

DETECCION DE LA ACTIVIDAD SECRETORA INDIVIDUAL EN
CELULAS DE LEYDIG DE RATA. FACTORES DE REGULACION
EN LA SECRECION DE ESTEROIDES.

Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas

FACULTAD DE CIENCIAS

por

HECTOR ALEJANDRO INOSTROZA ROBLES

Diciembre de 1992

Director de Tesis: Prof. Ana María Pino Zúñiga.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias
que la Tesis de Magister presentada por el Candidato

HECTOR ALEJANDRO INOSTROZA ROBLES

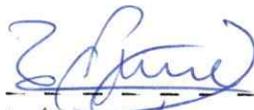
ha sido aprobada por la Comisión Informante de tesis como
requisito de tesis para el Grado de Magister en Ciencias
Biológicas con mención en Biología Celular y del Desarrollo.

Director de Tesis
Dra. Ana María Pino Zúñiga

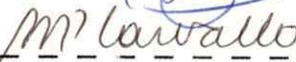


Comisión Informante de Tesis

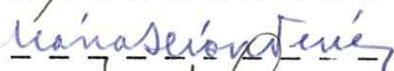
Dr. Marco Tulio Nuñez



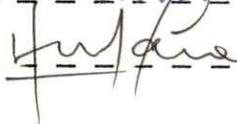
Dra. Pilar Carvalho



Dra. María Serón-Ferré



Dr. Hernán Lara



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el logro del esfuerzo y la perseverancia personal. Sin embargo, esta dedicación siempre estuvo tamizada de la colaboración y participación de muchas personas.

Quiero inicialmente mencionar a mis padres, a quienes principalmente debo este logro y a quienes dedico esta tesis. Ellos sembraron en mi la semilla del espíritu de superación y la perseverancia, herramientas vitales para vivir en la competencia de la vida. Así mismo quiero dedicar esta tesis a mi hijo Esteban, quien ha dado un nuevo, definitivo y hermoso trasfondo a mi vida. A él que comienza a vivir.

En segundo lugar, es momento de reconocer también la fundamental colaboración y guía de la Dra. Ana María Pino, de quien he aprendido la disciplina y la rigurosidad del trabajo científico durante la tesis que dirigió. Su desinteresada ayuda y su labor docente son merecedores del reconocimiento público más destacado.

Cabe además destacar la colaboración de mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología de la Reproducción; la preocupación, el compañerismo y la amistad

más allá del trabajo y la discusión, me han permitido crecer como persona, parte importante en la formación científica.

También quiero reconocer a muchos otros amigos y compañeros que en su momento y en la circunstancia que fue importante, me alentaron cuando creí que desfallecía, me aconsejaron cuando creí que hacía lo correcto y me entregaron amistad en momentos que requerí de ello. A todos ellos, muchas gracias.

A varios profesores que conocí durante mi formación de post-grado y que llegué a sentir en forma especial por su aporte y preocupación sin prejuicios ni intereses: el Dr. Luis valladares B., el Dr. José Minguell, al Dr. Miguel Llanos S., Al Dr. Alejandro Hernández K. y Hernán Pérez T.

Corresponde mencionar finalmente, que este trabajo pudo ser desarrollado gracias al aporte y financiamiento de los Proyectos Fondecyt # 973/88, y # 466/92 y Beca de Financiamiento de tesis de Post-Grado # 030-91 de la Universidad de Chile.

INDICE DE MATERIAS.

- INDICE DE FIGURAS	VI
- INDICE DE TABLAS	IX
- LISTA DE ABREVIATURAS	X
- RESUMEN	1
- SUMMARY	6
- INTRODUCCION	10
- MATERIALES Y METODOS	26
1. Animales	26
2. Reactivos	26
3. Soluciones tampón y medios de incubación	27
4. Antisueros	29
5. Obtención de células intersticiales	30
6. Conteo de células	32
7. Purificación de las células de Leydig	32
a) Purificación en gradiente discontinua de Percoll 40-90%	32
b) Purificación en gradiente continua de percoll 10-80%	34
c) Tinción citoquímica específica para células de Leydig	35
d) Determinación de la viabilidad celular	37
8. Obtención de sangre de animales como fuente del complemento y para lavado de eritrocitos.....	37

a) Obtención de suero como fuente del complemento	38
b) Lavado de eritrocitos de cordero y acopla- miento a proteína A	38
9. Estudios de unión de testosterona y de hemólisis de eritrocitos mediada por complemento, en células en suspensión	40
a) Incubaciones de eritrocitos con [³ H]-testosterona. Especificidad de la unión del esteroide a la superficie de los eritrocitos, efecto de la concentración de antisuero y del complemento	41
b) Medición de la hemoglobina presente en el medio de incubación por efecto de la hemólisis	42
10. Ensayo de Placa Hemolítica reversa (RHPA)	43
a) Construcción de cámaras de reacción para el RHPA	43
b) Co-incubación en las cámaras de reacción de glóbulos rojos-proteína A y células de Leydig purificadas	45
c) Ensayo de placa hemolítica reversa	45
11. Obtención de resultados y estadística	47
- RESULTADOS	51
I) Adaptación del RHPA para la secreción de esteroides	51
1. Medición de la unión del antisuero y testosterona a la superficie de los eritrocitos acoplados a proteína A	52

2. Hemólisis de glóbulos rojos-proteína A unidos a antisuero, en presencia de tes- tosterona en la incubación	56
3. Formación de monocapas de glóbulos rojos proteína A con células de Leydig de tes- ticulo de rata	59
II) Detección de la secreción de testosterona desde células de Leydig individuales, utili- zando el RHPA	64
1. Dependencia del tiempo de incubación para la detección de testosterona	64
a) Porcentaje de células que forman placa.....	64
b) Efecto del tiempo de incubación sobre el tamaño de los halos de lisis	68
2. Dependencia de la dosis de la hormona go- nadotrofina sobre la secreción de testos- terona medida en el RHPA	70
3. Control de las condiciones de incubación para el RHPA.....	72
4. Estudio de algunos factores que modifican la esteroidogénesis, sobre la secreción de testosterona medida por el RHPA	76
III) Caracterización de subpoblaciones de células de Leydig secretoras y no secretoras de tes- tosterona	79
1. Comparación de las áreas celulares estima- das entre células secretoras y no secre- toras	79

2. Análisis de la frecuencia de células secretoras y no secretoras de testosterona, en la población de células de Leydig purificadas por la gradiente discontinua de percoll 40-90%	82
3. Análisis funcional de células secretoras y no secretoras purificadas por gradiente continua de percoll 10-80%	84
4. Tamaño de las células de Leydig purificadas por la gradiente continua de percoll	88
5. Distribución de frecuencia de áreas de células de Leydig purificadas en la gradiente continua de percoll	90
IV) Estudio de la secreción de progesterona desde células de Leydig purificadas	96
1. Estudio en función del tiempo de incubación de la secreción de progesterona desde células de Leydig individuales	96
2. Estudio de las condiciones de ensayo sobre la secreción de progesterona	99
3. Factores que modifican la proporción de células de Leydig secretoras de progesterona según el RHPA	101
4. Análisis morfométrico de células de Leydig secretoras y no secretoras de progesterona.....	104
V) Detección de la secreción de estradiol desde células de Leydig purificadas mediante el RHPA	106
VI) Estudio de la secreción de 2 esteroides por el EPHR	108

- DISCUSION	111
- CONCLUSIONES	145
- REFERENCIAS	146

INDICE DE FIGURAS.

Esquema 1: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA VIA ESTEROIDOGENICA EN LA CELULA DE LEYDIG Y ALGUNAS DE LAS CARACTERISTICAS PROPIAS DE ESTAS CELULAS	16
Esquema 2: DIAGRAMA ESQUEMATICO DEL ENSAYO DE PLACA HEMOLITICA REVERSA (RHPA)	22
Esquema 3: REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL SUB-FRACCIONAMIENTO DE LA GRADIENTE DE DENSIDAD CONTINUA DE PERCOLL 10-80% PARA OBTENER 5 FRACCIONES DE CELULAS DE LEYDIG	36
Esquema 4: DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA SECUENCIA DE PASOS EN EL RHPA	44
Figura 1: VARIACION EN EL PORCENTAJE DE UNION DE [³ H]-T AL ANTICUERPO ANTITESTOSTERONA	53
Figura 2: EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL COMPLEMENTO SOBRE LA LIBERACION DE HEMOGLOBINA (Hb) DESDE GLOBULOS ROJOS-PROTEINA A EN SUSPENSION	58
Figura 3: FOTOGRAFIAS DE MONOCAPAS DE CO-INCUBACION DE GLOBULOS ROJOS-PROTEINA A Y DE CELULAS NUCLEADAS OBTENIDAS POR LA GRADIENTE DISCONTINUA DE PERCOLL	60
Figura 4: EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS 3 β -HSD CON ACTIVIDAD SECRETORA DE TESTOSTERONA (que forman placas)	66
Figura 5: ESTUDIO DEL AREA DE LAS PLACAS DE HEMOLISIS	69
Figura 6: EFECTO DE LA DOSIS DE LA GONADOTROFINA hCG SOBRE EL PORCENTAJE DE CELULAS SECRETORAS	71

Figura 7: EFECTO DE MODIFICACIONES DEL MEDIO DE INCUBACION NORMAL SOBRE EL PORCENTAJE DE CELULAS SECRETORAS DE TESTOSTERONA	73
Figura 8: ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE MODIFICAN LA ESTEROIDOGENESIS, SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS SECRETORAS DE TESTOSTERONA	77
Figura 9: ANALISIS DE CORRELACION DEL AREA CELULAR ESTIMADA A PARTIR DE MEDICIONES INDEPENDIENTES DEL DIAMETRO CELULAR EN EL PLANO HORIZONTAL A LA OBSERVACION Y DEL RADIO CELULAR EN EL PLANO PERPENDICULAR	81
Figura 10: AREA CELULAR ESTIMADA PARA LOS SUBTIPOS DE CELULAS DE LEYDIG SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE TESTOSTERONA	83
Figura 11: ANALISIS DE FRECUENCIA DE LAS AREAS CELULARES ESTIMADAS PARA CELULAS SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE TESTOSTERONA	85
Figura 12: ESTUDIO DEL AREA CELULAR ESTIMADA DE CELULAS DE LEYDIG OBTENIDAS POR LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL	91
Figura 13: COMPARACION DEL AREA CELULAR ESTIMADA PARA LAS CELULAS SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE TESTOSTERONA, PRESENTES EN CADA FRACCION DE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL	92
Figura 14: ANALISIS DE FRECUENCIA DE DISTRIBUCION DE LAS AREAS CELULARES TOTALES EN LAS 5 FRACCIONES OBTENIDAS DE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL	94
Figura 15: ANALISIS DE FRECUENCIA DE DISTRIBUCION DE AREAS DE LAS CELULAS SECRETORAS O NO SECRETORAS DE TESTOSTERONA PRESENTES EN LAS 5 FRACCIONES DE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL	95
Figura 16: EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS 3β -HSD CON ACTIVIDAD SECRETORA DE PROGESTERONA (que forman placas)	98

Figura 17: EFECTO DE LAS MODIFICACIONES DEL MEDIO DE INCUBACION NORMAL SOBRE EL PORCENTAJE DE CELULAS SECRETORAS DE PROGESTERONA	100
Figura 18: ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE MODIFICAN LA ESTEROIDOGENESIS, SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS SECRETORAS DE PROGESTERONA	102
Figura 19: AREA CELULAR ESTIMADA PARA LOS SUBTIPOS DE CELULAS SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE PROGESTERONA	105
Figura 20: ANALISIS DE FRECUENCIA DE LAS AREAS CELULARES ESTIMADAS DE CELULAS SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE PROGESTERONA	107
Figura 21: PROPORCION DE CELULAS 3β -HSD (+) QUE SECRETAN TESTOSTERONA, PROGESTERONA O AMBOS ESTEROIDES EN MONOCAPAS DE CELULAS DE LEYDIG CO-INCUBADAS CON GLOBULOS ROJOS-PROTEINA A	110

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: CARACTERISTICAS DEL SUBFRACIONAMIENTO DE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL 10-80% 87

TABLA 2: ESTUDIO DE LA FUNCION SECRETORA DE TESTOSTERONA DE LAS CELULAS DE LEYDIG PURIFICADAS MEDIANTE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL 89

ABREVIATURAS EMPLEADAS.

FSH	: hormona folículo estimulante.
LH	: hormona luteinizante.
hCG	: hormona gonadotrofina coriónica humana.
3 -HSD	: 3 Beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa.
cAMP	: adenosina 3'-5' monofosfato cíclico.
8(Br)-cAMP	: 8-Bromo de adenosina 3'-5' monofosfato cíclico.
MIX	: metil isobutil xantina.
SER	: retículo endoplásmico liso.
mRNA	: ácido ribonucleico mensajero.
RHPA	: ensayo de placa hemolítica reversa.
BSA	: albúmina de suero de bovino.
NBT	: azul de nitrotetrazolio.
β -NAD	: beta adenosina nicotinamida dinucleótido.
[³ H]-T	: [1,2,6,7- ³ H]-testosterona.
DHT	: 5 α -dihidroxitestosterona.
PBS	: Solución salina tamponada con fosfato.
Hb	: hemoglobina.
UI	: Unidades Internacionales.

RESUMEN

La secreción testicular de hormonas esteroidales en la rata adulta se debe a la actividad de las células de Leydig, y es regulada principalmente por la hormona luteinizante, liberada por la hipófisis. También hay regulación de dicho proceso, por factores producidos localmente por las células de Leydig, otras células intersticiales o por el túbulo, que modifican la esteroidogénesis y se reconocen como reguladores para/autocrinos. De esta forma, las distintas células de Leydig se encuentran en un microambiente particular, que podría ser la base para explicar la heterogeneidad morfológica y enzimática observada en estas células.

El objetivo general de esta investigación; es analizar la existencia de subpoblaciones de células de Leydig con diferente capacidad para la secreción de esteroides; es decir, se requiere detectar la secreción individual de las células para cada uno de los esteroides. Además interesa conocer el efecto de algunos factores que regulan la esteroidogénesis, sobre la actividad individual de secreción de esteroides.

Con este objetivo, se adaptó el ensayo de placa hemolítica reversa, que permite el análisis de la función secretora en células individuales. Este ensayo se basa en la lisis mediada por complemento, de eritrocitos acoplados con anticuerpos específicos, los que se co-incubaban con las células secretoras del antígeno correspondiente en estudio. Las células secretoras del antígeno forman un halo o placa de lisis de eritrocitos alrededor de ellas, en cambio las células no secretoras del antígeno, no muestran este halo.

Las células de Leydig se purifican desde testículo de rata por sedimentación en gradientes de densidad de percoll. El ensayo citoquímico para la actividad enzimática 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa se usa en las células colectadas para estimar la proporción de células de Leydig purificadas.

La combinación del ensayo de placa hemolítica reversa con la tinción para la actividad enzimática, permitió detectar que en la población de células esteroideogénicas, un $52 \% \pm 13$ de las células de Leydig secretan testosterona; un $37,8 \% \pm 5,7$ secretan progesterona y tan sólo un $20,2 \% \pm 2,7$ del total de las células secretan estradiol, en presencia de la gonadotropina.

La máxima respuesta secretora de células de Leydig para cualquiera de los esteroides analizados, se logra en presencia del anticuerpo específico y de una dosis de 25 UI/ml de gonadotrofina coriónica humana durante 90 min a 34° C.

La proporción de células de Leydig que secretan testosterona o progesterona no aumentó en presencia de concentraciones apropiadas de 8-bromo de adenosina 3'-5' monofosfato cíclico, pregnenolona o hidroxicolesterol, con respecto a las incubaciones en presencia de la hormona gonadotrofina coriónica. Este resultado permite concluir que la fracción limitada de células secretoras de los esteroides, no se debe a una alteración de la señal hormonal, ni tampoco a una limitación de los sustratos esteroi-dogénicos para la síntesis y secreción de ambos esteroides. Estos resultados demuestran que la hormona luteinizante es un factor suficiente para la activación de la síntesis y también sobre la secreción de esteroides.

Por otra parte, en incubaciones en presencia de gonadotrofina y estradiol o aminoglutatimida, la proporción de células secretoras de testosterona o progesterona disminuyó significativamente, similar al valor en incuba-

ciones en ausencia de la gonadotrofina. Estos resultados muestran que el efecto de estos inhibidores específicos de enzimas esteroidogénicas, pueden también disminuir la actividad secretora en células individuales por una disminución de la síntesis en la vía.

Luego, se relacionó la función secretora con el tamaño celular. Se encontró que para la secreción de testosterona o progesterona, la subpoblación de células secretoras es, en promedio, de menor tamaño que la subpoblación de células no secretoras. El análisis de frecuencia de distribución del tamaño celular para ambas subpoblaciones confirmó estos resultados.

Finalmente se analizó la proporción de células de Leydig secretoras y no secretoras en presencia de los antisueros para estudiar la secreción de testosterona y progesterona en forma simultánea; se comparó con la secreción observada en presencia de cada antisuero sólo. Se observó que la proporción de células secretoras fue mayor que la proporción de células sólo secretoras de testosterona; este resultado indicaría que una fracción de las subpoblaciones secretoras, secreta ambos esteroides.

La purificación de células de Leydig en gradientes de densidad continua de percoll 10-80%, no permitió

la separación de subpoblaciones secretoras y no secretoras de acuerdo al tamaño.

Todos estos resultados permitieron concluir que el ensayo de placa hemolítica reversa es un método apropiado para la detección específica de la secreción de esteroides. Además se demuestra que las células de Leydig son heterogéneas en la función secretora de esteroides, probablemente como resultado de la síntesis diferencial de los mismos. El estudio del tamaño celular amplió el análisis de la heterogeneidad en la función secretora descrita, permitiendo demostrar la existencia de subpoblaciones de células de Leydig.

La secreción diferencial de esteroides detectada en este estudio, podría ser explicada por la participación sobre la función esteroidogénica de distintos factores que modifican la síntesis en cada célula, definiendo subpoblaciones de células de acuerdo a la función secretora aún cuando el potencial esteroidogénico es similar para todas las células. La proporción de células secretoras varían dependiendo del medio circundante.

SUMMARY.

Steroids hormones secreted by the adult rat testis are produced by Leydig cells, which are mainly regulated by the pituitary luteotrophic hormone. There are also several other regulatory factors, produced either by interstitial or tubular cells, which modify the steroidogenic pathway and are considered para/autocrine regulators. Thus, it could be estimated that each Leydig cell would be subjected to a particular microenvironment, which could explain the observed morphologic and enzymatic heterogeneity of Leydig cells.

The general aim of this study was to detect whether Leydig cells show different ability to secrete steroid products. In this regard, detection of individual cell secretion of different steroids products was studied. Moreover, it was also evaluated the effect of several regulatory factors of the steroidogenic pathway on the individual cell secretory activity.

It was then necessary to implement a method to detect individual cell's steroids secretory activity. In this work it is described the adaptation of the reverse

hemolytic plaque assay to detect steroids secretion. This method is based on complement-mediated lysis of antibody-coated erythrocytes coincubated with antigen-secreting cells. Antigen secretion results in hemolysis of erythrocytes surrounding the secretory cells. Thus, so that clear areas of lysis identify cells secreting antigen, but non-secreting cells maintain intact erythrocytes around them.

Adult rats Leydig cells were purified by sedimentation through percoll density gradients, and they were identified by histochemical staining for 3β -hydroxysteroid dehydrogenase. Using the reverse hemolytic plaque assay in combination with enzymatic staining for 3β -hydroxysteroid deshydrogenase, this work described the first direct detection of steroid secretion in a Leydig cell population. Thus, it is shown that upon human chorionic gonadotropin stimulation, Leydig cells secrete androgens, progesterone and estradiol in a proportion of $52\% \pm 13$, $37.8\% \pm 5.7$ and $20.2\% \pm 2.7$ respectively. Results show that the gonadotropin, both recruits new cells into the population of secreting cells and increases the rate of secretion. Optimal incubation conditions used for the detection of the 3 steroids, were 90 min at 34°C , in the presence of human chorionic gonadotropin (25 IU/ml).

The proportion of Leydig cells that secretes testosterone or progesterone was not increased by the presence 8-bromo-cyclic AMP or pregnenolone or hydroxycholesterol during the incubation. These results show that the number of secretory cells is not limited neither by the availability of the hormone's second messenger nor by the steroidogenic substrates.

On the other hand, in the presence of the gonadotropin, the proportion of testosterone and progesterone secretory cells was significantly decreased by the addition of either estradiol or aminogluthetimide, to the incubation medium. These results show that the effect of specific inhibitors of the steroidogenic process can be detected also at the individual cellular secretory activity.

The detection of individual cell's secretory activity allowed also to appreciate a relationship between cell's size and its steroid secretory activity. Thus, it was observed that the mean size of the subset of testosterone- or progesterone-secreting cells was smaller than the corresponding subset of non-secreting cells. These observations were confirmed by a frequency distribution analysis of cell's size. Taken together these observations

with results obtained in the presence of a mixture of equivalent amounts of antitestosterone and antiprogestrone antibodies, allows us to infer that, at least, there is a subset of Leydig cells secreting both testosterone and progesterone.

On the other hand, purification of Leydig cells, using a continuous percoll gradient, showed that secretory and non-secretory Leydig cells could not be separated by their size.

All these results show that Leydig cells are heterogeneous in their capability to secrete steroids, and allows to conclude that the reverse hemolytic plaque assay is an appropriate method to detect specific steroid secretion from individual cells. The method also allowed us to identify and characterize subtypes of Leydig cells, according to secretory activity and size. The number of secretory cells vary according to the presence of factors that modify the steroidogenic process.

INTRODUCCION.

La gónada masculina de mamíferos desarrolla una doble función: espermatogénica y endocrina. Ambas funciones se encuentran anatómica e histológicamente localizadas en los túbulos seminíferos y en el tejido intersticial, respectivamente. Las hormonas tróficas hipofisiarias, son los factores regulatorios de mayor influencia cuantitativa sobre ambas funciones: la hormona folículo estimulante (FSH) influye sobre la función espermatogénica y la hormona luteinizante (LH) sobre la función hormonal (1-3).

Las células de Leydig constituyen uno de los varios tipos de células dentro del tejido intersticial y son directamente responsables de la producción de esteroides androgénicos por parte del testículo. Derivan de la diferenciación de fibroblastos intersticiales (4); existen antecedentes que permiten establecer que la población total de estas células se mantiene por un mecanismo de recambio celular a partir de los fibroblastos y no por división de las células de Leydig ya diferenciadas (4-6). Se encuentran heterogéneamente distribuidas entre los distintos tipos celulares intersticiales, estableciendo

relaciones celulares próximas, de notable contigüidad, incluso con otras estructuras histológicas como vasos sanguíneos y túbulos seminíferos (4).

La proporción de dichas células en el total celular intersticial varía de acuerdo a la especie (4,7,8). Estudios fundamentalmente de carácter morfométrico y estereológico en varias especies, han demostrado que el número de células de Leydig y el número total de células intersticiales forman un cociente constante, pero al mismo tiempo esta proporción depende del desarrollo de la gónada en cada especie (7,8). Es propio de cada especie también, encontrar diferencias cuantitativas en la producción de testosterona (7,8). Sin embargo, no existe una relación estrecha entre los niveles de producción de esteroides y la proporción numérica de las células de Leydig en cada especie, si no más bien se relaciona a la existencia y desarrollo de estructuras propias de la diferenciación morfo-funcional de dichas células, es decir, tiene relación con la masa total de organelos relacionados con la esteroidogénesis. Así se ha observado que la producción del andrógeno, expresado por un número equivalente de células de Leydig provenientes de animales que tienen pocas

células, puede ser mayor que la hormona derivada de células provenientes de animales que tienen abundantes células de Leydig (4).

En relación a las características ultraestructurales de importancia funcional dentro de las células de Leydig, la evidencia indica que la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig está estrechamente relacionada con el suministro y reserva de gotas de lípidos (4,9), el número de mitocondrias (que contienen la enzima P-450_{SCC}) (4,11), y el desarrollo del retículo endoplásmico liso (SER) y microsomas que contienen la actividad 3 β -HSD y las otras enzimas esteroidogénicas requeridas para la conversión del colesterol en esteroides (11,12). Cabe destacar además que la observación de estas características estructurales dentro de las células intersticiales son los aspectos considerados para identificar particularmente a las células de Leydig cuando éstas son observadas en preparaciones de cortes de tejido mediante microscopía de luz o electrónico (4,13).

Por otra parte nos encontramos con que el mantenimiento del estado de diferenciación estructural y funcional de las células de Leydig, depende principalmente de la acción del eje hipotálamo-hipófisis sobre la gónada,

acción que directamente resulta en la liberación de la hormona LH (10,12,14).

En la actualidad se ha descrito ampliamente en células de Leydig, la existencia, estructura molecular y función de los receptores de membrana para esta hormona hipofisiaria (15,16); la generación de cAMP que deriva de la función de dichos receptores finalmente desencadena una serie de cambios celulares o respuestas que se pueden clasificar como respuestas agudas y crónicas desde el punto de vista de la ocurrencia temporal de cada fenómeno. La respuesta que fisiológicamente tiene mayor importancia para la función de estas células, es finalmente la producción e inmediata secreción de testosterona, respuesta considerada aguda, respecto a otras que aparecen posteriormente. Es conveniente destacar también que el conocimiento de esta acción de la LH ha permitido experimentalmente reemplazar dicha hormona por su homóloga funcional: la gonadotropina coriónica humana (hCG), puesto que la especificidad y afinidad de los receptores de membrana para ambas glicoproteínas es idéntica (17).

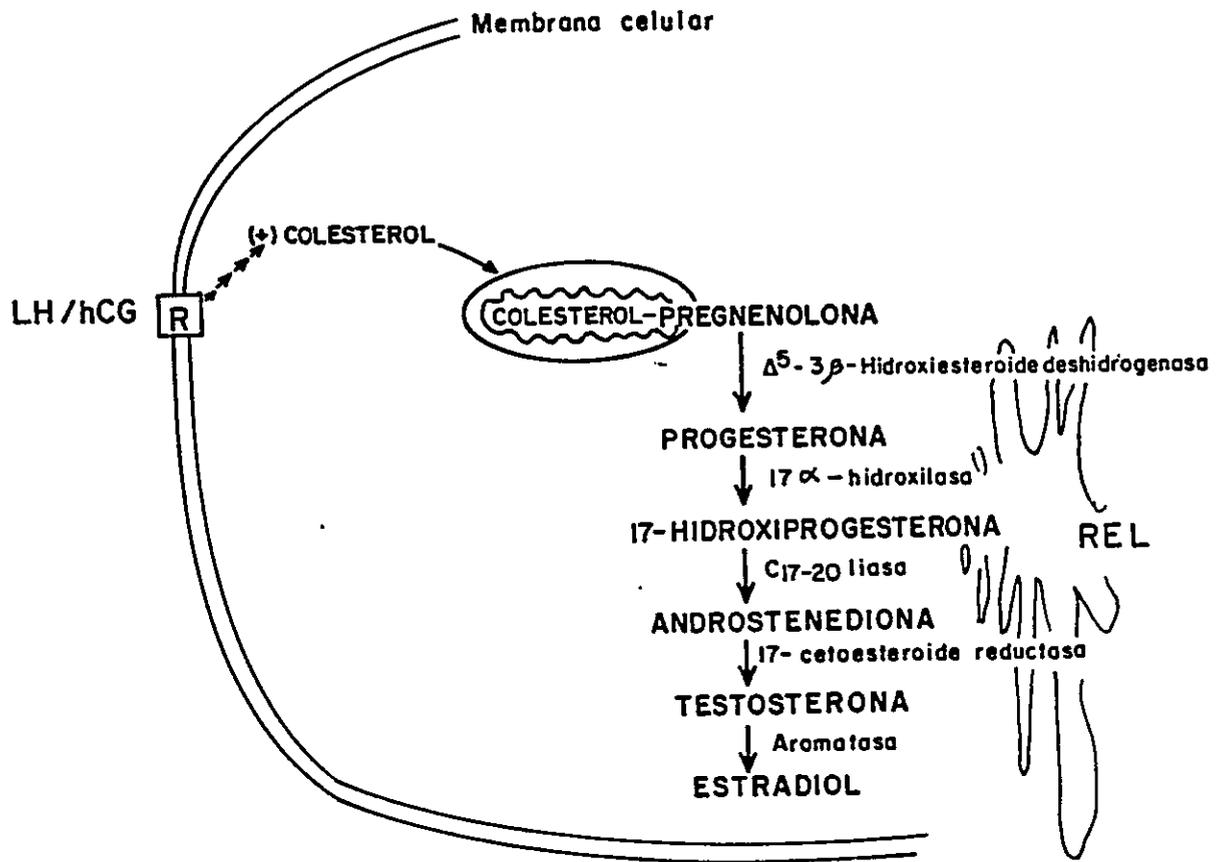
Al analizar el efecto de la LH sobre la función esteroidogénica de la célula de Leydig, se reconoce su

acción sobre distintos factores: por una parte, estimula a enzimas esteroidogénicas para iniciar su actividad en la vía, y por tanto desencadenar la producción de testosterona y otros esteroides (18,19). Por otra parte, mediante su efecto trófico, mantiene el número de células esteroidogénicas en el total intersticial (8,20) y, sobre cada una de estas células mantiene el área del SER, microsomas y mitocondrias, organelos donde radica la existencia de la totalidad de las enzimas de la vía esteroidogénica (2,9,19). Finalmente, mediante la acción de proteínas quinasas, aumenta la síntesis de mRNA específicos para la formación de enzimas y otras proteínas relacionadas a la esteroidogénesis (18,21,22).

