

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA  
METROPOLITANA

---

---

UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Y

UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA  
EN MEDICINA REPRODUCTIVA  
HOSPITAL "LUIS CASTELAZO AYALA"  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS  
RECEPTORES DE MEMBRANA PARA LA HORMONA  
LUTEINIZANTE (LH) Y LA HORMONA FOLICULO  
ESTIMULANTE (FSH) EN TESTICULOS DE  
RATA ADULTA

**T E S I S**

Q U E P R E S E N T A  
**BIOL. EXP. MARIBEL PERDOMO ESQUIVEL**  
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE  
**MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 1997

**El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Andrología de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, del Hospital Luis Castelazo Ayala del I.M.S.S.; el Laboratorio de Hormonas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.; el Laboratorio de Fisiología del CINVESTAV del I.P.N. y el Laboratorio de Mecanismos de Regulación Hormonal de la U.A.M.-I.**

**Mi agradecimiento a la Coordinación de Investigación Médica del IMSS por el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo con la Beca como Auxiliar de Investigación.**

**En lo personal y como representante del grupo de trabajo agradecemos al Dr. Parlow el habernos facilitado las Hormonas de rata altamente purificadas por medio del National Hormone Pituitary Program (NHPP).**

**La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana cuenta con el apoyo del CONACYT, según el Convenio PFPN/66/92, por considerársele un posgrado con nivel de excelencia. Mi total reconocimiento al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización de la maestría, a través de la beca con número 88090.**

## **TUTOR DE TESIS:**

### **M. en B.E. Joaquín Herrera Muñoz**

Investigador Titular A de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva. IMSS.  
Profesor-investigador Titular C de M.T. en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

## **ASESORES DE TESIS:**

### **M. en B.E. Enrique Mendieta Márques**

Profesor-Investigador Titular C Tiempo Completo del Departamento de Ciencias de la Salud.  
UAM-Iztapalapa.

### **Dr. José Artúro Bermúdez**

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del IMSS.

**A las personas olvidadas, a los miembros competentes, quiero mostrar mi gratitud. Ha sido un placer trabajar con ellos. Por último a las personas que han sacrificado su vida social y familiar por haberme dado ánimos cuando más los necesitaba ya que con su apoyo y comprensión hicieron posible llevar a buen termino este trabajo, un agradecimiento especial.**

## **MI FILOSOFIA**

**Opto por no ser un hombre común.**

**Es mi derecho ser un hombre diferente, si puedo.**

**Busco la oportunidad, no la seguridad.**

**Quiero soñar y construir, fracasar y triunfar; nunca ser un número entre aquellas almas tímidas y débiles que no han conocido ni la victoria ni el fracaso.**

**Sé que la felicidad puede llegar solamente del interior a través de trabajo constructivo y duro y del pensamiento positivo y sincero.**

**Sé que los llamados placeres momentáneos no pueden confundirse con un estado de felicidad.**

**Se que puedo obtener una medida de satisfacción interna de cualquier trabajo si lo planeo de manera inteligente y lo ejecuto valientemente.**

**Sé que si pongo cada gota de fuerza que poseo --física, mental y espiritual-- hacia el logro de una tarea valiosa y si caigo extenuado por el camino, la Mano invisible me alcanzará y me levantará.**

**Sí, quiero vivir peligrosamente, planear mi proceder en base a riesgos calculados, resolver los problemas de cada día para tener una paz interior.**

**Sé que, si sé como hacer todo esto, sabré cómo vivir y, si sé cómo vivir, sabré cómo morir.**

**H.B. Zachry.**

## **A MIS PADRES:**

**ELISA ESQUIVEL G.† Y ANTONIO PERDOMO T.**

**En especial a mi madre que siempre cuando estuvo a mi lado me dio su calor y todo su amor y ahora que ya no está a mi lado el dolor es inmenso, pero cada momento recuerdo los consejos que ella me daba y para mi ella siempre será lo mejor que Dios me dio y lo que más me dolió perder.**

## **A MIS HERMANOS Y SOBRINOS:**

**JUAN ANTONIO, IRMA DELIA, PATY, GUS, CARLOS, ELI y a mis queridos sobrinos TOTO, MONTSERRAT, MARIANA, XIMENA, CARLOS DANIEL, e ILEANA .**

**A todos mis profesores que de alguna o de otra manera han hecho de mí, lo que soy ahora, un agradecimiento especial a mi tutor de tesis y a mis asesores, a la maestra Elvira González y a Héctor Serrano por su constante apoyo. A mis amigos más cercanos por darme toda su comprensión y su ayuda incondicional, en especial a Luis Enrique, Gerardo, Lety, Lucy, Marce, Fernando, Jesús, Sergio, Lulú, Victor y a dos personas que han estado a mi lado incondicionalmente en momentos muy difíciles Lupita y Vera.**

**“Si la estructura no nos cuenta algo sobre la función,  
implica que no hemos observado correctamente”**

**Szent-Györgyi.**

**“Hasta lo difícil puede decirse de manera simple,  
pero es difícil.**

**Hasta lo simple puede decirse de forma difícil. Y es fácil.”**

**Soya.**

**“En ocasiones, las líneas de un dibujo corren  
en la dirección opuesta a lo esperado.  
pero sin embargo sigue siendo un dibujo”**

**Karen Blixen**

**“Nuestros hechos deben de ser correctos.**

**Nuestras teorías no necesitan serlo,**

**si nos ayudan a descubrir importantes hechos nuevos”**

**Selye.**

# INDICE

<b>ABSTRAT</b>	<b>A</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>B</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
FISIOLOGIA TESTICULAR	
CELULAS DE LEYDIG	
CELULAS PERITUBULARES	
CELULAS DE SERTOLI	
TRANSDUCCION DE SEÑALES	
SISTEMA DEPENDIENTE DE ADENILATO CICLASA	
SISTEMA DEPENDIENTE DE FOSFOINOSITOL-CALCIO	
MECANISMO DE ACCION DE LH	
MECANISMO DE ACCION DE FSH	
MECANISMOS PARACRINOS DE REGULACION DE LA FUNCION TESTICULAR	
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>20</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>22</b>
OBTENCION DE LAS FRACCIONES TESTICULARES	
PURIFICACION DE LA FRACCION INTERSTICIAL	
PURIFICACION DE LA FRACCION TUBULAR	
EVALUACION DE LA RELACION HORMONA RECEPTOR	
RIA DE AMPc INTRACELULAR	
RIA DE ESTEROIDES	
CUANTIFICACION DEL CALCIO CITOSOLICO	
FORMACION DE FOSFATOS DE INOSITOL	
EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINAS CINASAS	
EFECTO DE PROTEINAS FOSFORILADAS	
<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
RESPUESTA DE LAS CELULAS DE LEYDIG	
RESPUESTA DE LAS CELULAS DE SERTOLI	
<b>DISCUSION</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>CITAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>53</b>

## MEMBRANE RECEPTOR ACTIVITY EVALUATION FOR LUTEINIZING HORMONE AND FOLLICLE STIMULATING HORMONE IN ADULT RAT TESTIS.

The gonadotropins LH and FSH mechanism of action has been established addressed to a membrane adenylate cyclase stimulation, with a consequent increase of cAMP levels; this first stimulation step is mediated by the G protein system. According with the general model, the cyclic nucleotide activates the protein kinase A with a phosphoryl activation-deactivation of enzymes, that result in the specific cellular response. Recent information related to the modification of the intracellular calcium concentrations and the activation of the cAMP-independent protein kinases as second messengers, was reported in correlation with the gonadotropins stimulatory activity; all this data imply an alternative or additive transductional information related to the gonadotropins actions. There are also evidences concerning the Sertoli cells (SC) role in the functional regulation of the Leydig cells (LC), in which this relationship is established through biochemical interactions mediated by substances of diverse nature, as it has been shown by the presence of protein steroidogenic modulator factors in the conditioned media of primary SC cultures. The main purpose of the project is to explore the transductional response of the testicular cells to the presence of gonadotropins, both, through the classical and the alternative routes, as the first step of an evaluating pathway for the mechanism of action of the protein steroidogenic modulator factor, considering the possibility of interactions with different transductional pathways, due to the multiple factor functional response capacity of the compartmental cells.

The approach to reach these objectives needs the use of special reagents and techniques: to evaluate the adenylate cyclase activity it is necessary the use of Forskolin and the cholera and *Pertussis* toxins, with the quantification of cAMP as second messenger. The activity of the phospholipase C will be evidenced by the measurement of the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>); as the effect of this second messenger is directly related to the calcium intracellular levels, it is important to determine the intracellular concentration of this ion. The evaluation of the protein kinases activities will be performed by the electrophoretic isolation of the phosphorylated proteins after the transference of the radioactive phosphate label from ATP. The protein kinase C role will be evaluated by the phorbol myristate role as an activator. The steroidogenic response of the correlative cellular lineages will be measured by specific radioimmunoassays.

## **EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA PARA LH Y FSH EN TESTICULO DE RATA ADULTA NORMAL**

### **R E S U M E N**

El mecanismo de acción de las gonadotropinas LH y FSH ha sido establecido clásicamente como mediado a través de la estimulación de la vía de la Adenilato Ciclasa, con un consecuente incremento en los niveles de AMPc, posterior a la primera etapa que depende del sistema de las proteínas G. De acuerdo al modelo general; los nucleótidos cíclicos activan a las proteínas cinasas A, la modificación de la actividad de las enzimas modificadas por fosforilación resulta en una respuesta celular específica. Reciente información con respecto a las modificaciones intracelulares de las concentraciones de calcio y la activación de proteínas cinasas no dependientes de AMPc se ha reportado en correlación a la actividad estimuladora de las gonadotropinas, todos estos datos suponen vías alternativas o aditivas en la transducción de las señales evocadas por las gonadotropinas, señales que más que de amplificación de las señales, podrían ser de modulación o ser una alternativa a la vía principal de la respuesta de las células blanco. Existen varias evidencias dadas por diversos grupos de trabajo que indican la presencia de factores de naturaleza proteica que son secretados por las células de Sertoli y que regulan la producción de testosterona de las células de Leydig; dichos factores pudieran estar modulando la respuesta final en varios pasos que preceden a la respuesta de la producción de testosterona; pudiendo modificar la transducción de la señal dada por otro u otros factores y el equilibrio de los segundos mensajeros intracelulares. En el caso de las células testiculares, se muestran en este trabajo resultados que indican que existe la activación de mas de una vía en la transducción de la señal para la LH y FSH.



# INTRODUCCION

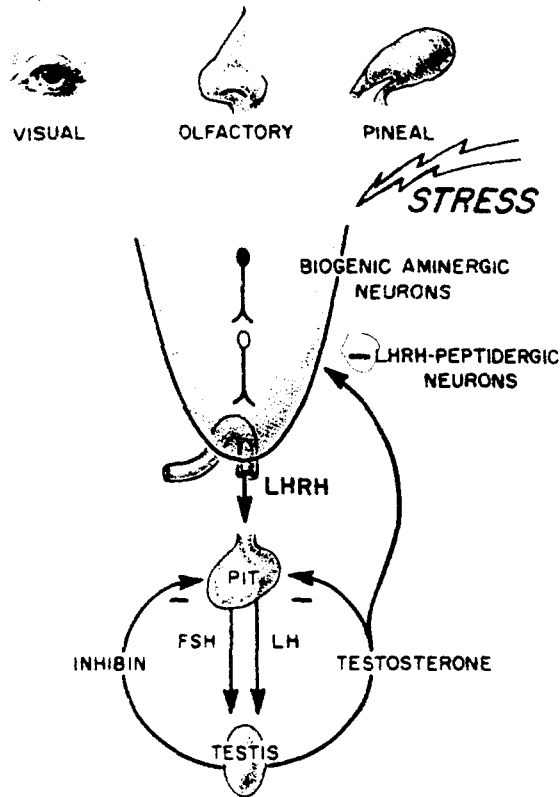
## FISIOLOGIA TESTICULAR

La función testicular se encuentra principalmente controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en donde el hipotálamo funciona como el centro integrador de la información que es recibida de la corteza cerebral y que regula o modula la actividad de las neuronas peptidérgicas hipotalámicas encargadas de la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que a su vez es transportada por el sistema porta-hipofisiario hasta la hipófisis donde se une a receptores de membrana con alta afinidad en la superficie celular de los gonadotropos encargados de sintetizar y secretar las gonadotropinas que viajan por circulación general hasta encontrar su órgano blanco (Wilson y Foster, 1992). Las gonadotropinas liberadas a circulación periférica modulan la actividad de sus células blanco a través de su interacción con receptores membranales específicos que en forma general se dice están ligados al sistema de la Adenilato Ciclasa. Así, las gonadotropinas unidas a sus receptores incrementan la actividad enzimática, y por lo tanto, la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos, como el 3'5'- adenosinmonofosfato cíclico (AMPC), que actúan como segundos mensajeros, lo que a su vez desencadena cambios en los patrones de fosforilación proteica y por tanto, modificaciones en las funciones particulares de cada tipo celular. La hormona luteinizante (LH) estimula la secreción de andrógenos en tanto que la hormona estimulante de los folículos (FSH) induce la maduración y el crecimiento de las células tubulares. El testículo responde endocrinamente a la llegada de las gonadotropinas principalmente con la secreción de testosterona (T), así como la secreción de diferentes péptidos como la inhibina. Estos productos a su vez regulan la secreción de gonadotropinas actuando a través de asas largas de retroalimentación negativa, así por ejemplo, la T puede regular a nivel hipotalámico la liberación del GnRH y a nivel hipofisiario la secreción de las gonadotropinas, en tanto que la inhibina solo actúa a nivel de la hipófisis bloqueando la liberación de la FSH (Robertson y cols, 1993), como se muestra en la Figura 1.

El testículo contiene dos unidades funcionales, un entremallado de túbulos encargados de la producción y del transporte de los espermatozoides hasta el conducto eyaculador y un sistema intersticial que contiene entre otras, células con la maquinaria enzimática necesaria para la producción de hormonas de tipo esteroide. Las dos funciones características del testículo son entonces, por una parte, la síntesis y secreción de andrógenos y por otra la espermatogénesis.(Ewing y Keeney, 1993).

En forma un poco más detallada, en los testículos de un animal adulto los túbulos seminíferos están formados por una gruesa lámina basal que a su vez está rodeada por 3 o 4 capas de células aplanadas, las cuales estudiadas por microscopía electrónica presentan mucha similitud con células de musculatura lisa, (células peritubulares CP). Por dentro de la lámina basal, los túbulos seminíferos se encuentran revestidos por un epitelio estratificado que contiene al menos dos tipos celulares: células de la línea germinal (CG) y células de Sertoli (CS). El compartimiento intersticial se encuentra formado principalmente de tejido

conectivo laxo que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y sanguíneos y unas células poligonales que generalmente se encuentran en cúmulos asociadas a vasos sanguíneos y que representan aproximadamente el 5% del total celular las llamadas células de Leydig (CL)(Ewing y Keeney, 1993).

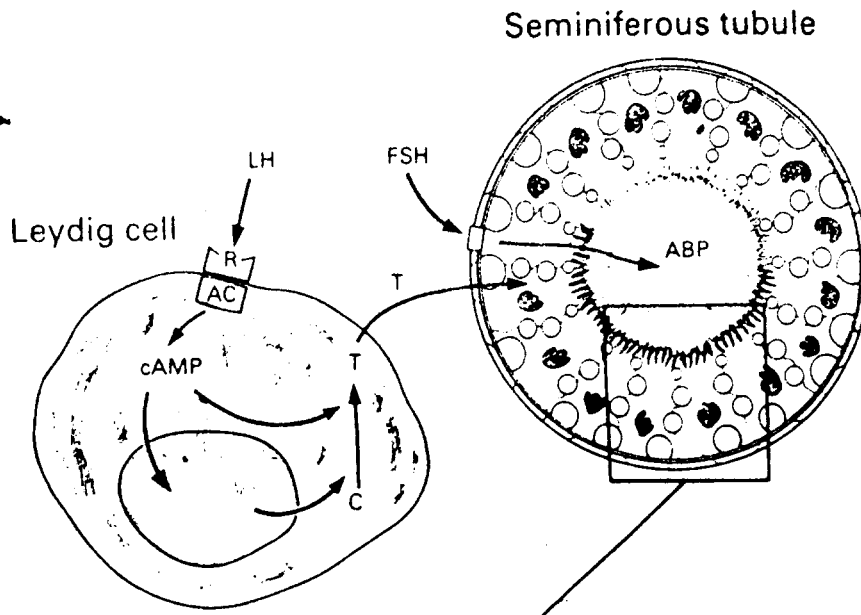


**Figura 1.**

Se muestra las interacciones de los controles por retroalimentación negativa neural y hormonal, la secreción del GnRH de las neurona peptidérgicas esta regulado por factores externos e internos, que regulan la respuesta final e intermedia de los diferentes órganos blanco y a su vez estos regulan positiva o negativamente la actividad a nivel cerebral o sobre la función y secreción de la hipófisis. Tomado de Wilson y Foster 1992.

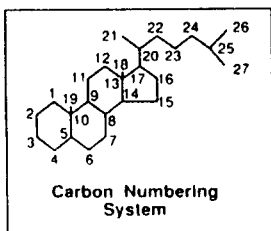
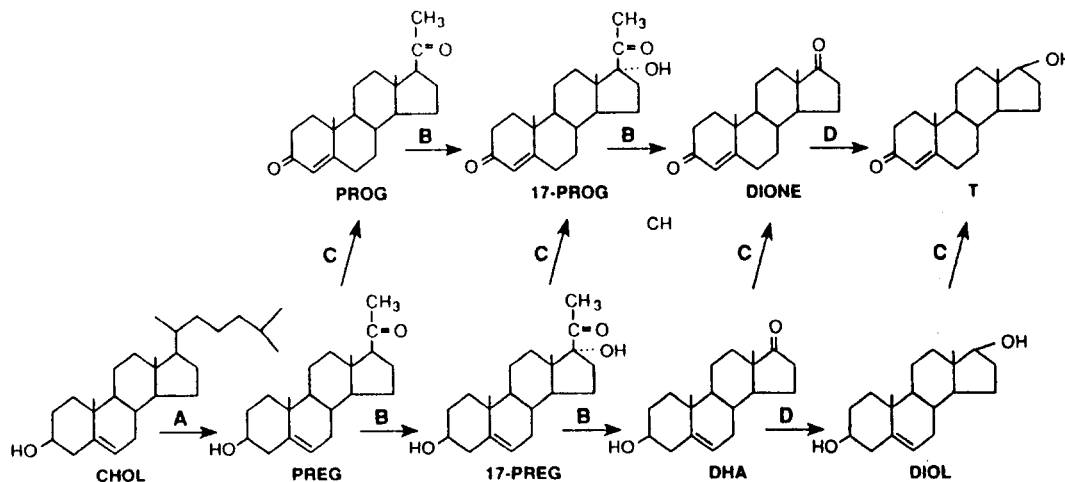
## CELULAS DE LEYDIG

Las CL localizadas en el comportamiento intersticial tienen como función principal la esteroidogénesis; por ello representan la porción endocrina del testículo, ya que sintetizan y secretan T. Después del nacimiento, las CL presentan una regresión hasta convertirse en células parecidas a fibroblastos y permanecen en este estado indiferenciado hasta la pubertad, que implica entre otros fenómenos la aparición de una estimulación gonadotrópica. La CL toma el colesterol y lo transforma en pregnenolona para posteriormente a través de varios pasos enzimáticos transformarla en T, existen dos rutas metabólicas para la formación de la T denominadas  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$  en base a la posición del doble enlace de la mayoría de sus componentes intermedios. ( Huhtaniemi , 1993). Las CL de rata adulta y en el humano adulto normal utilizan preferencialmente la ruta de los intermediarios  $\Delta 4$ .



**FIGURA 2.**

El testículo contiene dos unidades fundamentales, un entramado de túbulos encargados de la producción y el transporte de los espermatozoides hasta el conducto eyaculator y un sistema intersticial que contiene entre otras, células con la maquinaria enzimática necesaria para la producción de esteroides. Las dos funciones características del testículo son entonces, por una parte la síntesis y secreción de andrógenos y por otra la espermatogénesis. Tomado de Herrera y cols, 1988.



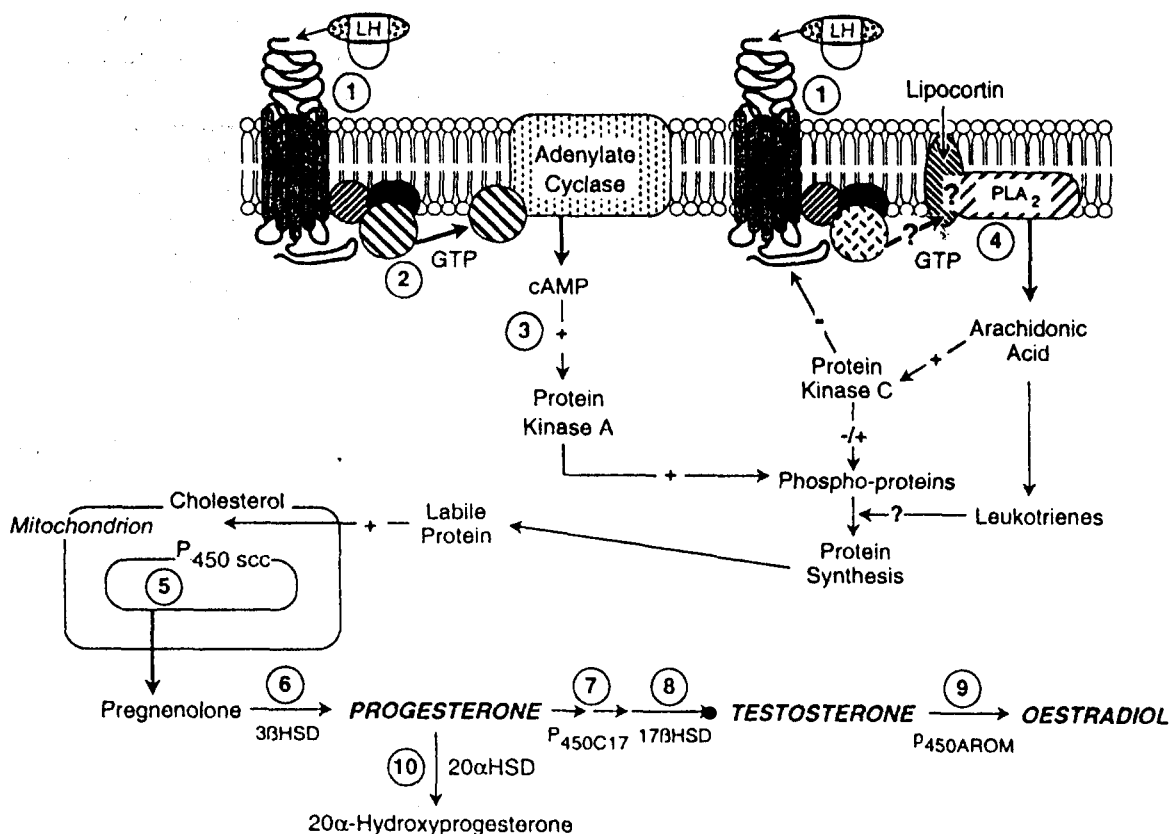
Steroidogenic Enzymes	Abbreviation	Cofactors	Location
A Cholesterol side-chain cleavage enzyme	P450 <sub>scc</sub>	NADPH	Mitochondrial inner membrane
B 17 $\alpha$ -hydroxylase / C17-20 lyase	P450 <sub>17<math>\alpha</math></sub>	NADPH	Smooth endoplasmic reticulum
C 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase / $\Delta$ 5-4 isomerase	3 $\beta$ HSD	NAD <sup>+</sup>	Smooth endoplasmic reticulum
D 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase	17 $\beta$ HSD	NADP <sup>+</sup>	Smooth endoplasmic reticulum

Chubo-41127a-MOB 11-88

**Figura 3.**

La ruta metabólica que la CL utiliza tomando colesterol y transformándolo en pregnenolona para posteriormente llevarlo hasta testosterona, puede seguir dos vías  $\Delta$  4 y  $\Delta$  5, de acuerdo a la posición del doble enlace de la mayoría de sus componentes intermedios. Tomado de Huhtaniemi I, 1993.

