

c1

**REGULACION DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS CELULAS
DE LEYDIG DE RATA: ESTUDIO DE LAS REACCIONES DE
METILACION DE FOSFOLIPIDOS Y SINTESIS DE RNA
EN CONDICIONES DE DESENSIBILIZACION
INDUCIDA POR hCG**

**Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología**

Facultad de Ciencias

por

ANA MARIA RONCO MACCHIAVELLO

Mayo, 1991

Director de Tesis: Prof. Luis Valladares Boasi

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias
que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

ANA MARIA RONCO MACCHIAVELLO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis
para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología en el Examen de
Defensa de Tesis.

Director de Tesis Dr. Luis Valladares

L. Valladares

Comisión Informante de Tesis

Dra. Catherine Connelly

Catherine Connelly

Dr. Horacio Croxatto

H. Croxatto

Dr. Luis Izquierdo

L. Izquierdo

Dr. Eugenio Spencer

E. Spencer

INDICE DE MATERIAS

| | |
|---|----|
| - LISTA DE ABREVIATURAS | VI |
| - RESUMEN | 1 |
| - SUMMARY | 5 |
| - INTRODUCCION | 9 |
| - MATERIALES Y METODOS | 47 |
| 1. Animales | 47 |
| 2. Reactivos | 47 |
| 3. Obtención de las células del tejido intersticial | 49 |
| 4. Purificación de las células de Leydig | 50 |
| a) Purificación en gradiente de metrizamida.. | 50 |
| b) Purificación en gradiente de Percoll | 51 |
| c) Tinción histoquímica específica para células de Leydig | 53 |
| d) Determinación del número de células y viabilidad celular | 54 |
| 5. Determinación de la producción de testos- terona | 54 |
| 6. Determinación de los receptores para LH/hCG . | 55 |
| a) Determinación del número de receptores libres y ocupados por la hormona | 57 |
| 7. Síntesis de RNA | 58 |
| a) Condiciones de Incubación | 58 |
| b) Determinación de la concentración de RNA | 59 |

| | |
|--|----|
| c) Determinación de la entrada de ^3H -uridina a la célula | 60 |
| d) Extracción de los RNAs sintetizados | 61 |
| e) Separación de los RNAm poliadenilados..... | 62 |
| 8. Metilación de Fosfolípidos | 63 |
| a) Perfusión Testicular | 64 |
| b) Determinación de la concentración de metionina | 64 |
| c) Condiciones de Incubación | 66 |
| d) Determinación de los niveles de metilación en los lípidos totales de las membranas celulares | 67 |
| e) Determinación de la concentración de metionina en la fracción acuosa | 68 |
| f) Separación y análisis de los FL metilados | 69 |
| 9. Determinación de la actividad de la enzima fosfolípidometiltransferasa (FMT) | 70 |
| a) Condiciones de incubación de las células de Leydig intactas con agonistas | 70 |
| b) Determinación de la actividad de la enzima FMT in vitro | 71 |
| c) Determinación de las condiciones experimentales óptimas para la evaluación de la actividad enzimática FMT | 72 |
| 1. Efecto de la temperatura de incubación en la actividad FMT en una suspensión libre de células | |
| 2. Efecto del tiempo de incubación en la actividad FMT en una suspensión libre de células | 74 |

| | |
|---|-----|
| 3. Efecto de la concentración de S-adenosilmetionina (SAM) sobre la actividad de la enzima FMT en una suspensión libre de células | 75 |
| 10. Análisis estadístico | 77 |
| - RESULTADOS | 78 |
| I) Metilación de FL en células de Leydig | 78 |
| 1) Acción de inhibidores de reacciones de metilación (3-DZA) sobre la síntesis de Testosterona en células intersticiales . | 78 |
| 2) Efecto de inhibidores de la metilación: 3-DZA y HTL en la incorporación de grupos metilo | 80 |
| 3) Progreso temporal de la incorporación de ³ H-metionina a FL. Efecto de hCG | 83 |
| 4) Efecto de la concentración de hCG sobre la metilación de FL y síntesis de Testosterona en células de Leydig..... | 87 |
| 5) Efecto de la Hormona Luteinizante (LH) en la incorporación de ³ H-metionina a FL | 90 |
| 6) Incorporación de ³ H-metionina a distintos tipos celulares | 92 |
| 7) Incorporación de ³ H-metionina en función de la concentración de células de Leydig | 94 |
| 8) Caracterización de los FL metilados. Efecto de hCG | 96 |
| 9) Efecto de diferentes esteroides producidos por las células de Leydig en la metilación de FL | 98 |
| 10) Efecto de LHRH y AVP en la metilación de FL y en la producción de T | 100 |

| | | |
|------|---|-----|
| 11) | Efecto de análogos de cAMP y estimuladores de la adenilato ciclasa en la metilación de FL | 102 |
| 12) | Efecto de diferentes subunidades de hCG y del híbrido de hCG en la metilación de FL | 106 |
| 13) | Efecto de los híbridos de hCG sobre la síntesis de Testosterona | 109 |
| II) | Determinación de la actividad de la enzima Fosfolípidometiltransferasa (FMT) | 111 |
| 1) | Efecto del inhibidor de la enzima FMT: SAH y de la adición exógena de fosfolípidos en la actividad de la enzima FMT . | 111 |
| 2) | Efecto de hCG y de sus subunidades individuales (α hCG y β hCG) en la actividad FMT | 113 |
| 3) | Efecto de análogos de cAMP y de activadores de la adenilato ciclasa sobre la actividad FMT | 116 |
| III) | Estudios en ratas desen sibilizadas | 118 |
| 1) | Determinación de la concentración de receptores para LH/hCG | 118 |
| 2) | Efecto de una dosis única de hCG (100 U.I.) sobre la metilación de FL . | 122 |
| 3) | Determinación de la concentración intracelular de compuestos marcados con 3 H-metilo | 127 |
| 4) | Actividad enzimática FMT en células de Leydig desensibilizadas | 130 |

| | |
|---|-----|
| IV) Estudios de síntesis de RNA en células de Leydig | 133 |
| 1) Efecto de una inyección de 100 UI de hCG en la síntesis de RNA en células de Leydig | 133 |
| 2) Efecto del tiempo de incubación en la incorporación de ³ H-uridina a RNA en ratas desensibilizadas | 134 |
| 3) Efecto de la desensibilización en la permeabilidad de la uridina | 137 |
| 4) Estudio comparativo entre número de receptores para LH, producción de T y síntesis de RNA en animales desensibilizados | 137 |
| 5) Caracterización de los RNA sintetizados | 140 |
| - DISCUSION | 143 |
| - REFERENCIAS | 173 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| ATP | : adenosina 5' monofosfato |
| AVP | : arginina vasopresina |
| AVT | : arginina vasotocina |
| 8-Br cAMP | : 8 bromoadenosina-3'-5' monofosfato cíclico |
| p-Br-Br | : bromuro de parafenacilo |
| BSA | : albumina de suero de bovino |
| cAMP | : adenosina 3'-5' monofosfato cíclico |
| CDP-colina | : citidin - difosfocolina |
| Col | : colesterol |
| dbcAMP | : dibutiril adenosina 3'-5' monofosfato cíclico |
| 3-DZA | : 3 deazaadenosina |
| E ₂ | : estradiol |
| FC | : fosfatidilcolina |
| FDE | : fosfatidil dimetiletanolamina |
| FE | : fosfatidiletanolamina |
| FME | : fosfatidilmonometiletanolamina |
| FK | : forskolina |
| FL | : fosfolípidos |
| FMT | : fosfolípido metiltransferasa |
| FSH | : hormona folículo estimulante |
| GDP | : guanosina 5'-difosfato |
| Gpp(NH)p | : guanosina 5'(β ,gama-imido) trifosfato |
| GTP | : guanosina 5' trifosfato |

| | |
|--------|--|
| 3-βHED | : 3- β hidroxioesteroide deshidrogenasa |
| hCG | : hormona gonadotrofina coriónica humana |
| ahCG | : subunidad alfa de la hCG |
| βhCG | : subunidad beta de la hCG |
| HTL | : homocisteína tiolactona |
| LFC | : lisofosfatidilcolina |
| LH | : hormona luteinizante |
| LHRH | : hormona liberadora de gonadotrófinas |
| MEM | : medio de cultivo mínimo |
| MIX | : metil isobutil xantina |
| M-199 | : medio de cultivo |
| NAD | : nicotín amida adenina dinucleótido |
| PBS | : solución salina tamponada con fosfato |
| PK-C | : proteína quinasa C |
| Preg | : pregnenolona |
| PRL | : prolactina |
| Prog | : progesterona |
| REL | : retículo endoplásmico liso |
| RIA | : radioinmunoanálisis |
| RNA | : ácido ribonucleico |
| SAH | : s-adenosilhomocisteina |
| SAM | : s-adenosilmetionina |
| SNC | : sistema nervioso central |
| T | : testosterona |
| TC | : toxina del cólera |

RESUMEN

En este trabajo se estudia si las respuestas tempranas y tardías de la LH/hCG se encuentran modificadas en la célula de Leydig desensibilizada por una dosis única y elevada de hCG (100 UI).

Es bien conocido que la hormona luteinizante (LH) o su análoga la gonadotropina coriónica humana (hCG), son las principales hormonas reguladoras de la síntesis de testosterona en las células de Leydig. La acción de LH/hCG comienza con la unión a receptores específicos localizados en la membrana plasmática de la célula de Leydig. Este evento estimula una serie de respuestas, clasificadas como tempranas y tardías de acuerdo a la secuencia temporal de la interacción hormona-receptor.

Se estudió la metilación de fosfolípidos, la que fue caracterizada como respuesta temprana de la acción de LH/hCG en la célula de Leydig. Esta observación se basó en la utilización de tres aproximaciones experimentales: el uso de inhibidores de las reacciones de metilación de fosfolípidos, la incorporación de ^3H -metionina a fosfolípidos totales de las membranas en células intactas y la determinación de la actividad enzimática fosfolípidometil-

transferasa (FMT) *in vitro* mediante la incorporación de ^3H -S-adenosilmetionina (SAM) en suspensiones libre de células. Nuestros resultados con inhibidores de las reacciones de metilación de FL, sugieren que estas reacciones están participando en la producción de una parte de los esteroides que son estimulados por LH/hCG. Estas gonadotrofinas aumentan específicamente la incorporación del precursor radioactivo ^3H -metionina en células de Leydig intactas, dependiendo de la dosis de hormona utilizada y del tiempo de incubación con ella.

En células intactas, las metilaciones se activan por la unión hormona-receptor y no por la producción de cAMP. Estas observaciones se basaron en estudios en los cuales análogos de cAMP y activadores de adenilato ciclasa no estimularon la incorporación de metionina radioactiva a FL. Estos hallazgos fueron corroborados por los estudios de la acción de las subunidades individuales de hCG, que no generan cAMP intracelular, de las cuales solamente la subunidad β estimuló la metilación de FL.

Los resultados de los estudios *in vitro* indicaron que la incubación previa con hCG y la subunidad β estimuló la actividad enzimática FMT, indicando una correlación con los estudios en células intactas. Sin embargo, otros resultados de este tipo, aparecen como

contradictorios y se discuten a la luz de las evidencias de la literatura.

En los animales desensibilizados por una dosis única y elevada de hCG (100 UI), se observó que la incorporación de ^3H -metionina a FL se encuentra inhibida en el día 1, 3 y 6 después del tratamiento. Sin embargo la actividad enzimática sólo disminuyó el día 3 cuando todos los receptores de LH/hCG se habían internalizado. Estos resultados permiten plantear la existencia de microdominios de la membrana en que coexisten cercanamente receptor y enzimas FMT.

La síntesis de RNA, una respuesta tardía de la acción de LH/hCG, también se ve alterada durante la desensibilización con hCG; ésta disminuye en el segundo día de tratamiento, después de la disminución en la concentración de receptores y en la síntesis de testosterona, indicando que se trata de un proceso más lento. Solamente en el día 12 se recupera la capacidad de síntesis de RNA. Nuestros resultados indican una disminución mayor en los RNA poli adenilados que en los RNA sin poli A.

En conclusión, en este trabajo se demuestra claramente, que el proceso de desensibilización produce alteraciones generalizadas de la funcionalidad de la

célula de Leydig. Se observó que aparte de la disminución en la síntesis de esteroides, otras respuestas, como la metilación de fosfolípidos y la síntesis de RNA, se encuentran modificadas.

SUMMARY

In this work, we have studied whether early and late testicular Leydig cell responses to LH/hCG are modified when animals are previously subjected to desensitization with a single large dose of hCG (100 IU).

It is well known that luteinizing hormone (LH) is the main hormone regulating physiological testosterone synthesis by Leydig cell. The same effect can be obtained with human chorionic gonadotrophin (hCG), an LH analog. Different responses classified in a chronological sequence as early and late events, can be observed when LH/hCG binds to its own receptor, located in the plasma membrane. In this study, two events occurring at different times have been analyzed: a) membrane phospholipid methylation, characterized in this work as an early molecular event, b) RNA synthesis, considered a late event.

Phospholipid methylation was classified as an early action of LH/hCG on Leydig cells on the basis of results obtained in three experimental designs: a) the use of inhibitors of phospholipid methylation, b) the incorporation of ^3H -methionine to total membrane phospholipids in

intact Leydig cells, and c) the phospholipidmethyltransferase (PMT) enzyme activity *in vitro* through the incorporation of ^3H -S-adenosylmethionine (SAM) in free cells suspensions. The results of this study with inhibitors, suggest that methylation reactions are partially involved in testosterone production.

Our results show a specific dose - dependent LH/hCG stimulatory effect on phospholipid methylation, which also depends on the length of the incubation time with the hormone. In intact Leydig cells, the increased phospholipid methylation depends on hormone-receptor interaction, and it seems to be independent of cAMP related events. Indeed, adenylate cyclase stimulators (cholera toxin and forskolin) fail to cause any effect on phospholipid methylation. Furthermore, the isolated β subunit stimulates phospholipid methylation when it interacts with LH receptor, in spite of, no cAMP production is obtained.

Then, phospholipid methylation could be a Leydig cell response activated by the ligand-receptor interaction and not through a cAMP mediated mechanism .

Nevertheless, *in vitro* enzymatic assays demonstrate that phospholipid methyltransferase activity

may be stimulated not only by previous exposure of cells to the hormone, but also through a mechanism presumably involving cAMP dependent phosphorylations.

On the other hand, in desensitized animals, it can be observed that phospholipid methylation is inhibited at 1, 3 and 6 days after hCG treatment; phospholipid methyltransferase activity is only inhibited on day 3, when the entire LH-receptor population has been internalized. In this way it is possible to establish a close relationship between phospholipid methylation and number of LH receptors localized in the plasma membrane.

Late responses to LH/hCG are also modified during desensitization. RNA synthesis, mainly RNA poli (A), decreases the second day after hCG injection. This has been considered a slow process, since receptors number and testosterone production decrease the first day after the hCG treatment. Only 12 days later, Leydig cells regain their original level of RNA synthesis.

Thus, it appears that desensitization triggers a general alteration of Leydig cells function, which involves molecular mechanisms associated with membrane, steroidogenic and nuclear events.

We may conclude therefore that, in addition to the classical LH/hCG role of stimulating acute testosterone synthesis, these hormones can also regulate other cellular events such as membrane phospholipid methylation and RNA synthesis at the nuclear level. It seems possible that both early and late responses may be involved in sequential molecular regulatory processes associated to Leydig cell steroidogenic pathway.

INTRODUCCION

La gónada tiene en el proceso reproductivo funciones de producir gametos y hormonas, interrelacionadas y bajo el control del sistema nervioso central (SNC) (Hauger y col. 1977; Fabbri y col. 1989; Matsumoto y Bremner, 1987). En el testículo, la función endocrina se realiza en las células de Leydig (Tahka, 1986), que están localizadas en el tejido intersticial entre los túbulos seminíferos (en cuyo interior se encuentran las células de Sertoli y las células germinales en distintos estados de diferenciación (Leblond y Clermont, 1952; Parvinen y col. 1986). Además de las células de Leydig, el tejido intersticial contiene macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos (Christensen, 1975). En la rata, aproximadamente el 16% del volumen testicular está ocupado por tejido intersticial y menos del 3% por las células de Leydig (Mori y Christensen, 1980).

La producción de andrógenos por las células de Leydig está regulada principalmente por la hormona luteinizante (LH) la cual es secretada por la pituitaria anterior en pulsos de alta actividad biológica (Waters y col., 1990; Conn y col., 1987; Clarke y Cummins, 1987).

Este modo de secreción mantiene la producción de andrógenos, de tal forma que cambios en la amplitud y frecuencia de los pulsos secretores se asocia a variaciones en el estado reproductivo (Brook y col., 1987). A su vez, y en forma recíproca, la secreción de gonadotrofinas está controlada por la secreción de productos de origen testicular sobre el hipotálamo y la hipófisis (Kalra y Kalra, 1983; Bardin y Paulsen, 1981; Clayton y Catt, 1981).

Se ha demostrado que diversas hormonas pueden modificar la función endocrina testicular, sin embargo, en una perspectiva fisiológica, LH sería la única hormona esencial para la producción y mantención de la testosterona (Zipf y col., 1978).

Desde el punto de vista de la regulación de la función testicular, se ha encontrado que LH/hCG son capaces de causar una disminución del número de receptores para LH (down-regulation) cuando se encuentran en una concentración aumentada o bien cuando su acción se prolonga en el tiempo. Si este proceso, demostrado experimentalmente, no se recupera en presencia de cAMP, se habla de "desensibilización" de la respuesta celular, ya que la respuesta esteroidogénica se encuentra disminuída frente a un segundo estímulo de la hormona. Esta es una caracterís-

tica que actualmente ha sido reconocida para muchas hormonas peptídicas y en muchos casos ha sido comprobado su rol fisiológico (Sibley y col., 1988). Si bien se ha demostrado que la función esteroidogénica está alterada durante la desensibilización de la célula de Leydig, se desconoce aún si otras respuestas celulares gatilladas por el estímulo hormonal, se encuentran modificadas. Este constituye el problema central de esta tesis, donde se pretende estudiar el proceso de desensibilización de las células de Leydig inducida por LH/hCG.

Antes de enunciar los objetivos de este trabajo, conviene resumir algunos antecedentes acerca de la función esteroidogénica de la célula de Leydig y de los mecanismos de acción y regulación implicados en ella. Este resumen lo he dividido en: I Fenómenos de interacción en la membrana y II Fenómenos intracelulares.

I. Fenómenos de interacción molecular en la membrana plasmática de la célula de Leydig.

Todas las señales químicas deben atravesar la membrana plasmática para controlar los eventos citoplasmáticos y genómicos de las células blanco, de modo que la membrana comprende un sitio regulatorio importantísimo de

las señales hormonales extracelulares. La transmisión de la señal hormonal no es un proceso constante ni fijo para un ligando químico determinado, sino por el contrario, es un proceso variable y adaptativo que depende de la dosis de hormona, de la etapa de desarrollo de la célula blanco - en relación a sus células vecinas - y también del estado metabólico de dichas células.

a) Mecanismos de acción de la LH/hCG.

La LH es una hormona glicoproteica y tiene algunas similitudes estructurales con otras hormonas de naturaleza glicoproteica como FSH, TSH y gonadotrofina coriónica humana derivada de la placenta (hCG) (Ryan y col., 1988; Gray, 1988; Gharib y col., 1990). La hCG, debido a su enorme similitud estructural con la LH, es capaz de reproducir los efectos de la LH al unirse a los mismos receptores, y por su larga vida media es utilizada experimentalmente con preferencia a LH (Dufau y Catt, 1980).

Cada una de estas glicoproteínas consiste en un heterodímero con dos subunidades asociadas no covalentemente: la subunidad α (común para todas ellas) y una subunidad β , que le otorga la especificidad biológica a la

hormona (Wilson y col.,1990). Las subunidades aisladas no poseen actividad biológica por lo tanto la formación del heterodímero es esencial para estimular de la síntesis de testosterona (T) (Dufau y Veldhuis, 1987). Ambas subunidades son glicosiladas en ciertos residuos y contienen numerosos entrecruzamientos intramoleculares (Sairam, 1989; Wilson y col., 1990; Browne y col., 1990). Se ha encontrado que las hormonas con un contenido menor de carbohidratos (d-hormonas) interactúan con el receptor pero son incapaces de activar eventos intracelulares (Sairam y Bhargavi, 1985). Desde este punto de vista, constituirían antagonistas, es decir, compuestos que se unen al receptor pero no inducen las modificaciones necesarias de la membrana que transducen la señal, impidiendo así la generación de una respuesta celular específica (Browne y col., 1990).

La síntesis de testosterona es estimulada principalmente por LH, y su acción comienza por la unión de esta hormona a receptores de alta afinidad localizados en la superficie de la membrana plasmática de la célula de Leydig (Catt y Dufau, 1978). Entre los diferentes eventos a nivel de la membrana plasmática que son iniciados por la interacción de LH o hCG con los receptores de la célula de Leydig, las proteínas que unen nucleótidos de

guanina (proteínas G) tienen un rol importante en la activación de la adenilato ciclasa de la membrana plasmática (Johnson y Dhanasekaran, 1989). Las acciones esteroideogénicas y tróficas de LH sobre la célula de Leydig serían pues mediadas por la activación de proteínas kinasas A y posterior fosforilación de proteínas regulatorias, incluyendo aquellas que controlan las enzimas esteroideogénicas involucradas en la biosíntesis de andrógenos (Dufau y Catt, 1978; Catt y col., 1980). Sin embargo, debido a que LH estimula la síntesis de testosterona a valores cercanos a la respuesta máxima, antes de que cAMP sea detectado experimentalmente, algunos autores han planteado que otros mecanismos, además del cAMP, podrían estar operando en la célula de Leydig (Themmen y col., 1985a;1985b). Una explicación probable para la primera observación sería la existencia de una heterogeneidad citoplasmática, la cual implica que pequeños cambios en la concentración total de cAMP (no necesariamente detectables experimentalmente) puedan inducir cambios locales en la molécula de proteína quinasa. Estos cambios locales podrían ser suficientes para amplificar la respuesta original de LH/hCG activando la proteína quinasa A. Esta hipótesis fue abordada experimentalmente determinando la cantidad de cAMP unido a la subunidad regulatoria de la proteína quinasa A. Los resultados indicaron que LH produ-

cía un aumento en el número de moléculas de la subunidad regulatoria de la proteína quinasa A unidas a cAMP y una disminución del número de moléculas libres de la subunidad regulatoria (Dufau y col., 1980).

No obstante que estos resultados sugieren fuertemente que cAMP es un mediador de la acción de LH, algunos autores postulan que otros sistemas mediadores, como proteína quinasa C y Ca^{+2} -calmodulina, también podrían estar involucrados en el control de la esteroidogénesis testicular (Lin, 1985; Hall y col., 1981; Welsh y col., 1984; Cooke y Sullivan, 1985; Sullivan y Cooke, 1986). Sus observaciones, implicarían que LH activa más de un mecanismo transductor (proteína quinasa A y proteína quinasa C). Aunque ambas propuestas (la compartimentalización de cAMP y otros sistemas de transducción como proteína quinasa C y Ca^{+2} -calmodulina) pudieran no ser excluyentes, es posible pensar, que mecanismos alternativos al cAMP estén operando en células distintas, empleando distintos segundos mensajeros intracelulares.

Recientemente, se ha postulado, que la acción de la LH/hCG involucra canales de Cl^{-} (Duchatelle y Joffre, 1987) y que este sería un mecanismo que opera previamente a la producción de cAMP (Choi y Cooke, 1990). Estos antecedentes se basan en estudios con bloqueadores

de canales de Cl^- los que inhiben la respuesta esteroidogénica estimulada por LH a bajas concentraciones de hormona ($< 1 \text{ ng/ml}$) y no a concentraciones elevadas (100 ng/ml).

LH también ejerce acciones tróficas sobre la célula de Leydig a nivel de su crecimiento y diferenciación, lo que se pone en evidencia por cambios de la morfología celular durante el desarrollo sexual del animal (Bordy y col., 1984; Knorr y col., 1970). La acción crónica de LH sobre la célula de Leydig involucra una regulación de los receptores de membrana para LH y prolactina, como así mismo otros procesos de membrana, procesos intracelulares relacionados con la vía esteroidogénica que conduce a la secreción de andrógenos y procesos a nivel genómico entre los que se encuentran la síntesis de RNA y proteínas (Dufau y Catt, 1978).

b) Características de los receptores testiculares para LH.

La existencia de los receptores de LH/hCG en la membrana plasmática de la célula de Leydig del testículo ha sido demostrada por una serie de metodologías entre las que se incluyen estudios de microscopía electrónica, enzimáticos e inmunoquímicos (Dufau y Catt, 1978).

Los receptores gonadales para LH/hCG se han caracterizado recientemente y se los identifica como glicoproteínas de transmembrana de estructura dimérica con un PM de 190.000 (Mc Farland y col., 1989; Frazier y col., 1990; Ascoli y Segaloff, 1989).

La capacidad de unión del receptor de LH en la rata adulta es de 1 pmol/g de tejido, que es equivalente a 20000 sitios de unión por célula de Leydig (Dufau y Catt, 1978). Esta concentración de receptores es excesiva en relación a la respuesta esteroidogénica, es decir, para obtener una respuesta esteroidogénica máxima, basta con la ocupación de alrededor de un 1-10% de los receptores de LH (200- 2000 receptores en promedio). Después de la saturación de los receptores de LH con hCG in vivo, el complejo hormona-receptor se internaliza en un proceso relativamente lento (6-24 h) (Herms y Lalli, 1988; Conn y col., 1978; Dufau y col., 1984; esta tesis). Recientemente, empleando anticuerpos monoclonales para el receptor luteotrófico se ha demostrado que la unión de LH no estimula la síntesis de T, a menos que vaya acompañada de una microdistribución del complejo hormona-receptor (Baraño y Dufau, 1983; Hsueh y col., 1976). Estudios con métodos de fotoblanqueo han demostrado que la constante de difusión de los receptores ocupados con hCG es sustancialmente menor que cuando están ocupados con LH. Tan marcada

diferencia en la movilidad lateral podría explicar la menor velocidad de internalización observada complejo hormona-receptor con hCG que con LH (Niswender y col., 1983). La microagregación de un limitado número de receptores es indispensable para la activación de la adenilato ciclasa y posterior producción de T, y conduce a un fenómeno más generalizado de macroagregación y "capping" de los receptores de LH. Este proceso que inicialmente causa la activación de la síntesis de andrógenos, causa también un período de insensibilidad en la respuesta de la célula de Leydig.

c) Regulación de los receptores de LH

La regulación de los receptores es decisiva en la modulación de la respuesta de la célula blanco a la estimulación hormonal. Muchas hormonas proteicas modulan la sensibilidad de sus tejidos blanco regulando el número de receptores de la membrana celular, como es el caso de LH en las células de Leydig de la rata madura (Huhtaniemi y col., 1982). Se ha observado además, que otros ligandos tales como prolactina (PRL), FSH, estrógenos, arginina - vasotocina (AVT), factores semejantes a LHRH y otras sustancias químicamente indefinidas producidas por Sertoli

son capaces de regular el número de receptores para LH (Ota y col., 1986; Chan y col., 1981). En roedores, FSH y PRL parecen tener un rol central en la regulación de los receptores para LH especialmente en la inducción de receptores durante el período puberal (Huhtaniemi y col., 1984); por este proceso, la exposición a dicha hormona aumenta la unión posterior a LH (Chen y Payne, 1977; Hsueh y col., 1976).

Al menos dos mecanismos diferentes parecen estar implicados en la regulación positiva de los receptores de LH. Tratamientos cortos de los animales con la hormona o bien una dosis fisiológica de LH, induce una elevación lenta pero sostenida del número de receptores homólogos (up - regulation), la que se evidencia después de 1-2 días. Esta situación parece ser el resultado de la acción trófica de LH sobre la inducción y mantención de los receptores de LH en la célula de Leydig.

Por el contrario, una dosis única suprafi-siológica de LH (1-10 µg) produce un aumento rápido de los receptores 3-6 h después de la administración (Huhtaniemi y col., 1978). Esto se explica por el desenmascaramiento de los receptores crípticos y/o incorporación de receptores pre-sintetizados en la membrana ya que esta situación no es modificada por inhibidores de la síntesis

proteica (Baraño y Dufau, 1983). Sin embargo, después del aumento inicial transiente de los receptores (up-regulation), altas dosis de LH inducen una importante disminución del número de receptores para LH (down-regulation) seguido por una respuesta disminuída de la célula de Leydig a una posterior estimulación hormonal (desensibilización) (Hsueh y col., 1977; Catt y col., 1979; Cigorruga y col., 1978).

d) Activación hormonal de la Adenilato Ciclasa

El mecanismo por el cual las hormonas estimulan la adenilato ciclasa involucra una modificación de proteínas G (Rodbell, 1980). Estas forman una compleja familia de heterotrómeros asociados a la membrana y están compuestas por las subunidades α , β y γ . Las diferencias en la subunidad α sirven para distinguir a las diversas proteínas G hasta ahora encontradas (Birnbaumer y col., 1991). La subunidad α contiene el sitio de unión a nucleótidos de guanina, que en el estado inactivado está ocupado por GDP y en el estado activo por GTP (Fig.1). La subunidad α posee también una actividad GTP-asa y contiene los sitios para la ADP-ribosilación catalizada por toxinas bacterianas. En presencia de la hormona o del agonista,

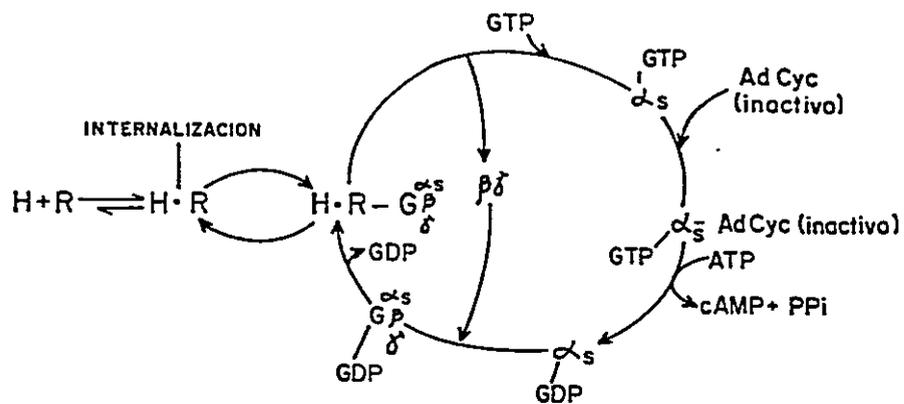


FIG.1 ESQUEMA DEL MECANISMO DE ACTIVACION DEL SISTEMA ADENILATO CICLASA.

H: Hormona; R: Receptor; Gs: Proteína Gs (estimuladora), subunidad reguladora de la Adenilato ciclase (AdCyc s); α, β y gama: Subunidades de la proteína Gs; AdCyc: enzima adenilato ciclase, GTP: guanosina 5'-trifosfato, GDP: guanosina 5'-difosfato

los receptores activan las proteínas G catalizando el intercambio del GDP unido por GTP (Allende, 1988). La unión de GTP produce la disociación de los complejos $\beta\gamma$ y α -GTP. El complejo α -GTP regula la actividad de la adenilato ciclasa a través de la subunidad α_s (G_s) (que puede ser ADP ribosilada por la toxina del cólera), responsable de la activación de la adenilato ciclasa, como así también por α_i (G_i) (sustrato de la toxina pertussis), responsable de la inhibición de la adenilato ciclasa (Johnson y Dhannasekaran, 1989).

La adenilato ciclasa de células de Leydig es dependiente de la adición de nucleótidos de guanina para la respuesta hormonal (Dufau y col., 1980). Así, su estimulación por LH/hCG aumenta en presencia de análogos de GTP no hidrolizables (Gpp(NH)p). La unión de este nucleótido a membranas de células de Leydig reveló un sitio de unión de alta afinidad (K_a $1-3 \times 10^7 M^{-1}$) y de alta capacidad (5-20 pmol/mg de proteína de membrana). LH/hCG estimulan la unión de Gpp(NH)p en forma dosis dependiente. La concentración del nucleótido unido a las membranas es mayor que el número de sitios de unión para LH/hCG, sugiriéndose una amplificación de la reacción de unión de la gonadotropina (Dufau y col., 1984). La interacción del complejo hormona-receptor con la subunidad regulatoria G implica un desplazamiento de estas proteínas

a través de la membrana plasmática y va acompañada de un reemplazo de GDP por GTP lo que en definitiva se traduce en una activación de esta subunidad y la posterior activación de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. La cantidad de cAMP producido como consecuencia de esta activación enzimática, por muy pequeña que sea, es capaz de estimular a la proteína quinasa A (PK A) (Catt y col., 1980), generando una cascada de fosforilaciones proteicas dentro de la célula de Leydig. Las células de Leydig tienen la capacidad de responder con la máxima producción de T, al ser estimuladas con concentraciones bajas de LH/hCG (del rango de 1 a 5mUI/ml, 10^{-13} M), las que generan un aumento apenas detectable en los niveles intracelulares de cAMP (2×10^{-9} M) (Brown y Bhalla, 1991). El cAMP producido ocupa sólo un 15 a un 20% de los sitios de unión que existen para este nucleótido cíclico dentro de la célula y que corresponden en su mayor parte a la subunidad reguladora de la proteína quinasa A. El aumento de la concentración de LH/hCG se traduce en una mayor producción de cAMP y proteínas quinasas, sin embargo, esto no representa una mayor síntesis de testosterona.

e) Ca^{+2} y reguladores paracrinos de la función esteroidogénica.

La mayoría de los procesos biológicos requiere de Ca^{+2} , al menos como agente permisivo. En la esteroidogénesis de la célula de Leydig, el Ca^{+2} parece tener un rol regulatorio (Hall y col., 1981; Welsh y col., 1984; Lin, 1985; Cooke y Sullivan, 1985), ya que la producción máxima de testosterona estimulada por LH sólo puede ser alcanzada en presencia de Ca^{+2} . Sin embargo, la acción de Ca^{+2} requiere de calmodulina, ya que trifluoperazina, un inhibidor de calmodulina, inhibe la acción esteroidogénica de LH (Hall y col., 1981). Algunos estudios sugieren que calmodulina está involucrada en el transporte de colesterol a la mitocondria y que proteínas quinasas dependientes de Ca^{+2} -calmodulina están involucradas en el control de la esteroidogénesis testicular (Hall y col., 1981) (Sullivan y Cooke, 1986).

Aunque LH es el factor hormonal principal que regula la función de la célula de Leydig, estas células reciben otros estímulos hormonales que ejercen una acción moduladora de la función celular. Algunos de ellos ejercen una acción paracrina (al ser secretadas por células vecinas) a través de receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células de

Leydig (Sharpe, 1986). Sin duda, entre los principales reguladores paracrinos de la función de la célula de Leydig están los péptidos semejantes a LHRH, presumiblemente secretados por las células de Sertoli, que ejercen efectos estimulatorios e inhibitorios directamente sobre las células de Leydig (Hsueh y Jones, 1981; Bourne y col., 1982; Sharpe y Cooper, 1982a; Sharpe, 1983; Sharpe y Cooper, 1983; Browning y col., 1983) a través de segundos mensajeros diferentes de cAMP. Se ha encontrado, que el factor semejante a LHRH induce cambios en el metabolismo del fosfatidilinositol, permeabilidad al ion Ca^{+2} y producción de prostaglandina E (Cooke y col., 1984; Molcho y col. 1984). Otros péptidos de origen neurohipofisiario, la arginina-vasotocina (AVT) y arginina-vasopresina (AVP) ejercen una acción antigonadal a través de receptores localizados en las células de Leydig, (Meidan y Hsueh, 1985; Adashi y Hsueh, 1982) presumiblemente vía la subunidad G_{α_i} de la adenilato ciclasa (Adashi y Resnik, 1984). También se han encontrado en estas células, receptores para prolactina (PRL), factor de crecimiento semejante a insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) catecolaminas y benzodiazepina (Ascoli, 1981; Welsh y Hsueh, 1982; Meidan y Hsueh, 1985; De Souza y col., 1985; Handelsman y col., 1985; Anakwe y col. 1985).

La función esteroidogénica era considerada la única función de la célula de Leydig pero actualmente, es evidente que estas células sintetizan otros compuestos bioactivos como péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC)(Shu-Dong y col., 1982; Margioris y col., 1983) y también un factor con actividad semejante a la renina (Parmentier y col., 1983), ambas involucradas en el control paracrino y autocrino de la función testicular.

Cualquier tejido que contenga numerosos tipos celulares necesita una coordinación de las funciones de los diferentes tipos celulares, pero en el testículo, donde prácticamente todas las funciones están reguladas por LH y FSH, surgen dudas sobre la necesidad de una regulación de ese tipo. Sin embargo, los mecanismos de control local sirven de mediadores o moduladores de la acción de las gonadotrofinas de acuerdo a los requerimientos locales y existen además, factores adicionales relacionados con la organización estructural única del testículo que potencian la importancia de las regulaciones paracrinas (Sharpe, 1986). Recientemente, se ha demostrado que la T, pero no otros productos de las células de Leydig, juega un rol fundamental en muchas de estas interacciones, de aquí la importancia de que la producción de esta hormona en las células de Leydig esté sometida a un control

fino de regulación (Sharpe y col., 1990; Saez y col., 1989) (Fig. 2).

II Fenómenos intracelulares

a) Esteroidogénesis.

La célula de Leydig está altamente especializada en la síntesis y secreción de andrógenos. La organización de las enzimas que participan en la esteroidogénesis está compartamentalizada en la mitocondria, retículo endoplásmico liso (REL) y citoplasma. La testosterona es sintetizada a partir del colesterol que es captado por la célula (también existe síntesis de novo) y transportado a la mitocondria donde se produce la ruptura de la cadena lateral para formar pregnenolona (Shikita y Hall, 1974). La posterior conversión de pregnenolona a T ocurre en el REL y requiere al menos 4 reacciones enzimáticas catalizadas por las siguientes enzimas :17 α -hidroxilasa, C₁₇₋₂₀ liasa, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y Δ^5-3 ketoisomerasa. La secuencia enzimática y las contribuciones relativas de las vías Δ^4 y Δ^5 varían según la especie. En la rata, la vía preferida es la Δ^4 (Fig. 3).

