ml.
NaCO3 (Backer) ----------2.97 g/100 ml
Formaldehido (Merck) ----------37%
Acido Acético (Merck) ----------1%

RESULTADOS

RESULTADOS

EFECTO SOBRE LA MORFOLOGIA DEL SISTEMA REPRODUCTOR DE RATAS

Como se puede observar en la siguiente figura el efecto de los diferentes tratamientos con estradiol es drástico en la morfología del sistema reproductor de ratas tratadas, efecto que es dependiente de la dosis.



Efecto del estradiol en implantes subdérmicos de polidimetilsiloxano durante 6 semanas sobre la estructura morfológica del aparato reproductor de rata.
A: ratas no tratadas. B: ratas implantadas con 1 mm de estradiol. C: ratas implantadas con 3 mm de estradiol. D: Ratas tratadas con 7 mm de estradiol.

EFECTO DEL ESTRADIOL EN IMPLANTES SUBDERMICOS SOBRE EL PESO CORPORAL.

En el inicio de los experimentos de 6 y 12 semanas de duración los animales fueron distribuídos en 4 grupos entre los cuales no había diferencia significativa con respecto al promedio del peso corporal. Como se observa en la Tabla 1, Fig 1 del experimento de 6 semanas de duración, el peso de los animales control se incrementó en un 16.3%, incremento que fué estadísticamente significativo. Con 1 mm de dosis de estradiol se observó un aumento de 2.2%, el cuál no fué significativo con respecto al peso inicial, con las dosis de 3 y 7 mm de estradiol se presento una pérdida de peso de 2.9 y 1.7 % respectivamente con respecto al peso inicial, disminución que no fué estadísticamente significativa.

Comparando los pesos finales de los grupos tratados (1,3,7 mm de estradiol) contra el peso final del grupo control se observan disminuciones 12.1,15,0 y 14% respectivamente.

En el experimento de 12 semanas de duración (Tabla 2, Fig 2) el peso de los animales control se incrementó en un 47%, con las dosis de 1 y 3 mm se observó un ligero aumento de 9.2 y 4.2 respectivamente, aumentos que no fueron significativos estadísticamente. Con la dosis de 7 mm de estradiol se presentó una disminución de 7.2%, disminución no significativa respecto al peso corporal inicial.

En este mismo experimento comparando el peso final de los diferentes tratamientos (1,3 y 7 mm de estradiol) contra el peso final del grupo control se obtuvieron disminuciones de -23.3,30.0 y 32.8% respectivamente.

Tabla 1.- Efecto de estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso corporal de rata macho.

TRATAMIENTO	Peso corporal (g) INICIAL	FINAL	
CONTROL	349 ± 9.0	406 ± 11.0	+57
1 mm	349 ± 10.0	357 ± 12.0*	+8
3 mm	355 ± 8.0	345 ± 8.0*	-10
7 mm	354 ± 8.0	348 ± 11.0*	-6

Implantes subdérmicos por 6 semanas
Los valores representan la media ± e.e.m. (n=12)
*** Significativamente diferente ($p<0.05$) del control por "t" student**

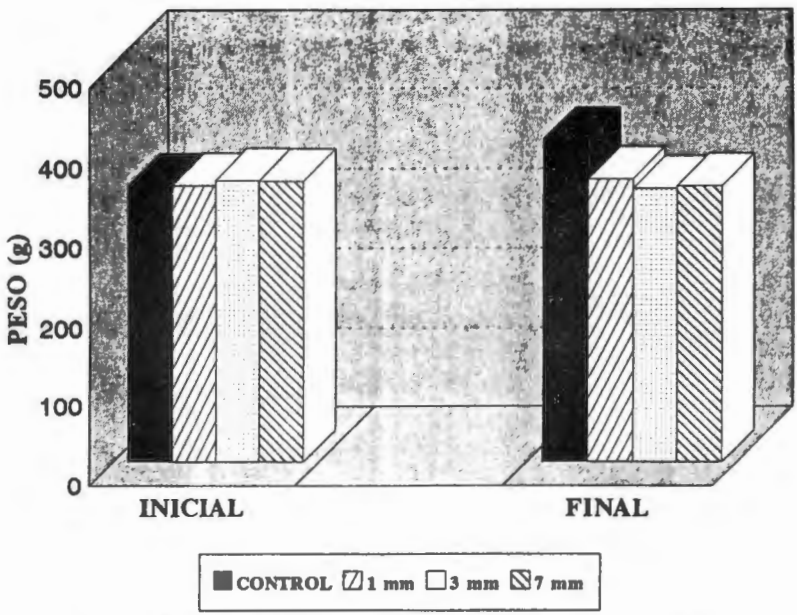


Fig 1.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso corporal de rata macho. (Implante por 6 semanas)

Tabla 2 .- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso corporal de rata macho.

TRATAMIENTO	Peso corporal (g) INICIAL	FINAL
CONTROL	335 ± 5	478 ± 19
1 mm	334 ± 8	347 ± 9*
3 mm	330 ± 11	343 ± 17*
7 mm	328 ± 9	328 ± 7*

Implantes subdérmicos por 12 semanas
Los valores representan la media ± e.e.m. (n=12)
*** Significativamente diferente ($p<0.05$) del control por "t" student.**

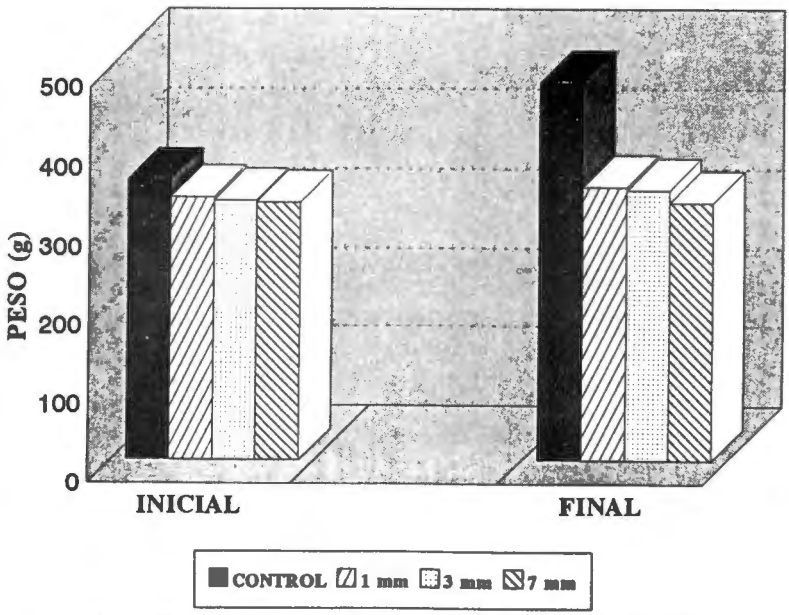


Fig 2.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso corporal de rata macho. (Implante por 12 semanas)

EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE EL PESO DE LOS DIFERENTES ORGANOS DEL SISTEMA REPRODUCTOR.

En la Tabla 3, Fig 3 se observan los resultados obtenidos con las diferentes dosis de estradiol a las 6 semanas de tratamiento sobre el peso de los organos del sistema reproductor de rata macho, encontrándose que todos disminuyen con las diferentes dosis de estradiol, disminuciones que fueron significativas.

En el tratamiento de 12 semanas (Tabla 4,Fig 4) de la misma manera que en el experimento de 6 semanas se produjo disminución en el peso de los organos del sistema reproductor, disminuciones que fueron significativas estadísticamente.

Tabla 3.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso de epididimo, testiculos, vesiculas seminales y próstata de rata.

TRATAMIENTO	EPIDIDIMO (mg)	TESTICULO (mg)	VES. SEM. (mg)	PROSTATA (mg)
CONTROL	668 ± 8	1760 ± 93	967 ± 294	524 ± 127
1 mm	432 ± 81*	1258 ± 300*	398 ± 181*	258 ± 67*
3 mm	214 ± 18*	584 ± 151*	203 ± 14*	186 ± 34*
7 mm	315 ± 58*	1049 ± 225*	223 ± 19*	102 ± 29*

Implantes subdérmicos por 6 semanas
Los valores representan la media ± e.s.m. (n=6)
*** Significativamente diferentes ($p<0.05$) del control por "t" student.**

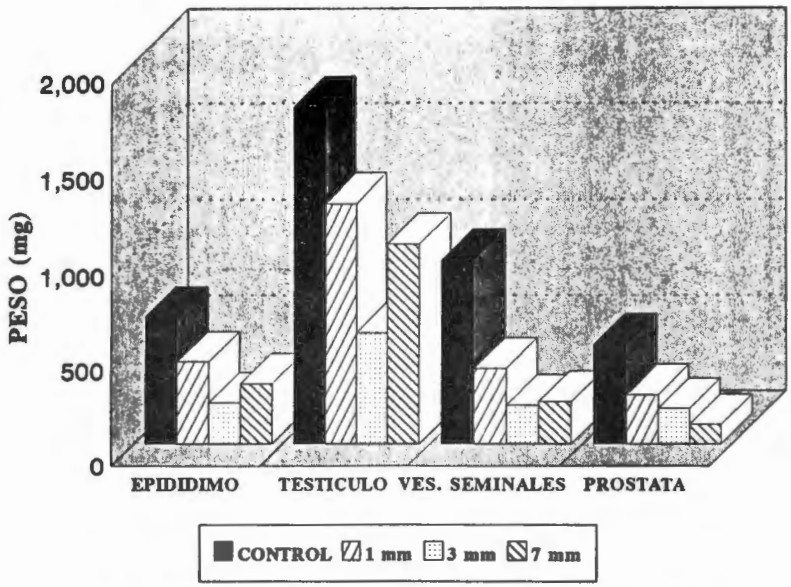


Fig 3.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso del epididimo, testiculo, vesiculas seminales y próstata de rata. (Implante por 6 semanas)

Tabla 4.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso de epididimo, testiculos, vesiculas seminales y próstata de rata.