Está demostrado que la LH se une a las CL a través de receptores membranales específicos (Catt y col, 1974), presentando elevadas constantes de afinidad y un número limitado de sitios de unión. Estas proteínas receptoras son capaces de incrementar los niveles intracelulares de AMPc, activar la función de la proteína cinasa A e incrementar la tasa de fosforilación de cuando menos 6 proteínas específicas, que presumiblemente tendrían un papel importante en la regulación de la esteroidogénesis. Se acepta que el AMPc es el principal factor que media la transducción de la señal evocada por LH, pero investigaciones recientes han mostrado que otros tipos de segundos mensajeros pudieran intervenir en la regulación de las funciones celulares. De igual forma la síntesis de AMPc se encuentra bajo control dual de proteínas G estimuladoras (Gs), e inhibitorias (Gi), a su vez controladas por estímulos extracelulares diversos que serían, en última instancia, conjuntamente responsables a nivel gonadal de la estimulación de las funciones celulares (Gilman, 1984).



**Figura 4.**

Se ha sugerido que el AMPc pudiera ser el mensajero mas importante en respuesta a las gonadotropinas, pero sin embargo varias investigaciones sugieren que varias vías conocidas hasta ahora pudieran estar interconectadas y que en última instancia influir sobre la síntesis de proteínas que pudieran estar implicadas en la regulación de la vía esteroidogénica. Tomado de Reichert y cols., 1989.

La acción a nivel fisiológico de las gonadotropinas que regulan al testículo ha sido ampliamente estudiada así, la LH estimula la síntesis de andrógenos en CL del testículo de rata, generalmente del resultado de la activación del receptor para la LH y la formación de AMPc (Dufau, 1988). La mejor evidencia del papel de la vía de AMPc es la capacidad exhibida de los análogos de AMPc para estimular la secreción de andrógenos, así como también el generar incrementos en andrógenos cuando la Adenilato Ciclasa es activada tanto por la toxina de Cólera (Dufau, 1975) como por la forskolina (Moger y Anawker, 1983), pero el papel del AMPc como único mensajero ha cambiado, basándose en la incapacidad para detectar incrementos en los niveles de AMPc en respuesta a bajas concentraciones de LH, no obstante que estas concentraciones sean claramente efectivas para incrementar la secreción de andrógenos (Choi y Cooke, 1991).

### **CELULAS PERITUBULARES**

Se cree que las CP son las responsables de la estabilidad estructural y de las contracciones rítmicas que se observan en el túbulo seminífero, además son las responsables de la formación del primer paso limitante de la barrera hemato-testicular (Fawcett, 1989). En el caso del humano, el complejo peritubular se extiende desde la lamina basal del túbulo hacia el tejido circundante y consiste de dos capas de colágenas y células mioideas entre las cuales pueden encontrarse capas delgadas de miofibrillas y material semejante al de la lámina basal. En casos de infertilidad masculina se ha observado cierta desorganización de la estructura peritubular, detectable mediante cortes histológicos seriados, (Dekretser y cols, 1975). aunque esto no se ha establecido como una causa segura de infertilidad.

### **CELULAS DE SERTOLI**

Las CS son al principio de la vida de los mamíferos, células cilíndricas que se extienden desde la lámina basal hasta la superficie luminal, pero una vez que se establece la pubertad, las CS emiten una serie de prolongaciones citoplásmicas apicales y laterales generando interdigitaciones y terminando por el establecimiento de uniones estrechas entre CS vecinas. Presentan un núcleo oval y surcado localizado generalmente en la parte basal de la célula, el cual contiene un gran nucleolo, también presentan gran cantidad de retículo endoplásmico liso y retículo endoplásmico rugoso, así como de lisosomas seguramente relacionados con su función fagocitaria. El citoplasma de las CS se encuentra polarizado, localizándose la mayor parte de los organelos en la porción basal. Las funciones principales de las CS son: el soporte estructural del epitelio seminífero, la formación de la barrera hemato-testicular y la secreción de múltiples factores de importancia tanto en la regulación y nutrición de las CG, como en la regulación paracrina de otros componentes testiculares. (Skinner 1991)

La barrera hemato-testicular tiene como función el mantenimiento de un gradiente adecuado de iones, moléculas pequeñas y proteínas entre la sangre y el fluido tubular; estas uniones estrechas entre las CS, dividen al epitelio germinal en el compartimiento basal que contiene a las espermatogonias y la zona proximal de las CS y el compartimiento adluminal en el que se encuentran los espermatocitos, las espermátidas y los espermatozoides; cada compartimiento tiene un microambiente único y necesario para que se desarrolle la espermatogénesis. Las CS secretan una gran cantidad de componentes que mantienen un microambiente adecuado para la espermatogénesis y que proveen un mecanismo de señalización entre los distintos tipos celulares que componen el testículo. Aproximadamente 300 proteínas se han detectado que son secretadas por las CS, muchas de ellas son tejido específicas y algunas otras son componentes también del suero ( Skinner 1991).

Como ya se ha mencionado, las CS son el principal elemento secretor del túbulo seminífero y proveen entre otras cosas, elementos nutritivos necesarios para las CG en transformación (Sharpe y cols, 1992); dentro de los múltiples compuestos que secretan algunos pueden formar parte del líquido seminal, tal es el caso de algunos oligopéptidos, esteroides y proteínas, dentro de estas últimas la primera identificada como producto de secreción de las CS es la proteína unidora de andrógenos (ABP) (Wayne, 1988); el 80% de la ABP es secretada hacia el lumen del túbulo seminífero y sólo un 20% hacia la sangre, mostrándose así una secreción polarizada de esta proteína. La función de la ABP fuera del túbulo no es del todo clara pero se cree que une a la T que llega del compartimiento intersticial y la transporta hacia el túbulo manteniendo concentraciones de andrógenos característicamente elevadas, necesarias para la maduración y diferenciación de las CG. Se ha demostrado que el hígado de animales inmaduros pueden sintetizar proteínas unidoras de esteroides muy parecidas a la ABP, pero cuando se hace una caracterización más fina de estas proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodesil sulfato de sodio (PAGE-SDS) se muestra que son proteínas diferentes. Además de las proteínas específicas como la ABP o la inhibina, las CS secretan varias proteínas que han sido previamente identificadas en suero o que son sintetizadas por otros tipos celulares tales como la transferrina, ceruloplasmina, activador de plasminógeno y otras (Sharpe y cols, 1992).

Esta síntesis y secreción de las CS puede ser diferencial en cuanto a concentraciones, de forma tal que un componente sea secretado en bajas concentraciones no quiere decir de ningún modo que su función no sea importante; de hecho, esta secreción diferencial puede ayudar a explicar las funciones de los diferentes productos secretados con respecto a sus niveles de producción. Los péptidos o proteínas secretadas en bajas concentraciones pueden estar involucradas preferentemente en acciones locales de tipo paracrino o autocrino, mientras que los productos secretados en cantidades mayores pueden actuar a mayores distancias como parte de la regulación endocrina (Sharpe y cols, 1992).

Por la información antes presentada, se puede definir que la función testicular en general está regulada por varios factores Intra y extratesticulares, sin embargo, la naturaleza y el mecanismo de acción de los elementos responsables de modular las funciones

testiculares endocrinas y reproductivas, aun no son bien conocidos, debiéndose dirigir las investigaciones a tratar de resolver los interrogantes existentes. Dentro de esta variedad de elementos reguladores cabe profundizar sobre los mecanismos de acción, principalmente de las hormonas hipofisarias, como ejemplo de los elementos de control extratesticular (Mather y cols., 1983; Rommerts y cols. 1987). Como fue mencionado, la secreción hipofisaria de las gonadotropinas depende directamente de la estimulación de la hormona liberadora hipotalámica sobre los gonadotropos y la cantidad de ésta secreción al sistema, depende de señales reguladoras recibidas en sitios específicos tanto a nivel hipotalámico en núcleo supraóptico, como localmente en la hipófisis, a modo de un mecanismo de retroalimentación negativa con hormonas esteroides y a otros factores relacionados como la inhibina (Robertson y cols, 1993).

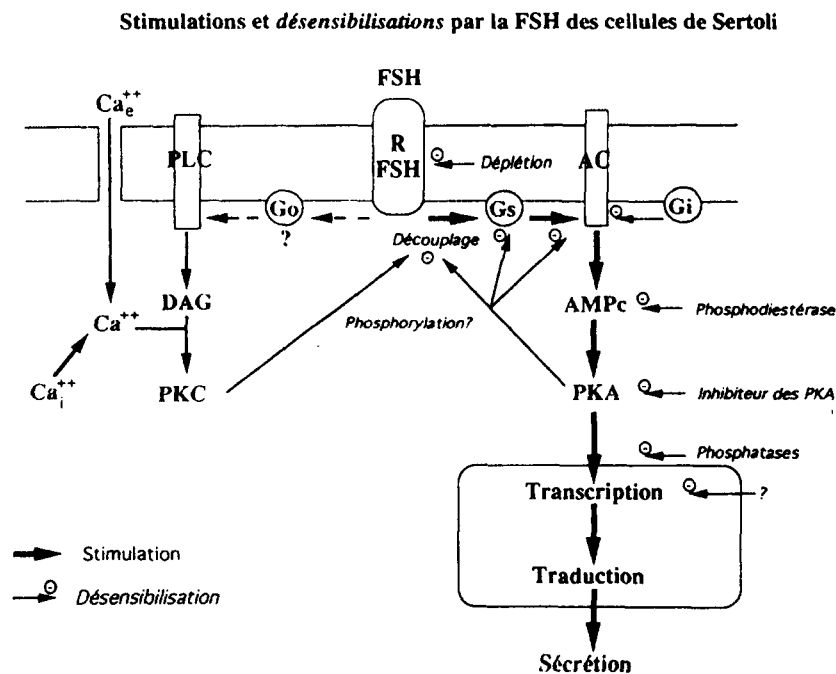
Para explicar la regulación testicular por factores intra y extra gonadales, habría que considerar que existen tres estrategias generales para la comunicación entre células 1) comunicación a distancia mediante moléculas secretadas, 2) comunicación por contacto mediante moléculas unidas a la membrana plasmática y 3) comunicación por contacto a través de uniones *gap*. Aquí solo consideraremos la primera forma en donde la célula blanco posee, en su membrana, proteínas que reconocen e interaccionan específicamente con la molécula mensaje. Este tipo de comunicación es también denominada comunicación química. La serie de fenómenos que se desarrollan en la célula blanco desde la unión hormona-receptor hasta el efecto final constituye la acción hormonal, que puede ser dividida en dos etapas fundamentales: 1.- la transducción de la señal, que comprende desde la unión hormona-receptor hasta la generación de los mensajeros intracelulares y 2.- la propagación de la señal que se inicia con la generación de los segundos mensajeros y que culmina con la respuesta final de la célula blanco (Eberhard y Holz, 1988).

## TRANSDUCCION DE SEÑALES

En los últimos años se han realizado avances importantes en la comprensión de los fenómenos de la comunicación celular, pero falta definir con mucho mayor precisión las bases moleculares de la comunicación química. Entre los sistemas de transducción que se conocen en la actualidad, se destacan tres: el de la Adenilato Ciclasa, el de la GMPc fosfodiesterasa y el sistema de los fosfoinosítidos-Calcio ( $IP_3$  - $Ca^{2+}$ ). En los tres casos el receptor de la membrana se halla relacionado funcionalmente al sistema transductor por un sistema de varias proteínas membranales capaces de unir nucleótidos de guanina.

Las moléculas mensaje o también llamadas de señalización, como las hormonas-proteicas, se unen a proteínas receptoras específicas existentes en la superficie membranal externa de las células sobre las que actúan. Estos receptores, unen al ligando externo con gran afinidad y transforman este acontecimiento en una señal intracelular que modifica las funciones celulares (Reichert y Dattatreymurty, 1989). Utilizando ligandos marcados ya sea con átomos radiactivos, con colorantes fluorescentes o con moléculas electrodensas como la

ferritina, es posible estudiar el número, distribución y propiedades de los receptores en la superficie celular, así como también seguir el destino de los complejos ligando-receptor después de la unión. De esta forma se ha demostrado que el número de receptores por célula para un ligando específico puede variar desde 500 hasta 10,000 y que la distribución inicial de esos receptores puede ser difusa o bien estar localizada en regiones determinadas de la membrana (Andreoli y cols., 1987). Al parecer, la gran mayoría de los receptores que unen moléculas de señalización tienen un cambio conformacional cuando se unen al ligando en el exterior de la célula, este cambio conduce a la formación de una señal intramembranal que finalmente activa o inhibe a una enzima ligada a la membrana por ejemplo la Adenilato Ciclasa, misma que cataliza del lado citoplásmico de la membrana la síntesis del segundo mensajero AMPc; que a su vez desencadena una serie de eventos de activación enzimática. Algunos de los receptores de la superficie celular al unirse a su ligando específico pueden también abrir o cerrar directamente canales iónicos lo cual genera una señal de alguno de estos dos mecanismos: 1.- provocando un flujo reducido y transitorio de iones, que altera brevemente el voltaje a través de la membrana o 2.- mediante un importante flujo de iones desde o hacia el citosol (Alberts y cols. 1989).



**Figura 5.**

Componentes de la vía de transducción de la señal evocada por FSH para las CS, donde se ven los componentes en la cascada de la señal. Tomado de V Laurent-Cadoret y Guillou, 1995.

Los receptores de membrana activados no estimulan directamente la Adenilato Ciclasa sino que ambos están acoplados a través de un tercer tipo de proteínas de membrana, aquellas que unen nucleótidos de guanosina como GTP llamadas en conjunto proteínas G. La activación de estas proteínas por los receptores debe persistir únicamente mientras se halla presente el ligando para que las células sean capaces de responder a los



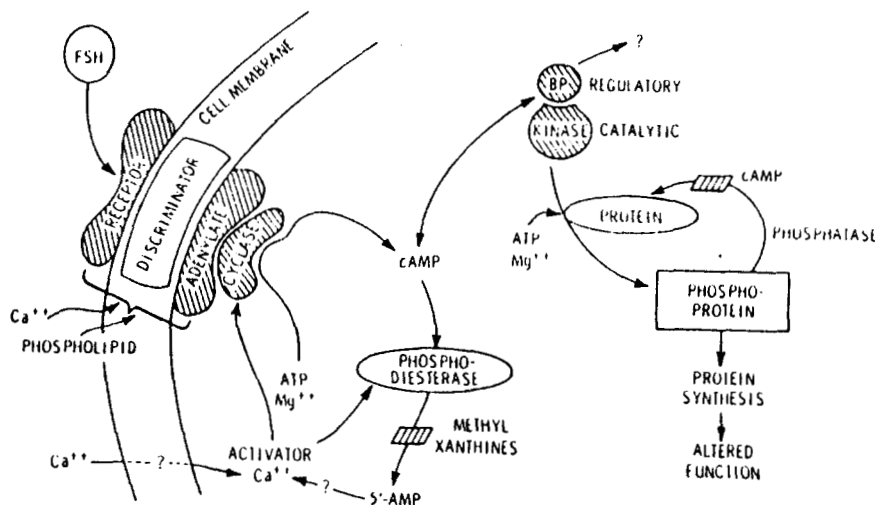
cambios de los niveles hormonales externos. Este tipo de respuesta está asegurado porque el sistema de las proteínas G tienen actividad de una GTPasa que se autoinactiva al hidrolizar el GTP unido, formando GDP y Pi. Si se utilizan análogos de GTP en los que el fosfato terminal no pueda ser hidrolizado, la activación de la Adenilato Ciclasa se incrementa y prolonga notablemente (Alberts y cols., 1989). La síntesis de AMPc se encuentra bajo un control dual de proteína G estimuladoras (Gs) e inhibitorias (Gi), las que a su vez son controladas por estímulos extracelulares diversos, que serían en última instancia, conjuntamente responsables a nivel gonadal de la estimulación de las funciones celulares (Gilman, 1984).

El estudio detallado de estos fenómenos intramembranales ha sido posible con el uso de "reactivos" especiales como la toxina de cólera (TC) que cataliza la transferencia de ADP-ribosa, desde el NAD<sup>+</sup> hasta la proteína G alterándola de tal modo que ya no puede hidrolizar el GTP que lleva unido. Esto significa que cuando la Adenilato Ciclasa ha sido activada por el complejo hormona-receptor y con la proteína G modificada de esta forma por la toxina de cólera, permanece irreversiblemente en estado activo, es decir, la toxina de cólera se une a las proteínas G estimuladoras (Dattatreya Murty y cols., 1986). De manera análoga, la toxina de pertusis (TP) actúa a nivel de las proteínas G inhibitorias manteniendo el sistema permanentemente inhibido. De esta manera, con sistemas activadores o inhibidores se propone que se regula la respuesta hormonal en un gran número de tejidos (Warrent, 1989). Otro de estos "reactivos" especiales, la forskolina, estimula directamente la actividad de la Adenilato Ciclasa, adelantándose a los pasos de la formación del complejo hormona receptor y de la activación de proteínas Gs (Kew y cols., 1986). Así este modelo de transducción de información se ha explorado en un gran número de células que responden a un estímulo extracelular, aunque en el caso del testículo se tiene poca información al respecto.

#### **SISTEMA DEPENDIENTE DE LA ADENILATO CICLASA.**

La Adenilato Ciclasa es la encargada de catalizar la formación del AMPc, como el más importante segundo mensajero intracelular en casi todas las células animales. Muchos de los efectos bioquímicos y fisiológicos son mediados a través de proteínas cinasas dependientes de AMPc; además el AMPc puede directamente modular la activación de algunos canales iónicos. El AMPc participa en una gran variedad de procesos fisiológicos a nivel bioquímico incluyendo el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Ahora, si bien es cierto que la Adenilato Ciclasa puede regular la activación o la inhibición de receptores acoplados a su subunidad catalítica a través de las proteínas G, el calcio intracelular también modula la actividad de la Adenilato Ciclasa en diversos tejidos y son justamente las Adenilato Ciclasas sensibles a calcio las que proveen del mecanismo llamado "cross-talk" o entrecruzamiento de vías entre los sistemas de transducción del calcio y el del AMPc (Rodbell y cols.; 1983). Además la Adenilato Ciclasa puede ser también regulada por la PKC, PKA y CAM- cinasas. Evidencias recientes también sugieren que

muchos órganos pueden expresar Adenilato Ciclasas sensibles a voltaje (Katada y cols; 1987). En muchos casos la Adenilato Ciclasa puede funcionar como un componente integrador de la señal y responder sinérgicamente a múltiples señales intracelulares y extracelulares.



**Figura 6.**

La adenilato ciclasa puede regular la activación o la inhibición de los receptores acoplados a su subunidad catalítica a través del sistema de proteínas G, el calcio intracelular también puede regular la activación de otros sistemas implicados en las respuestas finales de cada tipo celular. Tomado de Hofman y cols 1990.

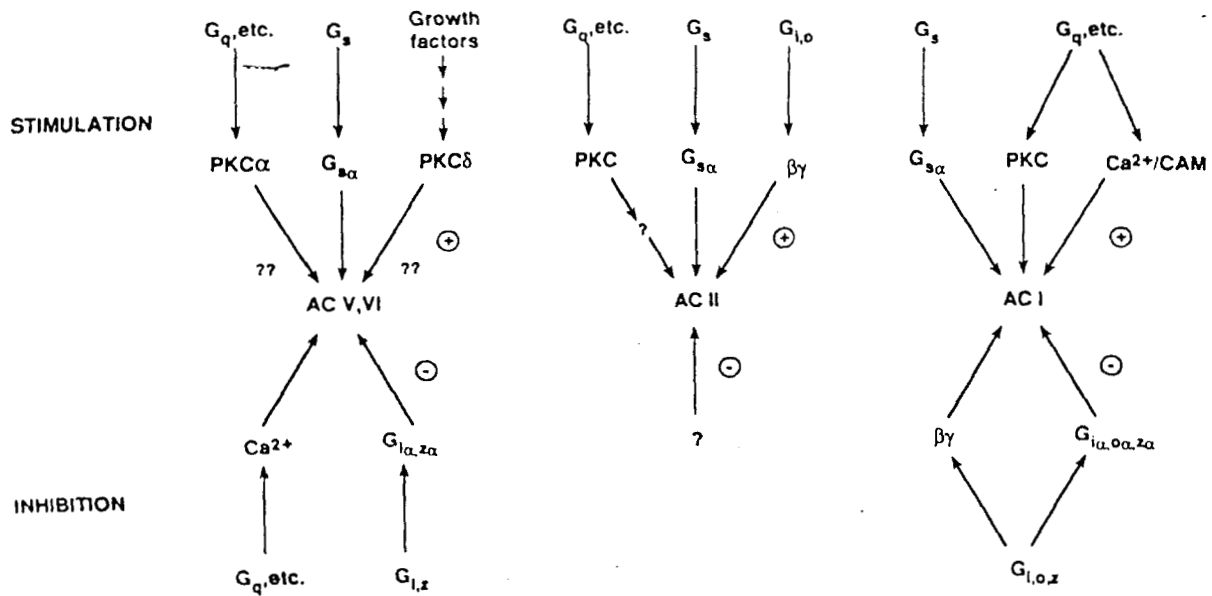
Como se mencionó la activación de la Adenilato Ciclasa es a través de la activación de receptores por mensajeros extracelulares como hormonas o neurotransmisores y requiere de la participación de GTP ya que es mediada por las proteínas unidoras de GTP. Cassel y Selinger (1986) originalmente proponen que el sistema de Adenilato Ciclasa que se encuentra en forma inactiva y que la actividad de GTPasa del complejo de proteínas G es la que activa a la enzima. Los receptores que unen ligandos estimuladores están acoplados a la Adenilato Ciclasa a través de proteínas Gs, que consisten de una subunidad  $\alpha$  que une GTP y un complejo  $\beta\gamma$  el cual se disocia de la subunidad  $\alpha$  cuando ésta lleva unido al GTP. La afinidad del GDP ligado a la subunidad  $\alpha$  es ampliamente incrementada cuando el complejo  $\beta\gamma$  está asociado con la subunidad  $\alpha$ . El complejo  $\beta\gamma$  inhibe la actividad estimuladora de la  $Gs\alpha$  y la hidrólisis del GTP unido; además recientes investigaciones sugieren que los diferentes componentes de las proteínas G, pueden modular la activación o la inhibición de algunos tipos de Adenilato Ciclasa como se indica en la figura del cross talking además de que la actividad de esta enzima puede ser regulada por otras proteínas clave en las vías de transducción a través del entrecruzamiento de las vías de transducción (Jacobowitz y cols, 1993; Katada y cols, 1987; Rodbell y cols, 1983).

Una comparación de la sensibilidad de los diferentes tipos de Adenilato Ciclasa hacia el complejo  $\beta\gamma$  indican que estas enzimas son diferencialmente reguladas. Por ejemplo, la Adenilato Ciclasa tipo 1 es inhibida por  $\beta\gamma$  mientras que el tipo II y IV son estimuladas y la tipo I puede ser estimulada por el complejo  $Gs\alpha$  o por CAM.

Los receptores para los que el AMPc es el mensajero intracelular actúan modificando la actividad de proteína cinasas, que por medio de fosforilación específica activan o inactivan determinadas enzimas. Entre las enzimas que se activan esta la fosfodiesterasa que disminuye los niveles activos de AMPc con consecuencias aparentemente contradictorias, sin embargo, es necesaria la degradación rápida y continua de cualquier mediador intracelular para poder obtener un rápido incremento o una pronta disminución de la concentración de un determinado metabolito y de esta manera regular esa función que pudiera ser reconocida como la respuesta celular específica (Andreoli y cols., 1987).

### **SISTEMA DEPENDIENTE DE FOSFOINOSITOLES-CALCIO**

Es ampliamente aceptado que muchas hormonas de naturaleza proteica pueden ejercer sus efectos biológicos a través de la estimulación de la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ( $PIP_2$ ), que produce inositol trifosfato ( $IP_3$ ), encargado entre otras cosas de la movilización del calcio a partir de sus fuentes intracelulares y/o de la modificación de los flujos transmembranales, además diacilglicerol (DAG), que activa a la Proteína Cinasa C (PKC) (Berridge, 1987). Existen evidencias indirectas de que la Fosfolipasa C (PLC) que cataliza la hidrólisis del  $PIP_2$  está regulada por una proteína específica que une nucleótidos de guanosina (Proteína G), activada a su vez por la estimulación a nivel membranal (Exon y cols, 1991). Otras variables que afectan la actividad celular incluyen la formación de complejos de Calcio-Calmodulina y la unión de una gran variedad de factores de naturaleza hormonal que cuentan con receptores específicos de membrana, tales como algunos factores de crecimiento (Hall y Frensh, 1990).