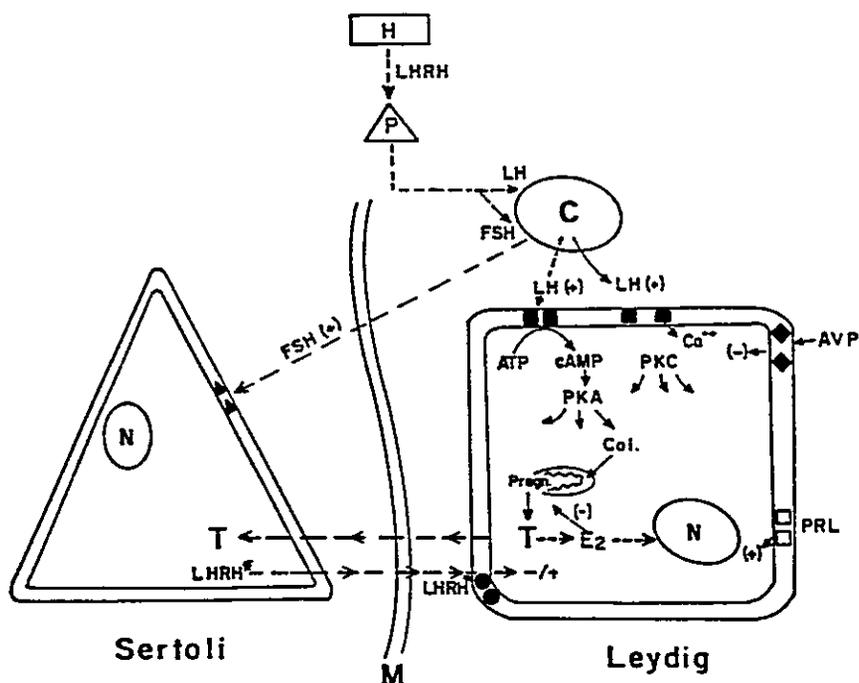


FIG. 2 PARTICIPACION DE FACTORES REGULATIVOS ENDOCRINOS PARACRINOS Y AUTOCRINOS SOBRE LA FUNCION DE LA CELULA DE LEYDIG.

H: Hipotálamo; P: Pituitaria; LH: Hormona Luteinizante; FSH: Hormona Folículo Estimulante; C: Vaso Capilar; AVP: Arginina-Vasopresina; LHRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas; LHRH*: Péptido semejante al factor liberador de gonadotrofina; PKA :Proteína Quinasa dependiente de cAMP; PKC: Proteína Quinasa C; Col: Colesterol; Preg: Pregnenolona; N: Núcleo; T: Testosterona; E: Estradiol; PRL: Prolactina; M: Membrana Basal.

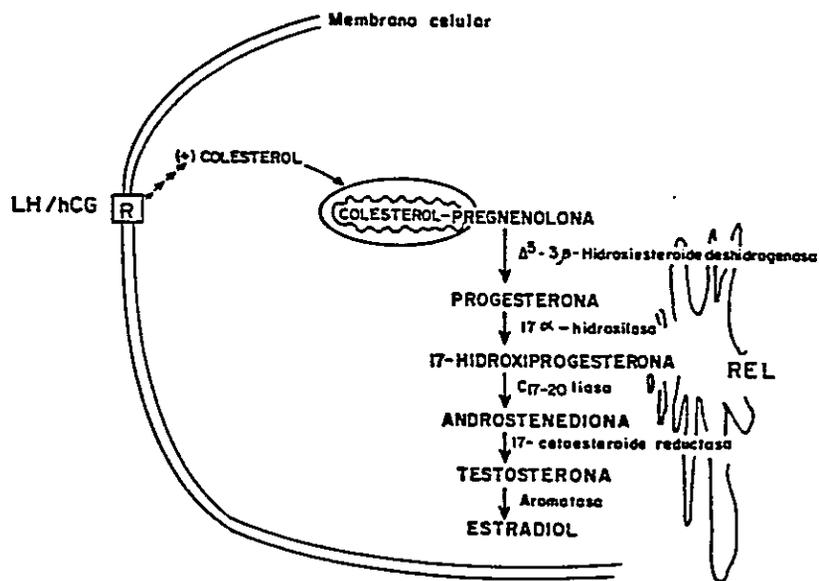


FIG. 3 RUTA ESTEROIDOGENICA DE LA SINTESIS DE TESTOSTERONA. (Ruta 4- eno, preponderante en la rata).

La testosterona sintetizada, es aromatizada a estradiol (E_2) por la enzima aromatasa (Valladares y Payne, 1980), una mono-oxigenasa dependiente de citocromo P-450, cuya actividad es regulada por LH/hCG (Tsai-Morris y col., 1985). El E_2 es sintetizado en la célula de Leydig del animal adulto y su secreción aporta a la circulación periférica entre un 20 y 25% de los estrógenos circulantes totales. Aunque la secreción de E_2 testicular puede ser de poca importancia a nivel periférico, es considerado actualmente uno de los principales responsables de la regulación autocrina testicular ya que es un factor importantísimo en la regulación del proceso esteroidogénico (Payne y Valladares, 1980; Valladares y Payne, 1979; Ronco y col., 1988).

Los antecedentes acerca del proceso esteroidogénico en la célula de Leydig, y de su activación por LH/hCG y de otros agentes, resumidos en I y II, nos permiten analizar el fenómeno de la desensibilización, problema central de esta tesis.

La estimulación hormonal de células y tejidos da inicio a una serie de reacciones bioquímicas características que constituyen la respuesta celular específica a una hormona determinada. Un rasgo funcional en los sistemas de transducción de señales es la adapta-

ción de la célula blanco a la presencia continua de la señal extracelular, lo cual produce una serie de modificaciones de la funcionalidad de dicha célula. Un ejemplo de estos hechos lo constituye el proceso de desensibilización inducido por hormonas, que ha sido descrito para un gran número de hormonas (Tell y col., 1978) en diferentes tipos celulares.

El modelo experimental de desensibilización, ha sido frecuentemente utilizado para conocer los mecanismos de regulación de la funcionalidad de la célula de Leydig. Se ha encontrado que la elevación de los niveles de LH circulantes, ya sea fisiológicamente o por una dosis farmacológica de la hormona, produce una alteración en la respuesta de la célula de Leydig frente a un estímulo posterior de LH/hCG.

Hsueh y col., (1976) y Sharpe (1976) fueron los primeros en informar que el proceso de desensibilización iba acompañado de una disminución del número de receptores testiculares para LH (down-regulation) (Melner y Abney, 1980). Ellos describieron también que este fenómeno producía una disminución del cAMP, como consecuencia del desacoplamiento entre receptor-adenilato ciclasa (Ezra y Salomo, 1980), y de la producción de testosterona durante las primeras horas después del

tratamiento hormonal. La pérdida de la respuesta de testosterona después del tratamiento con hCG era inicialmente paralela a la pérdida de la respuesta de cAMP, reflejando que la pérdida de la actividad esteroidogénica era consecuencia de la acción reguladora del cAMP sobre la síntesis de testosterona (Catt y Dufau, 1978). Sin embargo, algunos autores encontraron que la desensibilización de la respuesta de cAMP no era la responsable de la ausencia de respuesta de T, ya que la desensibilización esteroidogénica no era revertida por la adición de análogos de cAMP in vitro (O'Shaughnessy y Payne, 1982; Chasalow y col., 1979).

La recuperación de la respuesta de testosterona ocurría cuando solo un pequeño porcentaje de los receptores y cAMP había reaparecido, indicando la presencia de receptores de "reserva" en relación a la esteroidogénesis (Sharpe, 1977; Zipf y col., 1978).

Esta estrecha relación entre contenido de receptores de LH y respuesta de cAMP durante la desensibilización inducida por hCG, indica que la mayoría de los sitios de unión funcionales en la célula de Leydig, están acoplados al sistema adenilato ciclasa (Browne y Bhalla, 1991).

En la rata madura, la desensibilización de la célula de Leydig no está solamente asociada con modificaciones de la membrana plasmática sino que también a cambios funcionales de la maquinaria sintetizadora de andrógenos. La desensibilización intracelular está asociada con varias lesiones específicas en la vía de la biosíntesis de T, que están relacionadas, aunque no sean su causa, con el grado de down-regulation de los receptores y con la desensibilización de la adenilato ciclasa inducida por LH/hCG (Cigorruga y col., 1978; Chasalow y col., 1979; Hsueh y col., 1977).

Se han identificado por lo menos dos defectos en la vía esteroidogénica que conducen a una disminución en la síntesis de T.

- 1) Lesión en las primeras etapas de la vía, es decir, antes de la producción de pregnenolona. Se piensa que este defecto sería consecuencia de un aumento de la proteína mitocondrial que inhibe la actividad de clivaje de la cadena lateral del colesterol (Hattori y col., 1984). Esta lesión, se produce al tratar con grandes dosis de hCG, y va acompañada de una importante pérdida del número de receptores (70%), lo que conduce a una disminución de la producción de pregnenolona y testosterona.

2) Lesión de las enzimas microsomales, cuyo resultado es una disminución de las actividades de enzimas microsomales 17 α -hidroxilasa y C_{17-20} liasa, y la producción con dosis menores de LH/hCG, de una pérdida de aproximadamente un 50% de los receptores de LH (Dufau y Catt, 1978; Nozu y col., 1981b; Nozu y col., 1981c). El grupo de Dufau (Nozu y col., 1981a; 1981b; Cigorraga y col., 1978) ha propuesto que esta lesión sería una acción regulatoria negativa del estradiol como consecuencia de la activación de la aromatasa por LH/hCG (Aquilano y Dufau, 1983). Esta regulación estaría mediada por el receptor de estradiol ya que en presencia de LH se encontró un aumento de los receptores nucleares para E_2 (Nozu y col., 1981b). Esta hipótesis está apoyada por resultados que indican que las células de Leydig fetales y neonatales no se desensibilizan, lo que coincide con una ausencia de receptor de estrógenos a esa edad (Huhtaniemi y col., 1984; Warren y col., 1982; Keel y Abney, 1985).

Estos antecedentes están indicando que el proceso esteroideogénico se encuentra totalmente alterado en la célula de Leydig desensibilizada. Sin embargo, no se conoce en estos momentos si existen otras respuestas mediadas por LH/hCG que se vean alteradas durante la desensibilización.

Las respuestas de LH/hCG se han clasificado en tempranas y tardías según la relación temporal de ellas con la interacción hormona - receptor. En este trabajo se analiza una respuesta temprana y otra tardía que son inducidas por LH/hCG, y se estudia su modificación durante la desensibilización de la célula de Leydig. Consideramos como una respuesta temprana, la metilación de fosfolípidos en la membrana plasmática y como respuesta tardía la síntesis de RNA.

Reacciones de Metilación de Fosfolípidos.

La mayoría de las funciones de la membrana plasmática están relacionadas con la composición y organización de las proteínas y lípidos que la constituyen. En algunos casos, como se ha observado en células de Leydig, el contenido fosfolipídico puede modificarse por la acción hormonal (Lowitt y col., 1982). En las células de Leydig, el principal componente fosfolipídico es la fosfatidilcolina, la cual puede ser sintetizada por vía de las transmetilaciones y por vía de la CDP-colina (Mato y Alemany, 1983; Pritchard y Vance, 1981). Esta última es la principal ruta metabólica para la síntesis de fosfatidilcolina (FC), sin embargo, actualmente existen eviden-

cias que indican que varias hormonas están regulando la síntesis de la fosfatidilcolina a través de reacciones de metilación (Sariba-Sohraby y col., 1984; Milvae y col., 1983; Kelly y col., 1985; Hirata y Axelrod, 1980; Merida y Mato, 1987; Llanos y Meizel, 1983).

Se ha observado que la unión de algunas hormonas y otros efectores proteicos a su receptor específico, produce la activación de la N- metilación de FL lo que ha llevado a proponer que la metilación de FL tiene una función regulatoria en la transmisión de la señal hormonal dentro de la membrana (Hirata y col., 1979; Mato y Alemany, 1983; Nieto y Catt, 1983).

En estas reacciones de metilación, participa la enzima fosfolípidometiltransferasa (FMT) que se encuentra ubicada tanto en la membrana plasmática como en la membrana microsomal. La enzima cataliza la transformación de fosfatidiletanolamina (FE) a fosfatidilcolina (FC) (Fig 4 y 5), a través de sucesivas metilaciones que utilizan S-Adenosilmetionina (SAM) como agente dador de grupos metilo (Vance y Ridgway, 1988). El posible rol de la metilación de FL en la transducción de la señal biológica ha interesado a varios grupos de investigación en los últimos años (Hirata y Axelrod, 1980; Mato y Alemany, 1983; Nieto y Catt, 1983; Llanos y col., 1985), que han

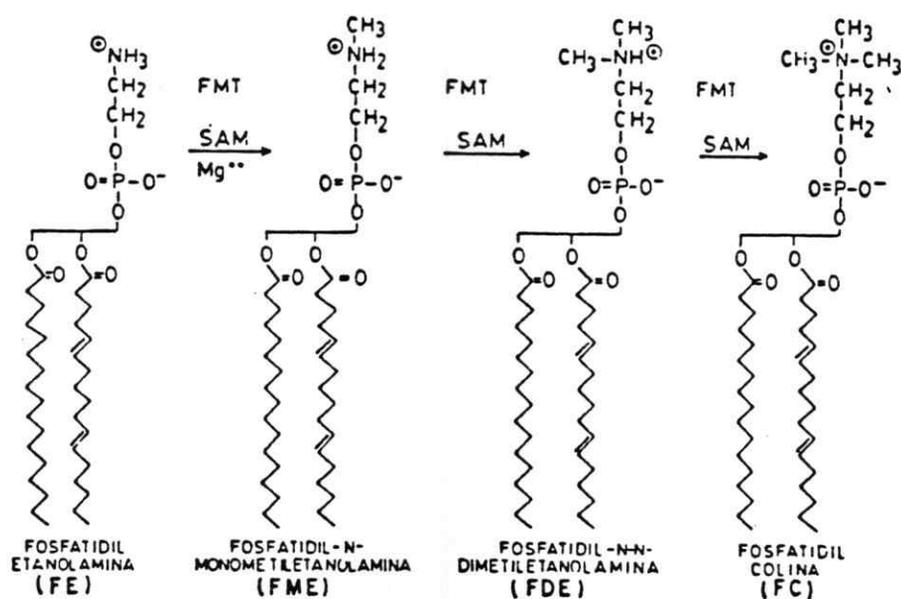


FIG. 4 CONVERSION ENZIMATICA DE FOSFATIDILETANOLAMINA A FOSFATIDILCOLINA.

FE: Fosfatidiletanolamina; FME: Fosfatidilmonometiletanolamina; FDE: Fosfatidildimetiletanolamina; FC: Fosfatidilcolina; SAM: S-adenosilmetionina; FMT:enzima fosfolípidometiltransferasa.

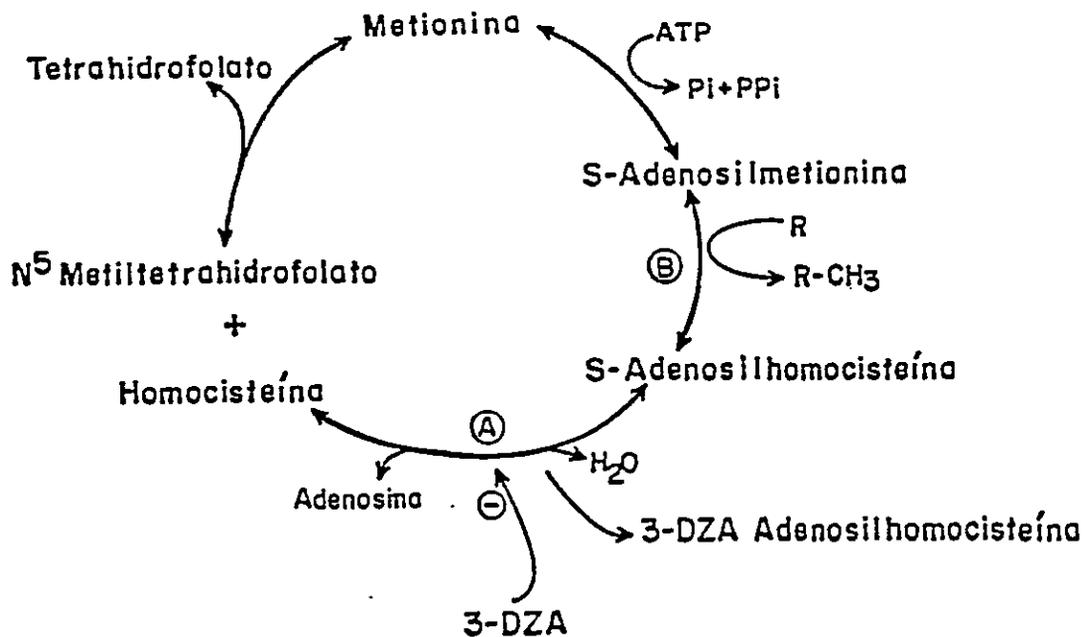


FIG. 5 CICLO DE LA METIONINA Y MECANISMO DE CONVERSION INTRACELULAR A S-ADENOSILMETIONINA (SAM). MECANISMO DE ACCION DE 3-DZA, INHIBIDOR DE LAS REACCIONES DE METILACION DE FOSFOLIPIDOS (FL).

A: Enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa; B: Enzima Fosfolípido - metiltransferasa (FMT); (-): Efecto inhibitorio de 3-DZA sobre la actividad de la enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa.

utilizado distintos modelos experimentales para su estudio. Dentro de estos grupos, se destacaron Hirata y Axelrod (1980), quienes postularon que la activación de las enzimas FMT producía un aumento en la fluidez de la membrana plasmática lo que tendría importancia en los distintos procesos asociados a ella como son: exposición de receptores, acoplamiento entre las subunidades del sistema adenilato ciclasa, la regulación del transporte activo de moléculas y la secreción por exocitosis. Ellos propusieron la existencia de 2 enzimas FMT con diferente distribución en la membrana plasmática. Sin embargo, recientemente, se logró purificar la enzima, a partir de microsomas hepáticos, y se encontró que las tres actividades metilantes estaban en una sola proteína de 18 KD (Vance y Ridgway, 1988).

La aplicación de estos procesos de membrana al mecanismo de acción hormonal plantea que la formación del complejo hormona- receptor activaría las enzimas FMT por un mecanismo no aclarado aún, lo que facilitaría la transmisión de la señal hormonal. Se ha descrito que agonistas β - adrenérgicos producen un aumento de la metilación de FL en reticulocitos (Hirata y col., 1979) y en células de astrocitomas (Mac- kenzie y Brophy, 1984) mientras que glucagón (Castaño y col., 1980) y la isoprenalina (Marin-Cao y col. 1983) producen el mismo efecto

en hepatocitos y la TSH en células tiroideas (Prasad y Edwards, 1984). Este fenómeno se ha asociado a la activación de la adenilato ciclasa y a la posterior respuesta celular. Sin embargo, en procesos no ligados a la acción hormonal, también se ha postulado que las reacciones de metilación de FL estarían involucradas; en la liberación de histamina en mastocitos (Izhizaka y col., 1980; Siraganian, 1983) y en células basofílicas de ratas leucémicas estimuladas con Ig E (Crews y col., 1980; Crews y col., 1981). En espermios de mamífero se ha encontrado una relación directa entre capacitación espermática, metilación de FL, entrada de Ca^{+2} y actividad fosfolipásica (Llanos y Meizel, 1983).

Concretamente en células de Leydig, también se ha estudiado la posible participación de las reacciones de metilación de FL en la transmisión de la señal hormonal de LH. Nosotros hemos planteado la hipótesis que las reacciones de metilación de FL estarían implicadas en la acción de la LH/hCG. Esta conclusión se basa en experimentos utilizando inhibidores de las reacciones de metilación como 3-DZA y HTL, donde encontramos una inhibición de la síntesis de T in vitro (Llanos y col., 1985). Resultados similares fueron obtenidos previamente por Nieto y Catt (1983), quienes encontraron una elevada

actividad enzimática FMT en células de Leydig, la que era estimulada por hCG, toxina del cólera (TC) ó 8 Br-cAMP, concluyendo que en la activación de la enzima estaría implicado un mecanismo mediado por cAMP.

Síntesis de RNA

Entre las respuestas de la célula de Leydig a un estímulo de LH/hCG se ha considerado tradicionalmente que la síntesis de RNA y proteínas constituyen eventos tardíos, ya que se producen como consecuencia de tratamientos crónicos con la hormona. Nosotros estudiamos la síntesis de RNA en las células de Leydig desensibilizadas, dando a conocer previamente algunos antecedentes de esta respuesta tardía.

La acción trófica de LH/hCG sobre la célula de Leydig involucra una acción a nivel genómico; la estimulación de la esteroidogénesis testicular requiere de la síntesis sostenida de RNA y proteínas (Mendelson y col., 1975; Cooke y col., 1975; Cooke y col., 1979). Se han obtenido evidencias indirectas del efecto de la LH sobre la síntesis de RNA través del uso de inhibidores de la síntesis de RNA. Mendelson y col., (1975) han demostrado

que cicloheximida y puromicina son capaces de inhibir la respuesta esteroidogénica estimulada por hCG y que la actinomicina D o la cordicepina reducen notoriamente esta respuesta esteroidogénica. Estos efectos eran similares cuando se estimulaba la síntesis de T con el mediador intracelular de LH: cAMP. Sin embargo, estos compuestos no inhibían la formación de cAMP producida durante la estimulación hormonal. Se ha demostrado que LH/hCG in vivo aumenta la incorporación de ^3H -uridina a RNA en células intersticiales de ratas inmaduras (Reddy y Vिलlee, 1975). Estas observaciones fueron corroboradas por nosotros (Valladares y Ronco, 1984) donde demostramos una acción directa de LH sobre la síntesis de RNA en células de Leydig de ratas inmaduras. Estos efectos eran dependientes de la dosis de hCG utilizada e imitados por cAMP, sugiriendo que la estimulación de la síntesis de RNA era un proceso mediado por el sistema adenilato ciclasa.

Este efecto estimulatorio de LH/hCG sobre la síntesis de RNA sólo fue detectado en ratas inmaduras (20-30 días de edad), y afectó preferentemente a los RNA poliadenilados (Valladares y col., 1986). No se encontró acción de otras hormonas o reguladoras de la función esteroidogénica como LHRH, argininasopresina (AVP) y FSH, demostrando que el efecto de LH/hCG sobre la síntesis de RNA en ratas inmaduras era específico.

Con estos antecedentes, el trabajo que se presenta en esta tesis, se basa en la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis

La célula de Leydig responde frente a la acción de LH/hCG de una manera muy amplia, originando respuestas que temporalmente, en relación a la interacción hormona-receptor, se podrían clasificar en tempranas y tardías. Habitualmente, cuando se analiza la función de la célula de Leydig frente a la acción de LH/hCG, se considera una sola respuesta: la síntesis de esteroides. En esta perspectiva, cuando la célula de Leydig se ve enfrentada a un estímulo hormonal permanente se adapta, modificando las respuestas esteroidogénicas que han sido estimuladas. Un ejemplo de esto lo constituye el proceso de desensibilización, durante el cual la presencia constante de la hormona produce una alteración en la maquinaria biosintética de esteroides de modo que un estímulo subsecuente conduce a una respuesta disminuída.

Por los antecedentes expuestos, se esperaría encontrar, que estímulos hormonales permanentes, vale

decir que lleven a la desensibilización, modifiquen varias de las respuestas celulares que resultan de la acción de LH/hCG .

Objetivos Generales

El objetivo general de este trabajo es analizar si el patrón de respuestas tempranas y tardías de la célula de Leydig se ve modificado como consecuencia del proceso de desensibilización.

Objetivos Específicos

La síntesis de RNA ha sido caracterizada como una respuesta tardía de la célula de Leydig a la interacción hormona-receptor y las reacciones de metilación de fosfolípidos constituirían una respuesta temprana a la acción hormonal en otros sistemas celulares; sin embargo, no está demostrado que la metilación de fosfolípidos en la célula de Leydig constituye una respuesta temprana de la acción hormonal. Por lo tanto, para lograr

nuestro objetivo general es necesario estudiar los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar La metilación de fosfolípidos en la célula de Leydig de rata, y establecer la relación temporal en la interacción LH/hCG-receptor. Este objetivo comprende especificar los siguientes puntos:

1.1. la participación de las reacciones de metilación de fosfolípidos en la elaboración de la respuesta esteroideogénica de la célula de Leydig.

1.2. el efecto de LH y hCG en la conversión de fosfatidiletanolamina (FE) a fosfatidilcolina (FC);

1.3. el mecanismo de la metilación de fosfolípidos por la interacción hormona-receptor;

1.4. si la metilación de fosfolípidos es un mecanismo general de transducción de la señal hormonal;

1.5. si la fosfolípidometiltransferasa es activada por LH/hCG;

1.6. si la actividad FMT se modifica en presencia de mediadores intracelulares.

2. Analizar si el patrón temporal definido en 1.- se modifica por el proceso de desensibilización:

3. Analizar si la síntesis de RNA se encuentra modificada en la célula de Leydig desensibilizada.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

En todos los experimentos se usaron ratas macho adultas de 60 a 70 días (200-250 g) de la cepa Wistar, obtenidas del vivero del INTA. Los animales se mantuvieron en un ciclo luz/obscuridad de 12/12 horas, alimentadas ad libitum.

Los animales desensibilizados fueron obtenidos mediante la inyección subcutánea de una dosis única elevada de hCG (100 UI). Las ratas se sacrificaron a diferentes tiempos después de la inyección (1,3,6 y 12 días).

2. Reactivos.

Hormonas: Gonadotrofina coriónica humana (hCG) (AE.3000 UI/mg) de Sigma, y hCG (AE.11900 UI/mg) de NIH. Hormona luteinizante (LH) de ovino (oLH, NIADDK-o-LH-26) (AE.2.3 UI/mg) donado por NIADDK; β hCG (AE.29 UI/mg) (Batch CR

125) y ahCG (sin AE. conocida; proviene de una mezcla de diferentes lotes) (CR mix) donado por NIH. La hCG reconstituída (híbrido de hCG- NIH) fue preparada por una recombinación de ahCG y β hCG (Canfield's ahCG-CR-123 y β hCG-CR-123) y su actividad biológica es de 6700 UI/mg, donado por NIH. La hCG reconstituída en el laboratorio (híbrido de hCG) fue preparada mezclando volúmenes iguales de ahCG y β hCG (0.5 UI/ml de β hCG) e incubadas por 2 h a 37°C (híbrido I) o bien por 18 h a 25 °C (híbrido II). Progesterona, testosterona (T), dietilestilbestrol (DES), estradiol (E₂), pregnenolona, LHRH y argininavasopresina (AVP), fueron suministrados por Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. La toxina del cólera (TC, potencia tóxica 19.7 Lb/ μ g de proteína) y forskolin fueron adquiridos en Calbiochem.

Radioisótopos: 5-³H uridina (4.4 Ci/mmol), L-metil-³Hmetionina (15 Ci/mmol) y S-adenosil-L-(metil-³H)metionina (15 Ci/mmol) fueron adquiridos en Amersham International. ¹²⁵I-hCG (58 μ Ci/ μ g) fue adquirido en New England Nuclear Corp. (NEN) Boston, USA.

Medios de Cultivo: Medio 199 y medio esencial mínimo (MEM) fueron obtenidos en Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

Colagenasa fue obtenida en Worthington Biochemicals Co., Metrizamida es de Nyegaard Co., Oslo, Suecia y Percoll de Sigma Chemical Co.

El kit del radioinmunoensayo para testosterona (RIA) fue suministrado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Boletín técnico WHO S.P., 1980).

Todos los demás reactivos son de grado analítico.

3. Obtención de las células del tejido intersticial.

Las células intersticiales se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Dufau y col. (1974). Se extrajeron los testículos, los cuales fueron decapsulados y colocados en un tubo de polipropileno graduado y con tapa rosca, el cual contenía 10 ml de medio de cultivo M-199 (conteniendo 25 mM de NaHCO_3 y 0.1% BSA y un pH final de 7.3). A este tubo, se le agregó colagenasa previamente disuelta, en una concentración de 0.25 mg /ml.

Posteriormente, los tubos se incubaron en posición horizontal y bien sellados, en un baño termoregulado, con una agitación constante de 100 ciclos/minuto durante 15 min. Con este tratamiento, los túbulos seminí-

feros se separaron por sedimentación de las células intersticiales, las que quedan en suspensión en el medio. Estas células se diluyeron con medio y se dejaron en reposo durante 5 min para la sedimentación de los túbulos seminíferos. Posteriormente, las células intersticiales se extrajeron con una jeringa a la que se le adicionó un pequeño tubo plástico. Estas células fueron filtradas para impedir el paso de espermatozoides y de restos celulares. Posteriormente, se centrifugaron por 10 min a 600 x g. Las células se lavaron 2 veces con 10 ml de medio para extraer el exceso de colagenasa. Finalmente, las células intersticiales se resuspendieron en un volumen apropiado de medio de cultivo. La concentración final de células se determinó en un hemocitómetro.

4. Purificación de las Células de Leydig

a) Purificación en Gradiente continua de Metrizamida.

Las células de Leydig provenientes de una suspensión de células intersticiales obtenidas con colagenasa, se purificaron en una gradiente continua de Metrizamida, preparada en medio M-199 (25 mM de NaHCO_3 pH 7.3 y BSA al 0.1%) (Cann y col.,1977). La gradiente se

preparó con volúmenes iguales de soluciones entre 0% y 40% de metrizamida (40,30,20,10 y 0%) con la solución más concentrada al fondo del tubo, en un volumen final de 40 ml. La gradiente así preparada, fue equilibrada durante 18 h a 4°C, protegida de la luz, y posteriormente se centrifugó a 3000 x g durante 30 min. En seguida, una suspensión de aproximadamente 2×10^8 células intersticiales fue colocada en el extremo superior del tubo, para luego centrifugarlo a 3000 x g durante 5 min. Después de la centrifugación, se extrajeron, con pipeta automática, fracciones de 1 ml desde el extremo superior del tubo. Las fracciones 20 a la 25 contenían $65 \pm 5\%$ de células de Leydig, según tinción histoquímica positiva para la enzima 3 β -hidroxiesteroidedeshidrogenasa: 3 β HED (Payne y col., 1980). Estas fracciones fueron diluídas con 3 volúmenes de medio de incubación MEM (libre de uridina) (25 mM de NaHCO₃, 16 mM Hepes pH 7.3 y 0.1 % BSA) y posteriormente centrifugadas a 600 x g durante 10 min. Las células sedimentadas fueron resuspendidas en un volumen adecuado de medio M-199 para su posterior incubación.

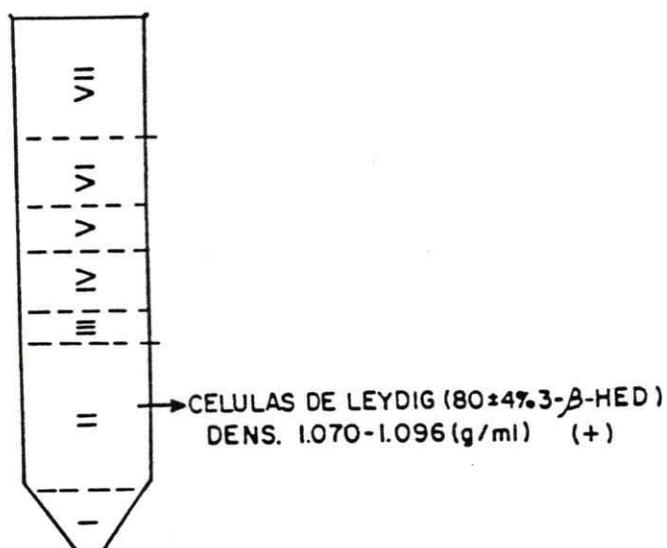
b) Purificación en gradiente continua de Percoll.

Se preparó una solución de Percoll al 10% y otra al 80% en buffer A (conteniendo 10 mM Hepes pH 7.4, 5 mM

glucosa, 145 mM NaCl, 5 mM KCl y 1 mM CaCl₂). Las soluciones al 10 y 80% de Percoll (13 ml de cada una) se colocaron en cada uno de los vasos comunicantes de una cámara para formar gradientes. Se ajustó el volumen de salida de la solución a una velocidad constante (0.8 ml/min) quedando la solución más concentrada en el fondo del tubo (Hedger y Eddy, 1986).

Una vez finalizada la gradiente de 26 ml, aproximadamente 2×10^8 células intersticiales fueron colocadas en un volumen de 2.5 ml. La gradiente fue centrifugada por 30 min a 800 x g y, posteriormente, se extrajeron fracciones de 1 ml con una pipeta automática. Las células se ubicaron de acuerdo a su densidad, en diferentes posiciones dentro de la gradiente. Las células de Leydig se reconocieron por la actividad 3- β HED en las fracciones 21 a 27 (densidad 1.070 a 1.096). Estas fracciones fueron diluídas con 5 volúmenes de medio de incubación y centrifugadas a 600 x g por 20 min. La operación se repitió 2 veces. En la Fig. 6 se muestra un esquema de la gradiente de Percoll y la localización de las células de Leydig dentro de ella.

FIG. 6



c) Tinción histoquímica específica para células de Leydig.

La proporción de células de Leydig presente en la suspensión de células intersticiales dispersas con colagenasa, o en fracciones más altamente purificadas, fue determinada mediante una tinción histoquímica para la enzima Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- β HED), que participa en la conversión de pregnenolona a progesterona (Steinberger y col. 1966). Para ello, alícuotas de la preparación celular fueron fijadas a temperatura ambiente, después de haber sido distribuídas homogéneamente sobre la superficie de un cubreobjeto. Las células fueron incubadas con solución de tinción durante 90 min a temperatura ambiente. La solución de tinción contiene buffer PBS

(0.14 M NaCl; 5 mM KCl; 0.4 mM Na₂HPO₄; 4 mM KH₂PO₄ pH 7.4), 1.5 mM de NAD (β -Nicotín amida adenina dinucleótido), 0.25 mM NBT (azul de nitrotetrazolidina) y como sustrato exógeno para la enzima 0.2 mM de etiocolano-lona (5 β -Androstan- β -17ona)]. Al término de la incubación, la preparación se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. La presencia de depósitos de formazan azul en las células de Leydig fue observada a través de un microscopio de luz.

d) Determinación del número de células y viabilidad celular.

El recuento de células nucleadas se realizó en un hemocitómetro de Neubauer y la viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión con azul tripano (Sharpe y Cooper, 1982a) o bien por exclusión de nucleótidos de piridina (Aldred y Cooke, 1983).

5. Determinación de la producción de testosterona

La determinación de T se realizó en las células intersticiales obtenidas por tratamiento con colagenasa y se realizó de la siguiente manera:

Aproximadamente 1.5 a 2.5×10^6 de células intersticiales en medio M-199 (volumen final 1 ml) fueron incubadas en un baño termorregulado, en una atmósfera de CO_2/O_2 (5%-95%) con una agitación constante de 50 ciclos por minuto y a una temperatura de 34°C . Después de 3 h, los tubos fueron calentados a baño de maría durante 5 min para detener la reacción. Posteriormente, los tubos se enfriaron en hielo por 20 min y se centrifugaron a $600 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se guardó a -20°C hasta el momento de ser analizado mediante la técnica de RIA.

En los distintos experimentos se estimuló la producción de T con LH, hCG, hCG reconstituída o como está indicado en cada experimento.

6. Determinación de la concentración de receptores de LH/hCG.

Células provenientes del tratamiento con colagenasa en una concentración aproximada de $5 \times 10^5/\text{ml}$ en medio M-199, fueron incubadas en presencia de 0.1-0.8 ng de ^{125}I -hCG (AE.58 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) por 90 min a 34°C con agitación constante. Después de este período, se agregó

1.5 ml de M-199 - 0.1 % BSA y se centrifugó a 16000 rpm por 10 min. Los precipitados fueron lavados 2 veces y contados en un espectrómetro de radiación gama. La unión no específica se determinó en incubaciones paralelas que contenían 500 veces de exceso de hCG no marcada. Los resultados se expresaron como cantidad de hormona radioactiva incorporada por un millón de células de Leydig (ng de ^{125}I -hCG / 10^6 células).

En la Tabla I se señalan los porcentajes de células de Leydig obtenidas (tinción positiva para la enzima 3 β -hidroxiesteroidesdeshidrogenasa 3- β HED), producción de Testosterona (T) basal y estimulada por hCG (1 UI, AE. 3000 UI/mg) y número de sitios de unión para LH (unión a ^{125}I -hCG), en células intersticiales provenientes del tratamiento con colagenasa, y células de Leydig purificadas en gradiente de Metrizamida y Percoll.

TABLA I

| Células | Tinción | Síntesis de T | | Unión ^{125}I -hCG |
|--|-----------------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| | 3β -HED(+) % total | ng/ 10^6 Celulas/ Control | 3 h hCG(1 U.I) | ng/ 10^6 Celulas |
| Células Intersticiales | 28 \pm 3 | 0.45 \pm 0.04 | 1.74 \pm 0.15 | 1.1 \pm 0.05 |
| Células Purificadas por Gradiente de Metrizamida 0-40% | 65 \pm 5 | 0.85 \pm 0.1 | 4.12 \pm 0.31 | 2.6 \pm 0.1 |
| Células purificadas por gradiente de Percoll 10-80% | 80 \pm 4 | 1.5 \pm 0.2 | 9.0 \pm 0.42 | 4.91 \pm 0.04 |

a) Determinación del número de receptores libres y ocupados por la hormona.

Este método fue descrito para disociar a la LH de su receptor sin alterar su capacidad de unión ni su afinidad (Chen y Payne, 1977). Las ratas se sacrificaron por decapitación, se removieron los testículos, se decapsularon, y se cortaron en mitades; una mitad se homogenizó con 1 ó 2 ml de MgCl_2 4 M y la otra mitad se homogenizó con 1 ó 2 ml de buffer A (0.25 M sacarosa; 10 mM Hepes pH

7.4; 0.1% BSA y 5 mM de CaCl_2). En seguida, ambas muestras se diluyeron con 15 volúmenes de buffer A. Los homogenizados fueron centrifugados a 20000 x g por 30 min. Los precipitados fueron lavados con 6 ml de buffer y nuevamente centrifugados a 20000 x g por 30 min. Estos precipitados se resuspendieron en buffer fosfato (PBS) y se tomaron alícuotas, las que se utilizaron para medir la concentración del receptor de LH.

La cantidad de ^{125}I -hCG unida proveniente de los testículos tratados con buffer (controles), representa los sitios de unión disponibles en la célula. La cantidad de ^{125}I -hCG unida proveniente de los testículos tratados con MgCl_2 representa el total de receptores celulares. La diferencia en la cantidad de ^{125}I -hCG unida entre los testículos tratados con MgCl_2 y los tratados con buffer (controles) representa el número de sitios ocupados por la hormona intratesticular (Katikineni y col., 1980).