TRATAMIENTO	EPIDIDIMO (mg)	TESTICULO (mg)	VES. SEM. (mg)	PROSTATA (mg)
CONTROL	798 ± 44	1943 ± 94	1312 ± 197	887 ± 111
1 mm	151 ± 9*	309 ± 18*	166 ± 2*	192 ± 18*
3 mm	209 ± 16*	399 ± 40*	129 ± 16*	295 ± 74*
7 mm	227 ± 26*	320 ± 30*	149 ± 13*	286 ± 58*

Implantes subdérmicos por 12 semanas
Los valores representan la media ± e.s.m. (n=6)
*** Significativamente diferentes ($p<0.05$) del control por "t" student.**

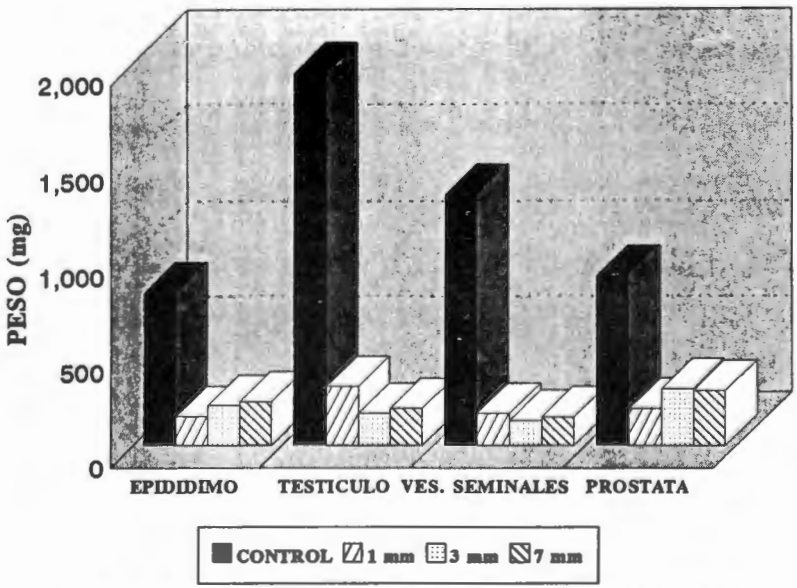


Fig 4.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso del epididimo, testiculo, vesiculas seminales y próstata de rata. (Implante por 12 semanas)

EFECTO DEL ESTRADIOL SOBRE EL PESO DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL EPIDIDIMO DE RATA.

Tanto en el experimento de 6 y 12 semanas se observaron con todas las dosis de estradiol disminuciones significativas de cabeza y cola del epidídimo. Estas disminuciones son dependientes de las diferentes dosis de estradiol, lo cuál refleja la actividad biológica de este esteroide. En el caso del cuerpo se observaron disminuciones de peso las cuales no fueron significativas con ninguna de las dosis y tiempo de tratamiento.

A las 6 semanas se observó disminución del peso de la cabeza con respecto al grupo control, a las dosis de 1,3 y 7 mm de estradiol estas disminuciones fueron de 29.4, 60.2 y 57.5 % respectivamente, en la cola las disminuciones del peso fueron de 41.7, 67.0 y 67.0 respectivamente.En el cuerpo no se observaron cambios. Se observa que las disminuciones en el peso son mayores en la cola que en la cabeza (Tabla 5, Fig 5).

A las 12 semanas (Tabla 6, Fig 6) se produjo disminuciones en el peso de la cabeza de 41.3, 67.2 y 74.2% con las diferentes dosis de estradiol en tanto que en la cola fueron de 58.8, 70.5 y 74.9%.

Tabla 5.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso de las diferentes regiones del epididimo de rata.

	Peso del epidídimo (mg)		
TRATAMIENTO	CABEZA	CUERPO	COLA
CONTROL	289 ± 12	59 ± 5.0	262 ± 8
1 mm	204 ± 23*	59 ± 6.0	153 ± 15*
3 mm	115 ± 18*	55 ± 4.0	92 ± 10*
7 mm	123 ± 21*	44 ± 6.0	92 ± 12*

Implantes subdérmicos por 6 semanas
Los valores representan la media ± e.e.m.(n=12)
*** Significativamente diferente ($p<0.05$) del control por "t" student.**

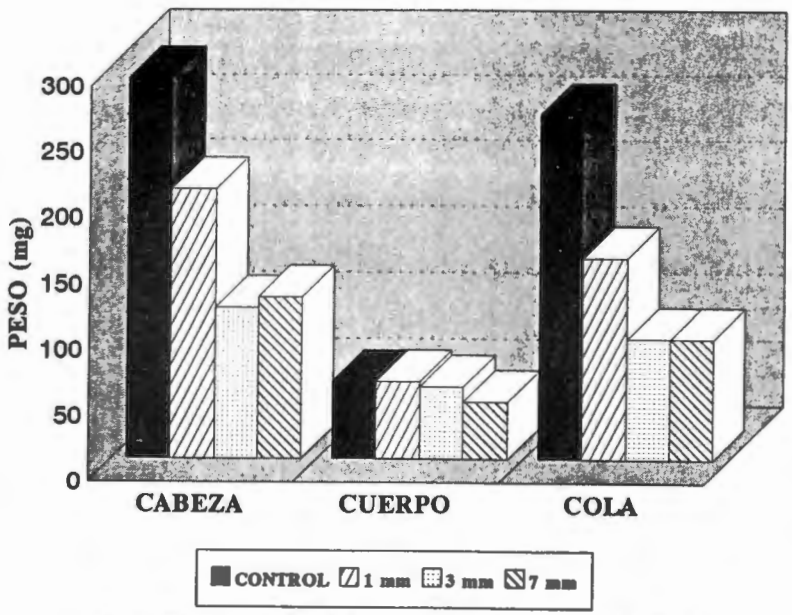


Fig 5.- Efecto de Estradiol en implantes sudérmicos de PDS sobre el peso de las difrentes regiones del epididimo de rata.

Tabla 6.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso de las diferentes regiones del epididimo de rata.

	Peso del epidídimo (mg)		
TRATAMIENTO	CABEZA	CUERPO	COLA
CONTROL	298 ± 18	79 ± 6	274 ± 15
1 mm	127 ± 30*	41 ± 6*	113 ± 18*
3 mm	98 ± 16*	39 ± 2*	81 ± 11*
7 mm	77 ± 6*	28 ± 2*	69 ± 6*

Implantes subdérmicos por 12 semanas
Los valores representan la media ± e.e.m. (n=12)
*** Significativamente diferente ($p<0.05$) del control por "t" student.**

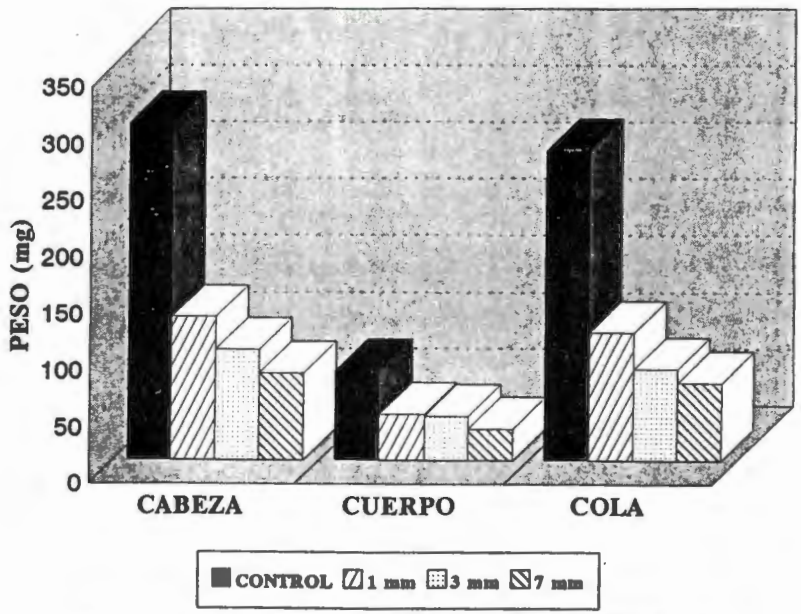


Fig. 6.- Efecto del Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre el peso de las diferentes regiones del epididimo de rata.

EFECTO DEL ESTRADIOL EN IMPLANTES SUBDERMICOS DE POLIDIMETIL-SILOXANO SOBRE LA CONCENTRACION TOTAL DE PROTEINAS EN LAS DIFERENTES REGIONES DEL EPIDIDIMO.

Como se observa en la Tabla 7 las concentraciones de proteínas de la cola son mayores (59%) en la cabeza en los animales control en el experimento de 6 semanas de duración.

En la Tabla 7 los resultados obtenidos con diferentes dosis de estradiol a las 6 semanas de tratamiento no presentan un efecto consistente sobre el grado de secresión de proteínas por el epididímo. Con las dosis de 1,3, y 7 mm de estradiol las concentraciones de proteínas/mg de tejido de cabeza aumentaron comparadas con el grupo control, siendo de 6,24 y 36% respectivamente, siendo solo significativos estos aumentos en los casos de tratamiento con 3 y 7 mm de estradiol. En el cuerpo se observa una disminución en la concentración de 23 y 34% con las dosis de 1 y 3 mm de estradiol, estradiol, mientras que con la dosis de 7 mm se presentó un aumento de 7.8% que no fué significativo.

En la cola con la dosis de 1 mm se observa un aumento de 17% en tanto que con las dosis de 3 y 7 mm se presento disminución en la concentración de proteínas de 7 y 8 % respectivamente, las cuales no fueron significativas estadísticamente.

En el tratamiento de 12 semanas (Tabla 8, Fig 8) los resultados son mas consistentes, se observa tambien que en el grupo control la

concentración de proteínas es mayor en cola que en cabeza (23%). Con las diferentes dosis de estradiol (1,3,y 7 mm se observaron disminuciones en las concentraciones de proteínas en los diferentes segementos del epidídimo, siendo de 52,26,76 % en cabeza, 62,47,91% en cuerpo y 52,35,66% en la cola, todas estas disminuciones fueron altamente significativas. Se observa que las disminuciones son semejantes en todos los segmentos del epidídimo.

Tabla 7.- Efecto de estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre la concentración de proteínas de las diferentes regiones del epididimo de rata.