**Figura 8.**

Cross-talk o entrecruzamiento de vías entre los sistemas de transducción de calcio y AMPc. La adenilato ciclas puede regular la activación o la inhibición de receptores acoplados al sistema de proteínas G y son justamente las ciclasas sensibles a calcio las que proveen del entrecruzamiento, además de estar reguladas por PKC, PKA y CAM. Tomado de rodbell y cols 1983.

Existen a la fecha dos grandes modelos para explicar las oscilaciones en las concentraciones de calcio, divididos a su vez cada uno en dos submodelos (Berridge y Galione, 1987). Un primer modelo pretende explicar las oscilaciones en las concentraciones del ion por la formación permanente del  $IP_3$ , sugiriendo que el receptor controla las oscilaciones y el segundo propone que las oscilaciones se deben a la presencia constante del segundo mensajero.

Los submodelos se refieren al mecanismo de regulación (retroalimentación positiva o negativa). El modelo del oscilador controlado por el receptor, en su modo controlado por retroalimentación negativa, postula que una vez iniciada la activación del receptor se generan por activación de la PLC los segundos mensajeros:  $IP_3$  y DAG; este último a su vez activa a la PKC la cual fosforila reversiblemente a la proteína G responsable de la estimulación de la PLC, lo que inhibiría la formación de los segundos mensajeros. Este mismo modelo pero operando por retroalimentación positiva, sugiere que el agonista produce un incremento inicial de  $IP_3$ . Este mecanismo se autolimita cuando la señal de calcio declina por salida del ion en el reticulo endoplásmico y otros reservorios como la mitocondria.

El modelo de oscilador controlado por el segundo mensajero a través de un mecanismo de retroalimentación negativa propone que la acción del  $IP_3$  libera el calcio para iniciar las oscilaciones; el incremento progresivo origina la inhibición de su propia liberación. Esta inhibición se suspende cuando el calcio es recapturado y enviado a los reservorios internos, permitiendo que el  $IP_3$  inicie la oscilación. Cuando opera por mecanismo de retroalimentación positiva, se propone que el calcio induce su propia liberación. El  $IP_3$  libera al calcio de los reservorios sensibles a  $IP_3$ , este incremento inicial es el estímulo para la liberación del ion de reservorios no sensibles a  $IP_3$ , además de que la entrada simultánea de

calcio exterior a la célula es un evento que colabora a incrementar las concentraciones citosólicas del ion. El aumento gradual de las concentraciones de calcio precede a la iniciación de las ondas. Posteriormente, ocurre la captura del calcio por los reservorios citosólicos y el descenso en su concentración representa el estímulo para su liberación.

Por otro lado, al utilizar concentraciones elevadas de calcio en forma intermitente disminuye el tiempo y el área de exposición a los efectos tóxicos del ion y se concilian dos eventos: la inevitable elevación de las concentraciones del ion por estímulo hormonal y la necesidad de mantener bajas las concentraciones de calcio durante la mayor parte del tiempo para la protección de la célula. El hecho de que las ondas de calcio tengan una orientación espacial, inmediatamente sugiere que debe de existir una compleja estructura celular que permita esta forma de autopropagación. Probablemente esta orientación espacial tenga importancia en la regulación de ciertas funciones metabólicas asimétricas de la célula. (Rooney y cols, 1990).

Cuando las oscilaciones en las concentraciones de calcio son consecuencia del estímulo de agentes movilizadores de calcio (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento) es decir, de agentes que actúan a través del sistema  $IP_3 / Ca^{2+}$ , la detección de las ondas de calcio citosólico puede hacerse a través de métodos directos como la colocación de un microelectrodo o con sustancias fluorescentes como el quelante Fura 2 AM y la proteína Aquorina, o bien, con métodos indirectos, en donde se registran eventos celulares dependientes de calcio (Berridge y Galione, 1987).

Mucha de la información disponible a nivel fisiológico sobre la biosíntesis de hormonas esteroides y su control por gonadotropinas y otros reguladores de la función del testículo, son eventos que se conocen con detalle, pero los eventos que siguen a la ocupación del receptor no son del todo claros. El papel del AMPc en la biosíntesis de esteroides es claramente aceptado, sin embargo existen evidencias que indican que sumado al efecto del AMPc, se encuentran cambios en las concentraciones de calcio, que son resultado de alteraciones en el metabolismo de los fosfatos de inositol (Peter y cols; 1989).

## **MECANISMO DE ACCION DE LA LH**

Nizhizuka y cols (1986) sugieren la posibilidad de que la LH puede estimular la formación de segundos mensajeros por dos vías que aparentemente son independientes, uno a través de la activación de la Adenilato Ciclasa y la otra es la de la hidrólisis de los inositoles fosfato, por ejemplo, células de la granulosa tratadas con la gonadotropina incrementan la incorporación de  $^{32}PO_4$  y  $^3H$  Inositol dentro de los fosfoinosítidos (Davis y cols, 1992), la gonadotropina es capaz de incrementar la acumulación de los inositoles fosfato.

Estos estudios indican que en células de la granulosa la LH, pero no la FSH, GnRH o AMPc, estimulan la acumulación de los inosítoles fosfato (IP). Concentraciones de 0.01  $\mu$ g LH/ ml. sólo incrementan al IP<sub>3</sub>, que aparentemente podría ser más sensible a la estimulación con LH, es decir, a concentraciones de 0.01  $\mu$ g solo se incrementa la acumulación de IP<sub>3</sub>. Estos hallazgos son consistentes con estudios que sugieren que justamente el IP<sub>3</sub> puede ser el segundo mensajero presente en las células de la granulosa, posiblemente actuando en la movilización del Ca<sup>2+</sup>, además de sugerirse que el calcio está involucrado en la esteroidogénesis de la célula de la granulosa.

Es generalmente aceptado que el IP<sub>3</sub> es el resultado fisiológico de la hidrólisis del IP<sub>2</sub> o fosfatidilinosítoles (IP<sub>2</sub>) (Wilson y cols, 1985). Se asume que en el caso del ovario, los relativamente altos IP radiomarcados después de la estimulación con LH sugieren dos posibilidades: 1) Que la acumulación de IP puede ser un reflejo de la acumulación de IP<sub>2</sub> e indirectamente del IP<sub>3</sub> ó 2) Que la generación de IP puede ser un indicador de la generación de DAG con la concomitante producción de IP<sub>3</sub>. Se puede argumentar que la estimulación del metabolismo de los fosfoinosítoles por parte de la LH, puede resultar en la generación de dos segundos mensajeros (DAG e IP<sub>3</sub>) que pueden variar cuantitativamente y temporalmente. Estos estudios son consistentes con la hipótesis de que la LH en algunos órganos blanco puede actuar por otros mecanismos diferentes a los de la vía de activación de la Adenilato Ciclasa.

Además se ha demostrado que el IP<sub>3</sub> es fosforilado por una cinasa para formar inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (IP<sub>4</sub>), el cual se ha involucrado en la entrada de calcio a la célula. El calcio así liberado es un factor de acoplamiento muy importante que activa múltiples enzimas y proteínas cinasas en forma directa o a través del complejo calcio-calmodulina. (Peter y cols; 1989)

No obstante la reciente y creciente información respecto a que las hormonas gonadotrópicas pueden inducir la activación de la FLC haciendo así, que emerjan como un nuevo al menos y el mejor mecanismo, según algunos autores, de formación de segundos mensajeros por la acción hormonal. Otros grupos de investigación han postulado que: las hormonas que utilizan al AMPc como el mediador intracelular, parecen no incrementar los niveles de los segundos mensajeros producto de la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> o la movilización de calcio. (Berridge y cols, 1987, Nekhal y cols, 1984, Monaco y cols, 1988).

El AMPc es reconocido como el segundo mensajero de la acción de muchas hormonas, pero otros estudios han demostrado que el calcio puede modular la acción estimuladora de la LH y la síntesis de AMPc y de progesterona. Los requerimientos de calcio para la acción de la LH sobre la estimulación de la esteroidogénesis ya han sido establecidos, pero lo que no se conoce es la forma en que la LH modula los niveles del Calcio. En el presente trabajo se ha tratado de examinar el efecto de la LH sobre el metabolismo de los inosítoles fosfato en células testiculares aisladas. Además se ha tratado

de correlacionar el incremento en  $IP_3$  por la acción estimuladora de la LH con incrementos en los niveles de Calcio determinado por fluorescencia con Fura 2AM.

### **MECANISMO DE ACCION DE LA FSH**

La FSH juega un papel central en la regulación de las CS y el mantenimiento de su función normal en animales adultos. La unión de FSH a su receptor específico activa el sistema de Adenilato Ciclasa provocando que se activen proteínas cinasas dependientes de AMPc, desencadenando una cascada de eventos de fosforilación proteica (Kew y cols., 1986). Posiblemente al igual que en el caso de la regulación de las CL, la activación de la Adenilato Ciclasa de la CS está mediada por proteínas Gs y Gi, así resulta estimulada tanto la actividad de la RNA Polimerasa como la síntesis de la proteína unidora de andrógenos (ABP) y de transferrina (Nekhla, 1984; Skinner, 1991; Wright, 1983; Papadopoulos, 1986).

La FSH induce la acumulación de AMPc y contiene proteínas G en sus membranas, que posiblemente pudieran activar canales de calcio directamente o indirectamente de la fosforilación de sus proteínas vía la subunidad catalítica de la PKA dependiente de AMPc.

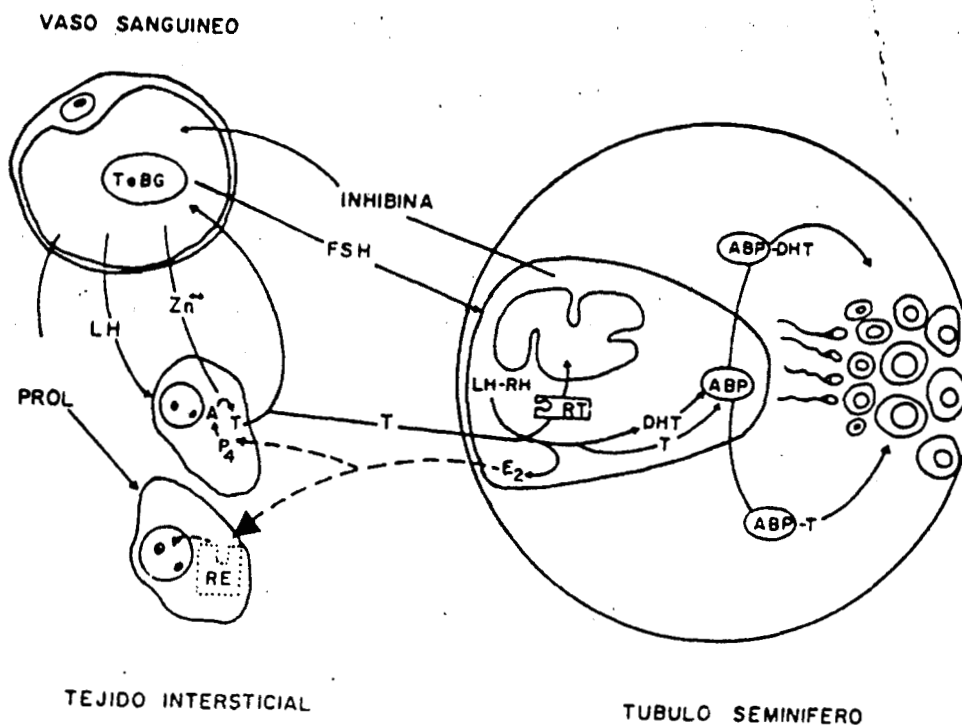
### **MECANISMO PARACRINOS DE REGULACION DE LA FUNCION TESTICULAR**

Existen evidencias cada vez más concluyentes de que la regulación sutil de las funciones testiculares puede ocurrir en forma local a través de interacciones de tipo paracrino y autocrino, mismas que involucran tanto contactos intercelulares, como también interacciones mediadas a través de factores de naturaleza diversa (Saez, 1987; Skinner, 1991). De esta forma, las hormonas hipofisarias proporcionarían el estímulo basal del cual dependen, en primera instancia, el funcionamiento testicular, mientras que la regulación fina del tiempo y de la intensidad de la respuesta de cada una de las estirpes celulares depende de las complejas interacciones inter e intracompartimentales (Skinner, 1991). Es ampliamente conocido y aceptado, que las CL son capaces de modular la actividad funcional de las CS a través de la producción de testosterona, la cual es captada en la CS por receptores específicos (Saez y Perrard-Sapori, 1987). De igual manera, aunque por un mecanismo diferente se ha propuesto que las CS pueden regular la función de las CL, esta idea se ha probado parcialmente al haberse descrito la actividad de un factor que regula la vía esteroideogénica de las CL, producido en los túbulos seminíferos en cultivos primarios en periodos cortos de incubación y presente en los medios de cultivo de CS, éste factor o factores parecen modular la síntesis de testosterona (Papadopoulos, 1986, Herrera y cols, 1996).

Originalmente se había establecido que la estimulación del receptor de la FSH presente en la superficie membranal de las CS resultaba en la activación de la Adenilato Ciclasa y la formación de AMPc, pero más recientemente, se ha mostrado que la FSH puede

inducir incrementos en los niveles de calcio intracelular en CS de rata pero el significado fisiológico de tales eventos no está del todo claro (Gorczyńska y Handesmal, 1991). Muchos de los eventos regulatorios en CS están asociados con incrementos en los niveles de Calcio intracelular, pero no de las concentraciones de AMPc, o de la activación de proteínas cinasas dependientes de AMPc; tales eventos están íntimamente involucrados en la expresión bioquímica de la FSH, sugiriendo que posiblemente modificaciones en los niveles de Calcio, IP<sub>3</sub> y DAG puede ser un mecanismo alternativo al sistema de transducción principal o un mecanismo de modulación y/o amplificación de la señal dada por la FSH en células testiculares.

Por otro lado, se han dado evidencias de que las CS juegan un papel importante en el desarrollo y la regulación de las CL, a través de interacciones bioquímicas complejas establecidas entre ellas (Skinner, 1991). Se presume que dichas interacciones son mediadas por varias proteínas que son secretadas por las CS y que éstas proteínas varían en tipo y/o cantidad, de acuerdo a la también estrecha relación que las CS tienen con las CG asociadas (Parvinen, 1982).



**Figura 9.**

Se muestran los posibles mediadores de los diversos compartimentos del testículo, particularmente se ha reportado la existencia de un factor modulador que inhibe la producción de Testosterona en CL *in vitro*, bloqueando parcialmente la conversión de precursores C 21 en andrógenos, y la caracterización parcial de dicho factor indica que es de naturaleza proteica con un peso molecular aproximado de 21 Kda. Tomado de Herrera y cols, 1996.



Se ha reportado la existencia de un factor que inhibe la producción de T *in vitro*; este factor parece estimular la vía esteroidogénica, bloqueando en forma parcial la conversión de precursores C21 en andrógenos (Syed y cols, 1988). Otros estudios apoyan la existencia de un factor inhibidor de T, presente en medios condicionados de CS de rata adulta normal incubadas hasta por periodos de 48 horas (Herrera y cols, 1996) y la caracterización parcial de dicho factor indica que es de naturaleza proteica con un peso molecular aproximado de 21 KDa. Además existen evidencias dadas por otros grupo de investigación que indican, que factores secretados al medio de cultivo por las CS pueden ejercer su acción sobre la función de la CL, demostrándose la existencia de al menos dos sustancias proteicas: un factor que aparentemente puede incrementar la síntesis de T y 17  $\beta$ - estradiol (Papadopoulos y cols, 1986) y otro que inhibe la esteroidogénesis "in vitro" (Welsh y cols, 1985; Syed y cols, 1988).

La aparente incongruencia respecto de la localización de factores modificadores de la esteroidogénesis de las CL y mas aún de sus efectos, se debe en parte, a que la mayoría de los trabajos "in vitro" se han realizado en células testiculares de animales jóvenes (15-18 días de edad), en razón de que: las características morfológicas, sobre todo en los túbulos seminíferos que carecen de células en las diversas etapas de la espermatogénesis y consecuentemente, contando con la posibilidad de que sus cambios bioquímicos sean mas 'sencillos' y por ende mejor conocidos en esta edad (Castellon y cols, 1989; Jegou, 1991). La mayoría de las conclusiones generadas de los resultados obtenidos en tales experimentos, son generalmente extrapolados a los animales adultos (> 3 meses).

Uno de los mejores campos de investigación bioquímica lo constituyen los descubrimientos de como las células son capaces de detectar y de responder a la llegada de un estímulo específico con una extraordinaria diversidad de eventos bioquímicos particulares. En el caso del testículo estos estímulos incluyen a las gonadotropinas, neurotransmisores y factores de crecimiento, además de factores paracrinos y autocrinos. además de poder extender la lista a muchos otros. Sin embargo las células emplean mecanismos complejos, pero a su vez semejantes para responder a tales eventos. La respuesta a varios estímulos simultáneos es posiblemente mediada por la activación de múltiples vías de señalización independientes. La disponibilidad de nuevas técnicas y reactivos han ayudado a la 'diseción' de los eventos moleculares relacionados con la transducción de las señales desde la membrana al citosol y posteriormente hasta los efectores nucleares. La investigación de las vías de señalización ha revelado la complejidad y diversidad de los mecanismos empleados por las células para regular su metabolismo, morfología y la expresión de sus genes. Las técnicas recientemente desarrolladas reflejan el interés de múltiples grupos de trabajo para poder entender las posibles de conexiones de las vías dadas para las glucoproteínas.

El objetivo del presente trabajo fue el tratar de establecer las características de los mecanismos en la transducción de señales de las gonadotropinas en células testiculares (CL y CS) obtenidas de animales adultos normales, para posteriormente probar el posible mecanismo de acción del factor inhibidor de naturaleza proteica (21 000 Da) que es secretado por las CS y que regula la función de las CL, en cuanto a la producción de Testosterona (T) (Herrera y cols, 1996).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Como se ha señalado, el AMPc parece ser el segundo mensajero en la transducción de señales dadas por glucoproteínas, pero además del control del AMPc para la acción de la gonadotropinas y de otros factores autocrinos o paracrinos de naturaleza proteica, podrían estar presentes otros mediadores intracelulares regulando la transducción de la señal. Ejemplos de esta modulación han sido descritos recientemente para hormonas como el glucagon, cuyo mecanismo de acción había sido ampliamente aceptado como hormona mediada únicamente por AMPc, sin considerarse de ningún modo la participación de otros mensajeros como  $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$  o DAG, de tal modo que cada una de las vías en la transducción de señales era considerada por separado y sin ningún punto de conexión entre ellas.

Por otra parte, una de las funciones más importantes de las CS es la regulación que tienen sobre la función esteroidogénica de las CL por medio de factores que son secretados y que han sido detectados en los medios de cultivo. En línea con lo anterior, se ha demostrado que mucho de esos factores son de naturaleza proteica y su mecanismo de acción debe estar relacionado con algún o algunos de los mecanismos de transducción antes descritos.

En consecuencia, el eje central del presente protocolo lo constituyó el estudio de la transducción de la señal de las gonadotropinas a partir de células testiculares de animales adultos, así como los mecanismos bioquímicos involucrados en ello. Todo ello es de gran relevancia como base para la evaluación del mecanismo de acción que pudieran tener los factores paracrinos y/o autocrinos que regulan las funciones de las CS y CL.

## **HIPOTESIS**

Dentro de la vía de transducción de la señal evocada por las gonadotropinas, existe un entrecruzamiento de sus vías de señalización y se requiere de la participación de más de un mediador intracelular como AMPc, calcio, inositol fosfato, para obtener una respuesta determinada cualitativa y cuantitativamente.

## **OBJETIVO GENERAL**

EVALUAR LAS CARACTERISTICAS DE UNION ESPECIFICAS DE LAS GONADOTROPINAS EN LA SUPERFICIE CELULAR DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CS Y CL, ASI COMO DETECTAR EL MECANISMO DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DEL COMPLEJO HORMONA RECEPTOR DESPUES DE SU FORMACION, EN BASE AL MODELO ESTABLECIDO QUE INVOLUCRA AL SISTEMA DE PROTEINAS G.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Determinar la capacidad de unión, constantes de afinidad y constantes de disociación del ligando al receptor de la superficie celular, para las fracciones enriquecidas de las CS y CL obtenidas de animales adultos normales.
- 2.- Establecer los mecanismos celulares por los cuales las gonadotropinas regulan la respuesta de las CS y las CL.
- 3.- Evaluar la activación de la Adenilato Ciclasa y la Fosfolipasa C como resultado de la estimulación por gonadotropinas.
- 4.- Demostrar la actividad de proteína cinasas.
- 5.- Establecer un patrón electroforético de las proteínas que se fosforilan por acción del segundo mensajero, con su posible caracterización.
- 6.- Hacer una evaluación del efecto que tienen las proteínas fosforiladas sobre la actividad funcional de las CL como forma de su posible identificación.

222869

## **METODOLOGIA**

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, o bien de una calidad adecuada para fines bioquímicos y la metodología utilizada para la obtención de las fracciones enriquecidas fueron las descritas por Welsh y cols en 1975, con algunas modificaciones establecidas por el grupo de trabajo (Bermúdez y cols, 1988). Las glucoproteínas fueron proporcionadas por el National Hormone Pituitary Program (NHPP), el  $^{125}$ I por DUPONT, con una actividad específica de 2mCi/mmol. Las toxinas, las enzimas para la digestión tisular, la Forskolina así como el Fura 2 AM fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Los estuches para RIA de AMPc fueron proporcionados por Amersham. Las columnas de intercambio iónico provistas por BIORAD. El  $^3$ H myo-inositol fue proporcionado por ACCESOLAB y los anticuerpos para RIA de esteroides fueron obtenidos de acuerdo a Bermúdez y cols (1975).

Los animales utilizados fueron ratas machos adultos normales, de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 250 g, correspondiendo aproximadamente a 90 días de edad, mantenidas en el bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, alimentadas *ad libitum* y con periodos de luz-obscuridad de 12 horas cada uno.

### **OBTENCION DE LAS FRACCIONES CELULARES ENRIQUECIDAS**

Se sacrificaron los animales por dislocación cervical y los testículos se sacaron por vía abdominal; el peso del par de testículos fue entre 2.8 y 4.1 g, se lavaron con una solución amortiguadora KRBG (NaCl, 125 mM; KCl, 5 mM; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.2 mM; Tris, 35 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM; Glucosa al 2% y gentamicina al 0.05%) a un pH de 7.4, y fueron descapsulados, eliminándose al máximo venas y arterias. Los testículos descapsulados se incubaron en una solución de colagenasa Sigma tipo IA (mg/ml) en un volumen de 7 ml por cada par de testículos durante 18 minutos a 37C con agitación constante. Al término de este período se disminuyó la actividad enzimática por dilución con 15 ml de solución salina isotónica (NaCl 0.9%) mezclando y dejando reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. La suspensión tisular fue filtrada a través de una malla de nylon, el filtrado (Fracción intersticial cruda) se utilizó para obtener la fracción enriquecida de CL, mientras que el precipitado (Fracción tubular cruda), fue utilizada para la obtención de la fracción enriquecida en CS.

### **PURIFICACION DE LA FRACCION INTERSTICIAL CRUDA**

Las células del filtrado fueron sedimentadas a 1500 x g durante 10 minutos a 4C, el botón obtenido se resuspendió en 1ml de KRBG para ser colocado posteriormente en el gradiente de Ficoll (KRBG-Ficoll 400-Albumina Sérica Bovina (BSA) 13%-0.2% a pH 6.5); por

último la suspensión se centrifugó a 1000 x g por 15 minutos a 4°C; y el botón obtenido en este paso se resuspendió en KRBG. El conteo celular se realizó utilizando un hemocitómetro y la densidad celular se ajustó a 600 000 células por ml o bien de acuerdo al experimento a realizar (Bermúdez y cols, 1988).