En estudios efectuados en condiciones de ablación de la pituitaria o de administración de esteroides mediante implantes subcutáneos, u otras técnicas para privar a un animal de la presencia de LH, se ha observado que hay una pérdida de la capacidad de secretar testosterona, debido principalmente a que en cada célula de Leydig, hay una pérdida en el volumen citoplasmático ocupado por cada uno de los organelos relacionados a la esteroidogénesis (mitocondrias, SER y microsomas), más que como consecuencia de una disminución en el número de células (12,23). Estos

hallazgos han permitido precisar un efecto trófico fundamental de LH para la supervivencia funcional de estas células (24).

Desde el punto de vista de la función esteroideogénica, el efecto estimulador de la gonadotropina sobre las enzimas esteroideogénicas constituye la acción inmediata necesaria para la producción de esteroides. En el Esquema 1 se muestra un esquema de la vía esteroideogénica que caracteriza la producción de esteroides en la rata. Estudios han afirmado que LH/hCG estimula la actividad de la éster-hidrolasa para iniciar la movilización de colesterol hacia la mitocondria para su utilización (17). De la misma forma se ha sostenido que la gonadotropina estimula a varias otras enzimas como la 3β -HSD, C17-20 Liasa, 17α -hidroxilasa y aromatasa (21). La estimulación sobre las enzimas deriva, por una parte, en un aumento de la actividad enzimática como respuesta aguda, y además como respuesta crónica, un aumento de la síntesis de mRNA, probablemente para la síntesis de enzimas esteroideogénicas. De hecho este último tipo de acción es fundamental para mantener la respuesta esteroideogénica, para una segunda dosis de la hormona trófica (18,25).



ESQUEMA 1: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA VIA ESTEROIDOGENICA EN LA CELULA DE LEYDIG Y ALGUNAS DE LAS CARACTERISTICAS PROPIAS DE ESTAS CELULAS.

En el Esquema 1 se puede apreciar también, porque la identificación de las células de Leydig in vitro se ha realizado mediante el reconocimiento de la enzima 3β -HSD por medio de la tinción citoquímica para la enzima (11,26-28). Las células de Leydig, como ya fue expresado, son las únicas células esteroidogénicas en el intersticio; la actividad 3β -HSD es pues un marcador enzimático muy específico y su presencia refleja un potencial esteroidogénico propio de estas células.

La tinción se basa en que la actividad deshidrogenasa de esta enzima permite la formación de depósitos de formazan en las células como consecuencia de la reducción del azul de nitrotetrazolio presente en la reacción, coloreando las células de un azul violáceo característico (26). Obviamente, se usa también como un marcador enzimático de reconocimiento funcional de otros tejidos con capacidad esteroidogénica como en la gónada femenina (29-31).

En conjunto todos estos antecedentes han contribuido al conocimiento de la estructura y el funcionamiento de las células de Leydig, y más aún, para distinguirlas y caracterizarlas. Sin embargo, estas caracterizaciones muchas veces dejan al margen el contexto histológico o anatómico en que se ubican in vivo y, por lo tanto no

consideran las relaciones que las células de Leydig sostienen con otras células y componentes del intersticio, incluso con el tejido tubular.

La actividad de las distintas células componentes del testículo, contiguas por las relaciones histológicas que mantienen y por el producto de sus secreciones, generaría una serie de señales moleculares que permitiría una regulación local de carácter auto y paracrina (11,32,33). Aunque el control hipofisiario es el principal para determinar la actividad esteroideogénica de las células de Leydig, numerosos estudios de células purificadas, incubadas en presencia de medios condicionados y/o en presencia de algunos factores de origen local, demuestran que la acción local de algunos compuestos provocan una modificación de la función de cada célula en particular. La participación potencial y las acciones de estos factores locales se reconoce en la mayor parte de los casos, del hecho que se han encontrado receptores específicos para dichos factores (32,34-39), o más directamente aún por la demostración de los efectos que estos agentes tienen sobre la esteroideogénesis de células de Leydig purificadas e incubadas (32,36,38,40-44).

Además existe la posibilidad de evaluar la participación de los mismos productos esteroidales, como factores de regulación de la actividad de las células de Leydig (5,32), especialmente el efecto de estradiol y testosterona sobre la actividad de algunas enzimas esteroideogénicas (45,46), basándose en la presencia y función de receptores para progesterona, andrógenos y estrógenos en células testiculares, esencialmente en Leydig (47-49).

En conjunto todas estas observaciones permiten configurar para la célula de Leydig, una realidad de estructura y función heterogéneas. Esta concepción de una propiedad individual de las células que constituyen un tejido es relativamente nueva y se ha iniciado su estudio principalmente en tejidos de función endocrina. Las aproximaciones experimentales que han permitido esta proposición, han analizado en forma independiente los distintos parámetros que definen la actividad celular, es decir que los estudios se han enfocado ya sea en la función o en la estructura de los tejidos estudiados (7-10,12).

Por lo tanto, el primer problema que se presentó, fue definir una aproximación que permitiera analizar la secreción de esteroides en forma individual desde células de Leydig. Los sistemas de incubación empleados usualmente

en nuestro laboratorio, como en otros grupos de trabajo, detectan la secreción de esteroides liberados al medio de incubación, sin embargo, la medición de éstos es el resultado de la secreción de la totalidad de las células y representa un promedio dentro de la población. Evidentemente que este tipo de estudios no permite la distinción de las diferencias propias de cada célula.

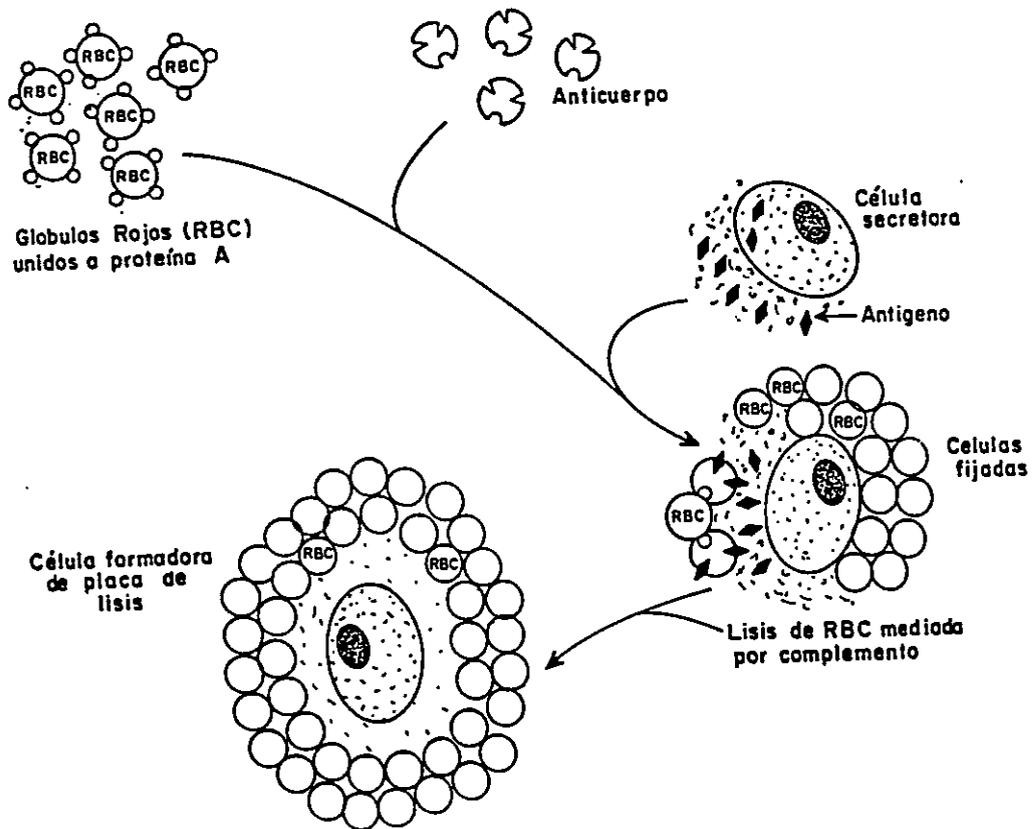
Por tanto, para estudiar la secreción de esteroides desde células de Leydig en forma individual se propuso adaptar una aproximación descrita por Neill y Frawley en el año 1983 (50). La descripción metodológica, las ventajas y desventajas y los alcances como aproximación a la función secretora de péptidos del ensayo de placa hemolítica reversa (RHPA), proviene del ensayo de placa hemolítica original de Neill Jerne en 1974, realizado rutinariamente para la detección de secreción de anticuerpos desde linfocitos.

El ensayo se basa en la lisis de eritrocitos, (mediada por complemento) que están cubiertos por anticuerpos específicos mediante proteína A. Las células secretoras que se co-incubaron con los eritrocitos, liberan el producto hormonal en estudio, el antígeno (Esquema 2). Las célu-

las secretoras del antígeno se reconocen por la aparición de una zona de lisis o placa hemolítica de eritrocitos hemolizados por acción del complemento. Las células que no secretan el antígeno, no presentan a su alrededor este halo o placa, permitiendo la identificación de dos tipos de células dentro de una población potencialmente homogénea, células secretoras y no secretoras.

Tras la publicación de Neill y Frawley, otros grupos reconocieron la utilidad de la adaptación del ensayo original para el estudio de otras células secretoras. Así, por ejemplo, la mayor parte de los trabajos posteriores se centraron en estudiar la función secretora desde células hipofisarias (51-60). Posteriormente aparecieron algunos estudios de caracterización de la función endocrina de células de la pituitaria para la detección secuencial de dos polipéptidos en una misma célula (61-63). Más recientemente, se logró simultáneamente caracterizar lactotrofos individuales de acuerdo a su función secretora y la expresión génica de las hormonas peptídicas, mediante la combinación del RHPA con un ensayo de hibridización in situ para detectar el mRNA de la hormona (64).

Todos los trabajos reportados coincidieron en señalar que la mayor ventaja de la técnica, es que permite



ESQUEMA 2: DIAGRAMA ESQUEMATICO DEL ENSAYO DE PLACA HEMOLITICA REVERSA (RHPA).

la observación de la actividad individual de las células con respecto a la secreción de un producto específico, permitiendo determinar el grado de especialización para dicha actividad, de cada una de las células que forman parte de un mismo tejido.

La observación individual de cada célula dentro de una población, y el análisis de sus propiedades de secreción, llevó a una conclusión común en todos los estudios: dentro de la población total, generalmente homogénea por el método de purificación, una proporción variable de las células demuestra, por este ensayo, que tiene actividad secretora. La proporción de células secretoras varió principalmente dependiendo del tipo de célula estudiada en cada trabajo, y para cada tipo celular, de acuerdo al tipo de secreción por ella liberada y que sea de mayor significado funcional.

Estos estudios han abierto la posibilidad experimental de estudiar la función secretora de células que, por distintos criterios son supuestamente homogéneas, ya sea por su origen o por su purificación. Aunque los resultados se expresan igualmente como promedio dentro de la población, el análisis célula a célula permitiría la identificación individual de los comportamientos que se

reflejan en el promedio de la actividad celular de una población específica.

Hipótesis

Puesto que las células de Leydig se han descrito heterogéneas estructural y enzimáticamente, probablemente como resultado de la participación de un conjunto de factores histológicos, citológicos y moleculares propios del testículo y particulares al microambiente próximo a cada célula de Leydig, se pretende demostrar que la función secretora de esteroides es distinta para cada célula

Objetivos Generales

El objetivo general de este trabajo es en primer lugar, analizar dentro de poblaciones celulares el comportamiento secretor para tres esteroides de la vía esteroidogénica y, en segundo lugar, evaluar el rol que tienen sobre la secreción de esteroides, algunos factores que típicamente regulan la esteroidogénesis.

Objetivos Específicos

1. Establecer experimentalmente una técnica que permita la detección de la secreción de testosterona desde células de Leydig individuales; para esto se adaptará el ensayo de placa hemolítica reversa (RHPA).
2. Relacionar la actividad potencial esteroidogénica con la secreción de esteroides, mediante la detección de la presencia intracelular de la actividad enzimática 3β -HSD, en las monocapas de células de Leydig y eritrocitos.
3. Estudiar el efecto de factores de regulación, con conocido efecto funcional sobre la secreción de testosterona, por ejemplo: LH/hCG, cAMP, sustratos esteroidogénicos y otros esteroides.
4. Analizar un parámetro morfológico, como el tamaño, de acuerdo a la actividad secretora de cada célula, y relacionar ambos parámetros.
5. Detectar y caracterizar la secreción de otros esteroides por las células de Leydig individuales, mediante el RHPA.
6. Caracterizar subpoblaciones celulares secretoras y no secretoras de esteroides de acuerdo a la detección simultánea de testosterona y progesterona.

MATERIALES Y METODOS.

1. Animales.

Se emplearon ratas Wistar macho adultas, de 65 a 80 días de edad, obtenidas de camadas distintas, mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad en el vivero del INTA. La alimentación suministrada "ad-libitum", estuvo constituida por un pellet concentrado y balanceado de proteínas, carbohidratos, materias grasas y agua.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y los testículos se obtuvieron tras una incisión abdominal. Los testículos fueron pesados y relacionados porcentualmente al peso de los animales.

2. Reactivos.

Los siguientes compuestos y reactivos se obtuvieron de Sigma (St. Louis, Mo.): Proteína A de estafilococos, poli-l-lisina, albúmina de suero de bovino (BSA), cloruro crómico III hexahidrato, azul de nitrotetrazolio (NBT grade III), percoll, medio Eagle's modificado de Dulbecco (DMEM), medio M-199 (M-199), medio Eagle's modificado de Dulbecco' / F-12 mezcla sin rojo fenol

(DMEM/F-12), gonadotropina coriónica humana (hCG, actividad específica 11.900 UI/mg), adenina nicotinamida dinucleótido, isómero β (β -NAD grado IV), ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanol sulfónico (Hepes), monofosfato de 8-Bromo-adenosina 3'5'-cíclico (8(Br)-cAMP), 3-isobutilmetil-xantina (MIX), progesterona, 5-colestano- 3β -22-R-hidroxicolesterol, pregnenolona, 5-androstan-17-ona-3 β -hidroxi (etiocolanolona), dietilestilbestrol (DES), 17 β -estradiol, y DL-aminoglutatimida. [1,2,6,7- 3 H]-testosterona (actividad específica 89 curies/mmol) se obtuvo de Amersham International plc. La colagenasa se obtuvo de Worthington Biochemical Co (Freehold, N.J.). Otros reactivos empleados y no especificados son todos de grado analítico probado.

3. Soluciones tampón y medios de incubación.

Para la preparación de distintos medios de incubación, se emplean las siguientes soluciones según protocolos de uso corriente en el laboratorio:

a. Solución tampón Hepes 10x: Hepes 10 mM, CaCl_2 1 mM, KCl 5 mM, NaCl 145 mM y glucosa 5 mM; esta solución se guarda a -20°C .

b. Solución tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS): NaCl 140 mM, Na_2HPO_4 0,4 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 4 mM, CaCl_2 1,06 mM y MgCl_2 0,4 mM; se mantiene a 4° C y se prepara mensualmente.

c. Solución anticoagulante CPD: citrato trisódico 86 mM, ácido cítrico 15,5 mM, fosfato monobásico de sodio 18,3 mM y glucosa 128 mM; se usa 7 ml de esta solución por cada 100 ml de sangre.

d. Medio 199/0,1% BSA, para 1 l se usa: medio M-199 15,1 g, NaHCO_3 26,2 mM y albúmina de bovino BSA (0,1 % P/V). La solución mezclada se ajusta a pH 7,4 y tiene una osmolaridad de 297 mOsm/Kg solución.

e. Medio Eagle's modificado de Dulbecco's/0,1%BSA, para 1 l se usa: medio DMEM 13,4 g/l, NaHCO_3 44 mM y albúmina de bovino BSA (0,1 % P/V). La solución mezclada se ajusta a pH 7,8 y tiene una osmolaridad de 335 mOsm/kg solución.

f. Medio Eagle's modificado de Dulbecco's/F-12 mixture/0,1% BSA, para 1 l se usa: medio DMEM F-12 15,6 g/l, NaHCO_3 14,3 mM y albúmina de bovino BSA (0,1 % P/V). La solución mezclada se ajusta a pH 7,3 y tiene una osmolaridad de 277 mOsm/kg solución.

- g. Solución para contar radioactividad (PPO-POPOP): contiene 2,5-difeniloxasol (PPO) 10,9 mM y 1,4-bis(5-fenil-2-oxasol)benzeno (POPOP) 0,6 mM, en tolueno.
- h. Solución para la detección citoquímica de la actividad enzimática 3β -HSD: para cada experimento se prepara 20 ml de una solución que contiene etioconanolona/DMSO 4,1 M, como sustrato esteroidogénico; NBT 0,2 mM y β -NAD 1,5 mM como aceptores de electrones, en tampón PBS/0,1%BSA.
- i. Suero Salino: NaCl 0,85% p/v (145 mM) y se mantiene a 4° C de temperatura.

4. Antisueros.

El antisuero anti testosterona fue obtenido de Steranti Res. Ltd, London England; el inmunógeno fue testosterona-11 α -(succinil) acoplada a gama globulinas de bovino. La unión del antisuero es de 100% para testosterona, y tiene una reacción cruzada con otros esteroides equivalente a 19,5% con 5 α -dihidrotestosterona, 17,6% con dehidroepiandrosterona, y de 6,5% con androstenediona. Para todos los progestágenos, la reactividad cruzada es inferior al 0,7%; para otros andrógenos,

menor que el 0,4% y para todos los estrógenos menor que el 0,2%.

Del mismo laboratorio (Steranti Res. Ltd.), se obtuvo el antisuero anti 17β -estradiol. Los animales se inmunizan con una mezcla de 17β -estradiol-6-carboximetil-oxima acoplado a BSA. El antisuero tiene una reacción de 100% con estradiol. Con otros esteroides estrogénicos, la reacción cruzada es inferior a 0,5%, mientras que con esteroides androgénicos y progestágenos, es menor al 0,04%.

El antisuero de progesterona, en tanto, se obtuvo liofilizado de Radioassay Systems Laboratories, Inc. (Carson, Cal), por donación del Dr. Luigi Devoto. Los animales son inmunizados con una mezcla de 11α -hidroxiprogesterona- 11α -hemisuccinato:HSA. El antisuero presenta un 100% de unión a progesterona. La reacción cruzada con otros esteroides es igual a 0,8% con pregnenolona, 0,03% con 20-dihidroprogesterona y menor del 0,01% con el resto de progestágenos, andrógenos y estrógenos.

5. Obtención de células intersticiales.

Las células intersticiales se obtienen siguiendo el protocolo de uso rutinario en el laboratorio (65):

los testículos se descapsulan y se depositan en un tubo cónico graduado de polipropileno con 10 ml de medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 que contiene colagenasa (0,25 mg/ml). El tubo se incuba en posición horizontal durante 15 min en un baño con agitación constante (100 ciclos/min) y una temperatura controlada de 37° C, para promover la dispersión de las células intersticiales del tejido tubular. Luego de la digestión, se completa a 30 ml con medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 y se separan las células intersticiales de los túbulos seminíferos por decantación durante 5 min por gravedad normal. El sobrenadante, que contiene las células intersticiales de la decantación, se traslada a otro tubo mediante una jeringa con una punta plástica, filtrando las células a través de una malla de algodón. Esta operación se repite 3 veces, con el sedimento de túbulos resuspendiéndolos cada vez y dejándolos decantar. El volumen total de medio así obtenido se centrifuga a 600 x g, y el sedimento de células se lava 2 veces más con medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 para eliminar el exceso de colagenasa. El sedimento final de células intersticiales se resuspende en un volumen apropiado de medio M-199/0,1% BSA pH 7,3, de acuerdo al tipo de gradiente que se usa para

la purificación: 3 ml para la gradiente discontinua y 2 ml para la gradiente continua de percoll.

6. Conteo de células.

En todos los casos se determina el número de células intersticiales separadas, mediante un hemocitómetro. Este procedimiento consiste en tomar una alícuota de las células obtenidas, y en una dilución definida, se infusionan al interior de una cámara de Neubauer. Con un aumento de 400x, se cuentan las células nucleadas observadas en el cuadrado dentro de un campo focal. El total de células contadas en 16 cuadrados, se amplifica por el factor de dilución y por el área de cada cuadrado en la cámara, obteniéndose la cifra que representa el número de células nucleadas en 1 ml de la suspensión de células (66).

7. Purificación de las células de Leydig.

a) Purificación en gradiente de Percoll discontinua 40-90%.

Para la mayoría de los experimentos, las células de Leydig se obtienen mediante sedimentación sobre la gradiente de densidad discontinua de percoll 40-90%. La gradiente se prepara según el procedimiento descrito por Moger (67,68). Se colocan 20 ml de una solución de 90% percoll como colchón en un tubo cónico de polipropileno de 50 ml, evitando la aparición de burbujas de aire y espuma. Se coloca gota a gota sobre la solución anterior, 20 ml de una solución 40% de percoll, procurando la formación de una interfase nitida entre ambas soluciones.

Las células intersticiales (3 ml) se colocan gota a gota sobre la gradiente. Luego, se centrifuga por 15 min a 600 x g y se colectan las células que sedimentan en los 5-7 ml sobre la interfase; estas fracciones contienen principalmente células de Leydig y en menor proporción otras células como eritrocitos y macrófagos que constituyen la población de células contaminantes (69).

Las células de Leydig colectadas se diluyen con 5 volúmenes de medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 y se lavan 2 veces con medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 para eliminar el exceso de percoll. El pellet final de células de Leydig se resuspende

en 1 ml de medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 y se emplean en los ensayos, tras ser contadas tal como se describió (sección 6).

b) Purificación en gradiente continua de Percoll 10-80%.

Para unos pocos experimentos en los que se analizó la secreción de testosterona, las células de Leydig se purifican mediante una gradiente de densidad continua de percoll 10-80%, que se preparó tal como lo describe Hedger y col. (70,71). Se preparan dos soluciones de percoll en buffer Hepes, una solución 10% y otra 80%. Se colocan 13 ml de cada solución en el interior de los vasos comunicantes de una cámara para formar gradientes, permitiendo luego la formación de una gradiente lineal de ambas soluciones en un tubo de 30 ml.

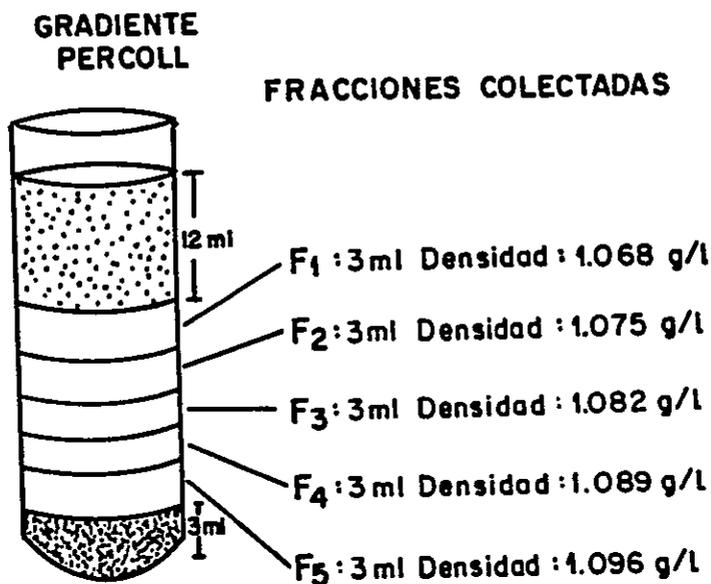
Las células intersticiales (2 ml), se colocan cuidadosamente sobre la gradiente y se centrifugan a 800x g por 30 min. Se descartan los 12 ml superiores de la gradiente y luego se separan 5 fracciones de 3 ml cada una, colectando cuidadosamente alícuotas de 1 ml, desde una densidad 1,068 g/l correspondiente a la fracción 1, hasta

la fracción 5, equivalente a una densidad 1,096 g/l (Esquema 3). Las células de cada una de las fracciones se diluyen en 5 volúmenes en medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 y se centrifugan a 600 x g durante 10 min y se lavan 2 veces más de la misma forma.

Finalmente, las células de Leydig purificadas en cada fracción se cuentan igualmente como se describió (sección 6).

c) Tinción citoquímica específica para células de Leydig.

En las distintas fracciones de células separadas por gradientes, se determina la proporción de células que corresponde a células de Leydig, por la detección de la actividad 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esta actividad, como se señaló en la introducción, es un marcador enzimático específico para dichas células (26,28). La determinación se hace en alícuotas de células intersticiales o purificadas, que se permeabilizan por deshidratación, sobre un portaobjeto. De inmediato, los portaobjetos se incuban por 90-120 min a 34° C, en la solución para detectar la actividad 3β -HSD (métodos



ESQUEMA 3: REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL SUBFRACCIONAMIENTO DE LA GRADIENTE DE DENSIDAD CONTINUA DE PERCOLL 10-80% PARA OBTENER 5 FRACCIONES DE CELULAS DE LEYDIG.

Los 12 ml iniciales desde la superficie de la gradiente se descartan, y a partir de los 13 ml se colectan sucesivamente 5 fracciones de 3 ml cada una: F1, F2,.....F5. Las células obtenidas de cada fracción se incuban separadamente. Los 3 ml finales de la gradiente se descartaron.

3.h.). Después de la incubación, las preparaciones se lavan con tampón PBS y las células se observan en un microscopio de luz. En todos los campos que se observan al azar, se cuenta el número total de células nucleadas y el número de células teñidas de azul, como resultado de los depósitos de sales de mono y diformazan derivadas de la actividad deshidrogenasa; estas células se consideran células de Leydig y la proporción de ellas en cada fracción varía según el procedimiento de purificación empleado. La fracción de células que no se tiñe, en tanto, son células intersticiales sin actividad esteroideogénica, de manera que para los fines de este trabajo no se contabilizaron.

d) Determinación de la viabilidad celular.

La viabilidad celular se determina en muestras de células recién purificadas y en las preparaciones de células al cabo de todas las condiciones experimentales, usando la técnica de exclusión de azul tripano, como valoración de la proporción de células vivas (66).

8. Obtención de sangre de animales como fuente del complemento y para lavado de eritrocitos.

a) Obtención de suero como fuente del complemento.

