

MATRIZ EXTRACELULAR PRODUCIDA POR CELULAS DE ESTROMA DE

TESTICULO: UN MICROAMBIENTE CON ROL REGULATORIO EN LA ESPERMATOGENESIS.

P.

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

JUAN PABLO RODRIGUEZ VIVES

Enero, 1991

Director de Tesis: Dr. José J. Minguell U

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

I N F O R M E   D E   A P R O B A C I O N  
T E S I S   D E   D O C T O R A D O

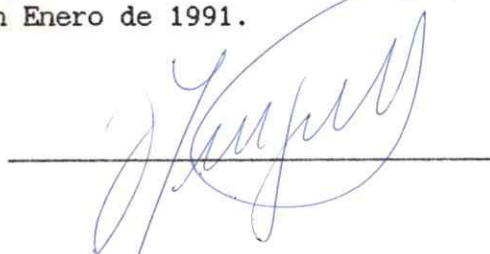
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

JUAN PABLO RODRIGUEZ VIVES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido en Enero de 1991.

Director de Tesis:

Dr. José J. Minguell

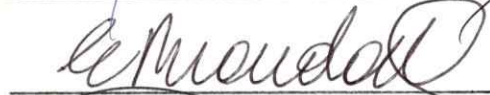


Comisión Informante de Tesis:

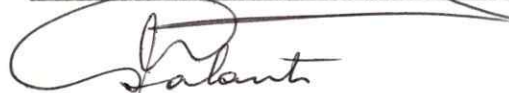
Dra. Catherine Connelly



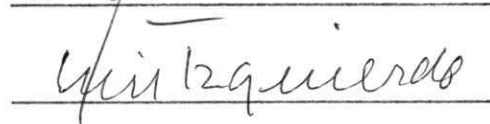
Dr. Enrique Brandán



Dr. Norbel Galanti



Dr. Luis Izquierdo



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera manifestar mi mas profundo agradecimiento al Dr. José J. Minguell, Director de Tesis, por su constante apoyo y estímulo durante el transcurso de esta Tesis.

Quisiera agradecer también a todo el grupo humano de la Unidad de Biología Celular del INTA, por su permanente colaboración durante el desarrollo de este trabajo. Extiendo también este agradecimiento a todos los miembros del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad de Chile, que prestaron su desinteresada ayuda para la realización de esta Tesis.

a mis padres y hermanos.

## INDICE DE MATERIAS

	Página
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xvii
INTRODUCCION	1
- Microambiente celular	2
- Interacciones celulares	4
- Interacción entre células de Sertoli y células de Leydig	6
- Interacción entre células de Sertoli y células peritubulares	6
- Interacciones entre células de Leydig y células peritubulares	7
- Interacción entre células de Sertoli y células germinales	8
- Matriz extracelular	9
- Hipótesis	11
MATERIALES Y METODOS	15
1. Obtención de células de testículo	15
a. Células de Sertoli	15
b. Células intersticiales	16
c. Células germinales	16
d. Células testiculares totales	17
2. Cultivos celulares	17
a. Cultivos de células de Sertoli	17
b. Cultivos de células intersticiales	18

c. Cultivos de la población total de células de testículo	18
d. Cultivos semisólidos	19
3. Recuento y viabilidad celular	20
4. Proliferación celular	20
a. Cinética de crecimiento	21
b. Síntesis de DNA	21
5. Estudios de estructura al microscopio de luz	21
6. Determinación de la producción de Proteína Ligante de Andrógenos (ABP)	22
7. Determinación de la producción de Testosterona	23
8. Medición de la síntesis de colágeno por incorporación de prolina tritiada	23
9. Caracterización de los tipos de colágeno	25
a. Por cromatografía de intercambio iónico	25
b. Electroforesis en geles de poliacrilamida	26
10. Síntesis de proteoglicanos	27
11. Separación y caracterización de Proteoglicanos	28
a. Separación de los proteoglicanos	28
b. Caracterización de proteoglicanos	29
12. Estudios de adhesión de células germinales a células de estroma	31
13. Localización de de proteoglicanos asociados a la membrana celular	32
RESULTADOS	34
A. PRODUCCION DE MOLECULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR CULTIVOS DE CELULAS SOMATICAS TESTICULARES AISLADAS	34
1. Cultivos celulares	34
2. Síntesis de colágeno por células de Sertoli y por células intersticiales.	35

3.	Síntesis de proteínas no colagenosas por células de Sertoli y por células intersticiales.	38
4.	Síntesis de proteoglicanos por cultivos de células de Sertoli y de células intersticiales	40
B.	GENERACION Y CARACTERIZACION DE UN SISTEMA DE CULTIVO DE CELULAS TESTICULARES TOTALES EN CONDICIONES DE LARGO TERMINO	50
1.	Condiciones de cultivo	50
2.	Características morfológicas de los cultivos celulares	51
	a. Células adherentes	51
	b. Células germinales	54
3.	Proliferación de células somáticas en cultivo de largo término	57
4.	Proliferación de células germinales	59
5.	Estudios de la capacidad funcional de los cultivos de largo término	61
	a. Producción de Proteína Ligante de Andrógenos (ABP)	61
	b. Producción de Testosterona	63
C.	GENERACION DE MACROMOLECULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR CELULAS SOMATICAS TESTICULARES BAJO CONDICIONES DE CULTIVO DE LARGO TERMINO	65
1.	Síntesis y distribución de colágeno	65
2.	Expresión de tipos de procolágeno producidos por células somáticas	67
3.	Síntesis y distribución de proteínas no colagenosas	72
4.	Síntesis de proteoglicanos por células somáticas testiculares	72
5.	Distribución de proteoglicanos y ácido hialurónico	75
6.	Caracterización molecular de proteoglicanos sintetizados por células somáticas testiculares en cultivo de largo término	77

a.	Proteoglicanos presentes en el medio de cultivo	77
b.	Caracterización de los proteoglicanos asociados a la membrana celular	80
c.	Caracterización de los proteoglicanos presentes en la fracción intracelular	82
7.	Proporción de los proteoglicanos asociados a la membrana celular y de los proteoglicanos presentes en el medio de cultivo	84
8.	Localización de proteoglicanos asociados a la membrana celular	85
9.	Estudios de adhesión de células germinales a capa adherente de células somáticas en cultivo de largo término	90
D.	DESARROLLO SEXUAL DE LA RATA Y SU IMPACTO EN LA GENESIS DE UN MICROAMBIENTE ESPERMATOGÉNICO	95
1.	Características edad-dependientes de las células somáticas testiculares en cultivos de largo término	95
a.	Proliferación celular	95
b.	Síntesis de ABP y testosterona	97
2.	Generación de componentes de matriz extracelular por células somáticas testiculares en cultivos de largo término	99
2.1.	Síntesis y distribución de colágeno	99
2.2.	Caracterización y distribución de tipos de procolágenos	101
2.3.	Síntesis y distribución edad-dependiente de proteoglicanos	105
2.4.	Características edad-dependiente de los tipos de proteoglicanos y la proporción en que ellos se encuentran	108
	DISCUSION	115
1.	Marco conceptual de un microambiente testicular	116
2.	Búsqueda de un modelo para estudiar las características del microambiente	120



3. Génesis de matriz extracelular por células somáticas	122
4. Cambios en componentes del microambiente espermatogénico durante el desarrollo sexual del animal	127
5. Conclusiones	130
APÉNDICE	131
Estudios de localización de proteoglicanos asociados a membrana por inmunofluorescencia.	131
REFERENCIAS	134

## INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Esquema del protocolo experimental para estudios de localización de proteoglicanos	33
2. Cultivos de células de Sertoli e intersticiales	36
3. Cromatografía en DEAE-Sephacel de proteoglicanos producidos por células de Sertoli, células intersticiales y por cultivos mixtos	41
4. Morfología de las células adherentes de un cultivo mixto	44
5. Morfología de las células en la capa adherente de cultivos de largo término	53
6. Morfología de células en la capa adherente de cultivos de largo término en confluencia	55
7. Morfología de células germinales adheridas a células de estroma en cultivos semisólidos	56
8. Curva de crecimiento de las células adherentes en cultivos de largo término	58
9. Curva de crecimiento de las células presentes en la fracción no adherente de cultivos de largo término	60
10. Producción de proteína ligante de andrógenos y testosterona por células somáticas testiculares en cultivo de largo término	62
11. Síntesis de colágeno por células somáticas testiculares en cultivo de largo término	66
12. Cromatografía en DEAE-celulosa de procolágenos radioactivos sintetizados por células somáticas testiculares	70
13. Síntesis de proteoglicanos por células somáticas testiculares en cultivo de largo término	74

14. Análisis por filtración en Sepharosa CL-4B y cromatografía en DEAE-Sephacel de los proteoglicanos y ácido hialurónico sintetizados por células somáticas testiculares y que se encuentran presentes en el medio de cultivo	78
15. Análisis por filtración en Sepharosa CL-4B y cromatografía en DEAE-Sephacel de los proteoglicanos y ácido hialurónico sintetizados por células somáticas testiculares y que se encuentran asociados a la membrana celular	81
16. Análisis por filtración en Sepharosa CL-4B y cromatografía en DEAE-Sephacel de los proteoglicanos y ácido hialurónico sintetizados por células somáticas testiculares y que se encuentran en la fracción intracelular	83
17. Cromatografía en DEAE-Sephacel de proteoglicanos producidos por células somáticas	88
18. Morfología de células germinales	91
19. Curva de crecimiento de las células adherentes de cultivos de largo término provenientes de ratas inmaduras y púberes	98
20. Síntesis de proteoglicanos y ácido hialurónico por células somáticas testiculares: Resultados obtenidos en el medio de cultivo	109
21. Síntesis de proteoglicanos y ácido hialurónico por células somáticas testiculares: Resultados obtenidos en la fracción asociada a la membrana celular	110
22. Síntesis de proteoglicanos y ácido hialurónico por células somáticas testiculares: Resultados obtenidos en la fracción intracelular	111
23. Representación esquemática del microambiente espermatogénico	119
24. Localización de los proteoglicanos asociados a la membrana celular de células de Sertoli	126
25. Inmunocitoquímica de cultivos de largo término	132

## INDICE DE TABLAS

	Página
1. Estructura de glicosaminoglicanos	12
2. Síntesis y exportación de colágeno por células de Sertoli y células intersticiales en cultivo	37
3. Síntesis y exportación de proteínas no colagenosas por células de Sertoli y células intersticiales en cultivo	39
4. Síntesis y distribución de proteoglicanos sintetizados por cultivos de células de Sertoli, de células intersticiales y por cultivos mixtos	42
5. Recambio de proteoglicanos asociados a membrana celular	46
6. Distribución y cantidad relativa de colágeno producido por células somáticas testiculares en cultivo de largo término	68
7. Distribución y cantidad relativa de colágeno producido por células somáticas testiculares en cultivo de largo término	71
8. Síntesis y distribución de proteínas no colagenasas producidas por células somáticas testiculares en cultivos de largo término	73
9. Distribución de proteoglicanos y ácidos hialurónico producidos por células somáticas testiculares	76
10. Proporción de los tipos de proteoglicanos en las diferentes fracciones	86
11. Correlación entre la adhesión de células germinales a monocapa de cultivos de largo término y la eliminación selectiva de proteoglicano mixto	93
12. Características diferenciales en la función testicular de ratas inmaduras y púberes	96
13. Síntesis de ABP y testosterona por células somáticas testiculares en cultivos de largo término	100

14. Síntesis y distribución de colágeno y proteínas no colágeno producido por células somáticas testiculares provenientes de ratas inmaduras y púberes	102
15. Tipos de procolágenos producidos por células somáticas testiculares provenientes de ratas inmaduras y púberes	104
16. Síntesis y composición de proteoglicanos producidos por células somáticas en cultivos de largo término provenientes de testículos de ratas inmaduras y púberes	106
17. Distribución de proteoglicanos y ácido hialurónico producidos por células somáticas testiculares	107
18. Proporción de tipos de proteoglicanos sintetizados por células somáticas testiculares	113
19. Resumen de características de los cultivos de largo término de células testiculares provenientes de ratas inmaduras y púberes	114

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABP	:	Proteínas ligante de Andrógenos
BSA	:	Albúmina de bovino
C-ABC	:	Condroitinasa ABC
CS	:	Condroitin sulfato
CTA	:	Cetiltriethylamonio
5- $\alpha$ DTH	:	5 $\alpha$ -dihidrotestosterona
EDTA	:	Acido etilen diaminotetraacético
FSH	:	Hormona folículo estimulante
HA	:	Acido hialurónico
hCG	:	Gonadotropina coriónica humana
HS	:	Heparán sulfato
HS-CS	:	Proteoglicano mixto
Kav	:	Coefficiente de distribución
LHRN	:	Factor de liberación de hormona luteinizante
M-CLT	:	Medio de cultivo de largo término
PBS	:	Tampón fosfato salino
PG	:	Proteoglicano
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
Tris	:	Tris-(hidroximetil) aminometano

## RESUMEN

En la espermatogénesis, tanto la migración, como la proliferación y diferenciación de las células germinales ocurren en el túbulo seminífero, en estrecho contacto con las células de Sertoli. Es por ésto, que a las células de Sertoli, históricamente se les ha asignado el rol de proveer un entorno adecuado (microambiente) para la maduración de la célula germinal. Sin embargo, numerosas evidencias tanto in vivo como in vitro, sugieren que este rol no es exclusivo de las células de Sertoli.

En esta tesis se propone ampliar el concepto de microambiente a uno en que no sólo participan las células de Sertoli, sino también las otras células somáticas, tales como células peritubulares, células de Leydig, fibroblastos; junto a factores solubles sintetizados por estas células y componentes de matriz extracelular.

Para ésto, en esta tesis se desarrolló un sistema in vitro de cultivos de largo término, en los cuales coexisten tanto los fenotipos testiculares de la línea germinal como los somáticos. De esta forma se establecen interacciones celulares, ya sea del tipo célula-célula o bien interacciones mediadas por factores difusibles. En las condiciones de cultivo utilizadas, las células somáticas proliferan y se organizan

formando estructuras nodulares características. También producen factores solubles, tales como proteína ligante de andrógenos (ABP) y testosterona; y componentes de matriz extracelular, como colágeno y proteoglicanos.

Los resultados obtenidos señalan que en estos cultivos se genera una organización espacial (microambiente ?), que permite la adhesión de algunos progenitores de células germinales y su eventual proliferación.

Una de las características del proceso espermatogénico es que sólo se inicia durante la pubertad del animal, sin que aún estén claro los mecanismos exactos que gatillan este proceso. Con el objeto de analizar el posible rol que juega el microambiente en este proceso, que ocurre durante la transición a la madurez sexual, utilizamos el sistema de cultivo de largo término como modelo que permitiera estudiar los cambios en el microambiente asociados al desarrollo sexual del animal.

Los resultados encontrados, utilizando cultivos de largo término de células provenientes de ratas en dos estados de desarrollo sexual (ratas inmaduras: 18 días de edad, y ratas púberes: 40 días de edad), demuestran cambios importantes tanto en las características proliferativas de las células somáticas, en la síntesis de los factores producidos por éstas (ABP y testosterona), como también en la síntesis total de componentes de matriz extracelular y en los tipos sintetizados en cada caso. De esta manera, se demuestra que el microambiente espermatogénico es un componente complejo y dinámico, que cambia en



función del estado de maduración sexual del animal. Estos resultados sugieren que, uno de los eventos que gatilla el inicio de la espermatogénesis, está relacionado con la formación o el establecimiento de un microambiente apto para que la célula germinal inicie su etapa de maduración, o que la maduración es función de la edad del animal y la edad gatilla el desarrollo de un microambiente apto.

## SUMMARY

In spermatogenesis, migration, proliferation and differentiation of germinal cells in the seminiferous tubule occurs, in close contact with Sertoli cells. It is assumed that Sertoli cells play a central role providing an adequate microenvironment for the development of germinal cells. However, both in vivo and in vitro evidences, suggest that this role might not be exclusive of Sertoli cells.

In this work, we propose to extent the rather limited concept of Sertoli's microenvironment, to one in which not only Sertoli cells participate but also the other somatic cells (peritubular cells, Leydig cells, fibroblasts), together with soluble factors and extracellular matrix components synthetized by these cells.

To further investigate the above assumption, we developed an in vitro system to culture testicular cells under long term conditions. In this system, where somatic and germinal phenotypes are present cellular interactions (cell to cell and/or mediated by difusible factors) are established. Under long-term culture conditions, somatic cells proliferate and organize in nodule-like structures. They also produce soluble factors as androgen binding protein (ABP) and testosterone as well as extracellular matrix components, like collagen and proteoglycans.

The results obtained show that, the organization of somatic cells in these cultures (microenvironment ?) seems to play an important role in the attachment of germinal cell progenitors and probably in its proliferation.

One of the features that characterize spermatogenesis is the fact that begin only in the puberty. It is not known which mechanisms trigger this process. As an experimental approach to study the possible role that microenvironment plays in this process, we decided to analyze whether changes in microenvironment are related with sexual developmental stages. The results from comparative studies performed in long-term cultures derived from immature (18 days) and pubertal (40 days) rats show important changes in the proliferative rate of somatic cells, together with variation in the synthesis of ABP, testosterone and extracellular matrix components. These results are interpreted as the expression of a spermatogenic microenvironment in the testis, which is a complex and dynamic and changes according to the sexual developmental pattern of the rat. We speculate that the onset of spermatogenesis depends and is related to the establishment of a microenvironment for the development of primitive germinal cells.

## INTRODUCCION

La espermatogénesis es un proceso que implica la división y diferenciación de una célula troncal monopotente a una célula especializada: el espermio. Este proceso tiene lugar en el túbulo seminífero, donde una adecuada organización celular permite que ocurran las necesarias interacciones que regulan las etapas de proliferación y diferenciación celular. La organización del tejido, junto con permitir el flujo o migración celular de la célula troncal (espermatogonia Ao), también debe contribuir a la preservación de la célula troncal, que es la única especie de célula germinal permanente en el tejido, a diferencia de su progenie que presenta expectativas de vida corta (Clermont and Hermo, 1976). La célula troncal es relativamente escasa y puede estar en ciclo celular o en estado de reposo proliferativo (Go).