## **PURIFICACION DE LA FRACCION TUBULAR CRUDA**

La fracción tubular cruda se fragmentó con un bisturí y se incubó en 20 ml de KRBG-Pancreatina (0.2 mg/ml) durante 20 minutos con agitación constante; posteriormente se dejó sedimentar a 1 x g durante 10 minutos a 28°C con agitación constante y se decantó el sobrenadante. La suspensión celular se volvió a fragmentar mecánicamente, pasándola a presión por una aguja de calibre 20 ga, y posteriormente se colocó sobre un gradiente discontinuo de KRBG-Sacarosa del 2 al 6% en intervalos del 1%, dejando sedimentar la suspensión celular a 1x g durante 30 minutos a 4°C. Se recuperó la fracción correspondiente al 4 y 5% y la suspensión celular se filtró a través de una malla semejante a la antes mencionada. Las células filtradas se concentraron por centrifugación a 1500 x g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó, el botón celular fue resuspendido en 5 ml de KRBG para el conteo celular, y se ajustó la densidad celular de acuerdo al experimento a realizar.

## **EVALUACION DE LA RELACION HORMONA-RECEPTOR**

Gonadotropinas de rata altamente purificadas de grado para radiomarcaje fueron obtenidas del NHPP de Estados Unidos de Norteamérica, proporcionadas por el Dr. Parlow, fueron marcadas por el método de Iodogen, siguiendo la metodología descrita por Liao en 1982, y finalmente purificadas en una columna de Sephadex G-100, para ser posteriormente utilizadas en los ensayos de radio-receptor.

Las CS y/o CL fueron suspendidas en KRBG a un pH de 7.4, agregando el ligando marcado radiactivamente ( $^{125}\text{I}$ -FSH y/o  $^{125}\text{I}$ -LH: 20 000 cpm), con una actividad específica de 46  $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$  prot., durante 3 horas a 32°C, y la separación de las fracciones libre y unida se realizó agregando una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.05 M, BSA 1% y centrifugando a 1500 x g a 4°C. Los experimentos de desplazamiento se realizaron utilizando una cantidad constante de proteína y de masa radiactiva, agregando diferentes cantidades de hormona fría (0.1-400 ng oFSH). Un análisis de Scatchard para la unión de FSH y LH (Scatchard, 1949) sirvió para determinar las constantes de afinidad, disociación y posibles sitios de unión por mg de proteína; las concentraciones totales de proteína fueron detectadas por el método de Lowry y cols (1951).

## **RIA DE AMPc INTRACELULAR**

Las fracciones enriquecidas de CL y CS fueron ocupadas para evaluar los niveles de AMPc intracelular como respuesta a alguno de los siguientes agentes: Toxina de cólera (TC) (100 ng/ml), toxina de *Pertussis* (TP) (25 ng/ml), forskolina (FK) (50 ng/ml), o 12-Miristato, 13-acetato de forbol (EF o TPA) (100 ng/ml) los cuales se colocaron en presencia o no de la correspondiente gonadotropina para cada tipo celular (LH 10 mUI/ml, FSH 100 ng/ml); todos los tubos se incubaron en presencia de 0.25 mM de metilisobutilxantina (MIX). También se realizó la determinación por radioinmunoanálisis de T y Estradiol (E) en ambos tipos celulares, como respuesta final a la presencia de los diferentes agentes y hormonas, además de evaluarse en presencia de los mismos factores las concentraciones citosólicas de calcio y el metabolismo de inosítoles fosfato.

Después de 90 minutos de incubación en presencia del agente y/o del estímulo proporcionado por las gonadotropinas, los niveles de AMPc fueron determinados por RIA utilizando un estuche de doble anticuerpo con sensibilidad de 25-1600 fmol/tubo u 8-526 pg/tubo. La extracción del AMPc se realizó agregando etanol frío al 95% y ácido tricloroacético TCA al 1%. Las proteínas precipitadas fueron colectadas por centrifugación durante 20 minutos, a 1500 x g y a 4°C. El sobrenadante fue decantado y el precipitado lavado 3 veces con etanol/TCA fríos. La fase acuosa fue evaporada, los residuos disueltos en el amortiguador para el RIA de AMPc (amortiguador de acetatos 0.05M). Se utilizó un AMPc marcado con <sup>125</sup>I (aproximadamente 59 KBq, 1.6μCi) y la radiactividad fue medida en un contador automático de radiaciones gamma (Drummond, 1983).

## **RIA DE ESTEROIDES**

El contenido de E y de T de las muestras de CS y CL fue determinado después de 3 horas de incubación, en presencia de los diferentes agentes. El período de incubación fue terminado por congelación del medio acuoso y las muestras fueron almacenadas hasta el día del ensayo de RIA a -20°C; 200μl de las muestras o concentraciones crecientes conocidas de T y/o E fueron incubadas durante 16 hrs a 4°C, utilizando una dilución del anticuerpo 1:1500 para T y 1:3,000 para E con ≈6,000 cpm del esteroide tritiado. Después se agregaron 500μl de una solución de Carbón Activado-Dextrán T-70 (0.25%-0.25%), y los tubos fueron centrifugados inmediatamente durante 15 minutos a 1500 x g a 4°C. El sobrenadante fue decantado en viales de conteo de 20 ml. y se agregaron 5 ml. de la mezcla de centelleo; la radiactividad fue contada después de una noche en un contador Beckman LS 7 000 con una eficiencia máxima de 56 % para <sup>3</sup>H.

## **CUANTIFICACION DEL CALCIO CITOSOLICO**

Células cultivadas en botellas de material plástico fueron lavadas con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  conteniendo EDTA (0.6 mM), y sometidas a la acción de tripsina/EDTA (500 unidades BAEE/ml., 0.6 mM). La suspensión celular así obtenida se centrifugó y las células se resuspenden en una solución de Krebs-HEPES (NaCl, 125 mM; KCl, 5 mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 mM; Tris, 35 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mM; Glucosa 5 mM y 10 mM HEPES) a un pH de 7.4, conteniendo 5 mg/ml de BSA y 20  $\mu\text{M}$  de Fura 2 AM. Las células fueron incubadas en dicha solución durante 45 min. La emisión de la fluorescencia para el calcio citosólico fue determinada en un espectrofluorómetro PERKIN ELMER equipado con longitudes de onda dobles de excitación a 340 y 380 nm, durante 300 segundos, siguiendo la metodología descrita por Gorczyńska y Handelsman (1991). Alicuotas de la suspensión celular fueron colocadas en la celda del espectrofluorómetro y sometidas a excitación de las dos longitudes de onda (340 y 380 nm), determinándose el cociente de emisión a 510 nm y para cada muestra se obtuvieron los valores para R max que corresponde a la fluorescencia obtenida al lisar las células con Tritón X-100 y R min a la fluorescencia remanente después de la adición de EGTA. La concentración de calcio intracelular fue calculada de acuerdo a la ecuación descrita por Grynkiewicz y cols (1985).

## **EVALUACION DE LA FORMACION DE LOS FOSFATOS DE $^3\text{H}$ -INOSITOL (IPs)**

Se utilizaron células cultivadas en cajas multipozos, en las cuales el medio de cultivo inicial (medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco:DMEM) fue sustituido por 0.5 ml de DMEM adicionado con  $^3\text{H}$ -inositol (0.16  $\mu\text{M}$ ). Al cabo de 24 horas, el medio fue aspirado y a cada pozo se le adicionaron 240  $\mu\text{l}$  de Krebs-HEPES conteniendo 20 mM de LiCl, durante 10 min. Al término de este período, se adicionaron los diferentes agentes (TC, TP, etc.) a las muestras, las cuales se incubaron durante 0, 5, 15 y 30 minutos en presencia de los diferentes factores de prueba. La incubación se detuvo por la adición de ácido perclórico siguiendo la metodología descrita por Davis (1992). Los IPs formados fueron separados utilizando columnas de cromatografía (BIORAD Poly-Prep) conteniendo 2 ml de resina de intercambio iónico (Dowex AG I-X8, forma formiato, malla 100-200). El  $^3\text{H}$ -inositol remanente y el  $^3\text{H}$  glicerofosfoinositol formado fueron eluidos con 10 ml de agua destilada y 10 ml de una solución 60 mM de formiato de amonio/ 5 mM de tetraborato de sodio respectivamente. El total de los fosfatos de  $^3\text{H}$ -inositol producidos ( $^3\text{H}$ -IP<sub>1</sub>,  $^3\text{H}$ -IP<sub>2</sub>,  $^3\text{H}$ -IP<sub>3</sub>) fueron separados mediante un gradiente de formiato de amonio 100-1000 mM / 100 mM de ácido fórmico y la radiactividad fue determinada por centelleo líquido.

## **EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEINAS CINASAS**

La actividad de las proteínas cinasas dependientes de AMPc fueron programadas para ser determinadas por la fosforilación de proteínas en medios con presencia de ATP



marcado con  $^{32}\text{P}$  en posición gamma (Kisinger y Skinner, 1982). El análisis de las proteínas fosforiladas y su purificación se realizaría en geles de poliacrilamida y se caracterizarían utilizando marcadores de peso molecular y la forma gráfica de Ferguson (Shapiro y cols, 1969).

## **EVALUACION DEL EFECTO DE LAS PROTEINAS FOSFORILADAS**

Un bioensayo de las proteínas fosforiladas se realizaría para evaluar el posible efecto que tienen estas sobre la actividad funcional de las CL, utilizando como parámetro la producción de T.

## **APLICACION DE PRUEBAS ESTADISTICAS**

La evaluación estadística incluyó un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico ( $n < 6$ ), así como la prueba de comparación múltiple de Mann-Whitney y la prueba de t no apareada para la evaluación paramétrica en el análisis entre grupos. El análisis de regresión y la prueba de t se utilizó para comparar los valores obtenidos por RIA y determinar el grado de diferencia entre los tratamientos. Se empleo ANOVA para comparar las diferencias entre todos los tratamientos y una prueba de Tukey para ordenar los diferentes grupos.

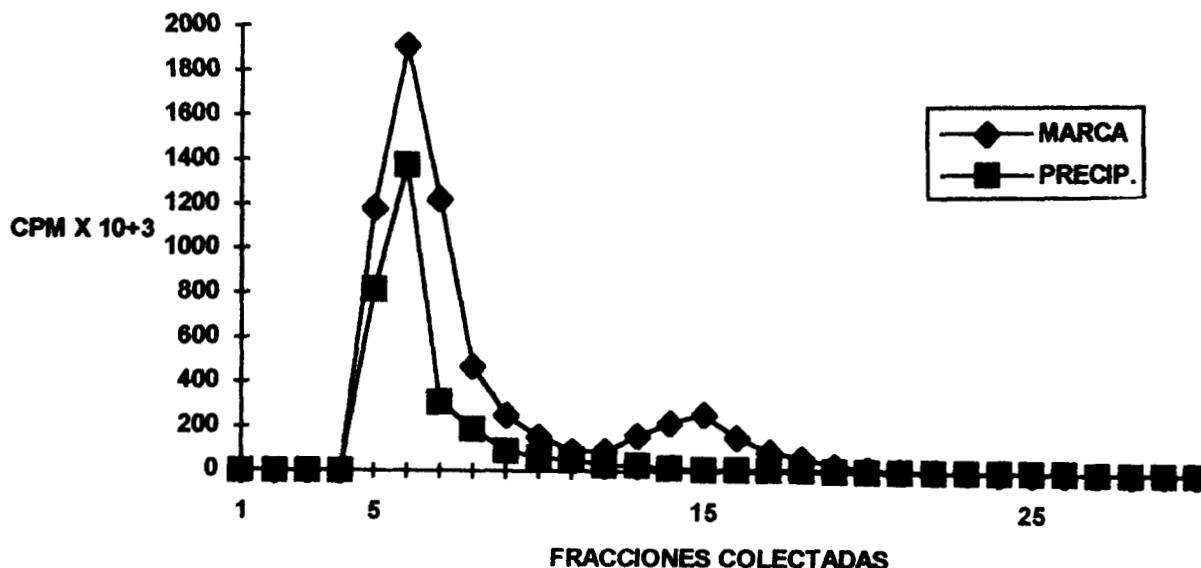
# RESULTADOS

## I. OBTENCION DE LAS FRACCIONES CELULARES

Después de los tratamientos mecánico y enzimático, las fracciones enriquecidas de ambos tipos celulares mostraron porcentajes de pureza y viabilidad semejantes a los antes obtenidos por el grupo de trabajo (Bermúdez y cols, 1988). La viabilidad medida utilizando la prueba de exclusión del azul tripano mostró porcentajes mayores al 80% y la pureza medida como la capacidad de síntesis del esteroide correspondiente, mostró que la fracción tubular no responde ante estimulación con LH con incrementos de T y que la fracción intersticial no responde al estímulo proporcionado por FSH.

## II. PREPARACION DE LAS GONADOTROPINAS MARCADAS

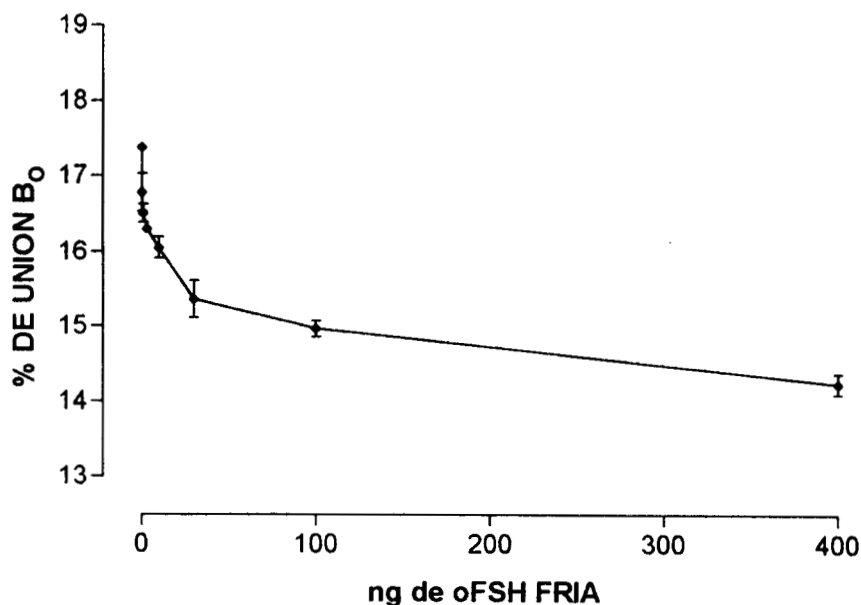
Los resultados del marcaje de las glucoproteínas por el método del Iodo gen, indicaron que se obtuvo FSH con actividad específica de  $46.64 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  de proteína y con una eficiencia de marcación de 82%, resultado 3 fracciones proteicas pico que fueron en las que se encontró la mayor cantidad de radiactividad y la mayor precipitación de proteínas determinada con TCA, mismas que fueron colectadas y utilizadas para los experimentos de unión a las células testiculares y sometidas a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, como se indica en la gráfica 1. Normalmente, la radiactividad unida en el punto cero del ensayo (hormona radiactiva solamente) constituyó menos del 10% de la radiactividad agregada y disminuyo hasta un 2-3% en presencia de hormona no marcada. Las cuentas absorbidas no específicamente a las paredes del tubo, no constituye más del 1% del total de unión no específica.



Gráfica 1.

La gonadotropina de grado para radiomarcarse fue marcada por el método del Iodo-Gen y purificada por cromatografía en Sephadex G-100. Obteniéndose 30 fracciones de las cuales se encontraron 3 fracciones pico de acuerdo a la cantidad de radiactividad mismas que coincidían con los picos para precipitabilidad con TCA al 30%.

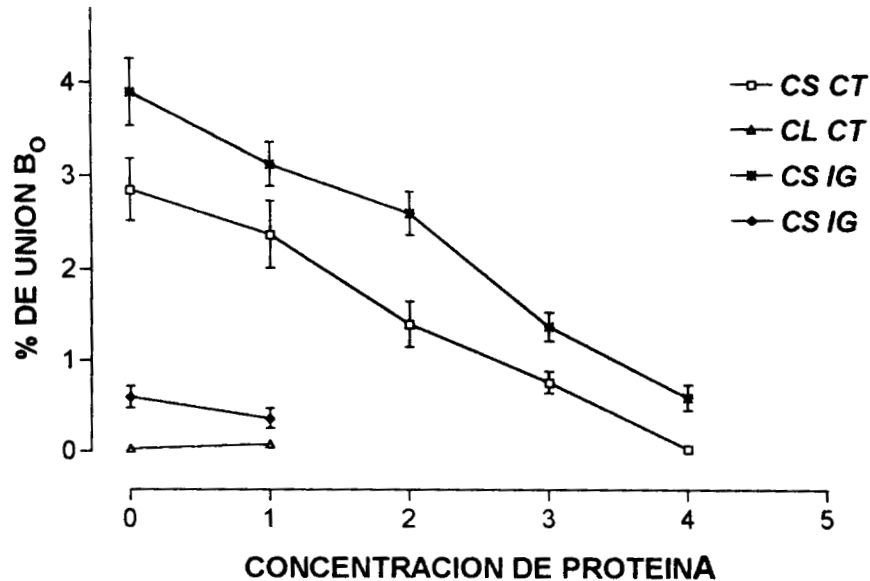
La unión de la oFSH a la superficie membranal de las CS representó unión inespecífica ya que no se logró un desplazamiento real de la hormona radiactiva por la hormona fría, aún para cantidades de 400 ng (gráfica 2), por lo cual no se pudieron establecer las características de unión de la hormona al receptor. El desarrollo de ensayos de radioligando-receptor representan una gran ayuda para las reacciones estructura función tanto de hormonas nativas como de sus derivados o análogos, por métodos directos de unión de hormonas marcadas se pueden obtener características de saturación consistentes con la presencia de uno o mas sitios de unión con afinidades relativamente altas por el ligando hormonal; pero se debe contar con moléculas marcadas con muy alta actividad específica y que mantengan las características biológicas de la hormona nativa.



### Gráfica 2.

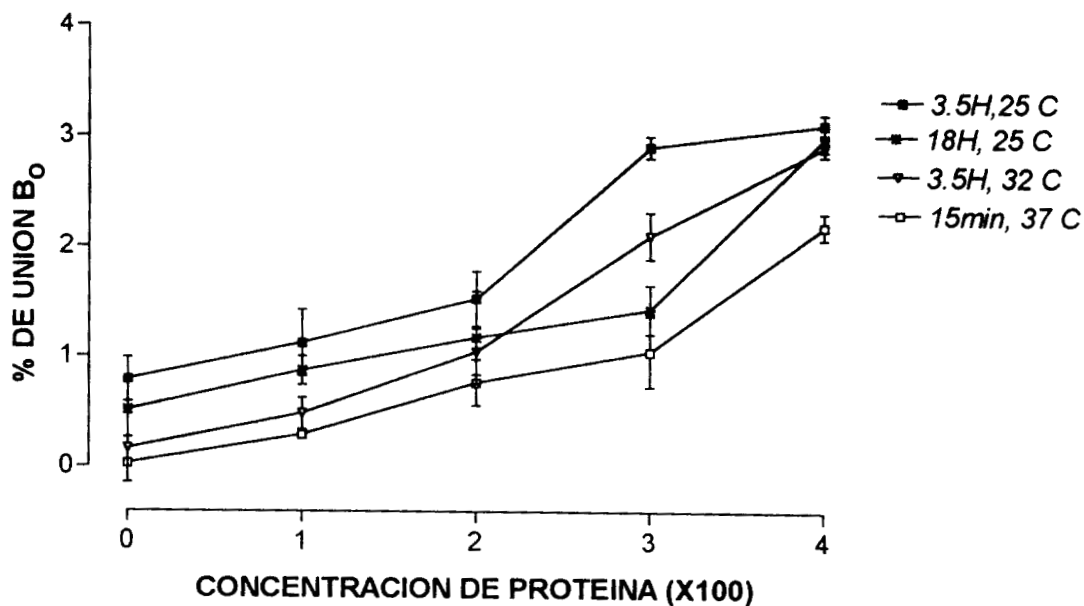
Se muestra un ensayo homólogo para definir una curva de desplazamiento para la FSH marcada por Iodo-Gen con actividad específica de  $46.64 \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$  de proteína, a cantidad constante de proteína  $500 \mu\text{g}$  y cantidad constante de masa radiactiva  $20\,000 \text{ cpm}$ , agregándose cantidades variables de hormona no marcada (FSH fría). La unión máxima fue mayor al 10%, pero el desplazamiento de la hormona marcada por la hormona fría fue solo de 3%.

En nuestro modelo experimental, sólo las CS fueron capaces de unir la FSH, no observándose unión a las células intersticiales como se muestra en la gráfica 3. La unión de la oFSH a los receptores testiculares en un proceso dependiente de la temperatura y del tiempo del ensayo, observándose que la mejor combinación de condiciones la constituyó a 3 hrs a  $25 \text{ C}$ , gráfica 4



**Gráfica 3.**

El porcentaje de unión de la fracción 6 de la oFSH marcada por dos métodos, Iodo gen y Cloramina T ( IG, CT ) en Células de Sertoli ( CS ) y Células de Leydig ( CL ) de rata adulta, la masa radiactiva de la hormona correspondió a 1 pg ( 20 000 cpm ) y la separación libre/unida se realizó agregando PBS 0.05M, BSA 1% y centrifugando a 1500 g a 4°C . La unión máxima para CL fue menor al 1% para IG y aun menor para CT, para las CS la unión fue mayor, pero menor al 5%, mostrando los mejores resultados para la hormona marcada con IG..



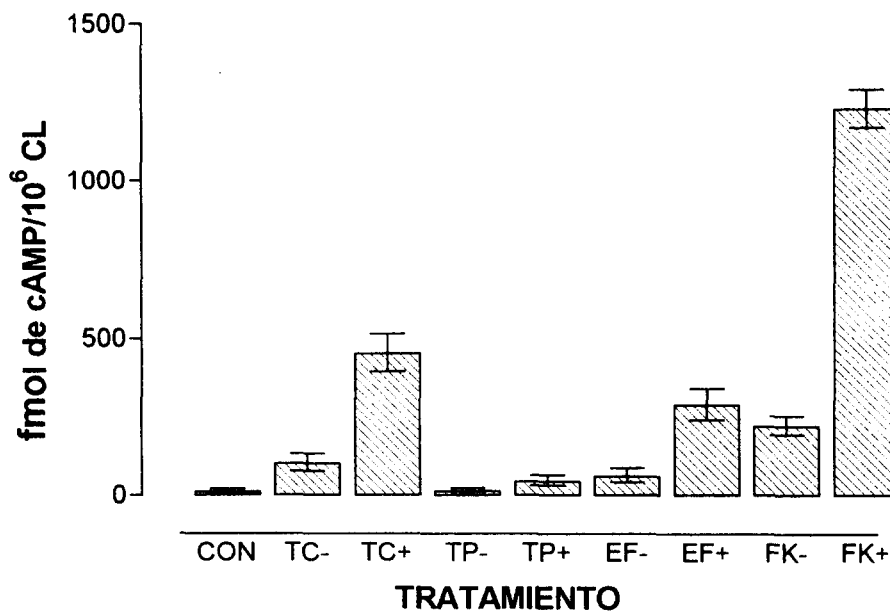
**Gráfica 4.**

La unión de las Células de Sertoli de rata adulta normal a la fracción 6 de la FSH de bovina marcada por el método de Iodo gen bajo diferentes condiciones de ensayo ( temperatura, tiempo de incubación, cantidad de proteína y tipo de amortiguador ), mostrando que las mejores condiciones para establecer el equilibrio se da después de 3 hrs. a 32°C, la unión total fue menor al 5%, aunque se muestra una tendencia creciente de ocupación de los receptores. Cada punto representa la media de al menos 5 repeticiones de 3 experimentos diferentes.

### III. RESPUESTAS DE LAS CELULAS DE LEYDIG.

#### A. NIVELES DE AMPc

Las CL aisladas de testículos de rata adulta fueron puestas en presencia de los diversos agentes durante periodos de incubación cortos y los cambios en las concentraciones de AMPc intracelular detectados para cada tratamiento están representados en la gráfica 5. Células incubadas en presencia de la TC y hLH mostraron incrementos de hasta 3 veces la producción de AMPc comparadas con las que fueron puestas en presencia solo de la TC. El tratamiento de 90 minutos de incubación de CL en presencia de la TP no mostró un cambio marcado en la acumulación del nucleótido, aunque con el estímulo proporcionado aumentó al doble con respecto a su control; no obstante la cantidad máxima fue de solo 47.52 fmol/10<sup>6</sup> CL que es pequeña en comparación con las obtenidas para TC, cuyos valores máximos fueron de 453.62 fmol/10<sup>6</sup> CL. Para las CL incubadas en presencia del activador directo de la Adenilato Ciclasa, FK, se demostraron incrementos hasta 222.18 fmol sin gonadotropina y que en presencia de ésta llegaron hasta 1226.56 fmol, esto es, un incremento de 6 veces la cantidad de AMPc. Con respecto al efecto de los ésteres de forbol las CL respondieron con niveles de 65.35 fmol y 289.62 fmol sin y con la gonadotropina respectivamente.