El suero de conejos y otros animales es usado como fuente del complemento, para reacciones de lisis, sin embargo éstos pueden contener anticuerpos naturales o toxicidad que pueden interferir inespecíficamente en la reacción de lisis, y deben ser eliminados. Para la obtención del suero que se usa como el complemento se extrae sangre de conejos mantenidos en el vivero y se obtiene el suero por coagulación. El suero se separa de los elementos figurados por centrifugación, luego, un volumen de éste, se mezcla con 0,3-0,5 volúmenes de glóbulos rojos de cordero (previamente lavados). La mezcla se mantiene a 4° C durante 30 min con agitación suave, ocasional, para mantener los eritrocitos en suspensión. Luego, manteniendo siempre la refrigeración, la mezcla se centrifuga 2 veces a 400 x g por 15 min; el suero sobrenadante final se guarda en alícuotas de 50 μ l en nitrógeno líquido, hasta su utilización (72).

b) Lavado de eritrocitos de cordero y acoplamiento a proteína A.

Un cordero macho se mantuvo durante el desarrollo de la investigación en el vivero, en condiciones controladas de alimentación, agua, temperatura y luz. Se toman mensualmente 30 ml de sangre, que se colocaron en el interior de un frasco estéril recubierto con una solución anticoagulante de CPD y se mantiene a 4° C. Semanalmente, 5-8 ml de la sangre colectada, se centrifuga por 10 min a 400 xg para colectar los glóbulos rojos. El suero sobrenadante se descarta y el sedimento se resuspende en 30 ml de suero salino y se centrifuga a 400 xg por 10 min. Este procedimiento se repite 4 veces consecutivas. El sedimento final de 1 ml de glóbulos rojos se puede guardar hasta una semana, resuspendido en 25 ml de medio DMEM/0,1% BSA pH 7,8.

El acoplamiento de proteína A a la superficie de los eritrocitos se hizo utilizando 0,5 ml del sedimento de glóbulos rojos lavados, al que se agrega 0,5 ml de una solución de proteína A (0,5 mg/ml) y 5 ml de una solución recién preparada de CrCl₃ (0,01% V/V) en suero salino. La mezcla se incuba exactamente por 60 min a 34° C, con rotación suave en un Coulter Mixer. Luego, se lavan los

glóbulos rojos cuatro veces con 30 ml de suero salino, centrifugando 10 min a 400 xg cada vez. El sedimento del último lavado se resuspende en 50 ml de medio DMEM/0,1% BSA pH 7,8. En esta suspensión se cuenta el número de células (sección 6). La suspensión de eritrocitos acoplados a proteína A se mantiene a 4° C hasta una semana.

9. Estudios de unión de testosterona y de hemólisis de eritrocitos mediada por Complemento, en células en suspensión.

Fue necesario este tipo de estudios preliminares para comprobar que se acopla proteína A a la superficie de los glóbulos rojos y que mediante ésta, se asocia antisuero antiesteroides. Además se quiere comprobar si se produce hemólisis mediada por el complemento.

Con este propósito se incuban alícuotas de glóbulos rojos-proteína A en presencia de antisuero antitestosterona y [3H]-testosterona, de modo que la unión se mide a través de la radioactividad pegada a la fracción de glóbulos rojos-proteína A.

a) Incubaciones de eritrocitos con [^3H]-testosterona. Especificidad de la unión del esteroide a la superficie de los eritrocitos, efecto de la concentración del antisuero y del complemento.

En un volumen final de 500 μl se incuban glóbulos rojos-proteína A en una suspensión con tampón PBS que contiene antisuero antitestosterona (dilución especificada en resultados), y 168 fmoles de [1,2,6,7- ^3H]-testosterona (10.000 cpm). La incubación se mantiene en agitación suave y constante, durante 60 min a 30° C; al cabo de este tiempo, los tubos se centrifugan para separar la fracción de glóbulos rojos-proteína A, del medio sobrenadante. El pellet de células se lava 3 veces con PBS y luego de secar el tubo con papel, se extrae toda la noche con 600 μl de etanol; una alícuota de la extracción se cuenta directamente en PPO-POPOP-tolueno. Por otra parte, la radioactividad unida al anticuerpo en el sobrenadante de cada incubación, se mide directamente luego del tratamiento del sobrenadante con carbón-dextrano 0,25% (73). Los resultados se expresaron como porcentaje de la marca total inicial de [^3H]-testosterona (10.000 cpm), unida al antisuero, tanto

en la fracción de glóbulos rojos-proteína A como en el antisuero libre, en el sobrenadante de la incubación.

Mediante una serie experimental similar a la anterior, se cuantifica la especificidad de la unión del esteroide a la superficie de los eritrocitos a través del antisuero antitestosterona. Para esto se agrega al medio de incubación testosterona, DHT o estradiol no radioactivos en una concentración de 10^{-6} M. Las mediciones se hacen la forma señalada anteriormente.

b) Medición de la hemoglobina presente en el medio por efecto de la hemólisis.

En algunos experimentos realizados de la forma señalada anteriormente, se estima la hemólisis de los eritrocitos por acción del complemento. Para este fin, se incuban glóbulos rojos-proteína A en presencia de testosterona fría ($2,24 \times 10^{-12}$ M) y antisuero antitestosterona (dilución 1:10.000). Después de 30 min de incubación a 30° C, se agrega suero de conejo de modo que se tienen diluciones variables (1:49 - 1:199) de

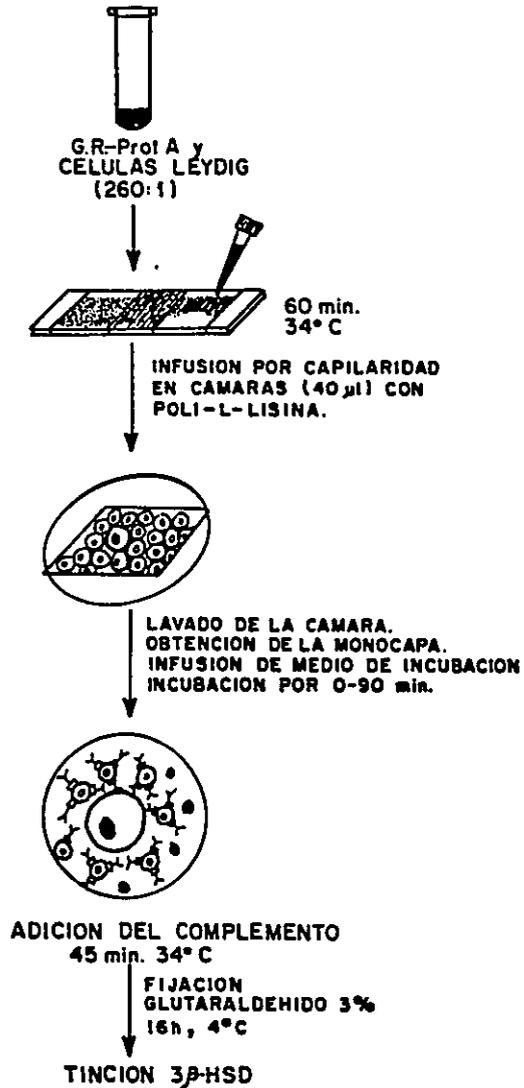
complemento. Se incuba adicionalmente por 30 min a 30° C para permitir la hemólisis. Luego se separan los glóbulos rojos por sedimentación y se miden en el sobrenadante, la absorbancia de hemoglobina a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Coleman 55.

10. Ensayo de Placa Hemolítica Reversa (RHPA).

a) Construcción de cámaras de reacción para el RHPA.

Sobre porta-objetos de vidrio previamente lavados con alcohol y enjuagados con agua, se pone una solución de 100 $\mu\text{g/ml}$ de poli-l-lisina en un volumen suficiente para cubrir el porta-objetos, y la solución se mantiene a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se lava el exceso de la solución de poli-l-lisina con una solución tampón PBS. Luego de que los porta-objetos se secan al aire, se pega sobre su superficie tres bandas paralelas de cinta adhesiva de doble faz, dejando entre ellas, dos espacios de aproximadamente 20x20 mm, los que finalmente se cubren con un cubre-objetos. Resulta así 2 cámaras con un volumen aproximado de 30-45 μl ; cada porta-objeto o placa consta de 2 cámaras de reacción (Esquema 4).

ENSAYO PLACA HEMOLITICA REVERSA (EPHR)



ESQUEMA 4: DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA SECUENCIA DE PASOS EN EL RHPA.

b) Co-incubación de glóbulos rojos-proteína A y células de Leydig purificadas en las cámaras de reacción.

Se mezclan volúmenes convenientes de glóbulos rojos-proteína A y de células de Leydig purificadas, de tal forma de obtener una relación celular aproximada de 260:1. Se infunde 40-50 μ l de esta mezcla al interior de las cámaras de reacción y se incuba por 60 min a 34° C, para permitir que las células se fijen a la matriz de poli-l-lisina. Luego de este tiempo, las células no adheridas, son eliminadas mediante un lavado con medio M-199/0,1% BSA pH 7,3; se observa la formación de una monocapa homogénea de ambas células.

c) Ensayo de placa hemolítica reversa.

Se utiliza el método descrito originalmente por Neill y Frawley (50), con algunas modificaciones menores. La obtención de glóbulos-rojos-proteína A y la construcción de cámaras de reacción, descrito anteriormente, no sufrieron cambios con respecto al método original; sin

embargo, la incubación de ambas células y la reacción de hemólisis se adaptó de la siguiente forma: el tiempo experimental se inicia luego de la fijación de las células a la matriz de la cámara, cuando se introduce en cada cámara, 45 μ l de medio de incubación, que contiene o no, según se especifica en resultados, antisuero antitestosterona, antiprogesterona, antiestradiol o la combinación de los dos primeros, hCG u otro mediador en estudio. Las cámaras se incuban a 34° C durante tiempos variables desde 0-90 min, especificados en resultados. Finalizado este tiempo, se agrega en cada cámara, 45 μ l de suero de conejo en medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 (1:49), como fuente del complemento. Se incuban las cámaras en presencia del complemento durante 45 min a 34° C, para inducir la reacción de hemólisis, en eritrocitos que hubiesen unido anticuerpo y el antígeno en estudio. En algunos experimentos no se agrega complemento, en su reemplazo se agrega sólo medio M-199/0,1% BSA pH 7,3. En la mayoría de los experimentos, una de las placas se destina para valorar la viabilidad celular, luego de la exposición de la monocapa de células, por 2-3 min, a una solución de azul tripano. En todas la placas, excepto en la destinada a

medir la viabilidad, el ensayo termina por fijación de las células, sumergiendo las placas en una solución de glutaraldehído 3% en PBS, manteniéndolas durante 16-18 h a 4° C.

Las cámaras finalmente se lavan en PBS y se procede a la reacción de tinción para la actividad 3 β -HSD, como se señaló anteriormente. La incubación se desarrolla a 34° C durante 150 min desde la infusión de un exceso de la solución para detectar la actividad enzimática y se detiene por lavado con tampón PBS (Esquema 4). Luego de la tinción, todas las placas se guardan sumergidas en PBS hasta 2 semanas, para la observación microscópica.

11. Obtención de Resultados y estadística.

Las cámaras se observan bajo un microscopio óptico Leitz Laborlux S, con un aumento de 400x, controlándose que las células nucleadas forman monocapas con los eritrocitos. En cada cámara se cuenta: el número de células nucleadas y teñidas para la actividad 3 β -HSD (población total con actividad esteroidogénica) y el número de células teñidas que forman placas de hemólisis o

halos, en las distintas condiciones de incubación (células secretoras); por diferencia de ambos grupos se obtiene el número de células nucleadas que siendo tinción positiva no forman placa de hemólisis (células no secretoras). Los resultados se expresan como porcentaje de células que forman o no placa, con respecto al 100% de células teñidas. Además, mediante el empleo de un ocular graduado Leitz, en algunos experimentos se cuantifica, en el plano de observación, el diámetro celular de todas las células teñidas, y en células secretoras, el diámetro del halo de hemólisis.

Como una aproximación a la medición del tamaño celular, a partir de la medición del diámetro celular en el plano de observación (plano horizontal) se estima el área celular, valor que se expresa en micrómetros cuadrados (μm^2). Considerando que las células observadas tienen un volumen, el que escapa a la medición directa en el plano, se valida la aproximación de estimar el área celular, determinando el volumen celular mediante la medición de la altura de las células. Para esto, en algunos experimentos, al momento de preparar las cámaras, se les hace un trazo fino con lápiz permanente sobre la capa de poli-l-lisina,

de modo de tener una referencia de la base sobre la que se fijan las células. En estas cámaras se mide, mediante las unidades arbitrarias propias del tornillo micrométrico del microscopio, tanto la cifra correspondiente al foco del trazo de lápiz (que corresponde a la base de la célula observada), como la cifra correspondiente al foco en el diámetro mayor de la célula. La diferencia entre estos dos valores, representa el radio de la célula, tomado en el plano vertical de la misma (conversación personal con el Dr. Carlos Doggenweiler, Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad de Chile). Luego las unidades del micrométrico se estandarizan en μm .

Cuando se mide el diámetro del halo, los resultados se expresan en cada caso como área de hemólisis, restando el área estimada ocupada por la célula secretora. Para estimar el área de hemólisis en μm^2 , igualmente se considera la graduación del ocular y el aumento utilizado.

Todos los datos individuales de las células, con respecto a características de secreción, diámetro, diámetro de placa, así como condiciones de incubación, se archivan en una base de datos y se analizan mediante un programa

SPSS/PC. Se analiza la distribución de las células según:

- a) la propiedad secretora o no, b) el promedio de los tamaños celulares en cada subpoblación, c) el área de hemólisis de secreción, en las condiciones de incubación señaladas y d) la frecuencia de distribución de los tamaños celulares medidos para cada subtipo definido: secretoras y no secretoras.

Para determinar las diferencias entre grupos experimentales y la significancia de los resultados para cada condición de incubación, se hace un análisis estadístico por ANOVA o por análisis de Duncan.

RESULTADOS.

I) ADAPTACION DEL RHPA PARA LA SECRECION DE ESTEROIDES.

El ensayo de placa hemolítica reversa RHPA es una técnica recientemente descrita y sólo se ha utilizado para el estudio de secreciones de peso molecular relativamente grandes (50-59). Debido a que este tipo de aproximación experimental permite determinar la actividad secretora de las células individuales y por lo tanto conocer una población celular heterogénea, con respecto a las propiedades de secreción, propusimos adaptar el método para el estudio de la secreción de esteroides, desde células de Leydig individuales, purificadas de testículo de rata.

Como el ensayo había sido descrito para la detección de la secreción de proteínas o péptidos, moléculas que no ofrecen dificultades en la inmunodetección y puesto que podría suponerse una disminución de la sensibilidad de este tipo de ensayos en estudios de detección de antígenos de peso molecular bajo, fue absolutamente necesario, en primer lugar, estudiar algunos parámetros de la reacción que indicaran la posibilidad de aplicar efectivamente el RHPA

para el estudio de la secreción de esteroides. Con este objeto, se analizó la capacidad de unión del anticuerpo antiesteroide a los glóbulos rojos-proteína A indirectamente a través de la unión de $[^3\text{H}]\text{-T}$ a los glóbulos rojos-proteína A; los factores de los que depende esta unión y, luego la acción inductora de hemólisis del complemento sobre los glóbulos rojos-proteína A que han unido moléculas del antígeno.

1. Medición de la unión del antisuero y testosterona a la superficie de los eritrocitos acoplados a proteína A.

Se incubó en un volumen final de 0,5 ml cantidades crecientes de glóbulos rojos-proteína A, preparados según se señaló en método (8b), en presencia de una concentración inicial constante de anticuerpo antitestosterona (dilución final 1:5.000) y de $[^3\text{H}]\text{-T}$ (10.000 cpm, 168 fmoles). Las incubaciones se realizaron por 60 min a 30°C , en agitación constante. Los resultados se expresan como porcentaje de unión de $[^3\text{H}]\text{-T}$ al anticuerpo presente en la incubación. La Figura 1a muestra los resultados de un experimento representativo, que demuestra que la unión de

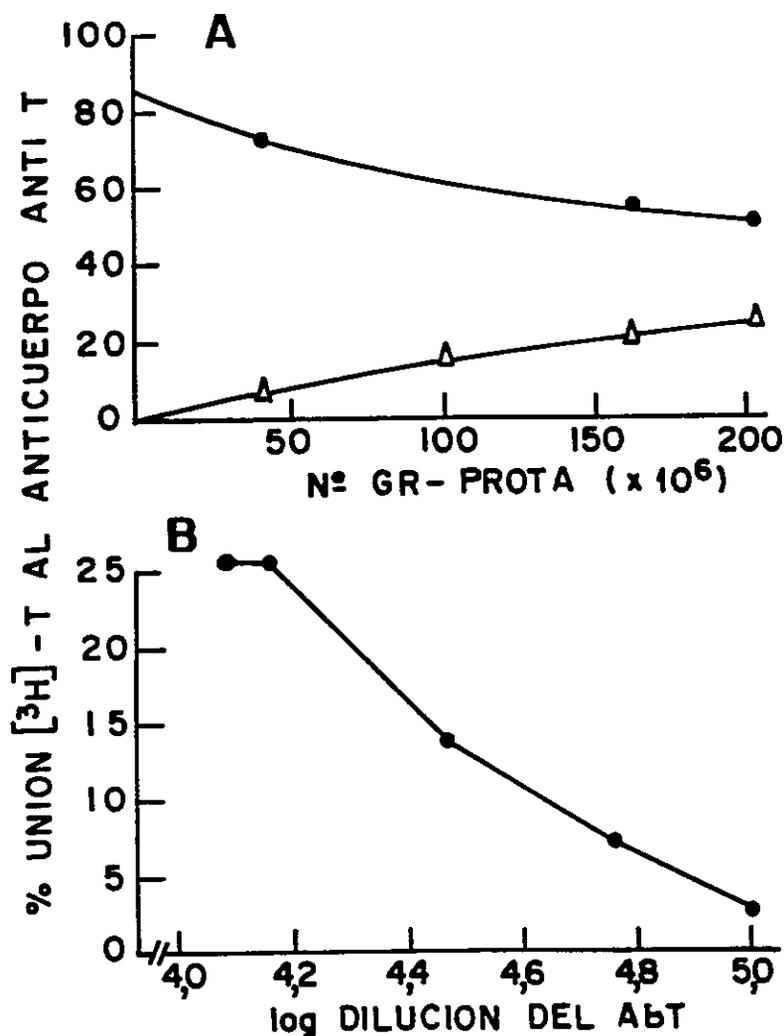


Figura 1: VARIACION DEL PORCENTAJE DE UNION DE [^3H]-T AL ANTICUERPO ANTITESTOSTERONA.

La incubación se llevó a cabo en un volumen final de 0,5 ml por 60 min a 30° C, como se detalló en métodos. Se separó los glóbulos rojos-proteína A (Δ) y la fracción sobrenadante (\bullet) y se midió en cada fracción la testosterona unida. a) Efecto de la concentración de glóbulos rojos-proteína A y b) efecto de la dilución del anticuerpo antitestosterona.

[³H]-testosterona a la superficie de los glóbulos rojos-proteína A, es dependiente de la concentración de éstos. Como no se observa unión de [³H]-T en ausencia de glóbulos rojos-proteína A o, glóbulos rojos sin proteína A, el incremento en la unión a la fracción celular que se aprecia en la figura, representa la unión mediada por proteína A acoplada a la superficie de los eritrocitos. Se observa que para la concentración de antisuero usada, el máximo de unión del antisuero a glóbulos rojos-proteína A es equivalente al 30% de la [³H]-testosterona inicial. Por otra parte, como comprobación de que el anticuerpo se ha unido a los glóbulos rojos-proteína A, se observa que el porcentaje de [³H]-T que se une al anticuerpo y que queda en el sobrenadante, es proporcionalmente menor al aumentar los glóbulos rojos-proteína A en la incubación.

En otra serie experimental semejante, esta vez utilizando una sola concentración de glóbulos rojos-proteína A ($2,155 \times 10^8$ células) y de [³H]-T (168 fmoles), se estudió el efecto de distintas concentraciones del antisuero antitestosterona, sobre el nivel de unión del esteroide a la fracción de glóbulos rojos-proteína A. Al igual que la serie experimental anterior, la unión a la

superficie de los glóbulos rojos-proteína A se expresó como porcentaje de [^3H]-T unido al anticuerpo presente en la incubación. Como se muestra en la Figura 1b, se observó que la unión de [^3H]-T a los glóbulos rojos-proteína A varió en forma creciente de acuerdo a la cantidad de antisuero antitestosterona presente durante la incubación; el máximo de unión se observó con la dilución final del antisuero de 1:15.000 y la unión disminuyó hasta 0, cuando el antisuero no estaba presente en la incubación. También se concluyó de este resultado de células en suspensión, que la dilución óptima para los ensayos de detección de esteroides es de 1:10.000.

A partir de los resultados descritos, se estimó el número de moléculas de proteína A acopladas a la superficie de los eritrocitos, considerando que cada proteína A une una molécula de anticuerpo, y la inmuglobulina a su vez une una molécula de [^3H]-T. Según esto, se calculó que un mínimo de 62 moléculas de proteína A se pueden unir a cada eritrocito.

Finalmente, en otra serie experimental se estudió la especificidad de la unión observada (resultados sólo comentados). Para ello se incubó glóbulos rojos-proteína A

en presencia del anticuerpo antitestosterona (dilución 1:10.000), [³H]-testosterona (168 fmoles) y 5 α -dihidrotestosterona, testosterona o estradiol no radioactivos (10^{-6} M en cada caso). No se observó competencia para la unión de [³H]-testosterona, mediada por el anticuerpo a la superficie de los glóbulos rojos-proteína A, en presencia de estradiol, aún cuando esta incubación se efectuó en las mismas condiciones de tiempo y temperatura que en los experimentos anteriores. Por otra parte, cuando en la incubación había DHT o testosterona no radioactiva, se produjo un descenso de un 12,5 y 53,1 %, respectivamente, de la [³H]-T unida a la superficie de los glóbulos rojos-proteína A.

2. Hemólisis de glóbulos rojos-proteína A unidos a antisuero, en presencia de testosterona en la incubación.

Habiendo demostrado indirectamente la unión de proteína A a los glóbulos rojos y la interacción de esta proteína al anticuerpo, se demostró finalmente que se puede inducir el desarrollo de hemólisis de glóbulos rojos por adición del complemento. Para esto, en otra serie experi-

mental, se incubó glóbulos rojos-proteína A ($2,15 \times 10^8$ células) con antisuero antitestosterona (dilución final 1:10.000), en presencia de testosterona no radioactiva ($2,24 \times 10^{-12}$ M), en un volumen final de 0,5 ml. Luego de 30 min a 30° C, se agregó suero de conejo, como fuente del complemento, en distintas concentraciones, incubándose por 90 min adicionales a 30° C. Se centrifugaron los tubos para separar el sobrenadante, y en éste, se midió la concentración de hemoglobina por absorción a 540 nm. Los resultados se muestran en la Figura 2; se aprecia que efectivamente en estas condiciones hay hemólisis mediada por el complemento. Se observó un aumento lineal, en la cantidad de hemoglobina derivada de la hemólisis de eritrocitos, por efecto del aumento en la concentración de complemento en la incubación. La hemoglobina observada en el sobrenadante, en ausencia del complemento, fue muy baja; tampoco se observó hemólisis cuando no hay testosterona en la incubación.

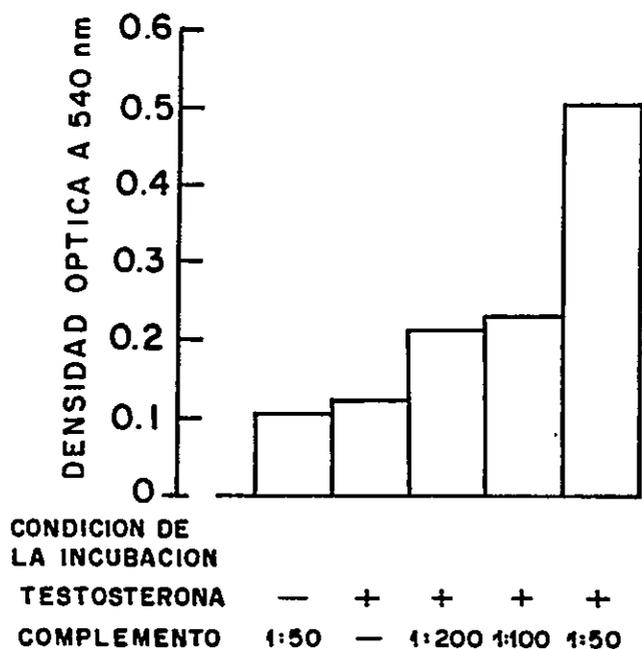


Figura 2: EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL COMPLEMENTO SOBRE LA LIBERACION DE HEMOGLOBINA (Hb) DESDE GLOBULOS ROJOS-PROTEINA A EN SUSPENSION.

La incubación por 30 min a 30° C, comenzó al agregar anticuerpo antitestosterona y testosterona no radioactiva, como se indica en la figura. Luego del tiempo de incubación, se agregó complemento en la proporciones indicadas en la figura por 45 min adicionales. El sobrenadante fue separado de los glóbulos rojos-proteína A y se midió la absorción en un espectrofotómetro a 540 nm.

3. Formación de monocapas de glóbulos rojos-proteína A con células de Leydig de testículo de rata.

Con la medición de los parámetros anteriormente descritos: la unión del antisuero y el esteroide a la superficie del eritrocito, el aumento de la hemólisis en presencia del complemento, y la especificidad de la reacción, se obtuvo una base experimental que indicaba la factibilidad de utilizar esta técnica para el estudio de la secreción de esteroides en células de Leydig. Por consiguiente, el paso siguiente fue lograr monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A, en las cámaras de incubación.

Observamos que para lograr el objetivo planteado fue apropiada una mezcla de células de Leydig purificadas con glóbulos rojos-proteína A, en una relación celular de 1:260. Luego del procedimiento experimental descrito en método, se observó la formación sobre la matriz de poli-l-lisina de una monocapa densa y homogénea de ambos tipos de células. Esto se puede apreciar en las fotografías de la Figura 3. La fotografía (3A) muestra la monocapa de eritrocitos y células nucleadas. La obtención de una densidad de eritrocitos por área, como la mostrada en esta

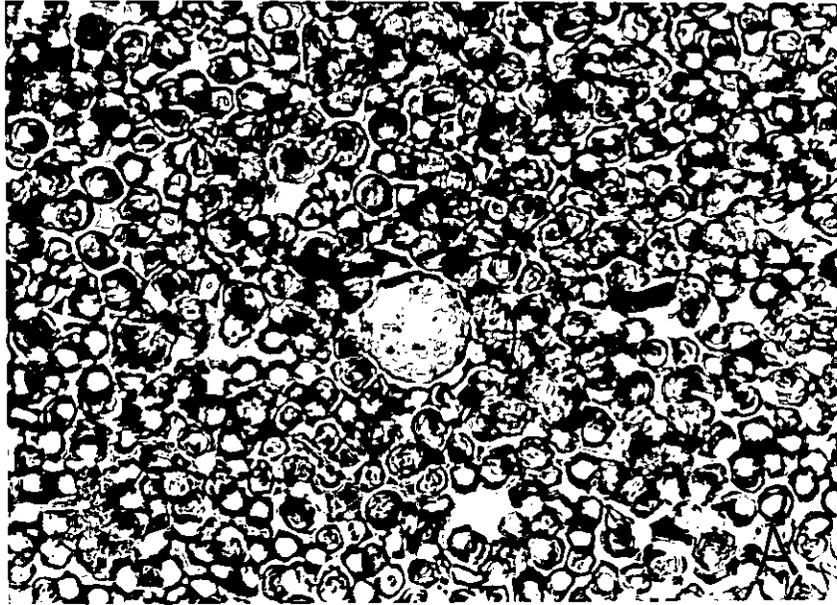


Figura 3: FOTOGRAFÍAS DE MONOCAPAS DE CO-INCUBACION DE GLOBULOS ROJOS-PROTEINA A Y DE CELULAS NUCLEADAS OBTENIDAS POR LA GRADIENTE DISCONTINUA DE PERCOLL.