Al desarrollarse, en contacto con la membrana basal de las células de Sertoli (Russell, 1977,a), las espermatogonias se mueven hacia el lumen del túbulo seminífero donde completan la meiosis y espermiogénesis, manteniendo aún una estrecha asociación con las células de Sertoli (Russell, 1977,b).

En el túbulo seminífero, la espermatogénesis procede sometida a mecanismos de control que están presentes en la organización estructural del túbulo seminífero (microambiente ?). Este control se

ejerce mediante interacciones entre las células germinales y las células de Sertoli, como también mediante la interacción de estas últimas con otras células somáticas (células peritubulares, células de Leydig etc.). La regulación de la espermatogénesis por hormonas producidas localmente o en otros tejidos sería por la acción de dichas hormonas sobre algunas de las células somáticas, mas que debido a la acción directa sobre las células germinales (Grootegoed et al, 1989).

- Microambiente celular.

En una gran variedad de tejidos se ha descrito la existencia de un microambiente que juega un rol en la proliferación y diferenciación celular (Potten et al, 1979). Este microambiente se define como la resultante, en el tiempo y el espacio, de interacciones entre distintos fenotipos celulares, con liberación de factores de crecimiento ( y/o diferenciación) y el establecimiento de una matriz extracelular (Dexter et al, 1977). Las interacciones celulares que se establecen en este microambiente, pueden ser del tipo célula-célula, mediadas por moléculas solubles o producto de la interacción de las células con componentes de matriz extracelular. Algunas moléculas de la matriz extracelular se encuentran asociadas a la membrana celular y reconocen sitios específicos de unión en componentes de matriz depositada, actuando como receptores de la información contenida en la matriz extracelular y relacionándose a través de ésta con otras células vecinas.

La regulación de la proliferación y diferenciación de la célula troncal depende del microambiente celular, por tanto la participación de la matriz extracelular en la conformación de dicho microambiente, supone que su composición no sea constante sino que varíe en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas.

La matriz extracelular consiste en una densa trama compuesta de colágeno, fibronectina y proteoglicanos, no sólo juega un rol de soporte, delimitando los diferentes compartimentos tisulares, sino también como un complejo dinámico de macromoléculas que media la adhesión celular y que juega un rol en la proliferación y diferenciación celular (Hay, 1981). Una estructura especializada de la matriz extracelular la constituye la membrana basal, que está compuesta además de proteoglicanos y fibronectina por laminina y colágeno tipo IV.

Existen evidencias que indican que, en el sistema hematopoyético, las células de estroma forman parte de un microambiente que tiene como funciones alojar las células troncales, favorecer el tránsito de éstas desde el reposo proliferativo (Go) a ciclo, y estimular el proceso de diferenciación (Wolf, 1979). Estas funciones asignadas al microambiente hematopoyético, pueden también ser aplicadas a otros sistemas donde exista un recambio celular elevado, como es el caso del sistema germinal.

Diversas evidencias sugieren que en el epitelio espermatogénico de testículo de mamífero, las células somáticas - primariamente las células de Sertoli- pueden proveer un microambiente para el desarrollo y

diferenciación de las células espermatozógenas (Tung and Fritz, 1980; Oonk et al, 1985; Sanborn et al, 1986).

Componentes de matriz extracelular tales como colágeno, ácido hialurónico, proteoglicanos y glicoproteínas, son macromoléculas muy abundantes en el testículo y producidas principalmente por las células de Sertoli y peritubulares (Skinner and Fritz, 1985a; Borland et al, 1986). Las células intersticiales, tales como células de Leydig y fibroblastos, producen una membrana basal que se localiza alrededor de estas células (Kuopio et al, 1989). Dentro del túbulo algunas moléculas de matriz extracelular se organizan en una lámina basal que separa las células peritubulares de las células epiteliales adyacentes. Además de esta estructura altamente organizada, las moléculas de matriz extracelular formarían parte también de un microambiente que promueve y mantiene la diferenciación de las células germinales (Tung and Fritz, 1980; Oonk et al, 1985).

#### - Interacciones celulares.

Tanto la proximidad espacial de los diferentes tipos celulares presentes en el testículo, como la particular arquitectura de este tejido, y la localización del sitio de acción de algunos de los productos secretados por las células testiculares, sugieren fuertemente que la regulación de la función testicular es mediada por las interacciones celulares que se establecen entre los diferentes fenotipos testiculares a través de una regulación de tipo paracrino.

Dentro de las interacciones en que participan las células testiculares, es importante considerar aquellas que se establecen entre los fenotipos testiculares y componentes de la matriz extracelular. Un ejemplo de esto, surge de la observación de las características morfológicas y funcionales (producción de ABP y respuesta a la hormona folículo estimulante, FSH) de las células de Sertoli en cultivo. Estas características dependen de si las células se cultivan sobre plástico o sobre una matriz extracelular aislada de un cocultivo de células de Sertoli y peritubulares (Hadley et al, 1985; Mather et al, 1984). Este material constituye un buen sustrato para aumentar la sobrevivencia de las células de Sertoli en cultivo primario y mantener la arquitectura normal de éstas, de manera tal de favorecer la sobrevivencia de las células germinales (Tung and Fritz, 1984; Suárez-Quian et al, 1985).

Resulta difícil realizar estudios de interacciones celulares in vivo. En este sentido, el desarrollo de sistemas de cultivos de diferentes fenotipos testiculares in vitro, ha permitido evidenciar la especificidad de las interacciones célula-célula que se establecen entre los distintos tipos celulares. El término interacción celular la utilizaremos no sólo para aquellas interacciones que involucran el contacto directo célula-célula, sino también aquellas mediadas por compuestos producidos por una célula y que ejercen su acción sobre otra, ya sea localmente o a distancia.



- Interacción entre células de Sertoli y células de Leydig.

Una de las interacciones mas estudiadas es la que se establece entre las células de Sertoli y las células de Leydig. La influencia recíproca entre ambos fenotipos celulares ha sido extensamente estudiada utilizando cocultivos de ambos tipos celulares.

El cocultivo de ambas células produce un aumento de la respuesta esteroidogénica de las células de Leydig al estímulo de gonadotropina coriónica humana (hCG), como también un aumento en la secreción de activador de plasminógeno por células de Sertoli (Reventos et al, 1989). Las células de Sertoli poseen receptores para andrógenos, lo que hace suponer que la testosterona participa en la regulación de la espermatogénesis mediante su unión a este tipo de células, produciendo entre otros efectos un aumento en la producción de ABP (Sanborn et al, 1977). Las células de Sertoli producen, a su vez, factores del tipo LHRH (factor de liberación de hormona luteinizante), que regulan la función de las células de Leydig (Sharpe et al, 1981; Sharpe et al, 1982), aumentando la producción de testosterona (Janecki et al, 1985; Grotjan and Heindel, 1982).

- Interacción entre células de Sertoli y células peritubulares.

Otro tipo de interacción es aquella que se establece entre las células de Sertoli y las células peritubulares, las cuales se encuentran adyacentes unas a otras en el túbulo seminífero, separadas por una membrana basal.

La interacción, célula específica (Mather and Phillips, 1984) de las células de Sertoli con las células peritubulares, produce un aumento en la producción de ABP y transferrina por las células de Sertoli. Este efecto es mediado por un factor dependiente de andrógenos, producido por las células peritubulares (Hutson and Stocco, 1981; Skinner and Fritz, 1985b). Existe además evidencia que las células de Sertoli producen factores que estimulan el crecimiento in vitro de las células peritubulares (Mather, 1984).

#### -Interacciones entre células de Leydig y células peritubulares.

La maduración morfológica de las células peritubulares dependen de andrógenos, a través de mecanismos mediados por receptores lo que sugiere que las células peritubulares constituyen uno de los blancos de acción de los andrógenos producidos por las células de Leydig. Se ha descrito que prostaglandinas, producidas también por las células de Leydig, ejercen también acción sobre las células peritubulares.

Estos dos tipos celulares ( células de Leydig y células peritubulares) se encuentran muy cercanas en el testículo. Incluso en algunas especies se ha observado células muy similares a las células de Leydig en la capa de células peritubulares. Esta estrecha asociación podría proveer una oportunidad de interacción entre estas células, mas allá de aquella mediada por la testosterona (Mather, 1984).

- Interacción entre células de Sertoli y células germinales.

In vitro, se ha demostrado que las células espermatogénicas y las células de Sertoli interactúan en un proceso que es célula específica (Tres and Kierszbaum, 1983; D'Agostino et al, 1984).

Esta interacción produce un marcado aumento en la síntesis de RNA y DNA en las células germinales (Rivarola et al, 1985), probablemente mediado por el factor mitogénico producido por la célula de Sertoli (Feig et al, 1980; Bellvé and Feig, 1984). También es posible observar este fenómeno a través de la unión de algunas de las proteínas producidas por las células de Sertoli: transferrina y ABP (Wright et al, 1981), a poblaciones enriquecidas de células germinales (Holmes et al, 1983; Steinberger et al, 1984) o por el efecto de piruvato y lactato (producidos por las células de Sertoli) sobre la síntesis de proteínas tanto en espermátocitos como en espermátidas aislada (Jutte et al, 1983).

Las células germinales también ejercen un efecto sobre las células de Sertoli, produciendo un aumento en la producción de ABP. Esta estimulación, sin embargo, está restringida a aquellas células germinales, espermátocitos en paquitenos, que se unen a la célula de Sertoli (Galdieri et al, 1984). Esta interacción y transferencia de productos, entre las células de Sertoli y las células germinales puede constituir un mecanismo de comunicación y regulación de la espermatogénesis por hormonas que actúan sobre las células de Sertoli (Steinberger et al, 1984).

Con los datos obtenidos in vitro, ha sido posible evidenciar la existencia de interacciones entre los diferentes fenotipos celulares presentes en el testículo. Esto se puede observar por el comportamiento que exhiben los fenotipos celulares al ser cultivados en forma aislada, cuando se cocultivan con otros fenotipos celulares o cuando se ponen en contacto con factores producidos por éstos (Janecki et al, 1985; Grotjan and Heindel, 1982; Bergh, 1982). Esta interacción parece ser fundamental para la regulación del funcionamiento de cada una de las células, debiera incidir, finalmente, en el proceso de la espermatogénesis.

- Matriz extracelular.

Como se ha indicado, algunas células de estroma, como células de Sertoli o células peritubulares, producen diversos componentes de matriz extracelular. El patrón de producción y depósito de estos componentes es diferente cuando los fenotipos que los producen son cultivados en forma aislada o en forma conjunta. Aunque no se conoce el significado fisiológico de las interacciones que llevan a la formación y mantenimiento de la matriz extracelular, los datos indican que existe cooperatividad en el depósito de la matriz (Skinner et al, 1985; Skinner and Fritz, 1985a).

El rol exacto que cumple la matriz extracelular en el sistema germinal no se conoce. En otros sistemas existen evidencias que, componentes de matriz extracelular no sólo participan como sostén sino que modifican la adhesión, los patrones biosintéticos, la migración y la proliferación celular (Yamada, 1983).

La organización de macromoléculas tales como colágeno, fibronectina, proteoglicanos, etc., en una matriz extracelular, debieran jugar un rol activo en el funcionamiento de las células de estroma. Así, en presencia de una matriz extracelular se observa claramente un aumento de la producción de ABP, una mayor respuesta a FSH, una organización de las células de Sertoli en cultivo morfológicamente muy similar a la estructura encontrada in vivo (Hadley et al, 1985; Pelliniemi et al, 1985), las que favorecen la interacción, y por lo tanto la sobrevivencia, de las células germinales. Ello no ocurre cuando las células de Sertoli son cultivadas en ausencia de dicha matriz (Tung and Fritz, 1984).

Por otro lado, no sólo es importante considerar los componentes de matriz extracelular exportados por las células y que se depositan estructurando una matriz, sino también aquellos componentes que permanecen asociados a la membrana celular. Estas últimas moléculas pueden reconocer componentes específicos de la matriz extracelular depositada, o bien pueden participar en el reconocimiento y adhesión de células vecinas.

En una gran variedad de células, se ha reportado la presencia de proteoglicanos de condroitin sulfato (CS) y heparán sulfato (HS) asociados a la membrana celular. En algunas de ellas, principalmente en células de tipo epitelial, el proteoglicano (PG) se presenta como un híbrido y contiene tanto cadenas de heparán sulfato como de condroitin sulfato. Las funciones de estos proteoglicanos asociados a la membrana celular no se conocen con precisión. Entre las funciones propuestas para

estas macromoléculas, se cuenta la de promover la adhesión de las células a la membrana basal mediante el reconocimiento de sitios específicos en alguno de los componentes de matriz extracelular (David et al, 1989). Esto se demuestra por el hecho que, al hidrolizar enzimáticamente las cadenas de heparán sulfato del proteoglicano asociado a la membrana de células de estroma de médula ósea, disminuye la capacidad adhesiva de los leucocitos inmaduros a estas células (Del Rosso et al, 1981).

Los mecanismos de regulación de la síntesis del proteoglicano mixto asociado a la membrana celular aún no se conoce. Se ha propuesto, sin embargo, que una forma de regulación se asocie con variaciones en la proporción en que se encuentran los dos tipos de cadenas de glicosaminoglicanos (GAG), como respuesta a cambios de la célula (Rapraeger, 1989). En la Tabla 1 se resumen algunas de las características moleculares de los proteoglicanos.

#### - Hipótesis.

In vivo, resulta evidente que todas las interacciones celulares que ocurren en el testículo, lo hacen simultáneamente, lo que implica que cada uno de los fenotipos está, directa o indirectamente regulado por las otras células del tejido. Por esta razón, no sólo las células de Sertoli, que son los fenotipos que están en contacto directo con las células germinales, y sus productos son las responsables de proveer un entorno adecuado para la proliferación y diferenciación de la célula germinal, sino que también deberían participar las otras células somáticas, los

TABLA 1. Estructura de glicosaminoglicanos.

	Unidades de monosacáridos	Sulfato por unidad de disacárido	Unido a proteína
Acido hialurónico	Ac. Glucorónico N-acetil glucosamina	0	-
Condroitin sulfato	Ac. glucorónico N-acetil galactosamina	0,2 - 1,0	+
Dermatán sulfato	Ac. glucorónico o idurónico N-acetil galactosamina	1,0 - 2,0	+
Heparán sulfato	Ac. glucorónico o ac. idurónico N-acetil glucosamina	0,2 - 3,0	+

productos secretadas por ellas y la matriz extracelular producida por todos los fenotipos de estroma, conformando un microambiente espermatogénico. De lo anterior se desprende que, además de los estudios que se realizan con fenotipos aislados, es importante utilizar un sistema en el cual coexistan todos los fenotipos testiculares y por lo tanto se permita que se establezcan las diferentes interacciones celulares.

Debido a la gran complejidad del sistema germinal, ha sido difícil estudiar *in vivo*, tanto el significado de las interacciones celulares, como la producción de distintos factores y la génesis y organización de una matriz extracelular.

Por ello, en esta tesis se diseña un sistema de cultivo que permita el establecimiento de interacciones celulares. En este sistema deben coexistir todos los fenotipos celulares del testículo, tanto aquellos de estroma como de la línea germinal. Un sistema con estas características, denominado en esta tesis como cultivo de largo término, no ha sido utilizado aún con esta finalidad.

En esta tesis se propone la existencia de un microambiente con un rol en la proliferación y diferenciación de la célula troncal germinal conformado no sólo por las células de Sertoli, sino que también incluya los otros fenotipos somáticos, tales como células de Leydig, células peritubulares, fibroblastos, macrófagos; productos secretados por estas células, como testosterona y ABP; y componentes de matriz extracelular. Este microambiente no debe ser estático sino cambiar durante el desarrollo.



Ya que la espermatogénesis es un proceso que sólo se inicia en la pubertad, parece interesante estudiar las características de algunos de los componentes del microambiente espermatogénico en animales en dos etapas diferentes de su desarrollo sexual: 1) en animales inmaduros, en los cuales aún no se inicia el proceso espermatogénico y 2) en animales púberes, donde ya se ha iniciado la espermatogénesis. Para ésto se utilizarán los cultivos de largo término, provenientes de ratas machos inmaduras y púberes, en los cuales se analizarán las características de las células somáticas, se determinará la síntesis de algunos de los productos secretados por ellas (ABP y testosterona), como asimismo se medirá la síntesis y distribución celular de componentes de matriz (colágenos y proteoglicanos) producidos por estas células.

## MATERIALES Y METODOS

### 1.- Obtención de células de testículo.

En esta tesis se utilizan ratas Wistar inmaduras (18-29 días de edad) y ratas púberes (40 a 45 días de edad).

Las ratas se sacrifican por decapitación, se obtienen los testículos y luego de decapsularlos se someten a tratamientos enzimáticos con el objeto de obtener las distintas poblaciones celulares:

#### a. Células de Sertoli.

Los testículos decapsulados son tratados con una solución de colagenasa tipo I, Worthington (0,4 mg/ml de Medio 199; 10 mg BSA) por 30 min a 33° C (Hutson and Stocco, 1981). Luego de la incubación se separan manualmente los túbulos de las células intersticiales. Los túbulos aislados son tratados nuevamente con la solución de colagenasa, liberando las células peritubulares. Luego de lavarlos tres veces con Medio 199, se disgregan mecánicamente pipeteando sucesivamente. Mediante este tratamiento se obtiene una población enriquecida en células de Sertoli. De aquí en adelante, cuando se mencionen cultivos de células de Sertoli, se referirá a cultivos enriquecidos en este tipo celular.