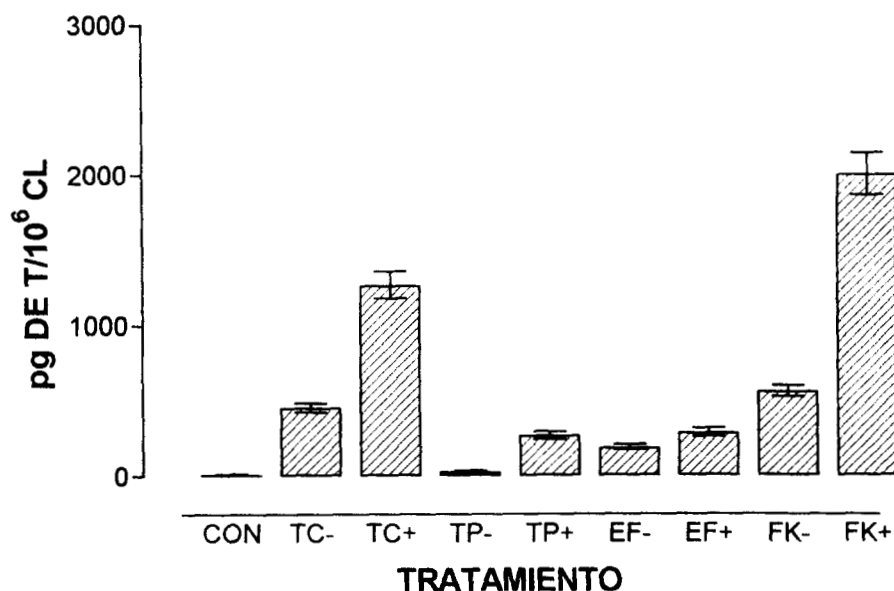
**Gráfica 5.**

Determinación de AMPc intracelular, medido por RIA ( fmol de AMPc / 10<sup>6</sup> CL / 1.5 hrs. ), en presencia del factor de prueba y del estímulo o no proporcionado por la gonadotropina. ( hLH 10 mU / ml. ). Al final del periodo de incubación, los medios fueron colectados y el AMPc intracelular fue extraído por un tratamiento "toda la noche" con etanol 95% frío y TCA al 1%. Las muestras fueron evaporadas y el contenido de AMPc fue estimado por RIA específico de doble anticuerpo con <sup>125</sup>I-cAMP con sensibilidad de 12.5 fmol. TC ( 100 ng/ml.), TP ( 25 ng/ml.), EF ( 100 ng/ml.), FK ( 50 ng/ml.) y todos en presencia de 0.25 M de MIX.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control  $P < 0.05$  determinado por un análisis de varianza.

## B. ACUMULACION DE ESTEROIDES

Testosterona. En el grupo control la concentración de testosterona fue de 12.83 pg. Se observó una estimulación máxima en las CL puestas en presencia de FK y hLH llegando a tener valores hasta de 1966 pg, ya que sin la hLH el incremento llegó solamente a 559 pg; la TC aumentó la T hasta 454 pg y al actuar junto con hLH se elevó el nivel de T hasta los 1267 pg. La TP por sí misma aumentó la T a 28 pg y con la gonadotropina hasta 269 pg. EF presentó un incremento a 191 pg de T y hasta 289 con hLH. (Gráfica 6).

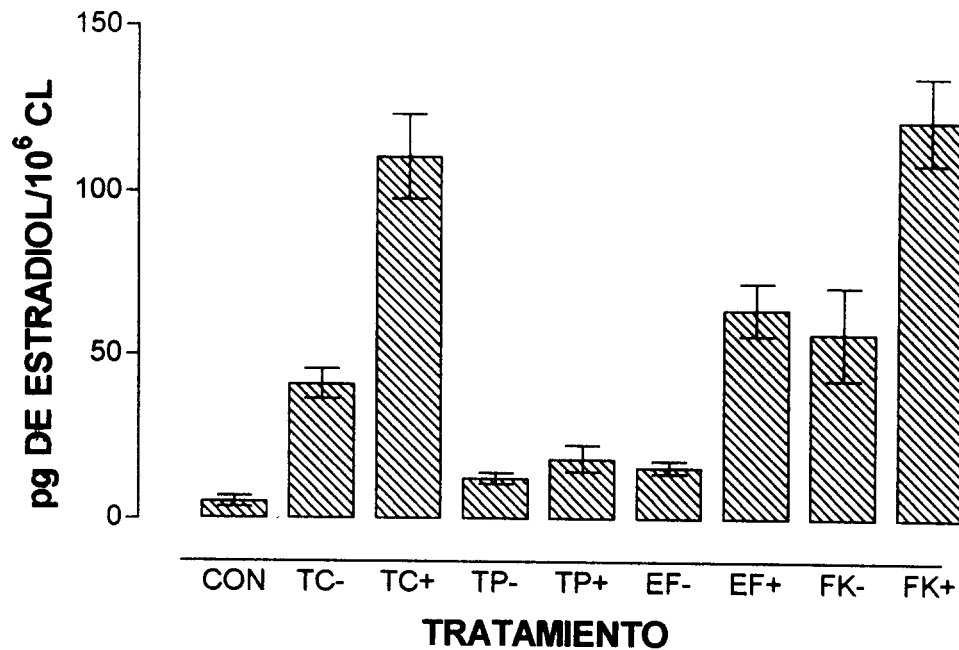


**Gráfica 6.**

Acumulación de Testosterona en Células de Leydig, después del tratamiento con o sin gonadotropina ( hLH 10 mU/ml. ) en presencia del factor de prueba. La incubación fue terminada por congelación y los medios fueron almacenados para determinar por RIA específico la Testosterona (T) acumulada después de 3 hrs. Cada barra es la media de 5 muestras; las diferencias fueron determinadas por ANOVA, las concentraciones máximas de la producción de T se observaron por el efecto de la TC y FK, alcanzando niveles superiores a los 1000 pg / 10<sup>6</sup> CL en presencia de el estímulo hormonal

Estradiol. Los niveles basales de estradiol de fueron de 5.50 pg y de manera semejante a testosterona, la respuesta máxima se dio en presencia de FK y hLH con 121 pg. La TC hizo incrementar el nivel hasta 41 pg y aunada con la gonadotropina se llegó hasta 110 pg. Con valores menores, la TP incrementó al Estradiol a 12.5 pg y actuando junto a la gonadotropina llegó hasta 18.6 pg (Gráfica 7).

222869



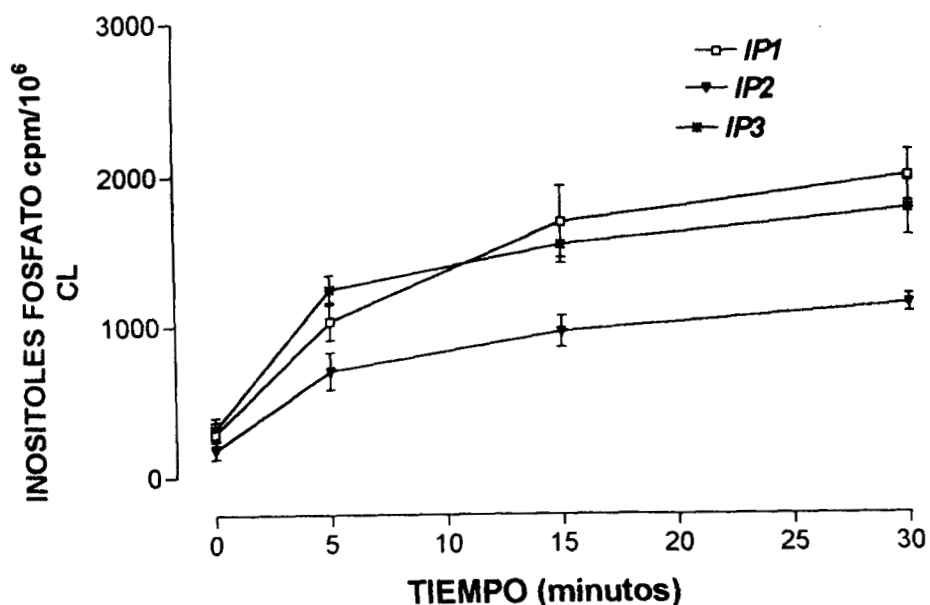
**Gráfica 7.**

Actividad de la aromatasa medida como la acumulación de Estradiol en Células de Leydig, después del tratamiento con o sin gonadotropina ( hLH 10 mU / ml. ) en presencia del factor de prueba. La incubación fue terminada por congelación y los medios fueron almacenados para determinar por RIA específico el Estradiol acumulado después de 3 hrs. Cada barra es la media de 5 muestras; las diferencias fueron determinadas por ANOVA, mostrando un incremento de la producción de E por el efecto de la TC y FK potenciado por el estímulo hormonal. Se hace énfasis en la concentración del esteroide determinado en estas muestras.

### C. METABOLISMO DE FOSFATOS DE INOSITOL

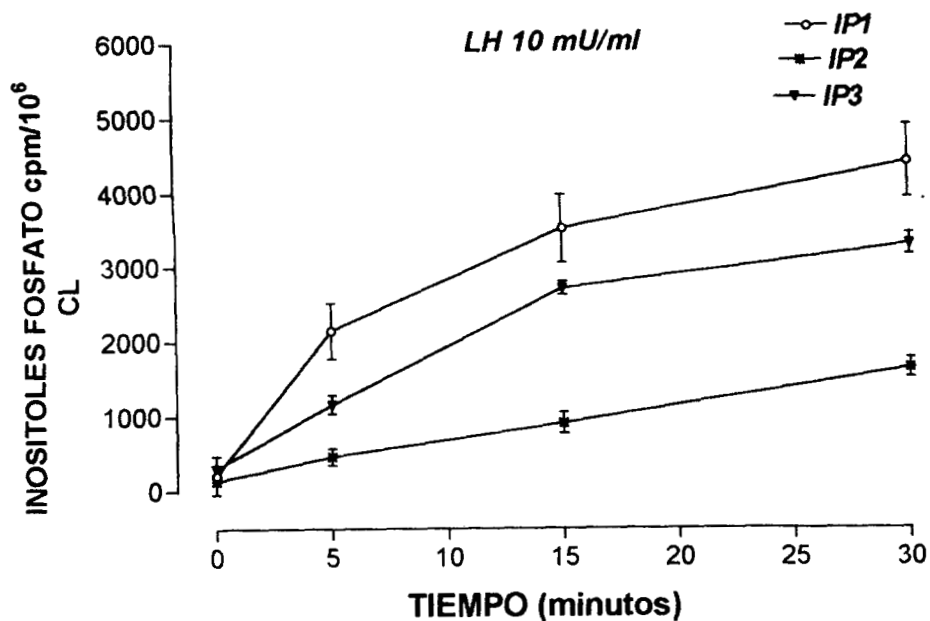
Las CL que fueron premarcadas durante 24 hrs con <sup>3</sup>H inositol, seguido por 10 mM de LiCl en presencia o no de la LH y en presencia de los diferentes agentes después de 30 minutos para la formación de IP, que fueron separados por cromatografía de intercambio iónico de manera similar a lo reportado por Monaco y cols en 1988 y los resultados se muestran en la gráfica 8.

Se observa que un tratamiento de las CL con 10 mUI/ml. provoca los siguientes cambios: los <sup>3</sup>H-IP<sub>1</sub>, <sup>3</sup>H-IP<sub>2</sub> e <sup>3</sup>H-IP<sub>3</sub> fueron incrementados 231, 143 y 178% con respecto al control respectivamente. La tasa inicial de formación del IP<sub>3</sub> fue mayor que la tasa de formación del IP<sub>2</sub> e incrementos significativos del IP<sub>1</sub> ocurrieron entre los primeros 5 min. en presencia de la hormona como se muestra en la gráfica 9.



**Gráfica 8.**

Tiempo cursado para la acumulación de inositoles fosfato en ausencia del estímulo proporcionado por la gonadotropina. La extracción de los inositoles fosfato se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando un gradiente de formato de amonio de ( 100 - 1000 mM ).



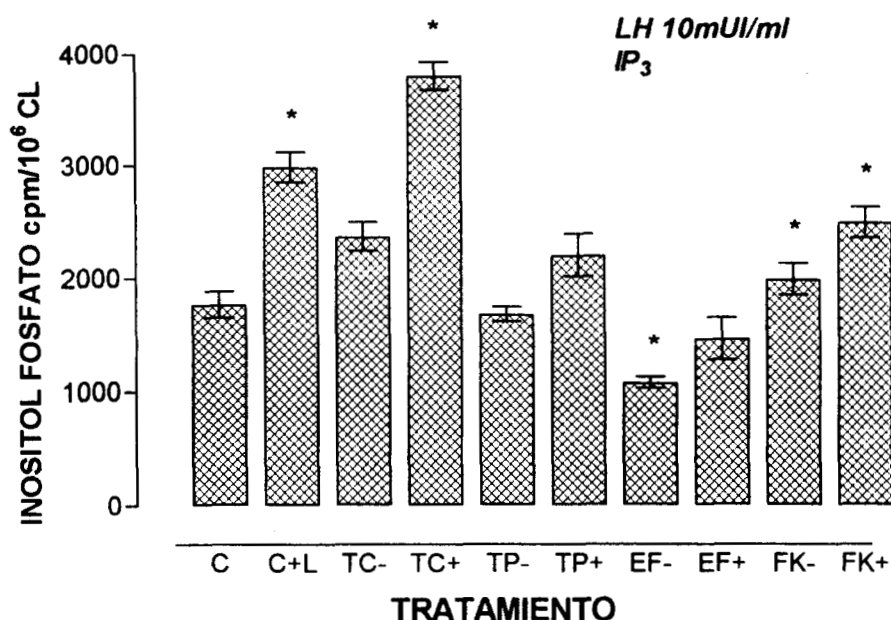
**Gráfica 9**

Efecto de la hLH ( 10 mU/ml.) sobre la acumulación de inositol trifosfato en células de Leydig. Las células fueron premarcadas 24 hrs. con 4  $\mu$ Ci / ml. de [3-H] myo inositol, en presencia de 10 mM de LiCl. Se muestra la acumulación de IP1, IP2 e IP3 en un periodo de 0-30 minutos en presencia de la LH, mostrándose la estimulación debida a la acción de la hormona, los inositoles fosfato fueron separados por cromatografía de intercambio iónico. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 5 repeticiones.

La presencia de la TC induce un incremento marcado en la acumulación de IP<sub>3</sub> después de 30 min. de incubación, tal incremento fue potenciado por la presencia de la LH, representando el tratamiento en el que la acumulación de IP<sub>3</sub> represento los valores



máximos 214% con respecto al control. En tanto que el tratamiento durante 30 minutos en presencia de 100 ng/ml. de miristato de forbol o TPA inhibe la acumulación de los inositoles fosfato. El tratamiento con TPA resulta en una comparable reducción de los niveles de IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub>, e IP<sub>3</sub> que va de 1769 ± 117.89 a 1074 ± 49.69 para IP<sub>3</sub> por ejemplo; aun en presencia de la dosis máxima efectiva de LH no se muestran incrementos significativos en los inositoles marcados pasando de 1769 ± 97.89 a 1459.96 ± 107.49.(Gráfica 10).



**Gráfica 10.**

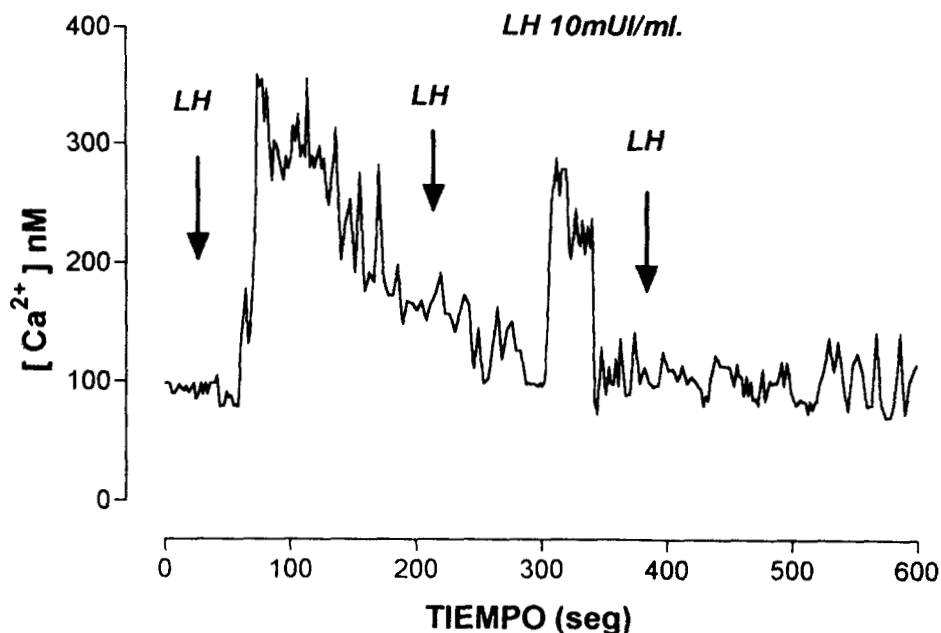
Efecto de la hLH ( 10 mUI/ml.) sobre la acumulación de inositol trifosfato en células de Leydig. Las células fueron premarcadas 24 hrs con 4 µCi / ml. de [3-H] myo inositol, en presencia de 10 mM de LiCl y puestas en presencia de diversos agentes, TC ( 100 ng/ml.), TP ( 25 ng/ml.), EF ( 100 ng/ml.) y FK( 50 ng/ml.). La incubación fue a 37°C y detenida por la adición de ácido perclórico y la extracción de los inositoles fosfato se realizó en columnas de intercambio iónico Dowex AG 1-X8, forma formiato, malla 100-200. Cada barra representa la media y la desviación estándar de 5 repeticiones.

La LH estimula una acumulación considerable para IP<sub>3</sub> en los primeros 5 minutos de la estimulación de la gonadotropina y una acumulación máxima para IP<sub>1</sub> al término de 30 minutos y un comportamiento similar para IP<sub>3</sub>.

#### D. CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE CALCIO

Las CL fueron cargados con un indicador fluorescente Fura 2AM, con la excitación a dos longitudes de onda (340 y 380 nm), después de la administración de 10 mUI/ml. de LH, en donde se muestran modificaciones de las concentraciones basales de calcio (87±9 nM), en presencia de LH dicha concentración se incrementó de hasta más de 300 nM, debido a la

presencia de la hormona (gráfica 11); mostrando además una caída a niveles basales de calcio después de 250 seg. de la aplicación de 10 mUI/ml de LH, una segunda aplicación de la misma concentración de la misma hormona induce un aumento en las concentraciones del calcio de hasta 250 nM, durante 50 seg., y un tercer estímulo solo provee de un pequeño incremento.

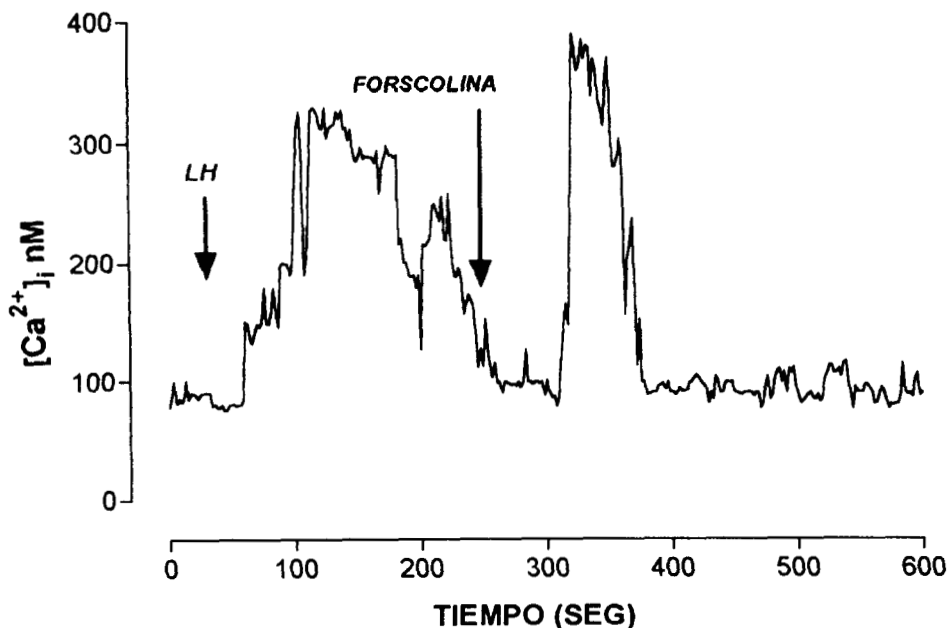


**Gráfica 11**

La LH ( 10 mUI/ml.) induce cambios en las concentraciones intracelulares de Calcio, elevando los niveles basales de  $87 \pm 9$  nM hasta niveles superiores a 360 nM del Calcio intracelular, en la gráfica cada punto representa los valores promedio para 3 repeticiones. El segundo mensajero resultante de la activación de los receptores para la gonadotropina por una segunda vía, el IP3, difunde al interior de la célula a al unirse a receptores específicos, estimula la salida de los iones contenidos en los depósitos intracelulares, lo cual fue demostrado por la exposición previa a Tapsigargina 1 nM y por la remoción del calcio del medio extracelular.

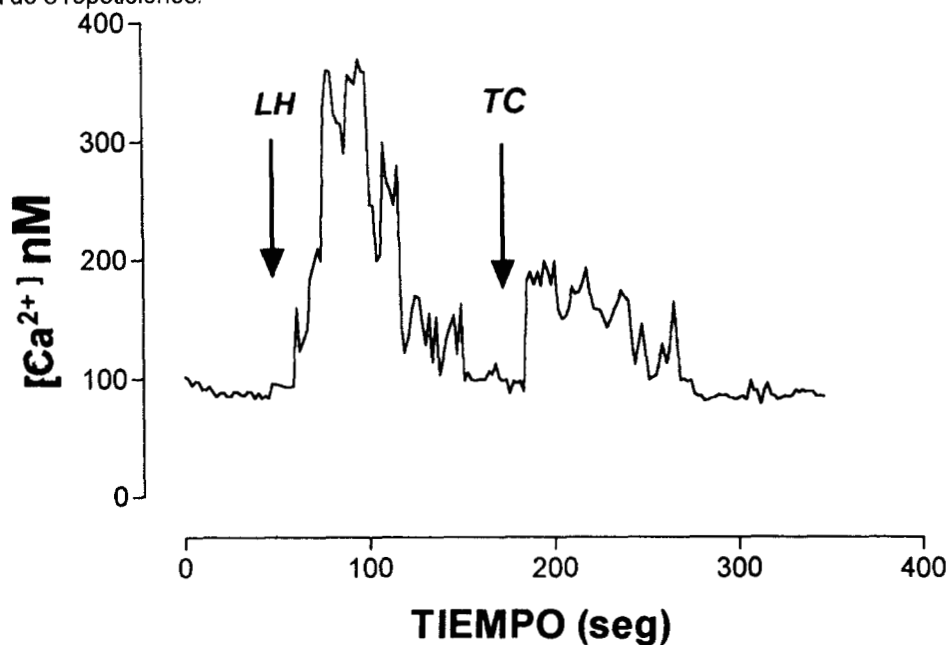
Cuando las células fueron expuestas a la presencia de un activador de la Adenilato Ciclasa, las concentraciones de calcio se elevaron hasta casi 400 nM (gráfica 12), efecto que posiblemente podría ser mediado por la presencia de concentraciones considerables de AMPc elevadas por la presencia de activadores de segundos mensajeros; a diferencia de la toxina de cólera que muestra solo un pequeño incremento de la concentración basal de calcio, que representa menos de la mitad de la estimulación dada por 10 mUI/ml. de LH (gráfica 13).