	Concentración de proteínas (μg/ml/mg de Tejido)		
TRATAMIENTO	CABEZA	CUERPO	COLA
CONTROL	1.43	1.79	2.27
1 mm	1.53	1.37	2.65
3 mm	1.77	1.11	2.12
7 mm	1.99	1.93	2.07

Implantes subdérmicos por 6 semanas
Los valores representan la media ± e.e.m. (n=12)
*** Significativamente ($p<0.05$) del control por "t" student.**

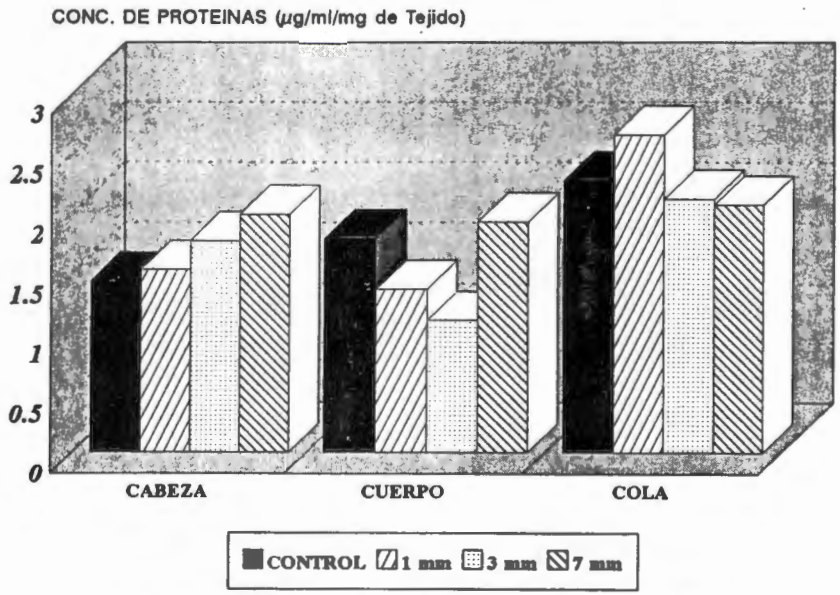


Fig 7.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre la concentración de proteínas en las diferentes regiones del epididimo de rata. (Implante por 6 semanas)

Tabla 8.- Efecto de estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre la concentración de proteínas de las diferentes regiones del epididimo de rata.

	Concentración de proteínas (μg/ml/mg de Tejido)		
TRATAMIENTO	CABEZA	CUERPO	COLA
CONTROL	2.59	2.43	3.18
1 mm	1.25	0.92	1.54
3 mm	1.92	1.28	2.07
7 mm	0.62	0.21	1.09

Implantes subdérmicos por 12 semanas
Los valores representan la media ± e.e.m. (n=12)
*** Significativamente (p<0.05) del control por "t" student.**

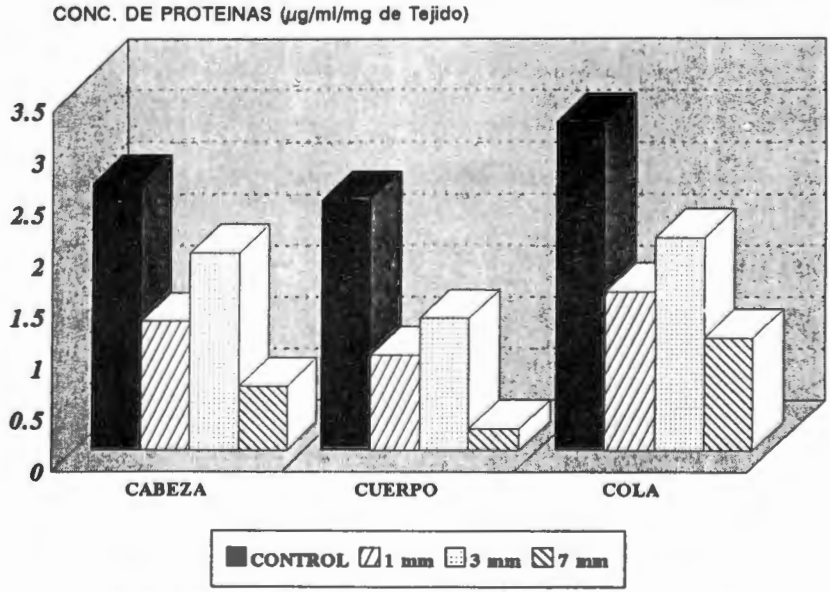


Fig 8.- Efecto de Estradiol en implantes subdérmicos de PDS sobre la concentración de proteínas en las diferentes regiones del epididimo de rata. (Implante por 12° semanas)

EFECTO SOBRE EL PATRON DE PROTEINAS.

En la Fig 9 que presenta el patrón electroforético de proteínas,a las 6 semanas de tratamiento. En la cabeza del grupo control se observan aproximadamente 14 componentes, mientras que en la cola del control no se encuentran presentes los componentes 2,7,8,9 y 11, los compomentes de alto peso molecular son menos abundantes.

Al comparar los patrones electroforéticos de cabeza de los animales tratados con estradiol contra el control se observa la desaparición de los componentes de bajo peso molecular con todas las dosis. Con respecto a los componentes de alto peso molecular se presenta una disminución en la concentración en la cabeza de los animales tratados con estradiol, aunque una separación mas clara.

En la cola de los grupos tratados tambien desaparecen los componentes de bajo peso molecular en los animales tratados con respecto al grupo control. En la cola de los grupos tratados aparece el componente 11, no presente en el grupo tratado. Aparecen también en la cola de los grupos tratados dos nuevos componentes de alto peso molecular (A y B) los cuales se encuentran por debajo del componente 13 común a los 4 grupos, uno de estos componentes (B) es mas prominente con las dosis de 3 y 7 mm. Los patrones electroforéricos de proteínas en en cuerpo son muy similares, excepto para la dosis de 3 mm en donde aparece mas claramente el componente 11 con la dosis de 3 mm la concentración de componentes de alto peso molecular es menos abundante y los de bajo peso molecular desaparecen, excepto con la dosis de 3 mm en la que se mantiene el componente 5. Con la dosis de 7 mm desaparece el componente 1.

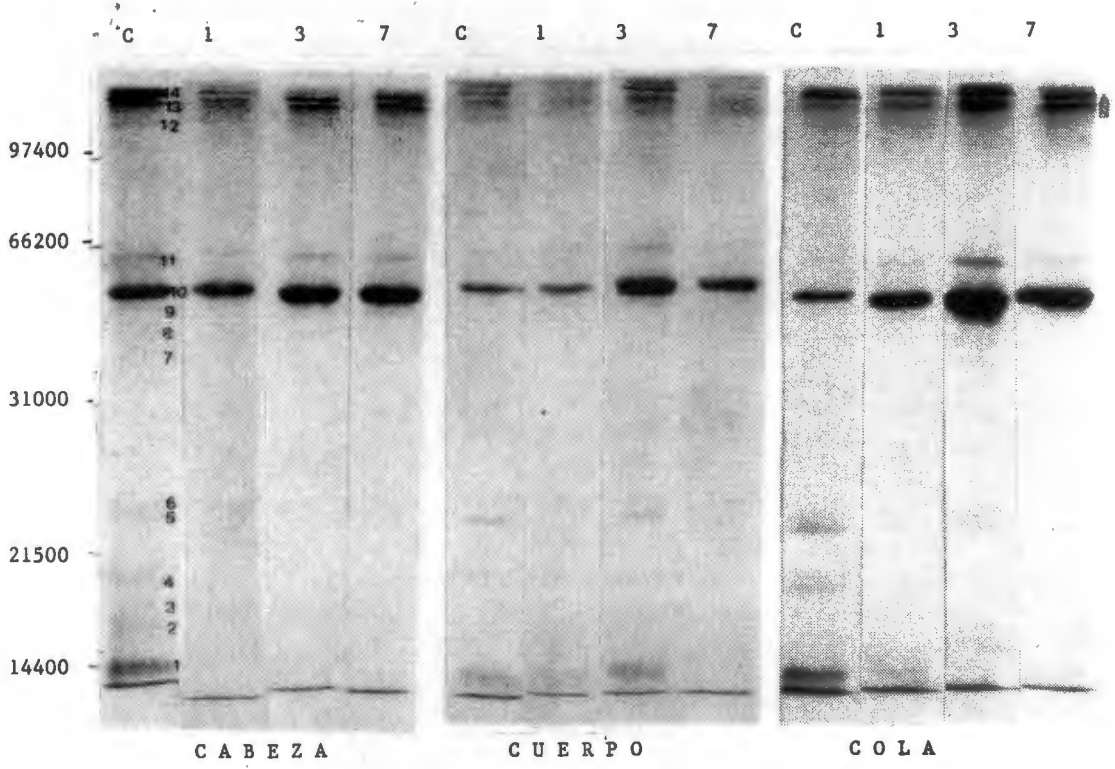


Fig 9. Patrón electroforético de proteínas en cada región del epidídimo después del tratamiento con diferentes dosis de estradiol (1,3 y 7 mm) durante 6 semanas. Las proteínas fueron separadas por electroforésis de gel de poliacrilamida (cada carril conteniendo 5 microgramos de proteínas totales), bajo condiciones desnaturalizantes y no reductoras. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata.

En la Fig 10 se muestra el patrón electroforético del fluído de las diferentes fracciones del epidídimo a las 12 semanas de tratamiento con diferentes dosis de estradiol. En la cabeza del grupo control se observan aproximadamente 15 componentes, en tanto que en la cola de este mismo grupo no aparecen todos y los componentes de bajo peso molecular (entre 14400 a 31000) se encuentran mas concentrados, los componentes de alto peso molecular se presentan menos concentrados. Al comparar el patrón electroforético de los fluídos de la región de la cabeza de los grupos tratados contra los de el grupo control se observa que los componentes de bajo peso molecular disminuyen a medida que aumenta la dosis, llegando casi a desaparecer con la dosis de 7 mm, sin embargo para los componentes de alto peso molecular, estos aumentan en concentración a medda que aumenta la dosis, esto es mas evidente con los componentes 13,14 y 15 a la dosis de 7 mm, tambien con esta dosis aparece otro componente por encima del 10, ausente en los demás grupos.