#### b. Células intersticiales.

Luego de incubar los testículos con colagenasa tipo I Worthington, en las condiciones indicadas en a), se separan manualmente los túbulos de las células intersticiales, se concentran por centrifugación y luego se lavan tres veces con Medio 199. Esta suspensión contiene células de Leydig, fibroblastos, macrófagos, como también células peritubulares.

#### c. Células germinales.

Los testículos obtenidos de ratas de 35 días son tratados con una solución de colagenasa tipo I, Worthington (0,4 mg/ml de tampón fosfato salino, PBS, pH 7,2) por 30 min a 33° C. Al término de la incubación, los túbulos se separan manualmente, se lavan dos veces con PBS y se disgregan mecánicamente. Se descartan los agregados celulares y las células se concentran por centrifugación (500 x g, 10min) luego de lo cual se resuspenden en BSA al 0,5% en PBS y se colocan en una gradiente discontinua de seroalbúmina de bovino (BSA) entre 1-4% (Lam et al,1970). Después de 4 horas a 4° C se colectan las fracciones y aquellas enriquecidas en espermatocitos paquitenos se utilizan para los experimentos de adhesión.

#### d. Células testiculares totales.

La suspensión de células de testículo se obtiene incubando los testículos, previamente decapsulados, con una solución de colagenasa tipo I Worthington (0,4 mg/ml de Medio 199; 10 mg BSA) durante 45 minutos a 33°C. Los agregados celulares se disgregan mecánicamente mediante pipeteos sucesivos. La suspensión celular se centrifuga (500xg por 10 min) y se lava tres veces con Medio 199. En esta suspensión se encuentran presentes tanto las células somáticas (células de Sertoli, células de Leydig, células peritubulares, fibroblastos) como aquellas de la línea germinal.

## 2. Cultivos celulares.

### a. Cultivos de células de Sertoli.

La fracción enriquecida en células de Sertoli obtenidas como se mencionó en 1.a) son resuspendidas en Medio 199 suplementado con 12% de suero fetal de bovino, 12% de suero de caballo, 0,1µM de hidrocortisona, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. A este medio se le denomina medio de cultivo de largo término (M-CLT). Las células ( $3,4 \times 10^5$  células) son cultivadas en botella de cultivo (25 cm<sup>2</sup>, Nunc), a 33°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. En las condiciones utilizadas las células de Sertoli se adhieren a la botella de cultivo formando una mono capa. Una vez a la semana se retira el medio de cultivo y se reemplaza por medio fresco.

#### b. Cultivos de células intesticiales.

Las células intersticiales obtenidas como se indicó en la sección 1.b), se resuspenden en medio M-CLT y se ponen a cultivar ( $3,4 \times 10^5$  células) en botellas de cultivo ( $25 \text{ cm}^2$ , Nunc), a  $33^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Una vez a la semana se cambia el medio por medio de cultivo fresco. Las células intersticiales se adhieren a la superficie de la botella de cultivo, formando una monocapa de células, donde se encuentran, entre otras, células de Leydig, fibroblastos, macrófagos.

#### c. Cultivos de la población total de células de testículo.

Las células obtenidas como se mencionó en la sección 1.c), se suspenden en medio M-CLT. Las células ( $1,36 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ ) se cultivan en botellas de cultivo ( $25 \text{ cm}^2$ , Nunc) e incubadas a  $33^\circ \text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Los cultivos son realimentados semanalmente removiendo la mitad del medio de cultivo (5 ml) y células en suspensión y reemplazándolo por una cantidad igual de medio de cultivo de largo término fresco (Rodríguez and Minguell, 1989a).

Bajo estas condiciones, se observa la proliferación y el establecimiento de una capa heterogenea de células somáticas, entre las que se encuentran células de Sertoli, células de Leydig, células peritubulares y fibroblastos, y células de la línea germinal adheridas a

esta capa. A esta población de células de estroma testicular se le denomina en este trabajo capa adherente. Una proporción importante de las células germinales no se adhiere al plástico y se encuentra en suspensión. A este compartimento celular se le denomina en este trabajo fracción no adherente.

Este tipo de cultivo se denomina en este trabajo cultivo de largo término.

#### d. Cultivos semisólidos.

Con el objeto de determinar la génesis de colonias de células germinales luego que éstas se adhieren a la capa de células adherente (ensayos clonales), se realizan cultivos semisólidos (Iscove et al, 1971).

Las células testiculares se resuspenden en medio M-CLT y se cultivan a 33 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Luego de una semana de establecido el cultivo de largo término, se retira el medio de cultivo y las células no adherentes. Sobre la capa de células adherentes se agrega una solución de agar al 0,3% preparada en medio M-CLT

En estas condiciones se puede observar la existencia de grupos de células germinales en estrecha asociación con determinados fenotipos del estroma.

### 3.- Recuento y viabilidad celular.

El número de células en cultivos se determinó utilizando un hemocitómetro.

Para el caso de las células que crecen en suspensión, a los tiempos escogidos, se toma una alícuota en la cual se cuentan las células.

Para determinar el número de células adherentes a los diferentes tiempos de cultivo, se liberan las células desde la superficie de la botella de cultivo por tratamiento con tripsina (0,1% en PBS, por 10 min a 37°C). Luego de la incubación se toma una alícuota para contar las células, utilizando un hemocitómetro.

La viabilidad celular se determina por exclusión de azul tripan.

### 4.- Proliferación celular.

La proliferación celular se determina, ya sea mediante una cinética de crecimiento y por medición de la síntesis de DNA.

a. Cinética de crecimiento.

En cada caso se siembran  $3,4 \times 10^5$  células por botella de cultivo en las condiciones indicadas en la sección 2.). Cada dos días de cultivo, se retiran tanto las células en suspensión como aquellas que se han adherido a la botella de cultivo, y se determina su número y viabilidad, como se indicó en la sección 3).

b. Síntesis de DNA.

La síntesis de DNA por células adherentes y no adherentes se determina por la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina. Luego de incubar por 24 horas las células con medio de cultivo suplementado con  $1 \mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H}$ -timidina (New England Nuclear, a.e.  $20 \text{ Ci/mmol}$ ), las células no adherentes se retiran y las células adherentes se liberan de la placa de cultivo por tratamiento con tripsina. Se toman alícuotas de células adherentes y no adherentes, se precipitan con TCA al 5% y el precipitado se separa por filtración. Los filtros de nitrocelulosa se lavan con TCA 5% y luego de secarlos se mide la radioactividad retenida en ellos. La síntesis de DNA se expresa como radioactividad incorporada por número de células.

5.- Estudios de estructura al microscopio de luz.

Los estudios morfológicos tanto de las células adherentes como de las células de la línea germinal se realizan por microscopía de luz



luego de teñir las células directamente en la botella de cultivo con May-Grunwald Giemsa, por observación directa de las células adherentes o bien en frotis de células germinales teñidas con May-Grunwald Giemsa. Las células de Leydig se identifican mediante la tinción histoquímica para la enzima 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Wiebe,1976).

#### 6.- Determinación de la producción de Proteína Ligante de Andrógenos.

La producción de ABP por células de Sertoli en la capa adherente se determina luego de incubar las células por 48 horas con Medio 199 libre de suero, en presencia o ausencia de 0,1  $\mu$ g/ml de FSH (rat-FSH-I5,NIADD,NIH). Al final de este periodo, se incuba una alícuota del medio con 2 nM de 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona tritiada ( $^3$ H-5 $\alpha$ -DHT) (148Ci/mol,Amersham) en presencia o ausencia de un exceso molar de 100 veces de 5 $\alpha$ -DHT no radioactiva en Tris-HCl 10mM (pH 8,5). Se incuba la mezcla por 30 min a 37° C y luego por 60 min a 0° C. Terminado el periodo de incubación, se filtra una alícuota en filtros de DEAE-celulosa previamente equilibrados con Tris-HCl 10 mM (pH 8,5). Los filtros se lavan con el mismo tampón y luego de secar se mide la radioactividad unida a éstos (Cailleau et al, 1984).

La síntesis de ABP se expresa como pmoles producidos por 10<sup>6</sup> células en 48 horas.

## 7.- Determinación de la producción de Testosterona.

La determinación de testosterona producida por células de Leydig presentes en la capa adherente de cultivos de largo termino se realiza por radioinmunoensayo (testosterone/dihydrotestosterone RIA kit, Amersham), luego de incubar durante 3 horas las células en la botella de cultivo con gonadotrofina coriónica humana (hCG)(2 IU/ml, 300 IU/mg, Sigma) en Medio 199 libre de suero.

La síntesis de testosterona se expresa como pg producidos por  $10^6$  células en 3 horas.

## 8.- Medición de la síntesis de colágeno por incorporación de prolina tritiada.

Esta se realizó siempre en células somáticas (adherentes), tanto en mono como cocultivos.

La capa adherente se lava dos veces con medio de cultivo de largo término, con el objeto de retirar las células no adherentes o aquellas adheridas debilmente al estroma. Las células de la capa adherente son incubadas en medio M-CLT suplementado con 50 µg/ml de ácido ascórbico, 50 µg/ml de β-aminopropionitrilo y 2 µCi/ml de  $^3\text{H}$ -prolina (20 µCi/mmol, Amersham) por 24 horas a 33°C en 5% CO<sub>2</sub>. En estas condiciones el colágeno sintetizado es liberado al medio de cultivo debido a la

presencia de  $\beta$ -aminopropionitrilo. Este reactivo no permite que ocurra entrecruzamiento ni depósito, por lo cual las moléculas de colágeno sintetizadas durante este periodo permanecen en forma soluble (Linsenmayer, 1981). Luego del periodo de incubación, el medio de cultivo es colectado y la capa adherente se lava dos veces con Medio 199.

1) Las células se liberan mediante tratamiento suave con tripsina, 2) se sonicán y se dializan contra ácido acético 0,5 M en presencia de inhibidores de proteasas, luego de lo cual se dializa contra Tris-HCl (pH 7,5). 3) Con el objeto de concentrar el colágeno, el medio que contiene el colágeno es tratado con sulfato de amonio (80% de saturación), seguido por una dialisis del precipitado en las mismas condiciones anteriores.

En ambas fracciones se determina la síntesis de colágeno mediante el análisis del material sensible a colagenasa (Peterkofsky and Diegelman, 1971). Para esto, una alícuota de cada fracción se incuba durante 90 min a 37° C con colagenasa tipo VII (Sigma). La reacción se detiene agregando una solución de ácido tánico al 1,25% y TCA al 25%. Luego de centrifugar se obtiene un precipitado y un sobrenadante. El precipitado se lava dos veces con ácido tánico 0,25% y TCA 5% y los lavados se juntan con el sobrenadante. Se determina la radioactividad en ambas fracciones, correspondiendo la radioactividad presente en el sobrenadante a proteínas sensibles a colagenasa (colágeno) y la presente en el precipitado a proteínas no colagenosas, es decir aquellas proteínas que no son sensibles a colagenasa. La síntesis de colágeno se expresa

como cpm de  $^3\text{H}$ -prolina incorporadas por número de células o como porcentaje respecto a las proteínas totales, es decir colágeno mas las proteínas no colagenosas. El cálculo de las proteínas totales supone que la incorporación de  $^3\text{H}$ -prolina es cinco veces mayor en colágeno que en proteínas no colagenosas (Aumailley et al,1982).

## 9.- Caracterización de los tipos de colágeno.

### a) Por cromatografía de intercambio iónico.

El colágeno es sintetizado y exportado al medio en la forma de procolágeno. En el espacio extracelular termina su procesamiento al ser hidrolizadas los extremos amino y carboxi terminal que no se encuentran formando triple hélice, por amino y carboxipeptidasas específicas.

Para analizar los tipos de procolágenos presentes tanto en medios de cultivo como intracelularmente, ambas fracciones se precipitan con sulfato de amonio (80% de saturación), se disuelve el precipitado y se dializa contra Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) que contiene 2 M urea y 1 mM EDTA (Uitto et al, 1980). Alicuotas del material dializado se cromatografían en columnas de DEAE-celulosa (2,2x16 cm) equilibradas en el tampón de diálisis. La columna se eluye con una gradiente lineal de NaCl (0 a 0,2 M) preparada en el mismo tampón. En las fracciones

colectadas se mide su radioactividad y su contenido de procolágeno, este último mediante el análisis de material sensible a colagenasa, según se indicó anteriormente (Peterkofsky and Diegelman, 1971).

Las especies separadas por cromatografía en DEAE-celulosa se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida.

#### b) Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los tipos de colágeno se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5% en condiciones denaturantes (1% SDS) (Laemmli, 1970). Las fracciones que se separan por cromatografía en DEAE-celulosa, que contienen colágeno se concentran mediante precipitación con sulfato de amonio, dializadas contra ácido acético y luego tratadas con pepsina (1 mg/ml, 12 horas a temperatura ambiente). Este último tratamiento tiene por objeto hidrolizar las proteínas no colágeno como también hidrolizar los extremos amino y carboxilo terminal de los procolágenos, que no se encuentran formando triple hélice. A las fracciones así tratadas se le agrega el tampón que contiene urea 2M y SDS 1% y luego se somete a electroforesis por 6 horas.

## 10.- Síntesis de proteoglicanos.

Las células no adherentes se retiran por aspiración y en las células adherentes se mide la síntesis de proteoglicanos. Para ésto, se agregan 5  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H}$ -glucosamina (22  $\mu\text{Ci/mmol}$ , Amersham) en medio M-CLT) a la capa de células adherentes y se cultivan por 48 horas a 33° C. En algunos experimentos la marcación se realiza por 48 horas agregando 5 $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{35}\text{S}$  sulfato (250  $\text{mCi/mmol}$ ) al medio de cultivo. Al final del periodo de incubación, se retira el medio de cultivo y la capa adherente se lava dos veces con tampón fosfato salino (PBS). Los lavados se juntan con el medio de cultivo original. Las células son liberadas mediante tratamiento suave con tripsina (0,05%, 10min, 37° C). Las células se centrifugan y el sobrenadante se guarda. Las células se resuspenden y se lavan dos veces con PBS. Los lavados se juntan con el sobrenadante obtenido del tratamiento con tripsina para obtener la fracción asociada a membrana (Oohira et al,1983). Para obtener la fracción intracelular las células son tratadas con un buffer de extracción disociativo que contiene 4 M guanidina-HCl e inhibidores de proteasas (Yanagishita and Hascall,1984). A las fracciones del medio de cultivo y asociados a membrana celular, se le guanidina-HCl sólida hasta una concentración final de 4 M, N-etilmaleimida hasta una concentración final de 10 mM y fenilmetilsulfonilfluoruro hasta una concentración final de 1 mM.

Los proteoglicanos totales en cada fracción se determinan mediante precipitación diferencial con cetiltriethylamonio (CTA) al 0,5%.

Luego de 1 hora a temperatura ambiente, el precipitado es colectado por filtración en filtros de fibra de vidrio, el cual se lava con CTA al 0,1% y posteriormente con agua destilada. Se mide la radioactividad asociada al filtro (Wasteson et al, 1973).

## 11. Separación y caracterización de Proteoglicanos.

### a) Separación de los proteoglicanos.

A cada una de las fracciones preparadas según se indica en la sección 10 se le remueven la glucosamina tritiada no incorporada a macromoléculas, la guanidina y otros reactivos por cromatografía en columnas de Sephadex G-50 (1,2 x 30 cm, Pharmacia) equilibradas y eluidas con una solución de urea 8 M que contiene 0,15 M de cloruro de sodio; 0,05 M de acetato de sodio; 0,5% (w/v) de Triton X-100, pH 6,0. Las fracciones que eluyen en el volumen de exclusión ( $V_0$ ) de la columna, que contienen macromoléculas marcadas, se analizan por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacel) y/o por filtración en gel (Sephacel CL-4B).

i.- La columna de Sepharosa CL-4B (1,8x70 cm, Pharmacia) se equilibra con tampón Tris-HCl 50 mM que contiene 4M guanidina HCl, 0,5% (w/v) de Triton X-100, pH 7,0. Luego que la muestra es aplicada, la columna se eluye con el tampón de equilibrio y se colectan fracciones de 1 ml y se mide la radioactividad en ellas. Estas fracciones contienen proteoglicanos, glicosaminoglicanos entre otros compuestos marcados.

ii.- La columna de DEAE-Sephacel (1,2 x 10 cm, Pharmacia) se equilibra con tampón Tris-HCl 50 mM que contiene urea 7 M, pH 6,5. Luego que la muestra es aplicada, la columna se lava con el tampón de equilibrio y posteriormente con el mismo tampón que contiene NaCl 0,15 M. El material retenido, que contiene proteoglicanos marcados, se eluye con una gradiente lineal de NaCl (0,2 a 1,0 M) en el tampón de equilibrio. Se colectan fracciones de 2 ml a las cuales se mide la radioactividad y conductividad (Carney, 1986).

Adicionalmente para los estudios en filtración en gel se calculan los coeficientes de distribución ( $K_{av}$ ) de los distintos proteoglicanos. El coeficiente de distribución ( $K_{av}$ ) para cada pico de radioactividad se calcula de acuerdo a: ( $K_{av}=(V_e-V_o)/(V_t-V_o)$ ), siendo  $V_e$  el volumen de elución de cada fracción;  $V_o$ , el volumen de exclusión de la columna, que se determina usando azul dextrano y  $V_t$ , volumen total que se estima utilizando glucosamina tritiada como marcador.

Para analizar el perfil de elución de las cadenas de glicosaminoglicanos unidas al núcleo proteico éstas se deben liberar desde el proteoglicano, para lo cual las muestras son dializadas y tratadas toda la noche con NaOH 0,2 M (Oohira et al, 1983).

#### b) Caracterización de proteoglicanos.

La caracterización de los distintos tipos de proteoglicanos y glicosaminoglicanos presentes en las fracciones obtenidas por a y b se



realiza analizando la sensibilidad a diferentes enzimas degradativas de glicosaminoglicanos.