La incubación de monocapas se realizó por 90 min a 34° C en presencia de hCG 25 UI/ml y anticuerpo antitestosterona. Después del tiempo de incubación se agregó complemento por 45 min adicionales y, luego de la fijación como se detalló en métodos, las cámaras se expusieron a la tinción citológica para la actividad enzimática 3 β -HSD por 120 min a 30° C. A) Célula nucleada no esteroidogénica o 3 β -HSD (-) (no se tiñeron). B) Célula nucleada esteroidogénica 3 β -HSD (+) no secretora, y C) célula nucleada esteroidogénica 3 β -HSD (+) secretora de testosterona, dado que forma placa hemolítica (aumento 1000x).

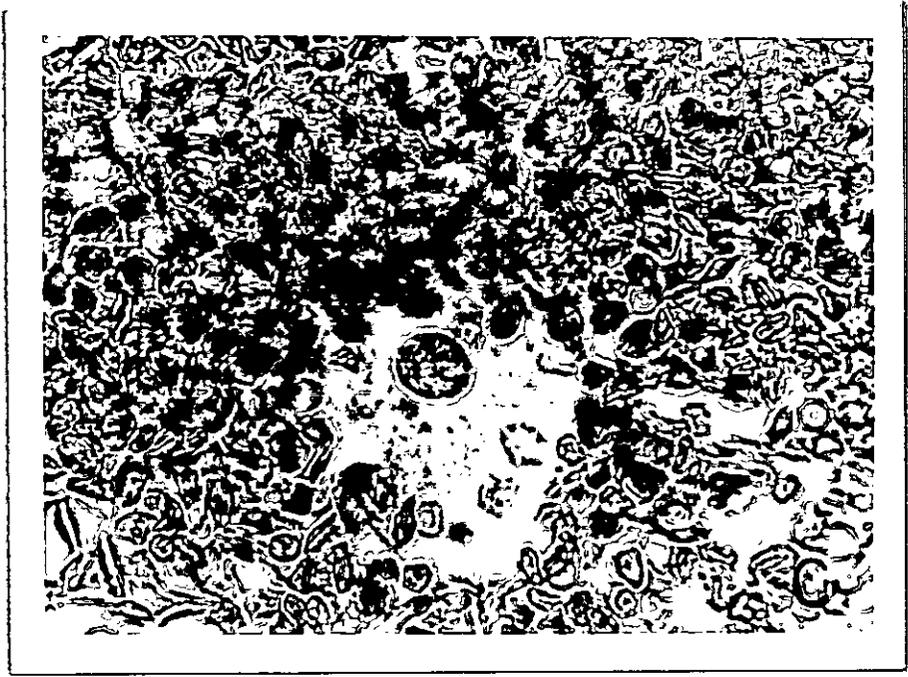
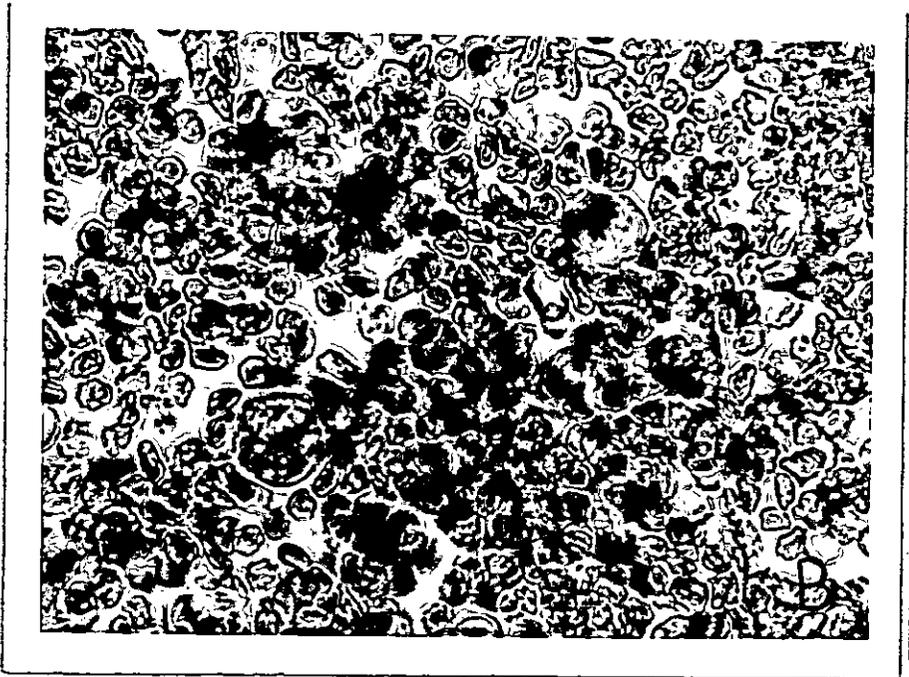


figura fue el primer criterio para seleccionar una preparación adecuada.

El segundo criterio utilizado en la observación de las monocapas de células, fue la obtención de una tinción apropiada de las células luego de la exposición de las placas a la tinción histoquímica de la enzima 3β -HSD. Según este criterio, las células nucleadas observadas al microscopio se clasificaron en 3 grupos: a) células nucleadas no teñidas (Figura 3A), que representarían células sin actividad esteroidogénica, por lo tanto no consideradas Leydig bajo este criterio. Este grupo celular no se expresa en los resultados pero se registró, y representó en todos los experimentos un $23,8\% \pm 9,6$ de las células nucleadas presentes en las preparaciones. b) Células nucleadas teñidas de azul, sin halo o placa hemolítica (Figura 3B), son células de Leydig con actividad esteroidogénica, pero sin secreción detectable del esteroide cuyo anticuerpo está presente durante la incubación y c) células nucleadas, teñidas de azul y rodeadas por un halo o placa hemolítica (Figura 3C), éstas son células de Leydig esteroidogénicas y con secreción activa del esteroide, cuyo anticuerpo se encuentra en el medio de incubación.

Cuando se analizó en una alícuota de células recién purificadas, la proporción de células que muestra actividad esteroideogénica por el marcador enzimático, se observó una proporción de $72,5 \% \pm 14,3$ con respecto al total de células nucleadas. Fue entonces importante demostrar, que luego de toda la manipulación experimental que requiere el método, el número de células teñidas en el interior de las cámaras era semejante al valor obtenido previo a la incubación, es decir, demostrar que la fijación de las células en la matriz de poli-L-lisina y el procedimiento de incubación en las cámaras con múltiples adiciones de medio, no altera la proporción de células nucleadas que se fijan. Así, al cabo de las incubaciones, la tinción realizada como se describió (método 10c), demostró que el porcentaje de células teñidas fue de $76,12 \% \pm 18,5$.

Finalmente y como control rutinario de las condiciones experimentales, al finalizar las incubaciones, una de las placas fue destinada para el control de la viabilidad celular (método 7d); encontramos que la sobrevivencia celular al cabo del procedimiento experimental fue de $88,5 \% \pm 3,4$.

II) Detección de la secreción de Testosterona desde células de Leydig individuales, utilizando el RHPA.

Los resultados anteriores dieron una base entonces, para estudiar utilizando el RHPA, la secreción del principal esteroide producido por las células de Leydig: la testosterona. Inicialmente fue necesario establecer las condiciones de incubación para la detección de la secreción de testosterona; posteriormente se analizó el efecto de algunos factores que inciden en la secreción de dicho esteroide desde las células de Leydig.

1. Dependencia del tiempo de incubación para la detección de testosterona.

a) Porcentaje de células que forman placa:

En el estudio de la secreción de otras células, en general se utiliza el RHPA con tiempos de incubación relativamente prolongados; sin embargo se sabe que suspensiones de células de Leydig incubadas in vitro por tiempos cortos (15-120 min), producen testosterona en cantidad fácilmente detectable por radioinmunoensayo (17).

Interesaba entonces, conocer si el RHPA permitía la detección de testosterona luego de tiempos de incubación relativamente breves.

Para esto, una vez que se logró formar la monocapa de ambas células en el interior de cada cámara, a un cierto número de cámaras se agregó medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 que contenía hCG (25 UI/ml), antisuero antitestosterona (dilución final 1:10.000), mientras que a otras se agregó sólo el medio con el antisuero, pero sin hCG. Luego de distintos tiempos (0 - 120 min), se agregó complemento, como ya fue descrito en método.

El uso del RHPA para detectar la secreción de testosterona con respecto al tiempo de incubación permitió apreciar que el tiempo necesario para obtener el máximo número de células secretoras de testosterona es diferente para las dos condiciones estudiadas: células no estimuladas por la gonadotropina o células estimuladas por hCG. Así, cuando la dependencia del tiempo se estudió en ausencia de la hormona, es decir en condiciones basales (Figura 4), se observó que al cabo de la incubación de 90-120 min el número de células secretoras sólo representó un 15-25% de las células de Leydig.

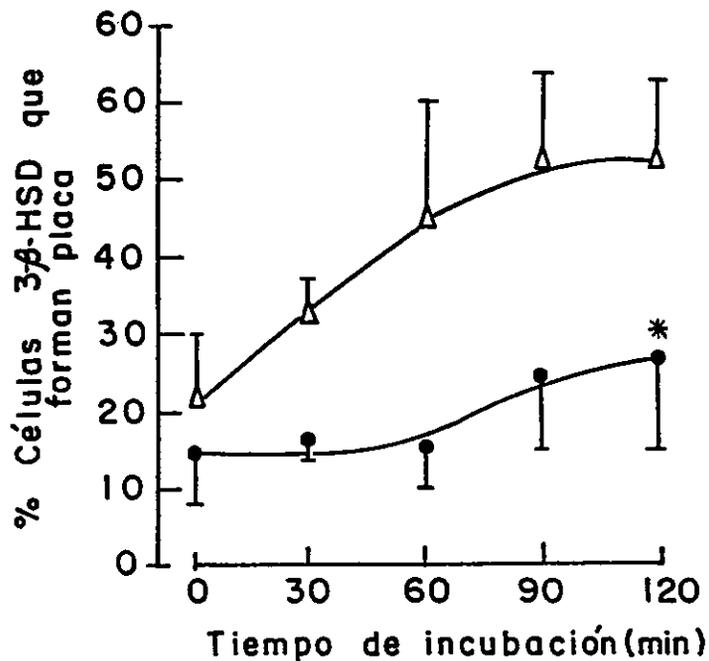


Figura 4: EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS 3 -HSD CON ACTIVIDAD SECRETORA DE TESTOSTERONA (que forman placas).

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34° C en los tiempos indicados en presencia del anticuerpo antitestosterona y hCG (Δ) o ausencia de la gonadotrofina (●). Luego del tiempo de incubación indicado en la figura, se agregó complemento por 45 min. Los resultados son promedios ± DS de 15 experimentos en duplicados (* P<0,001 cuando se comparó con estimuladas con hCG 25 UI/ml).

Por otra parte, la presencia durante la incubación de la gonadotrofina, modifica en forma apreciable el número de células de Leydig que participa en la secreción de testosterona. El tiempo 0 min de incubación (que representa la secreción durante los 45 min de incubación para inducir la hemólisis por la presencia del complemento), no es significativamente diferente en los dos tipos de incubaciones que se ilustran en la Figura 4. Sin embargo, ya al cabo de 15 min, el número de células reclutadas en la actividad secretora de testosterona, es claramente mayor en presencia de la gonadotrofina. El efecto de hCG para incluir el número máximo de células a la fracción secretora se logra prácticamente a los 60 min ($52 \% \pm 13$); este número no aumenta con incubaciones más prolongadas por lo menos hasta 180 min.

Posteriormente, la mayoría de los experimentos se hicieron con una incubación de 90 min, que se demostró suficiente para obtener la incorporación del máximo de células de Leydig a la secreción de andrógenos.

b) Efecto del tiempo de incubación sobre el tamaño de los halos de lisis.

Desde un punto de vista teórico, el área de los halos de hemólisis en torno a las células secretoras, debería dar cuenta hasta cierto punto, de la cantidad de antígeno secretado desde cada célula, aunque esta medición no puede relacionarse cuantitativamente en términos de masa de hormona producida y liberada. La Figura 5A ilustra los resultados observados en nuestro sistema en células estimuladas con hCG. Se observa que el área de los halos de lisis de eritrocitos, aumenta gráficamente en forma exponencial con el tiempo de incubación (como se señaló anteriormente, las placas de hemólisis observadas a tiempo 0, representa la secreción producida durante los 45 min de incubación con el complemento).

En la Figura 5B, por otra parte, se muestra el análisis de frecuencia del área de secreción, en la totalidad de las células secretoras estudiadas a los 90 min de incubación en presencia de hCG (2023 células). Se muestra que la mayor proporción de ellas se comporta en forma semejante cuantitativamente, de modo que el 50% de las células definen halos de $450 \mu\text{m}^2$.

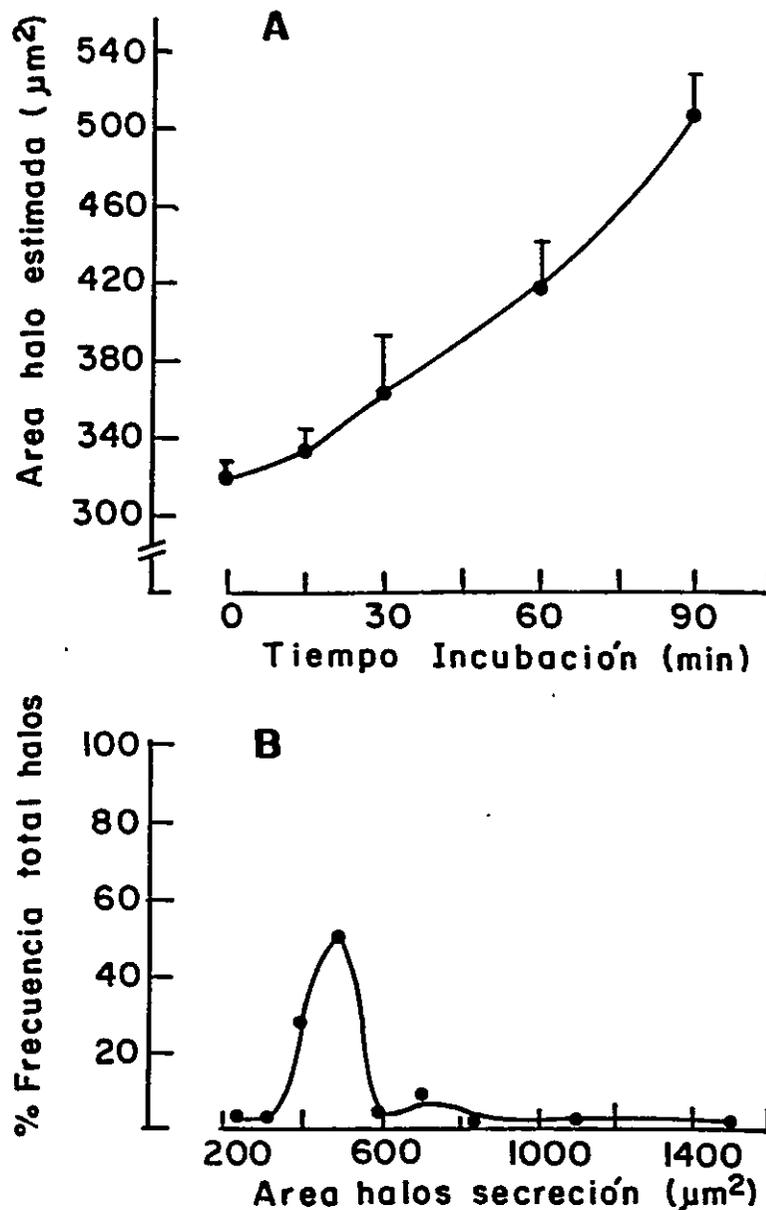


Figura 5: ESTUDIO DEL AREA DE PLACAS DE HEMOLISIS.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34°C en presencia de 25 UI/ml de hCG y anticuerpo antitestosterona, por los tiempos indicados. Terminada la incubación, se agregó complemento por 45 min. (A) Efecto del tiempo de incubación sobre el área de los halos de hemólisis, los resultados representan los promedios \pm DS de 6 experimentos. (B) Análisis de la frecuencia del área de hemólisis observada en el total de células secretoras ($n=2023$ células).

2. Dependencia de la dosis de la hormona gonadotrofina sobre la secreción de testosterona medida en el RHPA.

Como se sabe, la influencia de LH sobre la respuesta esteroidogénica de las células de Leydig, es el principal factor de regulación, por tanto era fundamental demostrar en este sistema de incubación que las células responden a la gonadotrofina. Se empleó la hCG, como hormona homóloga a la funcional LH, dado que tiene ventajas experimentales y sus propiedades de unión a los receptores de membrana, de estimulación del sistema proteína G-adenilato ciclasa, generación de cAMP y síntesis de esteroides in vitro están caracterizadas en el laboratorio (17,49).

La Figura 6 resume gráficamente los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la concentración de hCG, sobre la respuesta de liberación de andrógenos luego de 90 min de incubación. Nuevamente, se observó un máximo de 52 % de células de Leydig secretoras de testosterona, ya con una dosis de 1-5 UI/ml de hCG; dosis aún mayores, no aumentó la fracción de células secretoras. También se

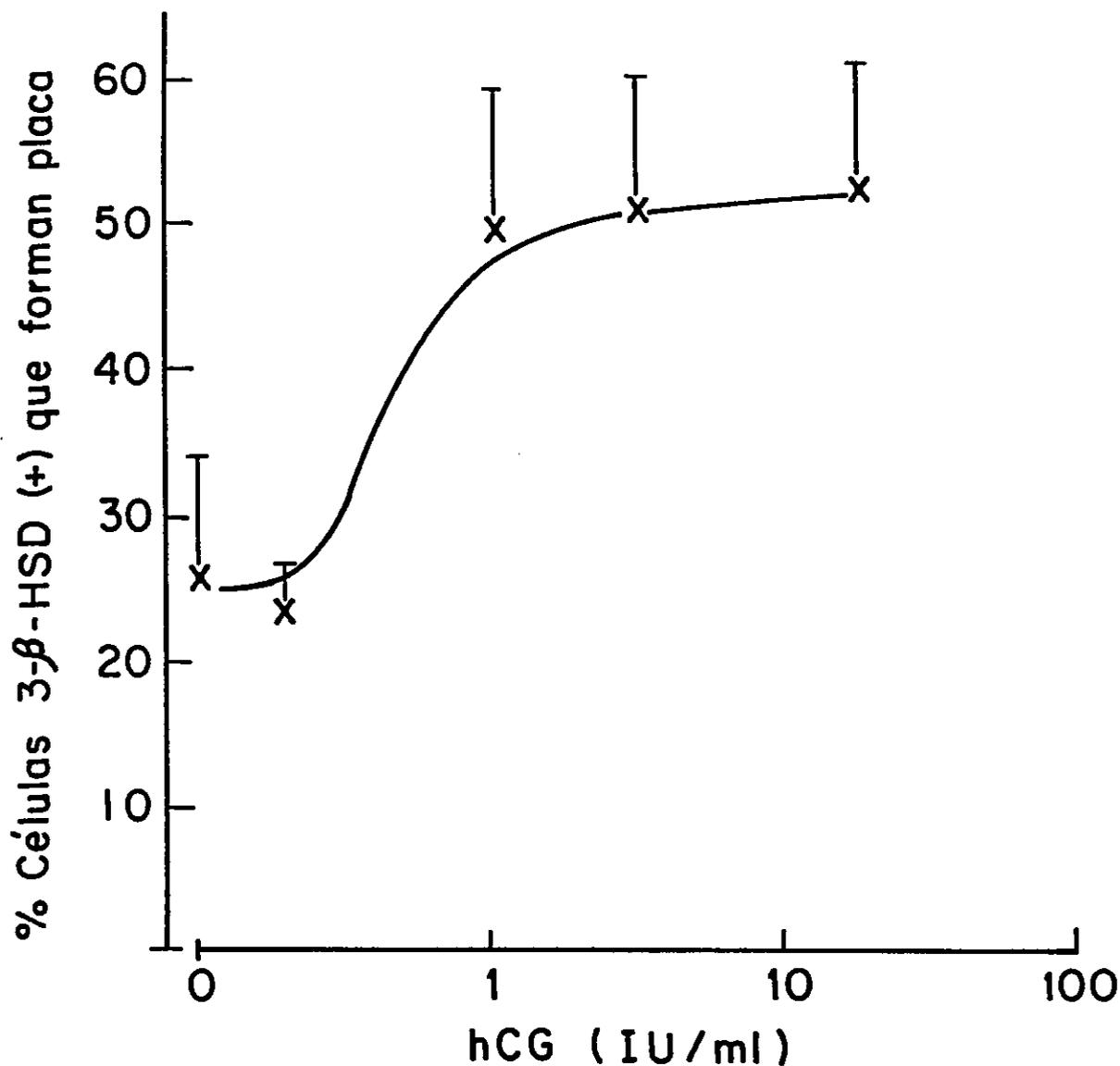


Figura 6: EFECTO DE LA DOSIS DE LA GONADOTROFINA hCG SOBRE EL PORCENTAJE DE CELULAS SECRETORAS.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron por 90 min a 34° C con cantidades crecientes de hCG, como se indica en la figura. Luego del tiempo de incubación, se agregó complemento por 45 min. Los resultados son el promedio \pm DS de 8 experimentos distintos en duplicados.

observa que en ausencia de la hormona hay un 25 % del total de células de Leydig que secretan el andrógeno. Estos resultados definen para las condiciones estudiadas de tiempo y de dosis del estímulo por la gonadotrofina, la existencia de dos subpoblaciones de células de Leydig, unas secretoras de testosterona y otras no secretoras. Al mismo tiempo, dentro de la población de células secretoras, una proporción de ellas responde al estímulo de la hCG, mientras que otras secretan el andrógeno independientemente de la gonadotrofina (células basales).

3. Control de las condiciones de incubación para el RHPA.

Frente a la necesidad de definir adecuadamente las características de la reacción, se realizaron experimentos en los que se omitió en la etapa correspondiente del RHPA, el anticuerpo antitestosterona, el suero como fuente del complemento, o la albúmina presente en el medio. Los resultados que se presentan en la Figura 7 demuestran que los 2 primeros factores son indispensables para la observación del RHPA. La ausencia durante el ensayo, ya sea del anticuerpo o del complemento, determina una hemólisis

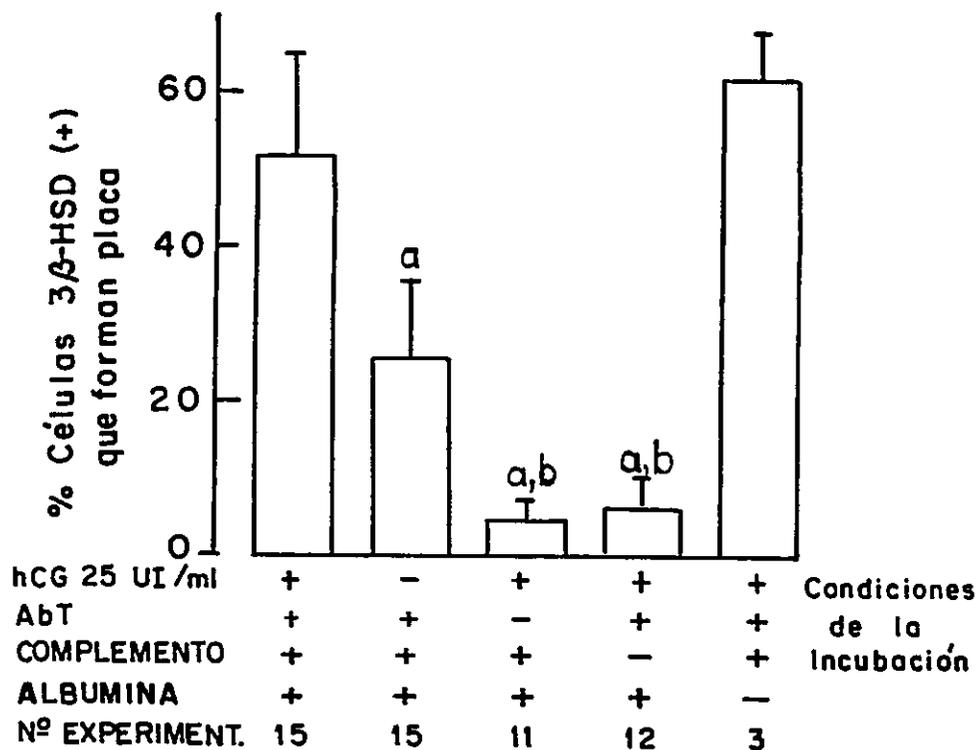


Figura 7: EFECTO DE MODIFICACIONES DEL MEDIO DE INCUBACION NORMAL SOBRE EL PORCENTAJE DE CELULAS SECRETORAS DE TESTOSTERONA.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34° C por 90 min en las condiciones indicadas en la figura. El complemento se agregó por 45 min después del tiempo de incubación. Los resultados son el promedio ± DS de los experimentos indicados en la figura. (a P<0,001 cuando se comparó con estimulado con hCG 25 UI/ml; a,b P<0,001 cuando se comparó con basal).

muy baja. Esta hemólisis inespecífica representaría, por una parte, la lisis inducida por factores de la incubación tanto en la manipulación experimental como derivados de la actividad de las células de Leydig y, por otra parte, el error experimental en la medición de los halos. Aunque el área de hemólisis es neta, es decir, restando el área ocupada por la célula, se consideraron como halos, a aquellos de un área mínima de $200 \mu\text{m}^2$.

Adicionalmente se demostró que el aumento al doble de la concentración del anticuerpo antitestosterona en la incubación (dilución final 1:5.000), no altera la proporción de células que forman placa, por lo que la concentración del antisuero no sería limitante en la incubación.

El otro factor cuyo efecto se analizó, fue la influencia que tiene la albúmina, presente en el medio de incubación. Este control experimental fue necesario pues se sabe que ésta y otras proteínas plasmáticas interactúan con los esteroides, de modo que su presencia en el medio de incubación, podría disminuir la capacidad de unión con el antisuero. Los resultados demostraron que la presencia de albúmina en el medio no disminuye en forma significativa la

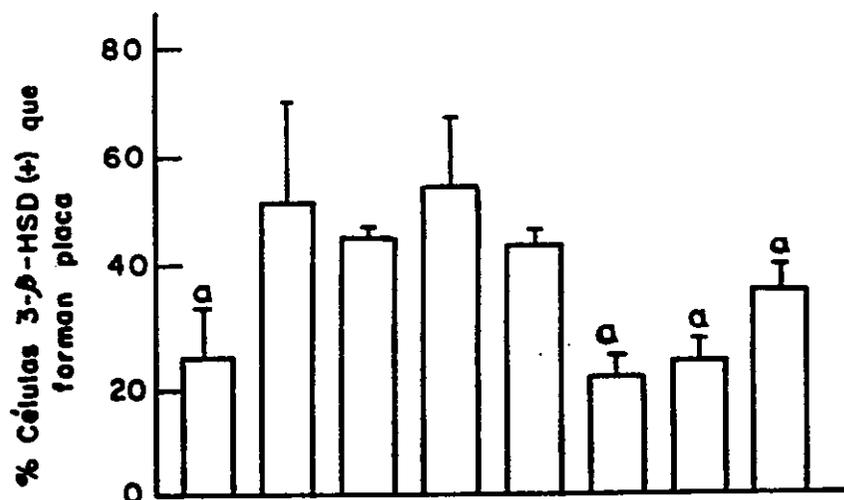
sensibilidad del método; dado que su presencia en el medio protege a las células de Leydig, se incluyó en todos los experimentos posteriores.