7. Síntesis de RNA

a) Condiciones de incubación.

La síntesis de RNA fue medida utilizando las células de Leydig purificadas obtenidas de la gradiente de

Metrizamida, preincubándolas en un baño con agitación por 1 h a 34° C bajo una atmósfera de O₂-CO₂ (95%-5%).

Para determinar la síntesis de RNA es necesario preincubar las células de Leydig por un período de 1 h, antes de agregar el precursor radioactivo y los agonistas respectivos. Después de este período, se agregaron 5 µCi de ³H- uridina (AE. 4.4 Ci/mmol) y los agonistas apropiados (volumen final de incubación de 1 ml) y se incubaron por 3h. Al final de las 3 h de incubación, se agregó 1 ml de una solución de 0,5 mM de uridina no marcada en NaCl 0.9% para detener la reacción. Posteriormente, la solución fue transferida a tubos de vidrio.

b) Determinación de la concentración de RNA.

La incorporación de ³H- uridina a RNA fue medida en las células colectadas por centrifugación a 600 x g por 10 min por el método de Grootegoed y col. (1977).

Las células fueron lavadas 2 veces con 2 ml de NaCl 0.9% con 0.5 mM de uridina; se congelaron y descongelaron para lograr el total rompimiento de la membrana plasmática. A cada muestra descongelada se le agregó 0.5 ml de una solución inespecífica de RNA no marcado (1

mg/ml) para facilitar la precipitación, y las macromoléculas se precipitaron con 1 ml de HClO_4 1.2 N a 0°C . El precipitado se rescató por centrifugación y se lavó 2 veces con HClO_4 0.2 N, y luego con etanol al 96%.

El RNA contenido en este precipitado, se hidrolizó a nucleótidos libres con NaOH 1 N a 37°C por 60 min. Las proteínas y el DNA se descartaron con una segunda precipitación con HClO_4 3 N a 0°C . Después de centrifugar a $800 \times g$ por 10 min, 0.2 ml del sobrenadante que contenía el RNA, se colocó en un vial de conteo al que se le agregaron 10 ml de líquido de centelleo con tritón (1 lt de tolueno, 6 gr PPO, 0.25 gr POPOP y 500 ml de Tritón), para determinar la radioactividad presente en el material soluble en ácido después de precipitar el DNA y las proteínas. La radioactividad presente en la fracción inicialmente insoluble en ácido representa la concentración de ^3H -uridina incorporada a RNA, y los resultados se expresaron como pmoles de ^3H -uridina por 10^6 células de Leydig.

c) Determinación de la entrada de ^3H -uridina a la célula.

El sobrenadante de la primera precipitación con HClO_4 y la solución de los lavados fue acumulada para

la medición de la cantidad de radioactividad soluble en HClO_4 dentro de las células. Una alícuota de 1 ml de esta solución acuosa fue agregada en un vial de conteo con 10 ml de líquido de centelleo (Aquasol), y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido (Beckman). La radioactividad incorporada a la fracción soluble se expresó en $\text{pmol}/10^6$ células de Leydig. La radioactividad total intracelular, indica la entrada de uridina a la célula, y está determinada por la radioactividad incorporada a la fracción soluble y la radioactividad incorporada a RNA.

Los resultados se expresaron en $\text{pmoles}/10^6$ células de Leydig (Grootegoed y col., 1977).

d) Extracción de los RNAs sintetizados.

Para la extracción de los RNAs sintetizados, se juntaron sedimentos celulares provenientes de cuatro incubaciones y se resuspendieron en 0.5 ml de buffer NETS (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris pH 7.4, 10 mM de EDTA y 0.2% SDS). En seguida se agregaron 0.5 ml de solución fenólica (preparado en una botella oscura y consistente en 50 ml de fenol, 50 ml de cloroformo y 250 ml de buffer

NETS). Se separó la fase acuosa mediante una centrifugación a 5000 rpm por 5 min. A la fase fenólica con la interfase se le agregaron 0.5 ml de buffer NETS. Esta operación se repitió tres veces. La fase acuosa total se mezcló con un volumen igual de cloroformo (1.5 ml de cada una). La fase acuosa total extraída, se trató con 50 µl de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 1 M y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto (a -20°C). Se dejó precipitando toda la noche a -20°C , para luego separar el precipitado por centrifugación a 15000 rpm por 30 min. La suspensión se lavó con etanol, se secó con aire y se resuspendió nuevamente en acetato de amonio con tres volúmenes de etanol absoluto para dejar precipitando toda la noche a -20°C . El precipitado se recogió por centrifugación a 15000 rpm por 30 min y representa los RNAs totales extraídos.

e) Separación de los RNA m poliadenilados.

Los RNA m con poli A fueron separados de los RNA ribosomales por cromatografía de afinidad. El precipitado proveniente de la extracción descrita en la sección d), se secó con aire, se resuspendió en 0.5 ml de buffer NETS (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris pH 7.4, 10 mM de EDTA

y 0.2% SDS) , se midió la densidad óptica (a 260 nm y 280 nm) en un espectrofotómetro Beckman D.U. y se contó la radioactividad de una alícuota de la solución.

El RNA poliadenilado se separó del RNA no poliadenilado por cromatografía de afinidad usando columna de Poli(U)-Sepharosa (Adesnik y Darnell, 1972). Las muestras se aplicaron a las columnas a temperatura ambiente contenidas en un volumen de 0.3 ml de buffer NETS; la fracción no unida se obtuvo lavando la columna con 10 ml de buffer NETS. El material unido fue eluído pasando 10 ml de buffer de elución (consistente en 90% formamida, 10 mM de EDTA, 10 mM de Tris pH 7.4 y 0.2% SDS) a través de la columna. El RNA se recuperó del lavado y eluídos por precipitación con etanol.

8. Metilación de Fosfolípidos

La metilación de FL, se determinó midiendo la incorporación de ^3H -metionina a la fracción liposoluble de una suspensión de células de Leydig purificadas, de acuerdo al método descrito por Llanos y Meizel (1983).

a) Perfusión Testicular.

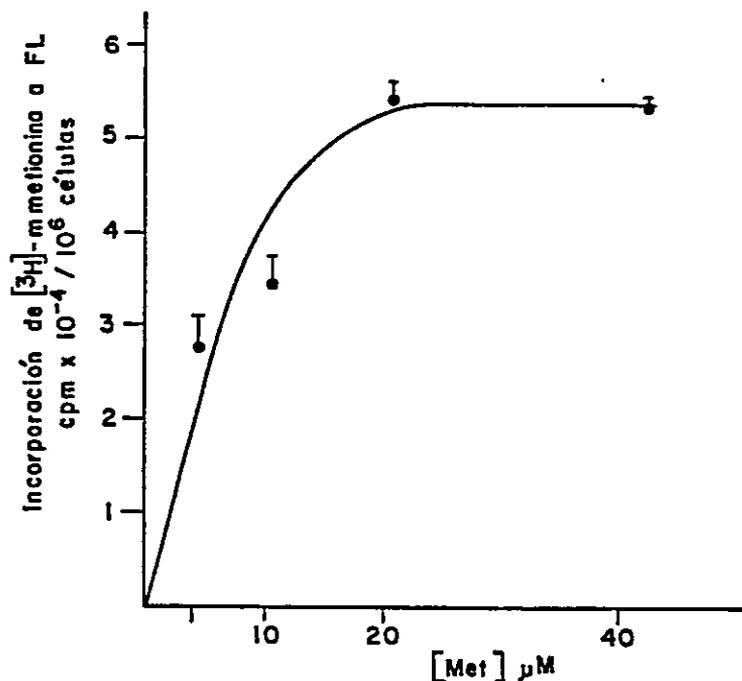
Para el ensayo de la metilación de FL, se perfundieron los testículos con una solución de PBS para extraer la totalidad de los glóbulos rojos. Los animales fueron anestesiados con éter, enseguida se inyectó 0.1 ml de una solución de heparina al 20% en PBS en el bazo para evitar la coagulación sanguínea. Los testículos se decapsularon y se perfundieron por la vena espermática, con 10 ml de una solución de PBS hasta lograr una eliminación casi total de los glóbulos rojos testiculares. Luego los testículos se colocaron en un tubo de 10 ml con medio de incubación para su posterior tratamiento con colagenasa.

b) Determinación de la concentración de metionina.

En una primera aproximación al estudio de las reacciones de metilación de FL, se quiso conocer cual era la concentración de metionina adecuada para los estudios in vitro y la relación metionina no marcada:metionina radioactiva. Las células de Leydig purificadas se incubaron por 60 min en presencia de distintas concentraciones de metionina radioactiva: 2 μ Ci, 5 μ Ci, 10 μ Ci y 20 μ Ci, con concentraciones finales de metionina de 4.26 μ M, 10.66 μ M,

21.30 μ M y 42.60 μ M respectivamente (A.E. de la 3 H-metionina comercial: 15 Ci/mmol). Los resultados están indicados en Fig. 7 y representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

FIG. 7



La actividad específica de la metionina utilizada fue de 0.94 μ Ci/nmol y fue constante en cada punto experimental. En los experimentos siguientes se utilizaron 10 μ Ci de metionina con una concentración final de 21.30 μ M.

c) Condiciones de Incubación.

Aproximadamente, 0.5 a 1×10^6 células de Leydig, fueron preincubadas por 10 min con 10 μCi de ^3H -metionina ($21.3 \mu\text{M}$) en un volumen final de 500 μl de buffer Tyrode's con 0.1% BSA (116.1 mM NaCl ; 10 mM KCl ; $0.3 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$; 24.9 mM NaHCO_3 ; 100 mg\% glucosa; 0.125 mM piruvato; 6.25 mM lactato ajustado a pH 7.2 con CO_2). Este período de preincubación es necesario para la conversión intracelular de metionina a S-adenosilmetionina (SAM), sustrato dador de grupos metilo. Luego, las células fueron incubadas por 30 min en presencia de los agonistas correspondientes. Una vez finalizada la incubación, los tubos fueron colocados en hielo y se les agregó a cada uno de ellos 500 μl de una solución A (conteniendo PBS, 4.5 g/% de sacarosa, $1 \times 10^{-4} \text{ mM}$ bromuro de parafenacilo (p-BR-Br, descrito como un inhibidor de las fosfolipasas A_2 y C (Thakkar y col., 1984; Volwerk y col., 1974); $100 \mu\text{M}$ 3-DZA y $250 \mu\text{M}$ homocisteína tiolactona (HTL). Posteriormente, las células fueron centrifugadas a $1000 \times g$ durante 10 min y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de una solución $0.5 \times A$ para luego ser centrifugada nuevamente a $1000 \times g$ durante 10 min. El sedimento se congeló a -20°C hasta el momento de ser analizado.

d) Determinación de los niveles de metilación en los lípidos totales de las membranas celulares.

El sedimento congelado se dejó a temperatura ambiente y se le agregó 0.3 ml de agua destilada, trasvasándose a tubos de vidrio con tapa rosca. Esta operación se repitió con igual volumen de agua para lavar el sedimento celular. El tubo se agitó en vortex para obtener una ruptura celular total, la que se controló por observación microscópica. Inmediatamente se procedió a la extracción de la fracción liposoluble, agregando una mezcla de 3 ml de cloroformo: metanol: HCl 2 N (12: 6 : 1 v/v) y agitando la solución dos veces en un vortex durante 30 segundos. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 800 x g por 5 min para separar la fase acuosa de la fase orgánica. La fase acuosa fue descartada y la fase orgánica fue lavada 3 veces por 30 seg cada vez, con 2 ml de una solución que contenía 0.5 M de KCl en metanol al 50 %. En cada caso, la agitación fue seguida de una centrifugación a 800 x g por 2 min descartándose la fase acuosa.

Una vez completo el procedimiento de extracción y lavado, la fase orgánica fue colocada en un frasco de vidrio de conteo y dejado a temperatura ambiente hasta su total evaporación. Luego, se agregaron 10 ml de líquido de centelleo (conteniendo 1 lt de tolueno, 4

grs PPO y 0.15 grs de POPOP) y se contó la radioactividad presente en un contador de centelleo líquido Beckman. Los resultados de la metilación de FL se expresaron como pmoles de grupos metilo radioactivos incorporados por 10^6 células de Leydig.

e) Determinación de la entrada de metionina radioactiva a la célula.

Para determinar si la disminución en la metilación de FL se debía a una disminución en la actividad de la enzima FMT o a una reducción en la entrada de metionina a la célula, se determinó la radioactividad presente en la fracción acuosa. Esto se hizo tomando una alícuota del sobrenadante acuoso de la extracción lipídica, evaporándolo a sequedad y determinando su radioactividad con líquido de centelleo (Tolueno, PPO y POPOP). Para determinar la entrada del aminoácido a la célula, se consideró la radioactividad en la fracción soluble y la radioactividad incorporada a fosfolípidos.

f) Separación y análisis de los FL metilados.

Los FL extraídos con solventes orgánicos, fueron separados e identificados por cromatografía en capa fina.

Después de la incubación con ^3H -metionina, se extrajeron los FL como en la sección d). La fase cloroformica (aproximadamente 1 ml en total) fue secada bajo una corriente de N_2 a temperatura ambiente (para evitar la oxidación de los ácidos grasos de los FL). El residuo resultante se redisolvió en 0.2 ml de una mezcla cloroformo: metanol (2:1 v/v). Posteriormente, 0.2 ml de los fosfolípidos extraídos fueron agregados a la placa, junto con 20 μg de cada uno de los siguientes fosfolípidos marcadores: lisofosfatidilcolina (LFC), fosfatidilcolina (FC), fosfatidildimetiletanolamina (FDE), fosfatidilmonometiletanolamina (FME) y fosfatidiletanolamina (FE). La mezcla se aplicó a una placa de sílica gel (placas de sílica-Gel 60 de Merck) como también una mezcla de los FL marcadores y de los FL individuales. La cromatografía se desarrolló en una mezcla de ácido propiónico: alcohol n-propílico:cloroformo: agua (2:2:1:1) para la separación de los FL (Hirata y col 1978). Después que el frente del solvente había migrado aproximadamente 14 cm, se secó la placa y los FL standards fueron visualizados con vapores de I_2 y se determinaron las movilidades cromatográficas.

La sección de la placa correspondiente a las muestras fue dividida en bandas de 5 mm. Cada banda fue raspada en un tubo de vidrio de 5 ml y extraída posteriormente con 0.5-1 ml del solvente de la cromatografía (recién preparado) . Esta solución se dejó aproximadamente por 6 h a temperatura ambiente en la oscuridad (durante la primera h los tubos se agitaron continuamente). Luego, los tubos se centrifugaron a 800 x g por 5 min. Una alícuota de 0.4-0.8 ml del sobrenadante fue colocada en un vial de conteo y secada bajo corriente de N₂. Finalmente se agregaron 10 ml de líquido de centelleo (Tolueno, PPO, POPOP) y se contó la radioactividad.

9) Determinación de la actividad de la enzima fosfolípidometiltransferasa (FMT).

a) Condiciones de incubación de las células de Leydig intactas con agonistas.

La incubación se realizó de acuerdo al método descrito por Nieto y Catt (1983).

Aproximadamente 0.5×10^6 células de Leydig purificadas en una gradiente continua de Percoll (10-80%)

fueron preincubadas por 30 min en alícuotas de 1.0 ml en solución de medio M-199 con una agitación de 75 ciclos/min a 37°C en una atmósfera 95% O₂ - 5% CO₂. Después de 30 min de preincubación, se agregó hCG, 8 Br-cAMP, subunidad alfa (ahCG), subunidad beta (βhCG), forskolina (FK) ó medio 199 (M-199) (controles), y se incubó por 30 min.

Al cabo de ese tiempo, las soluciones fueron trasvasiadas a tubos Eppendorf y centrifugadas a 10000 x g por 1 min. Los sedimentos fueron congelados en N₂ líquido y luego mantenidos a -70° C hasta la posterior determinación enzimática. Se ha demostrado que este método de congelamiento no altera la actividad enzimática durante varias semanas.

b) Determinación de la actividad de la enzima fosfolípidometiltransferasa (FMT) in vitro.

Las células congeladas provenientes de a) se resuspendieron en 0.1 ml de buffer Hepes, pH (40 mM Hepes, 20 mM KF, 3 mM Benzamidina, 5 mM EGTA y 6% sacaro-
sa) y se agitaron vigorosamente en vortex hasta lograr una suspensión libre de células, lo que se controló por observación microscópica. Se encontró que, una posterior

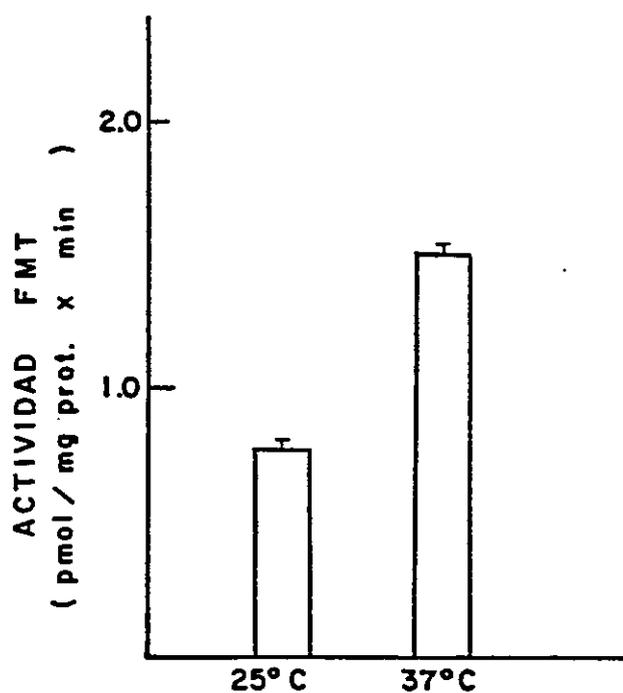
homogenización no aumentaba la actividad de la enzima FMT. La solución resultante fue usada directamente en el ensayo enzimático, que contenía además 160 mM Hepes, 80 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 80 mM DTT y 30% sacarosa, pH 7.3. El volumen final de incubación fue de 0.5 ml y la reacción se inició al agregar 1 µCi de S-adenosil-L - (metil-³H) metionina (SAM) (AE. 15 Ci/mmol) con una concentración final de 100 µM. La reacción se detuvo agregando directamente al tubo de incubación 3 ml de una mezcla cloroformo: metanol: HCl 2 N (12:6:1) para la extracción lipídica. La fase cloroformica se lavó 3 veces con 2 ml 0.5 M KCl en 50% metanol y posteriormente fue colocada en un vial de conteo para su total evaporación. En seguida se agregaron 10 ml de líquido de centelleo (tolueno, PPO y POPOP) y se contó la radioactividad en un contador de centelleo (Beckman). La actividad específica de la enzima FMT en condiciones basales estuvo en un rango de 2-12 pmol/ min x mg proteína.

c) Determinación de las condiciones experimentales óptimas para la evaluación de la actividad enzimática FMT.

- 1.- Efecto de la temperatura de incubación en la actividad fosfolípido metiltransferasa (FMT) en una suspensión libre de células.

Las células de Leydig congeladas a -70°C obtenidas de varias purificaciones independientes, fueron descongeladas y resuspendidas en el medio de homogenización descrito en la sección anterior y sometidas a una fuerte agitación en Vortex hasta obtener una suspensión libre de células. Se juntaron varias muestras hasta obtener una concentración de proteína suficiente para realizar una determinación enzimática (rango de concentración: 0.1-0.2 mg/tubo). Las suspensiones así obtenidas fueron resuspendidas en medio de homogenización e incubadas por 40 min en presencia de 100 μM SAM (1 μCi) a 25°C y 37°C . Los resultados expresados en pmoles/min x mg de proteína están representados en la Fig.8, e indican una mayor actividad enzimática a los 37°C que a los 25°C (0.76 ± 0.02 y 1.5 ± 0.25 pmol x mg prot⁻¹ x min⁻¹ grupos metilo radioactivos incorporados a 25°C y 37°C respectivamente). En lo sucesivo las determinaciones enzimáticas se realizaron a 37°C .

FIG. 8

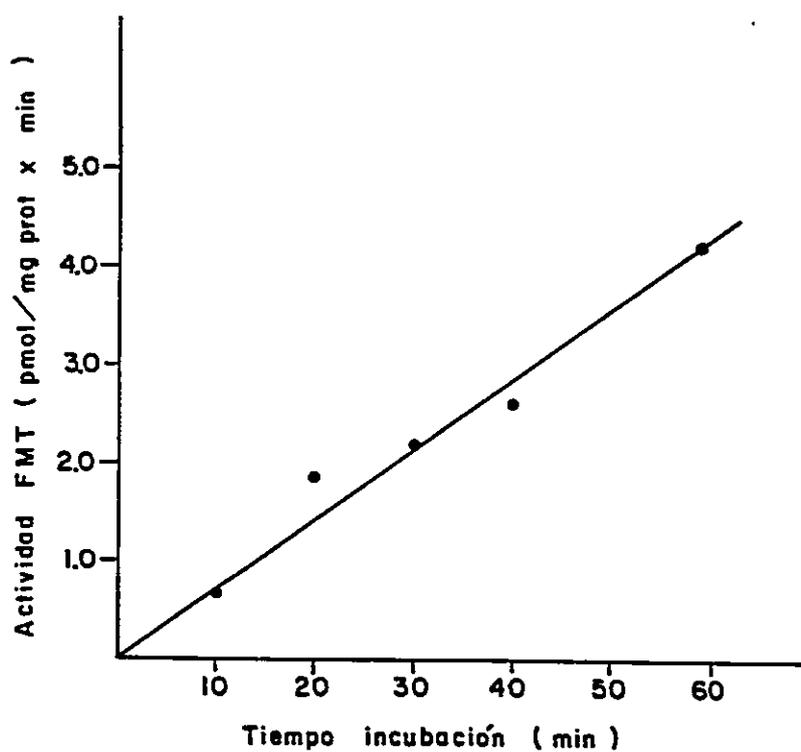


2.- Efecto del tiempo de incubación en la actividad fosfolípidometiltransferasa (FMT) en una suspensión libre de células .

Las muestras, obtenidas como está señalado en la sección a) y con una concentración de proteína en un rango de 0.1 - 0.2 mg/tubo, fueron incubadas en presencia de 1 μ Ci de SAM (100 μ M) durante los tiempos indicados. Los resultados expuestos en

la Fig.9 indican una respuesta lineal de la actividad enzimática hasta los 60 min de incubación. En los experimentos sucesivos, se utilizaron tiempos de incubación de 30 min.

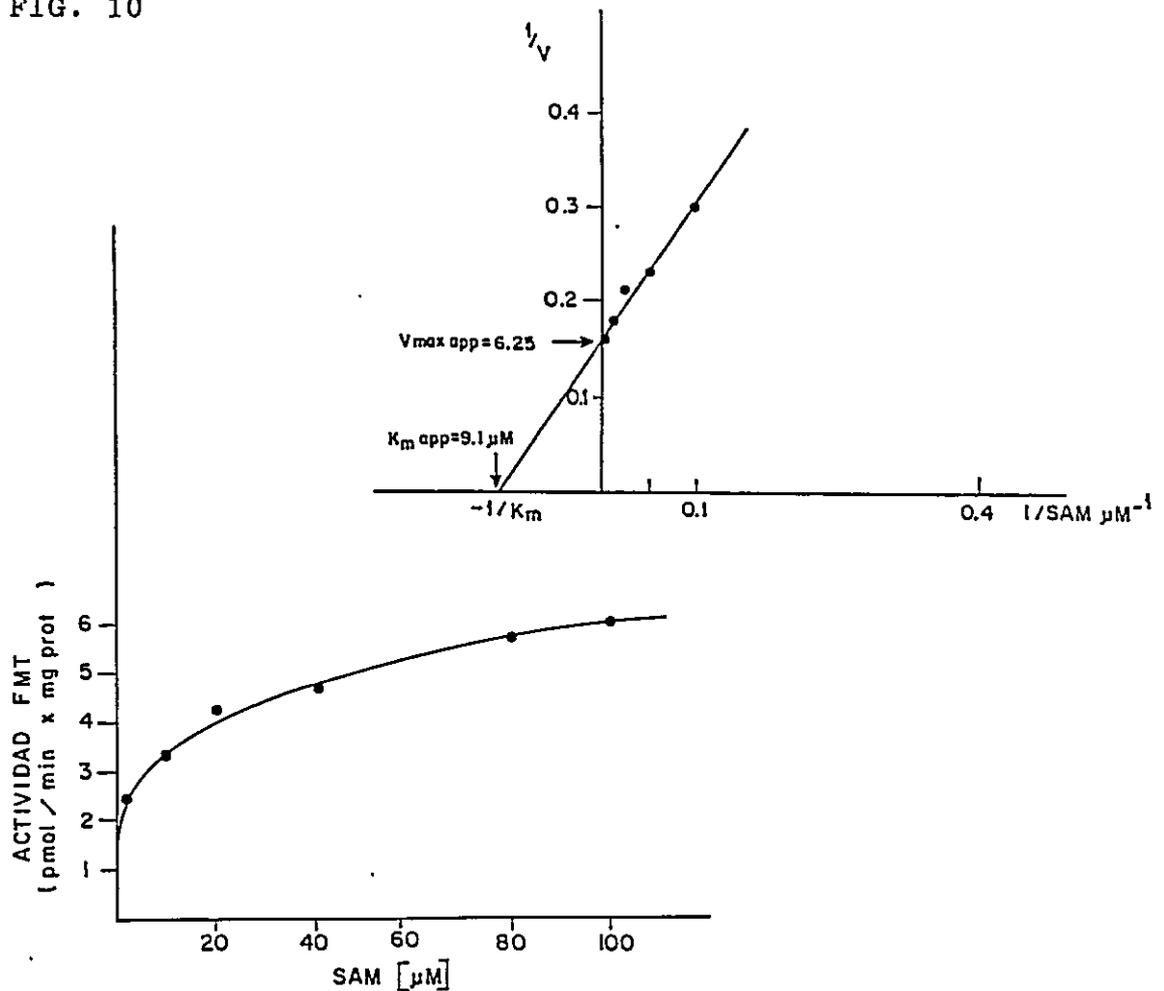
FIG. 9



3.- Efecto de la concentración de S-adenosilmetionina (SAM) sobre la actividad de la enzima FMT en una suspensión libre de células.

Las muestras obtenidas como está señalado en la sección a), fueron incubadas por 30 min a 37°C en presencia de las concentraciones de sustrato (SAM) indicadas. En la Fig.10, se muestra la curva dosis-respuesta indicando una K_m app de aproximadamente 9.1 μM para SAM y una V_{max} de 6.25 pmol/ min x mg proteína. En los experimentos sucesivos se utilizó una concentración de 100 μM de SAM.

FIG. 10



10. Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos representan 3-4 experimentos y están expresados como promedio \pm Desviación Standard (DS).

Se utilizó como ensayo de significación estadística el test t de Student.

RESULTADOS

I) METILACION DE FOSFOLIPIDOS EN CELULAS DE LEYDIG.

La primera etapa consistió en estudiar la participación de la metilación de fosfolípidos en el proceso esteroidogénico y establecer su relación temporal con la interacción hormona-receptor.

1) Acción de inhibidores de reacciones de metilación (3-DZA) sobre la síntesis de Testosterona en células intersticiales.

Para evaluar la participación de las reacciones de metilación de FL en la respuesta esteroidogénica estimulada por LH/hCG, analizamos la acción de inhibidor de metilación, 3-DZA, en la respuesta esteroidogénica de las células de Leydig.

Como se puede ver en la Fig. 11, la presencia de 3-DZA (100 μ M) durante la incubación, inhibió significativamente la producción de T estimulada por hCG.

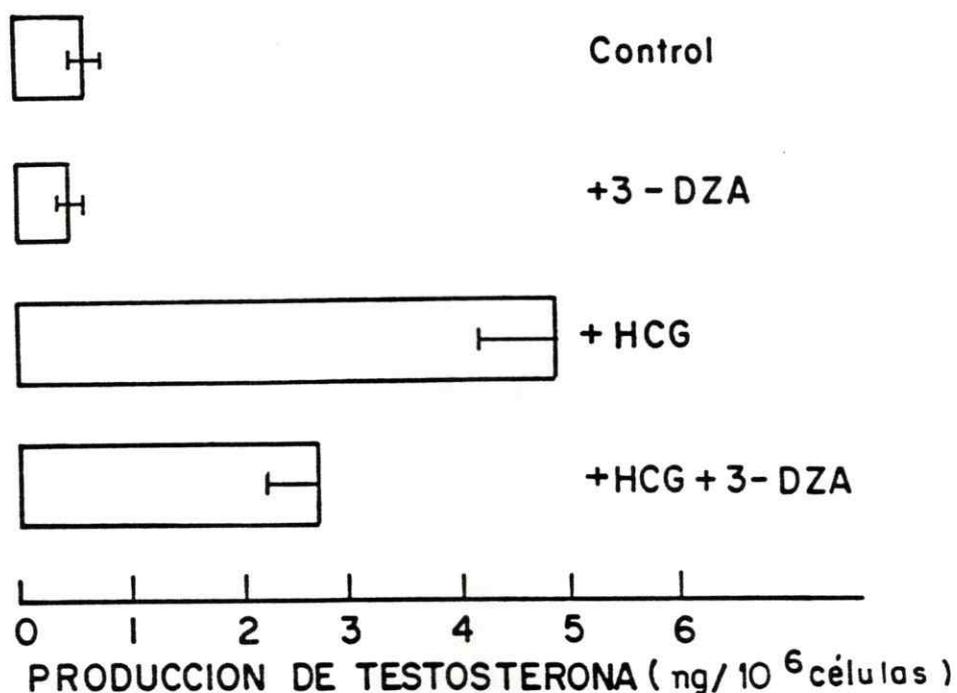


FIG.11 EFECTO DEL INHIBIDOR 3-DZA EN LA SINTESIS DE TESTOSTERONA.

Comparación del efecto de 3- DZA (100 μ M) sobre la síntesis de T basal y estimulada por hCG (10 mU.I., AE. 3000 UI/mg) en células intersticiales. Las células intersticiales fueron preincubadas por 10 min en 0.95 ml de M-199-0.1% BSA en ausencia o presencia de 100 μ M de 3 - DZA. Después de este período, se agregaron 10 mUI de hCG (en 50 μ l de M-199 - 0.1 % BSA) y se incubó por 3 h. Los controles representan células incubadas en ausencia de hormona. La producción de T se determinó de acuerdo a la técnica descrita en materiales y métodos.

La producción basal de T fue de 0.6 ± 0.2 ng/ 10^6 células para los controles, en ausencia de hormona, y de 0.5 ± 0.2 ng/ 10^6 células para los tubos sin hCG pero en presencia de 3-DZA. Cuando las células fueron estimuladas con hCG, la producción de T aumentó a 5.0 ± 0.6 ng/ 10^6 células y solamente a 2.7 ± 0.4 ng/ 10^6 células en las células previamente tratadas con 3-DZA. Estos resultados indican que 3-DZA no modifica los niveles de testosterona en ausencia de hCG, sin embargo, inhibe en un 46% la síntesis de testosterona estimulada por la hormona.

Para analizar este efecto inhibitor en la esteroidogénesis, se estudió qué proporción de las reacciones de metilación de fosfolípidos presente en las células de Leydig, era inhibida por 3-DZA y homocisteína tiolactona (HTL).

2) Efecto de Inhibidores de la metilación: 3DZA y HTL en la incorporación de grupos metilo.

Las células de Leydig purificadas en gradiente de Percoll, fueron preincubadas por 10 min en presencia de 10 μ Ci del precursor radioactivo 3 H-metionina (21.3 μ M), y luego incubadas 30 min con medio de incuba-

ción (controles), hCG (1 UI) ó hCG (1 UI) en presencia de 100 μ M 3-DZA, 100 μ M HTL ó 100 μ M de 3-DZA + 100 μ M de HTL. La fracción lipídica extraída con solventes orgánicos fue evaporada y contada en un contador de centelleo líquido.

Los resultados expresados en la Fig.12 indican que 3-DZA inhibió la metilación de FL estimulada por hCG en un 100%. HTL disminuyó la metilación de FL estimulada por hCG en 82% (de 0.25 ± 0.005 a 0.046 ± 0.004 pmol/ 10^6 células de Leydig). La adición de una mezcla de ambos inhibidores disminuyó la metilación en 86% (de 0.25 ± 0.005 a 0.036 ± 0.005 pmol/ 10^6 células de Leydig). No se observó efecto de 3-DZA ni de HTL sobre la incorporación de ^3H -metionina a FL en los controles.

Los resultados en Figs. 11 y 12 señalan que 3-DZA produce una inhibición total de las reacciones de metilación de fosfolípidos, aunque la inhibición de la esteroidogénesis no supera el 50%. Estos resultados sugieren que una parte de la producción de testosterona es independiente de las reacciones de metilación de FL, y que por sobre ese nivel, la esteroidogénesis sería dependiente de la metilación de FL. Considerando que para obtener una respuesta óptima de síntesis de testosterona se necesita que las reacciones de metilación de fosfolípidos estén

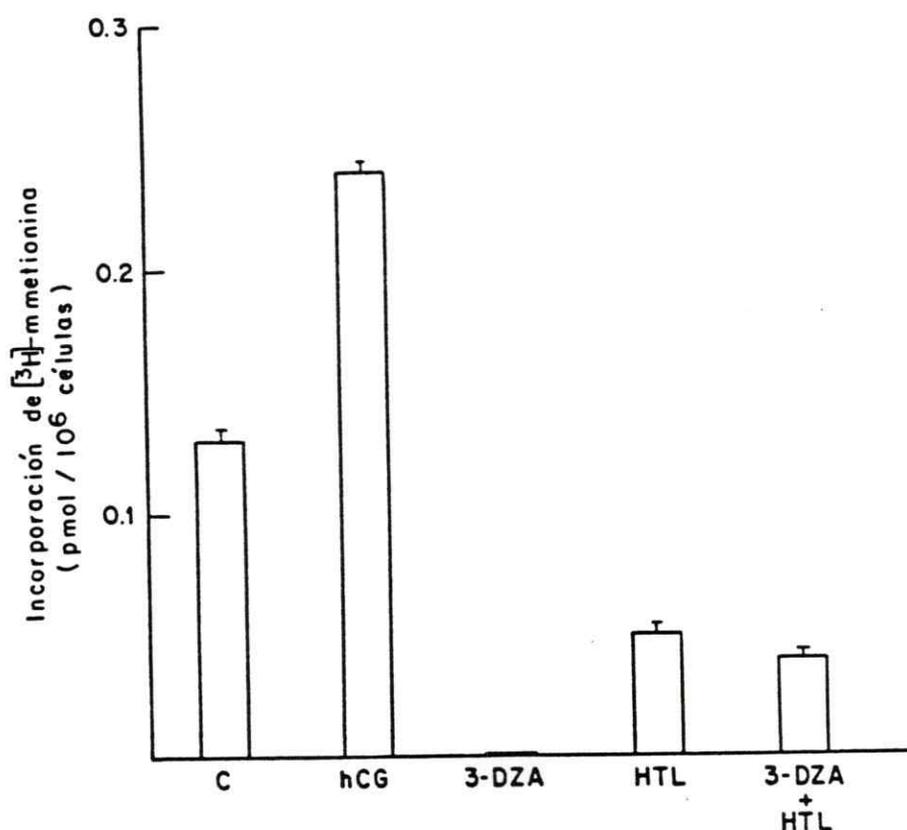


FIG 12 EFECTO DE INHIBIDORES DE LA METILACION DE FOSFOLIPIDOS 3-DZA Y HTL SOBRE LA INCORPORACION DE GRUPOS METILO RADIOACTIVOS.

Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig fueron preincubadas por 10 min con 10 μCi de ^3H -metionina (21.3 μM , AE. 15 Ci/mmol) y luego incubados durante 30 min en presencia de medio de incubación (controles), hCG (1 UI) o hCG (1 UI) en presencia de 3-DZA (100 μM), HTL (100 μM) y 3DZA + HTL. Se determinó la radioactividad presente en la fracción liposoluble de acuerdo a materiales y métodos. Los resultados expresan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

intactas, y que los inhibidores de metilación son capaces de inhibir la estimulación esteroideogénica por hCG, se procedió a estudiar el efecto de hCG en la conversión de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina.

Para este propósito, se incubaron células de Leydig intactas con ^3H - metionina. La metionina es precursor de SAM, agente dador de grupos metilo en las reacciones de metilación de FL. En consideración a que según algunos antecedentes de la literatura SAM no siempre penetra la membrana plasmática, lo cual es indispensable para que sirva como sustrato en las reacciones de transmetilación de FL (Siraganian, 1983; Cordasco y col., 1981), se procedió a analizar la metilación de FL en presencia de ^3H -metionina.

3) Progreso temporal de la incorporación de ^3H -metionina a fosfolípidos. Efecto de hCG.

Se preincubaron las células de Leydig (aproximadamente 0.5×10^6 células de Leydig) por 10 min a 34°C en una atmósfera de $\text{O}_2\text{-CO}_2$ (95%-5%) con agitación constante y en presencia de 10 μCi (21.3 μM) de ^3H -metionina. Al

cabo de este tiempo, se agregó 1 UI de hCG y se continuó la incubación por diferentes tiempos (Fig. 13).

Los resultados indican que hCG estimula significativamente la metilación de fosfolípidos ($p < 0.01$), manifestándose este efecto después de los 5 min de incubación con la hormona. A los 30 min de incubación, se observó un efecto estimulador de 3 veces el valor control, el que se mantiene hasta los 60 min de incubación. Estos resultados estarían indicando, por primera vez, que la gonadotropina aumenta la conversión de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina, y que este efecto se manifiesta en etapas tempranas de la interacción hormona-receptor.