Las muestras son dializadas exhaustivamente contra agua destilada, se ajustan a 0,15 M Tris-HCl, pH 8,0 y se digiere con pronasa (Sigma, 7 mg/ml, 10 h a 42° C) (Whiteside et al, 1985). Después de inactivar la enzima (10 min a 100° C) las muestras se clarifican por centrifugación. La caracterización se realiza por tratamientos con condroitinasa ABC, condroitinasa AC (Sigma) y hialuronidasa str. hyal.(Seikagaku), que actúan específicamente sobre condroitín sulfato y dermatán sulfato; condroitín sulfato y ácido hialurónico, respectivamente. Luego del tratamiento enzimático se agrega condroitín sulfato como coprecipitador (0,6 mg/ml, Sigma). El grado de digestión de los GAG luego del tratamiento con las enzimas fue seguido por precipitación diferencial con una solución de cetiltriethylamonio (Wasteson et al, 1973). Para esto, los glicosaminoglicanos se precipitan con una solución de CTA al 0,5%. Luego de 1 hora a temperatura ambiente el precipitado es colectado en un filtro de fibra de vidrio, el cual se lava con CTA al 0,1% y posteriormente con agua destilada. Para la caracterización de heparán sulfato, las muestras son sometidas a tratamiento con ácido nitroso, el cual hidroliza específicamente heparán sulfato, y el grado de la reacción se evalúa por cromatografía en columnas de Sephadex G-50 (Shively and Conrad, 1976), en las cuales se separan las macromoléculas resistentes al tratamiento de los productos de la reacción.

## 12.- Estudios de adhesión de células germinales a células de estroma.

Con el objeto de estudiar las interacciones adhesivas entre las células germinales con células de estroma, se utiliza un método que permite cuantificar la adhesión mediante la marcación de las células germinales con  $^{57}\text{Cr}$ -cromato de sodio (Campbell et al, 1987).

La interacción implica enlaces adhesivos entre moléculas presentes en las células germinales y de estroma, que son resistentes a lavados con medios isotónicos y agitación vigorosa y que se remueven sólo mediante tratamientos con tripsina.

Para ésto, las células germinales separadas mediante gradiente de BSA y resuspendidas en PBS se incuban con el isótopo por 45 minutos a  $37^\circ\text{C}$  ( $10\text{ uCi}/1 \times 10^6$  células). Al final de la incubación, las células se lavan repetidas veces, se resuspenden en Medio 199 y se agregan sobre una capa de células de estroma. Luego de 1 hora de interacción a  $33^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ , se retiran las células no adherentes, que contienen las células germinales marcadas que no se adhieren al estroma, y se lavan dos veces la capa adherente con Medio 199. Las células adherentes, que incluyen las células de estroma junto con las células germinales marcadas que se adhirieron específicamente, se liberan por tratamiento con tripsina (0,1%, 10 min). Se mide la radioactividad en ambas fracciones celulares. La adhesión se expresa como porcentaje, que se calcula a partir de las células marcadas adheridas específicamente al estroma respecto al total de células marcadas que se agregan al cultivo, en cada experimento de adhesión.

### 13.- Localización de proteoglicanos asociados a la membrana celular.

Como una manera de determinar si los proteoglicanos asociados a la membrana celular se encuentran distribuidos homogéneamente en ella, o bien se encuentran ubicados en ciertas zonas de la membrana, se realizan estudios en que se determina la sensibilidad de los proteoglicanos a enzimas que los degradan específicamente. Los proteoglicanos producidos por las células de estroma se marcan incubándolas con  $^3\text{H}$ -glucosamina por 48 horas. Luego de finalizado el período de marcación, la monocapa de las células de estroma se trata, *in situ*, con condroitinasa ABC (0,05 U/ml) a 33°C por 30 minutos, para remover específicamente las cadenas de condroitin sulfato de proteoglicanos que se encuentran orientados apicalmente en relación al medio de cultivo. Finalizado este procedimiento, el cual no produce la liberación de las células desde la botella de cultivo, se retira el medio y las células de la monocapa son tratadas con tripsina 0,05% por 10 min. Este procedimiento, junto con liberar las células desde la placa de cultivo, libera también todos los proteoglicanos asociados a la membrana celular remanentes, es decir que fueron hidrolizados por el tratamiento con condroitinasa ABC, y que se encuentran ubicados tanto apical como basolateralmente con respecto del medio de cultivo. Para caracterizar los tipos de proteoglicanos así obtenidos, se cromatografían en DEAE-Sephacel, como se indicó en la sección 11. La figura 1 muestra un esquema del protocolo experimental utilizado en estos estudios.

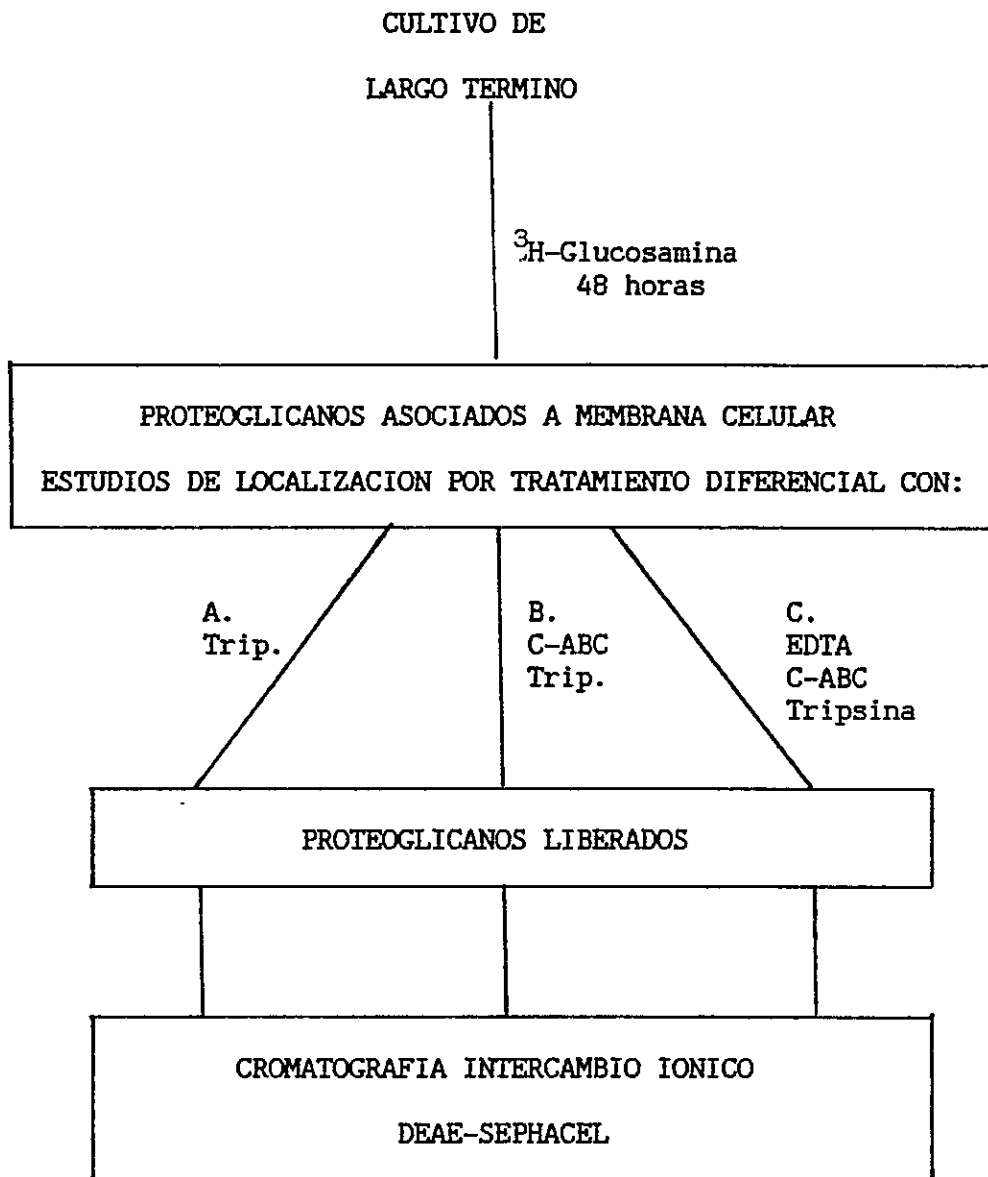


Figura 1: Esquema del protocolo experimental para estudios de localización de proteoglicanos.

## RESULTADOS.

### A. PRODUCCION DE MOLECULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR CULTIVOS DE CELULAS SOMATICAS TESTICULARES AISLADAS.

En estos estudios se mide la síntesis y se caracterizan algunos componentes de matriz extracelular tales como colágeno y proteoglicanos. Estas mediciones se realizan en células de Sertoli, que son los fenotipos celulares que se encuentran en contacto directo con las células germinales, y en células intersticiales, las cuales no forman parte del túbulo seminífero y, que como se ha mencionado, afectan la funcionalidad de las células de Sertoli.

#### 1.- Cultivos celulares.

Con este objeto, se establecen cultivos de células de Sertoli y de células intersticiales según se describe en Materiales y Métodos.

Las células de Sertoli, obtenidas luego de tratamiento enzimático de los túbulos seminíferos, se disgregan y se resuspenden en medio M-CLT. Al cabo de 24 horas de cultivo, las células se adhieren a la botella formando agregados celulares que presentan las siguientes

características morfológicas: forma irregular del núcleo, nucleoplasma homogéneo con nucleolo ubicado en posición central. En la figura 2 se muestra un agregado típico de células de Sertoli. También se puede observar en dicha figura que las células de Sertoli no proliferan durante los 12 días de cultivo, tiempo máximo estudiado.

Las células intersticiales también se adhieren a la botella de cultivo, formando una monocapa heterogénea de células, entre las cuales se encuentran presentes células de Leydig y fibroblastos (Figura 2). Como se muestra en la figura, esta población celular prolifera hasta los 12 días de cultivo, luego de lo cual alcanza la confluencia.

## 2.- Síntesis de colágeno por células de Sertoli y por células intersticiales.

Tanto las células de Sertoli como las células intersticiales en cultivo sintetizan activamente colágeno. Como se muestra en la Tabla 2, al comparar la cantidad de colágeno sintetizado por estos dos tipos celulares no se observan diferencias significativas. Es interesante el hecho que las células de Sertoli sintetizen una cantidad similar de colágeno que las células intersticiales, donde existen fibroblastos, que son importantes productores de colágeno. Esto se puede explicar porque al no estar en división las células de Sertoli podrían estar sintetizando colágeno constantemente, mientras que las células intersticiales sólo lo harían en algunas etapas del ciclo celular. También se puede observar en

**Figura 2. Cultivos de células de Sertoli e intersticiales.**

Número de células de Sertoli (A) y de células intersticiales (B) a los 2 y 12 días de cultivo. A los tiempos señalados, las células se liberan de la placa por tratamiento con tripsina y en una alícuota se cuenta el número de células en un hemocitómetro.

Microfotografía de las células de Sertoli (C) y de las células intersticiales (D) en cultivo (x 100). En C, el asterisco muestra un agregado típico de células de Sertoli. En D, la punta de flecha muestra una células con las características de célula de Leydig, la flecha muestra células con características de fibroblastos.

### Células de Sértoli

### Células Intersticiales

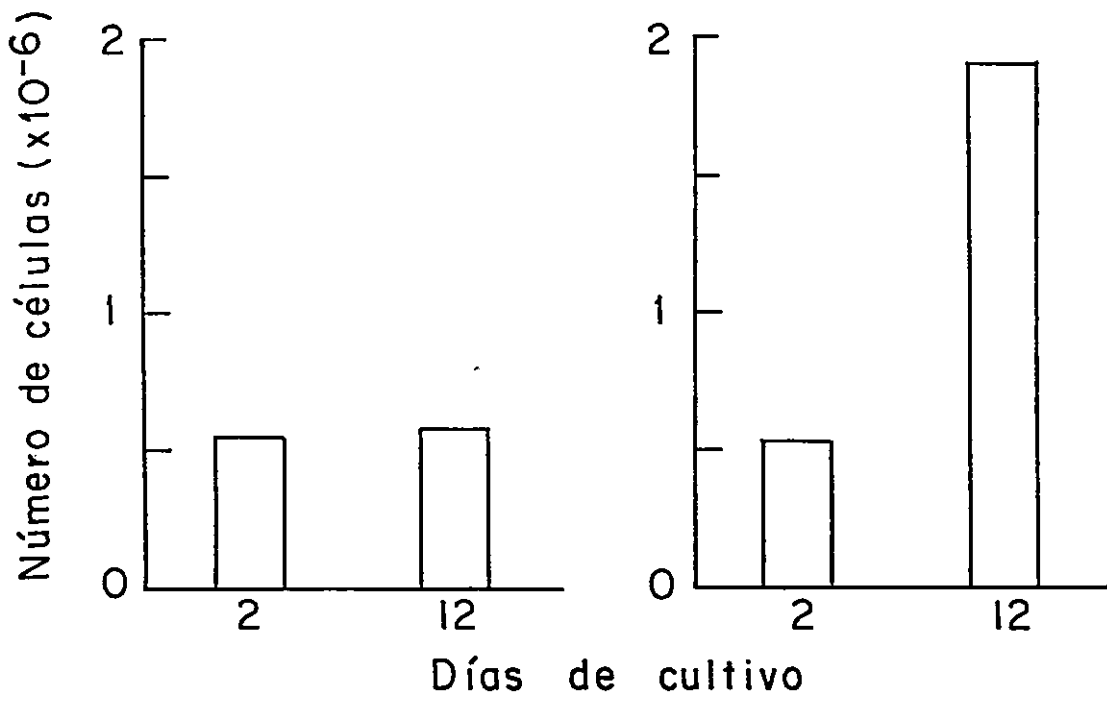




TABLA 2. Síntesis y exportación de colágeno por células de Sertoli y células intersticiales en cultivo.

	Síntesis de colágeno	
	Total (cpm/10 <sup>6</sup> células)	Fracción de Exportación*
Células de Sertoli	16.840 ± 1.840	0,57 ± 0,06
Células Intersticiales	17.590 ± 1.200	0,71 ± 0,06

Las células se obtienen como se describe en Materiales y Metodos, a partir de testículos de rata de entre 18 y 20 días de edad.

La síntesis de colágeno se expresa como cpm de prolina tritiada incorporada en el material sensible a colagenasa.

Las mediciones se realizan a los 12 días de cultivo y los datos representan el promedio ± desviación estandar de tres experimentos.

\* Representa la fracción de colágeno exportado respecto al colágeno total sintetizado.

dicha Tabla, que la fracción de colágeno exportado al medio de cultivo respecto del total de colágeno sintetizado (fracción de exportación), es levemente superior en las células intersticiales que en las células de Sertoli (0,71 versus 0,57). Esto indica que alrededor del 57% del colágeno sintetizado por las células de Sertoli y alrededor del 70% del colágeno sintetizado por las células intersticiales se encuentra en el medio de cultivo y por lo tanto puede ir a formar parte de la matriz extracelular.

### 3.- Síntesis de proteínas no colagenosas por células de Sertoli y por células intersticiales.

Al analizar la producción de proteínas totales no colagenosas (no sensibles a degradación por colagenasa) en estos mismos sistemas de cultivos, se puede observar que tampoco existen diferencias ni en la cantidad total sintetizada ni en la forma como ellas se distribuyen entre el medio de cultivo y la fracción celular. Esto último, representado por las fracciones de exportación, demuestra que alrededor del 80% de estas proteínas sintetizadas de novo, son exportadas hacia el medio de cultivo (Tabla 3). Por otra parte, la síntesis total de estas proteínas es 4 a 5 veces mayor que la síntesis total de colágeno (Tablas 2 y 3).

TABLA 3. Síntesis y exportación de proteínas no colagenosas por células de Sertoli y células intersticiales en cultivo.

Síntesis de proteínas no colagenosas		
	Total 6 (cpm/10 células)	Fracción de exportación*
Células de Sertoli	75.200 ± 6.450	0,83 ± 0,03
Células Intersticiales	77.900 ± 2.640	0,83 ± 0,01

Las células se obtienen como se describe en Materiales y Métodos, a partir de testículos de ratas de entre 18 y 20 días de edad. La síntesis de proteínas no colagenosas se expresa como cpm de prolina tritiada incorporada a proteínas no sensibles a colagenasas. Los datos representan el promedio ± desviación estandar de tres experimentos realizados a los 12 días de cultivo.  
 \* Corresponde a la fracción de proteínas exportadas al medio de cultivo respecto al total sintetizado.

#### 4.- Síntesis de proteoglicanos por cultivos de células de Sertoli y de células intersticiales.

Tanto los cultivos de células de Sertoli como de células intersticiales incorporan activamente glucosamina tritiada a macromoléculas, las cuales son separadas del isótopo libre en una columna de Sephadex G-50. Sobre el 90% del material que eluye en el volumen exclusión de esta columna corresponde a proteoglicanos y ácido hialurónico, demostrado por el perfil de elución en DEAE-Sephacel (Figura 3). De ahí que la cantidad de proteoglicanos que se indican en la Tabla 4, pueda obtenerse del material eluido en el volumen de exclusión de una columna de Sephadex G-50.

Como se aprecia en la Tabla 4, la cantidad total de proteoglicanos (presentes en el medio de cultivo y asociados a la membrana celular) sintetizados por células de Sertoli, es alrededor de 2,5 veces superior a la cantidad sintetizada por cultivos de células intersticiales. La distribución de estas macromoléculas se mantiene constante en ambos tipos celulares.

Con el objeto de determinar si la ocurrencia de interacciones celulares (ya sea célula-célula o mediadas por factores difusibles) afecta la producción de proteoglicanos de matriz extracelular, se realizaron estudios respecto a la síntesis de estos componentes por cultivos mixtos de células de Sertoli y de células intersticiales.