Finalmente en esta serie experimental, se incluyó incubaciones en las que el medio DMEM/0,1% BSA pH 7,8 fue reemplazado por el medio DMEM/0,1% BSA pH 7,8 F-12, que no contiene rojo fenol (resultado sólo comentado). Este control se realizó dado que se ha informado que en distintos sistemas de incubación, este indicador tiene acción estrogénica, por tanto era relevante evaluar su efecto en el RHPA. Los resultados demostraron que al menos en las condiciones descritas, la presencia del rojo fenol no influye, puesto que las incubaciones efectuadas sin este indicador, resultaron cuantitativamente iguales a las incubaciones obtenidas en presencia o ausencia de hCG con el medio M-199/0,1% BSA pH 7,3 que contiene el indicador. De modo que se mantuvo el uso de este medio M-199/0,1% BSA pH 7,3, dada las ventajas que tiene su uso para controlar las variaciones de pH.

4. Estudio de algunos factores que modifican la esteroidogénesis, sobre la secreción de testosterona medida por el RHPA.

Dado que el número de células de Leydig secretoras de testosterona representó sólo aproximadamente el 52% de las células esteroidogénicas, pareció fundamental estudiar si la falta de secreción de testosterona por parte del 50% de células no secretoras, se debía a alguna disfunción de la señal de la gonadotropina, ya sea por alteración del receptor durante el procedimiento experimental o debido a una modificación de la activación posterior requerida para la esteroidogénesis, o a otros factores. Por tal motivo se hicieron los estudios que se resumen en la Figura 8.

Se aprecia que si en vez de la gonadotropina se utiliza el análogo del segundo mensajero de LH, 8(Br)-cAMP, la fracción de células secretoras de testosterona es equivalente a la observada en presencia de hCG. Por otra parte, la serie de experimentos realizados con distintos sustratos esteroidogénicos como pregnenolona, progesterona o 22-hidroxicolesterol, todos intermediarios



hCG 25 UI/ml	-	+	-	-	-	-	+	+
8(Br)cAMP + MIX 1 mM	-	-	+	-	-	-	-	-
Pregnenolona 10 ⁻⁶ M	-	-	-	+	-	-	-	-
22-R-Hidroxicolesterol 10 ⁻⁶ M	-	-	-	-	+	-	-	-
Estradiol 10 ⁻⁶ M	-	-	-	-	-	+	+	-
Aminoglutatimida 0.5 mM	-	-	-	-	-	-	-	+
Nº Experimentos	10	10	3	3	3	3	3	3

Figura 8: ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE MODIFICAN LA ESTEROIDOGENESIS, SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS SECRETORAS DE TESTOSTERONA.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34^o C por 90 min. Las incubaciones se hicieron en presencia de los factores señalados sin la gonadotropina, para el caso de 8(Br)-cAMP, pregnenolona o 22-R-hidroxicolesterol; y en presencia de hCG 25 UI/ml para los ensayos con estradiol y aminoglutatimida. Después del tiempo de incubación óptimo, se agregó complemento durante 45 min. Los resultados son el promedio ± DS de los experimentos indicados en la figura (a P < 0,001 cuando se comparó con respecto a estimuladas con hCG 25UI/ml).

de la vía que asegurarían un máximo de capacidad de síntesis de testosterona en ausencia de la gonadotropina, no determinó en ninguno de los casos que la proporción de células secretoras aumentara. Estos mismos resultados se observaron si las incubaciones con los esteroides citados se realizaban en presencia de hCG 25 UI/ml.

Estos resultados revelan que el número limitado de células que secretan testosterona, no se debe a una falla en la funcionalidad del receptor o el sistema efector; además estos experimentos permiten concluir que las células secretoras y no secretoras estarían provistas de suficiente cantidad de sustratos esteroidogénicos precursores para la síntesis de testosterona.

Aunque no se logró incorporar un mayor número de células a la fracción secretora de testosterona, se demostró que este número se modifica con factores inhibitorios de la síntesis de testosterona. Los resultados que se muestran también en la Figura 8, demuestran que aminoglutatimida incluida en el medio de incubación y en presencia de hCG, disminuye el número de células secretoras de testosterona a sólo un 37%. Este estudio se realizó para determinar la influencia de la inhibición de la síntesis

de esteroides sobre la población de células secretoras.

Por otra parte, se estudió también en este sistema en presencia de hCG, el efecto de estradiol. Como se sabe este esteroide es también sintetizado por las células de Leydig de ratas adultas y puede ser un inhibidor de la síntesis de testosterona (46,74). Los resultados demostraron que el estradiol provoca una clara reducción en el número de células secretoras de testosterona, proporción de células secretoras que llega a ser equivalente a la fracción de células secretoras basales.

III. Caracterización de subpoblaciones de células de Leydig secretoras y no secretoras de testosterona.

1. Comparación de las áreas celulares estimadas para células secretoras y no secretoras.

Los resultados descritos hasta ahora hicieron evidente la presencia regular de dos subpoblaciones de células de Leydig: secretoras de testosterona y no secretoras; además, se apreció que el método permitía registrar

otro parámetro de las células de Leydig: el tamaño. Considerando que las diferencias de tamaño de las células podría resultar de deformaciones causadas por las condiciones del ensayo, fue necesario controlar la exactitud de la medición del área como aproximación al tamaño celular. Para esto, se midió la altura de las células pequeñas y grandes en cierto número de preparaciones (método 11). Los resultados obtenidos como radio de cada célula se expresaron como área celular estimada y se relacionaron individualmente con los datos obtenidos para las mediciones en el plano de observación (Figura 9). La curva de regresión obtenida muestra que las células son prácticamente esféricas, en el caso de células pequeñas y ligeramente ovoides en las células de mayor tamaño. Si se observa en un mismo grupo de los tres grupos celulares seleccionados por la medición en el plano, existen diferencias importantes de área celular medida por el radio, sin embargo, en promedio estas diferencias son significativamente distintas.

Estas observaciones permiten concluir que el área celular estimada, tiene correlato con el tamaño de las células, y por tanto, cada vez que se mide que una célula

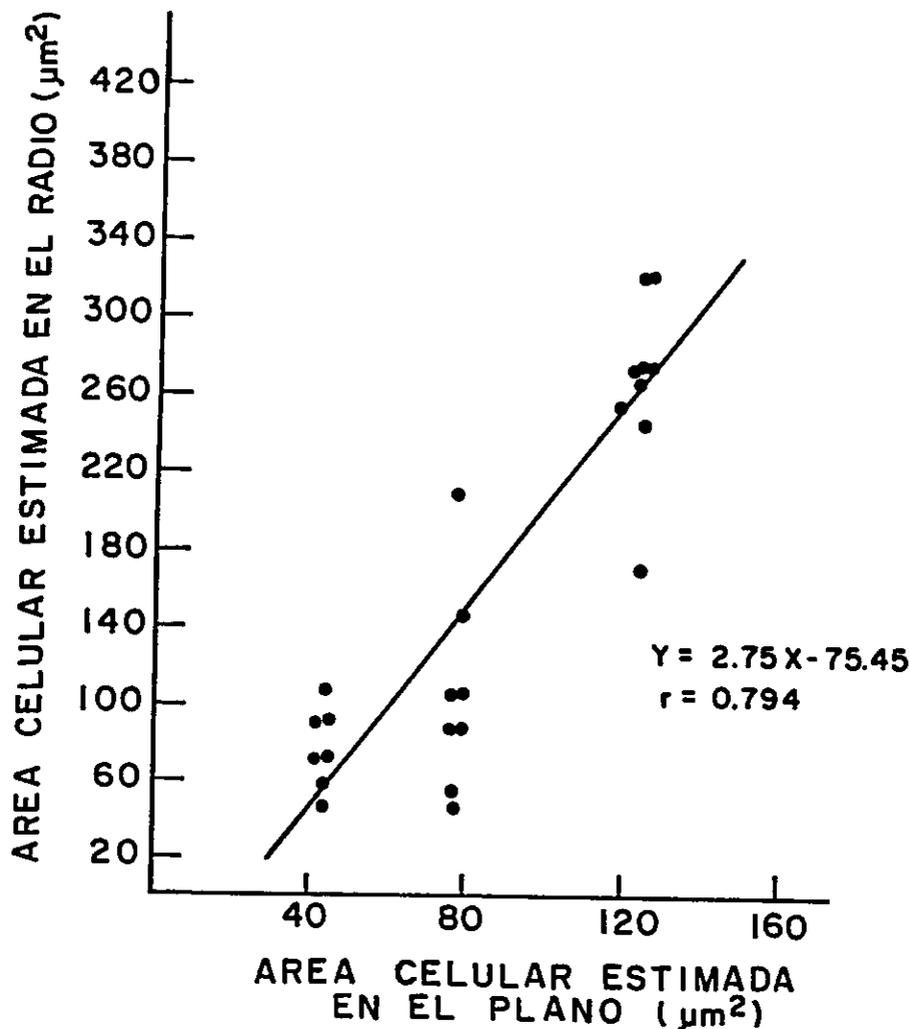


Figura 9: ANALISIS DE CORRELACION DEL AREA CELULAR ESTIMADA A PARTIR DE MEDICIONES INDEPENDIENTES DEL DIAMETRO CELULAR EN EL PLANO HORIZONTAL A LA OBSERVACION Y DEL RADIO CELULAR EN EL PLANO PERPENDICULAR.

Las células de Leydig coincubadas con glóbulos rojos-proteína A de distintas preparaciones, fueron medidas en su diámetro (en el plano horizontal de observación) y en el radio (plano perpendicular a la observación) mediante un ocular graduado, tal como se detalló en métodos. Los resultados se expresaron como áreas celulares estimadas.

es mayor que otra, es una observación relacionada con el volumen total de la célula y no resulta del plano de observación.

Entonces cada vez que se detectaba la secreción, se midió también el diámetro celular de células secretoras y no secretoras, empleando un lente ocular graduado (método 11). Estas observaciones permitieron detectar que las células secretoras de andrógenos tienen en promedio un menor tamaño que las células no secretoras (Figura 10), diferencia que es más evidente en incubaciones en presencia de hCG, condición en la que la diferencia del tamaño de ambos grupos tiene una significancia de $P < 0.01$.

2. Análisis de la frecuencia de células secretoras y no secretoras de testosterona, en la población de células de Leydig purificadas por la gradiente discontinua de percoll 40-90%.

Los valores promedio de tamaños celulares, dentro de una población heterogénea, no permite apreciar la distribución individual de los distintos tipos existentes, de modo que se analizó la distribución por tamaño en las

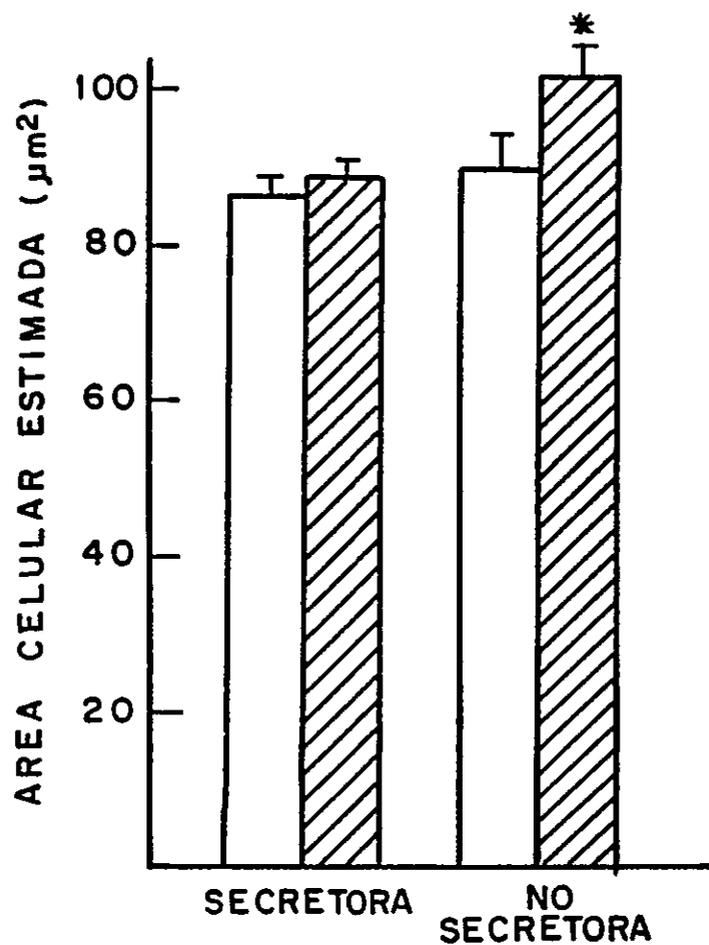


Figura 10: AREA CELULAR ESTIMADA PARA LOS SUBTIPOS DE CELULAS DE LEYDIG SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE TESTOSTERONA.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34° C por 90 min en presencia del anticuerpo antitestosterona y en presencia ▨ o ausencia de □ hCG. Se midió el diámetro celular y se expresó el área celular estimada en el plano de observación. Los resultados son el promedio ± DS de 5 experimentos (*P<0,01 cuando se comparó respecto a secretoras).

subpoblaciones de células secretoras y no secretoras, purificadas por la gradiente discontinua de percoll. Para este análisis se consideró la totalidad de las células observadas en las incubaciones de 90 min en presencia y ausencia de la hCG. El análisis de distribución de frecuencia de las áreas celulares, demostró que la mayor proporción de células secretoras de testosterona tiene área de 78 - 122 μm^2 , tanto en presencia de la hCG (Figura 11A) como en ausencia de la gonadotrofina (Figura 11B). El análisis de frecuencia, extiende los resultados de la Figura 10, puesto que la mayor parte de las células secretoras son de menor tamaño, comparando con el grupo de células no secretoras de testosterona, donde la mayor parte son de áreas entre 78 - 167 μm^2 .

3. Análisis funcional de células secretoras y no secretoras purificadas por gradiente continua de percoll 10-80%.

Puesto que el RHPA permitió la observación de que la actividad secretora de testosterona tiene relación con el tamaño de la célula de Leydig, y dado que la gradiente discontinua de percoll no permite separar las células de

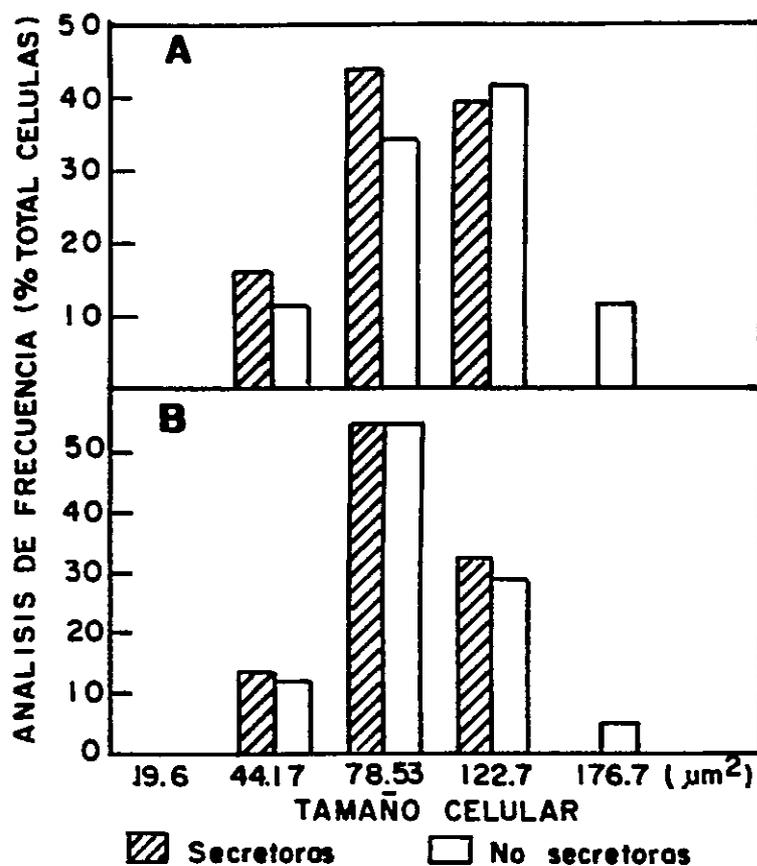


Figura 11: ANALISIS DE FRECUENCIA DE LAS AREAS CELULARES ESTIMADAS PARA CELULAS SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE TESTOSTERONA.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34° C por 90 min en presencia de anticuerpo antitestosterona y 25 UI/ml de hCG (A) o ausencia de la gonadotrofina (B). El análisis corresponde a los resultados de la figura 10 ,con un total de 815 células (A) y 440 células (B).

Leydig en fracciones discretas, se investigó si la gradiente continua de percoll 10-80%, permitiría separar células de Leydig en fracciones definidas, tanto con respecto al tamaño como por su actividad secretora. Luego de separar las células como se señaló en la Figura 3 (método 7b), se colectaron 5 fracciones de 3 ml cada una. Se analizó cada fracción en forma separada mediante el RHPA. La Tabla 1 muestra las características de la purificación realizada y la proporción de células esteroideogénicas colectadas en cada fracción. La fracción F1 resultó ser la más abundante en células intersticiales, sin embargo, la proporción de células esteroideogénicas es menor en esta fracción, con respecto a los valores promedio de tinción para la actividad enzimática 3β -HSD en las otras fracciones. Así mismo, aunque la cantidad de células disminuye progresivamente en las fracciones 2, 3 y 4, la proporción de células de Leydig se incrementa, de modo que la fracciones 3 y 4 tienen incluso un mayor contenido de células esteroideogénicas que la fracción obtenida en la gradiente discontinua de percoll. La F5 resultó con la mayor proporción de células de Leydig. En todas las fracciones obtenidas, la viabilidad de las células

	Nº células separadas en cada fracción (x 10⁶)	Células 3β-HSD (+) esteroidogénicas (%)	Viabilidad celular (%)
F1	3,77 \pm 0,46	47,1 \pm 23,3	88,8 \pm 3
F2	1,58 \pm 0,35	63,2 \pm 15,8	92 \pm 2,5
F3	1,49 \pm 0,45	78,5 \pm 11,7	92,8 \pm 3
F4	0,65 \pm 0,15	85,5 \pm 8,1	91 \pm 3,2
F5	1,04 \pm 0,7	89,1 \pm 4,1	89,1 \pm 4

TABLA 1: CARACTERISTICAS DEL SUBFRACCIONAMIENTO DE LA GRADIENTE CONTINUA 10-80% DE PERCOLL.

Las células de Leydig fueron colectadas en subfracciones de densidad como se indicó en métodos. Antes de ser incubadas separadamente con glóbulos rojos-proteína A, se midió en cada fracción la proporción de células esteroidogénicas obtenidas mediante la detección de la actividad 3 β -HSD y la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul tripano. Los resultados se expresan como promedios \pm DS y corresponden a 5 experimentos distintos.

separadas fue equivalente, y comparable a la obtenida en todos los experimentos anteriores.

Por otra parte, al analizar individualmente la actividad secretora de las células colectadas en cada fracción, mediante el RHPA (Tabla 2), es posible obtener un enriquecimiento de las células de Leydig secretoras reguladas por hCG en las fracciones F4 y F5. Por otra parte, en las fracciones F1 y F2, las células secretoras no reguladas por hCG (basales), fueron más numerosas. No obstante, es claro que en ninguna de las fracciones colectadas, se observó un porcentaje de células secretoras superior al 52 % como el obtenido en los ensayos anteriores. Por lo tanto, este fraccionamiento no permite separar en grupos discretos a las células secretoras de las no secretoras, aunque la fracción 5 permite la obtención de una población enriquecida de células que responden a hCG.

4. Tamaño de las células de Leydig purificadas por la gradiente continua de percoll.

Cuando se analizó la distribución del área celular estimada en las distintas fracciones, se observó que en

	Nº células 3β-HSD (+) observadas en el RHPA	Porcentaje células 3β-HSD secretoras de testosterona (forman placa)	
		sin hCG	con hCG
F1	1878	26,3 \pm 12,9	24,4 \pm 6,7
F2	1149	23,4 \pm 5,0	25,7 \pm 5,4
F3	799	18,5 \pm 5,3	38,4 \pm 10,7
F4	1016	16,7 \pm 2,7	44,7 \pm 5,6
F5	575	13,9 \pm 5,0	52,3 \pm 10

TABLA 2: ESTUDIO DE LA FUNCION SECRETORA DE TESTOSTERONA DE CELULAS DE LEYDIG PURIFICADAS MEDIANTE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL.

Las células purificadas en la gradiente descrita en la Tabla 1, se incubaron en monocapas con glóbulos rojos-proteína A durante 90 min. a 34^o C en presencia del anticuerpo antitestosterona y hCG, o ausencia de la gonadotrofina. Luego se agregó complemento por 45 min adicionales. Terminada la fijación como se describió en métodos, se tiñeron las células para observar en las cámaras a las células de Leydig secretoras y no secretoras (total en columna 1). Los resultados se expresan como promedio \pm DS de 5 experimentos distintos (columnas 2 y 3).

cada fracción de la gradiente, el promedio del área celular estimada fue semejante en todas ellas (Figura 12). Pero si este análisis se efectúa separadamente para células secretoras y no secretoras, se encontró nuevamente que el tamaño de las células secretoras es menor que el tamaño de células no secretoras en cada fracción, ya sea en presencia o ausencia de la gonadotrofina (Figura 13A y B). Al igual que para el caso de la gradiente discontinua, en todas las fracciones se observa un menor tamaño de las células secretoras, sin embargo entre las fracciones no existen diferencias significativas, como tampoco si existe o no hCG en la incubación.

5. Distribución de frecuencia de áreas de células de Leydig purificadas en la gradiente continua de percoll.

Finalmente, el análisis que puede dar cuenta de una separación efectiva mediante la gradiente, entre células secretoras y no secretoras, en relación al tamaño, es la frecuencia de las áreas celulares estimadas. La Figura 14 ilustra que la gradiente, no permite una selección destacada por el tamaño celular. En todas las fracciones se ubican células de los distintos tamaños discriminados.

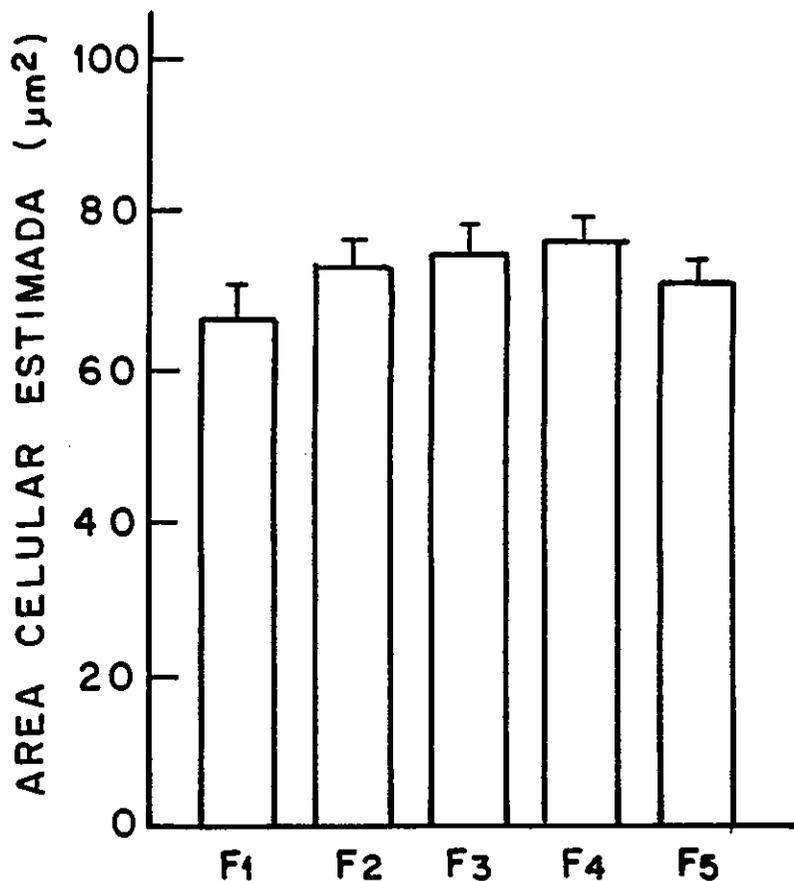


Figura 12: ESTUDIO DEL AREA CELULAR ESTIMADA DE CELULAS DE LEYDIG OBTENIDAS POR LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL.

Monocapas de células de cada fracción y glóbulos rojos-proteína A se incubaron tal como se indicó en la Tabla 1. Para las células secretoras y no secretoras se midió el diámetro celular que se expresa como área celular estimada. Los valores corresponden al promedio \pm DS de células secretoras y no secretoras de testosterona presentes en cada fracción en las condiciones de incubación de estimulación o no estimulación por hCG.

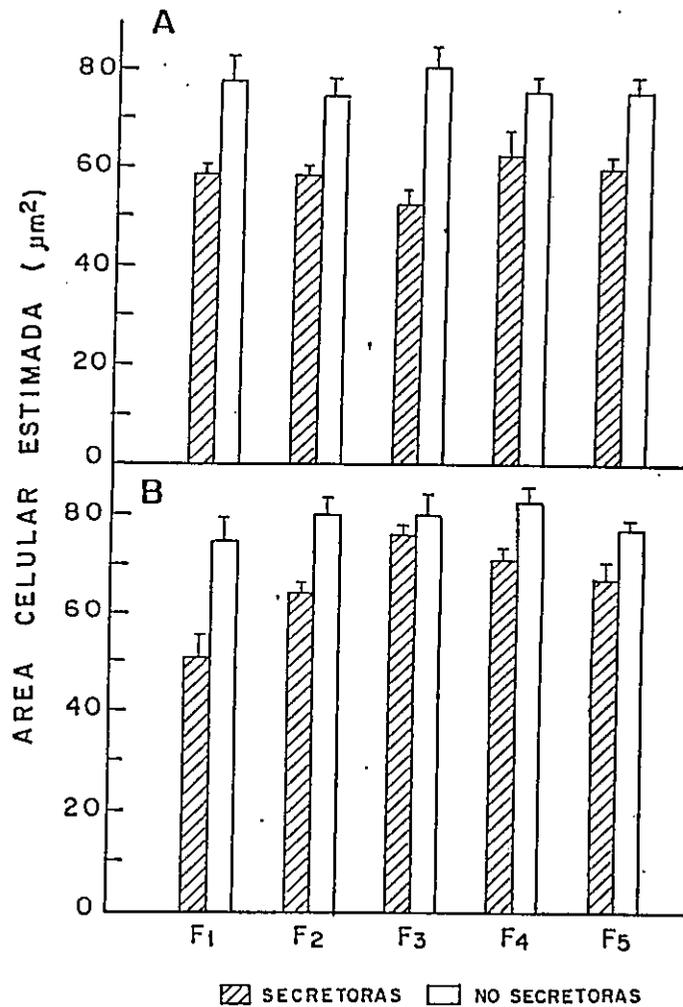


Figura 13: COMPARACION DEL AREA CELULAR ESTIMADA PARA LAS CELULAS SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE TESTOSTERONA, PRESENTES EN CADA FRACCION DE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL.

Los datos corresponden a las mediciones hechas en las incubaciones señaladas en la Tabla 2, pero seleccionadas según la presencia o no de placa hemolítica. (A) incubaciones realizadas en presencia de 25 UI/ml de hCG. (B) incubaciones en ausencia de la gonadotropina.

En las fracciones 4 y 5 hay una mayor proporción de células con áreas entre $44 - 122 \mu\text{m}^2$, con respecto a la distribución observada en las primeras fracciones. Por otra parte, si el análisis de frecuencia se hace considerando la propiedad de secreción, se demuestra que solo en las fracciones 1, 2 y 3 se puede observar una distribución con mayor diferencia de tamaño relacionada con la función secretora; no obstante, la separación no es suficiente para discriminar ambos subtipos (Figura 15).