En la cola se observa aumento en la concentración de los componentes 2 y 4 con la dosis de 3 mm, el cuál no es muy evidente en el grupo control y en los demás grupos. Con la dosis de 7 mm aparece nuevamente el componente 11 por encima del 10, ausente en el grupo control. Los componentes de alto peso molecular se conservan con todas las dosis empleadas, aunque la concentración aumenta con la dosis de 7 mm.

En el cuerpo se observa una aumento en la concentración del componente 3, sobre todos con la dosis de 3 mm. Para los componentes de alto peso molecular se aprecian cambios cuantitativos en los com-

ponentes 12, y 13 siendo mas concentrados para los grupos tratados, principalmemte para el de 1 mm.

Al comparar de manera general los resultados obtenidos en los patrones electroforéticos de los grupos tratados a las 6 semanas contra los grupos tratados a las 12 semanas, observamos que en el caso del tratamiento de 6 semanas las concentraciones de los componentes de bajo peso molecular son menos abundantes y las concentraciones de proteínas de alto peso molecular aumentan a medida que aumenta la dosis, existiendo una relación dosis dependiente en ambos casos. Mientras que en el tratamiento de 12 semanas los resultados se presenta opuestos al tratamiento de 6 semanas.

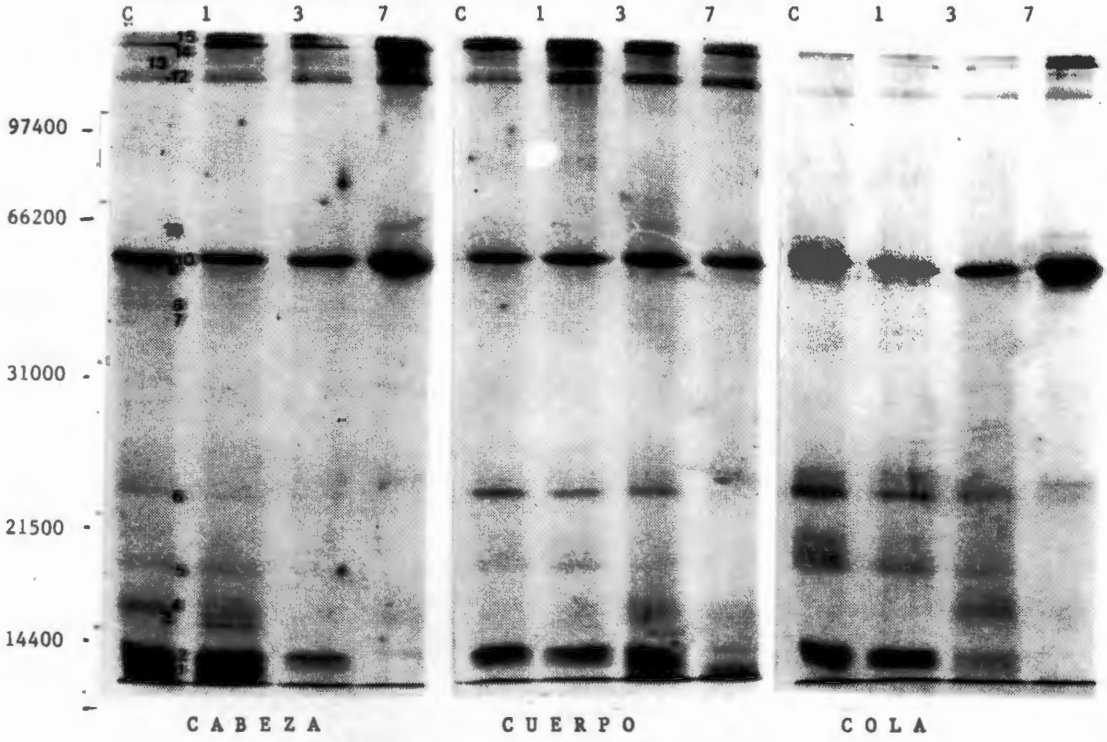


Fig 10. Patrón electroforético de proteinas en cada región del epidídimo después del tratamiento con diferentes dosis de estradiol (1,3,y 7 mm) durante 12 semanas. Las proteínas fueron separadas por electroforésis de gel de poliacrilamida (cada carril conteniendo 5 microgramos de proteínas totales), bajo condiciones desnaturalizantes y no reductoras. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata.

DISCUSION

La administración sostenida de estradiol en dosis altas y bajas a ratas macho durante 6 y 12 semanas produce cambios significativos en la estructura del sistema reproductor.

Robaire y col (1987) sostienen que bajas concentraciones de estradiol en administración crónica no producen ganancia significativa en el peso corporal, pero la administracíon de dosis altas dan como resultado cambios significativos en este parámetro. Los resultados de nuestros experimentos concuerdan con los de los anteriores autores al comparar los pesos finales de cada lote con el peso inicial, sin embargo al compararlos con el peso final del lote control se presentó una diferencia significativa lo cuál indica que el estradiol impide de alguna manera la ganancia de peso corporal, aunque se desconoce el mecanismo de este efecto .

Las diferentes concentraciones de estradiol producen un decremento significativo en el peso de los diferentes organos del sistema reproductor lo cuál concuerda con los resultados presentados por Robaire y col (1987), aunque este autor establece que estas disminuciones solo son significativas con dosis altas de estradiol (3 y 7 mm).

Con las diferentes concentraciones de estradiol a las 6 semanas de tratamiento se observaron disminuciones en el peso de las diferentes regiones del epididimo, en este caso podía esperarse que tambien las concentraciones de proteínas disminuyeran, sin embargo no se presentó una relación entre estos dos parámetros en el trata-

miento de 6 semanas, ya que en la porción de la cabeza de observa una disminución del peso pero las concentraciones de proteínas totales aumentan con el tratamiento de dosis altas, en tanto en la cola aunque se observa una disminución significativa en el peso de esta porción, la concentración total de proteínas no se ve modificada, lo cuál sugiere una regulación independiente entre la cabeza y la cola del epidídimo. Sin embargo en un tratamiento mas prolongado (12 semanas) se presenta relacion entre la disminución de peso de las diferentes regiones del epididimo y su concentración total de proteínas on todas las dosis de estradiol utilizadas, lo cuál puede sugerir que con tratamientos prolongados de estradiol las diferentes regiones del epidídimo son incapaces de autorregularse en cuanto a la concentracion total de proteínas.

La regulación diferencial de la cabeza y cola del epidídimo queda demostrada con el patrón electroforético de proteínas después de la administración de estrógenos. Esta diferenciación es mas clara con el patrón electroforético. A las 6 semanas ya que existe desaparición de componentes de bajo y alto peso molecular a medida que aumentan las dosis, mientras que en la cola desaparecen componentes de bajo peso molecular y aparecen nuevos componentes de alto peso molecular y son mas concentrados, lo cuál sugiere una regulación independiente entre cabeza y cola.

A pesar de que las concentraciones totales de proteínas disminuyen en todas las fracciones del epidídimo con el tratamiento de 12 semanas, el patrón electroforético cambia observándose que en la cabeza los componentes de bajo peso molecular desaparecen al ir

aumentando las dosis, los de alto peso molecular aumentan su concentración, mientas que en la cola la desaparición de los componentes de bajo peso molecular no es tan evidente como en cabeza y los componentes de alto peso molecular también aumentan, aunque este aumento no es tan evidente como en la cabeza, lo cuál sugiere una regulación independiente entre cabeza y cola.

CONCLUSIONES

La concentración y presencia de componentes de proteínas en las diferentes partes del epidídimo esta regulada por el medio endócrino interno.

Es importante considerar que la región de la cabeza y la cola tienen funciones diferentes lo que permite entender las diferencias iniciales en los parámetros estudiados, sin embargo en base a la discusión podemos concluir que los diferentes segmentos del epidídimo son susceptibles a los cambios endócrinos del medio pero a pesar de la duración del tratamiento se conserva el funcionamiento diferencial entre la cabeza y la cola, aunque esta diferenciación sea opuesta en el tiempo de duración del tratamiento.

El efecto del estradiol en parámetros como el peso corporal, peso de organos ocurre claramente a las 6 semanas de tratamiento, aunque la concentración de proteinas no se afecta de manera consistente. A las 12 semanas el efecto de las diferentes dosis de estradiol es consistente en todos los parámetros debido probablemente a la presencia de altas concentraciones de estrógenos que inhiben probablemente el eje hipotálamo-hipófisis-testiculo o bien por acción di-

recta sobre los organos reproductores, disminuyendo la concentración de andrógenos, los cuales mantienen la estructura, metabolismo y funcionamiento de los diferentes organos sexuales . La presencia de estrógenos modifica la síntesis y secresión de proteínas, la cuál esta en función de la dosis de estradiol y del tiempo de tratamiento.

En base a lo anterior concluimos que la liberación continua de estradiol en implantes subdérmicos de PDS en ratas adultas macho induce cambios en el peso corporal, peso de los diferentes organos del sistema reproductor y modifica diferencialmente el patrón de proteínas de las diferentes regiones del epidídimo.

BIBLIOGRAFIA

1.- Barker,L.S.D. and Amann,R.P. (1971): Epididimal physiology II. Inmunolfuorecence analysis of epithelial secretion and absortion of bovine sperm maturation. J. Reprod. Fert. 26. 319-332.

2.- Bedford,J.M. (1963): Changes on the electrophoretic properties of the rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. Nature.200. 1178-1180.

3.- Bedford,J.M. (1965): Changes in the fine structure of the rabbit sperm head during passage through the epididymis. J.Anat.99, 891-906.

4.- Bedford,M.A. and Nicander,L. (1971): Ultrastructural changes in the acrosomal and sperm membrane during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey. J.Anat. 108. 527.543.

5.- Bedford,J.M. (1985): Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In Handbook of Physiology. sect 7, Endocrinology, Vol 5. Male Reproductive System (D:W:

6.- Blaquier,J:A., Cameo,M.S and Burgos,M.H. (1972): The role of androgens in the maturation of epididimal spermatozoa in the guinea pig. Endocrinology,90, 839-842.