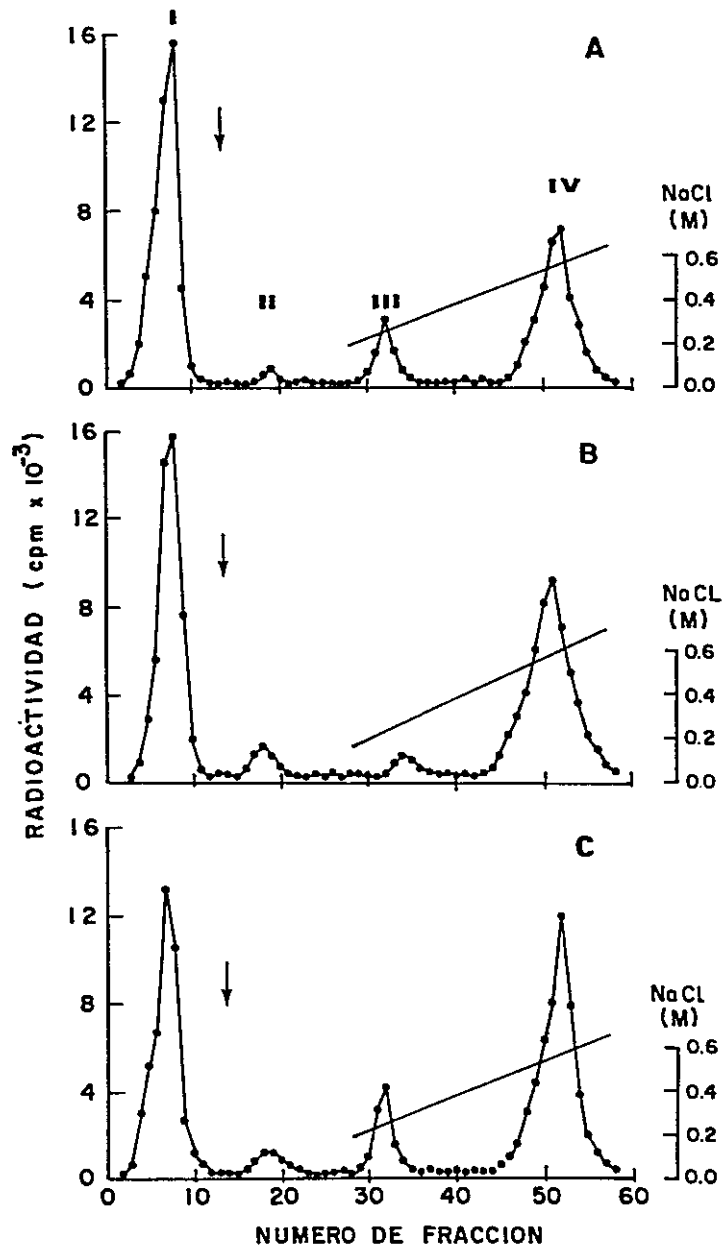


Figura 3. Cromatografía en DEAE-Sephacel de proteoglicanos producidos por células de Sertoli (A), células intersticiales (B) y por cultivos mixtos (C). Alicuotas del material marcado con <sup>3</sup>H-glucosamina que eluye en el volumen vacío de una columna de Sephadex G-50, es cromatografiado en columnas de DEAE-Sephacel. El pico I corresponde a ácido hialurónico, el pico II corresponde a glicoproteínas, el pico III corresponde a un proteoglicano mixto de heparán sulfato y condroitín sulfato y el pico IV corresponde a un proteoglicano de condroitín sulfato.

TABLA 4. Síntesis y distribución de proteoglicanos sintetizados por cultivos de células de Sertoli, de células intersticiales y por cultivos mixtos.

Cultivo	Total	Medio Cultivo (cpm/10 <sup>6</sup> células)	Asociado a membrana celular
Sertoli	292.000	183.400	109.500 (37,4%)
Intersticiales	116.900	79.300	37.600 (32,2%)
Mixto	85.800	42.500	43.300 (50,5%)

El establecimiento de los cultivos de células de Sertoli e intersticiales se describe en Materiales y Métodos, a partir de testículos de ratas de entre 18 y 20 días de edad. Los cultivos mixtos se establecen poniendo igual número de células de Sertoli y células intersticiales por botella de cultivo. Los datos se expresan como cpm de glucosamina tritiada incorporada en proteoglicanos.

Entre paréntesis se indica el porcentaje asociado a la membrana celular.

Para el establecimiento de estos cultivos se siembra un número similar de ambos tipos celulares, las cuales se adhieren a la botella de cultivo. Esta población celular prolifera hasta los 12 días de cultivo, alcanzando luego la confluencia. La figura 4 muestra la apariencia de un cultivo mixto, donde se destaca la organización que se logra, con un agregado de células de Sertoli rodeado por las células intersticiales.

Al comparar la cantidad total de proteoglicanos sintetizados por los cultivos mixtos, se puede observar que ésta corresponde sólo a un 30% de la cantidad sintetizada por las células de Sertoli y a un 70% de la sintetizada por las células intersticiales. No sólo se observa una diferencia en la síntesis total de proteoglicanos, sino también en la distribución de estas macromoléculas. La proporción de macromoléculas asociadas a la membrana celular aumenta en forma significativa en los cultivos mixtos. Así, mientras en los cultivos de células de Sertoli la cantidad de precursor radioactivo incorporado en proteoglicanos asociados a la membrana celular corresponde al 37%, y en los cultivos de células intersticiales corresponde al 32% del total de los proteoglicanos sintetizados; en los cultivos mixtos el 51% de los proteoglicanos producidos se encuentra en esta fracción celular. La síntesis de estas macromoléculas por cultivos mixtos, no corresponde a la suma de la síntesis de proteoglicanos por las células de Sertoli y células intersticiales en cultivos aislados. Estos resultados sugieren que se establecerían interacciones celulares entre las células de Sertoli y las



Figura 4. Morfología de las células adherentes de un cultivo mixto. Se muestra un agregado de células de Sertoli rodeado por células intersticiales. (x 100).



células intersticiales en los cultivos mixtos, afectando la producción y distribución de proteoglicanos.

La menor cantidad de precursor radioactivo incorporado en proteoglicanos que se encuentran asociados a la membrana celular en los cultivos mixtos, comparado con los encontrados en los cultivos de células de Sertoli aisladas, puede corresponder a una menor síntesis, a una mayor degradación de estas macromoléculas o a un aumento de la liberación de estas macromoléculas al medio de cultivo. En un intento por conocer si algunas de las alternativas planteadas es la correcta, se realizaron estudios de pulso y caza, utilizando como trazadores radioactivos tanto  $^3\text{H}$ -glucosamina como  $^{35}\text{S}$  sulfato. Estos resultados se muestran en la Tabla 5. La radioactividad asociada a la membrana celular disminuye más rápidamente en los cultivos mixtos que en los cultivos de células de Sertoli. El resultado de desaparición de radioactividad es similar si se usa  $^{35}\text{S}$  sulfato o  $^3\text{H}$ -glucosamina como trazador. Esto valida el uso de  $^3\text{H}$ -glucosamina como marcador de proteoglicanos, y por otra parte indica que el recambio de proteoglicanos y ácido hialurónico es similar. Los resultados no permiten dilucidar el mecanismo implicado en el recambio de estas macromoléculas, sin embargo sugieren que las diferencias observadas se deben a una mayor degradación de estas macromoléculas o una mayor liberación de estos proteoglicanos al medio de cultivo en los cultivos mixtos y no a una menor síntesis.

Como se mencionó anteriormente, la caracterización de los proteoglicanos se hace por cromatografía en DEAE-Sephacel. En los tres

TABLA 5. Recambio de proteoglicanos asociados a membrana celular.

cultivo	Días		
	0	1	2
	(%)*		
Sertoli	100	89 ± 11	72 ± 12
Mixto	100	51 ± 1	43 ± 7

\* Luego de 48 horas de marcación con  $^3\text{H}$ -glucosamina o  $^{35}\text{S}$  sulfato, se mide la radioactividad de los proteoglicanos asociados a la membrana celular, que corresponde al 100% (Día 0). A los días señalados se mide la radioactividad remanente, la cual se expresa como porcentaje respecto del día 0. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos realizados utilizando glucosamina tritiada como precursor radioactivo. Resultados similares se obtienen al utilizar  $^{35}\text{S}$ -sulfato.

tipos de cultivos estudiados, no se observan diferencias cualitativas importantes en los proteoglicanos asociados a la membrana celular, ya que en todos ellos se obtiene un perfil de elución que se caracteriza por presentar cuatro picos (Figura 3). El pico I no se retiene en la columna y eluye con el tampón de equilibrio. El pico II, es retenido y eluye a una concentración de NaCl de 0,15 M; y los picos III y IV que son retenidos en la columna eluyen a una concentración de NaCl de 0,26 M y 0,56 M, respectivamente.

Para caracterizar las cadenas de glicosaminoglicanos asociados a cada pico de radioactividad, alícuotas de estas fracciones son sometidas a tratamientos con enzimas que hidrolizan específicamente glicosaminoglicanos y tratamientos químicos para determinar heparán sulfato. El pico I resultó ser ácido hialurónico, dado que es completamente sensible al tratamiento con hialuronidasa. El pico II contiene material radioactivo que correspondería a glicoproteínas de secreción, ya que no es sensible ni a tratamiento con hialuronidasa ni a tratamiento con condroitinasa ABC. Estas glicoproteínas no fueron objeto de estudios más detallados.

El material que eluye asociado al pico III corresponde a proteoglicanos de condroitín sulfato y de heparán sulfato, o bien a un proteoglicano mixto que contenga cadenas de heparán sulfato y de condroitín sulfato. La presencia de estos componentes se deduce por el hecho que el material es sensible a condroitinasa ABC y a condroitinasa AC, como también a tratamiento con ácido nitroso. Los proteoglicanos de

condroitín sulfato y de heparán sulfato, por tener diferente carga, se retienen en forma diferencial en una columna de intercambio iónico, de la cual son eluidos separadamente, utilizando una gradiente salina. El hecho que, en las condiciones aquí utilizadas, las especies sensibles a ácido nitroso (HS) y a condroitinasa ABC (CS) eluyan de la columna de DEAE-Sephacel como una sola especie, sugiere que las cadenas de heparán sulfato y condroitín sulfato se encuentran posiblemente unidas a un mismo núcleo proteico, dando origen a un proteoglicano mixto.

El material que eluye asociado al pico IV, corresponde a un proteoglicano que contiene sólo cadenas del tipo condroitín sulfato, a juzgar por ser altamente sensible a tratamientos con condroitinasa ABC y AC, pero no es sensible a tratamiento con ácido nitroso.

En los cultivos mixtos el análisis cuantitativo revela que la razón entre el proteoglicano de condroitín sulfato y el proteoglicano mixto de heparán y condroitín sulfato disminuye significativamente en comparación con los cultivos aislados de células de Sertoli o de células intersticiales. En los cultivos mixtos esta razón es de 6,1, mientras que en los cultivos de células de Sertoli la razón es 9,6 y en los cultivo de células intersticiales es de 13,3. Este cambio en la razón de los proteoglicanos se debe fundamentalmente a un aumento en la cantidad del proteoglicano mixto de heparán y condroitín sulfato (calculado a partir de la figura 3).

Los resultados de síntesis y distribución celular de

proteoglicanos obtenidos con cultivos mixtos, comparados con aquellos obtenidos con cultivos aislados de células de Sertoli y de células intersticiales, indican que en los cultivos mixtos se establecen interacciones celulares, las cuales alteran el patrón de biosíntesis y distribución celular de estas macromoléculas. Esta interacción cuya expresión morfológica se observa en la figura 4, implican un ordenamiento de las células intersticiales en torno a los agregados de células de Sertoli.

Por lo tanto, en estudios in vitro de la síntesis de componentes de matriz extracelular y de su posible rol funcional, es importante realizarlos en cultivos donde coexistan los distintos fenotipos celulares del testículo, mas que en cultivos de fenotipos aislados.

## B. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE CULTIVO DE CÉLULAS TESTICULARES TOTALES EN CONDICIONES DE CULTIVO DE LARGO TÉRMINO.

Por lo anterior se inició la búsqueda de un sistema de cultivo donde coexistan todos los fenotipos celulares del testículo, tanto somáticos como de la línea germinal, de forma tal que las interacciones célula-célula o interacciones mediadas por mensajeros químicos, se expresen morfológica y funcionalmente. Después de varios intentos, se diseñó un sistema, que denomino cultivo de largo término, que permite la adecuada interacción celular y que es viable y funcionalmente competente.

### 1.- Condiciones de cultivo.

Las condiciones óptimas para el cultivo de la población total de células testiculares, requieren de la suplementación del medio de cultivo con 12% de suero fetal de bovino y 12% de suero de caballo, para obtener así una adecuada concentración de varias hormonas que tienen efecto espermatogénico (Dufau et al, 1984; Louis and Fritz, 1979). De esta manera, este medio de cultivo tiene una concentración 15 veces mayor de hormonas pituitarias (FSH + LH), 8 veces mayor de progesterona y 2 veces mayor de andrógenos, comparado con similares utilizados para el cultivo de células testiculares, como el descrito por Steinberger (1975). El medio de cultivo también se suplementa con hidrocortisona, a una concentración efectiva para inhibir en un 40-60% el crecimiento de

fibroblastos en el cultivo (Minguell et al, 1982), lográndose que el cultivo no se enriquezca en este fenotipo celular.

## 2.- Características morfológicas de los cultivos celulares.

Cuando la población total de células de testículo se cultivan en condiciones de cultivo de largo término, las células germinales y las células somáticas pueden ser separadas fácilmente debido a su diferente adhesividad a la placa de cultivo. Las células somáticas se adhieren fuertemente al plástico, probablemente vía moléculas adhesivas, tipo fibronectina, la cual está presente en alta concentración tanto en el suero fetal como en el suero de caballo con que se suplementa el medio de cultivo. La mayor parte de las células germinales permanecen en suspensión, probablemente debido a que las células germinales en estados de maduración mas avanzado no reconocen sitios de unión en la matriz extracelular o en las células somáticas adheridas a la placa.

### a) Células adherentes.

Los resultados muestran que la población total de células de testículo cultivadas en las condiciones de largo término indicadas, generan, luego de 24 horas de cultivo, una capa adherente compuesta por células somáticas y una fracción de células no adherentes que incluye a las células germinales. El análisis morfológico al microscopio de luz

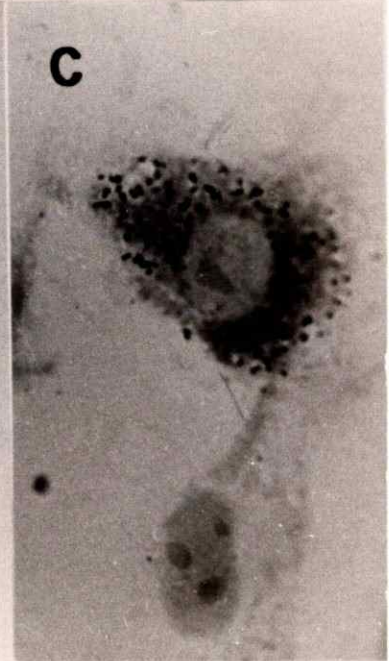
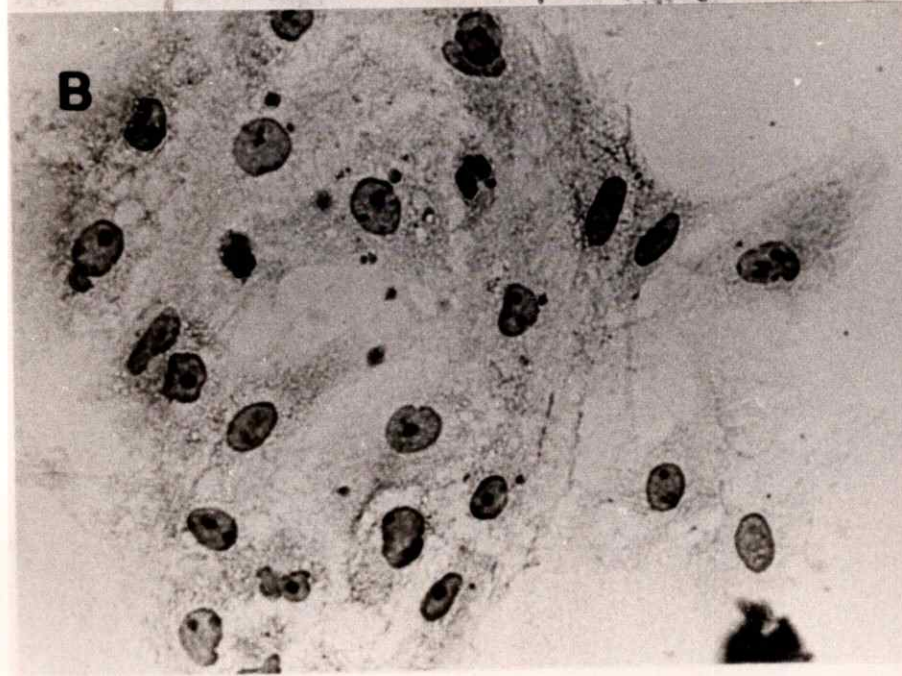
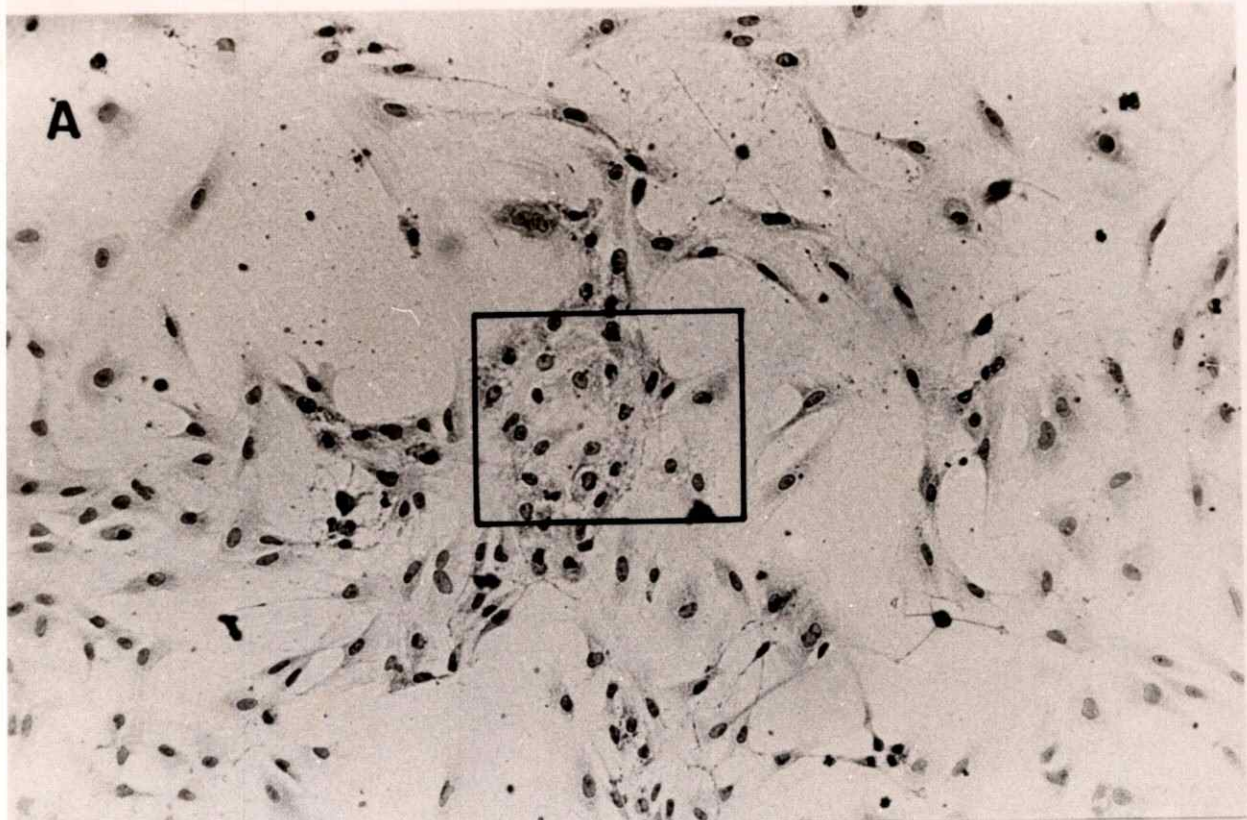
revela una composición celular heterogénea para las células adherentes (Figura 5). Se observan agregados celulares de células de Sertoli a partir del día 3 de cultivo. En estos agregados, las células muestran una forma irregular del núcleo con invaginaciones de la membrana nuclear y presentan un nucleoplasma marcadamente homogéneo, con una gran cantidad de eucromatina los cuales presentan un nucleolo ubicado en posición central (Figura 5 B).