En tanto que para toxina de pertusis y para el éster de forbol no se mostraron modificaciones para las concentraciones de calcio. (gráficas 14 y 15 respectivamente).



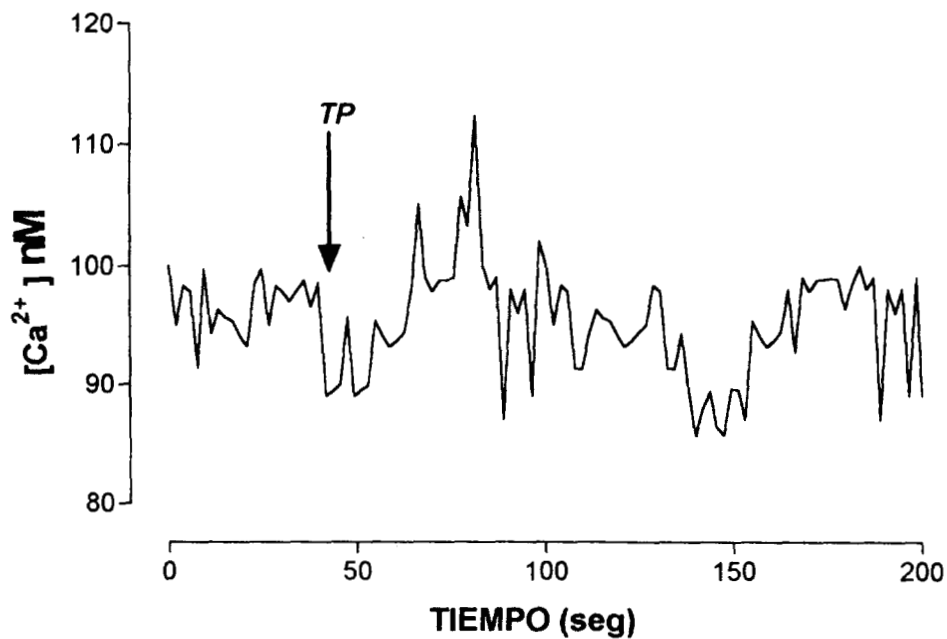
**Gráfica 12**

Niveles de Calcio citosólico en CL de rata adulta normal, medidos con el uso de 20  $\mu\text{M}$  de FURA 2AM, con la excitación a dos longitudes de onda ( 340 y 380 nm ), después de la administración de 50 ng / ml. de Forscolina ( FK ), un activador directo de la adenilato ciclasa y de 10 mUI de hLH, mostrando que la FK induce un incremento que se supera al efecto mostrado para la hLH. Cada punto de la gráfica representa la media de 3 repeticiones.



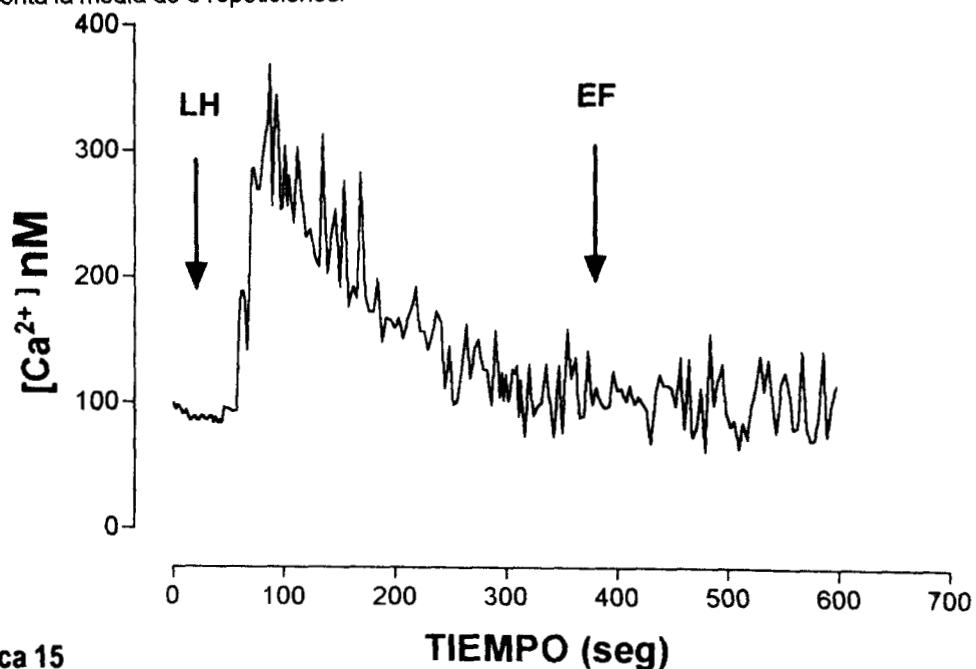
**Gráfica 13**

Determinaciones de Calcio citosólico en CL de rata adulta normal, medidos con el uso de 20  $\mu\text{M}$  de FURA 2AM, con la excitación a dos longitudes de onda ( 340 y 380 nm ), después de la administración de 100 ng / ml. de Toxina de Cólera ( TC ), un activador directo del sistema de proteínas Gs. Se muestra que la presencia de la TC puede inducir un cambio significativo de los niveles de calcio, mostrando 95 nM basal a 179 nM en presencia de la TC. Cada punto de la gráfica representa la media de 3 repeticiones.



**Gráfica 14**

Niveles de Calcio citosólico en CL de rata adulta normal, medidos con el uso de 20  $\mu\text{M}$  de FURA 2AM, con la excitación a dos longitudes de onda ( 340 y 380 nm ), después de la administración de 25 ng / ml. de Toxina de Pertusis ( TP ), un activador directo del sistema de proteínas Gi. Se muestra que 3 horas de incubación previa de las CL en presencia de la TP no son suficientes para inducir un cambio significativo de los niveles de calcio, mostrando 97 nM basal y 119 nM en presencia de la TP. Cada punto de la gráfica representa la media de 3 repeticiones.



**Gráfica 15**

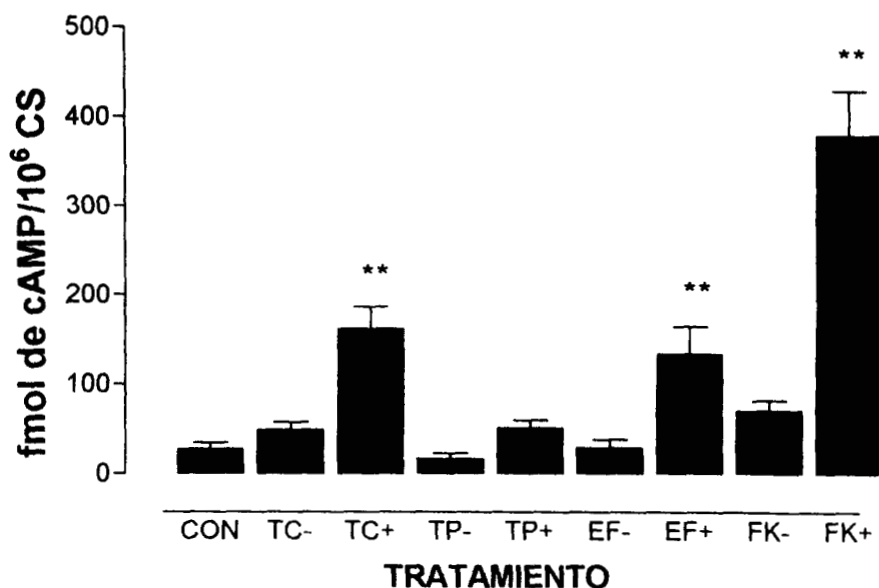
Determinaciones de Calcio citosólico en CL de rata adulta normal, medidos con el uso de 20  $\mu\text{M}$  de FURA 2AM, con la excitación a dos longitudes de onda ( 340 y 380 nm ), después de la administración de 100 ng / ml. de Ester de forbol ( EF ), un activador directo de la Proteína Cinasa C. Se muestra la presencia de la EF no parece inducir un cambios de los niveles de calcio. Cada punto en la gráfica representa la media de 3 repeticiones.

## IV. RESPUESTA DE LAS CELULAS DE SERTOLI

### A. NIVELES DE AMPc

La interacción de la FSH con su receptor en las membranas de CS provoca un incremento en los niveles de AMPc, el cual ha sido ampliamente descrito como el principal segundo mensajero, pero no solo esta vía puede estar accesible ante la llegada de FSH, sino que pueden estar participando otras vías de transducción membranal ( Groncyska y Handelsman 1991). De acuerdo a los resultados, otros segundos mensajeros podrían estar participando y pueden ser señales en paralelo y aún más, entre ambas concurrir en una transferencia de información mucho más compleja.

Los resultados de las determinaciones de AMPc de CS incubadas por periodos cortos se muestran en la gráfica 16. Hay una nivel basal de 28 fmol de AMPc y esta cantidad aumentó en un 47% en presencia de TC; pero que en presencia de TC y hFSH, los valores se incrementaron hasta 161.85 fmol de AMPc, lo que representó un incremento mayor al 500% con respecto al control. Para la TP no se mostraron cambios significativos en los niveles del nucleótido. La presencia de FK aumentó por si sola los niveles de AMPc, para tener 61.95 fmol y este valor fue incrementado hasta 376.98 fmol en presencia de la hFSH. La presencia de EF no modificó los niveles de AMPc teniendo niveles parecidos al control, pero cuando son puestas las células en presencia de EF y gonadotropina, hay un incremento en la producción de hasta 134.13 fmol de AMPc.



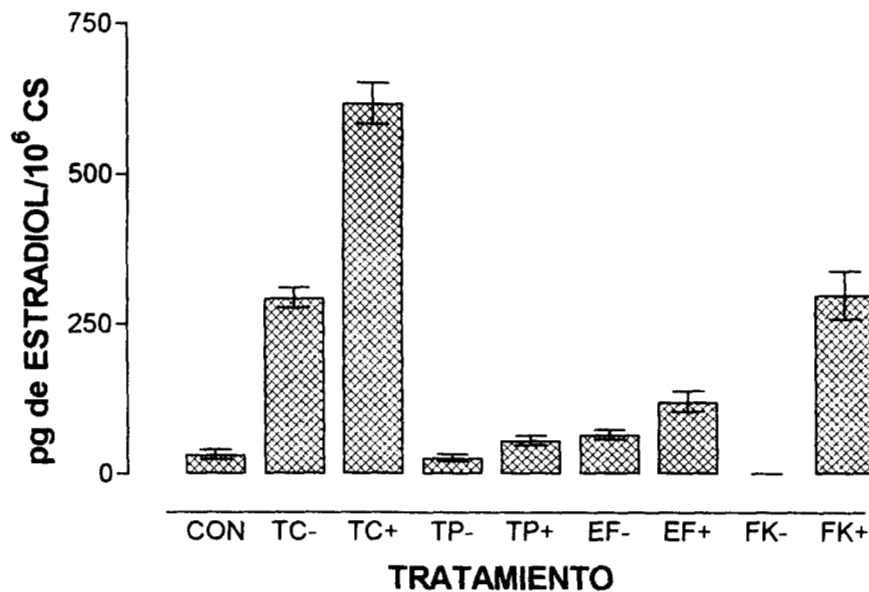
**Gráfica 16**

Determinación de AMPc intracelular, medido por RIA ( fmol de AMPc /10<sup>6</sup> CS / 1.5 hrs), en presencia del factor de prueba y del estímulo o no proporcionado por la gonadotropina ( hFSH 100 ng/ml. ). Al final del periodo de incubación, los medios fueron colectados y el AMPc intracelular fue extraído por un tratamiento "toda la noche" con etanol 95% frío y TCA al 1%. Las muestras fueron evaporadas y el contenido de AMPc

fue estimado por RIA específico de doble anticuerpo con  $^{125}\text{I}$ -cAMP con sensibilidad de 12.5 fmol. TC ( 100 ng/ml. ), TP ( 25 ng/ml. ), EF ( 100 ng/ml. ), FK ( 50 ng/ml. ) y todos en presencia de 0.25M de MIX. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control  $P < 0.05$  determinado por un análisis de varianza.

## B. ACUMULACION DE ESTRADIOL

Los niveles basales de Estradiol fueron de 33.5 pg para las muestras control y se mostró un incremento a 294 pg en presencia de la TC y hasta de 618 pg en presencia de la TC y hFSH. La TP no modificó los niveles de estradiol acumulados, pero al agregársele la gonadotropina se llegó a 56.66 pg. Se observó un incremento a 298 pg en presencia de la FK y hFSH (Gráfica 17).



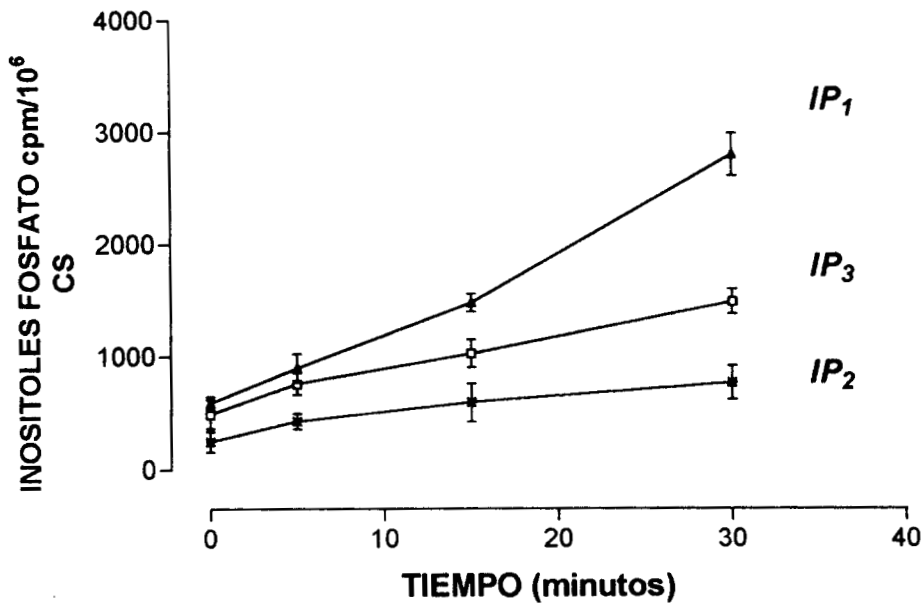
### Gráfica 17

Acumulación de Estradiol en Células de Sertoli, después del tratamiento con o sin gonadotropina ( hFSH 100 ng/ml ) en presencia del factor de prueba. La incubación fue terminada por congelación y los medios fueron almacenados para determinar por RIA específico el Estradiol acumulado después de 3 hrs. Cada barra es la media de 5 muestras; las diferencias fueron determinadas por ANOVA, mostrando un incremento de la producción de E por el efecto de la TC y FK potenciado por el estímulo hormonal. La cantidad del esteroide en estas muestras es mucho mayor que el determinado para las CL tratadas bajo las mismas condiciones.

## C. METABOLISMO DE FOSFATO DE INOSITOL

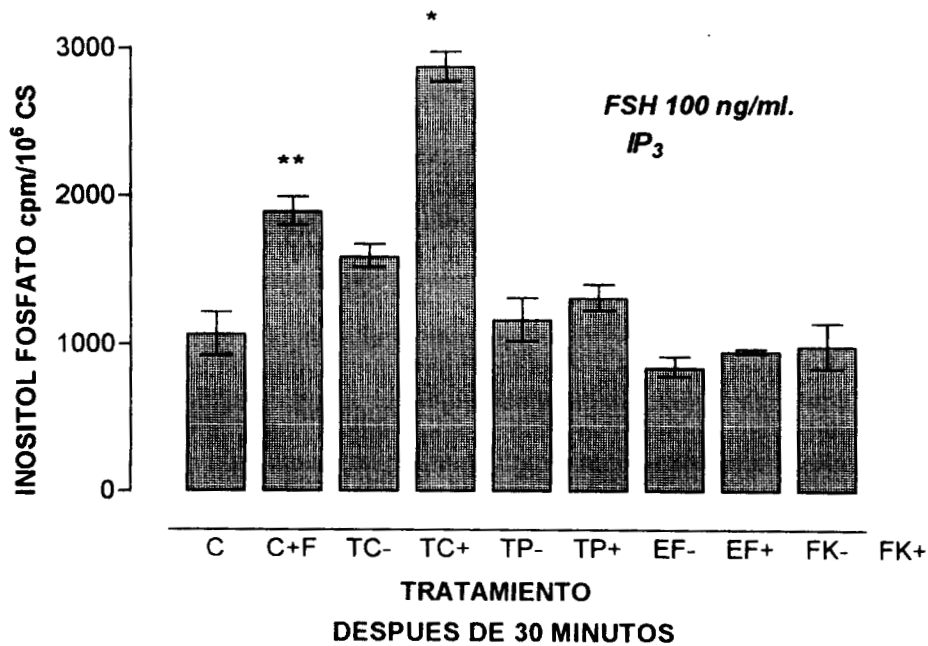
En CS previamente marcadas con  $^3\text{H}$ -myo inositol, la FSH estimuló la formación de fosfatos de  $^3\text{H}$  inositol ( $^3\text{H}$ -IP<sub>1</sub>,  $^3\text{H}$ -IP<sub>2</sub> Y  $^3\text{H}$ -IP<sub>3</sub>) separados por cromatografía de intercambio iónico (Gráfica 18). La formación de IP<sub>3</sub> fue estimulada por la presencia de 100

ng/ml. de FSH ( $1074 \pm 145.89$  control a  $1897.78 \pm 94.04$ ), pero a diferencia de la respuesta de las CL las cantidades de inositoles fosfato determinadas para CS siempre fueron menores para CS siempre fueron menores para CS siempre fueron menores en todos los tratamientos, excepto que para la acumulación del  $IP_1$  las concentraciones fueron mayores para las CS (Gráfica 19).



**GRáfica 18**

Efecto de la hFSH ( 100 ng/ml. ) sobre la acumulación de inositol trifosfato en células de Sertoli. Las células fueron premarcadas 24 hrs. con  $4 \mu\text{Ci}$  / ml. de  $[3\text{-H}]$  myo inositol, en presencia de 10 mM de LiCl. Se muestra la acumulación de  $IP_1$ ,  $IP_2$  e  $IP_3$  en un periodo de 0 - 30 minutos en presencia de la LH, mostrándose la estimulación debida a la acción de la hormona, los inositoles fosfato fueron separados por cromatografía de intercambio iónico. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 5 repeticiones.



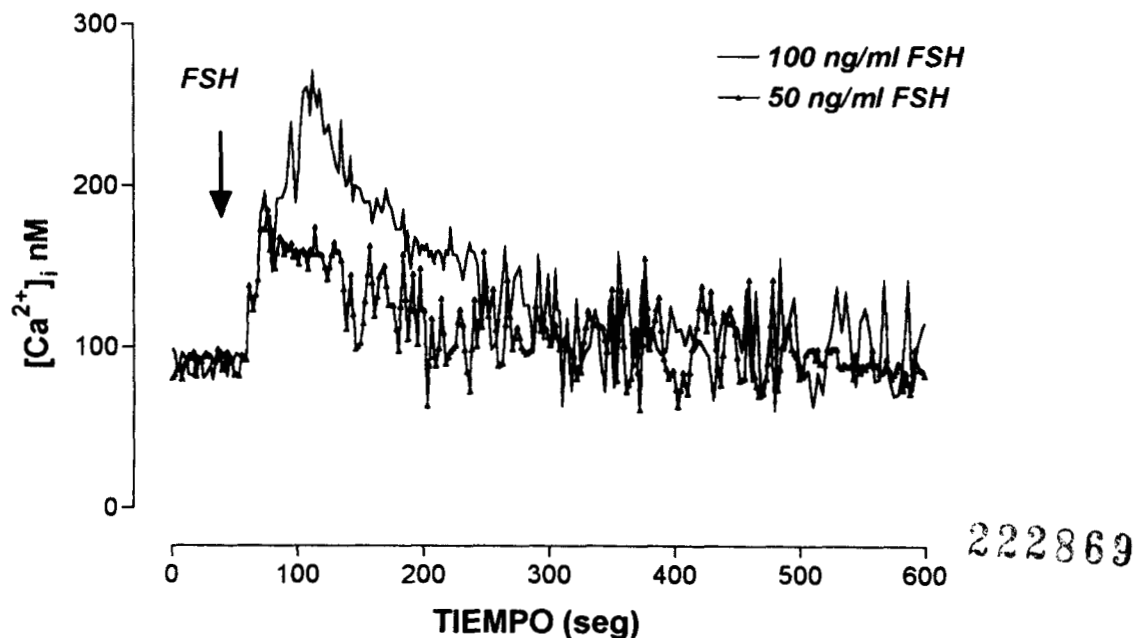
### Gráfica 19

Efecto de la hFSH ( 100 ng/ml. ) sobre la acumulación de inositol trifosfato en células de Sertoli. Las células fueron premarcadas 24 hrs. con 4  $\mu$ Ci / ml. de [3-H] myo inositol, en presencia de 10 mM de LiCl y puestas en presencia de diversos agentes, TC ( 100 ng/ml. ), TP ( 25 ng/ml. ), EF ( 100 ng/ml. ) y FK ( 50 ng/ml. ). La incubación fue a 37°C y detenida por la adición de ácido perclórico y la extracción de los inositoles fosfato se realizo en columnas de intercambio iónico Dowex AG 1-X8, forma formiato, malla 100-200. Cada barra representa la media y la desviación estándar de 5 repeticiones

La TC, activador de los sistemas de proteínas Gs, mostró un incremento para IP<sub>3</sub> estadísticamente significativo con respecto a su grupo control (1074  $\pm$  145.89 a 1594.7  $\pm$  98.78) y en presencia de la FSH la formación de IP<sub>3</sub> se estimulo hasta 2869.7  $\pm$  108.36. En tanto que para la FK las concentraciones no elevó la acumulación de inositoles fosfato de manera significativa.

### D. CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES INTRACELULARES DE CALCIO

En las suspensiones de células la concentración basal de calcio fue 92 nM  $\pm$  3. La FSH puede incrementar las concentraciones de calcio intracelular vía la entrada de calcio extracelular y/o cambios en los reservorios internos; en presencia de 50 ng/ml. de FSH la concentración se elevó hasta mas de 150 nM de calcio y en presencia de 100 ng/ml. la concentración fue de mas de 280 nM, elevaciones en ausencia de calcio extracelular, el medio libre de calcio preparado por la adición de 2.5 mM de EGTA, los cambios fueron detectados a los 2-3 minutos después de la adición de la hormona, lo que indica que para las CS la liberación de calcio de los compartimientos intracelulares es dependiente de la concentración de la hormona. (Gráfica 20).