7.- Blaquier,J.A. (1973):An in vitro action of androgens on protein synthesis by epididimal tubules manteined in organ culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52:1177-1183.

8.- Blaquier,J.A. (1975):The influence of androgens on protein synthesis by culture rat epididimal tubules. Acta, Endocrinol. 79:401-416.

9.- Briggs,M., Briggs,M.(1974): Oral contraceptive for men. Nature 252: 585-86.

10.- Brooks,D.E., Hamilton,D.W., and Mallek,A.H.(1974): Carnitine and glycerylphosphorylcholine in the reproductive tract of the male rat. J. Reprod. Fertil. 36:141-160.

11.- Brooks,D.E. (1977): The androgenic control of the composition of the rat epididymis determined by eferent duct ligation or castration. J.Reprod. Fertil. 49: 383.385.

12.- Brooks,D.E. (1979): Influence od androgens on the weights of the male accesory reproductive organs on the activities of mitoconfrial enzimes in the epididyes of the rat, J.Endocrinol.82: 293-203.

13.- Brooks,D.E. (1979): Biochemical enviroment of sperm maturation. In: The spermatozoon. edited by D.W.Fawcett and J.M.Bedford, M.A.Baltimore: Urban & Schwarzenbreg, 1979. 23-24.

14.- Brooks,D.E. Carnitine in the male reproductive tract and its relation to the metabolism of the epididimis and spermatozoa. In: Carnitine biosynthesis, metabolism and functions. Edited by R.A. Frenkel and J.D. Mc Garry. New York. Academis,1980. 216-235.

15.- Brooks,D.E. and Higgins,S.J.(1980): Characterization and androgen-dependence of protein asociated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis.J.Reprod. Fertil. 59:363-375.

16.- Brooks ,D:E: (1981): Metabolic Activity in the epididimis and its regulation By androgens. Pjysiological Reviews. Published by American Physiological Society. Vol 61, No3. July 1981

17.- Brooks,E.D.(1982): Purification of rat proteins "D" and "E", demostration of shared immunological determinants, and identification of regional synthesis and secretion. Int. J. Androl. 5, 513-524.

18.- Cameo,M.S. and Blaquier,J.A. (1976): Androgens controlled specific proteins in rat epididimis. J. Endocrinol. 68, 47-55.

19.- Cooper,G.W. and Bedford,J.M. (1971): Acquisition of surface change by the plasma membrane of mammalian spermatozoa during epididimal maturation. Anal.Rec.169.300-301.

20.- Court,M. (1984); The male in farm animal reproduction. Edit. Institute National de la Reserche Agronomic. France. pp 79-101.

21.- Danzo,B.J., Wolfe,M.S., and Curry,B.J. (1977): The presence of an estrdiol binding component in cytosol immature rat epididimides. Mol. Cell. Endocrinol. 6:271.

22.- Danzo,B.J., Eller,B.C., Judy, L.A. Trautman,J.R., and Orgebin-Crist,M.C. (1975): Estrdiol binding in cytosol from epididimides of immature rabbits.Mol. Cell. Endocrinol. 2:91.

23.- Danzo,B.J., Sutton,W., and Eller,B.C. (1978):Analysis of (3H) estradiol binding to nuclei prepared from epididimides of sexually immature intac rabbits. Mol. Cell. Endocrinol. 9:21.

24.- Danzo,B.J., and Eller,B.C. (1979): The presence of a cytoplasmic estrogen receptor in sexually mature rabbit epididimides: Comparison with the estrogen receptor in immature rabbit epididimal cytosol. Endocrinology. Vol.105. No 5. p. 1128-34.

25.- Dyson,A.L.M.B., and Orgebin-Crist,M.C.(1973):Effect of hypophysectomy, castration and androgen replecement upon the fertilizing ability of rat epididimal spermatozoa. Endocrinology 96: 391-402.

26.- Ericsson,R.J., Backer,B.F.(1966).Transport of oestrogens in semen to the female rat during mating and its effects on fertility. J.Reprod. Fertil. 12:381-384.

27.- Ewing,LL., Desjardins,C., Irby,D:C., Rabaire, B.(1977): Sinergistic interaction of testosterone and estradiol: Inhibition of spermatogenesis in rats. Nature. 269: 409-11.

28.- Ewing,LL., Gorski,R.A.,Sbordone,R.J.,Tyler,J.V.,Desjardins,C., Robaire,B.(1979): Testosterone-Estradiol filled polydimethyl-siloxane subdermal implants: effect on fertility and masculine sexual and aggresive behavior of male rats. Biol. Reprod.21: 265-72-

29.- Flickinger, C.J. (1979): Synthesis, transport and secrettion on protein in the initial segment of the mouse epididymis as studied by electron microscope radioautography. Biol. Reprod. 20:1015-1030.

30.- Fournier-Delpech,S., Bayard,F.,and Boulard,C.(1977): Contribution à l'etude de la maturation du sperma. Étude d'une protéin acide de l'epididyme chez le rat. Dépendance androgéne, relation avec l'acide sialique. C.R. Soc.Biol. 167:1989-1996.

31.- Fowcett,D.W. and Phillips.D.N. (1969): Observations on the release spermatozoa and on the changes in the head during passage through the epididymis. J. Reprod. Fert. Suppl. 6. 405-418.

32.- Frick,J., Danner,Ch., Joos,H., Kumt,G., Luukkainen,T. (1981): Spermatogenesis in men treated with subcutaneous application of levonorgestrel and estrone rods. J.Androl. 2:331-338.

33.- Friend,D.S., and Farquhar,M.G. (1967): Function of coated vesicles during protein absortion in the rat vas deferents. J. Cell. Biol. 35: 357-376.

34.- Gaberi,J.C., Kohane,A.C., Cameo,M.S. and Blaquier,J.A. (1979): Isolation and characterization of specific rat epididimal proteins. Mol. Cell. Endocrinol. 13, 73-82.

35.- Gordon,M., Dandekar,P.V. and Bortoszewicz,W. (1974): Ultrastructural localization of surface receptors for concanavalin A on rabbit spermatozoa. J.Reprod.Fert. 36, 211-214.

36.- Hamilton,D.W.(1972): The mamalian epididydimis. In: Reproductive Biology. Edited by H. Bolin and S. Glosser. Amsterdam. Excepta Medica. p. 268-337.

37.- Hamilton,D.W. Structure and functions of the epitelium lining the ductuli efferents, ductus epididymis, and ductus defferents in the rat. In: Handbookc of physiology. Endocrinology. Washington,D.C.: Am. Physiol. Soc., 1975, sect.7, vol.V, Chapt.13, p159-301.

38.- Hilton,B.T., and Selchell,B.P.(1980): Concentration of glycerophosphocholine, phosphocholine and free inorganic phosphate in the luminal fluid of the rat testes and epididymis. J. Reprod. Fertil. 58:401-406.

39.- Hoffer,A.P., Hamilton,D.W., and Fawcett,D.W.(1973): The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididimis. Anat. Rec. 175:169-202.

40.- Hunter,A.C. (1969): Differentiation of the rabbit sperm antigens from those of seminal plasm. J.Reprod. Fert. 36, 211-214.

41.- Johnson,W.L. and Hunter,A:G. (1972): Inmunofluorecence evalua-evaluation of the male rabbit reproductive tract for sites of secretion and absortion of seminal antigen. Biol. Reprod. 6, 13-22.

42.- Jones,R., Brown,R.C., Von Glos,K.I.,and Parker,M.G.(1980):- Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. Characterization of androgen-dependent and testicular fluid-depend proteins. Biochem.J. 188: 667-676.

43.- Killian,G.J. and Amann,R.P. (1973): Inmunoelectrophoretic characterization of fluid and sperm entering and leaving the bovine epididymis. Biol.Reprod. 9,489-499.

44.- Kohane,A.C., Garberi,J.C., Cameo,M.S. and Blaquier,J.A. (1979): Quantitative determination of specidic proteins in the rat epididymis . J. Steroids. Biochem. 11, 671-674.

45.- Kohane,A.C., Cameo,M.S., Piñeiro,L., Garberi,J.C and Blaquier,J.A. (1980): Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. Biol. Reprod. 23, 181.187.

46.- Koskimies,A.J. and Kormano,M. (1975): Proteins in fluid fron differents segments of the rat epididymis. J. Reprod. Fert. 43, 345-348.

47.- Lea,O.A., Petrusz,P. and French,F.S. (1978): Purification and localization of acidic epididimal glycoproteins (AEG): A sperm coating ptotein secreted by the rat epididymis. Int. J. Androl. Suppl. 2, 592.605.

48.- Lobl,T.J., Kirlon,K.T., Forbes,A.D., Ewwing, LL., Kemp,P.L., Dejardins,C. (1983): Contraceptive efficacy of testosterone estradiol implants in male rhesus monkey. Contraception 27: 383-389.

49.- Moore,H.D.M., and Bedford,J.M. (1979): Thge differential absortive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. Anal. Rec. 193: 315-328.

50.- Nicolson,G.L., Usui,N., Yanagimachi,R., Yanagimachi,H. and Smith;J.R. (1977): Lectin-Bilding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa. Changes in surface receptors during epididimal maturation and after eyaculation. J.Cell. Biol.74, 950-962.

51.- Nieschlag,E., Behre,H.M., Weinbawer,G.F., Gudermann,Th., Simoni,M., Spiteri-Grech,J., and Cooper,T.G. (1992): Report of the 17th European workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the testis. Mol. and Cell. Endocrinol. 87:R25-42.

52.- Olson,G.E. and Hamilton,D.W. (1976): Morphological changes in the midpiece of wooly opossum spermatozoa during epididymal transit. Anat. Rec. 186, 387-404.

53.- Olson, G.E. and Hamilton ,D.W. (1978): Characterization of the surface glycoprotein of rat spermatozoa. Biol. Reprod. 19,26-35.

54.- Orgebin-Crist,M.C., and Davis,J. (1974): Functional and Morphological effects of hipophysectomy and androgen replacement in the rabbit epididymis. Cell. Tissue. Res. 148.183-201.