La presencia de células de Leydig, por otra parte, se evidencia por la tinción histoquímica específica para la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Figura 5 C). Entre los días 1 y 10 de cultivo, aproximadamente un 10% del total de las células adherentes muestran una reacción positiva para esta enzima. Luego de periodos mas largos de cultivo, la cantidad de células que presentan una tinción positiva disminuye a un 2-3%. Los datos aquí presentados no permiten saber si esta disminución se debe a muerte celular, a una pérdida de la capacidad funcional de estas células o a ambas. De cualquier manera esta disminución se ve avalada por la menor síntesis de testosterona, como se mostrará mas adelante. Además de las células de Sertoli y células de Leydig, también están presentes en la capa adherente otros fenotipos celulares con características morfológicas de células peritubulares y fibroblastos (Figura 5).

Después de 12 días de cultivo, cuando se alcanza la confluencia y por tanto el crecimiento celular se ha detenido, se observa al microscopio de luz una monocapa celular bien organizada pero no



Figura 5. Morfología de las células en la capa adherente de cultivos de largo término. a) Microfotografía de las células adherentes a los 6 días de cultivo (x 70). b) Mayor aumento del área marcada en A, muestra un agregado de células de Sertoli (x 250). c) Apariencia típica de una célula de Leydig a los 6 días de cultivo, que presenta tinción positiva para  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (x 700).



homogénea. Esta monocapa está caracterizada por la formación de estructuras del tipo "nódulos" de células de Sertoli, con numerosas células elongadas que se proyectan de un nódulo a otro, como se muestra en la figura 6. Estas estructuras son similares a las observadas por Tung y Fritz (1986).

#### b) Células germinales.

Las células germinales, en las condiciones de cultivo de largo término utilizadas, no se adhieren al plástico y por lo tanto permanecen en suspensión, lo que permite retirarlas cada vez que se realice la realimentación de los cultivos, con medio fresco.

Sin embargo, se observa que una proporción de las células germinales se encuentra adheridas a células de la capa adherente, específicamente a zonas enriquecidas en células de Sertoli, de donde se liberan al medio de cultivo. Como otra manera de poner en evidencia esta población celular se usa un ensayo clonal (sistema de cultivo semisólido), en el cual la migración de las células germinales está impedida. Se producen así, colonias que se generan a partir de células progenitoras tempranas, adheridas al estroma testicular. En la figura 7, se observa que estas colonias están compuestas por aproximadamente 40 a 100 células, con una morfología homogénea, caracterizada por una fuerte birrefringencia.

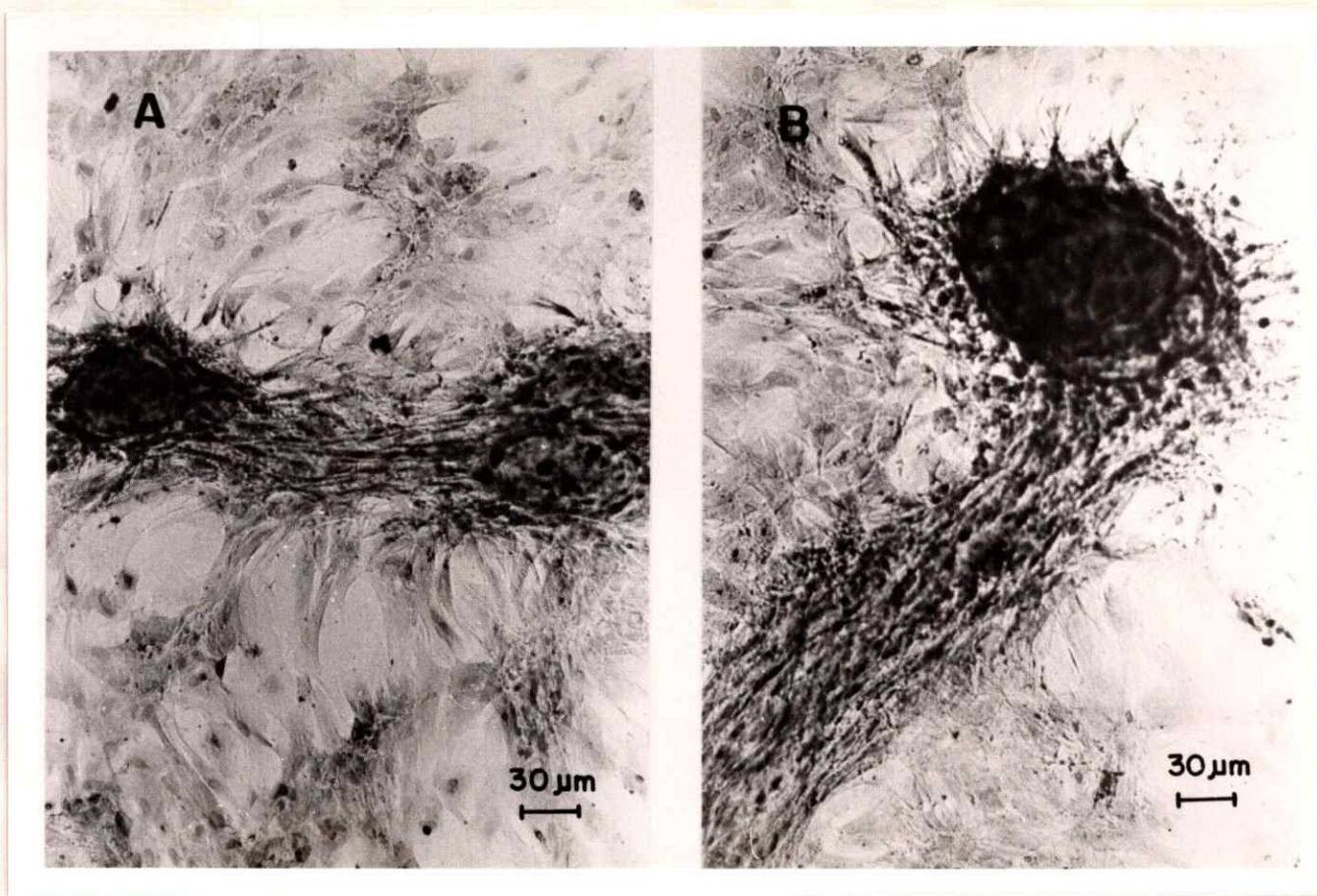


Figura 6. Morfología de células en la capa adherente de cultivos de largo término en confluencia. A) Microscopía de luz de las células somáticas muestra dos estructuras tipo nódulo. Células elongadas se proyectan de un nódulo a otro. Células peritubulares rodean a estas estructuras (x 100). B) Se muestra una estructura tipo nódulo mas elaborado (x 100).

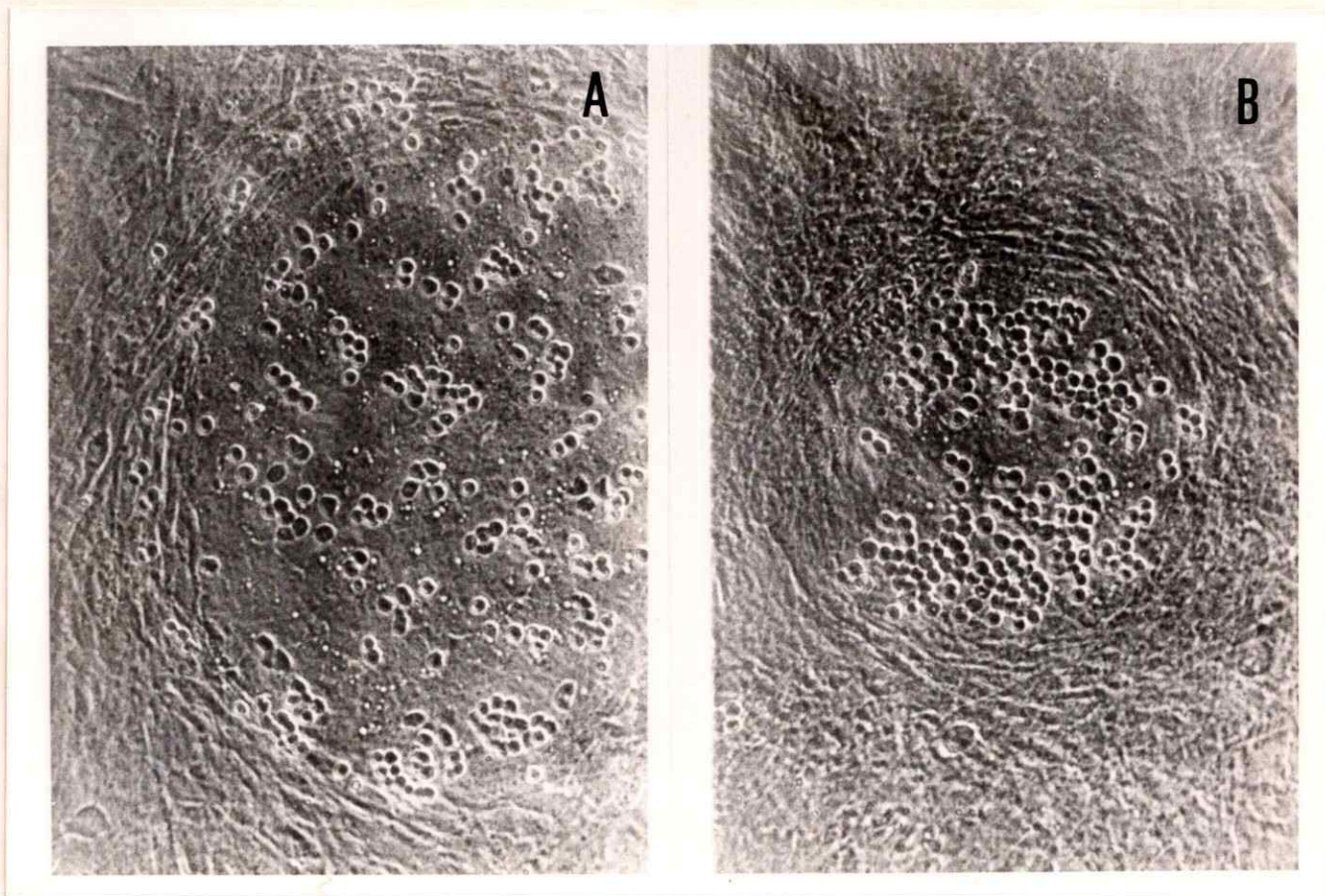


Figura 7. Morfología de células germinales adheridas a células de estroma en cultivos semisólidos. Sobre la capa de células adherentes se agrega agar al 0,3% para establecer cultivos semisólidos. En estas condiciones se observan colonias de células germinales asociadas a células de Sertoli presentes en el cultivo de largo término (x 100).

Esta metodología presupone además que la capa de células adherentes del cultivo de largo término, provee las señales celulares y químicas (microambiente) necesarias para, al menos, la proliferación de las células germinales.

Utilizando estos ensayos clonales se confirma la observación microscópica que señalaba que las colonias de células germinales se asocian solamente a células de Sertoli presentes en la capa adherente (Figura 7). Otras células adherentes del cultivo de largo término, como células peritubulares y fibroblastos no son capaces de sostener el desarrollo clonal de progenitores germinales.

Estas observaciones indican que en los cultivos de largo término, se genera una monocapa organizada de células somáticas las que establecen interacciones celulares no sólo entre ellas, sino también entre células germinales y las células de Sertoli.

### 3.- Proliferación de células somáticas en cultivo de largo término.

La población heterogénea de las células somáticas presentes en la capa adherente del cultivo de largo término, proliferan activamente. Esta proliferación, expresada como una curva de crecimiento, se muestra en la figura 8. Se puede observar que luego de 48 horas de iniciado el cultivo, entre un 30 y 40% del inóculo inicial de células testiculares se

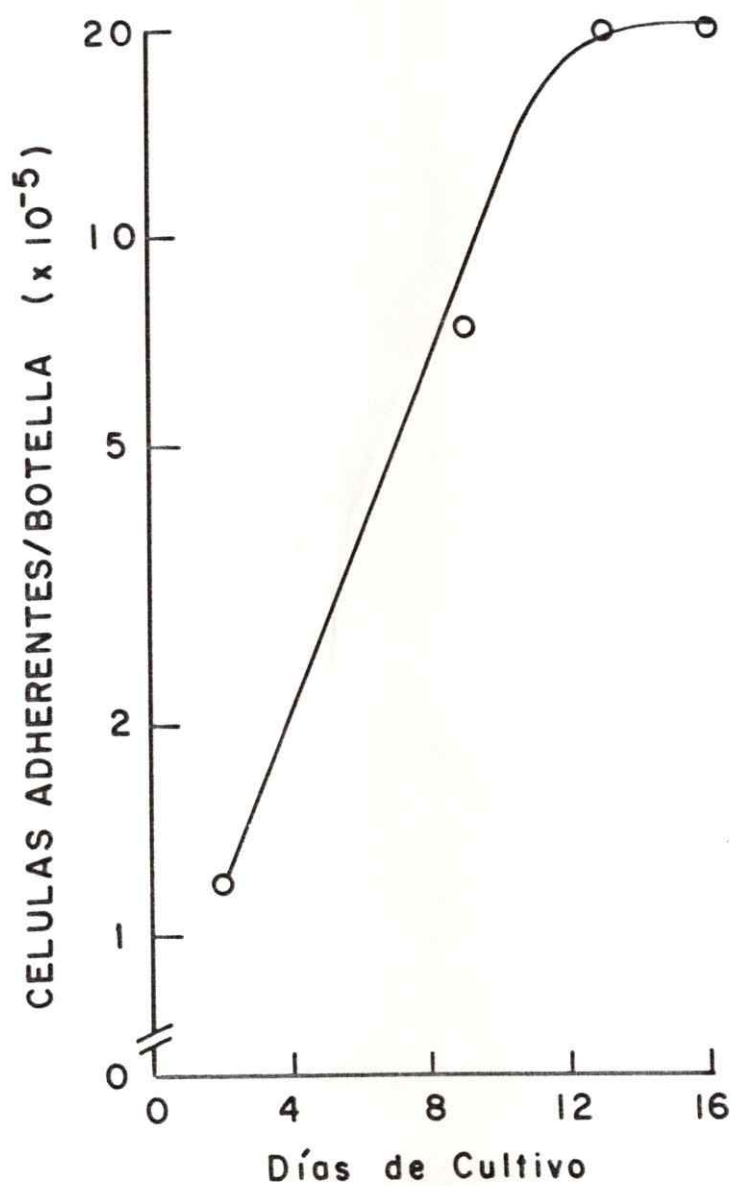


Figura 8. Curva de crecimiento de las células adherentes en cultivos de largo término. Se siembran  $3,4 \times 10^5$  células testiculares por botella. A los tiempos señalados, las células de la capa adherente se liberan como se indica en Materiales y Métodos y se cuentan en un hemocitómetro.

adhiere a la placa de cultivo. La eficiencia de adhesión a la placa de cultivo relativamente baja, que se observa en este tipo de cultivos (30-40%), se puede explicar por el alto número de células germinales presentes en la suspensión celular con que se inicia el cultivo y por el daño que sufren algunas células somáticas por efecto del tratamiento enzimático y mecánico que se utiliza en la preparación de la suspensión celular. Estas células proliferan activamente hasta los 12 días de cultivo, manteniendo su capacidad adhesiva. Esta fase logarítmica de crecimiento es seguida por una fase donde no se observa proliferación celular, debido a una inhibición por contacto, dada la confluencia del cultivo. Con estos datos se calculó un tiempo de duplicación promedio para la población adherente de 48 horas.