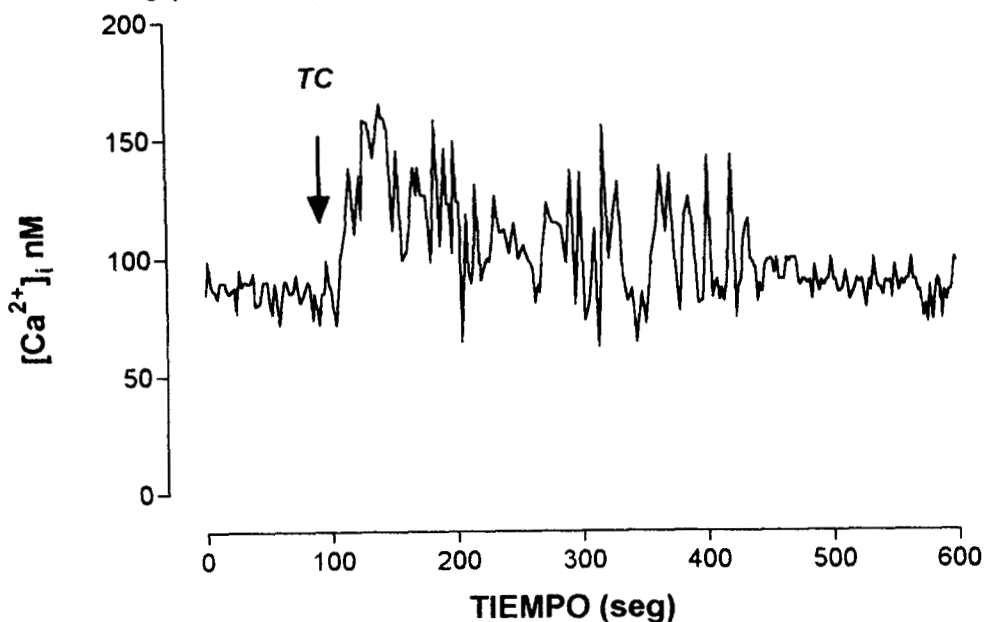




### Gráfica 20

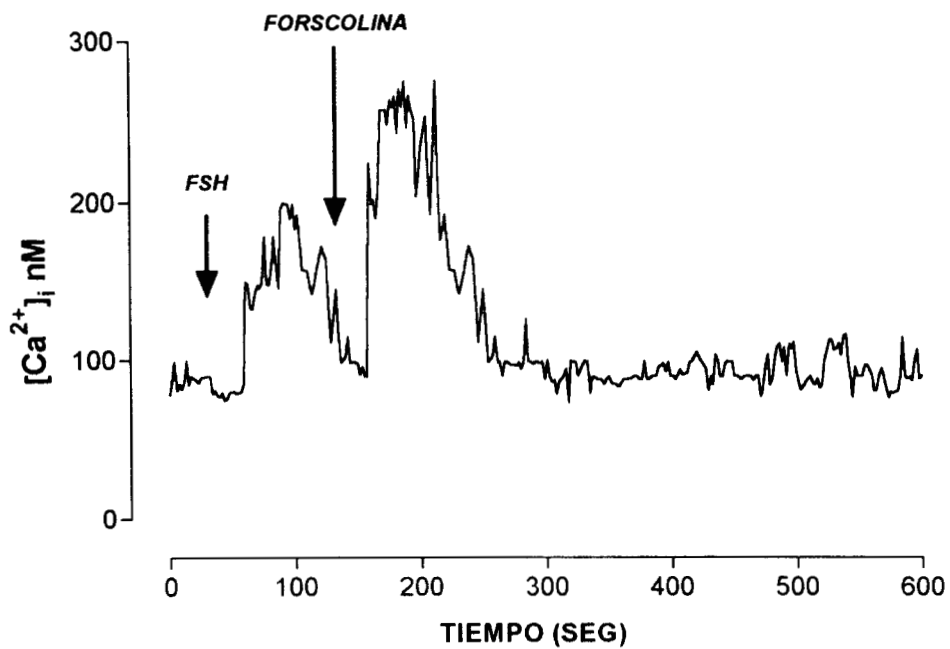
Niveles de Calcio citosólico en CS de rata adulta normal, las CS obtenidas mediante tratamientos enzimáticos y mecánicos fueron incubadas con 20  $\mu\text{M}$  de FURA 2AM y 5 mg / ml. BSA durante 45 min. Alicuotas de la suspensión celular fueron colocadas en el espectrofluorómetro y sometidas a excitación en dos longitudes de onda ( 340 y 380 nm ), y después de la administración de 100  $\mu\text{l}$  del amortiguador (Krebs-HEPES). Los niveles de calcio siempre oscilaron entre 80-98 nM de calcio. Después de la administración de 50 ng / ml. de FSH y 100 ng / ml. de la misma hormona se muestra un efecto dependiente de la concentración. Cada punto de la gráfica representa la media de 3 repeticiones.

La forskolina incremento la concentración de calcio detectadas, casi en 100 nM de calcio con respecto a la modificación inducida por la presencia solo de la hormona (Gráfica 21 ). Un pretratamiento con TP no afectan incrementos de calcio inducidos por FSH, pero si parece modificar las concentraciones de AMPc, estas observaciones sugieren que las proteínas G sensibles a TP parecen estar involucradas en la acción de la FSH sobre la Adenilato Ciclasa pero no en las concentraciones de calcio en CS. Mientras que para la respuesta de las CS en presencia de la TC solo se puede observar una pequeña modificación de aproximadamente 50 nM de calcio, pero a diferencia de las respuestas antes encontradas aquí se muestra una duración de la modificación en la concentración de calcio de hasta 300seg.(Gráfica 22)



### Gráfica 21

Niveles de Calcio citosólico en CS de rata adulta normal, las CS obtenidas mediante tratamientos enzimáticos y mecánicos fueron incubadas con 20  $\mu\text{M}$  de FURA 2AM y 5 mg / ml. BSA durante 45 min. Alicuotas de la suspensión celular fueron colocadas en el espectrofluorómetro y sometidas a excitación en dos longitudes de onda ( 340 y 380 nm ), y después de la administración de 100  $\mu\text{l}$  del amortiguador (Krebs-HEPES). Los niveles de calcio siempre oscilaron entre 80-98 nM de calcio. Después de la administración de 100 ng / ml. de TC, donde se observan modificaciones duraderas de los niveles de calcio intracelular. Cada punto de la gráfica representa la media de 3 repeticiones.



### Gráfica 22

Niveles de Calcio citosólico en CS de rata adulta normal, las CS obtenidas mediante tratamientos enzimáticos y mecánicos fueron incubadas con 20  $\mu$ M de FURA 2AM y 5 mg / ml. BSA durante 45 min. Alicuotas de la suspensión celular fueron colocadas en el espectrofluorómetro y sometidas a excitación en dos longitudes de onda ( 340 y 380 nm ), y después de la administración de 100  $\mu$ l del amortiguador (Krebs-HEPES). Los niveles de calcio siempre oscilaron entre 80-98 nM de calcio. Después de la administración de 50 ng / ml. de FK, donde se observan modificaciones casi de 100 nM de calcio después de la adición de FK. Cada punto de la gráfica representa la media de 3 repeticiones.

## DISCUSION

Muchas investigaciones se han realizado para poder demostrar la participación de uno o varios mediadores intracelulares a la llegada de un estímulo hormonal de naturaleza proteica, como se ha señalado el AMPc parece ser el segundo mensajero en la transducción de las señales dadas por glucoproteínas. Pero además de la participación del AMPc, para la acción de gonadotropinas y de otros factores autocrinos o paracrinos de naturaleza proteica, podrían estar presentes otros mediadores regulando la transducción de la señal, de hecho el objetivo principal de este trabajo, lo constituyó el servir como punto de partida para evaluar la vía de entrada de el factor modulador de la esteroidogénesis de las CL, de alguna manera para poder evaluar cual de las vías podría estar modificando.

El desarrollo de una serie de ensayos de radioligando, en que se emplean receptores celulares tienen que cumplir con ciertas características, de éstas las más importantes representan la afinidad y la especificidad que poseen los preparados, con capacidad selectiva de reconocer conformaciones biológicamente activas de moléculas hormonales. Para muchos derivados hormonales, se ha observado una estrecha correlación entre su actividad biológicas y la correspondiente afinidad por los sitios receptores específicos, sugiriendo que las propiedades de unión y activación de procesos celulares que se encuentran confinadas a un mismo sitio molecular. En cambio, para otros péptidos, tales como ACTH y glucagon (Hofmann y cols, 1974), ha sido posible distinguir regiones características en la activación de la Adenilato Ciclasa.

En el caso de las hormonas glucoproteicas, los residuos de carbohidratos tienen una influencia importante en las características de unión y activación. Para la hCG por ejemplo, se ha mostrado una clara una clara disociación de ambas propiedades a medida que se remueven los carbohidratos de su estructura. Así la eliminación de ácido siálico y galactosa produce una pérdida de la bioactividad. (Tsuruhara y cols, 1972), de tal modo que la calidad de los preparados radiomarcados determinan el éxito de los experimentos de radioligando.

Dentro de condiciones fisiológicas la FSH interactua con un receptor dentro de un medio que contiene 140 mM de NaCl, sin embargo, la actividad biológica "in vitro" normalmente es estudiada en un medio químicamente definido que trata de mimetizar el medio fisiológico. (Reichert y Dattatreymurty, 1989). En contraste, muchos estudios de análisis de receptores son corridos en amortiguadores de fuerza iónica baja, dentro de estas condiciones, la FSH presenta una alta afinidad a su receptor y en presencia de concentraciones fisiológicas de sal, la afinidad se reduce marcadamente. Sin embargo, no queda del todo claro si el cambio es debido a la reducción de la afinidad del ligando a su receptor o al cambio en el número de sitios de unión (Van Loenen y cols, 1994). De tal modo que los bajos porcentajes de unión de la hormona marcada obtenidos en nuestra experiencia, podrían indicar por un lado unión propiamente inespecífica por no aparecer desplazamiento real por la hormona fría o que, tal vez las condiciones del amortiguador utilizado no fueron las mas apropiadas por utilizar concentraciones fisiológicas de NaCl, puesto que recientemente algunos grupos (Van Loenen y cols, 1994) proponen que residuos de ácido aspártico de la segunda región transmembranal

del receptor, involucran una modulación por NaCl para la unión del ligando al receptor acoplado al sistema de proteínas G.

Los residuos de ácido aspártico están muy conservados en los receptores para FSH, LH/CG y TSH y en estas glucoproteínas el Na<sup>+</sup> modula las propiedades de unión al receptor. El Na<sup>+</sup> puede interactuar con el residuo carboxilo de ácido aspártico por medio de alosterismo, impidiendo la unión de ligandos pequeños a regiones particulares del receptor para gonadotropinas. (Strander, 1988; Horsman y cols, 1990; y Quintana y cols, 1993). El Na<sup>+</sup> pudiera inducir una reducción en la interacción de la región transmembranal del receptor pudiendo contribuir un decremento en la afinidad del ligando.

Si las proteínas G pueden regular la respuesta hormonal (Gilman 1984, Spiegel, 1987), entonces la evaluación de las respuestas celulares ante la presencia de los factores utilizados para estudiar los efectos de estas proteínas G resultarían congruentes con las explicaciones encontradas en la literatura. En las preparaciones celulares provenientes de testículos de animales adultos los factores como TC y FK estimularon, como se esperaba, la producción de AMPc y por consiguiente los niveles de los esteroides en las vías disponibles para cada tipo celular; estos efectos fueron potenciados por el estímulo provisto por la gonadotropina correspondiente. En este estudio a diferencia de otros (Warren, 1989), se mostró que en CL incubadas en presencia de TP,-- la cual bloquea la acción inhibitoria dada por la Gi--, no se tuvieron los incrementos significativos de AMPc esperados, esto pudo ser resultado de: (A) El no uso de las supuestas condiciones óptimas que se ofrecen cuando son utilizadas células testiculares de animales inmaduros o irradiados (Hsueh, 1980). (B) Otra posibilidad es que en las condiciones de estudios previos las incubaciones con TP fueron hasta por periodos de 24 horas y en ocasiones hasta por 8 días en cultivo a diferencia de los 90 minutos de nuestro estudio; permitiendo en los primeros, una mayor posibilidad de ADP-ribosilación de las proteínas Gi y por consiguiente de un efecto de la TP, no inhibiendo entonces a la Adenilato Ciclasa y por tanto incrementando los niveles del AMPc, con un incremento consecuente en la respuesta final proporcionada por las células y vista como la producción de esteroides. (C) Que no obstante el haber utilizado las concentraciones manejadas en la literatura, la otra posibilidad sería que las cantidades de TP utilizadas no fueron suficientes para generar la respuesta esperada; 25 ng de la toxina de pertusis que fueron utilizados aparentemente no resultan ser efectivos, considerando que la literatura maneja 100, 200, 400 ng/ml. de la TP, pero cabría la pregunta de ¿ por qué la TC requiere para tener su acción solo de 90 min. de incubación lo que es reportado por el proveedor y que resulta congruente con los resultados obtenidos, si al final ambas son proteína que tienen que encontrar a su proteína específica para su acción, por lo que tendrían ambas que atravesar la membrana. Y (D) posiblemente sería que no se están activando las Gi ya que no agregamos ningún "inhibidor" al medio de cultivo.

Las CL incubadas incrementaron los niveles de AMPc, testosterona y/o estradiol con una estimulación máxima en presencia de la gonadotropina, esto demuestra, en primera instancia, que existe un acoplamiento entre las hormonas utilizadas como estímulo y el receptor de membrana correspondiente y por otra parte la presencia de sistemas de proteínas Gs funcionales en células testiculares de animales adultos; proteínas Gs que son activadas en

periodos cortos de incubación por la TC. Los supuestos sistemas de proteínas Gi, posiblemente requieren de periodos más largos de incubación en presencia de la TP, para que entonces bloquearan su acción, elevando los niveles de los esteroides si el factor hormonal estuviera acoplado para su acción a un sistema de proteínas Gs. Por lo que podemos decir que las gonadotropinas utilizadas en células testiculares de animales adultos pudieran no estar acopladas a un sistema de proteínas Gi. La FK que es un activador directo de la Adenilato Ciclasa y demostró ser el agente que tiene mayor efecto potenciador tanto en la acumulación de nucleótidos cíclicos como en la de esteroides, ya que no realiza al menos los dos pasos previos en la transducción de la señal hormonal, el acoplamiento con el receptor y la activación de un sistema de proteínas G.

Existen múltiples trabajos contradictorios muchos de ellos que indican la existencia de mas de una vía de transducción de células blanco para gonadotropinas y algunos otros sugieren que estos últimos carecen de validez puesto que pasan por alto muchos puntos claves que se deben de experimentar para poder dar una respuesta clara para el entendimiento de la transducción de las señales

En estudios recientes en células FRTL-5 puestas en presencia de PDBu (un activador directo de la PKC) y TSH se encontró que hay una inhibición de la producción de AMPc y en la incorporación de <sup>3</sup>H timidina, estos hallazgos sugieren la posibilidad de que en células FRTL-5, los esteroides de forbol modulan, vía la activación de la PKC, las respuestas mediadas por AMPc pueden ser proximales o distales a los procesos de generación del AMPc (Burch y cols, 1986). El tipo de regulación presente en las células, determina el papel biológico que tiene la PKC, sin embargo la concentración y el tiempo de exposición al éster de forbol necesaria para tener una respuesta máxima y cambios en los tipos de regulación dependen de el sistema celular utilizado. La interacción entre la PKC y las vías PKA, AMPc dependientes y otros mecanismos presentes, pueden estar involucrados en la regulación del crecimiento y los procesos post-generación del AMPc (Burch y cols, 1986).

Resultados de estudios previos no indican la presencia de proteínas Gi funcionales en membranas de CL fetales y los siguientes experimentos han sido diseñados para tener las condiciones óptimas que demuestren la existencia o no del tal regulador transmembranal sobre la función de células de Leydig; es importante señalar que con ese modelo experimental se lleva a condiciones muy especiales.

Davis en 1984 reporta que la hCG estimula la hidrólisis de fosfatos de inositol en células de cuerpo lúteo e incrementa la posibilidad de que la LH y la hCG puedan actuar por medio de incrementos en los niveles de AMPc intracelular, pero también participar en la activación de la PLC con la consecuente formación de inositoles como segundos mensajeros. Algunos de los hallazgos han sido claros y demostraron que cambios en las concentraciones de calcio y de otros segundos mensajeros ocurren en repuesta a la adición de la hormona, pero aún no es claro si los efectos observados se dan como respuesta primaria a la estimulación del receptor o si son secundarios a la formación del AMPc. Cuando se clona el receptor para la LH y se expresa en células que tienen un receptor que estimula a la Adenilato

Ciclasa, no se observan cambios en las concentraciones de fosfatos de inositol o variaciones en calcio, indicando que una de las primeras capacidades primarias del receptor es activar tanto el sistema de Adenilato Ciclasa como la vía de la PLC. Se propone entonces, que la estimulación de Adenilato Ciclasa y de la PLC, son ambas propiedades intrínsecas del receptor, presumiblemente, estas enzimas son reguladas a través de la activación de dos proteínas G independientes (Gs y Gp) (Taylor CW, 1990).

El efecto de las gonadotropinas fue dependiente de la concentración y no se observa respuesta de las CL ante la presencia de FSH ni de las CS en presencia de LH, indicando que dicho efecto se debe a la activación de los receptores propios y exclusivos de cada línea celular. La respuesta a las gonadotropinas o a los diversos factores no fue modificada por la ausencia de iones calcio en el medio extracelular como tampoco lo fue por  $\text{Cd}^{2+}$  un bloqueador inespecífico de canales de calcio, lo cual indica que no se requiere de la entrada de iones calcio para la respuesta inducida por los gonadotropinas.

Resulta difícil dar un único y específico papel al AMPc como respuesta a la llegada de gonadotropinas; se ha visto que a concentraciones bajas de LH (Dufau y cols, 1975), factor de crecimiento epidermal o factor liberador de gonadotropinas, son capaces de estimular la esteroidogénesis sin que se puedan detectar incrementos en los niveles de AMPc, esto no implica necesariamente que los nucleótidos cíclicos no estén implicados en la respuesta de estos agentes, aunque estas observaciones son comparables con esta idea, en relación a esto, cuatro puntos pueden ser nombrados:

- 1.- Resulta difícil que una célula tenga una poza homogénea de AMPc; evidencias directas sugieren que múltiples pozas en CL están presentes (Moger, 1991).
- 2.- No podemos asumir que el AMPc exógeno, pueda tener una distribución con exacta correspondencia con la distribución del nucleótido endógeno. Muchas de las investigaciones realizadas utilizan análogos de AMPc que pueden atravesar la membrana, pero dichos análogos difieren en solubilidad a los nucleótidos naturales, además de poder variar en su distribución y metabolismo, por lo que resulta difícil que la respuesta de los nucleótidos cíclicos y sus análogos sean las mismas.
- 3.- La comparación del umbral y la sensibilidad para gonadotropinas, TC y AMPc resultan de difícil interpretación, por ejemplo, la TC puede tener acceso a los diferentes tipos de proteínas G que pudieran ser estimuladas por las gonadotropinas (Gilman, 1984). Una comparación entre dos o más agentes estimuladores que entran a una vía por diferentes puntos es incierta, no pudiendo elegir al mejor agente estimulador, aun cuando consideremos una célula hipotética con una sola poza de AMPc.
- 4.- Finalmente, la sensibilidad del método que se puede utilizar para la determinación de AMPc, puede no ser el adecuado para encontrar la diferencia en pequeñas variaciones del nucleótido de una sola poza.

Existe definitivamente literatura contradictoria, es decir algunos grupos de trabajo como el Grasso y Reicher indican que de acuerdo a sus estudios la respuesta de gonadotropinas no implica la movilización de calcio, contrario a lo sugerido por Gorczynska y Handelsman, quienes indican que específicamente para FSH si existe la movilización de calcio; de acuerdo con esto otros grupos (Choi y Cooke, 1991) sugieren que el calcio esta involucrado en la síntesis de andrógenos para CL por un mecanismo que involucra canales de  $Cl^-$ . Las células adrenales proveen un interesante ejemplo, en donde las células responde al calcio exógeno con la producción de cortisol, esta respuesta implica la apertura de canales dependientes de voltaje (Yanagibashi y cols, 1989). En contraste con lo que sucede con las células fasciculadas de rata en donde no se encuentra respuesta al calcio exógeno. Evidentemente considerar al calcio como segundo mensajero resulta interesante, pero una interesante aproximación a este problema podría ser el considerar que a concentraciones bajas de las hormonas, donde la correlación entre la síntesis de esteroides y AMPc es pobre, un inhibidor del AMPc decrece la respuesta esteroidogénica para las gonadotropinas, lo que implica el AMPc esta implicado en la respuesta. Sin embargo, el calcio y AMPc están implicados necesariamente en la respuesta máxima para LH y FSH (Pereira y cols, 1987).

El segundo mensajero resultante de la activación de los receptores, el  $IP_3$  difunde al interior de la célula, y al unirse a los receptores específicos, estimula la salida de los iones calcio contenidos en el interior de los depósitos intracelulares, nuestros resultados indican que la gonadotropina induce incrementos en la concentración citosólica de iones calcio, confirmando que dicho efecto fue debido a la estimulación del receptor. La procedencia intracelular del calcio fue establecida en base a dos aspectos experimentales: a) la fase inicial del incremento de calcio no fue afectada de manera significativa por la remoción del calcio del medio extracelular y b) la exposición previa a Tapsigargina, un agente que inhibe la bomba de calcio del retículo endoplásmico y por lo tanto vacía los depósitos intracelulares de dicho ion, abolió la respuesta de las gonadotropinas.

Existen dos mecanismos por los que las células amortiguan el calcio provenientes de los depósitos intracelulares: los iones calcio son introducidos a depósitos intracelulares por la calcio ATPasa del retículo endoplásmico o son excluidos por intercambiadores  $Na^+/Ca^{2+}$  de la membrana plasmática y bombas ATP dependientes. La exclusión de iones Calcio por el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  puede resultar en un incremento intracelular de  $Na^+$  y este incremento tener alguna relevancia en los procesos de liberación de algún producto, de alguna manera parecida a la señal para la liberación de neurotransmisores, que pueden mostrar una correlación con los cambios en el potencial de membrana y/o cambios en la concentración de  $Na^+$  intracelular mas que en  $Ca^{2+}$ .

La función de las oscilaciones en las concentraciones de calcio no han sido completamente definidas (Berridge y Galione, 1987 y Berridge MJ, 1990); posiblemente sea solo una manifestación del complejo mecanismo con el que cuentan las células para mantener la homeostasis del calcio. Sin embargo, la información recabada hasta el momento no es suficientemente importante y contundente como para pensar en otras alternativas, aún inexploradas, que modificarían significativamente las ideas corrientes sobre las señales

hormonales. En principio, podemos suponer que las oscilaciones en las concentraciones de calcio son parte del mecanismo de la señal hormonal, además, como la intensidad de la señal hormonal se refleja en la frecuencia de las oscilaciones y no en la amplitud de la elevación del calcio, por lo cual la señal no sería analógica sino digital (Berridge y Galione, 1987 y Berridge MJ, 1990). Una señal digitalizada facilita, por un lado, una información más precisa, puesto que los incrementos de calcio en forma oscilatoria permiten que el mensaje se transmita por oscilaciones en la frecuencia, hecho que coincide con las observaciones experimentales de variación en la frecuencia por cambios en las concentraciones de las hormonas.

Recientemente se ha propuesto un modelo matemático para explicar los osciladores citosólicos de calcio (Somogyi y Stucki, 1991). Dicho modelo analiza la homeostasis del calcio mantenida por el equilibrio de las bombas de calcio que remueven el calcio citosólico tanto al exterior de la célula como al interior de los reservorios intracelulares y los flujos pasivos de calcio hacia el citoplasma provenientes de los reservorios intracelulares y del espacio extracelular. El modelo plantea además la existencia de un canal de calcio localizado en la interfase del REL y con el citoplasma controlado por el  $IP_3$ , CAM y calcio, junto con la participación de un solo reservorio sensible a  $IP_3$ . La salida de calcio a través del canal es función directa del  $IP_3$  pero el calcio por sí mismo es capaz de controlar el canal por una función autocatalítica de la concentración citosólica del ion; se sugiere que la CAM media este mecanismo de retroalimentación. La acción de la CAM sobre el canal de calcio podría estar dada por una acción directa de esta proteína sobre el canal o podría ser que el complejo  $Ca^{2+}$ -CAM activaría a una proteína cinasa o a otro mediador que fuera entonces el encargado directo de controlar el canal de calcio. La mayor parte de los datos, incluyendo este modelo favorecen la hipótesis de que el oscilador es controlado por el segundo mensajero por un mecanismo de retroalimentación positiva, en el que el calcio induce su propia liberación. En apoyo de esto último, recientemente se encontró que la fase de liberación de calcio puede ocurrir sin la participación del  $IP_3$  (Rooney y cols, 1991). El descubrimiento de los osciladores de calcio proponen el reconsiderar los conceptos establecidos sobre señales hormonales para avanzar en la penetración y disección de las bases moleculares de este fenómeno y, en general en la comprensión de la comunicación celular. Sin embargo, muchas interrogantes están aún sin respuesta; es necesario definir en primer lugar la función de las oscilaciones de calcio, establecer un planteamiento para descodificar una señal de este tipo, penetrar en la estructura celular que favorece el viaje de estas oscilaciones y definir las posibles relaciones con otros mecanismos de transducción.

Los resultados de estos estudios indican que, además de un incremento en los niveles de AMPc, la LH provoca un incremento rápido en la acumulación de  $IP_3$ . El tiempo que transcurre del experimento revela que el incremento en los niveles de fosfoinosítoles, incrementa en principio los niveles de  $IP_3$ . Mas aún la tasa inicial de la formación de  $IP_3$  es mayor que la tasa de formación de  $IP_2$ , lo cual sugiere que uno de los primeros efectos de la LH sobre el metabolismo de los inosítoles fosfato, es la hidrólisis del  $PIP_2$ , y es posible además que la LH estimule la formación de  $IP_2$  directamente del rompimiento del  $PIP_2$  o que el  $IP_2$  sea el producto de la degradación del  $IP_3$ . El marcado incremento en los niveles de  $IP_3$ , posiblemente reflejan la degradación de  $IP_3$  e  $IP_2$ .