55.- Orgebin-Crist,M.C., Danzo,B.J. and Davis,J. (1975): Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertility ability in the epididymis. In: Handbook of Physiology Sec.7. Endocrinology. Vol.5. Male Reproductive System (D:W: Hamilton and R.O.Greep, eds) American Physiological Society, Washington.D.C. pp 319-333.

56.- Orgebin-Crist,M.C.(1981): Epididimal physiology and sperm maturation. Prog. Reprod. Biol. 8:80-89.

57.- Rajalakshmi,M., and Prasat,R.M.N. (1976): Stimulation of nucleic acid and protein synthesis in the epididimis and accesory organs on the rat by testosterone. J. Endocrinol. 70:263-273.

58.- Rao,M.V., Chinoy,N.J.(1983): Effect of estradiol benzoate of the reproductive organs and fertility in the male rat. Eur.J. Obstet. Gynrcol. Reprod.Biol.15:189

59.- Reid,B.L., and Cleland,K.W.(1957): The structure and functions of the epididymis. I. The history of the rat epididymis. Aust. J. Zool. 5:223-246-

60.- Robaire,B.,Ewing,LL., Irby,D.C., Desjardins,C. (1979): Interaction of trstosterone and estradiol-17B on the reproductive tract of the male rat. Biol.Reprod. 21: 455-463.

61.- Robaire,B.,Smit.S., and Hales,B.F.(1984): Suppression of spermatogenesis by testosterona in adult male rats: Effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. Biol. Reprod. 31, 221-130.

62.- Robaire,B., Duran,J., and Hales,B.F. (1987): Effect of estradiol filled polydimethylsiloxane subdermal implants in adult male rats on the reproductive system, fertility, and progeny outcome. Biol. Reprod.37, 327-334.

63.- Robaire,B., Hermo,L. (1988): Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, function, and their regulation. In: Knobil E, Neil,J. (eds). The physiology of reproduction . New York,NY: Raven Press. pp 999-1080.

64.- Rosado,A., Hernández,O. (1988): Biología molecular del espermatozoide humano. Ciencia,39:249-260.

65.- Setchell, B.P. and Brooks,D. (1988): Anatomy, vasculature, innervation and fluid of the male reproductive tract. In: The physiology of reproduction.Edit. by Raven Press. New York. Vol.5, cap.19.p.253-837.

66.- Singh,J.N.,Setty,B.S.,Chowdhury,S.R.,Kar,A.B.(1970):Functional sterility in male rats after micro-dose estrogen treatment. Contraception 1:372-87.

67.- Thomas,J.A., Knych,E.T. (1966): Inhibitory effects of the estrogens on the testosterone-dependent process of sex accesory fructose secretion. Endocrinology 78: 1084-86.

68.- Turner,T.T., Plesums,J.L., and Cabot,C.L. (1979): Luminal fluid proteins of the male rat reproducction tract.Biol. Reprod.21,883-890.

69.- Turner,T., Gleavy,J., Harris,J.(1990): Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsecuent vasovasostomy. J.Androl. 11:422-428.

70.- Yanagimachi,R.(1980): Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Cap.5, Vol I. edit. Raven Press. New York. pp 135-185.

71.- Yen., and Jaffe.(1986):Reproductive Endocrinology. Edit. Saunders Co. Vol.I, Cap 7:177-200.

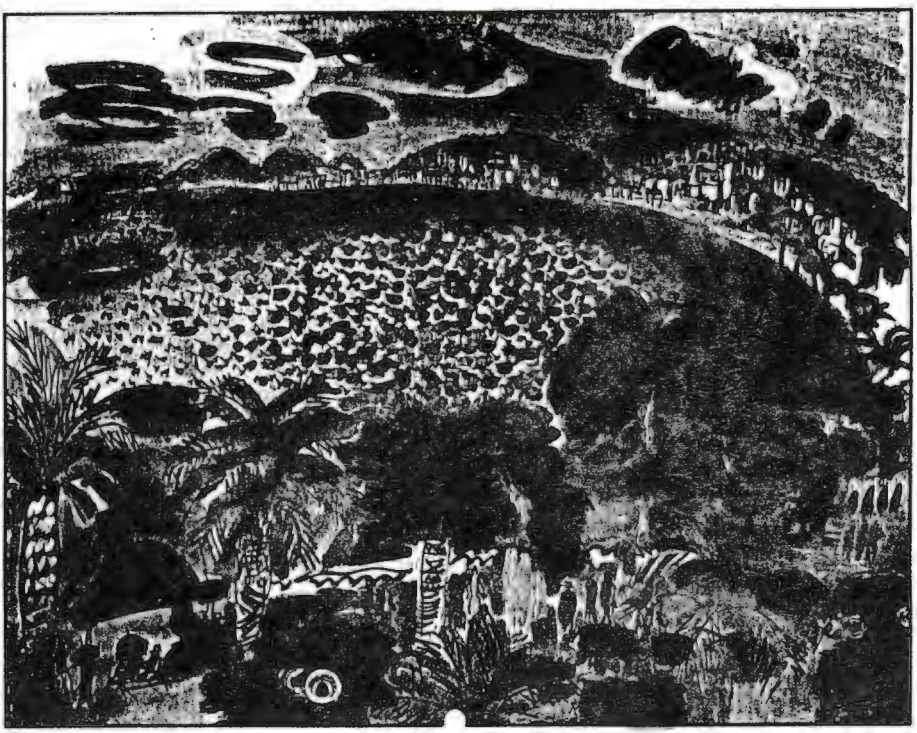
72.- Laemmmli,U.K. (1970). Clavaje of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature (London),227: 680-695.

73.- Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. (1951): Protein measurement with the Folin fenol reagent. J.Biol.. Chem. 181: 265-275.

PRESENTACION EN EVENTOS CIENTIFICOS.

NINTH INTERNATIONAL CONGRESS OF ENDOCRINOLOGY

NICE • FRANCE • AUGUST 30 - SEPTEMBER 5 • 1992



Raoul Dufy : La Promenade des Anglais. Aquarelle, 1928 © by SPADEM 1990. Photo Gal. Fanny Guillon-Lafaille, Paris.

...AND HUMAN
...MINISTRATION
...D PREGNANCY
...H SUBNORMAL

...AWA I., YONAGO,

...KGI.
...I L.J., QIN H.,

...ETION IN VITRO.
...RANCE.

...TOLI CELL
...ORHINUS

RENNES, FRANCE.

...I IS INVOLVED IN
...ION OF HEPATOCYTE

...T H., KNEIP B.,
...ES, FRANCE.

...GULATED BY FSH,
...IES.
...RANCE.

...HORMONE BINDING

...B., ALBANY, U.S.A.

...E
...RTER mRNA LEVEL

...IENTO M., L'AQUILA,

...UPTAKE BY THE

...STRALIA.

...ERISTICS AND
...SIKA BUCK , CERVUS

...', TAKEDA T., IKEDA

...TISSUE-SPECIFIC
...OBCULTURES FROM

...EAN C., AUBIERE,

...OC mRNA LEVELS IN

...LI E., MAGNANTI M.,
...RINI A., ROMA, ITALY.

...ENZYME (ACE)
...CTLY RESTRICTED

...ORVOL P., SOUBRIER

13-03-084 DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION AND TISSUE LOCALIZATION OF THE TWO ISOFORMS OF ACE REVEALED BY IN SITU HYBRIDIZATION AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY.
SIBONY M., GASC J.M., ALHENC-GELAS F., SOUBRIER F., CORVOL P., PARIS, FRANCE.*

13-03-085 FSH RECEPTOR mRNA LOCALIZATION IN THE RAT SEMINIFEROUS EPITHELIUM BY IN SITU HYBRIDIZATION.
KLIESCH S., PENTTILA T.L., GROMOLL J., NIESCHLAG E., PARVINEN M., MÜNSTER, GERMANY.*

13-03-086 CHARACTERIZATION OF THE ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION IN THE MOUSE TESTIS AND OVARY.
CHAN J.S.D., HAYES W.P., WU J., SALAS-PRATO M., FOCK-TAVE F.H.T., BLEAU G., ROBERTS K.D., LOH Y.P., CARRIERE S., MONTREAL, CANADA.*

13-03-087 A NEW FLOWCYTOMETRIC ASSAY FOR NUCLEAR CHROMATIN COMPACTION REVEALS A ROLE FOR FOLLICLE STIMULATING HORMONE IN EPIDIDYMAL MATURATION OF BONNET MONKEY (MACACA RADIATA) SPERMATOZOA.
ARAVINDAN G.R., MOUDGAL N.R., BANGALORE, INDIA.*

13-03-088 DIFFERENTIAL REGULATORY EFFECT OF CHRONIC ADMINISTRATION OF 17β ESTRADIOL UPON THE DIFFERENT ANATOMICAL SEGMENTS OF THE RAT EPIDIDYMIS.
HEUZE Y., JAYME V., ONEGA M.C., FONSECA T., ROSADO A., MEXICO D.F., MEXICO.*

13-03-089 STUDIES ON ESTROGEN SYNTHESIS IN SERTOLI CELLS FROM IMMATURE RATS AND MICE.
YU J.Y.L., SHEN S.T., SONG L.C., HUANG M.C., TAIPEI, TAIWAN.*

13-03-090 SUPRESSION OF HUMAN SPERMATOGENESIS BY TESTOSTERONE IMPLANTS.
HANDELSMAN D.J., BOYLAN L.M., CONWAY A.J., SYDNEY, AUSTRALIA.*

13-03-091 ABNORMAL MEMBRANE PHOSPHOLIPID PROFILES IN OLIGOSPERMIC SPERMATOZOA - CAUSE FOR LOW FERTILITY.
SINHA S., INDORE, INDIA.*

13-03-092 REGULATION OF HUMAN SERTOLI CELL FUNCTIONS BY GERM CELLS IN VITRO.
FOUCAULT P., DROSDOWSKY M.A., CARREAU S., CAEN, FRANCE.*

13-03-093 CHANGES IN SEMINAL FLUID INDEXES AND HORMONAL PROFILES IN SMOKERS AND NONSMOKERS.
OCHEDALSKI T., DEC W., LACHOWITZ A., LODZ, POLAND.*

13-03-094 MALE INFERTILITY AND HETEROCHROMATIC ALTERATION OF CHROMOSOME 1.
BRETON LESMES I., ANDIA V., BOTELLA M., MEZA S., CORREDERA J., ORERA M., JARA A., MADRID, SPAIN.*

13-03-095 ADMINISTRATION OF PULSATILE GONADOLIBERINE (GnRH) IN INFERTILE MAN WITH HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM (H.H.).
LORCY Y., BOHEC M., ALLANNIC A., RENNES, FRANCE.*

13-03-096 SPERMATOGENESIS DEPENDS ON ADEQUATE INTRATESTICULAR TESTOSTERONE (T) STIMULATION REGARDLESS OF CIRCULATING T LEVELS.
COUZINET B., YOUNG J., NAITOUL K., SCHAISON G., LE KREMLIN BICETRE, FRANCE.*

DIFFERENTIAL REGULATORY EFFECT OF CHRONIC ADMINISTRATION OF 17B ESTRADIOL UPON THE DIFFERENT ANATOMICAL SEGMENTS OF THE RAT EPIDIDYMIS. Y. Heuze*,V. Jayme*, M.C. Onega, T. Fonseca and A. Rosado.; Division de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Calzada del Hueso #1100. Col. Villa Quietud. cp. 04960. México., D.F.