#### 4.- Proliferación de células germinales.

La fracción de células germinales, presentes en el inóculo inicial de los cultivos de largo término, corresponde a células germinales en varios estados de diferenciación. Estas células germinales proliferan activamente bajo las condiciones de cultivo de largo término, en estrecho contacto con las células de estroma desde donde se liberan hacia el medio de cultivo. Como se muestra en la figura 9, el número de células germinales (no adherentes) por botella de cultivo aumenta progresivamente hasta el día 12 de cultivo, con un tiempo de duplicación de aproximadamente 72 horas. A tiempos más largos de cultivo (16 días),



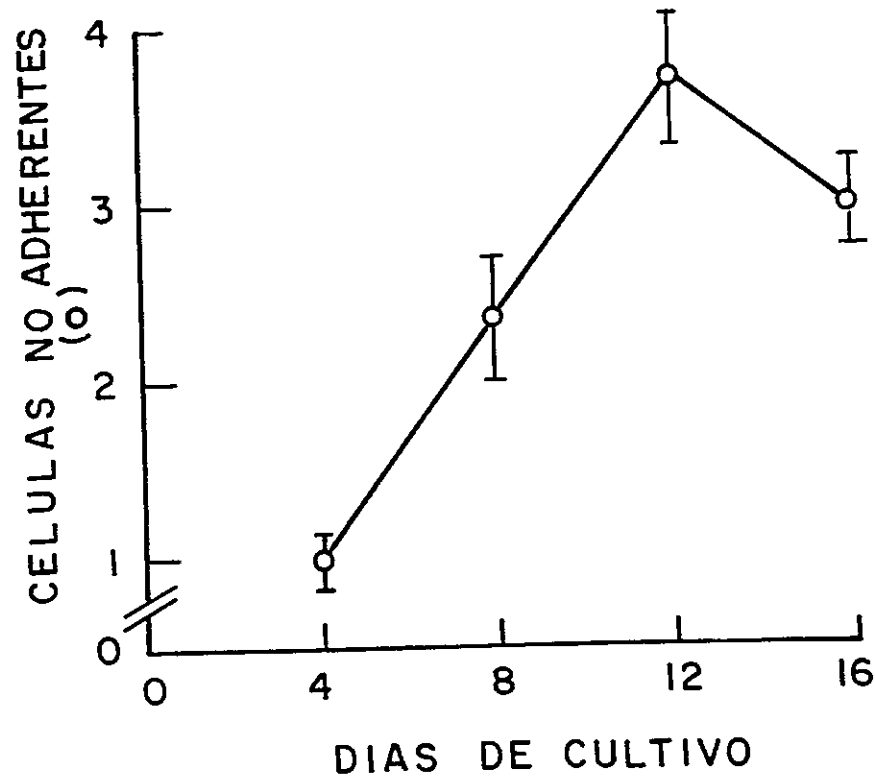


Figura 9. Curva de crecimiento de las células presentes en la fracción no adherente de cultivos de largo término. El número de células no adherentes se expresa como un valor relativo respecto al número de células presentes en el día 4 de cultivo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  desviación estandar de 4 determinaciones. El número de células no adherentes se corrige considerando el número de células no adherentes que se retiran cada vez que se cambia el medio de cultivo.

se observa una disminución en el contenido de células germinales, indicando una disminución en la capacidad proliferativa de esta población celular.

Esta disminución en la capacidad proliferativa se confirma por estudios de síntesis de DNA en estas células, medida por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. La síntesis de DNA al día 16 de cultivo es sólo un 30% de aquella observada para células al día 4 de cultivo.

#### 5.- Estudios de la capacidad funcional de los cultivos de largo término.

Para determinar que las células presentes en los cultivos de largo término, no sólo proliferan sino que también mantienen sus funciones específicas, se realizan estudios que permiten determinar la producción de compuestos de exportación propios de las células de Sertoli y Leydig.

##### a.- Producción de Proteína Ligante de Andrógenos (ABP).

Las células de Sertoli presentes en la capa adherente producen y liberan al medio de cultivo ABP, como se observa en la figura 10A. La producción de ABP se mantiene relativamente constante durante los 15 días de cultivo estudiados. Esta observación es interesante puesto que la producción de ABP por cultivos de células de Sertoli aisladas, disminuye

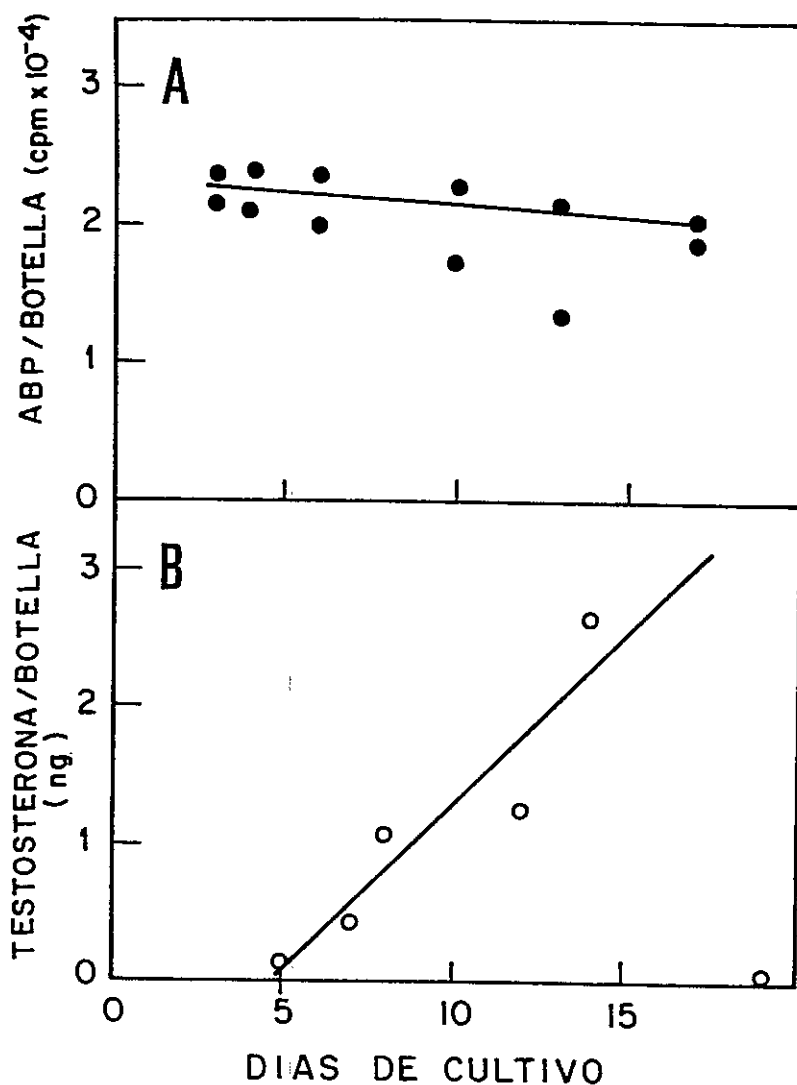


Figura 10. Producción de proteína ligante de andrógenos (ABP) y testosterona por células somáticas testiculares en cultivo de largo término. A) A los tiempos escogidos, el medio de cultivo se reemplaza por Medio 199 libre de suero. Luego de 48 horas de incubación se determina la producción de ABP en una alícuota del medio condicionado, como se indica en Materiales y Métodos. B) A los tiempos escogidos, el medio de cultivo de largo término se reemplaza por Medio 199 libre de suero. Luego de 3 horas de incubación en presencia de 2 UI/ml de hCG, se determina la síntesis de testosterona por RIA, como se indica en Materiales y Métodos.

drásticamente en función del tiempo de cultivo (Rich et al, 1983). El hecho que en estas condiciones de cultivo, la producción de ABP se mantenga prácticamente constante a través del tiempo de cultivo, sugiere que factores adicionales para mantener la actividad secretora de ABP son producidos por otros fenotipos celulares en el testículo o por la existencia de posibles interacciones de las células de Sertoli con otros fenotipos de estroma.

#### b.- Producción de Testosterona

Las células de Leydig presentes en la capa adherente de cultivos de largo término producen y liberan al medio de cultivo testosterona. La cantidad de hormona producida aumenta proporcionalmente con el tiempo de cultivo hasta el día 14 de cultivo, tal como se muestra en la figura 10B. A tiempos de cultivo mas largos (día 19), se observa una drástica disminución en la producción de la hormona, la que es coincidente con la desaparición de células de Leydig, a juzgar por la disminución de células que presentan una reacción positiva para la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa .

La producción de testosterona por las células de Leydig en la capa adherente depende de la presencia de hCG en el medio de cultivo, ya que cultivos no expuestos a hCG exógena, producen 10 veces menos testosterona que aquellos a los cuales se le adiciona la hormona, lo que

es una prueba adicional de que estas células mantienen en estos cultivos, sus características funcionales.

Los resultados presentados en esta sección, demuestran claramente que el sistema de cultivo descrito en esta tesis permite que coexistan tanto las células germinales como las células somática. Bajo las condiciones descritas, las células en los cultivos de largo término son viables, proliferan y mantienen por lo menos para el caso de las células de Sertoli y de las células de Leydig, su capacidad funcional expresada en la producción de ABP y testosterona hasta el día 14.

Es oportuno volver a destacar que las células testiculares, e las condiciones de cultivo de largo término descritas, adquieren un alto grado de organización como consecuencia del establecimiento de interacciones específicas y no casuales resultantes de una simple cercanía espacial, producto de una sedimentación azarosa sobre el plástico.

## C. GENERACION DE MACROMOLECULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR CELULAS SOMATICAS TESTICULARES BAJO CONDICIONES DE CULTIVO DE LARGO TERMINO.

El sistema de cultivo de largo término aquí descrito, parece ofrecer una clara ventaja para el estudio de la génesis de componentes de matriz extracelular, respecto de los cultivos de fenotipos somáticos aislados, puesto que en el sistema de cultivo de largo término se permite la existencia de interacciones celulares de contacto directo o bien mediadas por factores difusibles.

### 1.- Síntesis y distribución de colágeno.

Las células adherentes de cultivos de largo término sintetizan colágeno a partir de H-prolina<sup>3</sup>. La figura 11 muestra una correlación entre el crecimiento de células adherentes en condiciones de cultivo de largo término y el colágeno producido por estas células en función del tiempo de cultivo.

Como se puede observar en dicha figura, a partir del día 4 de cultivo la síntesis de colágeno aumenta en forma proporcional al aumento del número de células adherentes. La síntesis máxima se observa cuando se alcanza la confluencia, luego de lo cual se produce una disminución en la síntesis de colágeno. Esto sugiere que en la confluencia el contacto

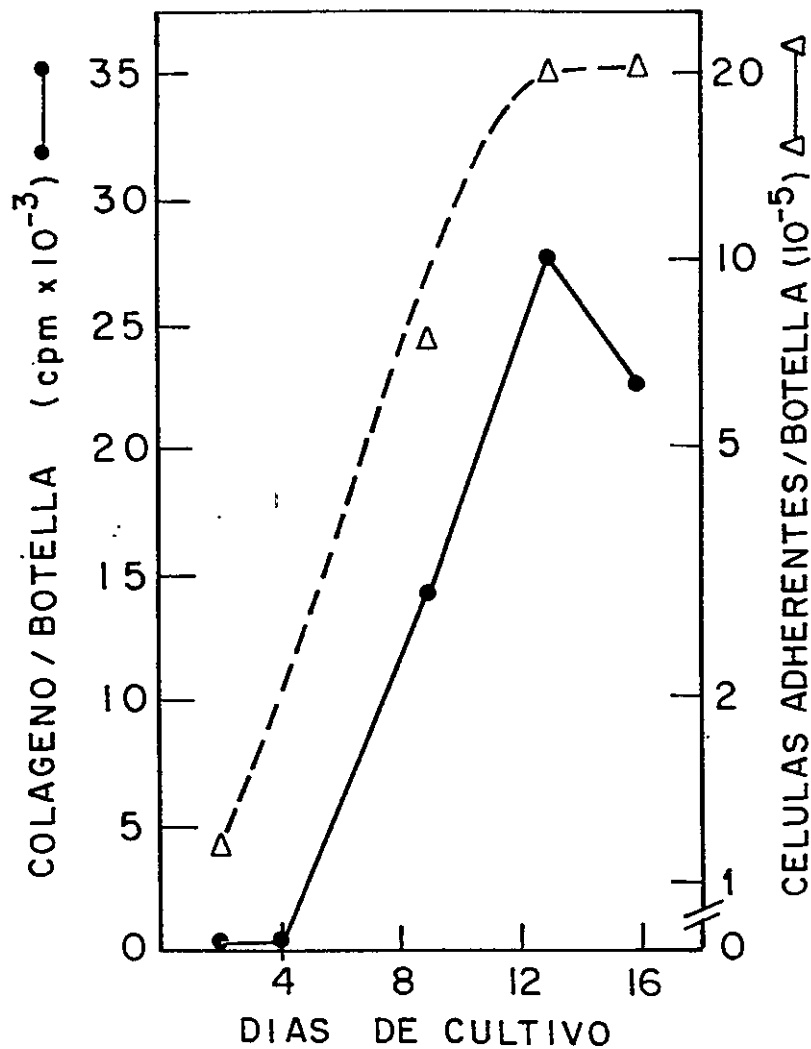


Figura 11. Síntesis de colágeno por células somáticas testiculares en cultivos de largo término. Se siembran  $3,4 \times 10^5$  células testiculares y a los tiempos indicados las células adherentes se cuentan y los medios se procesan para la medición de la síntesis de colágeno.

celular, no sólo produce una inhibición en la proliferación celular, sino que también una inhibición de la síntesis de colágeno.

Las moléculas de colágeno recién sintetizadas se encuentran distribuidas tanto en el medio de cultivo como en la fracción celular. Esta distribución y la cantidad relativa de colágeno en cada fracción se puede observar en la Tabla 6. En el medio de cultivo se encuentran dos tercios del colágeno sintetizado, que corresponde a una cantidad relativa de 0,16 del total de las proteínas presentes en esta fracción. La proporción restante del colágeno, se encuentra en la fracción celular, lo cual corresponde a una cantidad relativa de 0,33 del total de las proteínas en esta fracción. Esto significa que aunque la mayor parte del colágeno sintetizado es exportado hacia el medio de cultivo, representa sólo una pequeña fracción del total de proteínas sintetizadas.

## 2.- Expresión de tipos de procolágeno producidos por células somáticas.

Los tipos de procolágenos sintetizados por las células somáticas testiculares en cultivo de largo término, se separaron por cromatografía en DEAE-celulosa y luego las cadenas de colágeno se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

El análisis por cromatografía en DEAE-celulosa muestra que entre el 80% y 90% del material radioactivo es retenido en la columna y



TABLA 6. Distribución y cantidad relativa de colágeno producido por células somáticas testiculares en cultivo de largo término.

Colágeno+		
	Distribución (%)#	Cantidad relativa*
Medio de cultivo	67 ± 8	0,16 ± 0,013
Fracción celular	33 ± 8	0,33 ± 0,028

Las determinaciones se realizan en cultivos de largo término de células testiculares provenientes de ratas de entre 18 y 20 días de edad. Estas mediciones se realizan a los 12 días de establecido el cultivo.

+ Los datos representan el promedio ± desviación estandar de tres experimentos

# Representa el porcentaje de colágeno que se encuentra en cada fracción respecto del total de colágeno sintetizado (100% = 16.910 ± 450 cpm/ 10-6 células).

\* Representa la fracción de colágeno sintetizado respecto al total de proteínas, asumiendo que el colágeno contiene cinco veces mas prolina que las proteínas no colágeno.

se resuelve como dos picos principales, los cuales eluyen con una concentración de NaCl de 0,1M y 0,15M, respectivamente (Figura 12). Este material corresponde a procolágeno I y III respectivamente, como se demuestra por la separación, mediante electroforesis en presencia de SDS, de las cadenas  $\alpha 1(I)$  y  $\alpha 2(I)$  para el caso de procolágeno I y de las cadenas  $\alpha 1(III)$  para el caso de procolágeno III (Figura 12, recuadro).

La distribución de las moléculas de colágeno sintetizadas, se muestra en la Tabla 7. El procolágeno tipo I se encuentra distribuido en similar proporción entre el medio de cultivo y la fracción celular. El procolágeno tipo III, en cambio, se encuentra presente solamente en el medio de cultivo, sugiriendo que este tipo de colágeno es sintetizado y rápidamente exportado. Aunque no se analizaron los mecanismos que pueden explicar la ausencia de procolágeno III en el interior de la célula, la rápida liberación de estas moléculas al medio de cultivo parece ser particular del testículo, ya que en otros tejidos el procolágeno III siempre se encuentra presente tanto en el medio de cultivo como en la fracción celular (Limeback et al, 1978; Aumailley et al, 1982). En esta tesis se realizaron estudios sobre síntesis y distribución sólo de los colágenos intersticiales I y III y no sobre colágeno tipo IV, puesto que existen diversos estudios sobre la síntesis de esta última macromolécula por células de testículo (Skinner et al, 1985; Borland et al, 1986).