Para conocer si el efecto estimulador de hCG en la metilación de fosfolípidos requería la presencia constante de la hormona, se realizaron los siguientes experimentos: las células de Leydig fueron preincubadas por 10 ó 30 min con 1 UI de hCG. Después de remover la hormona y lavar las células, estas se incubaron por 60 min en presencia del precursor radioactivo (Fig. 14). La preincubación de las células de Leydig durante 10 min con 1 UI de hCG estimuló la incorporación de ^3H -metionina a FL de 0.26 ± 0.03 a 0.84 ± 0.02 pmol/ 10^6 células; mientras que la preincubación durante 30 min con hCG estimuló la incorporación de ^3H -metionina de 0.6 ± 0.06 a 1.18 ± 0.02

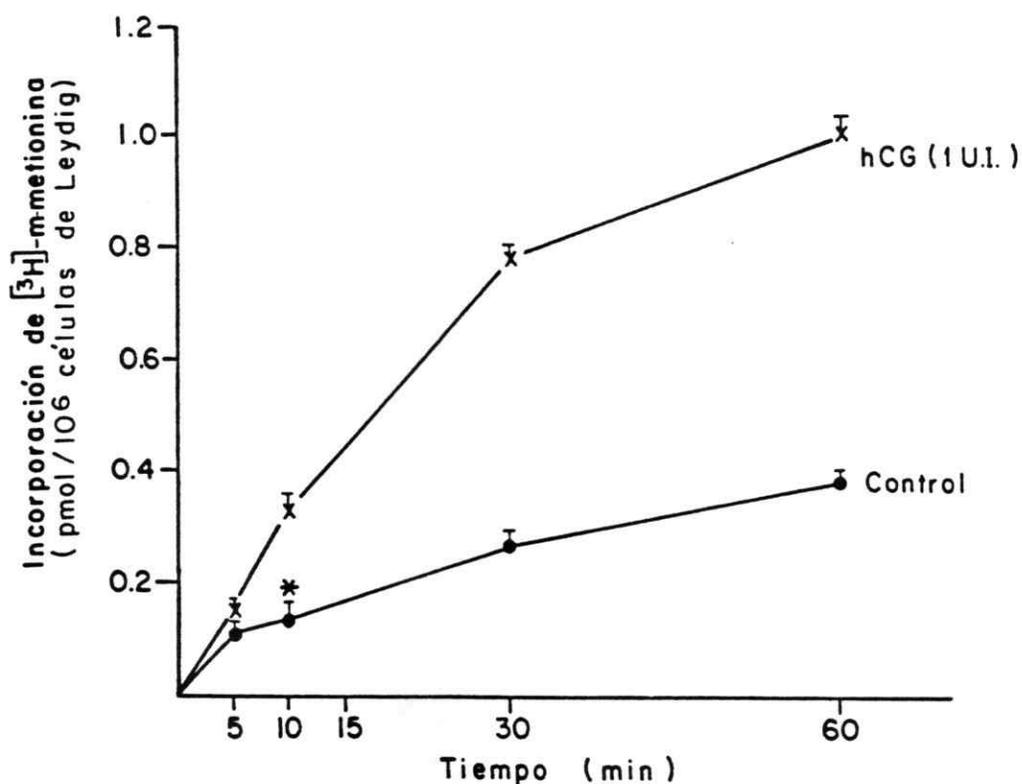


FIG. 13 INCORPORACION DE ³H-METIONINA A FOSFOLIPIDOS EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION. EFECTO DE hCG.

Aproximadamente 0.5 a 1×10^6 células de Leydig purificadas en gradiente de Percoll, fueron preincubadas durante 10 min con 10 μ Ci de ³H-metionina (21.3 μ M, AE. 15 Ci/mmol). Posteriormente se agregó M-199 (control) o hCG (1 UI, AE. 3000 UI/mg) en un volumen final de 0.5 ml, y se incubó por el tiempo indicado. La reacción se detuvo con 0.5 ml de solución de PBS-Sac y se determinó la incorporación del precursor radioactivo a la fracción lipídica de acuerdo al procedimiento descrito en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio \pm SD de experimentos en triplicado. * $p < 0.01$

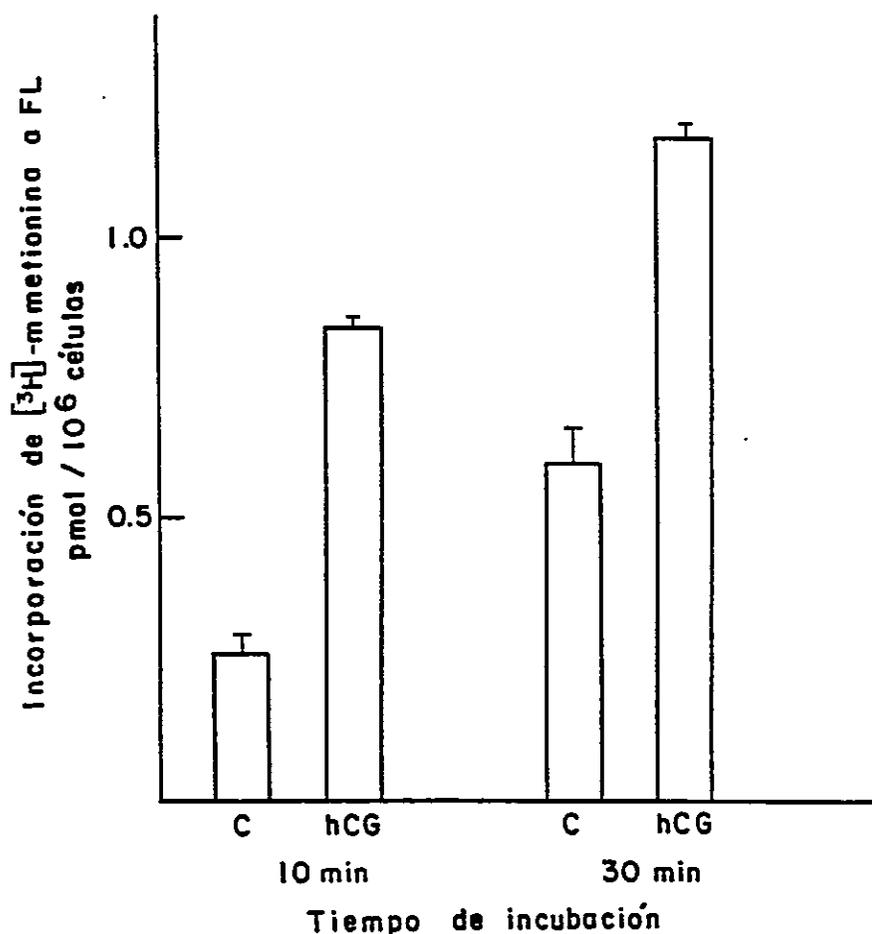


FIG. 14 EFECTO DE LA PREINCUBACION DE LAS CELULAS DE LEYDIG CON hCG EN LA METILACION DE FOSFOLIPIDOS.

Aproximadamente 0.5 a 1×10^6 células de Leydig fueron preincubadas con 1 UI de hCG (AE. 3000 UI/mg) por 10 min ó 30 min. A los tiempos indicados, los tubos se centrifugaron y se lavaron 2 veces con 1 ml de buffer Tyrode's para eliminar la hormona libre. Las células se resuspendieron en medio de incubación y aproximadamente 0.3×10^6 de ellas, fueron incubadas con 10 μ Ci de 3 H-metionina (21.3 μ M, AE. 15 Ci/mmol) en un volumen final de 0.5 ml por 60 min. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica de acuerdo al método descrito previamente. Los resultados, con los controles correspondientes, sin hCG, representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

pmol/10⁶ células. La acción de la hCG durante 10 min estimula la metilación de FL en 2.38 veces vs 2 veces de aumento cuando se incubaba 30 min con la hormona (en relación a sus respectivos controles). Estos resultados están señalando que en los primeros 10 min de interacción de la hormona con su receptor, las reacciones de metilación de FL se han activado, y que no se requeriría la presencia continua de la hormona para obtener esta respuesta máxima. Por otro lado, estos antecedentes sugieren que las reacciones de metilación de FL se estarían activando en etapas tempranas de la interacción hormona-receptor.

Una vez demostrado el efecto de hCG sobre la metilación de FL en células de Leydig intactas, se estudió la variación de este efecto en función de la concentración de la hormona.

4) Efecto de la concentración de hCG sobre la metilación de FL y síntesis de T en células de Leydig.

Se quiso establecer una relación entre los procesos de metilación de FL y síntesis de T. Para esto, se estudió la concentración de hCG necesaria para obtener un

efecto máximo en cada una de estas respuestas. Aproximadamente 0.5×10^6 células de Leydig se preincubaron durante 10 min con el precursor radioactivo. Luego, se adicionaron concentraciones variables de hCG de acuerdo a lo señalado en la Fig.15., y se incubaron por 30 min. Los resultados indican un aumento en la incorporación de grupos metilo radioactivos que es dependiente de la dosis de hCG utilizada. El efecto máximo de hCG se obtuvo con una concentración de 100 mUI de hCG y la dosis EC_{50} , es decir, la dosis de hCG necesaria para obtener la mitad de la respuesta máxima, se obtuvo con una concentración de 7.5 mUI de hCG.

Para el estudio de la producción de T, aproximadamente 1×10^6 células intersticiales fueron incubadas por 3 h en presencia de las diferentes concentraciones de hCG señaladas. Los resultados de la Fig. 15 indican que el efecto máximo de hCG para la síntesis de testosterona se obtuvo con una concentración de 10 mUI y la EC_{50} se alcanzó con una concentración de 2 mUI. Estos resultados están demostrando que a concentraciones bajas de hormona, se puede obtener un elevado nivel de producción de testosterona, pero que para obtener una activación importante de las reacciones de metilación de FL, se necesitarían concentraciones mayores de hormona. Se sugieren dos explicaciones para tales efectos:- es posible que la maquinaria biosintetizadora de testosterona sea más

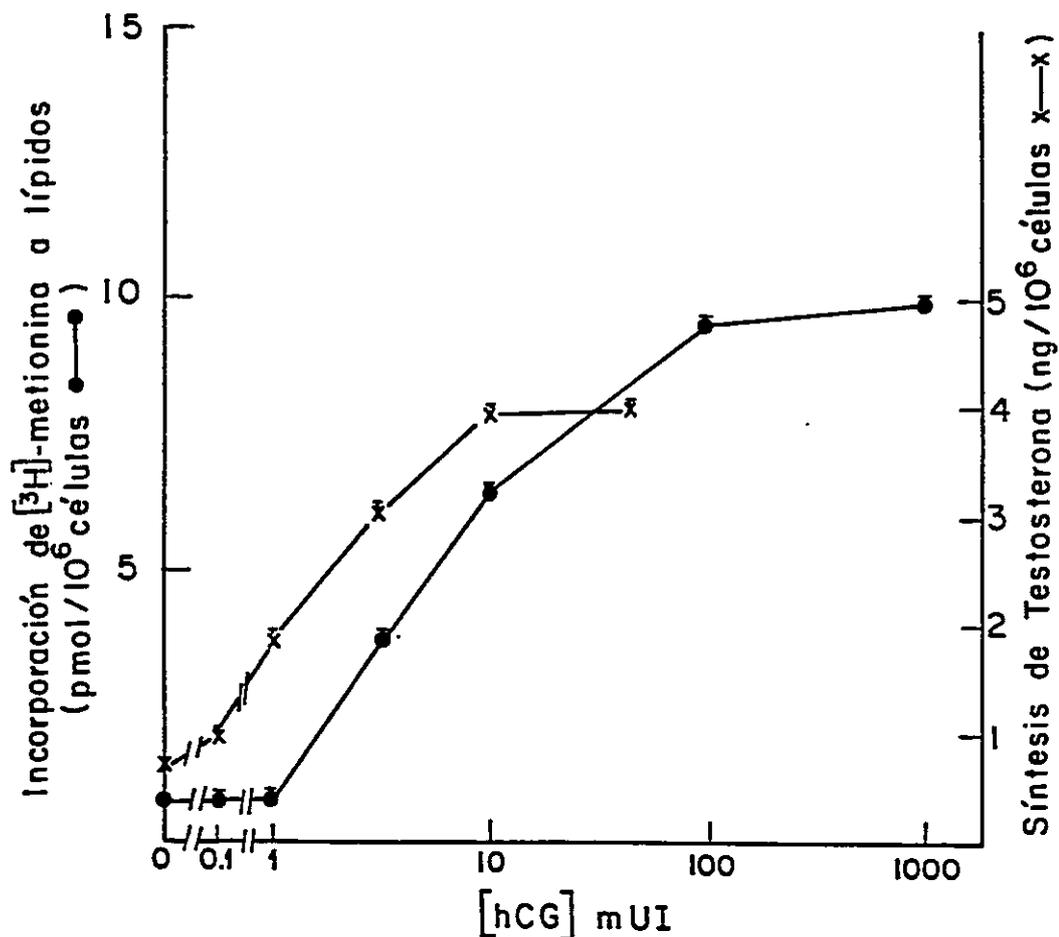


FIG. 15 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE hCG SOBRE LA METILACION DE FL Y SINTESIS DE T.

Para el estudio de la incorporación de ³H-metionina, aproximadamente 0.5 a 1 x 10⁶ células de Leydig fueron preincubadas por 10 min a 34°C (vol. final de 0.5 ml) con 10 pCi de ³H-metionina (21.3 μM, AE. 15 Ci/mmol). Posteriormente, se adicionaron las concentraciones señaladas de hCG (AE. 3000 UI/mg) y se incubó por 30 min. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica de acuerdo a materiales y métodos. La síntesis de T se determinó incubando 1 x 10⁶ células intersticiales por 3 h a 34°C (vol. final de 1 ml) en presencia de las concentraciones de hCG señaladas. Los valores corresponden al promedio ± SD de 3 determinaciones.

sensible a la acción de hCG que las reacciones de metilación de FL, o bien, que el sistema experimental utilizado para detectar metilación de FL no sea lo suficientemente sensible.

Si bien, desde el punto de vista esteroidogénico, la acción de la LH es similar a la acción de hCG, ambas hormonas tienen algunas diferencias estructurales referente al contenido de carbohidratos y número de aminoácidos de la cadena β . Considerando esto, y otros resultados contradictorios de la literatura (Moger, 1985), quisimos estudiar el efecto de LH sobre la síntesis de fosfolípidos.

5) Efecto de la hormona luteinizante (LH) en la incorporación de ^3H -metionina a fosfolípidos.

Las células de Leydig fueron preincubadas por 10 min y luego incubadas con 1, 5, 10, 100 ó 1000 mU.I. de LH por 30 min. Los resultados descritos en la Fig.16, indican que LH también es capaz de estimular la metilación de FL de una manera dosis dependiente. En este caso, el efecto máximo se obtuvo con una concentración de 100 mUI de LH y la EC_{50} de LH para la metilación de FL fue de 8 mUI.

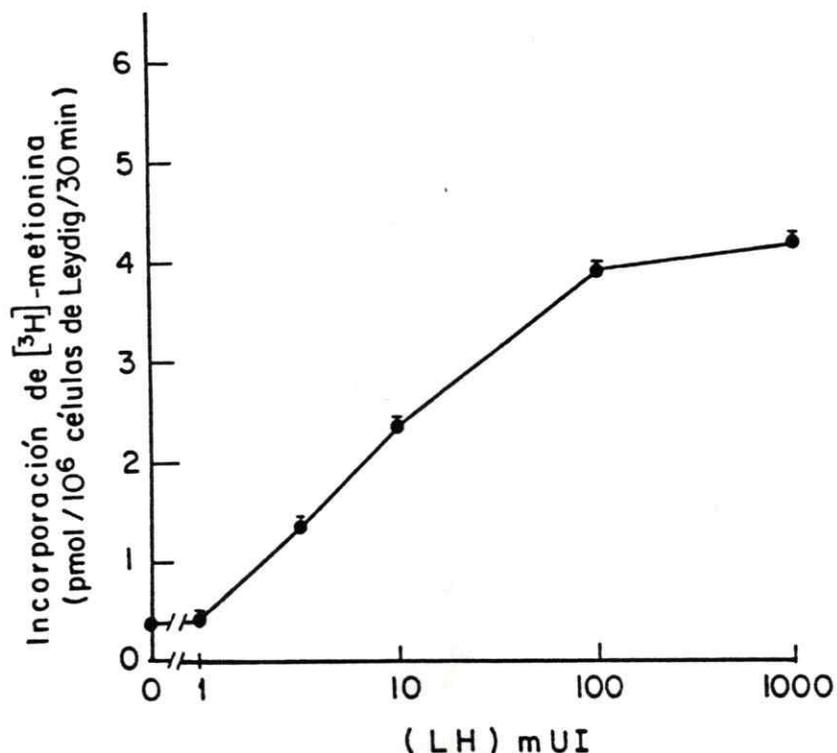


FIG.16 EFECTO DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH) EN LA INCORPORACION DE ^3H -METIONINA A FL.

Para el estudio de la incorporación de ^3H -metionina, aproximadamente 0.5×10^6 de células de Leydig fueron preincubadas por 10 min con 10 μCi de ^3H -metionina (21.3 μM , AE. 15 Ci/mmol). Luego, se agregó LH a las concentraciones señaladas y se incubaron los tubos por 30 min. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica de acuerdo a materiales y métodos. Los valores corresponden al promedio \pm SD de 3 determinaciones.

Estos resultados indican que LH y hCG tienen un comportamiento similar en relación a los procesos de metilación de FL en las células de Leydig.

Dado que en el tejido intersticial coexisten diversos tipos celulares, se quiso conocer el grado de incorporación basal de ^3H -metionina a fosfolípidos en células de Leydig purificadas, en células intersticiales obtenidas por colagenasa y en glóbulos rojos.

6) Incorporación de ^3H - metionina a distintos tipos celulares.

Aproximadamente 0.5×10^6 células de Leydig, 1×10^6 células intersticiales y 2×10^6 glóbulos rojos fueron incubados durante 30 min con 10 μCi (21.3 μM) de ^3H -metionina. Los resultados están expuestos en la Fig.17 y se puede observar que la incorporación de ^3H -metionina a FL en las células de Leydig fue de 1.25 ± 0.13 pmol/ 10^6 células. En las células intersticiales y glóbulos rojos, la incorporación fue de 0.18 ± 0.01 pmol/ 10^6 y de 0.03 ± 0.01 pmol/ 10^6 células respectivamente. Estos resultados señalan que en las células de Leydig existe una proporción de reacciones de metilación muy elevada en

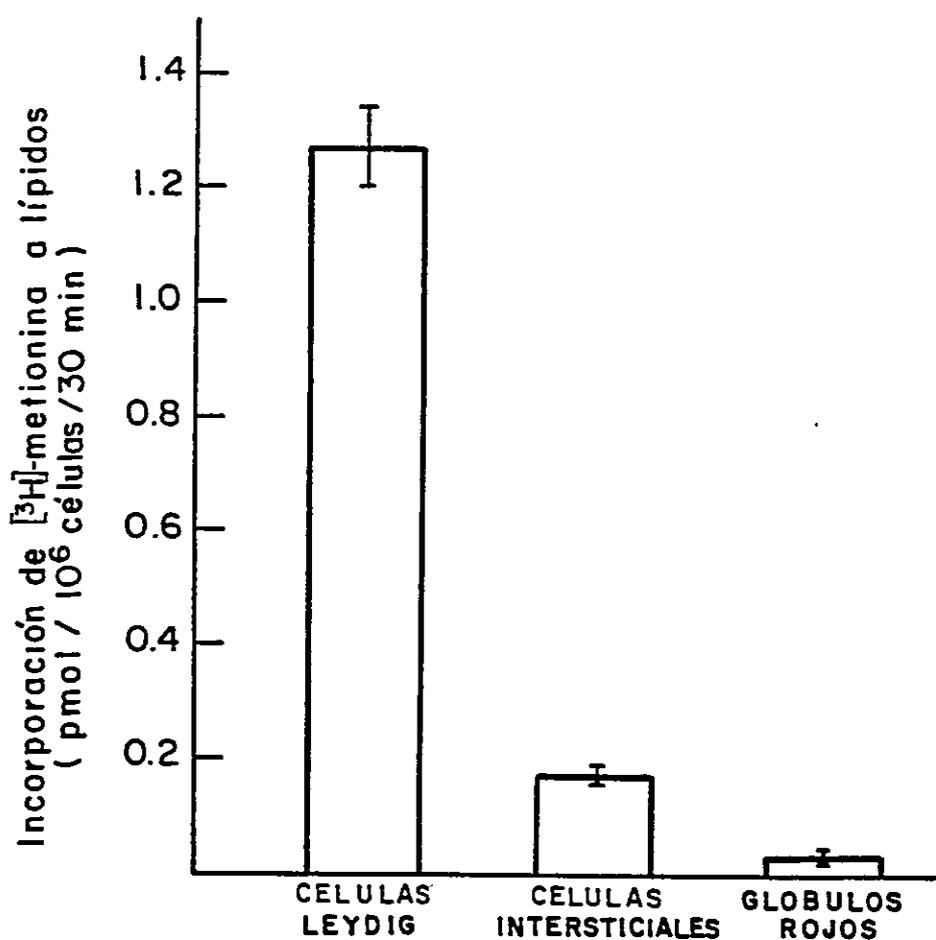


FIG. 17 INCORPORACION DE GRUPOS METILO RADIOACTIVOS A DISTINTOS TIPOS CELULARES.

Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig, 1×10^6 células intersticiales y 2×10^6 glóbulos rojos, fueron incubados durante 30 min con 10 μCi de ^3H -metionina (21.3 μM , AE. 15 Ci/mmol). Luego, se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones .

comparación a otros tipos celulares presentes en el testículo.

7) Incorporación de ^3H -metionina en función de la concentración de células de Leydig.

Diferentes concentraciones de células de Leydig fueron preincubadas (en un rango de 1 a 4×10^5 células) por 10 min en presencia de 10 μCi de ^3H -metionina (21.3 μM), y luego incubadas por 30 min en presencia o ausencia de 1 UI de hCG (Fig. 18). Se observa que la incorporación de grupos metilo se correlaciona bien con el número de células de Leydig incubadas, dentro del rango estudiado. Debido a la dificultad en contar con un número elevado de células de Leydig mediante la gradiente de Percoll, fue prácticamente imposible realizar estudios con concentraciones mayores de células de Leydig. En todas las concentraciones celulares estudiadas, la hCG estimuló aproximadamente 4 veces la incorporación del precursor radioactivo .

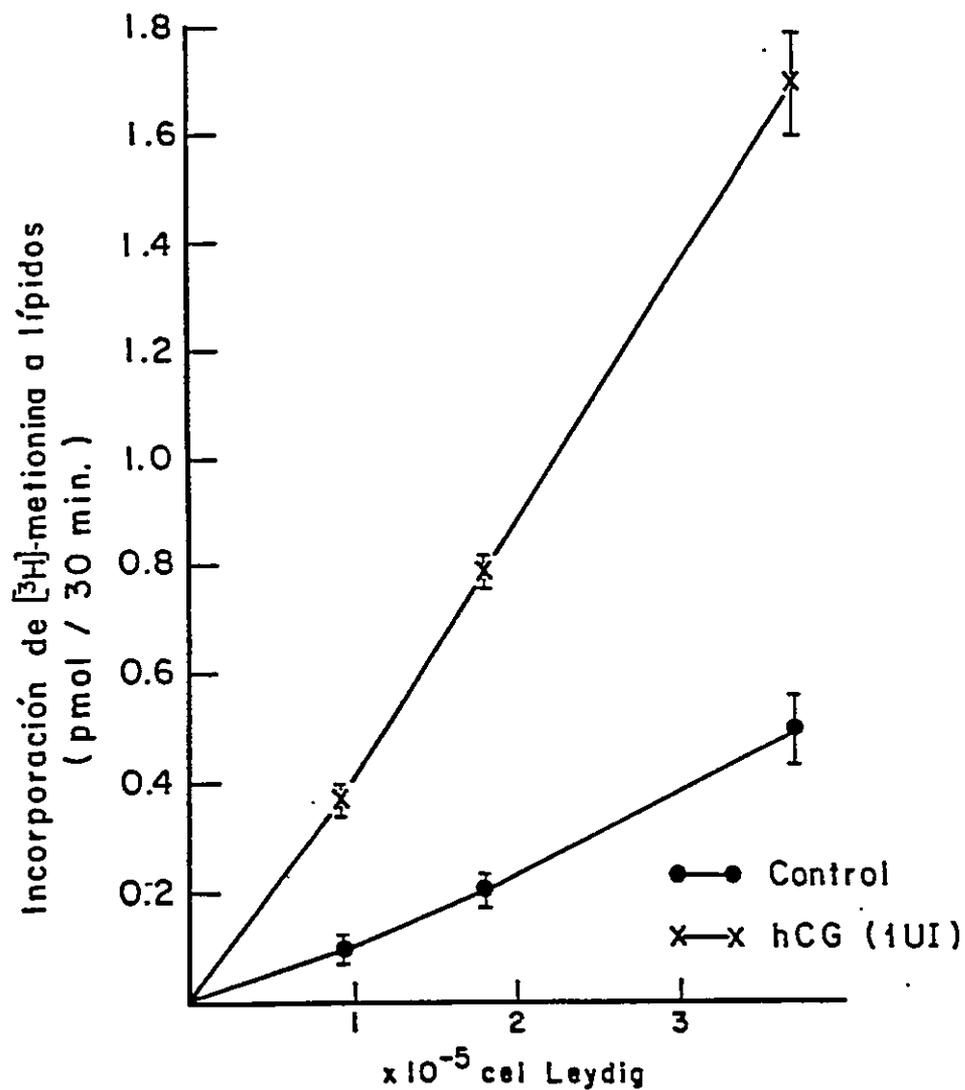


FIG. 18 INCORPORACION DE GRUPOS METILO RADIOACTIVOS EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE CELULAS DE LEYDIG. EFECTO DE HCG.

Concentraciones variables de células de Leydig (entre 1 y 4×10^5) fueron preincubadas durante 10 min con 10 μ Ci de 3 H-metionina (21.3 μ M, AE. 15 Ci/mmol). Luego, se agregó medio de incubación o hCG (1 UI, AE. 3000 UI/mg) y se incubó por 30 min. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica de acuerdo a como se describió en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

8) Caracterización de los fosfolípidos metilados: Efecto de hCG.

Aproximadamente 1×10^6 células de Leydig fueron preincubadas por 10 min en presencia de 10 μCi de ^3H -metionina (21.3 μM). Después de este período, se agregó medio de incubación (controles) ó 1 UI de hCG y se incubaron las células por 30 min.

Los fosfolípidos metilados provenientes de esta incubación, fueron extraídos con cloroformo: metanol: HCl y fueron separados por cromatografía en capa fina cuyos detalles se dieron a conocer en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la Fig. 19 y corresponden a los fosfolípidos sintetizados por 1×10^6 células de Leydig durante 30 min en presencia o ausencia de hCG. Se observa que los grupos metilo radioactivos fueron incorporados principalmente en la región donde migran la fosfatidilcolina (FC), fosfatidildimetiletanolamina (FDE) y fosfatidilmonometiletanolamina (FME). Aproximadamente un 32% de la radioactividad total fue incorporada a FC, un 30% a FDE y un 6% a FME. La adición de hCG aumentó la incorporación total de los grupos metilo marcados en todos los fosfolípidos pero el incremento fue mayor en la FME: 28% de aumento en la FC; 48% en la FDE y 78% en la FME.

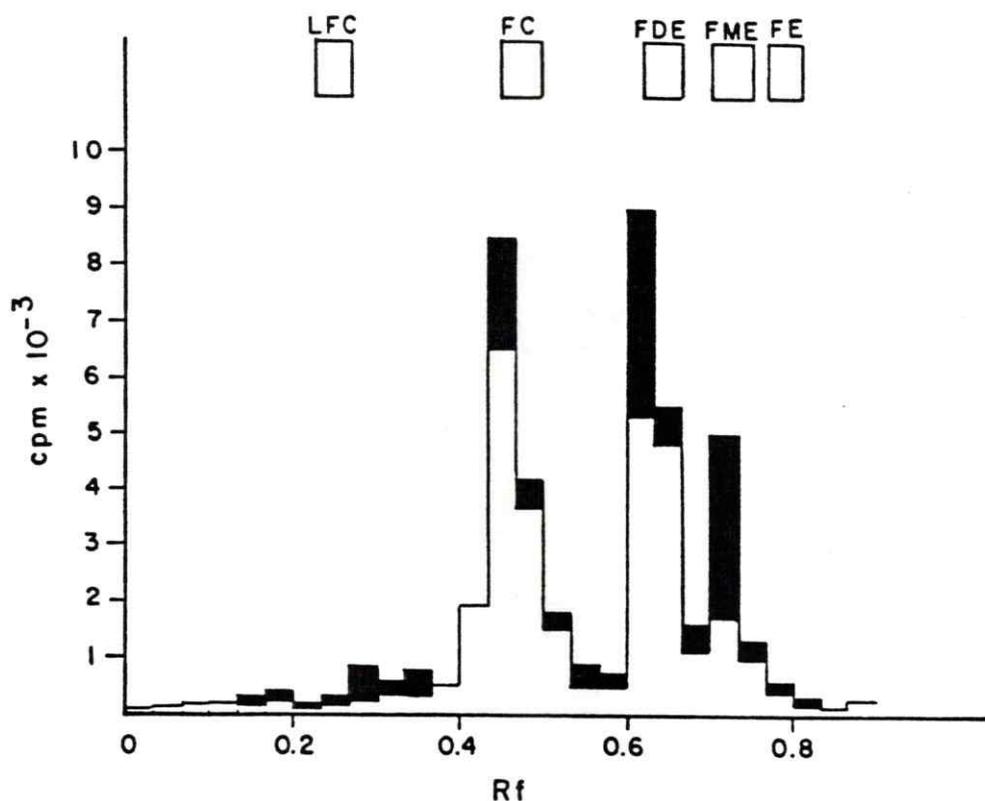


FIG. 19 CARACTERIZACION DE LOS FOSFOLIPIDOS METILADOS

Histograma que muestra las movilidades cromatográficas de los fosfolípidos metilados extraídos. Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig fueron preincubadas con $10 \mu\text{Ci}$ de ^3H -metionina ($21.3 \mu\text{M}$). Luego, los tubos fueron incubados por 30 min en presencia o ausencia (controles) de 1 UI de hCG (AE.3000 UI/mg). Alícuotas de células de Leydig provenientes de los tubos control y con hormona, fueron analizadas por cromatografía en capa fina de acuerdo a la técnica descrita en materiales y métodos.

LFC, lisofosfatidilcolina; FC, fosfatidilcolina; FD, fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina; FME, fosfatidil-N-monometiletanolamina. R_f : movilidad cromatográfica. Las barras oscuras representan la radioactividad estimulada por hCG, y las barras blancas, la incorporación de grupos metilo en ausencia de hormona (control).

9) Efecto de diferentes esteroides producidos por las células de Leydig en la metilación de Fosfolípidos.

Puesto que LH/hCG producen una estimulación de la síntesis de fosfolípidos, era fundamental analizar si los esteroides, principales productos fisiológicos de las células de Leydig, podrían mediar o regular la respuesta de la hormona en la síntesis de fosfolípidos.

Las células de Leydig fueron preincubadas por 10 min y luego durante 30 min en presencia o ausencia de 1 UI de hCG, con la adición de 32 μ M de pregnenolona, 32 μ M de progesterona, 35 μ M de testosterona ó 37 μ M de estradiol. Los resultados están expresados como "índice de estimulación" que representa una razón entre el valor tratado con su control respectivo y están señalados en la Fig. 20. Se observa que ningún esteroide modificó la respuesta de metilación de FL. Al control se le asignó un valor de 1; los valores obtenidos con el tratamiento hormonal fueron los siguientes: pregnenolona: 0.98 ± 0.16 ; progesterona: 1 ± 0.18 ; testosterona: 1.12 ± 0.18 y estradiol: 1.25 ± 0.25 .

La respuesta de hCG (1 UI) fue de 3.14 ± 0.33 y en presencia de pregnenolona fue de 3.27 ± 0.39 ; de progesterona: 3.25 ± 0.16 ; de testosterona: 3.38 ± 0.35 y

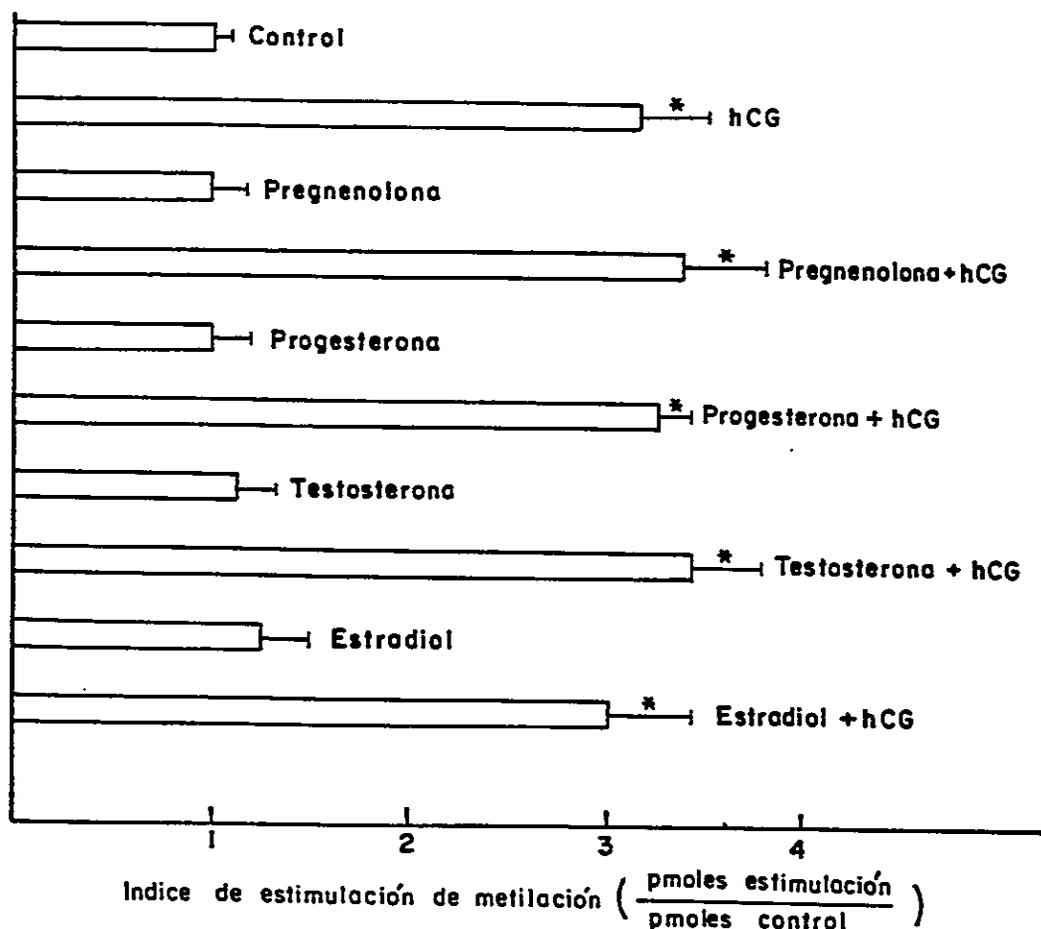


FIG. 20 EFECTO DE ESTEROIDES EN LA INCORPORACION DE GRUPOS METILO RADIOACTIVOS A FOSFOLIPIDOS.

Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig fueron preincubadas por 10 min a 34°C con 10 μCi ($21.3 \mu\text{M}$) de ^3H -metionina.

Luego se adicionó medio de incubación (controles), pregnenolona ($32 \mu\text{M}$), progesterona ($32 \mu\text{M}$), testosterona ($35 \mu\text{M}$) o estradiol ($37 \mu\text{M}$) hasta completar un volumen final de 0.5 ml. Cada uno de los esteroides se agregó también en presencia de 1U.I. de hCG. A los 30 min se detuvo la reacción y se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica. Los resultados están expresados como índice de estimulación, que representa una relación entre pmoles estimulados y pmoles control, asignándosele a los controles el valor de 1. Cada valor corresponde al promedio \pm SD de 5 determinaciones.

* $p < 0.005$

de estradiol: 3.0 ± 0.38 . Los valores de estimulación de hCG y de hCG con los esteroides fueron significativamente mayores que el control ($p < 0.001$). Estos resultados indican que si bien los esteroides no tienen efecto sobre la metilación de FL, tampoco modifican la respuesta estimuladora de hCG.

10) Efecto de LHRH y AVP en la metilación de fosfolípidos y en la producción de testosterona.

Si bien es conocida la acción regulatoria que ejercen los polipéptidos LHRH y AVP en la esteroidogénesis de la célula de Leydig a través de sus receptores localizados en la membrana de estas células, no se conoce su efecto regulatorio sobre las reacciones de metilación de FL. Este estudio se realizó además, para conocer si las reacciones de metilación de FL estaban implicadas en la transducción de otras señales hormonales que tenían acción en la célula de Leydig. En la Fig. 21, se observan los resultados obtenidos al incubar por 30 min las células de Leydig purificadas con LHRH (0.8 nM) y AVP (0.1 μ M). Los resultados están expresados como "índice de estimulación" y se observa, que, ni LHRH ni AVP modifican la magnitud de las metilaciones de FL: el control tiene un

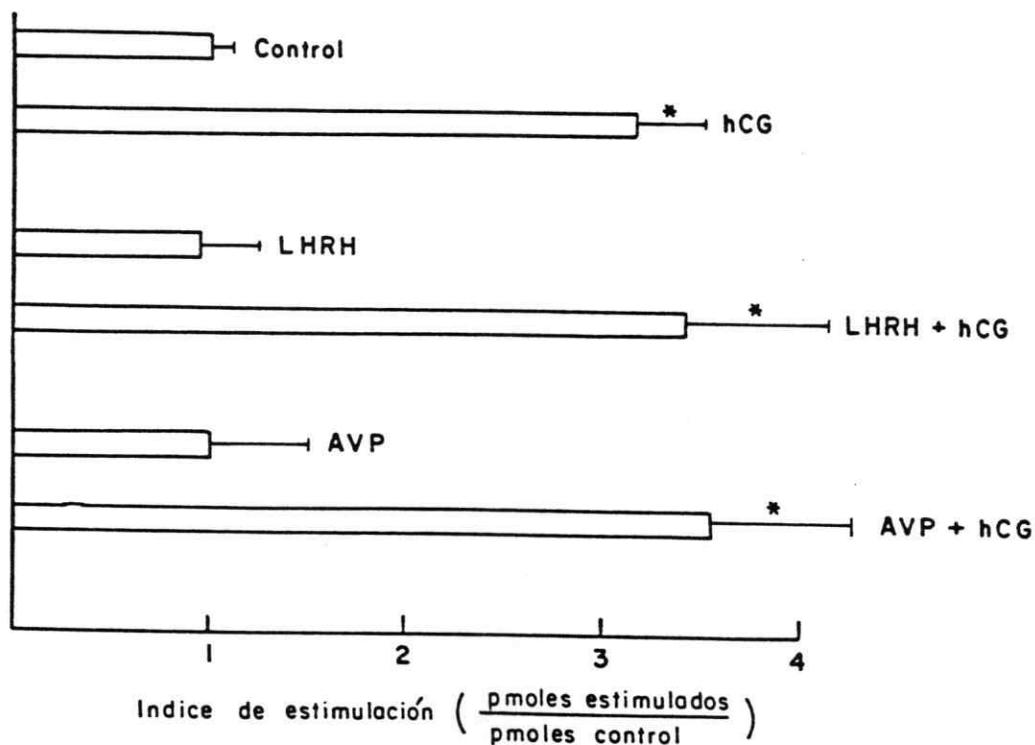


FIG. 21 EFECTO DE LHRH Y AVP EN LA INCORPORACION DE GRUPOS METILO RADIOACTIVOS A FOSFOLIPIDOS.

Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig fueron preincubadas por 10 min a 34°C con 10 μCi (21.3 μM) de ^3H -metionina. Luego, se adicionó medio de incubación (controles), LHRH (0.8 nM) o AVP (0.1 μM) ó cada uno de ellos en presencia de 1 U.I. de hCG hasta un volumen final de 0.5 ml y se incubó por 30 min. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica, según descrito en materiales y métodos. Los resultados están expresados como índice de estimulación (relación entre pmoles estimulados y pmoles control) y representan el promedio \pm SD de 4 determinaciones (* $p < 0.004$)

valor de 1 ± 0.1 ; LHRH: 0.96 ± 0.25 ; AVP: 1 ± 0.5 . La acción estimuladora de hCG (3.14 ± 0.31) no se modificó en presencia de LHRH (3.37 ± 0.58) ni de AVP (3.5 ± 0.64). Si bien estos péptidos no tienen acción en la metilación de FLs, a las mismas concentraciones utilizadas, su efecto inhibitor en la producción de testosterona estimulada por hCG es significativo (Tabla II).

Con los resultados obtenidos, la etapa siguiente fue estudiar los mecanismos que están implicados en la activación de las reacciones de metilación de FL.

11) Efecto de análogos de cAMP y estimuladores de la adenilato ciclasa en la metilación de FL.

Antecedentes en la literatura (Hirata y Axelrod, 1980; Castaño y col., 1980; Nieto y Catt, 1983) han señalado que algunos agentes que elevan el cAMP intracelular, son capaces de estimular las enzimas fosfolípidometiltransferasas (FMT). Sin embargo, estos resultados han generado gran controversia, ya que no todos los estudios enzimáticos han detectado una relación entre la metilación de FL y activación de adenilato ciclasa (Colard y Breton, 1981; Schanche y col., 1982). La interpretación

TABLA II: EFECTO DE LHRH Y AVP EN LA SINTESIS DE TESTOSTERONA DE CELULAS DE LEYDIG

| | Síntesis de Testosterona -hCG | (p/moles/10 ⁶ células) +hCG |
|---------|----------------------------------|---|
| Control | 10,52 ± 1,5 | 89,6 ± 7,2 |
| AVP | 8,93 ± 2,0 | 45,3 ± 6,1 |
| LHRH | 12,35 ± 1,9 | 51,6 ± 8,9 |

Aproximadamente 1×10^6 células intersticiales fueron incubadas por 3 h a 34°C en un volumen de 1 ml en presencia de medio 199 (control), 1 UI de hCG, 0.8 nM de LHRH, 0.1 µM de AVP, 1 UI de hCG + 0.8 nM de LHRH ó 1 UI de hCG + 0.1 µM de AVP. Al cabo de este período se determinó la producción de T por el método de RIA, como está descrito en materiales y métodos.

se dificulta aún más cuando se comparan resultados de actividad enzimática FMT con resultados de metilación de FL en células intactas, los que son contradictorios; se ha encontrado que la adición exógena de CPT-cAMP a hepatocitos de rata, disminuye la formación de fosfatidilcolina a partir de los precursores radioactivos y por otro lado, duplica la actividad fosfolípidometiltransferasa (Pritchard y col., 1981a). Resultados anteriores nuestros (Llanos y col., 1985; Rojas, 1985), demostraron que la estimulación de la producción de T por dibutiril cAMP (db-cAMP) y por toxina del cólera (TC) no eran modificadas por la adición de inhibidores de la metilación (3-DZA).

Con estos antecedentes, quisimos estudiar el efecto de estos activadores sobre la metilación de FL.

Las células de Leydig fueron preincubadas por 10 min con el precursor radioactivo, y luego, incubadas durante 30 min en presencia de 0.1 mM de 8 Br-cAMP en 0.1 mM de 1-metil 3-isobutilxantina (MIX) (Williams y col., 1976), 10 µg/ml de toxina del cólera activada (TC) ó con 95 µM de forskolina (FK).

Los resultados indicados en la Fig. 22 señalan que los análogos de cAMP y activadores de la adenilato ciclasa no son capaces de estimular la metilación de FL. La incorporación de ³H-metionina a FL fue de

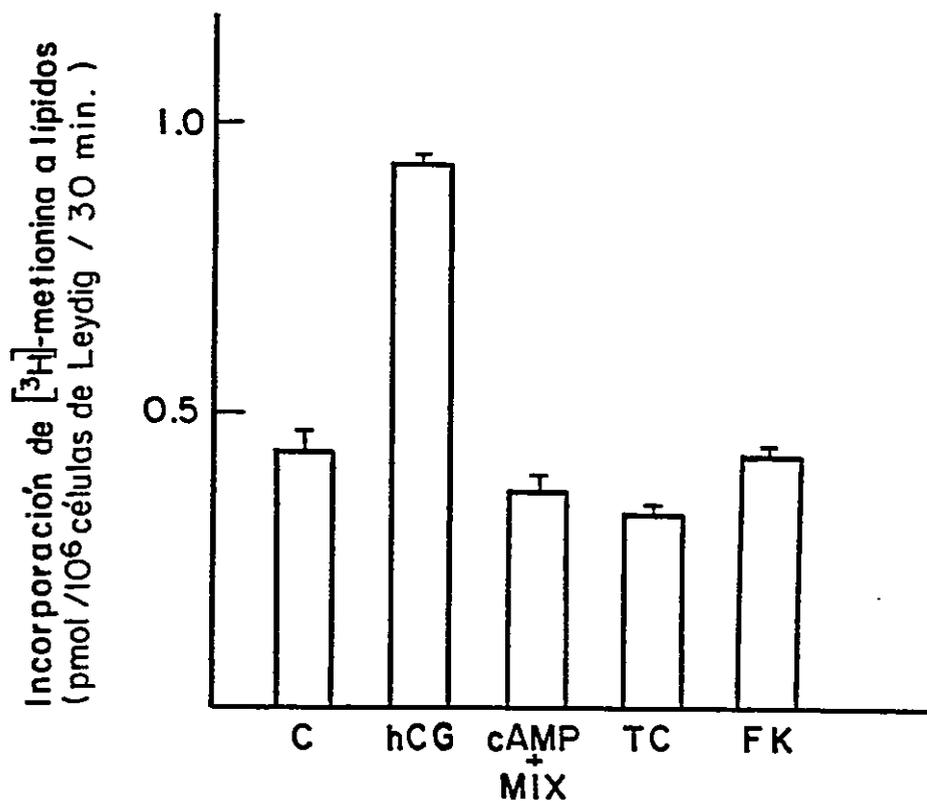


FIG. 22 EFECTO DE ANALOGOS DE cAMP Y ACTIVADORES DE ADENILATO CICLASA EN LA INCORPORACION DE GRUPOS METILO A FL.

Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig fueron preincubadas por 10 min a 34°C en presencia del precursor radioactivo. Luego se agregó medio de incubación (controles), hCG (1UI), 8-Br cAMP ($0.1 \mu\text{M}$) con MIX ($0.1 \mu\text{M}$), TC ($10 \mu\text{g/ml}$) o FK ($5 \mu\text{M}$) hasta un volumen final de 0.5 ml y se incubó por 30 min. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica según lo descrito en materiales y métodos. Los resultados están expresados en pmoles/ 10^6 células de Leydig y representan el promedio \pm SD de 6 determinaciones.

0.44 ± 0.03 pmol/ 10^6 células en los controles, valor que se incrementó a 0.95 ± 0.01 pmol/ 10^6 células, en presencia de hCG (1 UI). Los valores experimentales de metilación fueron de 0.4 ± 0.025 , 0.36 ± 0.01 y 0.43 ± 0.01 pmol/ 10^6 para 8-Br cAMP + MIX, TC y FK respectivamente.

12) Efecto de las diferentes subunidades de hCG y del híbrido de hCG en la metilación de FL.

Habiendo demostrado que la incorporación de ^3H -metionina a FL en células intactas, no era activada por cAMP, sino que solamente era incrementada en presencia de LH/hCG, era necesario no solo poder demostrar la especificidad de la respuesta a LH/hCG, sino que también poder aproximarnos a establecer los dominios de la gonadotropina que serían responsables de la síntesis de fosfolípidos.

Como se mencionó anteriormente, tanto la LH como la hCG están formadas por dos subunidades (α y β) glicosiladas, las que forman un heterodímero que es esencial para la actividad estimuladora de la síntesis de T. En un intento por conocer el mecanismo de acción de las reacciones de transmetilación de FL, fue interesante conocer si las subunidades individuales (que no producen respuesta esteroidogénica) producían algún efecto en la

incorporación de grupos metilo. También se quiso evaluar la acción de un híbrido de hCG preparado por NIH del híbrido de hCG preparado en el laboratorio, al incubar ambas subunidades a diferentes temperaturas y por diferentes períodos. Los resultados (Fig. 23) indican que la incubación de las células de Leydig por 30 min con la subunidad α no promueve la incorporación de grupos metilo (0.29 ± 0.02 pmol/ 10^6 células en relación a 0.3 ± 0.03 pmol/ 10^6 del control). Sin embargo la subunidad β estimuló significativamente la incorporación de grupos metilo en relación al control (0.7 ± 0.025 vs 0.3 ± 0.03 pmol/ 10^6 para la subunidad β y los controles respectivamente), aunque en menor proporción que la hormona nativa (0.7 ± 0.025 y 0.89 ± 0.025 pmol/ 10^6 células para subunidad β y con hCG respectivamente). Estos resultados están indicando, que a pesar que ambas subunidades individuales se unen débilmente al receptor de LH/hCG, sólo los dominios de unión presentes en la subunidad β , son capaces de activar las reacciones de metilación de FL.

El híbrido NIH estimuló la metilación de FL en la misma proporción que hCG (0.89 ± 0.02 y 0.89 ± 0.025 pmol/ 10^6 para el híbrido NIH y la hormona nativa respectivamente) y los híbridos preparados en el laboratorio también tuvieron un efecto positivo (0.68 ± 0.03 y 0.69 ± 0.03 pmol/ 10^6 para el híbrido I y II respectivamente). La

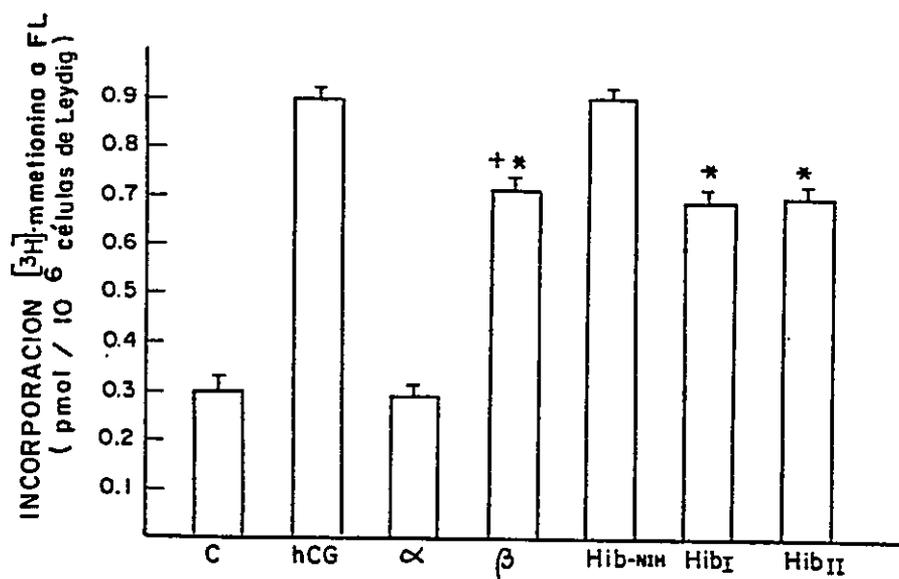


FIG. 23 EFECTO DE LAS SUBUNIDADES α Y β DE HCG Y DE DIFERENTES HIBRIDOS DE HCG SOBRE LA INCORPORACION DE GRUPOS METILO A FOSFOLIPIDOS.

Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig, fueron preincubadas con $10 \mu\text{Ci}$ ($21.3 \mu\text{M}$) de ^3H -metionina por 10 min a 34°C . Luego se agregó medio de incubación (controles), hCG (1 UI, AE. 3000 UI/mg), subunidad α (aprox. 0.5 UI), subunidad β (0.5 UI, AE. 29 UI/mg), híbrido - NIH (1 UI) e híbrido I y II (aprox. 1 UI de c/u) y se incubó por 30 min.

Hibrido I: se tomaron volúmenes iguales de la subunidad α y β y se incubaron a 37°C por 2 h.

Hibrido II: se tomaron volúmenes iguales de la subunidad α y β y se incubaron a 25°C por 18 h.

Se determinó radioactividad liposoluble. Los resultados están expresados como promedio \pm SD de 4 determinaciones.

* $p < 0.007$, respecto al control.

++ $p < 0.002$, respecto al valor con hCG

manera experimental en que se prepararon los híbridos no afectó la respuesta de metilación.

13) Efecto de los híbridos de hCG sobre la síntesis de T.

Se evaluó el efecto de los diferentes híbridos en la capacidad de producir una respuesta esteroidogénica. La Tabla III muestra los resultados obtenidos al incubar células intersticiales con hCG, híbrido comercial, híbrido I y II por 3 h. Se observa que el híbrido comercial estimula mucho mas la síntesis de T, incluso que hCG. Los híbridos preparados en el laboratorio estimularon la síntesis de T en forma análoga a hCG. Tampoco se encontraron diferencias en la respuesta esteroidogénica relacionadas con el método de preparación de los híbridos. Ninguna de las subunidades individuales posee actividad esteroidogénica.

TABLA III EFECTO DE HCG Y DIFERENTES HIBRIDOS DE HCG EN LA SINTESIS DE T.

| | SINTESIS DE TESTOSTERONA ng/10 ⁶ Celulas |
|----------------|--|
| Control | 0.38 ± 0.01 |
| + hCG (1 U.I.) | 0.90 ± 0.02 |
| + Híbrido NIH | 1.12 ± 0.01 |
| + Híbrido I | 0.80 ± 0.01 |
| + Híbrido II | 0.82 ± 0.01 |

Aproximadamente, 5×10^6 células intersticiales fueron incubadas por 3 h en presencia de hCG (1 U.I, AE 3000 UI/mg), híbrido-NIH (1 U.I.) y de híbridos I y II preparados como está descrito en la leyenda de la Fig 23. Al cabo de 3 h se determinó la concentración total de T por RIA. Los resultados están expresados en pg/10⁶ células intersticiales y representan el promedio ±SD de 3 determinaciones.

II) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFOLIPI DOMETILTRANSFERASA (FMT).

Habiendo demostrado que en células de Leydig intactas, las reacciones de metilación de FL son activadas específicamente por LH/hCG, en etapas tempranas de la interacción hormona - receptor, y que estas reacciones no son estimuladas por cAMP, se quiso evaluar la actividad fosfolípidometiltransferasa. Estos estudios enzimáticos, se realizaron en suspensiones libre de células, provenientes de células de Leydig incubadas en presencia de diferentes efectores, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

- 1) Efecto de S-adenosilhomocisteína (SAH) y de la adición exógena de fosfolípidos (FME) en la actividad de la enzima FMT.

La Fig. 24 muestra el efecto del inhibidor de la enzima FMT, S-adenosilhomocisteína (SAH), en la incorporación de grupos metilo. Se puede observar que la adición de 1mM de SAH al medio de incubación produce una inhibición de 81% en la metilación de FL.

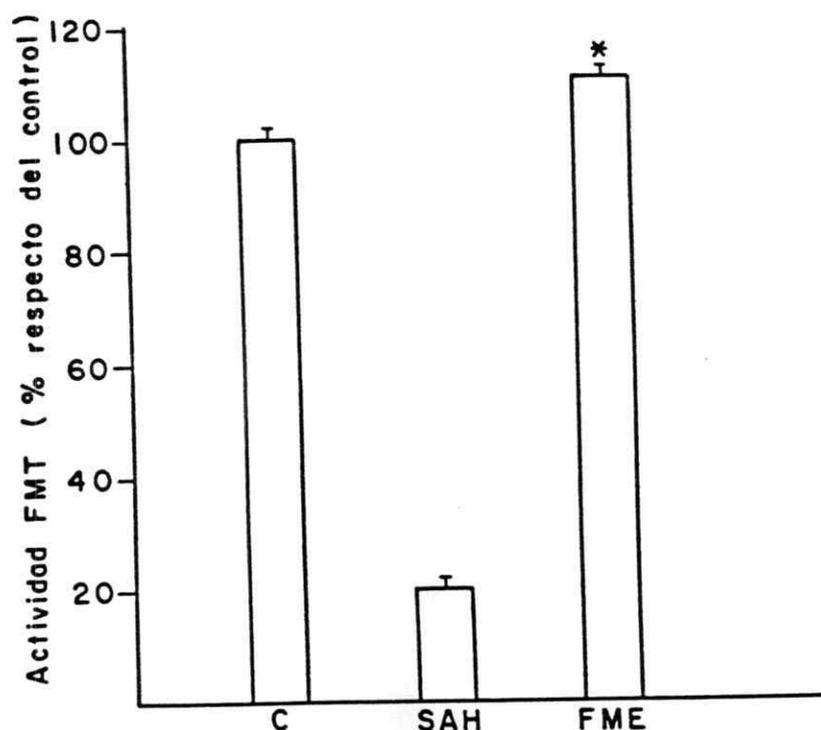


FIG. 24 EFECTO DE LA ADICION DE S-ADENOSILHOMOCISTEINA Y DE FOSFATIDILMONOMETILETANOLAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD FMT.

Las células de Leydig purificadas en gradiente de Percoll fueron congeladas a -70°C . La determinación enzimática se realizó agitando fuertemente las células descongeladas, hasta obtener una suspensión libre de células. Una alícuota de esta suspensión conteniendo aproximadamente 0.1 mg de proteína, fue incubada con $1\mu\text{Ci}$ de $^3\text{H-SAM}$ ($100\mu\text{M}$) (AE. 15 Ci/mmol), en presencia o ausencia de S-adenosilhomocisteína (SAH) (1mM) o de fosfatidilmonometiletanolamina (FME) 2.2 mM , por 30 min a 37°C . Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica. Los resultados de actividad enzimática están expresados en % respecto del control basal y representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

* $p < 0.001$ respecto del control.

Se consideró la posibilidad de que en los ensayos de actividad enzimática FMT existiera una concentración limitante de los sustratos fosfolipídicos de las reacciones de metilación que son los fosfolípidos de la membrana. Por esta razón se adicionó fosfolípido exógeno en el ensayo de actividad enzimática. Se agregó al medio de incubación fosfatidilmonometiletanolamina (FME), considerando que la formación de este producto es la etapa limitante de la reacción de metilación. Como se ve en la Fig. 24, la adición de FME exógeno produjo un aumento del 10% en la actividad enzimática FMT. Resultados similares fueron obtenidos al agregar fosfatidiletanolamina (FE) exógena a hepatocitos tratados con glucagón (Castaño y col., 1980).

2) Efecto de hCG y de sus subunidades individuales (ahCG y BhCG) en la actividad fosfolípidometiltransferasa.

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas para la medición de la actividad enzimática FMT in vitro, y habiendo demostrado que LH/hCG son capaces de estimular la incorporación de ^3H -metionina a fosfolípidos en células de Leydig intactas, se quiso estudiar si este aumento en la metilación de FL in vivo

estaba relacionado con un aumento de la actividad enzimática FMT.

En estos estudios, se preincubaron las células de Leydig por 30 min en presencia de medio de incubación y con agitación constante. Después de este tiempo, alícuotas de medio conteniendo hCG (1 UI), subunidad α (ahCG), subunidad β (β hCG) ó medio solo (controles) fueron agregados y se incubaron por 30 min. Después de este tiempo, los tubos fueron centrifugados a 10000 x g por 2 min y congelados a -70° C hasta su posterior determinación enzimática. La determinación enzimática se realizó como está descrito en materiales y métodos, con una concentración de proteína en un rango de 0.1 - 0.2 mg/tubo. Los resultados, expuestos en la Fig. 25 indican que hCG, ahCG y β hCG son capaces de estimular la actividad enzimática FMT siendo este efecto mayor para β hCG (1.9 ± 0.12 ; 2.55 ± 0.13 ; 3.25 ± 0.1 y 4.5 ± 0.12 pmol x min⁻¹ x mg prot⁻¹ de grupos metilo incorporados para los controles, con hCG, ahCG y β hCG respectivamente). Estos resultados no concuerdan exactamente con los estudios sobre la acción de las subunidades individuales de hCG en células intactas, ya que como demostramos, (Fig.23), la subunidad β (β hCG), fue capaz de estimular la incorporación de ³H-metionina a FL, en tanto que la subunidad α (ahCG) no causaba ese efecto.

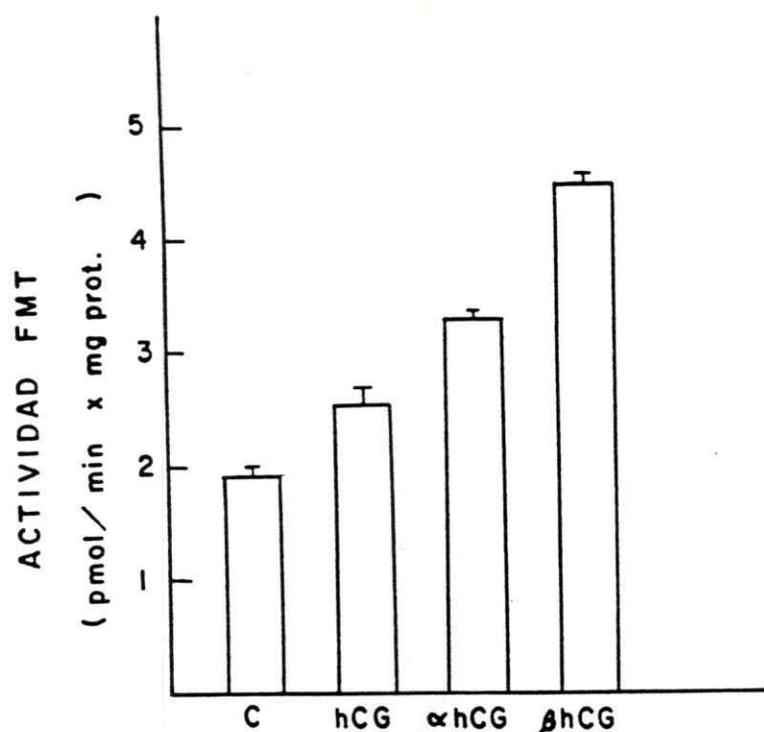


FIG. 25 EFECTO DE HCG Y DE LAS SUBUNIDADES α Y β DE LA HCG EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA FMT.

Aproximadamente 0.5×10^6 células de Leydig fueron preincubadas con medio M-199 por 30 min a 34°C con 95% CO_2 -5% O_2 . Luego, alícuotas de medio conteniendo hCG (1UI, AE. 3000 UI/mg), subunidad α (aprox. 0.5 UI), subunidad β (0.5 UI, AE. 29 UI/mg) ó medio (C), fueron agregados y se incubó por 30 min. Las células fueron congeladas a -70°C hasta la determinación enzimática. Para el ensayo enzimático, las suspensiones celulares fueron descongeladas, resuspendidas en el buffer del ensayo enzimático y agitadas vigorosamente hasta lograr una destrucción celular total. Una alícuota de la suspensión celular así obtenida (0.1 mg de proteína) fue incubada con 1 μCi de ^3H -SAM (100 μM , AE 15 Ci/mmol) por 30 min a 37°C . Posteriormente, se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica de acuerdo al método descrito anteriormente.

3) Efecto de análogos de cAMP y de activadores de la adenilato ciclasa sobre la actividad FMT.

Dada las enormes contradicciones descritas en la literatura, cuando se comparaban los estudios de incorporación de ^3H -metionina a FL en células intactas con los estudios de actividad enzimática FMT in vitro, y a nuestros resultados recientemente expuestos que indicaron que la incorporación de grupos metilo radioactivos en células intactas no era estimulada por cAMP, se estudió si la actividad de la enzima FMT in vitro estaba alterada por una incubación previa de las células de Leydig con cAMP. Para estos estudios, las células de Leydig fueron incubadas en presencia de 8-Br cAMP o forskolina (FK) de manera análoga al experimento anterior. En la Fig. 26 se observa que la enzima FMT puede activarse tanto en presencia de cAMP y de activadores de adenilato ciclasa, como en presencia de la hormona (1.8 ± 0.15 ; 2.6 ± 0.13 ; 3.55 ± 0.2 y 4.6 ± 0.25 pmol \times min $^{-1}$ \times mg prot $^{-1}$ para el control, con hCG, con 8-BrcAMP y FK respectivamente).

Estos resultados, como en el caso anterior, nos demuestran que las situaciones que ocurren en una célula intacta no siempre son extrapolables a los estudios in vitro, donde las condiciones experimentales son generalmente diferentes.

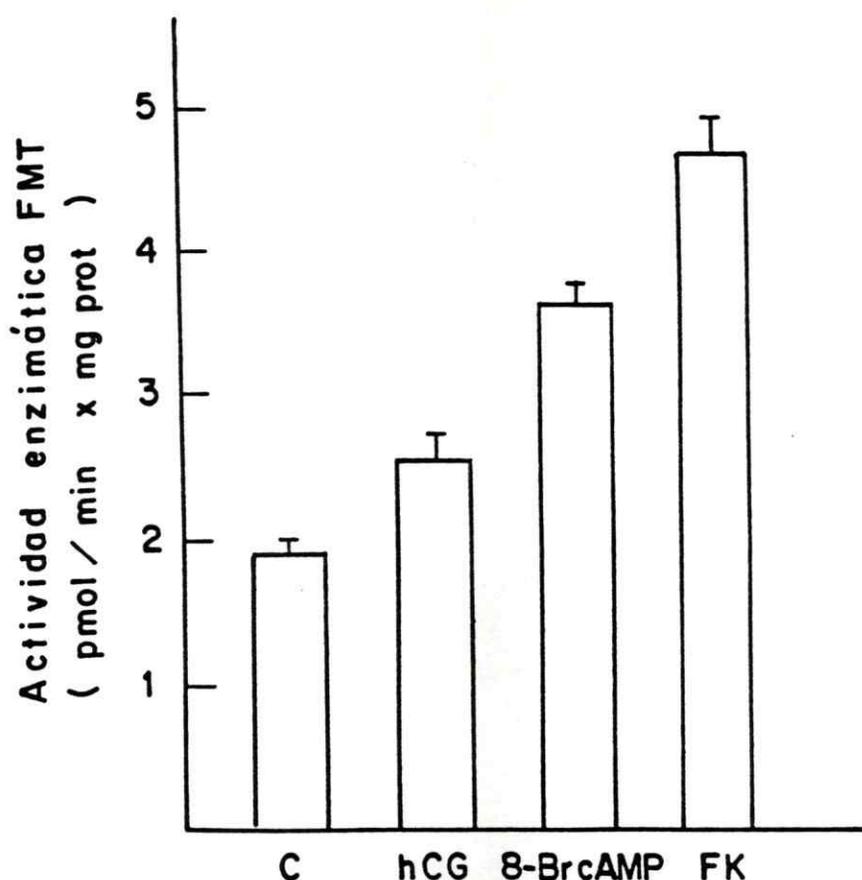


FIG 26 EFECTO DE ANALOGOS DE cAMP Y ACTIVADORES DE ADENILATO CICLASA EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA FMT.

Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig fueron preincubadas por 30 min con medio M-199. Posteriormente, se agregó medio de incubación (control), hCG (1 U.I, AE. 3000 UI/mg.), 8 - BrcAMP + MIX (0.1 mM) ó FK (5 μ M) y se incubó por 30 min a 34°C. Luego, los tubos fueron congelados hasta la determinación enzimática. Para el ensayo de la actividad enzimática, alícuotas de células descongeladas fueron resuspendidas en el buffer del ensayo enzimático y vigorosamente agitadas hasta destrucción celular total. La suspensión obtenida, conteniendo una concentración de proteína en un rango de 0.1-0.2 mg fue incubada por 30 min con 1 μ Ci de 3 H-SAM (100 μ M, AE. 15 Ci/mmol). Posteriormente, se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica de acuerdo a materiales y métodos. Los resultados expresan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

Habiendo caracterizado las reacciones de metilación de fosfolípidos y habiendo establecido que estos procesos forman parte de las respuestas tempranas de la LH/hCG, el objetivo siguiente, consistió en evaluar las reacciones de metilación de FL, como respuestas tempranas de la hormona, en la célula de Leydig desensibilizada.

III) ESTUDIOS EN RATAS DESENSIBILIZADAS.

1) Determinación de la concentración de receptores para LH/hCG.

Una vez establecido que:- la esteroidogénesis testicular inducida por gonadotrofinas es inhibida parcialmente por agentes que inhiben la metilación de FL y que - la síntesis de FL en células intactas es estimulada por LH/hCG en etapas tempranas de la interacción hormona-receptor, se quiso conocer si el proceso de regulación por pérdida de receptores (down - regulation), inducido por hCG in vivo, afectaba la metilación de fosfolípidos.

En la Fig. 27, se resumen los efectos que se producen en la célula de Leydig como consecuencia de la



FIG. 27 EFECTO DE UNA DOSIS DESENSIBILIZANTE DE HCG EN LA CONCENTRACION DE LOS RECEPTORES PARA LH.

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas sc. con 100 U.I. de hCG (AE. 11900 UI/mg). A los días indicados, se sacrificaron y se determinó la concentración total de receptores para LH presentes en las células de Leydig, según descrito en materiales y métodos.

Los resultados están expresados en ng de ¹²⁵I-hCG por 10⁶ células de Leydig, y representan el promedio \pm SD de 4 determinaciones.

administración de una dosis única de 100 UI de hCG. Se observa, que el número de receptores para LH/hCG expresado como ng de ^{125}I -hCG unida por 10^6 células de Leydig, está dramáticamente disminuido a partir del día 1 después de la inyección de hCG (de 4.5 ± 0.3 a 0.3 ± 0.1 ng/ 10^6 células de Leydig). Esta situación se mantiene hasta el día 6, donde se comienza a observar un pequeño aumento en el número de sitios de unión (0.8 ± 0.3 ng/ 10^6 células de Leydig) debido supuestamente a la síntesis de novo de receptores. Se observa a los 12 días después del tratamiento, una recuperación total de los sitios de unión para la 125 -hCG (4.6 ± 0.4 ng/ 10^6 células de Leydig).

La disminución en la capacidad de unión observada anteriormente, puede ser consecuencia de una internalización del complejo hormona-receptor o una ocupación de los receptores con la hCG administrada in vivo. En la Fig. 28, se analiza la concentración de receptores ocupados por la hormona mediante una técnica descrita en materiales y métodos. Los resultados indican que el primer día después de la inyección, un 80 % de los receptores está ocupado con la hormona no radioactiva (3.6 ± 0.2 ng/ 10^6 células de Leydig) y aproximadamente un 20 % de receptores se ha internalizado. Al día 2, un 24.4 % de los receptores se encuentra ocupado y un 71 % de los receptores se ha internalizado. En el día 3, casi el 90% de

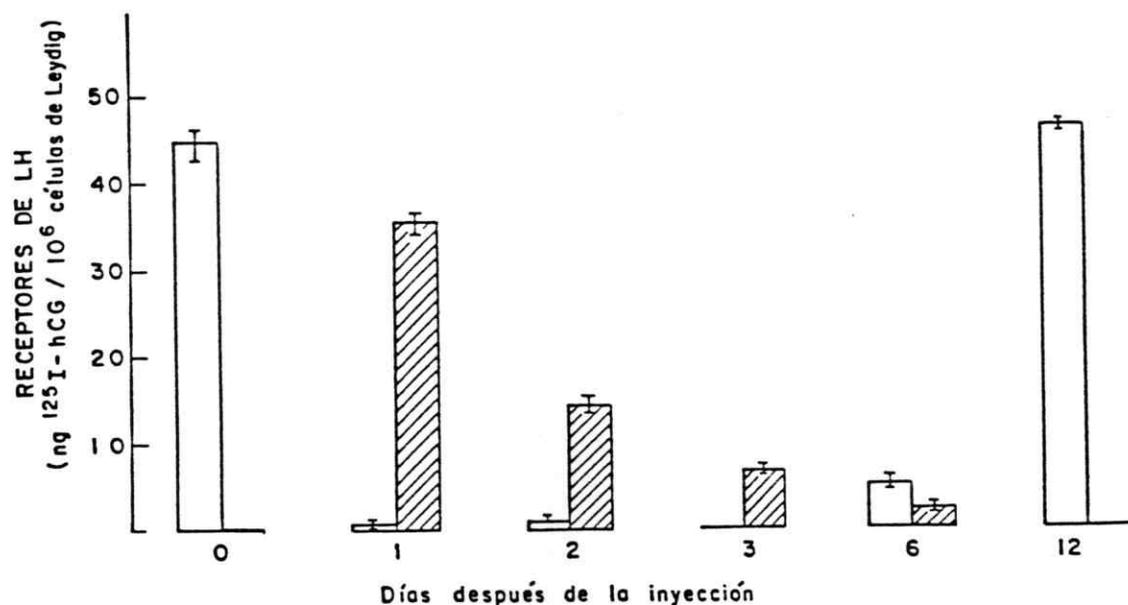


FIG. 28 EFECTO DE UNA DOSIS DESENSIBILIZANTE DE HCG EN LA CONCENTRACION DE LOS RECEPTORES OCUPADOS PARA LH.

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas sc. con 100 U.I. de hCG (AE. 11900 UI/mg). A los días señalados, se sacrificaron, se extrajeron los testículos los que fueron tratados con $MgCl_2$ de acuerdo a la técnica descrita en materiales y métodos, y se determinó la concentración de receptores ocupados y desocupados.

Los resultados expresan el promedio \pm SD de 4 determinaciones.

Las barras blancas representan la concentración de receptores libres, y las barras achuradas, la concentración de receptores ocupados por la hCG.

los receptores se ha internalizado (11 % de los receptores están ocupados por la hormona endógena) y en el día 6, el número de receptores ocupados es de $0.25 \text{ ng}/10^6$ células de Leydig, sin embargo, empieza a aparecer un número de receptores como producto de la síntesis de novo, que alcanza a $0.6 \text{ ng}/10^6$ células de Leydig. En el día 12, no se encuentran receptores ocupados por la gonadotropina y las células han recuperado la totalidad de los receptores.

2) Efecto de una dosis única de hCG (100 UI) sobre la metilación de fosfolípidos.

Mediante un protocolo experimental semejante al utilizado para analizar el efecto de hCG in vivo sobre la capacidad de unión de la ^{125}I -hCG, se analizó la incorporación de grupos metilo radioactivos en células de Leydig desensibilizadas. Los resultados expuestos en la Fig. 29, indican que la metilación de fosfolípidos está disminuída en el grupo de animales tratados con hCG. En el día 1 después de la inyección de hCG, la incorporación de ^3H -metionina fue de $0.18 \pm 0.013 \text{ pmol}/10^6$ células en 30 min de incubación. Este valor representa una disminución de un 40 % cuando se compara con la metilación en los

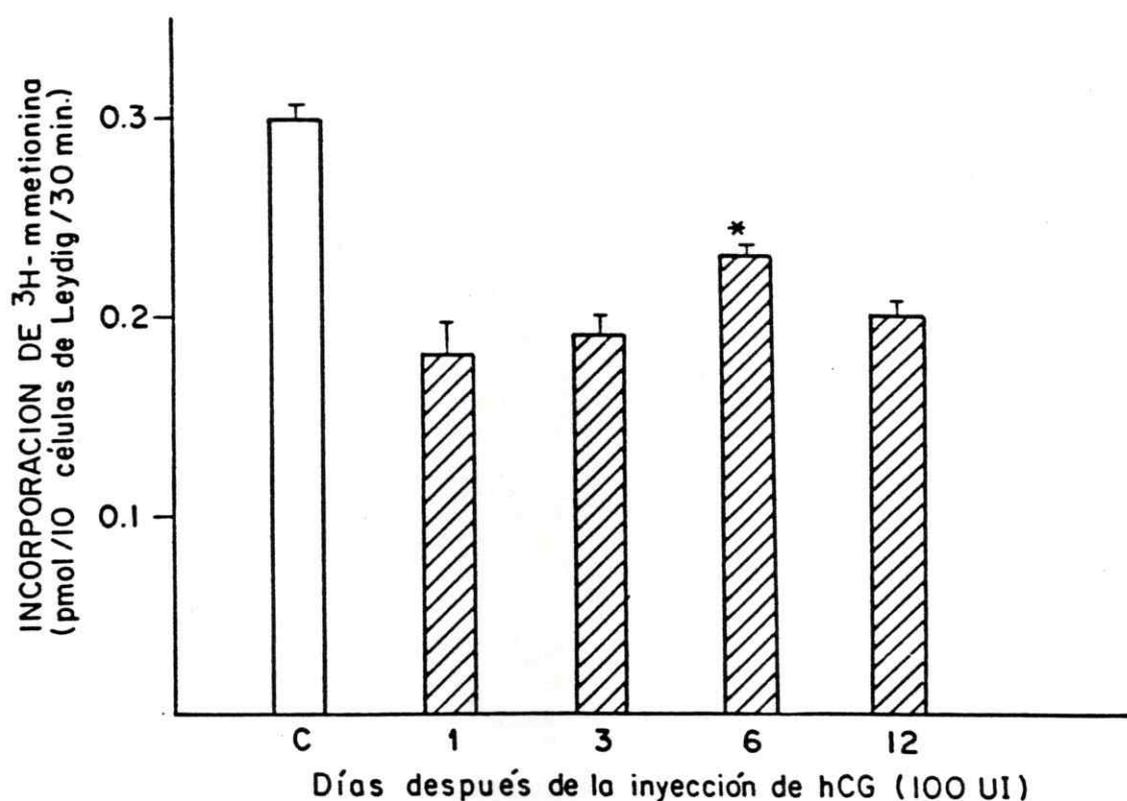


FIG. 29 EFECTO DE UNA DOSIS DESENSIBILIZANTE DE HCG EN LA INCORPORACION DE GRUPOS METILO A FL.