To obtain direct evidence about the possibility that the anatomical segments of the mammalian epididymis are differentially regulated by the endocrine milieu, we realized the following experiments. Male adult wistar rats were implanted with estradiol subdermal silastic implant of different lenghts. At 6 and 12 weeks after treatment, experimental and control animals were sacrified; epididymis removed and after careful perfussion surgically divided into head, corp and tail. Each segment was then differentially processed to study: 1.- Morphological aspect, size, weight and histological study both by optic and electron microscopy. 2.- Number, mobility and viability of the contained sperm cells. 3.- Influence on the capacity of the sperm nuclei to undergo in vitro descondensation. 4.- Testosterone, dihydrotestosterone and androstendione concentration by RIA, and 5.- Modification on the protein acrylamyde electrophoretic patterns of the epididymal fluid.
The results obtained demostrated that the endocrine regulation is indeed different in each of the anatomic segment of the epididymis. These facts can be correlated with the know participation of the epididymis on the espermatozoa maturation process.

13-03-88

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

III SIMPOSIO

DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

SALA CUICACALLI

29 Y 30 DE OCTUBRE DE 1992

EFECTO DIFERENCIAL DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ESTRADIOL SOBRE LA FISIOLOGIA Y ESTRUCTURA DE LAS DISTINTAS REGIONES ANATOMICAS DEL EPIDIDIMO DE LA RATA.

Heuze Yvonne*, Jaime Victoria*, Onega Ma. Carmen*, Fonseca Teresa+ y Rosado Adolfo*.

* Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco, + Depto. de Ciencias de la Salud y *Depto. de Producción Animal, U. A. M. - Iztapalapa.

El espermatozoide de mamífero adquiere su movilidad progresiva y su capacidad fertilizante durante el paso por el epirlídimo en el proceso que se ha denominado maduración del espermatozoide. Existe evidencia indirecta de que las tres diferentes partes anatómicas del epidídimo, cabeza, cuerpo y cola, son reguladas independientemente,

Para establecer la veracidad de esta hipótesis se realizaron los siguientes experimentos: ratas machos Wistar de 250-300g de peso fueron divididas en tres grupos e implantadas con una cápsula subdérmica de polidimetilsiloxana de diferentes longitudes, 1, 3 y 7 mm, conteniendo 17 B extradiol y con capacidad de liberación continua.
Se llevó un control semanal del peso corporal durante 8 y 12 semanas y al término de los tiempos señalados los animales fueron sacrificados. Se aislaron los epidídimos, perfundiéndose vía rete testes con solución de Krebs y fueron quirúrgicamente divididos en cabeza, cuerpo y cola. Cada segmento fue procesado en forma individual para los siguientes estudios: 1.- Morfología, peso, tamaño y apariencia. 2.- Movilidad progresiva, mortalidad y cuenta espermática. 3.- Estudio histológico en microscopía de luz y electrónica.

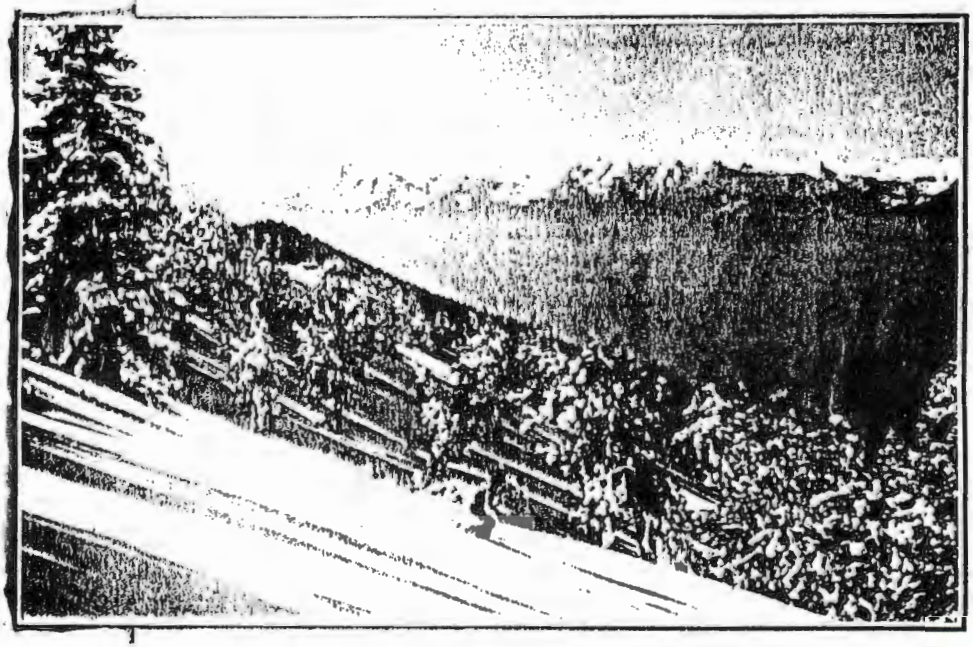
Resultados.- 1°. El peso corporal, así como el peso de los órganos sexuales accesorios, disminuyó en relación directa al tamaño del implante. 2°. El número de espermatozoides se relaciona de una manera inversa a la concentración de E_2 liberado por los implantes. 3° La movilidad en general se ve disminuida siendo significativamente inhibida en los espermatozoides de la cola, además se cambia el patrón de desplazamiento circular de los espermatozoides de la cabeza epididimaria por un patrón de desplazamiento hacia adelante que normalmente se observa en los espermatozoides obtenidos de la cola del mismo órgano. 4° Los estudios ultraestructurales indican un daño generalizado que sin embargo, es notablemente más pronunciado y selectivo a nivel de la cola del epidídimo.

Los resultados obtenidos nos han permitido concluir que la regulación endócrina realmente se hace diferencial por lo menos en la parte proximal y distal del epidídimo, correlacionándose así el papel del epidídimo durante la maduración del espermatozoide.

Western Pharmacology Society and the Australasian Society of Clinical and Experiemental Pharmacologists

1993 Meeting
January 31 - February 5, 1993

Program and Abstracts



Hyatt Regency — Lake Tahoe
Incline Village, Nevada

HOSTED BY
THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY
UNIVERSITY OF NEVADA SCHOOL OF MEDICINE
RENO, NEVADA

DIFFERENTIAL MODIFICATION ON THE PROTEINS PATTERNS OF THE EPIDIDYMAL REGIONS BY CHRONIC TREATMENT WITH ESTRADIOL IN RATS. V. Jayme*, F. Mendoza*, Y. Heuze** and A. Rosado***. *Departamento de Sistemas Biológicos, **Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM-Xochimilco, *** Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-Iztapalapa. Calzada del Hueso 1100. Col Villa Quietud, c.p.04860, México, D.F. MEXICO.

Some proteins have been found in specific epididymal regions with sperm motility and fertilizing inducing activity. This differential regulation of epididymal segments has been documented for other functions. To stablish if this differential regulation is due to the endocrine enviroment we studied the effect of three doses of estradiol [E_2] (subdermal implants) to adult male rats on epididymal protein composition. The differential effects observed in the electrophoretogram obteined after estradiol implantation may be resumed as: a) head seems to be resistant to low [E_2], but is proportionally affected by longer doses. b) tail is highly susceptible to low [E_2], but larger [E_2] do not induce a proportional effect. c) the tail protein pattern observed under high [E_2] tend to become similar to the normal head protein pattern.

(55)

TIBIAL HISTOLOGICAL ALTERATIONS OF THE MICE FETUSES EXPOSED TO DIAZEPAM. Amalia Márquez-Orozco and Cristina Márquez-Orozco. Department of Embryology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

Investigations with 14C labelled diazepam (DZ) have shown that it acumulates in human and mice fetal tissues. However, it is not known if they produce alterations in bone tissues. The purpose of this work is to investigate if DZ administrated sc in pregnant mice females induces alterations in the bone formation of fetal tibia. Pelvic limbs of fetal mice of an experimental group DZ and one of control group (C), were fixed, embedded, thin sectioned, stained and studied with light microscopy. Microscopic examination of the proximal and distal tibial ends from the DZ group showed hypertrophic chondrocytes with vacuolated cytoplasm, voluminous nuclei with atypical distribution of the chromatin. The intercellular material was edematized. The trabeculae were coarser than the C group, which were encircled by osteoblasts and few and large osteocytes with voluminous nuclei. The periosteum and the perichondrium also had large cells with large nuclei. Significative differences $p < 0.05$ were found about diameter of chondrocytes nuclei and osteoblast and osteocytes size. This alterations probably persist after birth.