El efecto de la LH sobre el metabolismo de los fosfoinositoles, aparentemente no es mediado por un incremento en los niveles de AMPc (Davis y cols, 19871 y Davis JS, 1992), esto sugeriría aparentemente que el receptor para la LH, media el incremento de AMPc y el metabolismo de fosfoinositoles a través de dos vías de transducción separadas. Pero hay varios estudios que demuestran aparentemente que hormonas como el glucagon o la ACTH, hormonas clásicamente descritas como de las acopladas al sistema de activación de la Adenilato Ciclasa y formación de AMPc, muestran que también se pueden observar incrementos en los niveles de inositoles fosfato. A concentraciones de hormona bajas donde apenas algunas respuestas fisiológicas son observadas, un incremento máximo en los niveles de inositoles fosfato fue demostrado y un incremento también considerable de AMPc fue detectado. Aparentemente la LH estimula la respuesta para la formación de AMPc e IP<sub>3</sub>. Esto sugiere que un solo tipo de receptor es responsable de mediar la respuesta de LH

Sobre la base de los resultados la secuencia de eventos para la liberación de factores paracrinos puede ser como sigue: activación de los receptores para las gonadotropinas que pueden estimular la formación de los fosfatos de inositol, movilización de calcio intracelular y la síntesis y secreción de los múltiples factores.

La posibilidad de que la FSH fuera modulada por una vía de fosfolípidos Calcio dependientes fue evaluada en cultivos de células de Sertoli. Las CS fueron metabólicamente marcadas y la acumulación de inositoles fosfato (<sup>3</sup>H inositol mono, di y trifosfato), fueron medidos por extracción y fraccionamiento sobre cromatografía de intercambio iónico.

Esta ya establecido que la ocupación de los receptores para las gonadotropinas activan vías dependientes de AMPc y que esta activación, media muchas respuestas biológicas observadas en las células blanco. De otra manera es menos clara la posibilidad de que el efecto de las gonadotropinas pueda ser mediado por el sistema de señalización del Calcio. Ha sido reportado que la LH regula la síntesis de fosfolípidos en CL y CG y que en estos tipos celulares existen cambios en los flujos de Calcio en respuesta a la estimulación de la LH. Es establecido también, que la manipulación del calcio intra y extracelular afecta la tasa de algunos pasos limitantes en las vías esteroidogénicas, en donde la fosforilación de proteínas particulares pueden regular la activación de algunas enzimas claves de la vías esteroidogénicas.

Se demuestra claramente que los EF producen una rápida inhibición de la activación inducida por la gonadotropina sobre el sistema de la PLC y la acumulación de inositoles. El efecto fue específico para sobre la PKC, pero aparentemente no puede ser tóxico, al no alterar la formación:

- 1.- de AMPc inducida por la gonadotropina
- 2.- Producción de Esteroides
- 3.- La incorporación de inositol 3-H en las células tratadas.

La acción inhibitoria del EF sobre la acumulación de inositoles inducida por la gonadotropina puede ocurrir en varios sitios:

- 1.- El EF puede estar involucrado en un incremento en el metabolismo de los inositoles.
- 2.- El efecto inhibitorio del EF sobre la acumulación de  $IP_3$ , ha sido manejado como resultado de la fosforilación mediada por PKC y la activación de  $IP_4$  e  $IP_5$ .
- 3.- El efecto inhibitorio del EF sobre la acumulación de  $IP_3$  inducida por las gonadotropinas, no es asociada con un incremento en la acumulación de  $IP_1$  e  $IP_3$ .

Un segundo sitio de inhibición por la acción del EF puede involucrar la reducción en los niveles del sustrato ( fosfolípidos de inositol), la posibilidad existe sin embargo, la inhibición selectiva del EF sobre la poza de fosfolípidos. Otro sitio de regulación puede estar en la línea de la señal de transducción esto es, el receptor de la hormona, una proteína G, o la misma PLC. Las bases de esta hipótesis ha sido sugerida por varias observaciones en que el EF inhibe la formación de inositoles inducida por un agonista y de manera tejida selectiva ( Davis JS, 1992), esto es el EF puede inhibir a agentes  $\alpha$  adrenérgicos, pero no la respuesta dada por angiotensina II (Nishizuka Y, 1989). Contrariamente el EF no interfiere en la unión de la hormona al receptor o en la reducción de la capacidad para estimular la formación de AMPc.

Estos argumentos indican que el EF puede inducir una modificación funcional del complejo hormona receptor que pudiera interferir en el acoplamiento con la PLC, sin embargo, mecanismos adicionales pudieran estar involucrados. Recientes estudios indican que isoformas de PLC y diferentes clases de proteínas G están involucradas en la formación de inositoles fosfato que son estimuladas por hormonas.

Los resultados demuestran que modificaciones en la vía estimulada por gonadotropinas y que dirige la formación de AMPc, la formación de fosfoinositoles y la movilización de calcio, puede estar asociada a los cambios en los niveles de esteroides.

El involucrar al calcio y los fosfoinositoles en el mecanismo de transducción de la señal de FSH, es análogo al papel que juega la LH, que ha sido mas ampliamente estudiada. Tanto la LH como la FSH están fuertemente relacionadas, ambas son glucoproteínas con la porción  $\alpha$  idéntica y una alta homología en la subunidad  $\beta$ , con receptores de superficie ligados al sistema de proteínas G. Ambas hormonas y sus receptores son derivados de genes ancestrales comunes (Gorczyńska y Handelsman, 1991), esto podría sugerir que sus mecanismos de transducción podrían estar preservados. Recientes investigaciones sugieren que el calcio involucrado en el mecanismo de transducción de la señal de LH puede ser una alternativa al mecanismo de transducción primario mas que una simple señal de amplificación.

222869

## CONCLUSIONES

- 1.- La generación de AMPc intracelular después de la interacción de la hormona con sus receptores es considerada como la principal vía de transducción de la señal, pero gran cantidad de información sugiere que múltiples vías de señalización pueden estar estimuladas por una sola hormona.
- 2.- En las preparaciones celulares provenientes de testículos de animales adultos los factores como TC y FK estimularon, como se esperaba, la producción de AMPc y por consiguiente los niveles de los esteroides en las vías disponibles para cada tipo celular; estos efectos fueron potenciados por el estímulo provisto por la gonadotropina correspondiente.
- 3.- Las CL incubadas incrementaron los niveles de AMPc, testosterona y/o estradiol con una estimulación máxima en presencia de la gonadotropina, esto demuestra, en primera instancia, que existe un acoplamiento entre las hormonas utilizadas como estímulo y el receptor de membrana correspondiente y por otra parte la presencia de sistemas de proteínas Gs funcionales en células testiculares de animales adultos; proteínas Gs que son activadas en periodos cortos de incubación por la TC.
- 4.- Los supuestos sistemas de proteínas Gi, posiblemente requieren de periodos más largos de incubación en presencia de la TP, para que entonces bloquearan su acción, elevando los niveles de los esteroides si el factor hormonal estuviera acoplado para su acción a un sistema de proteínas Gs.
- 5.- Por lo que podemos decir que las gonadotropinas utilizadas en células testiculares de animales adultos pudieran no estar acopladas a un sistema de proteínas Gi.
- 6.- Algunos de los hallazgos han sido claros y demostraron que cambios en las concentraciones de calcio y de otros segundos mensajeros ocurren en respuesta a la adición de la hormona, pero aún no es claro si los efectos observados se dan como respuesta primaria a la estimulación del receptor o si son secundarios a la formación del AMPc.
- 7.- Sobre la base de los resultados la secuencia de eventos para la liberación de factores paracrinicos puede ser como sigue: activación de los receptores para las gonadotropinas que pueden estimular la formación de los fosfatos de inositol, movilización de calcio intracelular y la síntesis y secreción de los múltiples factores.

## BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Martin, F and Watson, D.** 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 5rd. ed. Garland Publishing. Inc. NY. p.p 690-712.
- Andreoli, E., Hoffman, F., and Fanestil S.** 1987. *Membrane Physiology. The Interaction of Hormones with Biological Membranes*. Second Edition. Plenum Medical. N.Y. pp 355-367.
- Bermúdez, J.A., León, C.J., y Herrera, J.**1975. *Fundamento y Estudio Comparativo de dos Métodos de Análisis por Saturación*. Rev Med. IMSS. 101.:639-642.
- Bermúdez, J. A., Mendieta E., y Herrera J.** 1988. *Evaluación de los métodos de Aislamiento y Purificación de Células de Leydig y Sertoli*. Arch. Inv. Med. 19:291.
- Berridge, M.J.** 1987. *Inositol Triphosphate and diacylglycerol; Two interacting second messenger*. Annu. Rev. Biochem. 56:159-93.
- Berridge, M.J., y Galione, A.** 1987. *Cytosolic calcium oscillators*. FASEB J. 2: 3074-3082.
- Berridge, M.J.** 1990. *Temporal aspect of calcium signalling*, in Y. Nishizuka, M. Endo y C. Tanaka (Eds.) *The Biology and Medicine of Signal Transduction*. Raven Press, New York. pp. 108-114.
- Berridge, M.J.** 1993. *Inositol thiphosphate and calcium signalling*. Nature; 361: 315-325.
- Burch, R.M., Luini, A., and Axelrod, J.** 1986. *Phospholipase-A2 and Phospholipase-C are activated by different GTP binding proteins in respose to  $\alpha$ 1 adrenergic stimulation in FRTL-5 thyroid cells*. Proc Natl Acad Sci USA. 83:7201-7205.
- Cassel, D., and Selinger, E.** 1986, *Basement Membrane Increase G-Protein Levels and Follicle- Stimulating Hormone Responsiveness of Sertoli Cell Adenylyl Cyclase Activity*. Arch. Biochem Biophys 252:538-551.
- Castellon, E., Janecki, A., and Steiberg, A.** 1989. *Age-Dependend Sertoli Cells Responsiveness to Germ Cells In Vitro*. International Journal of Andrology. 12:439-450.
- Catt, K.J., Tsurahara, J., Mendelson, C., and Dufau, M.**1974. *Gonadotropin Binding and Activation of the Interstitial Cell of the Testis*. In: Dufau M.L (ed), *Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis*. Plenum Press, NY, pp 1-30.
- Choi, M.K., and Cooke, B.A.** 1991. *Evidence for Two Independent Pathways in Stimulation of Steroidogenesis by Luteinizing Hormone Involving Chloride Channels and Cyclic AMP*. FEBS Lett. 261:402-404.
- Davis, J.S., Weakland, I., Farese, R., and West, I.** 1987. *Luteinizing Hormone Increase Inositol Trisphosphate and Cytosolic Free  $Ca^{2+}$  in Isolates Bovine Luteal Cells* . J. Biol. Chem. 262:8515-8521.
- Davis, J.S.**1992. *Modulation of Luteinizing Hormone-Stimulated Inositol Phosphate Accumulation by Phorbol Esters in Bovine Luteal Cells*. Endocrinology, 131:749-757.

- Dattatreya**murty, B., **Sehneyer**, A., and **Reichert**, E. 1986. Physical and Functional Association of Follitropin Receptor With Cholera Toxin-Sensitive Guanine Nucleotide-Binding Protein: *J. Biol. Chem.* 262:11737-45.
- Drummond**, G. 1983. *Advances in Cyclic Nucleotide Research* 15, Greenand, P, and Robinson GA, (eds). Raven Press N. Y. pp 373
- Dufau**, M.L., **Horner**, K.A., **Hayashi**, K., **Tsuruhara**, T., **Conn**, P.M., and **Catt**, K.J. 1975. Actions of the Cholera toxin and Gonadotropin in Isolated Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 253:3721-3729.
- Dufau**, M.L. 1988. Endocrine Regulation and Communicating Functions of the Leydig Cell. *Ann. Rev. Physiol.* 50:483-508.
- Dwight**, W., and **Warren**, M. 1989. Development of the Inhibitory Guanine Nucleotide-Binding Regulation Protein in the Rat Testis. *Biol. Reprod.* 40:1208-1214.
- Eberhard**, D.A., and **Holz**, R.W. 1988. Intracellular  $Ca^{2+}$  activates phospholipase C. *Trends Neurosci*; 11:517-520.
- Ewing**., R, and **Keeney**, P. 1993. Evidence that the FSH Receptor itself is not a Calcium Channel. *Endocrinology* 131 2: 979-981.
- Exxon**, J.H., **Taylor**, S.J., and **Augert**, G. 1991. Cell Signaling through Phospholipid break down. *Mol Cell Biochem* 104:81-86.
- Fawcett**., D.W. and **Burgos** 1989. Studies on the fine structure of the mammalian testis. *Amer J. Anat* 107:245
- Gilman**, A. C. 1984. G Protein and Dual Control of Adenylate Cyclase. *Cell* 36:577-79.
- Gorczyńska**, E., and **Handelsman**, D. 1991. The Role of Calcium in Follicle-Stimulating Hormone Signal Transduction in Sertoli Cells. *J. Biol. Chem.* 266:23739-23744.
- Graasso**, P., and **Reichert**, L.E. 1990. Follicle-Stimulating Hormone Receptor-mediated Uptake of  $^{45}Ca^{2+}$  by Culture rat Sertoli Cells does not require activation cholera toxin- or pertussis toxin- sensitive guanine nucleotide binding proteins or adenylate cyclase. *Endocrinology* 127:949-956.
- Grynkiewicz**, G., **Ponie**, M., and **Tsien**, R.Y. 1985. A New Generation of Calcium Indicator with Greatly Improved Fluorescence Properties *J. Biol. Chem.* 6: 3440-3450
- Hall**, S.H., and **Freneh**, F.S. 1990. Follicle -Stimulating Hormone Regulation of Androgen Binding Protein Messenger RNA in Sertoli Cell. *Mol. Endocrinol.* 4:349-55.
- Herrera**, J., **Mendieta**, E., and **Bermúdez**, J.A. 1988. Sertoli Cell Conditioned Medio (SCCM) Modulate and Androgen Biosynthetic Pathway in Rat Leydig Cell (CL) Primary Cultures. XXVIII Reunión Anual de la Soc. Mex. de Nutrición y Endocrinología. Guanajuato, Mex.
- Herrera**, J., **Mendieta**, E., and **Bermúdez**, J.A. 1996. Sertoli Cell Conditioned Medio Modulate the Androgen Biosynthetic Pathway in Leydig Cell. *Arch of Androl.* 37: 127-133
- Hofmann**, K., **Montibellerja**, R., and **Finn**, F. Transmembrane Signalling Pathways initiating Cell Growth. *Procc. Natl Acad Sic* 71:80 1974.
- Horsman**, D.A., **Brandon**, S., **Wilson**, A.L., **Guyer**, C.A., **Cragoe**, J.E., and **Limbird**, L.E. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 21590-21596.

- Hsueh, A.J.** 1980. Gonadotropin Stimulation of Testosterone Production in Primary Culture of Adult Rat Testis Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97:156-168.
- Huhtaniemi, I.** 1993. Hormonal Control Mechanisms of Leydig Cell, en Kretser, D (Eds). *Molecular Biology of the Male Reproductive System.* Academic Press, San Diego, California pp. 383-403.
- Jacobowitz, O., Chen, J., and Premont, R.T.** 1993. Cellular Basic for FSH Stimulated Calcium Signaling Rat Sertoli Cells: Possible Dissociation from Effects of ADENOSINE 3'5'-Monophosphate. *J. Biol. Chem* 268:3829-3832.
- Jegou, B.** 1991. Spermatids are Regulators of Sertoli Cells Function. *The Male Germ Cells: Spermatogonium to Fertilization.* J. of Andrology. 637:340-353.
- Katada, T., Kusakabe, M., and Oinuma, M.U.** 1987. Protein Kinase C and Gi protein mediated modulation of cAMP production in different stages of the rat seminiferous epithelium. *J. Biol. Chem.* 262,11897-11900.
- Kew, D., Muffly, K., and Hall, P.** 1986. Plasma Membranes for Rat Sertoli Cell: Purification and Properties. *Biol. Reprod.* 35:1235-47.
- Kisinger, C., and Skinner, M.K.** 1982. Analysis of Sertoli Cell Secreted Protein by two-dimensional gel Electrophoresis. *Biol. Reprod.* 27:233-46.
- Laurent-Cadoret V and Guillou F.** 1995. Mecanismes moléculaires de stimulation et désensibilisation de la cellule de Sertoli par l'hormone folliculo-stimulante. *Reprod Nutr Dev* 35: 213-235.
- Liao, J.A and Conti M.** 1982. Modulation of cellulat response by hormones: role of cAMP specific, rolipram-sensitive phosphodiesterases. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 100:75-79.
- Lowry, D.H., Rosebrough, A.L., and Farr, A.** 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mather, J.D., Gonsalus, G.L., and Perez Infante, V.** 1983. The Hormonal and Cellular Control of Sertoli Cell Secretion. *J. Steroid. Biochem.* 19:41-48.
- Moger, W.H., and Anawke, O.** 1983. Efects of Forskolin on Androgen Production by Mouse Intestinal Cell in vitro. Interaction with Luteinizing Hormone and Isoproterenol. *Biol. Reprod.* 29:932-937.
- Moger, W.H.** 1991. Evidence for compartmentalization of adenosine 3' 5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein Kinase in rat Leydig cell using site selective cAMP analogs. *Endocrinology* 128:1414-1418.
- Monaco, L., Adamo, S., and Contri, M.A.** 1988. Follicle-Stimulating Hormone Modulation of phosphoinositide turnover in the Inmature rats. *Endocrinology.* 123:2032-2039.
- Nakhal, A.M., Mather, J.D., and Randall, G.R.** 1984. Estrogen and Androgen Receptors in Sertoli, Leydig, Myoid and Epithelial Cell: Efect of time in Culture and Cell Density. *Endocrinol.* 115:121-131.
- Nishizuka M.** 1986. ANEW Role for Follicle Stimulating Hormone in the Regulation of Calcium Flux in Sertoli Cells. *Endocrinology* 128:1 158-164.
- Nishizuka, Y.** 1989. The Family of Protein Kinase C for Transduction. *JAMA* 262:1826-1833.
- Papadopoulos, V., Kamtchoving, M.C., and Arreau, S.** 1986. Adult Rat Sertoli Cells Secrete Factor (s) Which Modulate Leydig Cell Function. *J. Endocrinol.* 114:459-467.
- Parvinen, M.** 1982. Regulation of the Seminiferous Epithelium. *Endocrine. Reviews.* 3:404-417.

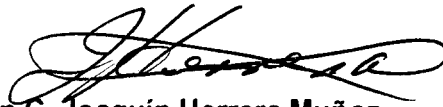
- Pereira, M.E., Segafol, D.L., Ascoli, M., and Eckstein, F.** 1987. Inhibition of choriogonadotropin-activated steroidogenesis in culture Leydig tumor cell by the Rp diastereoisomer of cAMP. *J. Biol. Chem* 262:6093-6100.
- Peter, C., Leung, K., and Wang, J.** 1989. The role of lipid metabolism in the ovary. *Biol. Reproduction*, 40:703-708
- Quintana, J., Wang, H., and Ascoli, M.** 1993. Evidence for Dual Coupling of the Murine Luteinizing Hormone Receptor to Adenylyl Cyclase and Phosphoinositide Breakdown and Calcium Mobilization. *Mol. Endocrinol* 7: 767-775.
- Reichert L.E. Dattatreya Murty M.** 1989. The Follicle Stimulating Hormone (FSH) Receptor in Testis; Interaction With, Mechanism of Signal Transduction, and Properties of the Purified Receptor. *Biol. Reprod.* 40:13-26.
- Robertson, D.M., Risbridger, G.P., and Kretser, D.M.** 1993. Inhibin and Inhibin-Related Protein, en Desjardins y C, Ewing L. (Eds). *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Oxford University Press. New York. pp 220-237
- Rommerts, F.G., Teerds, A., and Van, N.** 1987. Multiple Regulation of Testicular Steroidogenesis. *J. Steroid. Biochem.* 27:309-316.
- Rodbell, M., Birnbaumer, S.L., Pohl, H.K., and Krans, S.** 1983. Kinetics of Cytosolic Calcium and Aldosterone Responses in Rat Adrenal Glomerulosa Cells. *Endocrinology* 129: 5 2431-2441.
- Rooney, T.A., Sass, E.J., and Thomas, A.P.** 1990. Agonist-induced cytosolic originate from a specific locus in single hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 265:10792-10796.
- Saez, J.M., Peerrad-Sapori, M.H.** 1987. Paracrine regulation of testicular function. *J. Steroid. Biochem.* 27: 317-329.
- Scatchard, G.** 1949. The Attraction of Protein for small molecules and ions. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 51: 660-672.
- Strader, C.D. Sigal, I.S. y Dixon, R.A.F.** 1989. Protein Kinase C activation and calcium mobilization decrease prolactin release. *FASEB J.* 3: 1825-1832
- Syed, V., Khan A, Lindn L.** 1988. Mechanism of Action of the Factors Secreted by Rat Seminiferous Tubules and Inhibiting Interstitial Cell Testosterone Production "in vitro". *Acta Endocrinol.* 119:425-34.
- Shapiro, L. A., Maizel B. J.,** 1969. Molecular weight estimation of Polypeptides by SDS-Polyacrylamide gel Electrophoresis: Further date concerning Resolving power and general considerations. *Anal. Biochem.*, 29: 505-514.
- Sharpe, RM., Maddocks, S., Millar, M., and McKinnell, C.** 1992. Testosterone and Spermatogenesis: Identification of Stage-Specific, Androgen Regulated Proteins Secreted by Adult Rat Seminiferous Tubules. *J Andrology.* 13:174-184.
- Skinner, M.K.** 1991. Cell-Cell Interactions in the Testis. *Endocr Rev* 12:45-65.
- Somogy, P.** 1981 Vertical Organization of Neurones Accumulating GABA in Visual Cortex of Rhesus Monkey. *Nature*, 294:761-763.
- Syed, V., Khan, A., and Lindn, L.** 1988. Mechanism of Action of the Factors Secreted by Rat Seminiferous Tubules and Inhibiting Interstitial Cell Testosterone Production in vitro. *Acta Endocrinol.* 119:425-34.

- Taylor, C.W.** 1990. The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem J.* 272:1-13
- Van Loenen, H.J., Flinterman, J.F., and Rommerts, F.G.** 1994. Follicle-stimulating hormone stimulates rat Sertoli cell via relatively low affinity binding sites. *Endocrine* 2: 1023-1029.
- Warrent, D.W.** 1989. Development of the Inhibitory Guanine Nucleotide-Binding Regulatory Protein in the Rat Testis. *Biol. Reprod.* 40:1208-14.
- Welsh, M.J., and Wiebe, J.P.** 1975. Rat Sertoli Cell. A Rapid Method for Obtaining Viable Cell. *Endocrinology.* 96:618.
- Welsh, M., Ireland, M.E., and Treisman, G.J.** 1985. Stimulation of Rat Sertoli Cell Adenylate Cyclase by Germ Cells "in vitro". *Biol. Reprod.* 33:1050-56.
- Wilson, J.D., and Foster, D.W.** 1992. *Williams Textbook of Endocrinology.* 8th Edition, W.B. Saunders.
- Wright, W.W., Parvienem, A.S., Mater J.D., and Bardin, C.W.,** 1983. Identification of state specific protein synthesis by rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.,* 29: 257-270.
- Yanagibashi., A, Kleinman, K, Lamsan, C.** 1989. Basement Membrane Increases G-Protein Levels and follicle Stimulating Hormone Responsiveness of Sertoli Cell Adenylyl Cyclase Activity. *Endocrinology* 128 2: 1167-1176.

222869



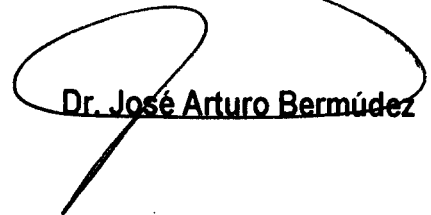
**El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 28 del mes de Noviembre de 1997.**



**M en C. Joaquín Herrera Muñoz**



**M en C. Enrique Mendieta Marquez**



**Dr. José Arturo Bermúdez**