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas sc. con 100 U.I. de hCG (AE. 11900 UI/mg). A los días señalados se sacrificaron y purificaron las células de Leydig en gradiente de Percoll.

Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig se incubaron por 30 min con 10 μ Ci (21.3 μ M) de ³H-metionina. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica. Los resultados están expresados como pmoles de grupos metilo radioactivos incorporados por 10^6 células de Leydig en 30 min y representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

* $p < 0.02$ respecto del control

animales control (0.3 ± 0.006 pmol/ 10^6 células). Esta disminución en la metilación observada en el día 1 se mantiene en el día 3, 6 y 12 después del tratamiento (* $p < 0.02$).

Como se indicó anteriormente (Fig.13) la incorporación de ^3H -metionina a fosfolípidos en células intactas es estimulada por hCG, y casi lineal por 30 min de incubación; en cambio en ausencia de la hormona, la metilación es lineal solamente por 5 min. Era necesario entonces comparar la cinética de incorporación del precursor radioactivo en células tratadas con dosis altas de hormona. Los resultados (Fig. 30) demuestran que la disminución de la metilación en las células de Leydig desensibilizadas, se manifiesta tempranamente, ya que a los 10 min de incubación en presencia del precursor radioactivo, se observó una disminución significativa en la metilación de fosfolípidos. Esta situación se mantuvo durante 1 h de incubación.

Una de las características del fenómeno de desensibilización inducida por la administración aguda de una dosis suprafisiológica de hCG, es la ausencia de respuesta in vitro frente al mismo estímulo hormonal. En la Fig 31, se muestra la acción de 1 UI de hCG in vitro, en la incorporación de ^3H -metionina en las células de

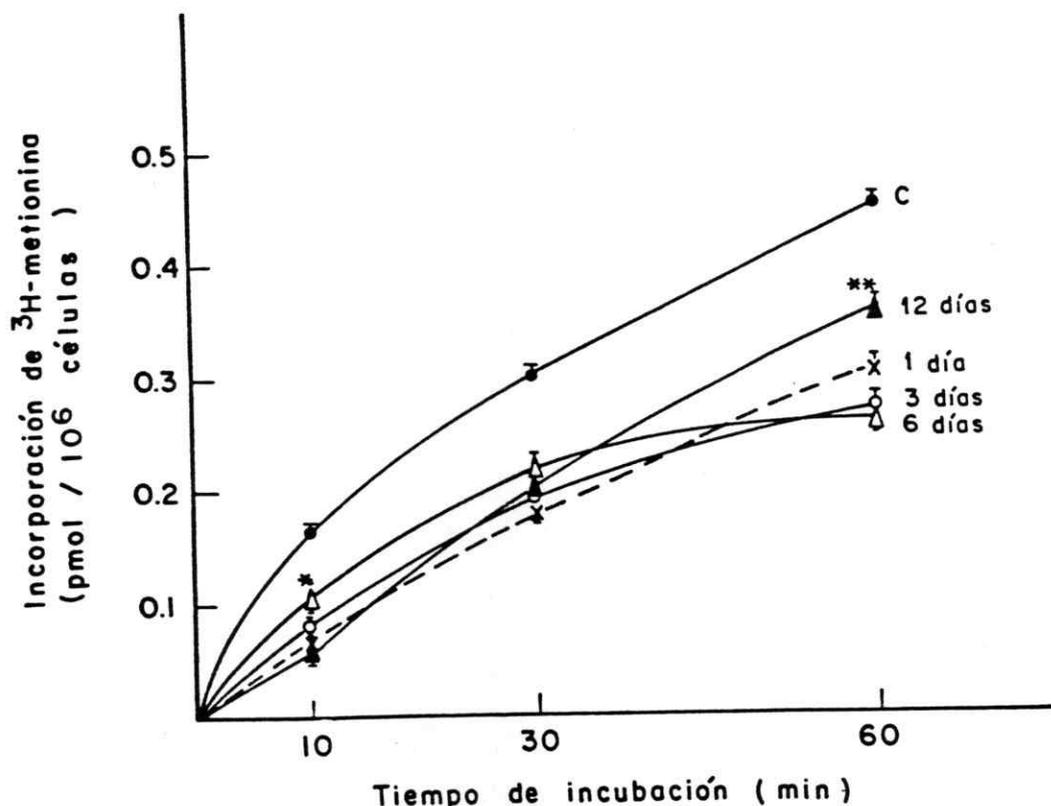


FIG. 30 INCORPORACION DE GRUPOS METILO RADIOACTIVOS A FL EN RATAS DESENSIBILIZADAS EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas sc. con 100 U.I. de hCG (AE.11900 UI/mg). A los días indicados en cada curva, se sacrificaron y se obtuvieron las células de Leydig en gradiente de Percoll. Aproximadamente, $0,5 \times 10^6$ células de Leydig se incubaron con 10 μ Ci de 3 H-metionina (21.3 μ M) durante los tiempos señalados. Los resultados están expresados en pmoles/ 10^6 células de Leydig, y representan el promedio \pm SD de 4 determinaciones. Cada curva indica la condición del animal del cual se extrajeron las células de Leydig inyección de 100 U.I. de hCG. C = control, sin tratamiento hormonal.

* $p < 0.002$ respecto del control respectivo

** $p < 0.01$ respecto del control respectivo

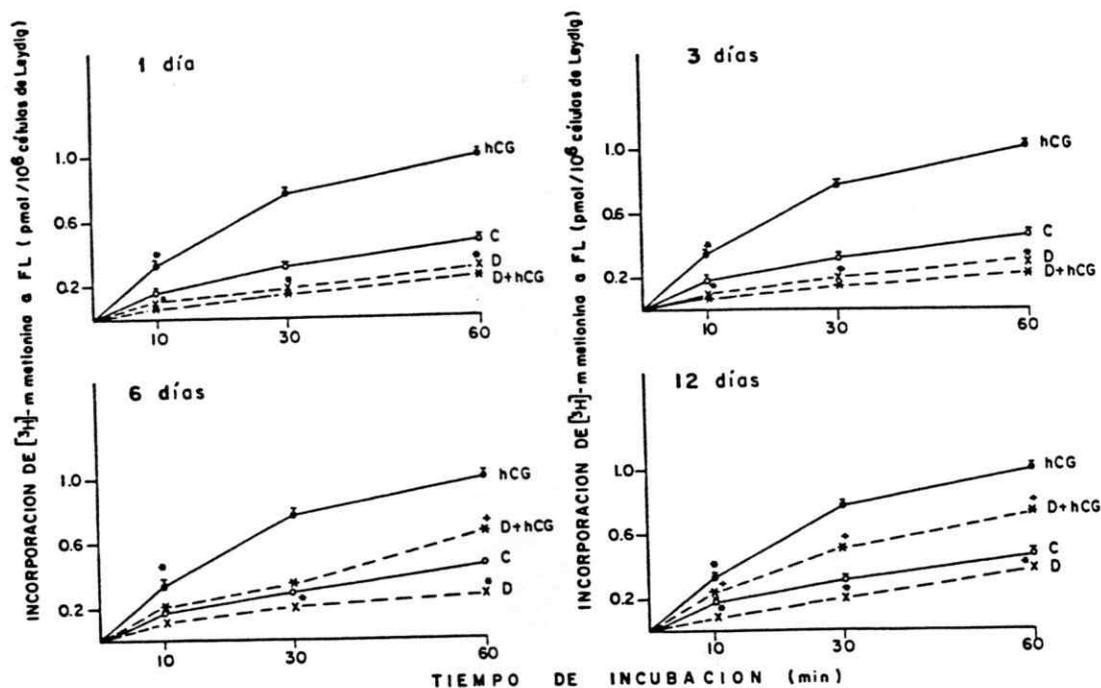


FIG. 31 INCORPORACION DE ^3H -METIONINA A FL EN RATAS DESENSIBILIZADAS EN PRESENCIA DE HCG IN VITRO.

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas sc. con 100 U.I. de hCG (AE. 11900 UI/mg). Al cabo de 1,3,6 y 12 días fueron sacrificadas y se obtuvieron las células de Leydig. Aproximadamente 0.5×10^6 células de Leydig fueron preincubadas por 10 min con 10 μCi (21.3 μM) de ^3H -metionina a 34°C . Luego se agregó medio de incubación (control) ó hCG (1 U.I., AE. 3000 UI/mg) y se incubó por los tiempos señalados. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica. Los resultados representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

C:control, D: desensibilizada,

* $p < 0.01$ respecto del control correspondiente

+ $p < 0.01$ respecto del animal desensibilizado en ausencia de hCG in vitro.

Leydig provenientes de animales previamente tratados con una dosis de 100 UI de hCG, (animales indicados como desensibilizados, D). Se observa que 1 UI de hCG es capaz de estimular la incorporación de grupos metilo solamente en células de Leydig provenientes de animales después del día 6 - 12 del tratamiento. La acción estimuladora de hCG después del 6° día de tratamiento se manifestó a los 60 min de incubación con la hormona y fue de 120%. La acción estimuladora después del 12° día, fue de 130%, 150% y 120% a los 10, 30 y 60 min de incubación respectivamente.

3) Determinación de la concentración intracelular de compuestos marcados con ^3H -metilo.

Una disminución de la metilación de FL como la observada en las células de Leydig proveniente de animales desensibilizados, podría ser consecuencia de al menos 2 factores : 1) una alteración en la permeabilidad de la metionina en las células de Leydig ó 2) una disminución de la enzima FMT.

Para descartar la primera posibilidad, se procedió a analizar la entrada de ^3H -metionina a las

células de Leydig. Este estudio se realizó cuantificando la cantidad de compuestos solubles marcados con grupos metilo radioactivos y la cantidad de ^3H -metionina incorporada a fosfolípidos. Las células de Leydig provenientes de animales control y tratados con una dosis de 100 UI de hCG después de 1 y 12 días, fueron preincubadas con 10 μCi de ^3H -metionina (21.3 μM) por 10 min y luego incubadas por 30 min. Al cabo de este tiempo, se extrajo la fracción lipídica con solventes orgánicos, en cuya fracción se determinó la incorporación de grupos metilo radioactivos. La fracción soluble proveniente de dicha extracción, fue analizada para determinar la concentración soluble de compuestos marcados con grupos metilo radioactivos. La cantidad total de radioactividad (radioactividad soluble e insoluble en solventes orgánicos) representa la entrada de metionina radioactiva a la célula.

Los resultados de este estudio se muestran en la Fig. 32, donde se indica la concentración total de grupos metilo radioactivos en la célula (a) y la concentración de grupos metilo incorporados a fosfolípidos (b). Se puede observar, que, en las células de Leydig desensibilizadas, la radioactividad total en la célula, es mayor que en las células de Leydig provenientes de animales control. Puesto que la incorporación de grupos metilo radioactivos a FL es menor en las células de Leydig

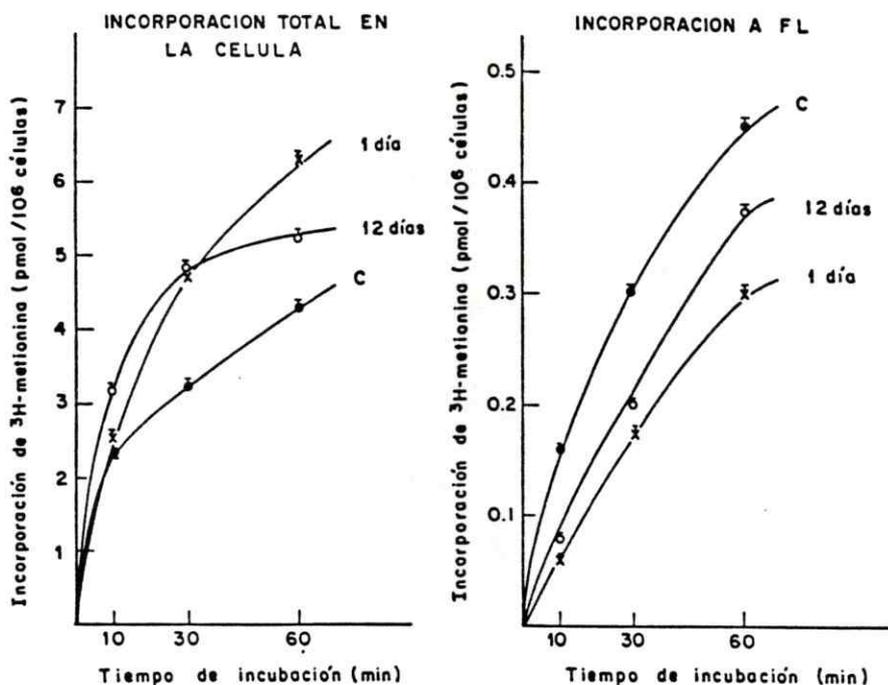


FIG. 32 ESTUDIO DE LA INCORPORACION DE METIONINA RADIOACTIVA A FOSFOLIPIDOS EN RELACION CON LA INCORPORACION TOTAL EN LA CELULA DE LEYDIG DE ANIMALES DESSENSIBILIZADOS.

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas con 100 UI de hCG (AE. 11900 UI/mg). Después de 1 y 12 días fueron sacrificadas y extraídas las células de Leydig en gradiente de Percoll. Aproximadamente 0.5×10^6 células fueron preincubadas por 10 min con 10 μ Ci de 3 H-metionina (21.3 μ M). Luego, se agregó medio de incubación ó 1 UI de hCG (AE 3000 UI/mg) hasta un volumen final de 0.5 ml. A los tiempos señalados, se detuvo la reacción con PBS-sac y se extrajo la fracción liposoluble. La fracción acuosa se juntó con las soluciones de lavado y se llevó a un volumen de 1.5 ml. Alícuotas de 0.2 ml fueron evaporadas a sequedad y se contó la radioactividad presente en dicha alícuota. El gráfico (a) representa la incorporación total de metionina radioactiva en la célula en función del tiempo de incubación (radioactividad en la fracción soluble e incorporación a FL). El gráfico (b) representa la incorporación de metionina radioactiva a FL. Los resultados representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

de animales desensibilizados, es posible que esta diferencia en la concentración intracelular del precursor radioactivo, sea consecuencia de una entrada aumentada del aminoácido en condiciones de desensibilización celular. Este efecto se manifiesta desde los primeros 10 min de incubación con ^3H -metionina, y se mantiene durante 1 h de incubación. Estos resultados descartan la primera posibilidad planteada al inicio de este estudio. Llama la atención que aún después de 12 días de la inyección desensibilizante, las células de Leydig no hayan recuperado totalmente las condiciones de "normalidad" en relación a la entrada de este aminoácido.

Es posible por lo tanto, que la disminución de la metilación observada en células de Leydig desensibilizadas sea consecuencia de una alteración de la actividad de la enzima FMT. Los estudios siguientes se referirán a este punto.

4) Actividad enzimática fosfolípidometiltransferasa en células de Leydig desensibilizadas.

Las células de Leydig perfundidas y purificadas provenientes de ratas inyectadas previamente 1,3 y 6

días antes con 100 U.I, de hCG fueron congeladas en N₂ líquido y acumuladas hasta obtener una cantidad suficiente para los análisis posteriores. Luego, alícuotas de suspensiones de células de Leydig desensibilizadas conteniendo entre 0.1 y 0.2 mg de proteína fueron incubadas para determinar la actividad enzimática responsable de la incorporación de metionina a lípidos. En la Fig. 33 se indica la comparación de actividades enzimáticas entre ratas control y ratas desensibilizadas. Se puede observar una disminución de la actividad enzimática solamente 3 días después de la inyección. No se observó cambios en la actividad a 1 y 6 días después de la desensibilización y la disminución observada a los 3 días fue de 37%. No se observa una relación entre estos resultados y aquellos obtenidos en células intactas, donde se observa una disminución de la incorporación del precursor radioactivo en todos los períodos estudiados.

El siguiente objetivo de este trabajo, consistió en estudiar si una respuesta tardía de la acción de la LH/hCG, como la síntesis de RNA, se encuentra modificada en la célula de Leydig desensibilizada.

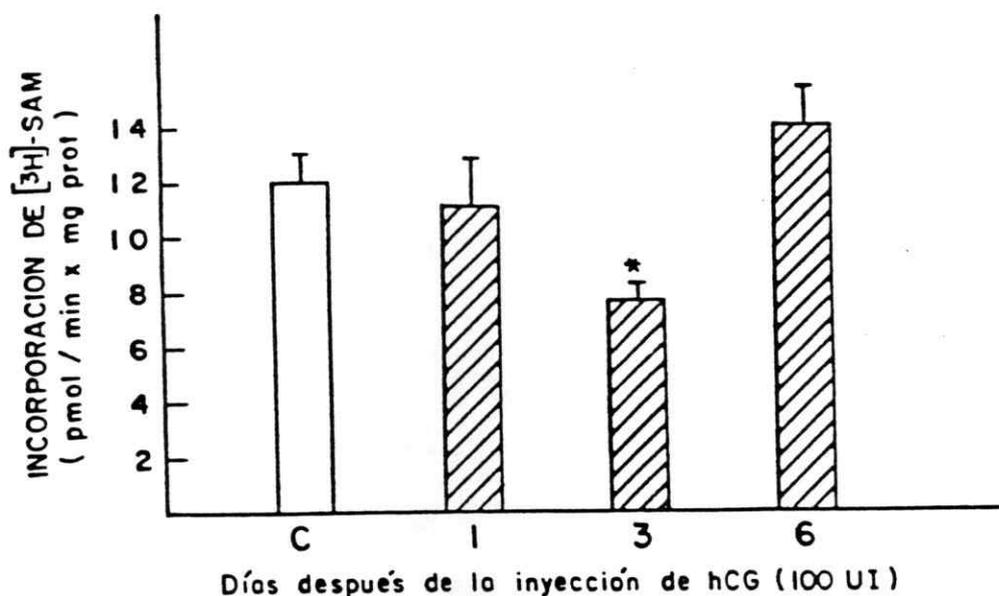


FIG. 33 ACTIVIDAD ENZIMATICA FMT EN CELULAS DE LEYDIG DESENSIBILIZADAS.

Ratas macho de 60 días fueron desensibilizados con 100 U.I. de hCG. Al cabo de 1,3 y 6 días fueron sacrificados y aisladas y purificadas las células de Leydig en gradiente de Percoll. Alícuotas de homogenizados de células de Leydig conteniendo 0.1-0,2 mg. de proteínas fueron incubadas con una mezcla de ^3H -SAM y SAM frío (100 μM) (1 μCi) por 30 min a 37 °C. Se determinó la radioactividad presente en la fracción lipídica de acuerdo a materiales y métodos. Los resultados representan el promedio \pm SD de 3 determinaciones.

* $p < 0.005$ respecto del control

IV) ESTUDIOS DE SINTESIS DE RNA EN CELULAS DE LEYDIG.

Dado que: a) la síntesis de RNA y de proteínas son prerequisites para la esteroidogénesis testicular (Mendelsohn y col., 1975; Reddy y Ville, 1975), b) la síntesis de RNA en ratas inmaduras es estimulada por LH/hCG (Valladares y Ronco, 1984) y c) la metilación de FL se encuentra alterada en animales desensibilizados con una dosis única de 100 U.I. de hCG (esta tesis), la siguiente etapa en este trabajo fue estudiar los procesos de síntesis de RNA relacionados con el fenómeno de desensibilización.

1) Efecto de una inyección de 100 UI de hCG en la síntesis de RNA en células de Leydig.

Las células de Leydig provenientes de animales tratados después de 1, 3, 6 y 12 días, fueron purificadas en un gradiente de metrizamida y se determinó la incorporación de ^3H -uridina a RNA según el método de Grootegoed (Grootegoed y col., 1977) y como está descrito en materiales y métodos.

Como se puede ver en la Tabla IV, la condición fisiológica de desensibilización produce una disminución gradual en la incorporación de ^3H -uridina a RNA la que se hace crítica a los 2 días después de la inyección de hCG (27 ± 1.8 % de la síntesis de RNA control). Posteriormente comienza una recuperación paulatina la que se hace evidente a los 12 días después de la dosis desensibilizante ($97 \pm 6.0\%$ del control).

2) Efecto del tiempo de incubación en la incorporación de ^3H -uridina a RNA en ratas desensibilizadas.

La Fig.34 muestra un estudio a diferentes tiempos después de la inyección de hCG en los cuales se midió la incorporación de ^3H -uridina después de 1,2 y 3 h de incubación. Se puede observar que tanto a los 2,3 y 6 días después de la inyección, la cinética de incorporación de ^3H -uridina a RNA en relación al control se manifiesta siempre más lenta, si bien esta diferencia se atenúa a los 6 días después de la inyección. A los 12 días post-inyección, no existe diferencia en la incorporación de uridina, a todos los tiempos de incubación estudiados, entre los animales control y los animales tratados.

TABLA IV EFECTO DE UNA DOSIS DESENSIBILIZANTE DE HCG EN LA SINTESIS DE RNA.

| DIAS DESPUES DE LA INYECCION | INCORPORACION DE $[^3\text{H}]$ URIDINA A RNA (%) | | |
|------------------------------|---|----|-----|
| | 0 | 50 | 100 |
| 0 | 100 ± 4.3 | | |
| 1 | 92 ± 7.5 | | |
| 2 | 27 ± 1.8 | | |
| 3 | 37 ± 1.4 | | |
| 6 | 64 ± 4.2 | | |
| 12 | 96 ± 3.5 | | |

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas sc. con una dosis de 100 U.I. de hCG. Al cabo de 1,2,3,6 y 12 días se sacrificaron y se purificaron las células de Leydig en gradiente de Metrizamida (0-40%). Aproximadamente, 0.5×10^6 células de Leydig se preincubaron por 1 h y luego se incubaron con 5 μCi de ^3H -uridina por 3 h. Se determinó la incorporación de radioactividad a material insoluble en ácido de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los resultados expresan el % de incorporación respecto del control y representan el promedio \pm SD de experimentos en triplicado.

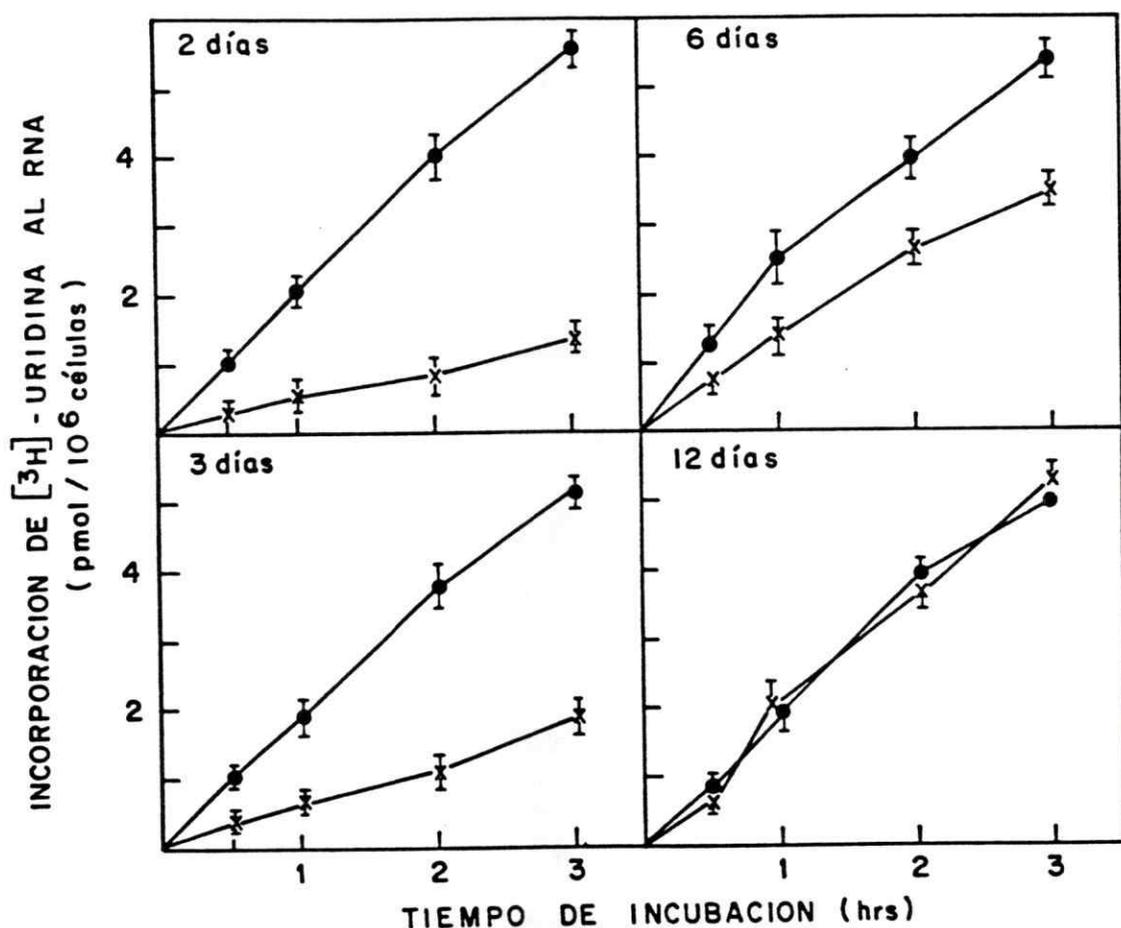


FIG. 34 SINTESIS DE RNA EN CELULAS DE LEYDIG DESENSIBILIZADAS EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION.

Ratas macho de 60 días fueron desensibilizadas con una dosis única de 100 UI de hCG. Al cabo de 2,3,6 y 12 días, se sacrificaron, y se purificaron las células de Leydig. Aproximadamente 0.5×10^6 células de Leydig de ratas control y desensibilizadas fueron preincubadas por 1 h y luego incubadas con 5 μ Ci de ³H-uridina por tiempos variables.

Se determinó la radioactividad presente en la fracción insoluble en ácido de acuerdo a materiales y métodos. Los resultados representan el promedio \pm SD de experimentos en triplicado o-o: control; x-x desensibilizados

3) Efecto de la desensibilización en la permeabilidad de la uridina.

Para determinar si la disminución de la incorporación de ^3H -uridina a RNA observada durante el tratamiento de desensibilización era consecuencia de una disminución en la entrada de la uridina a la célula, se analizó la entrada de ^3H -uridina a la célula en los días 1, 3, 6 y 12 días después de la inyección de una dosis desensibilizante de hCG. Los resultados se muestran en la Tabla V, donde se compara la incorporación de ^3H -uridina a RNA y la entrada de la uridina radioactiva a la célula, en las ratas control y desensibilizadas después de 2, 3, 6 y 12 días. Se observa que si bien la síntesis de RNA se ve alterada como consecuencia de la desensibilización, esto no sería consecuencia de una disminución en la entrada del precursor radioactivo.

4) Estudio comparativo entre número de receptores para LH, producción de T y síntesis de RNA en animales desensibilizados.

Como se puede observar en la Tabla VI, la disminución de la incorporación de uridina observada en

TABLA V EFECTO DE LA DESENSIBILIZACION EN LA ENTRADA DE URIDINA A LAS CÉLULAS DE LEYDIG

| Tiempo de acción de la hCG (días) | [³ H]-uridina (pmoles/10 ⁶ células) | |
|-----------------------------------|--|------------|
| | Incorporación a RNA | Entrada |
| 0 | 5.40 ± 0.2 | 16.3 ± 1.1 |
| 2 | 1.05 ± 0.1 | 17.2 ± 0.9 |
| 3 | 1.85 ± 0.2 | 16.4 ± 1.4 |
| 6 | 3.47 ± 0.2 | 15.9 ± 1.3 |
| 12 | 5.02 ± 0.1 | 16.7 ± 1.6 |

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas con una dosis sc. de 100 UI de hCG (AE. 11900 UI/mg). A los tiempos señalados se sacrificaron, extrajeron las células de Leydig las que fueron purificadas en gradiente de metrizamida. Alícuotas de células de Leydig conteniendo 0.7×10^6 células se incubaron en presencia de ³H-uridina durante 3 h. Al cabo de este tiempo, las células se precipitaron con HClO₄. El sobrenadante de esta precipitación junto con la solución de los lavados fue analizada para la determinación de la radioactividad soluble. Una alícuota de 1 ml de esta solución fue agregada a un vial de conteo para determinar la radioactividad presente. La entrada de uridina radioactiva en células intactas, se determinó sumando la radioactividad presente en la fracción soluble con la radioactividad incorporada a RNA al cabo de 3 h de incubación. Los resultados representan el valor promedio ±SD de tres experimentos en triplicado.

TABLA VI ANALISIS COMPARATIVO ENTRE NUMERO DE RECEPTORES PARA LH, PRODUCCION DE TESTOSTERONA Y SINTESIS DE RNA EN RATAS DESENSIBILIZADAS

| Días después del tratamiento de hCG | Unión de ^{125}I -hCG ng/ 6 Cél de Leydig | Producción de Testosterona (% control) | | | Incorporación de ^3H -uridina % control |
|-------------------------------------|---|--|---------|-----------|--|
| | | Control | hCG | (db cAMP) | |
| 0 | 4.5±0.3 | 100± 6 | 1070±86 | 990±120 | 100±4.3 |
| 1 | 0.3±0.1 | 250±12 | 286± 9 | 395± 56 | 92±7.5 |
| 2 | 0.2±0.1 | 270±14 | 320±12 | 296± 25 | 27±1.8 |
| 3 | 0.1±0.1 | 270±13 | 300±10 | 310± 18 | 37±1.4 |
| 6 | 0.8±0.3 | 100± 9 | 650±56 | 770± 41 | 64±4.2 |
| 12 | 4.6±0.4 | 100± 8 | 979±14 | 1170±120 | 97±6.0 |

Ratas macho de 60 días fueron inyectadas con 100 UI de hCG (AE. 11900 UI/mg). A los tiempos señalados fueron sacrificadas, extraídas las células de Leydig y purificadas en gradiente de metrizamida. Una alícuota conteniendo 0.5×10^6 células fue incubada durante 3 h en presencia de medio (control), hCG (1 UI, AE.11900 UI/mg) o de dibutiril cAMP en presencia de MIX (1 mM). Al cabo de ese tiempo, se determinó la producción de T por RIA. Una alícuota de 0.5×10^6 células fue preincubada por 1 h y luego incubada por 3 h en presencia de 5 μCi de ^3H -uridina y posteriormente, se determinó la incorporación del precursor en material insoluble en ácido. Una alícuota de células de Leydig fue incubada por 90 min con 0.1 ng de $^{125}\text{I}_2$ (AE. 58 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, para determinar el número de sitios de unión. Los resultados representan el promedio de por lo menos 5 experimentos en triplicado.

animales tratados es concomitante con la disminución de la población de receptores para LH/hCG, y la disminución de la producción de T estimulada por hCG ó dbcAMP. Aunque se puede observar que 1 día después de la inyección ,el número de receptores ha disminuído notablemente (de 4.5 a 0.3 ng/10⁶ cel) como así también la síntesis de T estimulada por hCG y dbcAMP, (las que disminuyen de un 1000% a 286 y 395% respectivamente), la incorporación de uridina sólo ha disminuído un 8%, lo que indica que existiría un desfase en este parámetro funcional, indicando que se trata de un proceso más lento.

5) Caracterización de los RNA sintetizados.

Se estudió en una columna de poli-U Sepharosa la proporción de RNA poliadenilados provenientes de animales controles y tratados después de 3 días con una dosis única de 100 UI de hCG. Se puede observar en la Tabla VII, la cantidad de RNA no unido y RNA poliadenilado encontrados después de colocar los RNA extraídos en una columna. La recuperación de RNA total en las células tratadas con hormona es 26% del valor obtenido con células no tratadas, un resultado esperado en base a las observaciones previas (Tabla IV). Por otro lado, la razón -Poli

TABLA VII CARACTERIZACION DE LOS RNA SINTETIZADOS DESPUES DE 3 DIAS DE UNA INYECCION DE HCG (100 U.I.)

| | <u>[³H] - Uridina (pmoles/100 µg RNA)</u> | |
|--------------|--|----------|
| | Controles | Tratadas |
| RNA no unido | 26.7 | 8.6 |
| Poli(A) RNA | 16.2 | 2.7 |

Los RNAs poliadenilados se separaron en una columna de Poli-U-Sepharosa a partir de un extracto de 145 µg de RNA provenientes de aproximadamente 4×10^6 células de Leydig de ratas control y desensibilizadas (3 días después de la inyección con 100 U.I. de hCG). La fracción no unida se determinó lavando la columna con buffer NETS y el material poliadenilado se eluyó con tampón conteniendo 90% de formamida, como está descrito en métodos.

A/ +Poli A es el doble en las células tratadas, indicando una disminución relativa importante en la expresión de este tipo de RNA.

DISCUSION

Se ha observado que LH/hCG gatilla en la célula de Leydig de rata respuestas tempranas como son el transporte de iones, metabolismo de carbohidratos y esteroidogénesis y respuestas tardías como la síntesis de RNA y proteínas, el crecimiento celular, la síntesis de DNA y la división celular (Catt y col., 1980). En este trabajo se ha demostrado, de acuerdo a los objetivos generales planteados, que tanto las respuestas tempranas como las tardías se encuentran alteradas por la desensibilización que induce hCG en células de Leydig.

El primer objetivo específico de esta tesis fue caracterizar las reacciones de metilación de FL como respuesta temprana de LH/hCG. Nos pareció interesante estudiar esta respuesta 1) porque se ha propuesto que la metilación de FL estaría involucrada en la transducción de la señal hormonal, ya que diversas hormonas y agonistas aumentan el recambio de ciertos FL de la membrana plasmática; por ejemplo, glucagón, vasopresina y angiotensina activan la FMT en hepatocitos aislados (Alemany y col., 1981), estradiol activa la FMT en membranas de pituitaria (Drouva y col., 1986), β -adrenérgicos estimulan la incorporación de $^3\text{H-SAM}$ en eritrocitos (Hirata y Axelrod, 1980)

2) porque en células de Leydig , estudios de Nieto y Catt, (1983) informaron una elevada actividad de la enzima FMT .

La función de las reacciones de metilación de FL en células de Leydig fue explorada con: 1) el uso de inhibidores de las reacciones de metilación de FL; 2) la incorporación de metionina radioactiva a FL en células de Leydig intactas y 3) la incorporación de grupos metilo desde S-adenosilmetionina (SAM) radioactiva para determinar la actividad fosfolípidometiltransferasa (FMT) en suspensiones libre de células provenientes de células de Leydig tratadas previamente con diferentes agonistas.

Primeramente se estudió la participación de las reacciones de metilación de FL en la elaboración de la respuesta esteroidogénica de la célula de Leydig utilizando 3-DZA, un inhibidor de las reacciones de metilación particularmente efectivo para fosfolípidos (Chiang y col., 1980). Los resultados demuestran que 3-DZA en una concentración de 100 μ M, inhibe aproximadamente un 50% de la producción de T estimulada por hCG (Fig. 11), si bien la inhibición de las reacciones de metilación fue de 100% (Fig.12). Resultados similares fueron descritos por Milvae y col., (1983), quienes observaron que en células lúteas, la adición de 3-DZA inhibía aproximadamente el 50% del efecto estimulatorio de LH sobre la producción de progesterona.

Si la estimulación hormonal causa esteroidogénesis a través de las reacciones de metilación de FL, el 50% de esteroidogénesis persistente podría ser inducida por segundos mensajeros cuya producción no se ve afectada por los inhibidores de metilación. Aunque en nuestro laboratorio se ha encontrado que 3-DZA produce en células de Leydig una disminución de la producción de cAMP estimulado por hCG (Rojas, 1985), es bastante conocido el hecho que para la producción de T se requieren niveles intracelulares muy pequeños de cAMP (Catt y col., 1980; Browne y Bhalla, 1991). Por otro lado, hay evidencias experimentales de que la acción esteroidogénica de LH/hCG en células de Leydig está mediada por proteínas quinasas dependientes de fosfolípidos y de Ca^{+2} -calmodulina (Lin, 1985; Themmen y col., 1985 a, 1985 b) además de proteínas quinasas dependientes de cAMP.

Una posibilidad que no se puede descartar es que las reacciones de metilación se encuentren localizados en distintos compartimentos membranosos de la célula de Leydig y que sólo las metilaciones de FL asociadas a los receptores de LH/hCG, afecten la producción de testosterona.

Los estudios de incorporación de metionina radioactiva a FL se realizaron en extractos liposolubles

provenientes de toda la célula. La condición experimental ideal habría requerido membranas plasmáticas aisladas relativamente puras, sin embargo, la técnica de purificación de células que se utiliza no permite obtener concentraciones elevadas de células altamente purificadas. Es posible que las reacciones de metilación no estén directamente relacionadas, o no sean necesarias para la estimulación de la esteroidogénesis y que el 50% de inhibición de la producción de T observada en presencia de 3-DZA, afecte otra vía metabólica. Se ha postulado que 3-DZA afecta la regeneración de tetrahidrofolato para la síntesis de purinas y pirimidinas (Kim y col., 1982) o la integridad del citoesqueleto, ya que imita a los agentes que depolimerizan microtúbulos y microfilamentos (Zimmerman y col., 1984; Zor, 1983). Por último, aunque 3-DZA inhibe principalmente la metilación de FL, no se puede descartar además, una inhibición en las metilaciones de proteínas y ácidos nucleicos (Chiang y col., 1980). Sin embargo, estas posibilidades son poco probables, ya que resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que el efecto inhibitorio de 3-DZA en la esteroidogénesis, es revertido en presencia de dibutiril cAMP y toxina del cólera (Rojas, 1985).

La siguiente etapa consistió en estudiar si las reacciones de metilación de FL constituyen una respu-

esta temprana de la célula de Leydig a la acción de LH/hCG. Estos estudios se realizaron analizando la incorporación de ^3H -metionina en células de Leydig intactas, y los resultados señalan que tanto LH como hCG estimulan significativamente la incorporación de metionina radioactiva a los fosfolípidos de las membranas celulares (Fig.13). Estos resultados demuestran por primera vez que las metilaciones de FL en la célula de Leydig responden tempranamente a la acción de LH/hCG.