(56)

EFFECTS OF DIAZEPAM ON THE ULTRASTRUCTURE OF FETAL MICE HEPATOCYTES. Ma. Cristina Márquez-Orozco, Amalia Márquez-Orozco and Ma. Verónica Gazca-Ramírez. Department of Embryology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

Previuos research has shown that fetal mice hepatic cells from females treated with diazepam (valium) during pregnancy have cytoplasmic and nuclear modifications at the fotonic microscope. The purpouse of this work is to investigate if diazepam administrated sc to pregnant mice females induces ultrastructural alterations in the citoplasmic organeles and the nucleus of the fetal hepatocytes. In the fetal mice of the experimental group of pregnant females treated with a single daily dose of diazepam 2.7 mg/Kg b.w., administrated from 6th to 15th pregnancy days, the observation at transmission electromicroscope of fetal hepatocytes frecuentlly showed desorganized and dilated rough endoplasmic reticulum cisterns, membranous elements, abundant Golgi complex and glucogen granules, around large vacuoles. The voluminous nucleus shows atipical distribution of chromatine. This alterations could modify hepatocyte physiology and probably persist after birth.

(57)

Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas



UNIVERSIDAD MERICANA DE ACAPULCO
EXCELENCIA PA

Acapulco Gro.
Agosto 15-20

C196

EFECTO DIFERENCIAL DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ESTRADIOL EN IMPLANTES SUBDERMICOS SOBRE LAS DIFERENTES REGIONES DEL EPIDIDIMO DE RATA. Jayme A. Victoria*, (avalado por Reyes Y. Cruz), Mendoza Felipe*, Rosado Adolfo*. Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México,D.F.

La adquisición de la motilidad y capacidad fertilizante del espermatozoide a su paso por el epididimo, han sido relacionadas con la presencia de ciertas proteinas en regiones especificas del epididimo. Para obtener evidencia acerca de la posibilidad de que los segmentos anatómicos (cabeza, cuerpo y cola) del epididimo de rata estan regulados diferencialmente por el medio endócrino, realizamos los siguientes experimentos:

Ratas wistar macho adultas (300-350g) fueron implantadas con estradiol (E_2) en implantes subdérmicos de polidimetilsiloxano con diferentes dosis. A las 6 y 12 semanas de tratamiento los animales control y tratados fueron sacrificados por decapitación, los epididimos removidos y después de ser perfundidos fueron divididos anatómicamente en cabeza, cuerpo y cola. Cada segmento fué procesado para estudiar:

1) Aspecto morfológico, peso y tamaño.
2) Modificación cualitativa y cuantitativa del patrón del proteinas del fluido epididimal de cada segmento, por el metodo de Lowry y por electroforesis.

Los resultados obtenidos indicaron que en los animales tratados el aspecto morfológico del epididimo cambia haciendose mas delgado, el peso y tamaño disminuye de manera significativa con respecto a los controles. Estos cambios guardan relación lineal con la dosis. En cuanto a la modificación del patrón de proteinas, los resultados demostraron en general que hay una disminución de la concentración y que esta disminución es dosis-dependiente. Se observó además que la región de la cabeza se mantiene resistente a bajas dosis de E_2 pero es afectada proporcionalmente por dosis grandes, la cola es altamente susceptible a bajas dosis pero dosis mayores no indican un efecto proporcional. Estos resultados indican que la regulación es diferente en cada uno de los segmentos anatómicos del epididimo, lo cuál se puede relacionar con el proceso de maduración espermática.

C197

PRESENCIA DE PROTEASAS EN LOS GRANULOS CORTICALES DE OVOCITOS DE RATON. Flores-Herrera, Héctor*, (avalado por Antón-Tay, Fernando) Serrano, Héctor*. Depto. Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa.

El bloqueo a la poliapermia se logra en base a dos mecanismos: un bloqueo rápido de corta duración asociado con el transporte de Ca^{+2}. Esta despolarisación permite la migración de los gránulos corticales (GC) a la superficie de la membrana plasmática y la consiguiente liberación de su contenido con lo que se modifican los componentes de la matríz glucoproteica que recubre a los ovocitos. Se ha demostrado que uno de estos (ZP_3) tiene un peso molecular menor una vez que el ovocito ha sido fertilizado. Al mismo tiempo, el componente ZP_2 es incapaz de unir espermatozoides despues de la fertilización, si bien en este caso no se ha asociado una disminución en el peso molecular.

Analizando el contenido de los GC de ovocito de ratón, en nuestro laboratorio se han detectado Oxoperoxidasas (Ortíz-Galicia y cols. 1991) que pueden estar implicadas en este proceso. En este estudio, reportamos la caracterización inicial de la actividad de proteasas presentes en el interior de los GC de ovocitos de ratón.

La obtención de ovocitos maduros y libres de zona pelúcida se hizo mediante la técnica reportadas por Ortíz-Galicia y colaboradores (1991). El sobrenadante de los ovocitos activados se recuperó y se clarificó por centrifugación a 13000 Xg 10 minutos. El contenido proteico se determinó mediante una modificación a la técnica de Smith y cols. (1987). La actividad de proteasas se realizó en geles de poliacrilamida al 10% conteniendo 2 mg/ml de gelatina, de acuerdo a la técnica de Heussen y Dowdle (1980). Los geles fueron revelados a 45 Volts por 16 horas. Las zonas libres de gelatina se evidenciaron por tinción con una solución etanol-acética de amido negro al 1%.

Utilizando diferentes concentraciones del exudado, se pudieron detectar dos regiones claras, evidencia de la presencia de proteasas detectadas con un substrato inespecífico. En las muestras de tripsina, las bandas de la protease tienen una movilidad diferente a la que se presenta en las muestras de exudado de los gránulos corticales.

Estos resultados indican que en los GC de los ovocitos de ratón se encuentran dos proteasas que pueden intervenir en el bloqueo permanente a la poliapermia.

(TRABAJO FINANCIADO PARCIALMENTE POR LA FUNDACION HECTOR SERRANO)

C198

EFECTO DE LA LESION DEL NUCLEO DEL TRACTO SOLITARIO EN LA RATA GRAVIDA A TERMINO Y SU IMPLICACION EN EL TRABAJO DE PARTO. Ninomiya Jesús G. y Sarco de Coronado Irma. Deptos. de Fisiología, Fac. de Medicina, U.N.A.M., Apdo. Postal 70-250, C.P. 04510 y Esc. Médico Militar, U.D.E.F.A., Lomas de Sotelo, México, D.F.

Hay evidencia de que por lo menos, algunas de las aferencias del cérvix y de los cuernos uterinos cursan a través del nervio vago. En éste, se describe la existencia de un 85% de fibras aferentes que hacen su primera sinapsis central en el núcleo del tracto solitario (NTS) del tallo cerebral. El propósito de este trabajo es poner de manifiesto la participación de estas conexiones para la integración de la actividad del trabajo de parto. Para ello, se usaron ratas grávidas a término, anestesiadas con pentobarbital (25 mg/Kg de peso) y se les bloqueó además el nervio facial con xilocaína. Se hizo un trépano bilateral a 1.5 mm de la línea media y a 12.3 mm de bregma y se descendió un electrodo monopolar a 6 mm de profundidad desde la superficie cerebelosa. En este sitio, se pasó una corriente electrolítica de 0.5 mA durante 20 seg con el fin de lesionar el NTS. Los resultados preliminares son los siguientes: la lesión bilateral del NTS efectuada 48 hrs antes del parto ocasionó distocia, ya que, aquél se retrasó de 12 a 15 hrs y todos los productos nacieron muertos. Por otra parte, la lesión unilateral del NTS (24 a 48 hrs antes del parto) también produjo distocia, con un retraso del parto de 6 a 30 hrs, que ocasionó, en el retraso menor que la mayoría de los productos nacieran muertos o bién, en el otro caso, la muerte de la madre. Los controles fueron los animales que se lesionaron en condiciones similares a los anteriores paro en otros sitios, por ejemplo: el cerebelo y su trabajo de parto fue normal.

Estos resultados sugieren la importancia de que la información aferente del NTS proveniente del útero, llegue a los núcleos paraventricular y supraóptico, para que se libere la ocitocina necesaria para que el trabajo de parto sea normal.

C199

RESPUESTA DEL BULBO OLFATORIO AL ESTIMULO CERVICO-VAGINAL Y DEL NUCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTALAMO. Reyes-Legorreta, C.*, Estrada-Palma, L.V.* y Guevara-Guzmán, R. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. A.P. 70-250, C.P. 04510. México, D.F. MEXICO.

Diversos autores concluyen que el Bulbo Olfatorio (BO) juega un papel muy importante en la conducta materna y en el reconocimiento de las crías. Además la conducta materna puede desencadenarse por estimulación vagino-cervical. Algunos autores han hecho énfasis en la intervención del aprendizaje. También se ha demostrado la intervención del hipotálamo lateral en la conducta materna. Por diversos autores se ha señalado la presencia de oxitocina en BO e hipotálamo, además de otras estructuras, haciendo notar su intervención para desencadenar la conducta materna.

El propósito del presente trabajo es demostrar la vía neural que desde la porción cérvico vaginal se proyecta a través de estructuras centrales, como el hipotálamo, hasta alcanzar el BO.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar hembras vírgenes. Para el registro de la activación eléctrica, las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral a 400 mg/kg. de peso. Se determinó el estado estral mediante frotis vaginales en cada caso.

El registro del BO se hizo con micropipetas de vidrio de 7 a 15 megaohms conteniendo acetato de sodio 2M. Para estimular el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) se utilizó un macroelectrodo monopolar. La estimulación cérvico-vaginal fue externa y por distensión con una sonda de Foley. Se exploró el BO hasta localizar neuronas cuya actividad espontánea fuera evidente. Sólo se estimuló NPV cuando había respuesta en BO a la distensión cérvico-vaginal.

Nuestros resultados muestran que la frecuencia de descarga de las neuronas registradas en BO se incrementa en unos y disminuye en otros ante la distensión cérvico vaginal, dependiendo del área registrada y del estado estral. Estos datos son comparables a lo observado por estimulación del NPV.

Lo observado nos induce a pensar en la presencia de una vía neural desde la porción vagino-cervical, estructuras centrales comprendiendo al NPV, hasta BO, seguramente con intervención de componentes humorales, para desencadenar y sostener la conducta materna, entre otros.