Una clara conclusión de estos resultados es que la propiedad de secreción de testosterona, que se observa relacionada con un tamaño celular menor que el de las células no secretoras, no puede separarse mediante el empleo de gradientes de percoll. Las células de Leydig tienen una densidad que es independiente del tamaño celular. En este sentido es claro por ejemplo, que la fracción 5 de mayor densidad tiene una distribución de células con menor tamaño que la fracción 1, la más liviana. Dado que la obtención de la gradiente discontinua de percoll 40-90%, es más sencilla experimentalmente, se utilizó en la purificación de células para todos los experimentos siguientes.

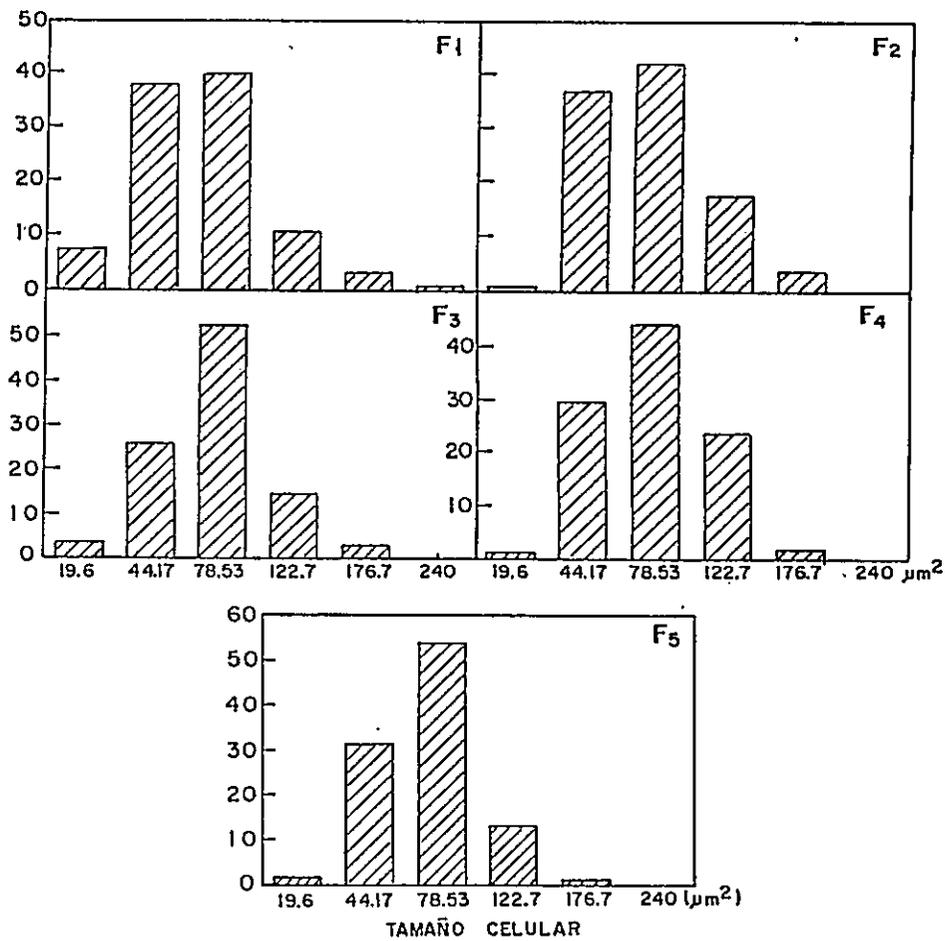


Figura 14: ANALISIS DE FRECUENCIA DE DISTRIBUCION DE LAS AREAS CELULARES TOTALES EN LAS 5 FRACCIONES OBTENIDAS DE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL.

El análisis de frecuencia corresponde a los valores indicados en la Tabla 2, para el total de células esteroideogénicas.

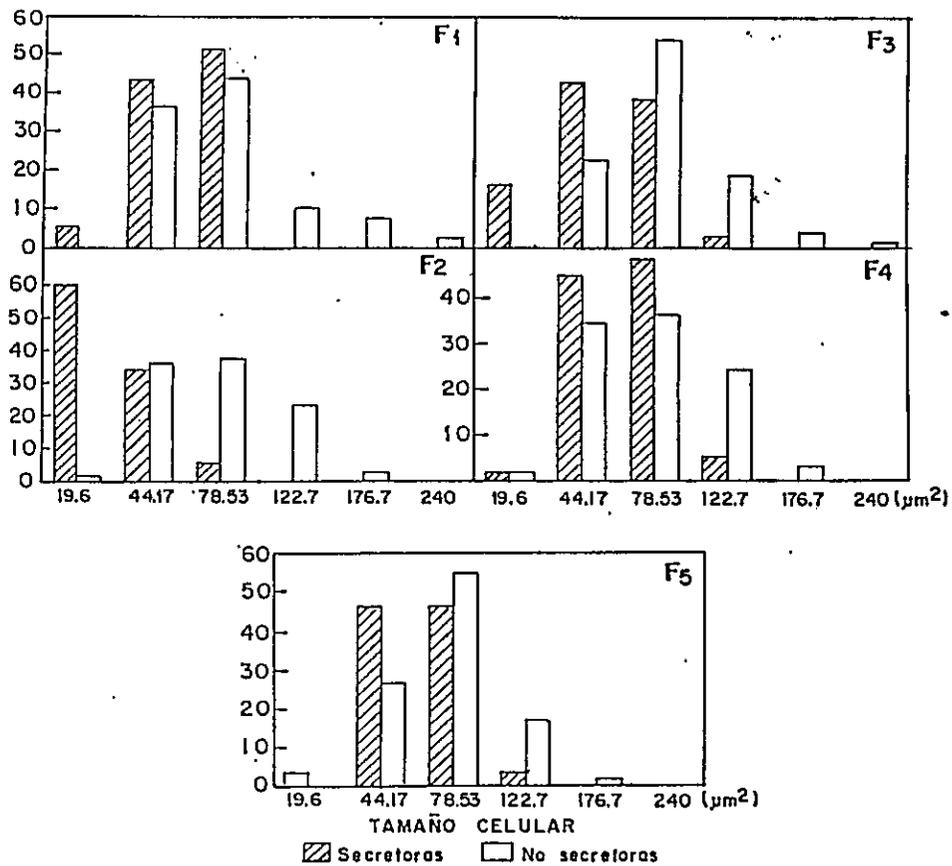


Figura 15: ANALISIS DE FRECUENCIA DE DISTRIBUCION DE AREAS DE LAS CELULAS SECRETORAS O NO SECRETORAS DE TESTOSTERONA PRESENTES EN LAS 5 FRACCIONES OBTENIDAS DE LA GRADIENTE CONTINUA DE PERCOLL.

El análisis de frecuencia corresponde a los valores indicados en la Tabla 1 y Figura 12, seleccionadas de acuerdo a la presencia o no de halo.

IV. Estudio de la secreción de progesterona desde células de Leydig purificadas.

No cabe duda que de todos los esteroides que se encuentran en el macho, la testosterona es el producto de la vía de mayor importancia cuantitativa. Sin embargo, es conocido que tanto a nivel sistémico como intratesticular, también se encuentran otros productos esteroidales tales como progesterona y estradiol. Bajo estos antecedentes, fue propuesto como objetivo de la investigación detectar por el RHPA, además de testosterona, la secreción de otro esteroide como por ejemplo la progesterona. Esta proposición formulada en el proyecto de tesis, se vio como una necesidad, al observar a través de todos los experimentos descritos, que sólo un 52% de las células de Leydig purificadas secreta testosterona, bajo condiciones de estimulación de hCG.

1. Estudio en función del tiempo de incubación de la secreción de progesterona desde células de Leydig individuales.

El objetivo de este estudio fue primero detectar la secreción de progesterona desde células de Leydig individuales y, en segundo lugar, comparar las características de esta secreción con respecto a la testosterona, en similares condiciones de incubación. Para ello se empleó la misma dosis de hCG que en los experimentos anteriores, sin embargo, como se sabe que la secreción de este esteroide difiere de la de testosterona, fue necesario conocer en este sistema de ensayo, el patrón de secreción de progesterona con respecto al tiempo de incubación. La Figura 16 demuestra que la secreción de progesterona medida por el RHPA difiere cualitativamente con respecto a la secreción de testosterona por las mismas células. En primer término, la proporción de células que secreta progesterona en condiciones de ausencia de hCG, es decir, basales, es muy baja al inicio de la incubación, y al cabo del tiempo analizado se logró obtener un $26,8 \% \pm 7,8$ de células de Leydig en la subpoblación de células secretoras de progesterona.

Es notable, por otra parte, que transcurridos sólo 15-30 min de incubación en presencia de la gonadotrofina, ya se expresa casi la totalidad de las células con

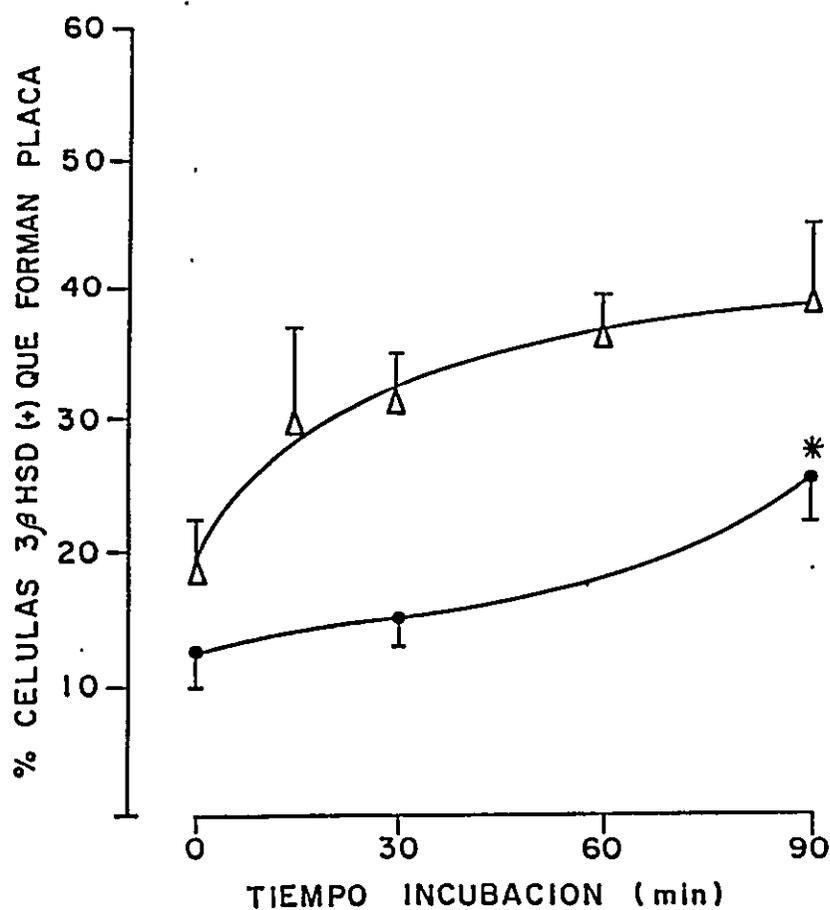


Figura 16: EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS 3 β -HSD CON ACTIVIDAD SECRETORA DE PROGESTERONA (que forman placas).

Las monocapas de células de Leydig purificadas por la gradiente discontinua de percoll y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34^o C en los tiempos indicados en la figura en presencia del anticuerpo antiprogesterona y hCG (Δ) o ausencia de la gonadotrofina (\bullet). Luego del tiempo de incubación, se agregó complemento por 45 min. Los resultados son el promedio \pm DS de 12 experimentos en duplicados (* P= 0,05 cuando se comparó con estimuladas con hCG 25 UI/ml).

actividad secretora, de modo que con respecto al patrón de secreción de testosterona, las células secretoras de progesterona parecieran estar reclutadas en un tiempo menor; mientras que el máximo de incorporación de células a la fracción secretora fue de $37,8 \% \pm 5,7$, al cabo de 90 min de incubación.

Fue evidente por estos resultados, que para la detección de la secreción de progesterona es también adecuada una incubación de 90 min; la prolongación de la incubación hasta los 180 min no sirvió para observar una mayor proporción de células en actividad secretora.

2. Estudio de las condiciones de ensayo sobre la secreción de progesterona.

Como ya se señaló para el estudio de la secreción de testosterona, se evaluó en este caso el efecto de los factores que inciden en el ensayo. La Figura 17 resume este estudio y se muestra que igual como se observó para la secreción de testosterona, la reacción ocurre sólo si en la incubación hay anticuerpo, y si el complemento se agrega

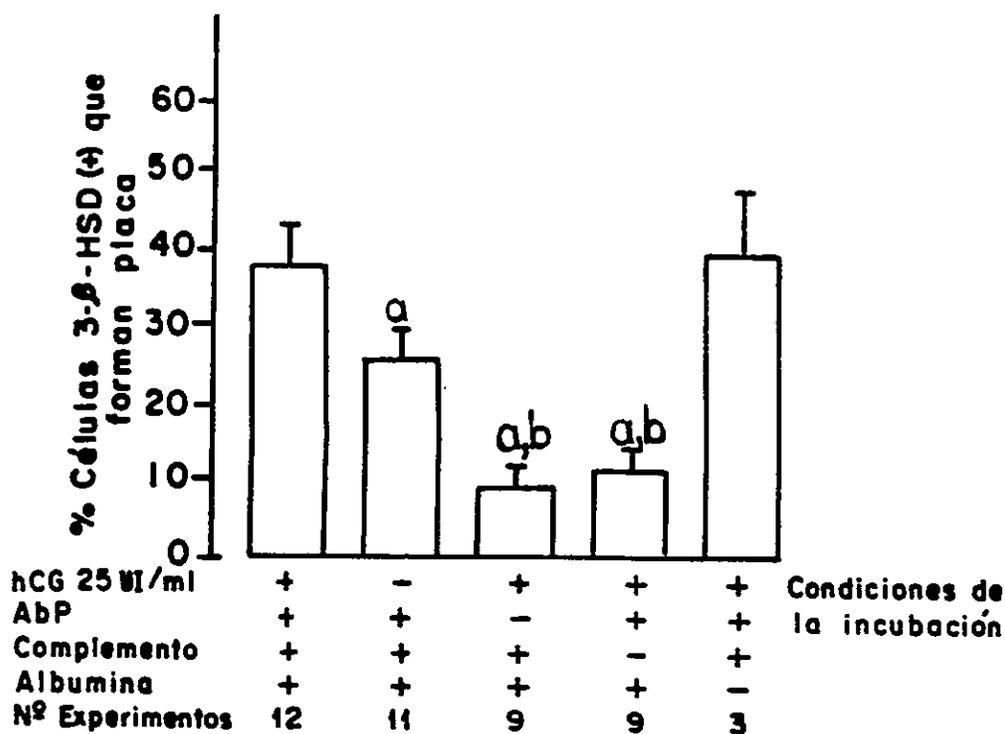


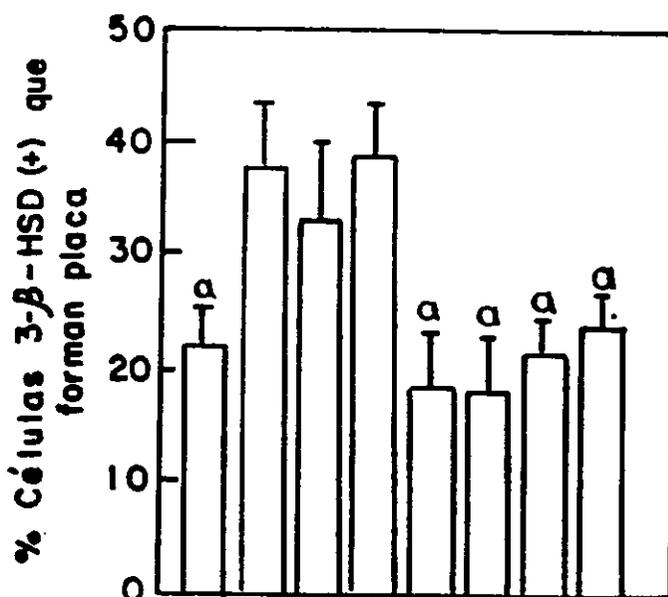
Figura 17: EFECTO DE LAS MODIFICACIONES DEL MEDIO DE INCUBACION NORMAL SOBRE EL PORCENTAJE DE CELULAS SECRETORAS DE PROGESTERONA.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34° C por 90 min en las condiciones indicadas. El complemento se agregó después del tiempo de incubación por 45 min. Los resultados son el promedio \pm DS de los experimentos indicados en la figura. (a $P= 0,05$ cuando se comparó con estimuladas con hCG 25 UI/ml; a,b $P<0,001$ cuando se comparó con basal).

durante el tiempo adicional de incubación. De igual forma, la presencia de albúmina no disminuye la sensibilidad del RHPA para la detección de progesterona. Tampoco la presencia del doble de concentración del anticuerpo modifica el número de células secretoras.

3. Factores que modifican la proporción de células de Leydig secretoras de progesterona, según el RHPA.

Dado que sólo un 37% de las células de Leydig secretan progesterona en las condiciones de incubación óptimas, se analizó qué otros factores, además de hCG, pueden modificar la secreción de este esteroide. Para esto las incubaciones se hicieron con un medio de incubación que contenía los agentes o factores que se indican en la Figura 18. Esta serie experimental, demuestra nuevamente que la proporción de células no secretoras no resulta como producto de una disfunción en el receptor de la gonadotropina o en el sistema efector, dado que el efecto de hCG se logra cuantitativamente con la presencia de 8(Br)-cAMPc en el medio. Por otra parte, el análisis del efecto de los precursores esteroideogénicos, demuestra que



hCG 25 UI/ml	-	+	-	-	+	+	+	+
8 (Br)-AMPc+ MIX 1 mM	-	-	+	-	-	-	-	-
22-R-Hidroxicolesterol 10 ⁻⁶ M	-	-	-	+	-	-	-	-
Aminoglutatimida 0.5mM	-	-	-	-	+	-	-	-
Testosterona 10 ⁻⁶ M	-	-	-	-	-	+	-	-
Estradiol 10 ⁻⁶ M	-	-	-	-	-	-	+	-
Dietilestilbestrol 10 ⁻⁶ M	-	-	-	-	-	-	-	+
Nº Experimentos	12	12	3	5	3	2	6	4

Figura 18: ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE MODIFICAN LA ESTEROIDOGENESIS, SOBRE LA PROPORCION DE CELULAS SECRETORAS DE PROGESTERONA.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34^o C por 90 min. Las incubaciones se hicieron en presencia de los factores señalados sin la gonadotrofina, para el caso de 8(Br)-cAMP o 22-R-hidroxicolesterol; y en presencia de hCG 25 UI/ml para los ensayos en presencia de estradiol, dietilestilbestrol, testosterona y aminoglutatimida. Luego del tiempo de incubación se agregó complemento por 45 min. Los resultados son el promedio \pm DS de los experimentos indicados en la figura (a P<0,001 cuando se comparó con respecto a estimuladas con hCG 25 UI/ml).

las células de Leydig están dotadas con una suficiente cantidad de sustratos esteroideogénicos endógenos, y que una limitación en el sustrato disponible no da cuenta tampoco del número de células secretoras, ya que la presencia de sustrato adicional en el medio no contribuye a obtener una mayor proporción de células secretoras de progesterona.

Por otra parte, resulta interesante el análisis del efecto de otros esteroides en el medio de incubación. Testosterona y estradiol, dos productos esteroideales posteriores a la producción de progesterona, disminuyen el número de células que secretan este último esteroide, a una proporción equivalente a las incubaciones en ausencia de la gonadotropina. Con respecto a la acción de estradiol, los resultados muestran que el efecto es comparable al obtenido en incubaciones en presencia del estrógeno sintético dietilestilbestrol.

Finalmente, así como fue hecho para el estudio de la secreción de testosterona, se hicieron incubaciones en presencia de aminoglutatimida 0,5 mM, inhibidor de la síntesis de esteroides; este agente también reduce la proporción de células secretoras de progesterona, al igual que para el caso de células que secretan testosterona; sin

embargo, la reducción en el número de células secretoras de progesterona es mayor que la observada para la secreción de testosterona, puesto que se compara cuantitativamente a la proporción de células basales o en ausencia de hCG.

4. Análisis morfométrico de células de Leydig secretoras y no secretoras de progesterona.

El RHPA permitió también, para el caso de células secretoras de progesterona, distinguir claramente dos subtipos de células de Leydig: secretoras y no secretoras de progesterona. Tal como resultó para el caso de las células que secretan testosterona, se observó el área celular estimada a partir de la medición del diámetro celular. Los resultados de estas observaciones se muestran en la Figura 19, en donde se manifiesta que las células de Leydig secretoras y no secretoras de progesterona se distinguen en cuanto al tamaño. En este caso, el análisis de los grupos celulares se hizo sólo en condiciones de estímulo por hCG, dado que como se observó en los resultados anteriores, las condiciones de la incubación no

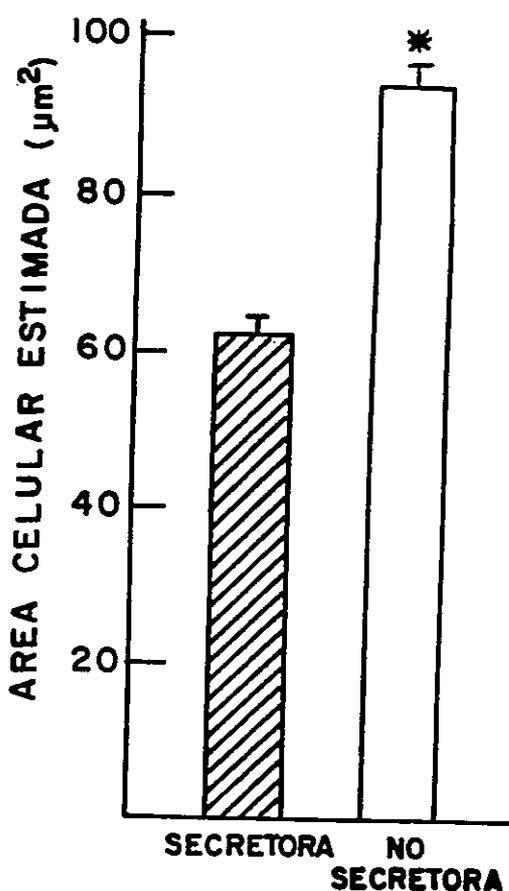


Figura 19: AREA CELULAR ESTIMADA PARA LOS SUBTIPOS DE CELULAS SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE PROGESTERONA.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34° C por 90 min en presencia del anticuerpo antiprogesterona y 25 UI/ml de hCG. El complemento se agregó por 45 min después del tiempo de incubación. Se midió el diámetro celular y los resultados expresan el promedio \pm DS del área celular estimada en 5 experimentos (* P<0,001 cuando se comparó respecto a células secretoras).

tienen efecto en las características de tamaño celular, hCG sólo maximiza las propiedades de secreción de las células.

Así mismo, se analizó la frecuencia de las áreas en las subpoblaciones de células de Leydig secretoras y no secretoras. La Figura 20 ilustra los resultados de este análisis, se puede apreciar que también la frecuencia de distribución de áreas celulares es claramente distinta y las células secretoras de progesterona son más frecuentemente de tamaño menor que las no secretoras.

V. Detección de la secreción de estradiol desde células de Leydig purificadas mediante el RHPA.

Finalmente, se analizó también la secreción de estradiol usando el RHPA. El objetivo de este estudio se limitó exclusivamente a detectar la secreción de estradiol desde células de Leydig purificadas, con el fin de comparar cuantitativamente la proporción de células secretoras para los tres principales esteroides de la vía: progesterona, testosterona y estradiol. Aun cuando se puede suponer que las condiciones para la secreción máxima de estradiol requiere de un tiempo más prolongado de incubación, este

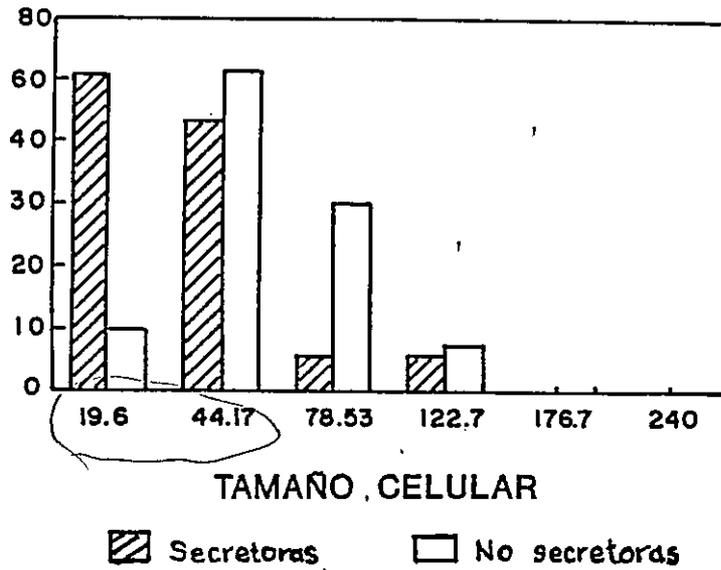


Figura 20: ANALISIS DE FRECUENCIA DE LAS AREAS CELULARES ESTIMADAS DE CELULAS SECRETORAS Y NO SECRETORAS DE PROGESTERONA.

Las monocapas de células de Leydig y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34° C por 90 min en presencia del anticuerpo antiprogesterona y 25 UI/ml de hCG. El análisis corresponde a los resultados de la Figura 19 y un total de 929 células.

estudio se limitó a usar las mismas condiciones definidas para la secreción de testosterona y progesterona. La proporción de células secretoras de estradiol fue $20,1 \% \pm 2,7$ en presencia de la hCG y de $18,9 \% \pm 5,2$, en ausencia de la hormona. No obstante, la prolongación de la incubación hasta los 180 min, del mismo modo como se realizó en los estudios anteriores, no logró aumentar los valores obtenidos, en presencia o ausencia de la gonadotrofina.

VI. Estudio de la secreción de 2 esteroides por el RHPA.

Todo el conjunto de resultados obtenidos en los estudios descritos anteriormente, revelan claramente que aún cuando las células de Leydig tienen el potencial enzimático para sintetizar los distintos productos de la vía esteroidogénica, las células expresan esta potencialidad en forma discreta, diferente cuantitativamente para los 3 posibles productos esteroidogénicos analizados. Los estudios finales de esta investigación estuvieron dirigidos a distinguir si las diferencias observadas en la proporción de células que secretan los distintos productos esteroi-
dales se relaciona con la existencia de subpoblaciones de

células secretoras para cada tipo de esteroide o bien, si en la totalidad de las células existe la potencialidad para producir y secretar varios productos de la vía.

Con este objeto, se analizó la proporción de células que forman placa hemolítica, cuando la incubación se hace en presencia de dos anticuerpos. Los experimentos se hicieron con una mezcla de anticuerpos antitestosterona y antiprogesterona, pero manteniendo la misma dilución final de cada uno de los anticuerpos, equivalente a la utilizada en las incubaciones con cada uno de los anticuerpos. Los resultados observados muestran que las células que secretan testosterona, progesterona o ambos esteroides en condiciones basales, corresponderían a una misma población, como ocurre en las poblaciones basales de los tres tipos de secreciones estudiados ($24,5 \% \pm 8,0$). Sin embargo, en condiciones de estímulo por la gonadotrofina, se pudo apreciar que la proporción de células secretoras se incrementó, de modo que un $64,3 \% \pm 8,3$ de las células esteroideogénicas forman placa hemolítica (Figura 21). Este valor fue significativamente mayor que la proporción de células secretoras sólo de progesterona o testosterona.