La acción estimuladora de las gonadotrofinas sobre la metilación de FL observada en este trabajo, está de acuerdo con estudios similares realizados en diversos tejidos y tipos celulares, en los cuales se ha observado que varias señales extracelulares, cuyos receptores se encuentran localizados en la membrana celular, estimulan las reacciones de metilación de FL (Geelen y col., 1979; Marin-Cao y col., 1983; Munzel y Koschel, 1982; Crews y col., 1980; Alemany y col., 1980; Izhizaka y col., 1980; Pfenninger y Johnson, 1981; Hook y col., 1982; Cordasco y col., 1981).

Sin embargo, nuestros resultados difieren de aquellos publicados por Moger (1985), quien no observó efecto de LH en la incorporación de metionina radioactiva a FL en células de Leydig intactas. Es posible que esta

discrepancia sea consecuencia de las distintas condiciones experimentales utilizadas en ambos estudios. Moger utilizó un sistema experimental en el cual se incubaron las células de Leydig en presencia de 0.2 μM de ^3H -metionina. Es probable que esta concentración sea insuficiente ya que el aminoácido debe entrar a la célula para convertirse en SAM, sustrato dador de grupos metilo. En nuestros experimentos, se utilizó una concentración que está en relación con las concentraciones de metionina encontradas en el medio intracelular de algunos tejidos (20 μM) (Lopez-Tejero y col., 1987).

En otros tejidos también se han encontrado resultados contradictorios cuando se estudia la incorporación de ^3H -metionina; en hepatocitos estimulados con glucagón, se ha observado estimulación (Geelen y col., 1979) o ausencia de efecto sobre la metilación de FL (Schanche y col., 1982), y las razones para tales diferencias no son satisfactorias.

La activación hormonal de la incorporación de metionina radioactiva en función del tiempo de incubación, reveló que se trata de un proceso rápido , ya que es detectado en los primeros minutos de incubación con la hormona (Fig. 13). Estos resultados están sugiriendo además, que existe una relación de temporalidad semejante

entre el proceso esteroidogénico y la metilación de FL. Ambos procesos se estimulan aproximadamente a los 10 min de incubación con la hormona. Considerando que las reacciones de metilación son necesarias para la obtención de una parte de la producción de T, se debería haber esperado una respuesta de metilación previa a la síntesis de T, pero las metodologías utilizadas para detectar ambos procesos son muy diferentes, y la sensibilidad para detectar variaciones a través del tiempo es mayor para la determinación de esteroides. Es interesante mencionar los estudios de Nieto y Catt (1983), ya que éstos demostraron que en células de Leydig, la hCG estimulaba la actividad FMT a los 5 min de incubación con la hormona.

El efecto máximo de hCG y LH en la respuesta de metilación, se logra con una concentración de 100 mUI (Fig. 15 y 16). La concentración de LH y hCG necesaria para lograr la mitad de la respuesta máxima en la metilación de FL (EC_{50}) fue semejante para ambas hormonas (7.5 mUI y 8 mUI para hCG y LH respectivamente).

Sin embargo, cuando se comparó la EC_{50} de hCG en la producción de testosterona, ésta fue de 2 mUI, es decir se requiere 4 veces menos concentración de hCG para lograr la mitad de la respuesta máxima en la síntesis de T. Así mismo, es interesante comentar, que a

la concentración de hCG necesaria para lograr la mitad de la respuesta máxima en la síntesis de T, no se observa estimulación en las reacciones de metilación de FL. Estas observaciones implican que la ocupación de un pequeño número de receptores (10%) por LH/hCG, serían suficientes para activar la síntesis de T pero no para obtener una respuesta máxima de metilación. La estimulación de la incorporación de ^3H -metionina a FL, se observa con niveles más altos de hormona, lo que podría indicar que diferentes mecanismos intracelulares gobiernan estos dos procesos o que la sensibilidad del método de detección de la incorporación de metionina radioactiva no permite detectar respuestas con niveles menores de hormona. Según nuestros resultados, el aumento de metilaciones sería proporcional al número de receptores ocupados por la hormona. A una concentración de 100 mUI, donde se obtiene una cantidad máxima de reacciones de metilación de FL, se esperaría que todos los receptores de LH estén ocupados por la hormona. Una posibilidad interesante de considerar es que los receptores de LH que están en exceso, ("receptores de reserva") tengan un papel funcional para la obtención de respuestas que no estén relacionadas directamente con la producción de T (Bhalla y col., 1987).

Un aspecto importante de analizar, en relación a esto, es lo que se refiere al efecto de las reac-

ciones de metilación de FL en el control del número de receptores celulares (Strittmatter y col., 1979; Bhattacharya y Vonderhaar, 1979). En la literatura se encuentra que al utilizar inhibidores de las metilaciones, el número de receptores de LH/hCG está alterado (Papadopoulos y col., 1987); del mismo modo, la presencia del sustrato de las enzimas FMT (SAM) produce un aumento del número de receptores de LH/hCG (Solano y col., 1987). Nosotros demostramos en células de Leydig, que 3-DZA producía un 25% de disminución de los sitios receptores de LH/hCG, sin modificar la constante de asociación (Llanos y col., 1985). Estos resultados sugieren que LH/hCG al interactuar con su receptor específico, activaría las enzimas FMT desenmascarando receptores de la superficie, lo que conduciría a un aumento del número de receptores (up-regulation) (Baraño y Dufau, 1983).

Según el esquema de las reacciones de metilación de fosfolípidos, la fosfatidiletanolamina (FE) recibe tres grupos metilo para convertirse en fosfatidilcolina (FC) a través de los intermediarios fosfatidilmonometiletanolamina (FME) y fosfatidildimetiletanolamina (FDE). En células de Leydig, FME, FDE y FC son los fosfolípidos preferentemente metilados; no se observa metilación de otros fosfolípidos como lisofosfatidilcolina (LFC) (Fig. 19). Si se compara la cantidad de los 3 FL

metilados en condiciones basales, se puede observar, que FME es el que se produce en menor concentración, y que los FL que se obtienen en mayor cantidad son FDE y FC. Ya que la enzima es de tamaño pequeño (Vance y Ridgway, 1988), es probable que FME y FDE compitan por un mismo sitio activo. En estudios cinéticos de la enzima FMT aislada de hepatocitos, se encontró que la metilación inicial de la FE es la etapa limitante y que una vez que FE es metilada, el producto FME se convierte a FC preferentemente a la metilación de una nueva molécula de FE (Vance y Ridgway, 1988). Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados en células de Leydig, donde se obtiene un nivel bajo de producción de FME.

La estimulación hormonal produce un recambio mayor de los FL metilados y como se muestra en la Fig.19, el principal producto de la acción de hCG es FME, indicando que la hormona estimula la etapa limitante de la secuencia de reacciones de metilación.

Antecedentes de la literatura, utilizando SAM radioactivo como agente dador de grupos metilo, describen que en células de Leydig, FME es el FL que se metila en mayor proporción en presencia de 8-BrcAMP (Nieto y Catt, 1983). Resultados semejantes se encontraron en otros sistemas, como espermatozoides capacitados (Llanos y

Meizel, 1983), hepatocitos tratados con glucagón (Castaño y col., 1980) y en plaquetas, donde la distribución de los FL metilados resultó ser dependiente de la concentración de SAM utilizada en las incubaciones de membranas con este precursor radioactivo (Hotchkiss y col., 1981). Estos antecedentes señalan que una parte importante de los FL de la membrana son metilados por estas reacciones y que el recambio aumenta después del estímulo hormonal.

La posibilidad que el proceso esteroidogénico y las reacciones de metilación de FL estén relacionados, permite considerar que diferentes metabolitos esteroidales producidos durante la activación de la vía esteroidogénica están, de alguna forma, modulando las reacciones de metilación de FL. Sin embargo, no se observó alteración en la incorporación de ^3H -metionina en respuesta a la acción in vitro de los diferentes precursores de la síntesis de T que se utilizaron (Fig. 20).

Se ha demostrado que existen diversas señales externas capaces de regular la respuesta esteroidogénica de las células de Leydig (Tahka, 1986). Si se considera que las reacciones de metilación participan en la transducción de la señal hormonal como ha sido propuesto por algunos autores (Hirata y Axelrod, 1980), se esperaría que otros reguladores de la función esteroido-

génica también modifiquen la metilación de FL. Sin embargo, este proceso resultó ser específico para LH/hCG; otras hormonas como LHRH y AVP, cuyos receptores también están presentes en la membrana plasmática de la célula de Leydig, no modificaron la incorporación de metionina radioactiva a FL (Fig.21).

Estos hallazgos plantean una interrogante acerca del verdadero papel de las reacciones de metilación de FL en la transducción de las señales hormonales. Si estas reacciones constituyeran un mecanismo general que facilitara la transmisión del estímulo externo, se debiera haber obtenido una modificación de las reacciones de metilación de FL en presencia de LHRH y AVP. Esto nos permite concluir, que en la célula de Leydig, las reacciones de metilación de FL están asociadas solamente a la acción de LH/hCG, lo que sugiere la existencia de microdominios de la membrana en que coexisten cercanamente receptor de LH/hCG y enzimas FMT.

Otro punto importante dentro de este objetivo específico, fue analizar si para la activación de las reacciones de metilación de FL era necesario la participación de un mediador intracelular o si sólo era necesario la interacción hormona-receptor para gatillar esta respuesta. Este análisis se enfrentó desde dos puntos de

vista; por un lado, el estudio de la acción de cAMP y de activadores de adenilato ciclasa en la metilación de FL en células de Leydig intactas, y por otro lado, la acción de las subunidades individuales de hCG, que como se mencionó anteriormente, no son capaces de generar cAMP. Los resultados señalan que ni 8-BrcAMP, ni toxina del cólera, ni forskolin, activaron la incorporación de metionina radioactiva a FL (Fig.22). Estos resultados están indicando que los efectos de LH/hCG sobre la metilación de FL están mediados por la interacción de la hormona con su receptor y no por el cAMP generado por la acción hormonal. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que el aumento del cAMP producido genere una acumulación intracelular de diferentes derivados de adenosina. Se ha observado que la adenosina y sus derivados afectan la razón SAM/nucleosidilhomocisteína, lo que conduce a una inhibición de las metilaciones de FL (Hoffman y col., 1980).

De manera consecuente con estos resultados, y a la vez bastante sorprendente, la subunidad β (que le proporciona la especificidad biológica a la hormona), pero no la α , estimuló la incorporación de ^3H -metionina en un 140%. Ambas subunidades individuales se unen débilmente al receptor a través de dominios aminoacídicos determinados. De acuerdo a estos resultados, se puede postular que β

podría producir modificaciones en el receptor de LH/hCG, permitiendo que ciertos dominios del receptor activen las enzimas FMT. En este caso, la subunidad β actuaría como antagonista ya que no es capaz de activar el sistema transductor; sin embargo, esto no implica que otras respuestas mediadas por el receptor sean bloqueadas (Sairam, 1989; Wilson y col., 1990; Browne y col., 1990). Estos resultados están señalando claramente, que en células de Leydig intactas, la activación de las reacciones de metilación de FL no necesita la producción de cAMP, sugiriendo que estos procesos estarían participando en etapas iniciales del estímulo hormonal, previo a la acción intracelular de cAMP. Estas observaciones están apoyadas por los estudios presentados en la Fig.14, donde se encontró que preincubaciones cortas con la hormona, gatillan la respuesta de metilación y que no se requiere la presencia continua del estímulo hormonal para su activación. Existen antecedentes en la literatura que apoyan esta observación; en mastocitos, la activación de la metilación de FL está mediada por la interacción ligando-receptor y no por el cAMP formado (Ishizaka y col., 1980).

Es interesante comentar los estudios realizados con híbridos de hCG. El híbrido- NIH de hCG resultó igualmente eficiente que la hormona nativa, tanto en la estimulación de las reacciones de metilación como en la

síntesis de testosterona. Los híbridos preparados en el laboratorio a partir de las subunidades individuales, estimularon la metilación de FL en igual proporción que la subunidad β . Se consideró la posibilidad que el tratamiento experimental para la formación de los híbridos no haya sido satisfactorio, lo que implicaría que la estimulación observada es el resultado de la acción de la subunidad β por sí sola. Sin embargo, los efectos observados en la producción de T (Tabla II) descartan esta posibilidad, ya que los híbridos estimularon la síntesis de T igual que la hormona nativa, no así β que no tiene efecto esteroideogénico.

En resumen, los estudios realizados en células de Leydig intactas donde se analiza la incorporación de ^3H -metionina a FL, nos permiten concluir hasta este momento que: 1.- Las reacciones de metilación de FL podrían estar participando en la elaboración de la respuesta esteroideogénica, 2.- LH/hCG estimulan específicamente la incorporación de ^3H -metionina de una manera dependiente del tiempo y de la dosis y 3.- La metilación de FE a FC ocurre en etapas tempranas de la interacción hormona-receptor y no requiere la producción de cAMP.

Con el objeto de comprobar si las observaciones anteriores estaban relacionadas con la acción de la

enzima FMT , se determinó la actividad enzimática FMT en suspensiones libre de células. La incubación previa de las células de Leydig con hCG, produjo una estimulación en la actividad FMT de un 33%, bastante menor que la obtenida en células intactas y menor que la reportada por Nieto y Catt (1983). La diferencia en la magnitud de la respuesta en células intactas (300%) e *in vitro* (33%) podría explicarse por la concentración limitante de alguno de los sustratos fosfolipídicos de la enzima, que debió disminuir durante la incubación previa con la hormona.

Aunque nuestros estudios enzimáticos en presencia de fosfolípidos exógenos (FME) indicaron que la actividad FMT en ausencia de estímulo hormonal sólo aumentaba en un 10% (Fig.24), no se estudió si la adición de FME en el ensayo enzimático de células previamente estimuladas, aumentaba la actividad enzimática.

De acuerdo a los resultados obtenidos con ambas subunidades, la actividad FMT se estimuló cuando previamente las células habían sido incubadas con α y β (Fig.25). Estos resultados difieren de los realizados en células intactas, en los cuales, sólo β estimuló la incorporación de metionina radioactiva a FL. Aunque la estimulación de β sobre la metilación fue semejante en células intactas e *in vitro*, (140% y 137% respectivamente), α

sólo estimuló en condiciones *in vitro* (72%), aunque en menor proporción que β (137%) pero más que la hormona nativa (33%). Es probable que los requerimientos de la célula intacta sean diferentes a los requerimientos de la enzima *in vitro*; sin embargo, se podría argumentar que los dominios de unión de α no son capaces de estimular la enzima en las células intactas pero sí cuando las condiciones experimentales de la enzima están controladas. Llama la atención que β estimuló más que la hormona nativa (137% vs 33%) en condiciones *in vitro*, sin embargo, en células intactas estimuló casi igual (240% vs 300%). Aunque a la luz de los conocimientos actuales es difícil interpretar estos resultados, no se descarta la posibilidad que la incubación previa con hCG produzca una disminución en alguno de los sustratos fosfolipídicos de la enzima.

Al estudiar el efecto de cAMP sobre la actividad FMT, se encontró que 8-BrcAMP estimuló 79% y forskolin un 147%. Estos datos están de acuerdo con los de Nieto y Catt (1983), quienes encontraron que la actividad FMT aumentaba en un 75% al incubar previamente las células de Leydig con 8-BrcAMP y forskolin. Sin embargo, difieren de los estudios con células intactas, donde la metilación de FL no fue estimulada en presencia de 8-BrcAMP ni de toxina del cólera o forskolin. Esta contradicción se

podría explicar arguyendo que la estimulación observada *in vitro*, sería consecuencia de una disponibilidad aumentada de los sustratos fosfolipídicos (FME) como resultado de la incubación previa de las células intactas con 8-BrcAMP ó forskolin (FK). Tampoco se puede descartar que, en células intactas, la adenilato ciclasa haya sido activada previamente por la interacción LH/hCG a su receptor, estimulándose la enzima FMT, de modo que la adición de cAMP exógeno o de activadores de la adenilato ciclasa no representan una estimulación adicional en el nivel de las metilaciones. Otra posibilidad es que las moléculas de enzima FMT se encuentren distribuídas al azar en la membrana plasmática, de modo que la interacción LH/hCG-receptor resulte en una activación de las moléculas de FMT vecinas al receptor y no en otros sitios de la membrana. El estudio enzimático, implica una ruptura de la organización estructural de la célula, perdiendo ésta la compartamentalización y activándose supuestamente moléculas de FMT que en la célula intacta no son accesibles a la proteína quinasa.

Castaño y col., (1980) purificaron una FMT proveniente de microsomas de hepatocitos, y postularon que sería activada a través de fosforilación, ya sea por una proteína quinasa dependiente del nucleótido cíclico (Varela y col., 1984) o por proteína quinasa C (Villalba y

col., 1987). No obstante que estos resultados fueron cuestionados debido a que se utilizaron preparaciones enzimáticas impuras (Vance y Ridgway, 1988), estudios preliminares han demostrado que FMT purificada de microsomas hepáticos, se fosforila *in vitro* en presencia de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Sin embargo, el nivel de fosforilación observado es relativamente escaso (0.25 mol Pi/mol enzima x h) lo que explica la ausencia de estimulación en la actividad de la enzima FMT al ser fosforilada (Vance y Ridgway, 1988). No se descarta la posibilidad que FMT esté en un estado altamente fosforilado, ya que la enzima purificada de microsomas de hepatocitos es semejante a las histonas (Vance y Ridgway, 1988) por lo que no sorprende que sea sustrato de quinasas.

Estas observaciones refuerzan nuestros resultados descritos anteriormente en el sentido que, en la célula intacta, es probable que las reacciones de metilación de FL se activen principalmente con la unión hormona-receptor y no por mecanismos dependientes de cAMP.

Los antecedentes señalados plantean una reevaluación de las reacciones de fosforilación como mecanismos regulatorios de la actividad FMT asociados a una respuesta celular específica. No obstante, es impor-

tante comentar que las reacciones de fosforilación-desfosforilación representan modificaciones covalentes y reversibles de ciertas enzimas, que son muy significativas en cuanto al papel regulatorio que poseen (Krebs y Beavo, 1979). Se ha demostrado, que la función de los diversos receptores presentes en la membrana plasmática, son regulados por mecanismos de fosforilación (Sibley y col., 1988).

Recientemente se ha observado que, en células de Leydig, las enzimas FMT se activarían en presencia de quinasas específicas no-dependientes de cAMP (Podestá, comunicación personal) de manera semejante a lo observado para receptores β -adrenérgicos (Hausdorf y col., 1989), en cuyo caso la fosforilación sería dependiente del número de receptores que son ocupados por el ligando.

Una de las funciones metabólicas más importantes que ejerce LH/hCG en las células de Leydig es la síntesis de testosterona. Los resultados hasta ahora expuestos indican que las reacciones de metilación de FL representan efectos tempranos de la acción de LH/hCG sobre la célula de Leydig. Habiendo sido caracterizada esta respuesta celular de acuerdo a nuestro primer objetivo específico propuesto, la siguiente etapa del trabajo se centró en estudiar la metilación de fosfolípidos, respues-

ta temprana, y la síntesis de RNA, respuesta tardía de la LH/hCG, en las células de Leydig desensibilizadas.

Como se mencionó en la introducción, dentro de los sistemas de regulación de las células de Leydig están aquellos que tienen relación con la capacidad adaptativa de estas células frente al medio, como es la "desensibilización". En este fenómeno, se encuentran involucradas numerosas alteraciones de la funcionalidad de las células de Leydig como son: número de receptores (Schwall y Erickson, 1984), enzimas esteroidogénicas (Chasalow y col., 1979) y sistema adenilato ciclasa (Ezra y Salomon, 1980; Sharpe, 1976; Hsueh y col., 1977)

La desensibilización, que consiste en una ausencia de respuesta esteroidogénica frente al estímulo de LH/hCG, ha sido un fenómeno muy estudiado en las células de Leydig, siempre relacionado con la síntesis de T. En este trabajo se encontró que el proceso de desensibilización de la célula de Leydig implica un cambio global de los procesos que están ocurriendo dentro de la célula. De acuerdo a nuestros resultados, respuestas tempranas como la metilación de FL, y tardías como la síntesis de RNA, se encuentran modificadas en la célula de Leydig desensibilizada.

La incorporación de ^3H -metionina a FL disminuyó a partir del primer día después del tratamiento hormonal. La disminución del nivel de metilaciones osciló en un rango de 20% a 40% durante el período que duró el tratamiento (Fig.29). Este efecto se manifestó desde los 10 min de incubación y se prolongó durante 1 h en todos los animales estudiados (Fig. 30). Si se considera que las reacciones de metilación que se ven alteradas están en estrecha relación con los receptores funcionales de LH/hCG, estos resultados están sugiriendo que un porcentaje no mayor del 40% de las reacciones de metilación se encuentra en esa situación, y que las metilaciones que no se ven afectadas por el proceso de desensibilización están localizadas en otros dominios de la membrana plasmática o bien, en otros compartimentos membranosos de la célula. Llama la atención no encontrar una recuperación de incorporación de grupos metilo a lípidos al final del tratamiento (12 días), cuando la concentración de receptores para LH/hCG se ha recuperado (Fig.27). Al observar *in vitro*, si la presencia de la hormona era capaz de revertir el efecto inhibitorio sobre la incorporación de metionina radioactiva, se encontró que en los animales desensibilizados en el día 6, la hCG en el medio de incubación sólo aumentaba el nivel de metilación después de 1 h de incubación con la hormona. Sin embargo, en los ani-

males desensibilizados en el día 12, la presencia de la hormona in vitro producía un aumento de las metilaciones a partir de los 10 min de incubación (Fig. 31). Este nivel de estimulación era significativamente mayor que el observado en ausencia de la hormona in vitro, pero menor que el observado en animales que no habían sido desensibilizados (Fig.31).

La disminución de la incorporación de grupos metilo a FL observada en los animales desensibilizados, puede ser el resultado de una entrada disminuída del aminoácido a la célula, o bien de una actividad enzimática FMT disminuída. Los estudios de permeabilidad de metionina radioactiva (Fig.32) descartan la primera posibilidad, ya que por el contrario, durante la desensibilización la entrada de metionina aparece aumentada.

Al estudiar la actividad enzimática FMT en células de Leydig desensibilizadas, solamente se observó una disminución de la actividad de la enzima a los 3 días después del tratamiento con hCG en niveles elevados (Fig.33). Por otro lado, la actividad enzimática detectada en los días 1 y 6 fue igual al control no desensibilizado. Estos estudios in vitro sugieren que la disminución de la metilación observada en células intactas de animales desensibilizados en el día 1 y 6 no es el resultado de una

disminución de la actividad enzimática sino de otros factores intracelulares que resultan del proceso de desensibilización. Uno de esos factores podría ser el aumento en la incorporación de metionina a proteínas o a sustratos no lipídicos. Además, no se puede descartar la posibilidad que fosfatidiletanolamina (FE), el otro sustrato de las metilaciones esté en concentraciones limitantes en las células desensibilizadas.

La disminución de la actividad FMT en el día 3 después del tratamiento hormonal, coincide con una internalización masiva de los receptores de LH/hCG (Fig.27). Sería interesante investigar la posibilidad que la internalización de receptores conlleve una internalización de moléculas de enzima FMT. Este tipo de resultados permitiría postular que la actividad enzimática FMT está asociada al receptor de LH/hCG, ya sea por una vecindad de las moléculas de FMT al receptor, o bien por una actividad enzimática FMT presente en los receptores de LH/hCG. La posibilidad de encontrar una proteína con actividad funcional en la vecindad del receptor de LH/hCG, abre amplias perspectivas de comprender los mecanismos involucrados en el proceso de internalización. De acuerdo a esta interpretación, la disminución de la enzima FMT que observamos a los 3 días de iniciado el tratamiento de desensibilización, sería consecuencia del proceso de degradación

lisosomal de la vesícula endocítica internalizada (Silberstein y col., 1977). También es importante señalar, que podrían haber otros factores intracelulares afectando la actividad FMT. Se ha reportado que la metilación de FE, pero no de FME y FDE, es inhibida por concentraciones crecientes de ácidos grasos (Audubert y Vance, 1983). La concentración de SAH, uno de los productos de la reacción de metilación, como así también la razón SAM/SAH, afectan la velocidad de metilación de FE. No se ha demostrado que la concentración del otro producto, FC altere la velocidad de metilación de FE en células intactas o tejidos.

Un aspecto de enorme importancia de acuerdo a los antecedentes de la literatura, se refiere a las reacciones de metilación en la entrada de iones. Se ha encontrado que en mastocitos la metilación estimulada por la interacción de la IgE con su receptor produce un aumento en la entrada de Ca^{+2} (Siraganian, 1983); en hepatocitos, la adición de vasopresina o angiotensina, dos hormonas cuyas acciones están mediadas por Ca^{+2} , inducen la activación de la FMT (Alemany y col., 1981). Este efecto es remedado por ionóforo de Ca^{+2} , y, en ausencia de Ca^{+2} externo, ninguna de las hormonas señaladas estimula la N-metiltransferasa. Algunas evidencias indican que calmodulina, la proteína que une Ca^{+2} , estaría mediando el efecto de Ca^{+2} sobre la metilación de FL en microsomas aislados

de hígado de rata (Alemany y col., 1982). Dada la importancia del Ca^{+2} en la regulación del proceso esteroidogénico (Lin, 1985), la posibilidad de una asociación entre las metilaciones de FL y la entrada de Ca^{+2} no es improbable. Recientemente, se observó que otros iones como Cl^- están participando en la respuesta esteroidogénica mediada por LH/hCG (Choi y Cooke, 1990) por lo que en estos momentos no se puede descartar una relación entre metilación de FL y entrada de otros iones a la célula de Leydig.

Por otro lado, algunos autores han planteado que las reacciones de metilación estarían participando en otros procesos de membrana desencadenados por la activación de receptores, como son la liberación de ácido araquidónico y la síntesis de prostaglandinas (Crews y col., 1980, 1981; Craven y Deruberties, 1984). En células de Leydig, se ha postulado que los productos de metabolización del ácido araquidónico, por acción de ciclooxigenasas (Ross, 1982) y lipoxigenasas (Hoffman y col., 1981 a) estarían involucrados en la estimulación de la esteroidogénesis, favoreciendo la entrada de colesterol a la mitocondria.

El tercer objetivo específico propuesto, consistió en estudiar si durante la desensibilización de la célula de Leydig, la síntesis de RNA se encuentra modificada.

Estudios realizados por otros autores y por nosotros, demostraron que la síntesis de RNA es necesaria para que ocurra el proceso esteroidogénico (Mendelson y col., 1975; Valladares y Ronco, 1984). En esta tesis se encontró que la síntesis de RNA se encuentra disminuída en animales que han sido tratados con una dosis única de 100 UI de hCG (Tabla III).

La posibilidad de que estos efectos fueran consecuencia de una disminución en la entrada del precursor al interior de la célula es poco probable (Tabla IV) lo que sugiere que se debería a una disminución real de la síntesis de RNA.

Este efecto se manifiesta a los 2 días después de la dosis desensibilizante y es detectado desde los 30 min de incubación con el precursor radioactivo (Fig. 34). Cuando se compara la síntesis de RNA con la producción de T o la cantidad de receptores de LH/hCG, se encuentra que el efecto de la desensibilización sobre la síntesis de RNA es más tardío (Fig.35). En el día 1, cuando la producción de T estimulada por hCG o dibutiril AMP cíclico (dbcAMP) disminuía un 73% y 60% respectivamente, la incorporación de uridina radioactiva no se había modificado (Tabla IV). De igual modo, en el día 1, la cantidad de receptores de LH/hCG había disminuído en 93%,

estando un 80% de ellos ocupados por la hormona (Fig.28). El análisis de los parámetros esteroidogénicos y de la cantidad de receptores disponibles a través de un período de 12 días después del estímulo hormonal elevado, indica que en los días 2 y 3, tanto la producción de T, número de receptores de LH/hCG y síntesis de RNA se encuentran disminuidos en grado máximo. En el día 6, la respuesta esteroidogénica y síntesis de RNA han comenzado a recuperarse (70% y 64% respectivamente del control respectivo) aunque la concentración de receptores para LH/hCG permanece disminuída (18%) como ha sido descrito previamente (Catt y Dufau, 1980).

Se encontró que en células de Leydig desensibilizadas, la disminución de los RNA totales representaba un 26% de los RNA de células provenientes de animales sin tratamiento hormonal (Tabla VI), un resultado esperado en base a las observaciones previas (Tabla V). Por otro lado, la razón -PoliA/+PoliA es el doble en las células tratadas, indicando una disminución relativa importante en la expresión de este tipo de RNA.

Recientemente, se ha descrito que la disminución de las enzimas esteroidogénicas microsomales 17 α -hidroxilasa y 17,20 liasa que se observa en las células de Leydig desensibilizadas, está relacionado con una

disminución de los niveles del RNA mensajero para dichas enzimas (Dufau y col., 1989). Del mismo modo, se ha encontrado que en células de Leydig (Pakarinen y col., 1990) y en células lúteas (Hoffman y col., 1991), la disminución de los receptores (down-regulation) observada durante la desensibilización, es consecuencia de una disminución en los RNAs mensajeros para los receptores de LH/hCG.

En conclusión, el proceso de desensibilización de la célula de Leydig inducida por hCG, es un fenómeno generalizado en el cual se ve alterada no solamente la síntesis de esteroides sino que también otras respuestas que son gatilladas por LH/hCG.

La síntesis de RNA , una respuesta tardía de la acción de LH/hCG, disminuye como consecuencia de la desensibilización. Recientemente se ha encontrado en células de Leydig de animales desensibilizados, que ciertos RNAs mensajeros específicos para proteínas que participan en el proceso esteroidogénico se encuentran disminuídos.

Una de las respuestas tempranas generada por la interacción hormona receptor es la metilación de FL, la que se encuentra disminuída después de la dosis desensibilizante de hCG. Resulta interesante la observación que esta disminución está relacionada con la internalización

del complejo hormona-receptor, sugiriendo que las reacciones de metilación de FL están de alguna forma asociadas con los receptores funcionales de LH/hCG. Esta posibilidad abre perspectivas futuras en relación al conocimiento del proceso de internalización de receptores.

En este trabajo se encontró que el recambio de fosfolípidos aumenta como consecuencia de la interacción de LH/hCG con su receptor, apoyando las observaciones que indican que las reacciones de metilación de FL están participando en la elaboración de la respuesta esteroideogénica.

En relación a los efectos hormonales sobre la metilación de FL, falta aún por correlacionar los estudios entre la actividad enzimática FMT *in vitro* con los estudios de conversión de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina. Quizá con la reciente purificación de la enzima se pueda definir rigurosamente el efecto de las hormonas sobre las reacciones de metilación de FL y encontrar su mecanismo de acción.

REFERENCIAS

- Adashi, E.Y. and Hsueh, A.J.W. 1982. Direct inhibition of rat testicular androgen biosynthesis by arginine vasotocin. Studies on Mechanism of action. *J. of Biol. Chem.* 257: 1301-1308.
- Adashi, E.Y. and Resnik, C.E. 1984. Antigonadal activity of the neurohypophyseal hormones: Direct in vivo regulation of Leydig cell function. *Annls. N. Y. Acad. Sci.* 438: 622-624.
- Adesnik, M. and Darnell, J.E., 1972. Biogenesis and characterization of histone messenger RNA in Hela cells. *J. Molec. Biol.* 67: 397-406.
- Aldred, L.F. and Cooke, B.A., 1983. The effect of cell damage on the density and steroidogenic capacity of rat testis Leydig cell, using an NADH exclusion test for determination of viability. *J. Steroid Biochem.* 18: 411-414.
- Alemaný, S.; García Gil, M. and Mato, J.M., 1980. Regulation by guanosine 3':5'-cyclic monophosphate of phospholipid methylation during chemotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem.* 77: 6996-6999.
- Alemaný, S.; Varela, I. and Mato, J.M., 1981. Stimulation by Vasopressin and Angiotensin of phospholipid methyltransferase in isolated rat hepatocytes. *FEBS LETT.*, 135, 111-114.
- Alemaný, S.; Varela, I.; Harper, J.F. and Mato, J.M., 1982. Calmodulin Regulation of Phospholipid and Fatty Acid Methylation by rat Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* 257, 9249-9251.
- Allende, J. 1988. GTP-mediated macromolecular interactions: the common features of different systems. *Faseb. J.*, 2, 2356-2367.
- Anakwe, O.O. and Payne, A. H. 1987. Noncoordinate Regulation of the Novo Synthesis of Cytochrome P-450 Cholesterol Side-Chain Cleavage and Cytochrome P-450 17 α -Hydroxylase/C₁₇₋₂₀ Lyase in Mouse Cell Cultures: Relation to Steroid Production. *Mol. Endocrinol.* 1: 595-603.

Anakwe, O.O.; Moger, W.H. and Nance, D.M., 1985. Catecholamine stimulation of testicular steroidogenesis. Biol. Reprod. 32 Suppl. 1 Abstr. 188.

Aquilano, D.R. and Dufau, M.L. 1983. Changes in Ribonucleic Acid Polymerase activities in Gonadotropin -treated Leydig cells: an Estradiol mediated process. Endocrinol. 113: 94-103.

Ascoli, M. 1981. Regulation of gonadotropin receptors and gonadotropin responses in a clonal strain of Leydig tumor cells by epidermal growth factor. J. Biol. Chem. 256: 179-183.

Ascoli, M. and Segaloff, D.L. 1989. On the Structure of the LH/hCG Receptor. Endocrine Rev. 10: 27-44.

Audubert, F. and Vance, D. 1983. Pitfalls and Problems in Studies on the Methylation of Phosphatidylethanolamine. J. of Biol. Chem. 258: 10695-10701.

Baraño, J.L. and Dufau, M.L. 1983. Gonadotropin -induced Changes in the Luteinizing Hormone Receptors of Cultured Leydig Cells. J. Biol. Chem. 258: 7322-7330.

Bardin, C.W. and Paulsen, C.A., 1981. The Testes. In Textbook of Endocrinology. Cap. 6: 293-344. Ed. Williams, R.H. W.B.Saunders Co. USA.

Bartke, A.; Williams, K.I.H. and Dalterio, S., 1977. Effects of Estrogens on Testicular Testosterone Production in Vitro. Biol. Reprod. 17: 645-649.

Bhattacharya, A.; and Vonderhaar, B.K., 1979. Phospholipid methylation stimulates lactogenic binding in mouse mammary gland membranes. Cell. Biol. 76: 4489-4492.

Bhalla, V.K.; Flash, M.V.; Browne, E.S.; Sohal, G.S. and Sharawy, M.M. 1987. Interstitial Cell Heterogeneity in Rat Testes. J. Biol. Chem. 262: 5322-5332.

Birnbaumer, L; Perez-Reyes, E; Bertrand, P.; Gudermann, T.; Wei, X-Y.; Kim, H.; Castellano, A. and Codina, J. 1991. Molecular Diversity and Function of G proteins and Calcium Channels. Biol. Reprod. ,44, 207-224.

Bordy, M.J.; Shaper, J.H. and Ewing, L.L. 1984. Trophic influences of Luteinizing Hormone on Steroidogenesis by Percoll-separated Rat Leydig Cells in Culture. Ann. N.Y. Acad. Sci. 438: 329-345.

Bourne, G.A.; Dockrill, M.R.; Regiani, S.; Marshall, J.C. and Payne, A.H. 1982. Induction of testicular gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors by GnRH: effects of pituitary hormones and relationship to inhibition of testosterone production. *Endocrinol.* 110: 727-733.

Brook, C.G.D.; Jacobs, H.S.; Stanhope, R.; Adams, J. and Hindmarsh, P. 1987. Pulsatility of reproductive hormones: applications to the understanding of puberty and to the treatment of infertility. 1, (1), Cap. 2, 23-42. In Balliére's *Clinical Endocrinology and Metabolism*. H.G. Burger Guest Ed. Balliére Tindall, U.K

Browne, E.S.; Flasch, M.V.; Sairam, M.R. and Bhalla, V.K. 1990. Is deglycosylated human chorionic gonadotropin an antagonist to human chorionic gonadotropin? Characterization of deglycosylated human chorionic gonadotropin action in two testicular interstitial cell fractions. *Biochim. Biophys. Acta* 1033: 226-234.

Browne, E.S. and Bhalla, V.K., 1991. ¿Does Gonadotropin Receptor Complex have an amplifying role in cAMP/Testosterone Production in Leydig cells? *J. of Andrology*, 12, 132-139.

Browning, J.Y.; D'Agata, R.; Steinberger, A.; Grotjan, H.E. and Steinberger, E. 1983. Biphasic effect of gonadotropin-releasing hormone and its agonist analog (HOE766) on in vitro by purified Leydig cells. *Endocrinol.* 113: 985-991.

Cann, P.; Tsurukara, T.; Dufau, M.L. and Catt, K., 1977. Isolation of highly purified Leydig cells by density gradient centrifugation. *Endocrinol.* 101: 639-

Castaño, J.G.; Alemany, S.; Nieto, A. and Mato, J.M. 1980. activation of Phospholipid Methyltransferase by glucagon in Rat Hepatocytes. *J. of Biol. Chem.* 255: 9041-9043.

Catt, K.J. and Dufau, M. L. 1978. Gonadotropin Receptors and Regulation of Interstitial Cell Function in the Testis. *Receptors and Hormone Action*. Vol. III, Cap. 10: 291-339. Acad. Press.

Catt, K.J. Harwood, J.P. Aguilera, G. and Dufau, M.L. 1979. Hormonal regulation of peptide receptors and target cell responses. *Nature*, 280: 109-116.

Catt, K.J.; Harwood, J.P.; Clayton, R.N.; Davies, T.F.; Chan, V.; Katikineni, M.; Nozu, K. and Dufau, M.L. 1980. Regulation of Peptide Hormone Receptors and Gonadal Steroidogenesis. *Rec. Prog. Horm. Res.* 36: 557-622.

Chan, V.; Katikineni, M.; Davies, T.F. and Catt, K.J. 1981. Hormonal regulation of Testicular Luteinizing Hormone and Prolactin receptors. *Endocrinol.* 108: 1607-1612.

Chasalow, F.; Marr, H.; Haour, F. and Saez, J.M., 1979. Testicular steroidogenesis after human chorionic gonadotropin desensitization in rats. *J. Biol. Chem.* 254: 5613- 5618.

Chen, Y-D.I. and Payne, A.H. 1977. Regulation of testicular LH Receptors by homologous hormone: in vitro studies on receptor occupancy and receptor loss. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74: 1589-1596.

Chiang, P.K.; Im, Y.S. and Cantoni, G.L.. 1980. Phospholipid biosynthesis by methylation and choline incorporation. Effect of 3-deazaadenosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94: 174-181

Choi, M.S.K. and Cooke, B.A. 1990. Evidence for two independent pathways in the stimulation of steroidogenesis by luteinizing hormone involving chloride channels and cyclic AMP. *FEBS*, 261 (1): 402-404.