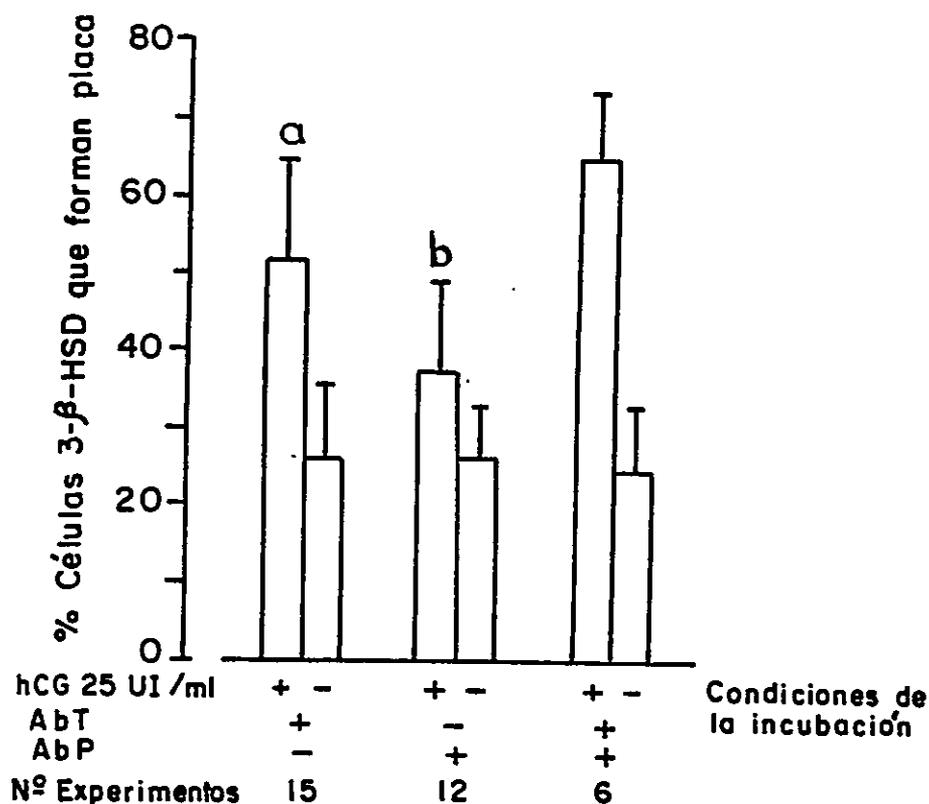


Figura 21: PROPORCION DE CELULAS 3 β -HSD (+) QUE SECRETAN TESTOSTERONA, PROGESTERONA O AMBOS ESTEROIDES EN MONOCAPAS DE CELULAS DE LEYDIG CO-INCUBADAS CON GLOBULOS ROJOS-PROTEINA A.

Monocapas de células de Leydig purificadas por la gradiente discontinua de percoll y glóbulos rojos-proteína A se incubaron a 34° C por 90 min en presencia del anticuerpo específico y en presencia o ausencia de 25 UI/ml de hCG como se detalla en la figura. El complemento se agregó después del tiempo de incubación por 45 min. Los resultados son el promedio \pm DS del número de experimentos indicados en la figura, en duplicados (a P=0,43 cuando se comparó con estimuladas con hCG en presencia de ambos antisueros; b P=0,003 cuando se comparó con estimuladas con hCG en presencia de ambos antisueros).

DISCUSION

La función esteroidogénica de las células de Leydig ha sido estudiada, tanto in vivo como in vitro y se ha analizado la participación y contribución al proceso esteroidogénico de los sustratos, las enzimas así como la acción de distintos reguladores de la vía (11,18-21), la cual produce entre otros esteroides, testosterona, progesterona y estradiol.

Todos los estudios y aproximaciones efectuados hasta ahora, se han hecho sobre la hipótesis de que el fenómeno celular de producción y secreción de los productos esteroidales, se desarrolla en forma homogénea por la totalidad de las células de Leydig. Sin embargo, recientemente se ha reconocido a partir de estudios morfológicos (8-10), inmunológicos, citoquímicos o funcionales (59,70,71), que estas células presentan entre sí propiedades diferentes en su actividad. No obstante estos antecedentes, hasta ahora no se había considerado la posibilidad de que las células de Leydig presentaran en su actividad más característica, es decir, la secreción de esteroides, una respuesta propia para cada célula de la población. Esta posibilidad es la que se ha abordado en el presente estudio.

Esta proposición se sustenta en observaciones morfológicas, como por ejemplo que las células de Leydig presentan distinto tamaño y densidad de organelos intracelulares, propiedades que se han asociado con un potencial esteroideogénico diferente para cada célula (4,9,11). Por otra parte, la diferencia de potencial esteroideogénica para dichas células se ha relacionado con la actividad de los túbulos seminíferos con los que las células de Leydig se encuentran contiguas histológicamente (8-10,75,76). Bergh y col. (76) observaron que las células de Leydig se diferencian dentro del tejido intersticial de acuerdo a los estados específicos del ciclo espermatogénico en el túbulo adyacente a cada célula. Estos autores sostienen por lo tanto que las células del epitelio germinal influyen paracrinamente sobre la esteroideogénesis; esta influencia se acentúa en los estados 7 y 8 del ciclo en el túbulo, en las que la espermatogénesis se hace testosterona dependiente.

Estudios citoquímicos permiten relacionar además las observaciones morfológicas con respecto a la distribución de las enzimas esteroideogénicas, tanto a nivel de células aisladas como en cortes de tejidos (27,29,77).

Así mismo estudios inmunocitoquímicos demuestran que las células de Leydig tendrían diferente cantidad de enzimas esteroideogénicas distribuidas tanto en mitocondrias como en el retículo liso (9,10,25-27).

Para demostrar la relación entre las diferencias morfológicas y de actividad enzimática de las células de Leydig en la capacidad individual de secreción de esteroides, se requiere de una técnica que permita demostrar directamente la función secretora individual de las células de Leydig. Uno de los objetivos propuestos en esta tesis, fue precisamente obtener una técnica que permitiera el análisis individual de la actividad secretora de esteroides.

Dicha técnica debe considerar que los esteroides son de peso molecular bajo, químicamente muy semejantes entre sí, difusibles a través de las membranas biológicas y que se secretan en baja cantidad (11). Teniendo en cuenta las limitaciones especificadas anteriormente, se pensó en la factibilidad de adaptar el RHPA para la detección de esteroides. Esta técnica permitiría no sólo la posibilidad de estudiar la actividad secretora célula a célula, sino también reconocer la contribución de la actividad secretora individual en la población celular.

APLICACION DEL RHPA COMO METODO DE DETECCION DE LA FUNCION
SECRETORA DE ESTEROIDES.

Para la adaptación del RHPA para la detección de esteroides se requirió considerar ciertos aspectos teóricos: la activación de la cascada de reacciones que lleva a la acción enzimática de lisis celular mediada por el complemento, requiere que sobre la superficie de la célula se unan por lo menos dos moléculas de anticuerpo que unen al antígeno. En teoría, la distancia a la cual se acoplan los complejos antígeno-anticuerpo sobre la célula que se lisa (en este caso el glóbulo rojo), puede llegar a restringir la fijación de C1 del complemento a la región Fc de las inmunoglobulinas. Para el caso de este estudio, en que el antígeno es una molécula pequeña, un esteroide, podría significar menor posibilidad para que las inmunoglobulinas estén suficientemente cerca para interactuar con C1. Este factor limitante para la interacción disminuiría si las moléculas de inmunoglobulinas sobre la superficie celular son numerosas. En otros estudios en los que se ha usado el RHPA, esto se ha logrado a través de la unión de proteína A sobre la

superficie de los eritrocitos. La proteína A es un polipéptido aislado de estafilococo aureus que une moléculas de inmunoglobulinas G mediante la región Fc de ellas, sin interactuar con el sitio de unión al antígeno.

Los resultados preliminares obtenidos permitieron indirectamente concluir a partir de la medición de la unión de [³H]-T, que efectivamente hay acoplamiento de proteína A al glóbulo rojo, y que ésta une el anticuerpo utilizado. Los cálculos efectuados, a partir de los estudios de unión, demuestran que un glóbulo rojo acopla por lo menos 64 moléculas de proteína A. Esta estimación cuantitativa permitió asegurar que sobre la superficie del glóbulo rojo hay un número suficiente de anticuerpos para el desarrollo apropiado de la lisis mediada por el complemento.

Como se ha señalado, las células de Leydig secretan un gran variedad de esteroides, todos con propiedades físico-químicas semejantes, aunque de notable diferencia funcional. Fue fundamental entonces demostrar que el anticuerpo utilizado no reconocería otros antígenos que se encontraran en el medio de incubación. Los ensayos preliminares demostraron que hay una alta especificidad en la unión de [³H]-T a los glóbulos rojos-proteína A-anticuerpo:

el desplazamiento de la unión en presencia de un exceso de 500 veces de hormona no radioactiva, usando testosterona, DHT, progesterona o estradiol, sólo testosterona redujo la unión en un 50%, mientras que la misma concentración de DHT, sólo un 12% del total de testosterona unida. Finalmente, en este tipo de ensayos se encontró que un exceso de progesterona o estradiol, no produjo competencia para la unión de la hormona radioactiva. Estos datos permiten afirmar por tanto, que el anticuerpo utilizado está midiendo efectivamente la unión de andrógenos. Más aún se consideró que para el caso de las células de Leydig de rata adulta, testosterona es el tipo de andrógeno de mayor importancia cuantitativa, ya que es conocido que estas células producen en muy bajas concentraciones 5 α -dihidrotestosterona y dehidroepiandrosterona (73,80), que son los esteroides por los que el anticuerpo podría mostrar reactividad cruzada.

Fue también necesario demostrar que la unión del antígeno, sobre la superficie de los glóbulos rojos, depende de la disponibilidad del antisuero. Los resultados obtenidos de los ensayos demostraron que este requisito se cumple para el caso de la unión de testosterona (Figura 1). Para la concentración de glóbulos rojos-proteína A

empleada, se alcanzó una saturación de la unión con una dilución 1:15.000 del antisuero, la cual es semejante a la utilizada para el ensayo corriente de radioinmunoensayo para testosterona (73). Para todos los estudios realizados posteriormente en co-incubación de glóbulos rojos-proteína A y de células de Leydig, se trabajó con una dilución final de 1:10.000 del antisuero. La comprobación de que la elección de esta dilución de anticuerpo no es limitante, se vio posteriormente corroborada cuando se observó que no hubo efecto sobre la proporción de células secretoras al agregar el doble de la concentración del anticuerpo.

Además fue importante controlar que no hay unión significativa de proteína A con otros anticuerpos que se podrían encontrar en el medio de incubación; los que por unión a sus antígenos, interfirieran en la sensibilidad y la especificidad del ensayo. Para esto se determinó que la ausencia del anticuerpo no permitía una reacción de incorporación significativa de marca o de hemólisis. Aunque la presencia de otros anticuerpos en la incubación no se puede descartar, éstos no influyen sobre la actividad de secreción de esteroides, aún en incubaciones en ausencia de la hormona gonadotrofina coriónica hCG.

Aún cuando el método de RIA y el RHPA no son directamente comparables, Neill y Frawley, así como otros grupos que han realizado adaptaciones del RHPA para estudiar distintas secreciones celulares, han estimado que el RHPA posee una sensibilidad semejante o superior a la del radioinmunoensayo (50-64). La experiencia recogida durante esta investigación permite sostener algo semejante para el estudio de la secreción de esteroides. Esta afirmación se sostiene sobre la base de dos argumentos: que el RHPA mide la secreción desde las células de Leydig mediante la hemólisis de eritrocitos, y permite detectar al cabo de sólo 15-20 min de incubación, diferencias apreciables entre células estimuladas con gonadotrofina con respecto a las no estimuladas. Por otra parte, en teoría, el límite de detección para el RIA, requiere de la participación en la función secretora, de por lo menos 60 células de Leydig incubadas por 3 h, mientras que el RHPA permite distinguir una célula secretora en ese mismo tiempo.

Finalmente cabe precisar que el método no da una medida cuantitativa de la secreción. La adaptación realizada en este estudio así como la descrita por otros autores para otro tipo de secreciones, no ha pretendido una

aproximación cuantitativa. Sin embargo, existe una correlación lineal entre el área de hemólisis con respecto al tiempo de incubación, hasta los 60 min. El área de hemólisis representa una estimación de la cantidad de esteroides secretados puesto que se sabe por distintos estudios in vitro, que la secreción aumenta con el tiempo de incubación. En los resultados presentados se puede apreciar que el área de hemólisis de las células en condiciones de incubación normal (25 UI/ml de hCG, anticuerpo antitestosterona, complemento y 90 min de incubación), es en promedio mayor que el área de hemólisis de las células en ausencia de la gonadotrofina, condición en la que la secreción de testosterona es cuantitativamente más baja. El hecho de que con incubaciones mayores de 60 min el aumento del área de hemólisis es menor, no implica que la secreción desde cada célula halla finalizado, sino más bien que el producto secretado se diluye cada vez más por la difusión a medida que se aleja de la célula que secreta.

Los resultados presentados permiten reconocer que el área de hemólisis producida por la secreción de esteroides es menor que la observada para la secreción de diferentes péptidos (50,55-57,62). Para dar cuenta de esta

diferencia hay que considerar fundamentalmente dos factores distintos: que el esteroide debido a su estructura, presenta menos epítomos que un péptido y, por otra parte, que la concentración utilizada del anticuerpo es bastante menor que la utilizada para la detección de péptidos. Estas observaciones permiten suponer que una estandarización cuantitativa parece alejado de las posibilidades reales del método. Probablemente la medición y comparación de las áreas de lisis en distintas condiciones experimentales, constituya la mejor aproximación semicuantitativa. Esta ha sido empleada por los distintos grupos que han recurrido a la técnica del RHPA para estudiar la secreción de productos peptídicos (50-53,57,62).

Finalmente, cabe señalar que la identificación y medición de halos para la obtención de resultados presentados en esta tesis, se hicieron considerando un tamaño mínimo de área de hemólisis de $200 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, cabe hacer notar que la distinción entre área de hemólisis pequeña y espacios vacíos de eritrocitos, suele ser más difícil para el caso de células secretoras pequeñas. Este hecho puede dar cuenta a lo menos, en parte, de los valores de hemólisis obtenidos en condiciones de ausencia de

anticuerpo o complemento.

DEFINICION DE LA HETEROGENEIDAD DE LAS CELULAS DE LEYDIG CON RESPECTO A SU FUNCION SECRETORA DE ESTEROIDES.

Los resultados presentados en esta investigación representan la primera detección directa del producto esteroidal liberado al medio, por células de Leydig individuales. Se demostró que la actividad secretora de varios esteroides es diferente entre células aparentemente similares tanto por los procedimientos de purificación como por la detección en ellas de la enzima 3β -HSD.

El estudio se hizo con una población enriquecida en células de Leydig. El rendimiento y pureza de las células de Leydig obtenidas, fue determinada mediante el reconocimiento de la actividad enzimática 3β -HSD, marcador específico de estas células. La especificidad de la reacción de reconocimiento de esta actividad enzimática es alta (25-31). Aunque existen otras actividades deshidrogenasas que podrían oxidar secundariamente al β -NAD y al NBT utilizando sustratos endógenos, esto se evita realizando la reacción de tinción con tiempos cortos de incubación y

concentraciones altas de sustrato esteroideogénico.

En este trabajo, la purificación de las células mediante la gradiente de percoll discontinua, permitió obtener una población en la que se tiñen específicamente para el reconocimiento de la 3β -HSD, un 75 % de las células, resultado que es comparable a la purificación lograda en el método original (67-71). La proporción de células que tienen la actividad enzimática 3β -HSD fue constante luego de todos los procedimientos del ensayo. Vale decir, la proporción de células que presentan actividad 3β -HSD en las células recién purificadas se mantiene luego de la fijación a la matriz de poli-L-lisina, el periodo de incubación, fijación con glutaraldehído y los lavados posteriores.

La elección del método de fijación de células o tejidos es fundamental para la mantención de la integridad y características funcionales. Para la adaptación del RHPA para la detección de la secreción de esteroides, parecía fundamental mantener la actividad enzimática 3β -HSD de las células. En este sentido un estudio previo que se realizó en células de Leydig y suprarrenales, demostró que el glutaraldehído no afecta la detección de la enzima, aun cuando sí afecta las intensidades de la coloración en las

distintas células (82). Este antecedente permitió encontrar las condiciones de dilución de glutaraldehído que lograran la fijación de las células, manteniendo la actividad enzimática 3β -HSD.

La combinación del RHPA junto con la reacción de tinción citoquímica para la actividad 3β -HSD permitió identificar simultáneamente a las células de Leydig y su actividad secretora de esteroides. Así se encontró que en la población total en presencia de hCG, sólo la mitad de ellas secreta el principal producto androgénico: la testosterona.

Este resultado llamó enormemente la atención, considerando que este esteroide es el principal producto de la vía, desde un punto de vista cuantitativo. Esta observación llevó necesariamente a precisar si la actividad celular era la óptima o si había otra limitación en el sistema como una carencia de sustratos, falla en la acción de la gonadotropina, u otra limitante derivada de la técnica.

En primer lugar todos los controles de la viabilidad celular, demostraron que las células luego de todo el procedimiento experimental, se encuentran intactas,

al menos en su capacidad de excluir el azul tripano. Este resultado era esperable, dado que las células de Leydig purificadas han demostrado una elevada viabilidad luego de incubaciones incluso más prolongadas que las efectuadas en estos ensayos.

Otra característica de estas células que permitió identificar con exactitud la viabilidad celular, es la respuesta esteroidogénica al estímulo de hCG. La observación de la proporción de células secretoras en el RHPA es evidente. Luego del estímulo con la gonadotrofina, se observa una notoria incorporación de un mayor número de células a la fracción de células secretoras. Este aumento es dependiente tanto del tiempo de incubación como de la concentración de la gonadotrofina, observación que refleja claramente la respuesta a la acción hormonal y no como resultado de un artefacto de la técnica.

Por otra parte, las células de Leydig que demostraron ser no secretoras por el RHPA, a pesar de estar en las mismas condiciones de incubación que las secretoras, muestran las características suficientes para ser consideradas células de Leydig: En primer lugar muestran integridad celular puesto que se identificaron sobre la base de la presencia del núcleo en su interior. Además, son células

que presentan la tinción citoquímica para la actividad enzimática 3β -HSD. Estos argumentos llevaron a establecer que estas células son Leydig, pero que no están secretando el esteroide que se analiza.

Por otra parte, se controló el efecto de la presencia en el medio de incubación del antisuero, el complemento, el rojo fenol y la albúmina en el desarrollo de las placas de hemólisis. Tal como se había demostrado por estudios preliminares con células en suspensión, la presencia del antisuero y del complemento son fundamentales (Figuras 7 y 17) para el óptimo desarrollo de las placas de hemólisis. La ausencia de cualquiera de dichos factores determina la observación de un número muy reducido de células esteroideogénicas que forman placas (5-8 %). Este resultado que representa la hemólisis inespecífica, en parte se explica por que la identificación de placas de hemólisis se hace especialmente difícil de diferenciar cuando las células secretoras son pequeñas, y las placas observadas son siempre de áreas muy pequeñas.

También se controló en las incubaciones de células en monocapas el efecto de rojo fenol, que está incluido en el medio de incubación. Se ha descrito que en

algunas células la estructura fenólica de este indicador tiene una acción semejante a la de estrógeno (73,79). Sobre las células de Leydig, se ha descrito que estradiol tiene efecto inhibitorio (45-47,83). En el sistema de incubación aquí descrito, se observó que las incubaciones de células en monocapas en presencia o ausencia del indicador, no manifiestan diferencias, y por lo tanto se comprobó que la inclusión del colorante en este sistema no modifica la proporción de células secretoras de esteroides.

Finalmente, era también importante evaluar el efecto de la albúmina en el medio de incubación. Esta proteína se requiere como protección de las células a lo largo del procedimiento experimental, sin embargo, se sabe que tiene una alta capacidad de unión con esteroides (73,79), y de esta forma podría representar una competencia cuantitativamente importante para la unión específica del anticuerpo al esteroide. A pesar de que se observó una competencia respecto a incubaciones en ausencia de albúmina (menor porcentaje en presencia de la proteína respecto a incubaciones sin albúmina), esta diferencia no fue significativa, por lo tanto todas las incubaciones fueron efectuadas en presencia de la proteína considerando el efecto protector para las células de Leydig.

Todo lo anterior lleva entonces a concluir que los componentes del medio de incubación no determinan ningún tipo de limitación sobre la proporción de células secretoras.

El método entonces, en estas condiciones, registra la capacidad de secreción de cada célula; de modo entonces que en una población de células de Leydig, identificadas por su potencial esteroideogénico, un 52 ± 13 % de ellas secretan testosterona, un 38 ± 8 % secretan progesterona y sólo el 20 ± 3 % secretan estradiol. Aún cuando en principio resultó llamativo que el número de células secretoras para cada esteroide fuese tan limitado, esta observación concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de otras células endocrinas mediante el RHPA, dado que también se aprecia en ellas que sólo una fracción de las células secretan el producto estudiado (50-64).

Una vez aclarados los aspectos del método que podrían haber influido en la obtención de un número limitado de células secretoras, se analizó, por otra parte, la participación de distintos factores cuya acción reguladora sobre la síntesis de esteroides testiculares es conocida; esta vez, analizando su acción sobre la función

secretora de esteroides. De éstos, se estudió la acción de hCG, la disponibilidad de sustratos esteroideogénicos, la acción de los esteroides producidos y de inhibidores sintéticos de la vía (Figuras 4-6,16,18).

El factor que primeramente se estudió fue la participación de la gonadotropina hCG. El efecto de la hormona se pudo apreciar claramente en parámetros característicos de la función celular como: 1- número de células secretoras, 2- respuesta secretora frente a la dosis de la hormona, 3- respuesta secretora a hCG con respecto al tiempo de incubación y, 4- área de lisis celular (Figuras 4-6,8,16). Sin duda todas estas observaciones fueron demostrativas de la validez del ensayo del RHPA, puesto que reflejan la respuesta individual de las células a la conocida acción de esta hormona sobre las células de Leydig.

Claramente el número de células que secretan ya sea testosterona o progesterona en ausencia de la hormona es bajo: $25 \pm 10 \%$, valor que es superior significativamente a los obtenidos en ausencia del anticuerpo o del complemento para incubaciones de 90 min. La presencia de la hormona en el medio de incubación, incrementa de manera dependiente de la dosis, el número de células que se

incorpora a la actividad secretora de esteroides, incorporación que es también dependiente del tiempo de incubación (aunque de distinta forma para ambos tipos de esteroides). Mientras el número máximo de células incorporadas a la actividad secretora de progesterona se observa ya a los 20 min, para la secreción de testosterona; para la secreción de testosterona se puede apreciar sólo recién a los 60 min. En conjunto, todas estas observaciones demuestran que la hormona tiene un claro efecto sobre la secreción de los esteroides analizados por el RHPA.

Como ya se ha comentado, este estudio representa el primer análisis de la respuesta secretora individual de células esteroidogénicas, y por lo tanto no hay otros trabajos con los cuales comparar la respuesta de estas células. Sin embargo, resulta atractivo homologar la observación por el RHPA de la selección de las células secretoras de esteroides en tiempos relativamente muy cortos por acción de la gonadotrofina, , con las observaciones, ya sea in vivo o in vitro del rápido efecto de esta hormona para aumentar la concentración de esteroides (8,9,17,22). Esta comparación se sostiene también sobre la base del efecto observado de la hormona

sobre el área de hemólisis, que como ya se discutió, representa una estimación semicuantitativa de los esteroides secretados desde la célula.

De los resultados anteriores es importante destacar además la distinción de una población de células de Leydig que mostraron actividad secretora de esteroides, en ausencia del estímulo de la hCG. Es decir, células que desarrollaron placa de hemólisis sin estar presente la hormona. Para los tres esteroides estudiados, la proporción de estas células basales dentro de la población fue de un $25 \pm 10 \%$. Nuevamente resulta atractivo homologar esta observación con estudios en los que se aprecia una producción basal de esteroides en condiciones de ausencia de la hCG, en células en suspensión (12,14,17), que resultaría entonces de la producción y liberación de esteroides desde algunas células basales, y no como consecuencia de la liberación de una pequeña cantidad de esteroides desde todas las células. Estos resultados que revela la existencia de células basales o secretoras de esteroides independientes de la hCG, es de una gran importancia. Por primera vez se describe dentro de la población de células de Leydig a un subgrupo de ellas que mantiene una actividad celular controlada independiente de

gonadotrofina. Dado que el control de la actividad esteroideogénica de estas células es por el momento desconocida, desde un punto de vista funcional no se puede descartar que la hormona sí modifique la cantidad de esteroides producidos y secretados.

Constituye también una evidencia más para sostener la proposición de la heterogeneidad en la función secretora de las células de Leydig, puesto que este grupo celular debe estar sometido a un nivel de regulación de la secreción distinto al de hCG. Este hecho ya las hace distintas respecto a las células que sí responden a la hormona hCG. Fisiológicamente estas células son desconocidas

El resultado que para los fines de este estudio constituyó evidencia suficiente para asegurar que la hormona no tiene limitación para establecer la respuesta de las células de Leydig, fue el análisis del efecto de 8(Br)-cAMP, un análogo al sistema efector intracelular de la hormona. En estudios previos en este laboratorio y en otros grupos, se ha logrado establecer las condiciones en que este análogo difunde al interior celular. Se observó que la presencia en el medio de incubación de 8(Br)-cAMP, remeda cuantitativamente el efecto de la gonadotrofina, por

lo tanto, es posible pensar que las células no secretoras, o no tienen receptor para hCG o bien el cAMP que se genera para activar el proceso esteroidogénico lleva a otros productos que no son detectados por el anticuerpo utilizado. El propósito de este experimento fue demostrar, que en condiciones de disponibilidad máxima de un análogo del efector intracelular de la gonadotropina, la respuesta secretora de esteroides se mantenía limitada sólo a algunas células.

La información disponible en la literatura permitiría relacionar la observación de la heterogeneidad en la función secretora encontrada en este estudio, con respecto a las características de maduración funcional de las células de Leydig. Por ejemplo, la capacidad esteroidogénica de estas células no sólo se ha asociado a la disponibilidad de receptores para LH/hCG y la activación de éstos (2,3,16,17); sino que principalmente al mayor desarrollo de estructuras subcelulares con activa participación en el proceso, como son las mitocondrias, retículo liso y microsomas (4,9,11), factor que durante las etapas del desarrollo de la rata varía notablemente (4-6,10,12,27,28).

Por otra parte, los estudios realizados permiten

sostener que la secreción de esteroides no está limitada por el suministro de precursores metabólicos. Las incubaciones con un exceso de sustratos esteroidogénicos, no producen un aumento de la fracción de células secretoras. Los estudios bioquímicos, señalan que las células de Leydig están dotadas de sustratos esteroidales suficientes (11,85,86), de modo que, in vitro, son capaces de mantener una respuesta de producción de esteroides incluso por la acción sostenida del factor gonadotrófico. Más aún, previo al agotamiento de las reservas de precursores esteroidales, se ha observado que las células de Leydig se desensibilizan, es decir, pierden la capacidad de responder a nueva dosis de la hCG por disminución de receptores (17,84). Este proceso se ha relacionado más bien a un rol de regulación de la producción de esteroides a nivel sistémico y no a un mantenimiento de los suministros de colesterol u otros precursores. Por otro lado, las células in vivo, están continuamente siendo suministradas de colesterol en las distintas etapas del desarrollo y de la vida reproductiva del macho (11).

También se estudió por el RHPA, si la síntesis de esteroides en las células secretoras y no secretoras

efectivamente está desarrollándose, puesto que hasta aquí se ha supuesto que la producción de esteroides desde las células ocurre en forma homogénea considerando que estas células muestran la actividad enzimática 3β -HSD, y por otro lado, la literatura ha concluido sin mayores evidencias, que el proceso de secreción en las células esteroidogénicas es un fenómeno que ocurre linealmente con la síntesis (11). Es decir, esta hipótesis no considera la posibilidad de que los metabolitos producidos se almacenen en vesículas de secreción, sino que los esteroides difunden libremente a través de la membrana celular inmediatamente, para cumplir roles hormonales sistémicos.

Para aproximarse a la relación entre la síntesis y la secreción de esteroides, se analizó el efecto de agentes modificadores de la producción de la vía esteroidal. Por ejemplo, estradiol, que siendo uno de los productos de la vía, se ha descrito como un inhibidor de la esteroidogénesis en células de Leydig in vitro e in vivo (45-47). Cuando este esteroide se agregó al medio del RHPA, se encontró que redujo la proporción de células secretoras de testosterona a un $20 \pm 3 \%$ y progesterona a un $22 \pm 4 \%$, efecto que resultaría como consecuencia de una inhibición de la vía en la síntesis de esteroides. Esta conclusión se

vió posteriormente corroborada al analizar la actividad secretora de células de Leydig en incubaciones en presencia de aminoglutatimida. Este inhibidor específico de la vía de síntesis de testosterona (48,49), produjo una notable reducción en la proporción de células secretoras de testosterona y progesterona, a un 37 ± 2 y 18 ± 6 %, respectivamente

Dado que se encontró que la inhibición de ambos agentes difiere cuantitativamente sobre la respuesta secretora es algo diferente, podría pensarse que la causa de esta diferencia se debe a los distintos mecanismos de acción de ambos agentes sobre la vía. Aunque el RHPA no aporta datos específicos que se refieran al mecanismo de inhibición de estradiol, la semejanza cuantitativa en la inhibición producida por este esteroide con respecto los resultados obtenidos en presencia de DES, sugiere que estradiol actúa mediante los receptores intracelulares, proteínas existentes en estas células (46-49) que modificaría la síntesis de las enzimas esteroideogénicas a nivel genómico o bien, para modificar alostéricamente la actividad enzimática. Por otra parte, el mecanismo de acción de aminoglutatimida es menos conocido. La literatura

propone para este agente una acción directa sobre las enzimas que transportan colesterol al interior de la mitocondria para su metabolización (48).

Independientemente del mecanismo, una vez más es difícil establecer una equivalencia cuantitativa entre la reducción parcial sobre la proporción de células secretoras de testosterona o de progesterona observada en estos estudios, con la inhibición sobre la cantidad de estos esteroides causada por estos mismos agentes, en otro tipo de ensayos. No obstante, sí se puede relacionar cualitativamente la respuesta esteroidogénica. Por ejemplo, células de Leydig incubadas in vitro en presencia de aminoglutatimida, producen menos testosterona, sin embargo siempre existe una concentración de este esteroide que se detecta en el medio. Podría postularse que este nivel basal de testosterona se debe a la secreción de células que en el RHPA aun en presencia de este inhibidor, secretan esteroides, es decir, las células cuya regulación es independiente de hCG.

Por otra parte, análisis histológicos tanto del tejido testicular completo (8-10), como de células aisladas (14,27,28,71,77) que demostraban una heterogeneidad morfológica y enzimática, son los antecedentes que sustentaron la observación preliminar de una relación entre la función secretora y el tamaño celular, otro parámetro que nos sirvió para estudiar la heterogeneidad de las células de Leydig.

Claramente se observó en este estudio que se puede distinguir la subpoblación secretora de la no secretora por su menor tamaño. Para ambos tipos de secreción estudiados en esta tesis, se encontró una significativa diferencia entre células secretoras y no secretoras, observación que se puede relacionar con los estudios morfológicos en los que se concluye que el potencial esteroidogénico depende más del desarrollo intracelular mas que del tamaño de la célula. Más aún, se encontró que el tamaño de las células secretoras de testosterona es significativamente de mayor tamaño que las células secretoras de progesterona. Esta última observación podría constituir una fuerte argumentación hacia la existencia de la heterogeneidad de las células de Leydig.

La observación de una asociación entre la función secretora de las células Leydig con el tamaño celular, resultado que concuerda con lo descrito en la literatura en cuanto a la relación entre la capacidad esteroidogénica y la morfología de las células de Leydig, planteó la posibilidad de obtener células secretoras, separadas de las no secretoras mediante un procedimiento de separación diferencial. La gradiente continua de percoll permite obtener células en fracciones determinadas de acuerdo a las características de diferenciación (27,28), también por su tamaño. En este estudio no se produjo una separación efectiva de las células, de acuerdo al tamaño, las distintas fracciones colectadas (Figuras 14 y 15). Sin embargo, las primeras fracciones colectadas de la gradiente, tienen mayor contenido de las células que se han identificado como independientes de la hormona; puesto que incubaciones en presencia de la gonadotrofina, la proporción de células secretoras no aumentó. Si la distribución de las células se analiza de acuerdo al tamaño de la célula, se encuentra que no existe un patrón de distribución del tamaño que permita discriminar una separación entre los tipos celulares. Entonces se puede concluir que la gradiente continua de

percoll separa las células de Leydig de acuerdo a la densidad de las células, más que por su tamaño, que por cierto varía por efecto de la separación desde el tejido en el que se encontraba.

Las células de Leydig con mayor potencial esteroideogénico evidencian también mayor desarrollo del retículo, cantidad de gotas de lípidos almacenadas y de mitocondrias citoplasmáticas (4,9,11). Este hecho implica que estas células son más densas y, que sometidas a una sedimentación en gradiente de densidad, muestran un coeficiente de sedimentación alto. Por lo tanto las células más densas se encuentran en fracciones de densidad mayor a pesar que son más pequeñas en tamaño. Bajo este mismo principio es que no se detecta en las fracciones 1 y 2, una proporción de células secretoras que sea superior a la condición basal.

Es importante además señalar que recientemente una tesis de magister efectuada en nuestro laboratorio demostró por estudios de citofotometría, que la intensidad de tinción de la actividad 3β -HSD, una medida del potencial esteroideogénico de cada célula, pudo relacionarse con el tamaño de las células (77). Contreras encontró que

células calificadas como pequeñas (área celular estimada de $55 \mu\text{m}^2$) mostraron una intensidad de tinción significativamente mayor que la intensidad detectada en células grandes (área celular de $120 \mu\text{m}^2$).

Por lo tanto, todos estos resultados junto a la argumentación dada en la literatura, permiten sostener la hipótesis de la heterogeneidad de función secretora de las células de Leydig, y estas diferencias individuales tienen relación con las características ultraestructurales de cada célula. Aunque la adaptación del RHPA aquí descrita, está limitada para el reconocimiento de las características ultraestructurales de las células de Leydig para distinguir las además de acuerdo al potencial esteroidogénico, sin embargo la relación con el tamaño aquí descrita permite terminantemente definir las subpoblaciones detectadas.

Como ya fue discutido, la función secretora de los esteroides es una propiedad que no todas las células de Leydig manifestaron, seguramente como resultado de una regulación del proceso esteroidogénico que para las

distintas células de la población testicular difiere de acuerdo a la participación de factores histológicos, celulares y moleculares, que debido al origen de éstos, son caracterizados como locales de acción paracrina o autocrina, encontrándose entre ellos por ejemplo, a los mismos esteroides y a péptidos.

La evidencia apunta principalmente a que estos factores modifican la actividad de enzimas claves en el proceso. En este sentido, Lieberman (90) ha propuesto que el proceso esteroidogénico está organizado en las distintas células esteroidogénicas como complejos multienzimáticos que permiten la formación de uno o dos esteroides muy similares de todos los que la vía potencialmente puede producir. De manera entonces que, podría pensarse como explicación alternativa, que cada célula de Leydig está condicionada enzimáticamente para producir sólo uno o unos pocos esteroides y no todos los que la vía produce. Existirían así subpoblaciones secretoras de testosterona, progesterona o estradiol, otros esteroides o la combinación de algunos de ellos. Este hecho podría implicar que cada célula sería regulada de manera distinta para cada tipo de esteroide. El efecto cualitativamente similar de hCG, los

esteroides y de un agente inhibidor de la vía demostrado en este estudio, sobre la secreción de testosterona y progesterona, permitiría suponer que al menos estos factores de regulación afectan en forma semejante a cada tipo de célula secretora y que, por lo tanto, se trataría de células de características funcionales similares. Por otra parte, dado el hecho que el ensayo se hace con células aisladas, cabe la posibilidad de que se pierda un factor de regulación que sea dependiente de los contactos celulares (11,87-89).

Se pensó en la posibilidad de estudiar en una misma célula, la secreción de dos esteroides distintos. Esto podría dilucidar algunas de las proposiciones planteadas. Está descrito para el RHPA, la demostración de la secreción de varios productos en forma secuencial para la misma célula. Para esto se estudia la secreción de un antígeno mediante el respectivo anticuerpo, y luego se agrega a las cámaras de ensayo una nueva cantidad de glóbulos rojos proteína A con el anticuerpo para un segundo antígeno, prolongando la incubación (62). Aunque teóricamente este tipo de aproximación ofrece una novedosa perspectiva para analizar la esteroidogénesis en el tejido

testicular, requiere de la prolongación del tiempo de incubación, que en nuestras condiciones serian dañinas para la viabilidad celular.

De esta forma, se adaptó la incubación de células de Leydig en presencia conjunta de los anticuerpos antitestosterona y antiprogesterona, comparado a la vez en incubaciones con cada tipo de anticuerpo empleados en forma separada. Si las células secretoras para cada esteroide fuesen subpoblaciones distintas se habría esperado que la proporción de células secretoras en presencia de ambos anticuerpos, fuera equivalente a la suma de ambos anticuerpos o al menos significativamente superior a la proporción de células secretoras sólo de testosterona o progesterona. Los resultados obtenidos, llevan a pensar que al menos un tipo celular tiene la capacidad de sintetizar y secretar los esteroides estudiados.

A la luz de los resultados obtenidos, se puede sostener que efectivamente las células de Leydig se encuentran sometidas a microambientes regulatorios particulares a cada célula. De esta forma, cada célula responde secretoramente en forma heterogénea dado que la vía se modifica por la participación de varios factores. Probablemente la

hormona hipofisiaria es el factor regulatorio más importante, para condicionar a un número mayor de células a la actividad secretora, como en este estudio se pudo determinar. Estudios conjuntos con RHPA y técnicas inmunocitoquímicas que se puedan adaptar, podrían ser de gran utilidad para precisar la acción reguladora de los otros factores finos de regulación del proceso esteroidogénico.

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que:

1. El ensayo de placa hemolítica reversa es un método que detecta la secreción de esteroides en forma específica desde células de Leydig individuales y caracteriza subpoblaciones de células de acuerdo a la actividad secretora y al tamaño de cada célula.
2. Existen subpoblaciones de células de Leydig secretoras y no secretoras de testosterona y progesterona. Una proporción de las células secretoras, pareciera liberar ambos esteroides.
3. Las células secretoras de ambos esteroides son de menor tamaño que las células no secretoras.
4. La influencia luteotrófica es el factor principal sobre la síntesis y secreción de esteroides; otros factores estudiados actúan de manera inhibitoria sobre la proporción de células secretoras.
5. La heterogeneidad en la función secretora descrita en este estudio se puede relacionar a la condición in vivo de acuerdo a los estados del ciclo espermatogénico en el túbulo y la dependencia de testosterona que esta actividad tiene.

REFERENCIAS.

1. De Kretser, D.M., Kerr, J.B., Rich, K.A., Risbridger, G. and Dobos, M.: Hormonal factors involved in normal spermatogenesis and following the disruption of spermatogenesis. In *Testicular Development, Structure, and Function* (Edited by A. Steinberger and E. Steinberger). Raven Press, New York (1979) pp.107-115.
2. Orth, J. and Christensen, A.K.: Localization of ^{125}I -labeled FSH in the testis of hypophysectomized rats by autoradiography at the light and electron microscope levels. *Endocrinology* (1977) 101:262-278.
3. De Kretser, D.M., Catt, K.J. and Paulsen, C.A.: Studies on the in vitro binding of iodinated luteinizing hormone in the rats. *Endocrinology* (1971) 88:332-337.
4. De Kretser, D.M. and Kerr, J.B.: The cytology of the testis. In *The Physiology of Reproduction* (Edited by E. Knobil and J. Neill et al). Raven Press, New York (1988) pp.908-912.
5. Hardy, M.P., Kelce, W.R., Klinefelter, G.R. and Ewing, L.L.: Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* (1990) 127:488-490.
6. Hardy, M.P., Zirkin, B.R. and Ewing, L.L.: Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in the testes of the pubertal rat. *Endocrinology* (1989) 124:762-770.
7. Ewing, L.L. and Zirkin, B.R.: Leydig cell and steroidogenic function. *Recent Progress in Hormone Research* (1983) 599-635.
8. Ewing, L.L., Zirkin, B.R., Cochran, R.C. Kromann, N., Peters, C. and Ruiz-Bravo, N.: Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology* (1979) 105:1135-1142.

9. Zirkin,B.R., Ewing,L.L., Kromann,N. and Cochran,R.C.: Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* (1980) 107:1867-1874.
10. Keeney,D.S., Mendis-Handagama,S.M.L.C., Zirkin.B.R., and Ewing,L.L.: Effect of long term deprivation of luteinizing hormone on Leydig cell volume, Leydig cell number, and steroidogenic capacity of the rat testis. *Endocrinology* (1988) 123:2906-2915.
11. Hall,P.: Testicular steroid synthesis: Organization and Regulation. In *The Physiology of Reproduction* (Edited by E.Knobil and J.Neill et. al) Raven Press, Ltd., New York (1988) pp.990-993.
12. Ewing,L.L., Wing,T.-Y., Cochran,R.C., Kromann, N., and Zirkin,B.R.: Effect of luteinizing hormone on Leydig cell structure and testosterone secretion. *Endocrinology* (1983) 112:1763-1769.
13. Mori,H., and Christensen,A.K.: Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *Journal cell Biology* (1980) 84:340-354.
14. Purvis,K., Clausen,O.P.F., Ulvik,N.M., and Hansson,V.: Functional and morphological characteristics of rat Leydig cells: effect of prepuberal and postpuberal hypophysectomy. In *Testicular Development, Structure, and Function* (Edited by A. Steinberger and E. Steinberger) Raven Press, New York (1980) pp.211-224.
15. Minegishi,T., Kusuda,S., and Dufau,M.L.: Purification and characterization of Leydig cell Luteinizing hormone receptor. *The Journal of Biological Chemistry* (1987) 17138-17143.
16. Crine,P., Aubry,M., and Potier,M.: Incorporation of radiolabeled aminoacids into protein subunits of the rat Leydig cell gonadotropin receptor: application to the study of receptor structure and turnover. In *Hormone action and testicular function* (Edited by K.J.Catt and M.L. Dufau). *Annals of the New York Academy of Sciences* (1984) 438:224-236.

17. Dufau, M.L. and Catt, K.J.: Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitamins and Hormones* (1978) 36:461-597.
18. Payne, A.H.: Hormonal regulation of cytochrome P-450 enzymes, cholesterol side-chain and 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase in Leydig cells. *Biology of Reproduction* (1990) 42:399-404.
19. O'shaughnessy, P.J., Wong, K-L, and Payne, A.H.: Differential steroidogenic enzyme activities in different populations of rat Leydig cells. *Endocrinology* (1981) 109:1061-1066.
20. Keeney, D.S., Sprando, R.L., Robaire, B., Zirkin, B.R. and Ewing, L.L.: Reversal of long term LH deprivation on testosterone secretion and Leydig cell volume, number and proliferation in adult rats. *Journal of Endocrinology* (1990) 127:47-58.
21. Payne, A.H., and Sha, L.: Multiple mechanisms for regulation of 3-hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase, 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ Lyase cytochrome P-450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinology* (1991) 129:1429-1435.
22. Cooke, B.A., Lindh, M.L. and Janszen, F.H.A.: Correlation of protein kinase activation and testosterone production after stimulation of Leydig cells with luteinizing hormone. *Biochemical Journal* (1976) 160:439-446.
23. Ewing, L.L.: The trophic effect of luteinizing hormone on the rat Leydig cell. *Journal of the American College of Toxicology* (1989) 8:473-485.
24. Bordy, M.J., Shaper, J.H. and Ewing, L.L.: Trophic influences of luteinizing hormone on steroidogenesis by percoll-separated rat Leydig cells in culture. In *Hormone action and testicular function* (Edited by K.J.Catt and M.L.Dufau). *Annals of the New York Academy of Sciences* (1984) 438:329-345.

25. O'Shaughnessy, P.J., Payne, A.H.: Differential effects of single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzymes in Leydig cell populations. *Journal Biological Chemistry* (1982) 257:11503-11509.
26. Wiebe, J.P.: Steroidogenesis in rat Leydig cells: changes in activity of 5-ene and 5-ene 3β -hydroxysteroid dehydrogenases during sexual maturation. *Endocrinology* (1976) 98:505-513.
27. Morono, E.P., Washburn, A.L.: Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in two distinct density Leydig cells from immature rats. Differences in responsiveness to human chorionic gonadotropin or 8-bromoadenosine 3',5'-monophosphate. *Biochimica et Biophysica Acta* (1991) 1091:55-62.
28. Kerr, J.B., Robertson, D.M., and Kretser, D.M.: Morphological and functional characterization of interstitial cells from mouse testes fractionated on percoll density gradients. *Endocrinology* (1985) 116:1030-1043.
29. Armstrong, D.G.: Subcellular distribution of Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the granulosa cells of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biochemical Journal* (1979) 181:685-689.
30. Porter, T.E., Hargis, B.M., Silsby, J.L. and El Halawani, M.E.: Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* (1989) 125:109-116.
31. Marrone, B.L., and Sebring, R.J.: Quantitative cytochemistry of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in avian granulosa cells during follicular maturation. *Biology of Reproduction* (1989) 40:1007-1011.
32. Skinner, M.K.: Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews* (1991) 12:45-77.

33. Findlay, J.K., and Risbridger, G.P.: Intragonadal control mechanisms. In *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism. International Practice and Research* (Edited by H.G. Burger). Baillière's Tindall (1987) 1:223-243.
34. Sharpe, R.M., Fraser, H.M.: Leydig cell receptors for luteinizing hormone releasing hormone and its agonists and their modulation of administration or deprivation of the releasing hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1980) 95:256.
35. Ascoli, M. and Lloyd, C.E.: On the mechanisms involved in the regulation of the cell-surface receptors for human choriogonadotropin and mouse epidermal growth factor in cultured Leydig tumor cells. *Journal of Cell Biology* (1983) 96:521-526.
36. Verhoeven, G. and Cailleau, J.: A factor in spent media from Sertoli cell-enriched cultures that stimulates steroidogenesis in Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* (1985) 40:57-68.
37. Lin, T., Blaisdell, J., and Haskell, J.F.: Hormonal regulation of type I insulin-like growth factor receptors of Leydig cells in hypophysectomized rats. *Endocrinology* (1988) 123:134-139.
38. Rigaudière, N., Grizard, G., and Boucher, D.: Aromatase activity in purified Leydig cells from adult rat. Comparative effects of insulin, IGF-I, and hCG. *Acta Endocrinologica (Copenh)* (1989) 121:677-685.
39. Fabbri, A., Tinajero, J.C., Dufau, M.L.: Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. *Endocrinology* (1990) 127:1541-1543.
40. Rommerts, F.F.G., Hoogerbrugge, J.W., and van der Molen, H.J.: Stimulation of steroid production in isolated rat Leydig cells by unknown factors in testicular fluid differs from the effects of LH or LH-releasing hormone. *Journal Endocrinology* (1986) 109:111-117.

41. Avallet, O., Vigier, M., Perrard-Sapori, M.H. and Sáez, J.M.: Transforming Growth factor β inhibits Leydig cell function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1987) 146:575-581.
42. Guo, H., Calkins, J.H., Sigel, M.M. and Lin, T.: Interleukin-2 is a potent inhibitor of Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* (1990) 127:1234-1239.
43. Warren, D.W., Pasupuleti, V.Y., Lu, Y., Platler, B.W., and Horton, R.: Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells in vitro. *Journal of Andrology* (1990) 11:353-360.
44. Calkins, J.H., Guo, H., Sigel, M.M., and Lin, T.: Differential effects of recombinant interleukin-1 α and β on Leydig cell function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1990) 167:548.
45. Nishizawa, Y., Sato, B., Miyashita, Y., Tsukada, S., Hirose, T., Kishimoto, S., and Matsumoto, K.: Autocrine regulation of cell proliferation by estradiol and hydroxytamoxifen of transformed mouse Leydig cells in serum-free culture. *Endocrinology* (1988) 122:227-235.
46. Ronco, A.M., Pino, A.M., Valladares, L.E.: RNA synthesis in the Leydig cells of the mature rat: effect of oestradiol-17. *Journal Endocrinology* (1987) 116:387--392.
47. Brinkmann, A.O., Mulder, F., Lamers-Stahlhofen, G.J.M., Mechielsen, M.J., and van der Molen, H.J.: An oestradiol receptor in rat testis interstitial tissue. *FEBS Lett* (1972) 26:301.
48. Hales, D.B., Sha, L., and Payne, A.H.: Testosterone inhibits cAMP-induced de novo synthesis of Leydig cell cytochrome P-450₁₇ by an androgen receptor-mediated mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* (1987) 262:11200-11206.
49. Pino, A.M. and Valladares, L.E.: Evidence for a Leydig cell progesterone receptor in the rat. *Journal Steroid Biochemistry* (1988) 29:709-714.

50. Neill, J., and Frawley, S.: Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* (1983) 112:1135-1137.
51. Sortino, M.A., and Wise, P.M.: Effects of age and long term ovariectomy on prolactin secretion, as assessed by the reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* (1989) 124:90-96.
52. Sortino, M.A., and Wise, P.M.: Effect of hyperprolactinemia on luteinizing hormone and prolactin secretion assessed using the reverse hemolytic plaque assay. *Biology of Reproduction* (1989) 41:618-625.
53. Larson, G.H., Koos, R.D., Sortino, M.A., and Wise, P.M.: Acute effect of basic fibroblast growth factor on secretion of prolactin as assessed by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* (1990) 126:927-932.
54. Ho, K.Y., Thorner, M.O., Krieg, R.J., Lau, S.K., Effects of gonadal steroids on somatotroph function in the rat: analysis by the hemolytic plaque assay. *Endocrinology* (1988) 123:1405-1411.
55. Taylor, M.J., and Clark, C.L.: Analysis of release of porcine relaxin by reverse haemolytic plaque assay: evidence for autoregulation. *Journal Endocrinology* (1987) 116:287-291.
56. Taylor, M.J., and Clark, C.L.: Detection of relaxin by porcine luteal cells using a reverse hemolytic plaque assay: effect of prostaglandins E₂ and F₂, human chorionic gonadotropin, and oxytocin. *Biology of Reproduction* (1987) 37:377-384.
57. Taylor, M.J., and Clark, C.L.: Analysis of relaxin release by cultured porcine luteal cells using a reverse hemolytic plaque assay: effects of arachidonic acid, cyclo-oxygenase blockers, phospholipase A, and Melittin. *Endocrinology* (1989) 125:1389-1397.

58. Boockfor, F.R., Schwarz, L.K., and Derrick III, F.C.: Sertoli cells in culture are heterogeneous with respect to transferrin release: analysis by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* (1989) 125:1128-1133.
59. Eskeland, N.L., Lugo, D.I., Pintar, J.E., and Schachter, B.S.: Stimulation of β -endorphin secretion by corticotropin releasing factor in primary rat Leydig cell cultures. *Endocrinology* (1989) 124:2914-2919.
60. Pino, A.M., Inostroza, H., and Valladares, L.E.: Detection of testosterone secretion from individual rat Leydig cells. *Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (1992) 41:167-170.
61. Frawley, L.S., Boockfor, F.R., and Hoeffler, J.P.: Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. *Endocrinology* (1985) 116:734-737.
62. Neill, J.D., Smith, P.F., Luque, E.H., Muñoz de Toro, M., Nagy, G., and Mulchahey, J.J.: Detection and measurement of hormone secretion from individual pituitary cells. *Recent Progress in Hormone Research*, (1987) 43:175-229.
63. Kineman, R.D., Henricks, D.M., Faught, W.J., and Frawley, L.S.: Fluctuations in the proportions of growth hormone- and prolactin-secreting cells during the bovine estrous cycle. *Endocrinology* (1991) 129:3:1221-1225.
64. Scarbrough, K., Weiland, G., Larson, G.H., Sortino, M.A., Chiu, S., Hirshfield, A.N., and Wise, P.M.: Measurement of peptide secretion and gene expression in the same cell. *Molecular Endocrinology* (1991) 129:1:134-142.
65. Dufau, M.L., Mendelson, C.R., and Catt, K.J.: A highly sensitive "in vitro" bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin: testosterone production by dispersed Leydig cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1974) 39:610-613.
66. Catalogo Biochemicals Organic Compounds de Sigma Chemical Company (1992). pp.1530-1531.

67. Anakwe, O.O., Murphy, P.R., and Moger, W.H.: Characterization of β -adrenergic binding sites on rodent Leydig cells. *Biology of Reproduction* (1985) 33:815-826.
68. Moger, W.H.: Phospholipid methylation by intact rat Leydig cells. *Biology of reproduction* (1985) 33:902-910.
69. Kuhn-Velten, N., Wolff, J., Passia, D., and Staib, W.: Determination of non-specific esterase activity in rat testis interstitial cells: a marker for evaluation of a Leydig cell purification procedure and of cell viability during incubation and continuous superfusion. *Cellular and Molecular Biology* (1982) 28:473-481.
70. Hedger, M.P., and Eddy, E.M.: Monoclonal antibodies against rat Leydig cell surface antigens. *Biology of Reproduction* (1986) 35:1309-1319.
71. Hedger, M.P., and Eddy, E.M.: The heterogeneity of isolated adult rat Leydig cells separated on percoll density gradients: an immunological, cytochemical, and functional analysis. *Endocrinology* (1987) 121:1824-1838.
72. Henry, C.: Hemolytic plaque assay. In *Selected methods in cellular immunology* (Edited by B.B. Mishell and S.M. Shiigi). W.H. Freeman & Company, USA, pp.69-123.
73. Cook, B., and Beastall, G.H.: Measurement of steroid hormone concentrations in blood, urine and tissues. In: *Steroid Hormones. A Practical Approach* (Edited by B. Green and R.E. Leake). Practical Approach Series IRL PRESS, Oxford, Washington DC (1987) pp.1-65.
74. Valladares, L.E., and Payne, A.H.: Induction of testicular aromatization by luteinizing hormone in mature rats. *Endocrinology* (1979) 105:431-437.
75. Sinha-Hikim, A.P., Amador, A.G., Bartke, A., and Russell, L.D.: Structure/function relationships in active and inactive hamster Leydig cells: a correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology* (1989) 125:1844-1856.

76. Bergh, A.: Development of stage-specific paracrine regulation of Leydig cells by the seminiferous tubules. *International Journal of Andrology* (1985) 8:80-85.
77. Contreras, H.: Participación de las reacciones de metilación de fosfolípidos a nivel microsomal en el proceso esteroidogénico de las células de Leydig. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas c/m Biología de la Reproducción (1992), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
78. Roitt, I.M.: Complement. In *Immunology* (Edited by I.M. Roitt, J. Brostoff and D.K. Male). Gower Medical Publishing, London-New York (1985) pp. 7.1 - 7.14.
79. King, R.J.B. and Mainwaring, W.I.P.: *Steroid - Cell Interacion*. Butterworth & Co Publishers Ltd, 1974. pp. 379-390.
80. Catt, K.J., Harwood, J.P., Clayton, R.N., Davies, T.F., Chan, V., Katikineni, M., Nozu, K., and Dufau, M.L.: Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Recent Progress in Hormone Research* (1980) 36:557-621.
81. Molenaar, R., Rommerts, F.F.G., and van der Molen, H.J.: Non-specific esterase: a specific and useful marker enzyme for Leydig cells from mature rats. *Journal Endocrinology* (1986) 108:329-334.
82. Anderson, J.E., Thliveris, J.A., Penner, S.B.: Effect of fixation on the ultrastructural localization of $\Delta^5_3 \beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in adrenocortical and Leydig cells of the rat. *Acta Histochemistry* (1983) 73:79-86.
83. Abayasekara, D.R.E., Kurlak, L.O., Band, A.M., Sullivan, M.H.F., and Cooke, B.A.: Effect of cell purity, cell concentration, and incubation conditions on rat testis Leydig cell steroidogenesis. *In Vitro Cellular and Development Biology* (1991) 27A:253-259.