Christensen, A.K. 1975. Leydig Cells. In *Handbook of Physiology*, (D.W. Hamilton and R.O. Greep, eds.) Sec. 7, Vol. 5: 57-94.

Cigorruga, S.B.; Dufau, M.L. and Catt, K.J. 1978. Regulation of Luteinizing Hormone Receptors and Steroidogenesis in Gonadotropin-desensitized Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 253: 4297-4304.

Clarke, I.J. and Cummins, J.T. 1987. Pulsatility of Reproductive hormones: physiological basis and clinical implications. 1, (1), Cap. 1, 1-22. In *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. H.G. Burger, Guest Ed. Baillière Tindall, U.K.

Clayton, R.N. and Catt, K.J. 1981. Regulation of Pituitary Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors by Gonadal Hormones. *Endocrinol.* 108: 887-894.

Colard, O.; and Breton, M. 1981. Rat liver plasma membrane phospholipids methylation; Its absence of direct relationship to adenylate cyclase activities. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 101: 727-733.

Conn, P.M.; Conti, M.; Harwood, J.P.; Dufau, M.L. and Catt, K.J., 1978. Internalisation of gonadotrophin-receptor complex in ovarian luteal cells. *Nature*, 274: 598-600.

Conn, P.M.; Huckle, W.R.; Andrews, W.V. and McArdle, C.A. 1987. The Molecular Mechanism of Action of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) in the Pituitary. *Rec. Prog in Horm. Res.* 43: 29-61.

Cooke, B.A., and Sullivan, M.H.F. 1985. Modulation and role of Ca^{2+} in LH and LHRH agonist action in rat Leydig cells. *Med. Biol.* 63: 259-263.

Cooke, B.A.; Dix, C.J.; Habberfield, A.D. and Sullivan, M.H.F., 1984. Control of steroidogenesis in Leydig cells: roles of Ca^{2+} and lipoxygenase products in LH and LHRH agonist action. *Annls. N.Y. Acad. Sci.* 438: 269-282.

Cooke, B.A.; Janszen, F.H.A.; Clotscher, W.M. and van der Molen, H.J. 1975. Effect of Protein-Synthesis inhibitors on testosterone production in rat testis interstitial tissue and Leydig cell preparations. *Biochem. J.* 150: 413-418.

Cooke, G.M. 1989. Identification and mechanism of action of phospholipids capable of modulating rat testicular microsomal 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in vitro. *Biol. Reprod.* 41: 438-445.

Cooke, B.A.; Lindh, L.M. and van der Molen, H.J. 1979. The mechanism of action of lutropin on regulator protein(s) involved in Leydig-cell steroidogenesis. *Biochem. J.* 184: 33-38.

Cordasco, D.M.; Segarnick, D.J. and Rotrosen, J. 1981. Human Platelet Phospholipid Methylation. *Life Science*, 29: 2299-2309.

Craven, P.; and Deruberties, F. 1984. Phospholipid methylation in the calcium dependent release of arachidonate for prostaglandins synthesis in renal medula. *J. Lab. Clin. Med.* 104: 480-493.

Crews, F.T., Morita, Y.; Mc Givney, A.; Hirata, F. Siraganian, R.P. and Axelrod, J. 1981. Ig-E Mediated Histamine Release in Rat Basophilic Leukemia Cells: Receptor Activation, Phospholipid Methylation, Ca^{+2} Flux, and Release of Arachidonic Acid. Arch. of Biochem and Biophys. 212: 561-571.

Crews, F.; Morita, Y.; Hirata, F.; Axelrod, J. and Siraganian, R. 1980. Phospholipids methylation affects immunoglobulin E-mediated histamine and arachidonic acid release in RBL cells. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 93: 42-49.

Daehlin, L.; Thore, J.; Bergman, B; Damber, J.E. and Selstam, G. 1985. Direct inhibitory effects of natural and synthetic oestrogens on testosterone release from human testicular tissue in vitro. Scand. J. Urol. Nephrol, 19: 7-12.

De Souza, E.B.; Anholt, R.R.H.; Murphy, K.M.M.; Synder, S.H. and Kuhar, M.J. 1985. Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis. Endocrinol. 116: 567-573.

Dorrington, J.H.; Fritz, I.B. and Armstrong, D.T. 1978. Control of testicular estrogen synthesis. Biol. Reprod. 18: 55-64.

Drouva, S.V.; Laplante, E.; Leblanc, P.; Clauser, H. and Kordon, C. 1986. Estradiol activates methylating enzyme involved in the conversion of phosphatidylthanolamine to phosphatidylcholine in rat pituitary membranes. Endocrinol. 119: 2611-2622.

Duchatelle, P. and Joffre, M. 1987. Ca^{+2} -dependent-chloride and potassium currents in rat Leydig cells. FEB. LETT. 217: 11-15.

Dufau, M.L. and Catt, K.J. 1978. Gonadotropin Receptors and regulation of Steroidogenesis in the testis and ovary. Vit. Horm. 36: 461-598.

Dufau, M.L.; Baukal, A.J. and Catt, K.J. 1980. Hormone-induced guanyl nucleotide binding and activation of adenylylate cyclase in the Leydig cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 5837-5841.

Dufau, M.L.; Mendelson, C. and Catt, K.J. 1974. A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin : testosterone production by dispersed Leydig cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism*, 39: 610.

Dufau, M.L.; Minegishi, T.; Buczko, E.; Kitamura, M. Delgado, C. and Namiki, M. 1989. Lactogen and LH Receptors. Rat P-450^{17 α} , Structural Analysis and Hormonal Regulation of mRNA Levels in the Leydig Cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 564:57-76.

Dufau, M.L.; Winters, C.A.; Hattori, M. Aquilano, D.; Barañao, J.L.S.; Nozu, K.; Baukal, A. and Catt, K.J. 1984. Hormonal Regulation of Androgen Production by the Leydig Cell. *J. Steroid. Biochem.* 20: 161-173.

Dufau, M.L. and Veldhuis, J.D. 1987. Pathophysiological relationships between the biological and immunological activities of luteinizing hormone in Baillieres. *Clinical Endocrinology and Metabolism*. Ed. H.G. Burger MD. (8) pp. 153-176.

Earp, H. and Steiner, A. 1978. Compartmentalization of Cyclic nucleotide-mediated hormone action. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 431-459.

Ezra, E. and Salomon, Y. 1980. Mechanism of Desensitization of Adenylate Cyclase by Lutropin. *J. Biol. Chem.* 255: 653-658.

Fabbri, A.; Jannini, E.A.; Gnessi, L.; Ulisse, S.; Moretti, C. and Isidori, A. 1989. Neuroendocrine Control of Male reproductive Function. The Opioid System as a Model of Control at Multiple Step. *J. Steroid Biochem.* 32: 145-150.

Frazier, A.L.; Robbins, L.S.; Stork, J.; Sprengel, R.; Segaloff, D.L. and Cone, R.D. 1990. Isolation of TSH and LH/CG Receptor cDNAs from human Thyroid: Regulation by Tissue Specific Splicing. *Molec. Endocrinol.* 4: 1264-1276.

Geelen, M.J.H.; Groener, J.E.M.; De Haas, C.G.M. and Van Golde, L.M.G., 1979. Influence of Glucagon on the synthesis of phosphatidylcholines and phosphatidyletanolamines in monolayer cultures of rat hepatocytes. *FEBS LETT.* 105: 27-30.

Gharib, S. D.; Wierman, M.E.; Shupnik, M.A. and Chin, W.W.Ch. 1990. Molecular Biology of the Pituitary Gonadotropins. *Endocrine Reviews*. 11 (1): 177-199.

Gorospe, W.C. and Conn, P.M. 1987. Membrane Fluidity regulates development of gonadotrope desensitization to GnRH. *Mol. Cell. Endocrinol.* 53: 131-140.

Gray, C.J. 1988. Glycoprotein gonadotropins. Structure and Synthesis. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 288:20-27.

Grootegoed, J.A.; Grollé-Hey, A.H.; Rommerts, F.F.G. and van der Molen, H.J., 1977. Ribonucleic acid synthesis in vitro in primary spermatocytes isolated from rat testis. *Biochem. J.* 168: 23-31.

Hall, P.F.; Osawa, S and Mrotek, J., 1981. The influence of calmodulin on steroid synthesis in Leydig cells from rat testis. *Endocrinol.* 109: 1677-1682.

Handelsman, D.J.; Spaliviero, J.A.; Scott, C.D. and Baxter, R.C., 1985. Identification of Insulin-like growth factor-I and its receptors in the rat testis. *Acta endocrinol. Copenh.*, 109: 543-549.

Haour, F.; Dray, F. and Mather, J.P. 1982. In vivo and in vitro response of Leydig cells to acute stimulation by hCG. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 383: 231-248.

Hattori, M-A.; Aquilano, D. R. and Dufau, M.L. 1984. An early Steroidogenic defect in hormone-induced Leydig Cell desensitization. *J. Steroid Biochem.* 21: 265-277.

Hauger, R.L.; Chen, Y-D.I.; Kelch, R.P. and Payne, A.H. 1977. Pituitary Regulation of Leydig Cell Function in the Adult Male Rat. *J. Endocrinol.* 74: 57-66.

Hausdorff, W.P., Bouvier, M.; O'Dowd, B.F.; Irons, G.I.; Caron, M.G. and Lefkowitz, R.L., 1989. Phosphorylation sites on two domains of the B2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 264: 12657-12665

Hedger, M.P. and Eddy, E.M. 1986. Monoclonal Antibodies against Rat Leydig Cell Surface Antigens. *Biol. Reprod.* 35(5): 1309-1319.

Hedger, M.P. and Eddy, E.M. 1987. The Heterogeneity of Isolated Adult Rat Leydig Cells separated on Percoll Density Gradients: An Immunological, Cytochemical, and Functional Analysis. *Endocrinol.* 121: 1824-1838.

Hermo, L. and Lalli, M. 1988. Binding and Internalization In Vivo of ^{125}I -hCG in Leydig Cells of the rat. *J. of Androl.* 9: 1-14.

Hirata, F. and Axelrod, J. 1978. Enzymatic methylation of phosphatidylethanolamine increases erythrocyte membrane fluidity. *Nature*, 257: 219-220.

Hirata, F.; and Axelrod, J. 1980. Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science*, 209: 1082-1090.

Hirata, F.; Axelrod, J. and Crews, F.T. 1979a. Concanavalin A stimulates phospholipid methylation and phosphatidyl serine decarboxylase in rat mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4813-4816.

Hirata, F.; Strittmater, W.J. and Axelrod, J. 1979b. Adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity and B-adrenergic receptor adenylylate cyclase coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 368-372.

Hodgdon, Y.M.; Urquhart, G. and de Kretser, D.M. 1983. Effect of oestradiol and tamoxifen on the testosterone response in male rats to a single injection of hCG. *J. Reprod. Fert.* 68: 295-304.

Hoffman, D.R.; Marion, D.W. Cornatzer, W.E. and Duerre, J.A. 1980. S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine Metabolism in isolated Rat Liver. *J. Biol. Chem.* 255: 10822-10827.

Hoffman, T. 1981a. Phospholipid methylation and phospholipase A_2 activation in cytotoxicity by human killer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 78: 3839-3843.

Hoffman, D.R.; Haning, J.A. and Cornatzer, W.E. 1981b. Microsomal Phosphatidylethanolamine Methyltransferase: Inhibition by S-Adenosylhomocysteine. *Lipids*, 16: 561-567.

Hoffman, Y.M.; Peegel, H.; Sprock, M.J.E.; Zhang, Q-Y and Menon, K.M.J. 1991 Evidence that Human Chorionic Gonadotropin/Luteinizing Hormone Receptor Down-Regulation Involves Decreased Levels of Receptor Messenger Ribonucleic Acid. *Endocrinol*, 128:388-393.

Hook, V.Y.H.; Heisler, S. and Axelrod, J. 1982. Corticotropin-releasing factor stimulates phospholipid methylation and corticotropin secretion in mouse pituitary tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 6220-6224.

Hotchkiss, A.; Jordan, J.V.; Hirata, F.; Shulman, N.R. and Axelrod, J. 1981. Phospholipid Methylation and Human Platelet Function. Biochem. Pharmacol. 30: 2089-2095.

Hsueh, A.J.W. and Jones, P.B.C. 1981. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. Endocrine Rev. 2: 437-461.

Hsueh, A.J.W.; Dufau, M.L. and Catt, K.J., 1976. Regulation of Luteinizing Hormone Receptors in Testicular Interstitial cells by Gonadotropin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72: 1145-1152.

Hsueh, A.J.W.; Dufau, M.L. and Catt, K.J. 1977. Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3'5'-cyclic AMP and testosterone responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 592-595.

Hsueh, A.J.W.; Dufau, M.L.; Katz, S.I. and Catt, K.J. Huhtaniemi, I.P.; Nozu, K.; Warren, D.W.; Dufau, M.L. and Catt, K.J. 1982. Acquisition of regulatory mechanisms for Gonadotropin Receptors and Steroidogenesis in the maturing Rat Testis. Endocrinol. 111: 1711-1720.

Huhtaniemi, I.T.; Warren, D.W. and Catt, K.J. 1984. Functional Maturation of Rat Leydig Cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 438: 283-303.

Huhtaniemi, I.; Martikainen, H. and Tikkala, L. 1978. hCG-induced changes in the number of rat testis LH/hCG receptors. Molec. Cel. Endocrinol. 11: 43-50.

Pakarinen, P.; Vihko, K.K.; Voutilanen, R. and Huhtaniemi, I. 1990 Differential Response of Luteinizing Hormone Receptor and Steroidogenic Enzyme Gene Expression to hCG Stimulation in the Neonatal and Adult Rat Testis. Endocrinol., 127:2469-2474.

Ishizaka, T.; Hirata, F.; Ishizaka, K. and Axelrod, J., 1980. Stimulation of phospholipid methylation, Ca^{+2} influx and histamine release by bridging of Ig E receptors on rat mast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1903-1906.

- Johnson, G.L. and Dhanasekaran, N. 1989. The G protein Family and their interaction with receptors. *Endocrine Rev.* 10: 317-331.
- Kalra, S.P. and Kalra, P.S. 1983. Neural Regulation of Luteinizing Hormone Secretion in the Rat. *Endocrine Rev.* 4: 311-351.
- Katikineni, M.; Davies, T.F.; Huhtaniemi, I.T. and Catt, K.J., 1980. Luteinizing hormone- Receptor Interaction in the Testis: Progressive Decrease in Reversibility of the Hormone Receptor Complex. *Endocrinol.* 107: 1980-1987.
- Keel, B.A. and Abney T.O. 1985. Oestrogenic regulation of Testicular androgen production during development in the rat. *J. Endocrinol.* 105: 211-218.
- Kelly, K.L. and Wong, E.H.A. 1987. Hormonal Regulation of Phospholipid Methyltransferase by 3',5'- cyclic Adenosine Monophosphate- dependent and independent Mechanisms. *Endocrinol.* 120: 2421-2427.
- Kelly, K.L.; Wong, E.H. and Jarett, L. 1985. Adrenocortico tropic stimulation and insulin inhibition of adipocyte phospholipid methylation. *J of Biol. Chem.* 260: 3640-3644.
- Kim, I.K.; Aksamit, R.R. and Cantoni, G.L. 1982. Mechanism of the cytostatic activity of 3-Deazaaristeromycin, an inhibitor of Adenosylhomocysteine Hydrolase. *J. Biol. Chem.* 257: 14726-14729.
- Knorr, D.W.; Vanha-Perttula, T. and Lipsett, M.B. 1970. Structure and Function of rat testis trough pubescence. *Endocrinol.* 86: 1298-1304.
- Kolena, J.; Horkovics-Kovats, S.; Sebokova, E. and Blazicek, P. 1986. Effect of Gonadotropin on Rat Testicular Membrane Lipid Fluidity. *Gen. Physiol. Biophys.* : 331-335
- Krebs, E.G.; Beavo, J.A. 1979. Phosphorylation dephosphorylation of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 923-
- Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952. Definition of the Stages of the Cycle of the Seminiferous Epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55: 548-573.
- Lin, T. 1985. The role of Calcium/Phospholipid-dependent protein kinase in Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinol.* 117: 119-126.

Llanos, M.N. and Meizel, S. 1983. Phospholipid methylation increases during capacitation of Golden Hamster sperm in vitro. *Biol. of Reprod.* 28: 1043-1051.

Llanos, M.N.; Ronco, A.M. Pino, A.M. and Valladares. L.E. 1985. The transmethylation inhibitor 3-DZA, inhibits in vitro testosterone production by rat testis interstitial cells. *J. of Steroid. Biochem.* 23: 73-76.

Lopez-Tejero, D.; Pastor-Anglada, M. and Remesar, X. 1987. Sulphur Amino Acid Levels in Some Tissues of the Rat during Pregnancy and Lactation. *Ann. Nutr. Metab.* 31: 47-54.

Lowitt, S. Farese, R.V.; Sabir, and Root, A.W. 1982. Rat Leydig cell content is increased by Luteinizing hormone and 8- Bromo-cyclic AMP. *Endocrinol.* 111: 1415-1417.

Mac-Kenzie, R. and Brophy, P. 1984. Isoproterenol stimulates lipid methylation in C6 cells without affecting membrane fluidity. *FEBS.* 164: 244-246.

Margioris, A.N.; Liotta, A.S.; Vaudry, H.; Bardin, C.W. and Krieger, T. 1983. Characterization of immunoreactive proopiomelanocortin related peptides in rat testes. *Endocrinol.* 113: 663-671.

Marin-Cao, D.; Alvarez, V. and Mato, J. 1983. β -Adrenergic control of Phosphatidylcholine synthesis by transmethylation in hepatocytes from juvenile, adult and adrenalectomized rats. *Biochem. J.* 216: 675-680.

Mato, J.M. and Alemany, S. 1983. What is the function of phospholipid N-methylation? *Biochem. J.* 213: 1-10.

Matsumoto, A.M. and Baird, D.T. 1987. Endocrinology of the hypothalamic-pituitary-testicular axis with particular reference to the hormonal control of spermatogenesis. 1, (1), Cap. 4, 70-88. In *Ballière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. H.G. Burger, Guest Ed. Ballière

Mc Farland, K.C.; Sprengel, R.; Phillips, H.S.; Kohler, M.; Roseblit, N.; Nikolics, K.; Segaloff, D.L. and Seeborg, P.H. 1989. Lutropin- Choriogonadotropin receptor: An usual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245: 494-499.

Meidan, R. and Hsueh, A.J.W. 1985. Identification and characterization of arginine vasopressin receptors in the rat testis. *Endocrinol.* 116: 416-423.

Melner, M. and Abney, T. 1980. Depletion of the Cytoplasmic Receptor in Gonadotropin-Desensitized Testes. *Endocrinol.* 107: 1620-1626.

Mendelson, C.; Dufau, M. and Catt, K. 1975. Dependence of gonadotropin-induced steroidogenesis upon RNA synthesis in the interstitial cells of the rat testis. *Bioch et Biophys. Acta*, 411: 222-230.

Merida, I and Mato, J.M. 1987. Inhibition by insulin of glucagon dependent phospholipid methyltransferase phosphorylation in rat hepatocytes. *Biochem. et Biophys. Acta*. 928: 92-97.

Milvae, R.A.; Alila, H.W. and Hansel, W. 1983. Methylation in bovine luteal cells as a regulator of LH action. *Biol. of Reprod.* 29: 849-855.

Moger, W.H. 1985. Phospholipid metylation by intact rat Leydig cells. *Biol. of Reprod.* 33: 902-910.

Molcho, J.; Zakut, H. and Naor, Z., 1984. Gonadotropin-releasing hormone stimulates phosphatidylinositol labeling and prostaglandin E production in Leydig cells. *Endocrinol.* 114: 1048-1050.

Mori, H. and Christensen, A.K., 1980. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J. Cell Biol.* 84: 340-354.

Moyle, W.R. 1975. Role of the Carbohydrate of Human Chorionic Gonadotropin in the Mechanism of Hormone Action. *The J. Biol. Chem.* 250,(23): 9163-9169.

Munzel, P. and Koschel, K., 1982. Alteration in phospholipid methylation and impairment of signal transmission in persistently paramyxovirus-infected C6 rat glioma cells. *Biochem.* 79: 3692-3696.

Murphy, K.M.M.; Goodman, R.R. and Synder, S.H. 1983. Adenosine receptor in rat testes: Biochemical and autoradiographic evidence for association with spermatocytes. *Endocrinol.*, 113: 1299-1305.

Nieto, A and Catt, K.J. 1983. Hormonal activation of Phospholipid methyltransferase in the Leydig cell. *Endocrinol.* 113: 758-762.

Nishihara, M.; Winters, C.A.; Buzko, E.; Waterman, M.R. and Dufau, M.L. 1988. Hormonal Regulation of Rat Leydig Cell Cytochrome P-450 ^{17 α} cDNA. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 154: 151-158.

Niswender, G.D.; Roess, D.A.; Sawyer, D.R. Silvia, W.J.; Peacock, J. and Barisas, G. 1983. Receptors for LH exhibits pronounced differences in lateral mobilities when occupied by oLH vs hCG. *Endocrinol.* 112 A, 178

Nozu, K.; Dufau, M.L. and Catt, K.J. 1981a. Estradiol Receptor mediated Regulation of steroidogenesis in Gonadotropin-desensitized Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 256: 1915-1922.

Nozu, K.; Dehejia, A.; Zawistovich, L.; Catt, K.J. and Dufau, M.L. 1981b. Gonadotropin-induced receptor regulation and steroidogenic lesions in cultured Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 256: 12875-12882.

Nozu, K.; Matsuura, S.; Catt, K.J. and Dufau, M.L. 1981c. Modulation of Leydig cell androgen biosynthesis and cytochrome P-450 levels during estrogen- treatment and hCG-induced desensitization. *J. Biol. Chem.* 256: 10012-10017.

Ota, H.; Wakizaka, A.; Fukushima, M. and Maki, M. 1986. Modulation of testicular receptors for LH, FSH and Prolactin by the administration of Ovine Prolactin in mature rats. *Endocrinol. Japon.* 33: 469-477.

O'Shaughnessy, P.J. and Payne, A.H. 1982. Differential Effects of single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzymes in Leydig cell populations. *J. Biol. Chem.* 257: 11503-11509.

Papadopoulus, V.; Kamtchoving, P.; Drosdowsky, M.A. and Carreau. 1987. Effects of the transmethylation inhibitor S-adenosylhomocysteine and of the methyl donor S-adenosyl-methionine in vitro. *J. of Steroid. Biochem.* 26: 93-98.

Parmentier, M.; Ingami, T.; Pochet, R. and Desclin, J.C. 1983. Pituitary-dependent renin-like immunoreactivity in the rat testis. *Endocrinol.* 112: 1753-1759.

Parvinen, M.; Vihko, K.K. and Toppari, J. 1986. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *Int. Rev. Cytol.* 104: 115-129.

- Payne, A.H.; Chase, D.J. and O Shaughnessy, P.J. 1982. Testicular steroidogenesis in cellular regulation of secretion and release. pp. 203-235.; Academic Press.
- Payne, A.H.; Downing, J.R. and Wong, K.L. 1980. Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. *Endocrinol.* 106: 1424-1429.
- Payne, A.H.; Quinn, P.G. and Rani, C.S.S. 1985. Regulation of Microsomal Cytochrome P-450 Enzymes and Testosterone Production in Leydig Cells. *Rec. Prog. Horm. Res.* 41: 153-197.
- Pfenninger, K.H. and Johnson, M.P., 1981. Nerve Growth factor stimulates phospholipid methylation in growing neurites. *Neurobiol.* 78: 7797-7800.
- Pino, A.M.; Valladares, L.E.; Ronco, A.M. and Inostroza, H. 1990 Analysis by the reverse hemolytic plaque assay (RHPA) of testosterone secretion by purified Leydig cells. *J. Steroid Biochem.* 36: Abs. 231.
- Plagemann, P.W. and Richey, D. 1974. Transport of nucleosides, nucleic acid bases, choline and glucose by animal cells in culture. *Biochem. Biophys. Acta* 344: 263-305.
- Prasad, Ch. and Edwards, R. 1984. Stimulation of phospholipid methylation and thyroid hormone secretion by thyrotropin. *Endocrinol.* 114: 941-945.
- Prasad, CH. and Edwards, R.M., 1981. Stimulation of rat pituitary phospholipid methyltransferase by vasopresin but not oxytocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981. 559-564
- Pritchard, P.H.; Pelech, S.L. and Vance, D.E. 1981a. Analogues of Cyclic AMP inhibits Phosphatidylethanolamine N-Methylation by Cultured Rat Hepatocytes. *Bioch. et Biophys. Acta*, 666: 301-306.
- Pritchard P.H. and Vance, D.E. 1981b. Choline metabolism and phosphatidylcholine biosynthesis in cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.* 196: 261-267.
- Rani, C.S.S. and Payne, A.H. 1986. Adenosine 3'5'-Monophosphate-mediated induction of 17 α -hydroxylase and C₁₇₋₂₀ lyase activities in cultured mouse Leydig cells is enhanced by inhibition of steroid biosynthesis. *Endocrinol.* 118: 1222-1228.

Reddy, P.R.K. and Vिलlee, C.A. 1975. Messenger RNA synthesis in the testis of gonadotropins and cyclic cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63: 1063-1068.

Rodbell, M. 1980. The role of Hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*, 284, 17-22.

Rojas, P. 1985. Esteroidogénesis testicular, participación de reacciones de transmetilación por acción de hCG en células de Leydig. Tesis de Magister. U. de Chile. Fac. de Medicina.

Rommerts, F.F.G.; Molenaar, R.; Hoogerbrugge, J.W. and van der Molen, H.J. 1984. Development of adenosine responsiveness after isolation of Leydig cells. *Biol. Reprod.* 30: 842-847.

Ronco, A.M.; Pino, A.M. and Valladares, L.E. 1988. RNA synthesis in Leydig cells of the mature rat: Effect of Oestradiol-17 B. *J. of Endocrinol.* 116: 387-392.

Ross, E. 1982. Phosphatidylcholine-promoted interaction of the catalytic and regulatory proteins of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 257: 10751-10758.

Ryan R.J.; Charlesworth, M.C.; McCormick D.J. Milius, R.P. and Keutmann, H.T. 1988. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. *Faseb. J.* 2: 2661-2669.

Saez, J.M.; Avallet, O.; Naville, D.; Perrard-Sapori, M.H. and Chatelain, P.G. 1989. Serrtoli-Leydig Cell Communication. *Annals. N. Y. Acad Sci.* 564: 210-231.

Sairam, M.R. and Berman, M.I. 1979. Direct inhibitory effects of estrogens on rat Leydig cells in vitro. *Steroids*, 33: 233-241.

Sairam, M.R. and Bhargavi, G.N. 1985. A role for Glycosylation of the α -Subunit in Transduction of Biological Signal in Glycoprotein Hormones. 229: 65-67.

Sairam M.R. 1989. Role of Carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *Faseb. J.* 3: 1915-1926.

Samborski, R.W.; Ridgway, N.D. and Vance, D.E. 1990. Evidence that only newly made Phosphatidylethanolamine is methylated to Phosphatidylcholine and that Phosphatidylethanolamine is not significantly deacylated-reacylated in rat hepatocytes. *J. of Biol. Chem.* 265: 18322-18329.

Sariban-Sohraby, S.; Burg, M.; Wiesmann, W.P.; Chiang, P.K. and Johnson, J.P. 1984. Methylation increases Sodium Transport into A6 Apical Membrane Vesicles: Possible Mode of Aldosterone Action. *Science*, 225: 745-746.

Schanche, J.S.; Ogreid, D.; Doskeland, S.O.; Refsnes, M. Sand, T.E.; Ueland, P.M. and Christoffersen, T. 1982. Evidence against a requirement for Phospholipid Methylation in Adenylate Cyclase Activation by Hormones. *FEBS. LETT.* 138: 167-172.

Schneider, W.J. and Vance, D.E., 1979. Conversion of Phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine in rat liver. *J. Biol. Chem.* 254, 3886-3891.

Schwall, R.H. and Erickson, G.F. 1984. Inhibition of Synthesis of Luteinizing Hormone Receptors by a Down-Regulating Dose of LH. *Endocrinol.* 114: 1114-1122.

Sharpe, R.M. and Cooper, I. 1983. Testicular interstitial fluid as a monitor for changes in the intratesticular environment in the rat. *J. Reprod. Fert.* 6: 125-135.

Sharpe, R. and Cooper, I., 1982a. Variation in the steroidogenic responsiveness of isolated rat Leydig cells. *J. Reprod. Fert.* 65: 475-481.

Sharpe, R.M. 1977. Gonadotrophin-induced in the steroidogenic responsiveness of the immature rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 957-962.

Sharpe, R.M. 1976. hCG-induced decrease in availability of rat testis receptors. *Nature* 264: 644-646.

Sharpe, R.M. 1986. Paracrine Control of the Testis. In *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 115, (1), Cap. 10 185-207. Franchimont, P. Guest Editor. W.B. Saunders Comp.

Sharpe, R.M.; Maddocks, S. and Kerr, J.B. 1990. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *Am. J. Anat.* 188: 3-20.

Sharpe, R. and Cooper, I. 1982b. The mode of action of LHRH agonist on the rat Leydig cells. *Molec. and Cellular Endocrinol.* 27: 199-221.

Shikita, M. and Hall, P.F. 1974. The stoichiometry of the conversion of cholesterol and hydrocholesterols to pregnenolone (3 β -hydroxypregn-5-en-20-one) catalysed by adrenal cytochrome P-450. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71: 1441-1445.

Siraganian, R., 1983. Histamine secretion from rat mast cells and basophils. TIBS, 4, 6147-6162

Shung-Dong, T.; Phillips, D.M.; Halmi, N.; Krieger, D. and Bardin, C.W., 1982. β -Endorphin is present in the male reproductive tract of five species. Biol. Reprod. 27: 755-764.

Sibley, D.R.; Benovic, J.L.; Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. 1988. Phosphorylation of cell Surface Receptors: A Mechanism for Regulating Signal Transduction Pathways. Endocrine Rev. 9: 38-56.

Silberstein, S.C.; Steinman, R.M. and Cohn, Z.A., 1977. Endocytosis. Annu. Rev. Biochem. 46, 669-722
Siraganian, R.P. 1983. Histamine secretion from rat mast cells and basophils. TIBS, 4: 6147-6162.

Solano, A.; Sanchez, M.; Podesta, E.; Tyrn, D. and Dellacha, J.M. 1987. Membrane methylation in isolated rat testis interstitial cells unmasks functional LH receptors. Biochim. et Biophysica Acta. 928: 107-113.

Steinberger, E.; Steinberger, A. and Vilar, O. 1966. Cytochemical study of v^5-3 β -hydroxysteroideshydrogenase (3 β -HED) in testicular cells grown in vitro. Endocrinol. 79: 406-410.

Strittmatter, W.J.; Hirata, F; Axelrod, J.; Mallorga, P.; Tallman, J.F. and Henneberry R.C. 1979. Benzodiazepine and β -Adrenergic receptor ligands independently stimulate phospholipid methylation. Nature, 282: 857-859.

Sullivan, M.H.F. and Cooke, B.A. 1986. The role of Ca^{+2} in steroidogenesis in Leydig Cells. Biochem J. 236: 45-51.

Sykes, E; Chag, S. and Kiechle, F.L. 1987. Effect of S-adenosylhomocysteine on insulin-independent release of pyruvate deshydrogenase activator from rat adipocyte plasma membrane. Biophys. Res. Comm. 143: 832-836.

Tahka, K.M. 1986. Current aspects of Leydig cell function and its regulation. J. Reprod. and Fertility, 78: 367-380.

Thakkar, J.K.; East, J. and Franson, R.C. 1984. Modulation of Phospholipase A₂ activity associated with Human Sperm Membranes by Divalent Cations and Calcium Antagonists. *Biol. Reprod.* 30: 679-686.

Themmen, A.P.N.; Hoogerbrugge, J.W.; Rommerts, F.F.G. and van der Molen, H.J. 1985a. The possible role of protein kinase C (PK-C) in lutropin (LH) action of immature rat Leydig cells. *Acta endocrinol. Copenh., Suppl.* 270, 207, Abstr.

Themmen, A.P.N.; Hoogerbrugge, J.W.; Rommerts, F.F.G. and van der Molen, H.J. 1985b. Is cAMP the obligatory second messenger in the action of lutropin on Leydig cell steroidogenesis? *Biochem and Biophys Res Commun.* 128: 1164-1172.

Tindall, U.K. Pirke, K.M.; Geiss, M. and Sintermann, R. 1978 A quantitative study on feed-back control of LH by testosterone in young adult and old male rats. *Acta Endocrinol.* 89: 789-795

Tsai-Morris, C.H.; Aquilano, D. and Dufau, M.L. 1985. Gonadotropic Regulation of aromatase activity in the adult rat testis. *Endocrinol.* 116: 31-37.

Valladares, L.E. and Payne, A.H. 1979a. Induction of testicular aromatization by LH in mature rats. *Endocrinol.* 105: 431-436.

Valladares, L.E. and Payne, A.H. 1979b. Acute stimulation of aromatization in Leydig cells by human chorionic gonadotropin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4460-4463.

Valladares, L.E. and Payne, A.H. 1981. Effects of hCG and cAMP on aromatization in purified Leydig cells of immature and mature rats. *Biol. Reprod.* 25: 752-758.

Valladares, L.E. and Ronco, A.M. 1984. Effect of luteinizing hormone on RNA synthesis in Leydig cells of immature cells. *J. Steroid Biochem.* 21: 443-446.

Valladares, L.E.; Ronco, A.M. and Pino, A.M. 1986. RNA synthesis in Leydig cells during sexual maturation in the rat. *J. of Endocrinol.* 110: 551-555.

Valladares, L.E.; Ronco, A.M. and Pino, A.M. 1984. Acción de estradiol en la regulación de la esteroidogenesis testicular. *Rev. Med. de Chile.* 112: 599-603.

- Vance, D.E. and De Kruijff, B., 1980. The possible functional significance of phosphatidylethanolamine methylation. *Nature* 228, 277-278.
- Van der Molen, H.J. and Rommerts, F.F.G. 1981. Testicular steroidogenesis. in *The Testis*. pp. 213-239 Eds. Burger H. and De Kretser, D., New York; Raven Press.
- Van der Vusse, G.J.; Kalkman, M.L. and van der Molen, H.J. 1975. Endogenous steroid production in cellular and subcellular fractions of rat testis after prolonged treatment with gonadotropins. *Biochim. Biophys. Acta* 380: 473-485.
- Vance, D.E. and Ridgway, N.D. 1988. The methylation of phosphatidylethanolamine. *Prog. in Lipid Res.* 27(1): 61-79.
- Varela, I.; Mérida, I.; Pajares, M.; Villalba, M. and Mato, J. 1984. Activation of partially purified rat liver lipid methyltransferase by phosphorylation. *Biochem and Biophys Res Commun.* 122: 1065-1070.
- Varela, I; Merida, I; Villalba, M; Vivanco, F and Mato, J.M. 1985. Phospholipid methyltransferase phosphorylation by intact hepatocytes: Effect of glucagon. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 131: 447-483.
- Villalba, M.; Pajares, M.A.; Renart, M. F. and Mato, J.M. 1987. Protein Kinase C catalyses the Phosphorylation and activation of rat liver Phospholipid Methyltransferase. *Biochem. J.* 241: 911-916.
- Volwerk, J.J.; Pieterse, W.A. and de Haas, G.H. 1974. Histidine at the active site of Phospholipase A₂. *Biochemistry*, 13: 1446-1454.
- Voutilainen, R.; Tapanainen, J.; Chung, B.C.; Matteson, J.K.; Miller, W.L., 1986 Hormonal regulation of P-450_{SCC} (20,22 -desmolase and P-450_{C17} (17 α -hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 202-207.
- Warren, W.D.; Dufau, M.L. and Catt, K.J. 1982. Hormonal regulation of gonadotropin receptors and steroidogenesis in culture fetal rat testis. *Science*, 218: 375-377.
- Waters, S.B.; Hawes, B.E. and Conn, P.M. 1990. Stimulation of Luteinizing Hormone Release by Sodium Fluoride is independent of Protein Kinase-C Activity and unaffected by desensitization to Gonadotropin-Releasing Hormone. *Endocrinol.* 126: 2583-2591.

Welsh, T.H. Jr.; Jones, P.B.C. and Hsueh, A.J.W. 1984. Phorbol ester inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis in vitro. *Cancer Res.* 44: 885-892.

Welsh, T.H.Jr. and Hsueh, A.J.W. 1982. Mechanism of the inhibitory action of epidermal growth factor on testicular androgen biosynthesis in vitro. *Endocrinol.* 110: 1498-1506.

WHO Special Programme of Research Development and Research Training in Human Reproduction. Programme for the Provision of Matched Assay Reagents for the Radioimmunoassay. Method Manual. Fourth Ed. 1980.

Widmark, A.; Damber, J-E. and Bergh, A. 1989. High and low doses of luteinizing hormone induce different changes in testicular microcirculation. *Acta Endocrinol.* 121: 621-627.

Williams, C.D.; Horner, A.K. and Catt, K.J., 1976. Effects of methylxanthines on gonadotropin-induced steroidogenesis and protein synthesis in isolated testis interstitial cells. *Endocrine Res. Commun.* 3: 343-358.

Wilson, C.A.; Leigh, A.J. and Chapman, A.J. 1990. Gonadotrophin glycosylation and function. *J. of Endocrinol.* 125: 3-14.

Zatz, M.; Dudley, P.; Kloog, Y. and Markey, S. 1981. Non polar lipid methylation. *J. Biol. Chem.* 256: 10028-10032.

Zelenka, P.; Beebe, D.C. and Feagans, D.E. 1982. Transmethylation of Phosphatidylethanolamine: An initial Event in Embryonic Chicken Lens Fiber Cell Differentiation. *Science*, 217: 1265-1267.

Zimmerman, T.P.; Iannone, M. and Wolberg, G. 1984. 3-Deazaadenosine. *J. of Biol. Chem.* 259: 1122-1126.

Zipf, W.B. ; Payne, A.H. and Kelch, R.P. 1978. Prolactin Growth Hormone and Luteinizing Hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors. *Endocrinol.* 103: 595-600.

Zor, U. 1983. Role of cytoskeletal organization in the regulation of adenylate cyclase-cyclic adenosine monophosphate by hormones. *Endocrine Rev.* 4: 1-10.