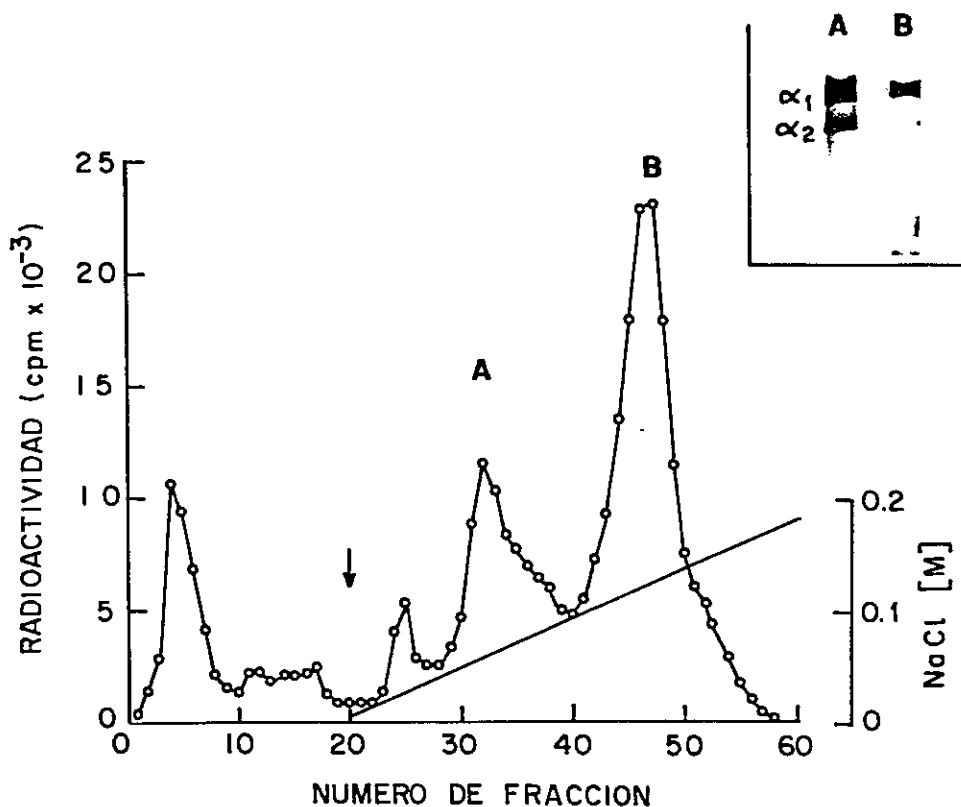


Figura 12. Cromatografía en DEAE-celulosa de procolágenos radioactivos sintetizados por células somáticas testiculares. Los picos A y B corresponden a procolágenos tipos I y III, respectivamente. La flecha indica el inicio de la gradiente. El recuadro muestra el patrón electroforético, en geles de poliacrilamida al 7,5%, del material asociados a los picos A y B. La posición en que migran las cadenas de colágeno se indica a la izquierda.

TABLA 7. Distribución de tipos de procolágenos producidos por células somáticas testiculares en cultivos de largo término.

	Pro colágeno I	Pro colágeno III
	(cpm/botella)	
Medio de cultivo	2.130 ± 160	12.080 ± 870
Fracción celular	2.070 ± 150	0

Los cultivos de largo término se incuban con prolina tritiada por 24 horas. El medio de cultivo y la fracción celular se concentran con sulfato de amonio (80 % de saturación), como se indica en materiales y métodos.

Los procolágenos se separan por cromatografía en DEAE-celulosa como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se presentan como el promedio ± desviación estandar de 3 experimentos.

### 3.- Síntesis y distribución de proteínas no colagenosas.

Para comprobar si el patrón de síntesis y distribución de colágeno es particular para esta proteína, se analizó la síntesis de las proteínas no colagenosas.

En la Tabla 8, se muestra la distribución y cantidad de proteínas no colagenosas sintetizadas por las células somáticas testiculares. Estas proteínas se distribuyen tanto en el medio de cultivo como en la fracción celular. Los datos de distribución celular de estas proteínas revelan que alrededor del 85% de estas proteínas se encuentran en el medio de cultivo, sugiriendo que son fundamentalmente proteínas de exportación.

### 4.- Síntesis de proteoglicanos por células somáticas testiculares.

Las células somáticas testiculares en cultivos de largo término incorporan activamente glucosamina tritiada en moléculas de proteoglicanos. En función del tiempo de cultivo, se observa un aumento de la cantidad de proteoglicanos sintetizados proporcional al incremento del número de células. Luego que se alcanza la confluencia (13 días), la síntesis de proteoglicanos disminuye (Figura 13). Esto sugiere que el contacto celular que se produce en la confluencia, regula negativamente la síntesis de estas macromoléculas.

TABLA 8. Síntesis y distribución de proteínas no colagenosas producidas por células somáticas testiculares en cultivos de largo término.

Síntesis de proteínas no colagenosas (cpm/10 <sup>6</sup> células)	
Total	70.610 ± 2.980
Medio de cultivo	60.560 ± 3.940
Fracción celular	10.050 ± 1.890

Las determinaciones se realizan en cultivos de largo término de células testiculares provenientes de ratas de entre 18 y 20 días de edad. Estas mediciones se realizan a los 12 días de establecido el cultivo.

Los datos representan el promedio ± desviación estandar de 3 experimentos.

Se utiliza prolina triada como trazador radioactivo.

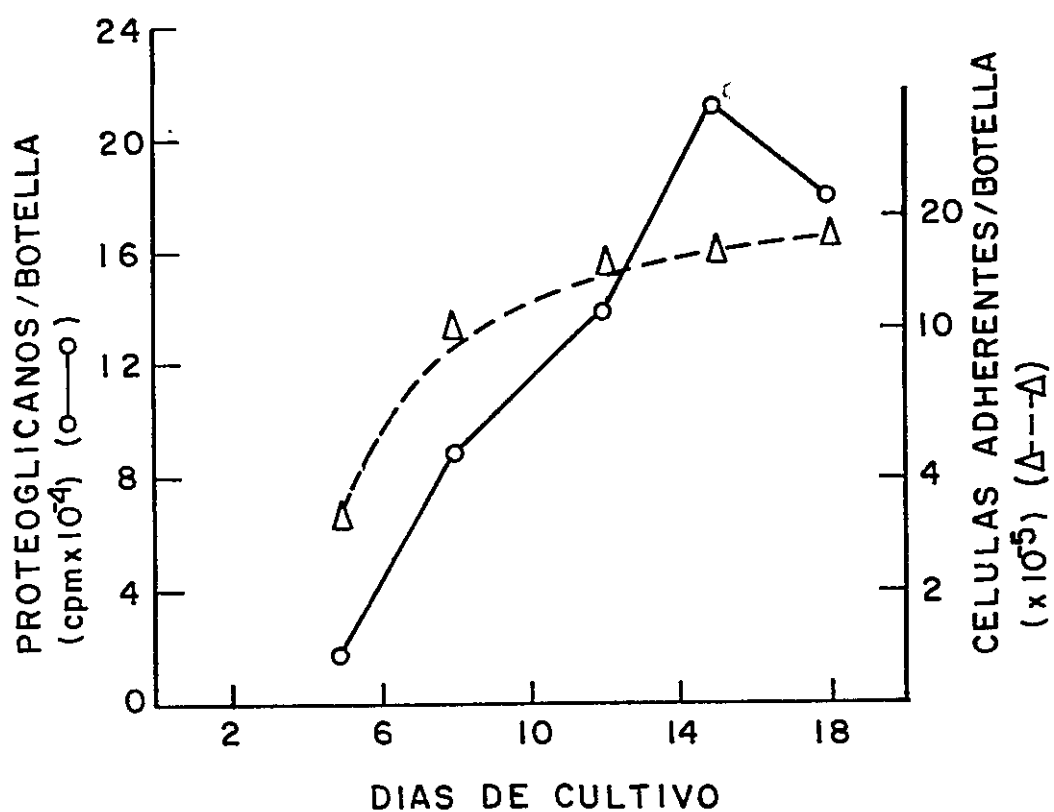


Figura 13. Síntesis de proteoglicanos por células somáticas testiculares en cultivo de largo término. A los tiempos señalados, tanto el material presente en el medio de cultivo como asociado a la fracción celular se procesa para determinar síntesis de proteoglicanos (o). A los mismos tiempos, las células adherentes se liberan de la placa de cultivo y se cuentan en un hemocitómetro (Δ).

El análisis enzimático y químico revela que las células adherentes sintetizan ácido hialurónico (HA) y proteoglicanos que contienen cadenas de condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) y heparán sulfato (HS). El 37% de la radioactividad incorporada a macromoléculas aparece asociada con moléculas de ácido hialurónico, mientras que el 63% restante de la radioactividad aparece asociada a moléculas de proteoglicanos. De éstas, el 30% de la radioactividad está presente como cadenas de glicosaminoglicanos del tipo heparán sulfato, el 21% como cadenas de condroitín sulfato y sólo el 13% como cadenas de dermatán sulfato. De estos datos se concluye que el ácido hialurónico es la especie más abundante en los cultivos de largo término. La existencia de cantidades importantes de hialuronidasa en el testículo, se pudiera interpretar por la cantidad de sustrato presente en este tejido.

#### 5.- Distribución de proteoglicanos y ácido hialurónico.

Los proteoglicanos y el ácido hialurónico producido por células somáticas testiculares en condiciones de cultivo de largo término, se encuentran distribuidos en el medio de cultivo, asociado a la membrana celular y en la fracción intracelular, como se indica en la Tabla 9.

A las 48 horas de cultivo, el 73% de los proteoglicanos ha sido exportado por las células somáticas y se encuentra en el medio de cultivo. El 17% se encuentra asociado a la membrana celular, de la cual son liberados por tratamiento controlado con tripsina. El 10% restante se



TABLA 9. Distribución de proteoglicano y ácido hialurónico producidos por células somáticas testiculares.

	Distribución	
	Proteoglicanos (%)	Acido Hialurónico (%)
Fracción:		
Medio de cultivo	73	60
Asociados a membrana	17	10
Intracelular	10	30

Las mediciones se realizan luego de 12 días de establecido el cultivo de largo término. El ácido hialurónico (HA) y los proteoglicanos (PG) se separan por cromatografía en DEAE-Sephacel. El material que eluye como el pico I de una columna de DEAE-Sephacel corresponde a HA mientras que el material que eluye como los picos III y IV corresponde a PG. Los datos son representativos de varios experimentos.

encuentra en la fracción intracelular, de la cual son solubilizados por tratamiento con un tampón de extracción disociativo que contiene guanidina 4M e inhibidores de proteasas. Por otra parte, el ácido hialurónico se encuentra principalmente en el medio de cultivo (60%), un 10% asociado a la membrana celular y en la fracción intracelular se encuentra un 30% del ácido hialurónico sintetizado. Los proteoglicanos presentes en el medio de cultivo participarían en la organización de una matriz extracelular competente, interactuando específicamente con otros componentes de matriz tales como colágeno y glicoproteínas (Höök et al, 1984). Por la forma como se obtiene la fracción asociada a membrana, en esta fracción también se incluyen los proteoglicanos depositados como matriz extracelular y que son liberados por el tratamiento con tripsina.

6.- Caracterización molecular de proteoglicanos sintetizados por células somáticas testiculares en cultivo de largo término.

a) Proteoglicanos presentes en el medio de cultivo.

Los proteoglicanos presentes en el medio de cultivo, son separados secuencialmente por cromatografía en Sephadex G-50 y por cromatografía en Sepharosa CL-4B. Cuando la fracción excluida de Sephadex G-50, es analizada en una columna de Sepharosa CL-4B, se obtiene un perfil de elución en donde se distinguen dos picos principales de

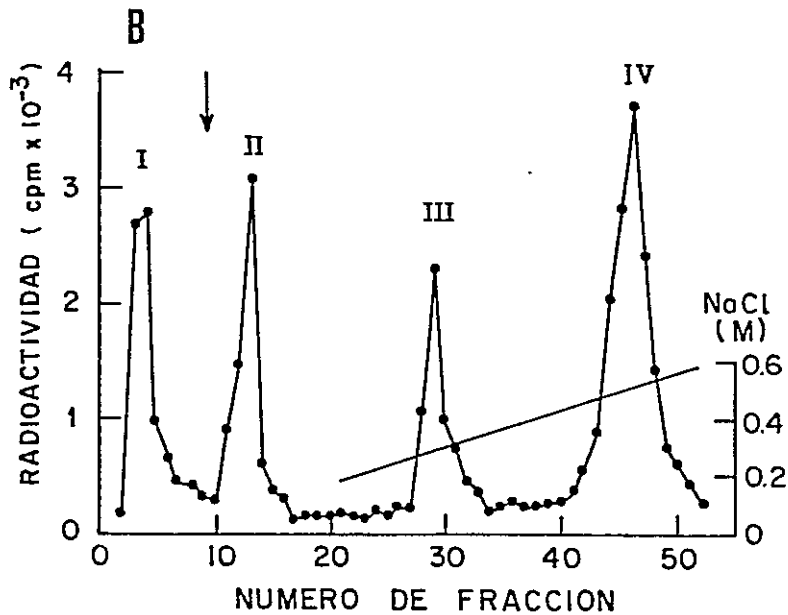
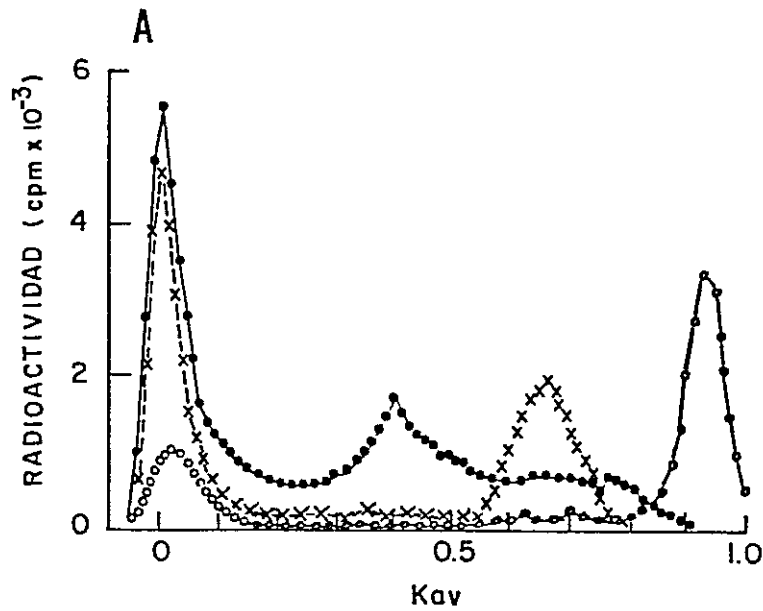


Figura 14. Análisis por filtración en Sepharosa CL-4B y cromatografía en DEAE-Sephacel de los proteoglicanos y ácido hialurónico sintetizados por células somáticas testiculares y que se encuentran presentes en el medio de cultivo. El perfil de elución en Sepharosa CL-4B (o-o) se muestra en A. También se indica el perfil de elución del material luego de tratamiento con NaOH 0,2 N (x-x) y hialuronidasa (o-o). En B se muestra el perfil de elución en DEAE-Sephacel. La flecha indica la adición de tampón de equilibrio que contiene NaCl 0,15M.

radioactividad (Figura 14,A). El primer gran pico de radioactividad eluye a un  $K_{av}=0$ . Este material al ser tratado con condroitinasa ABC, condroitinasa AC o con NaOH y luego recromatografiado en Sepharosa CL-4B presenta nuevamente un  $K_{av}=0$  similar al del compuesto original no tratado. Sin embargo, este material es sensible al tratamiento con hialuronidasa. Luego de recromatografiar, en Sepharosa CL-4B, el material previamente tratado con la enzima se observa una dramática disminución de la radioactividad asociada al pico que eluye a  $K_{av}=0$ . Estos resultados indican que el material que eluye en esta posición contiene principalmente ácido hialurónico y no contiene proteoglicanos.

El segundo pico radioactivo eluye a un  $K_{av}= 0,37$ . El desplazamiento de la posición de elución de este material a un  $K_{av}=0,65$  luego de hidrólisis alcalina, sugiere que este material corresponde a proteoglicanos. El componente que eluye a  $K_{av}=0,65$  correspondería a las cadenas de glicosaminoglicanos que se liberan hidrolíticamente desde el núcleo proteico del proteoglicano.

Alternativamente, el material marcado que se encuentra presente en el medio de cultivo, después de ser excluido de una columna de Sephadex G-50, se analizó por cromatografía en DEAE-Sephacel. En estas condiciones se obtuvo un perfil de elución que se caracteriza por presentar cuatro picos principales (Figura 14,B). Para caracterizar las cadenas de glicosaminoglicanos asociados a cada pico de radioactividad, alícuotas de estas fracciones son sometidas a tratamientos enzimáticos y químicos como se describió anteriormente.

El pico I contiene ácido hialurónico dado que es completamente sensible a tratamiento con hialuronidasa. El pico II corresponde a glicoproteínas de secreción. El pico III corresponde a un proteoglicano mixto que contiene cadenas de heparán sulfato y condroitín sulfato y el pico IV corresponde a un proteoglicano que contiene sólo cadenas de condroitín sulfato. Presentes en el pico que eluye de la columna de Sepharosa CL-4B con un  $K_{av}=0,37$ , se encuentran los tipos de proteoglicanos que eluyen en volúmenes correspondientes a los picos II, III y IV de la columna de DEAE-Sephacel.

b) Caracterización de los proteoglicanos asociados a la membrana celular.

Los proteoglicanos presentes en la membrana celular se cromatografían secuencialmente en Sephadex G-50, en Sepharosa CL-4B y posteriormente en DEAE-Sephacel. El perfil de elución de la cromatografía en Sepharosa CL-4B se caracteriza por la presencia de un pico de radioactividad que eluye con un  $K_{av}=0$ , seguido por un pico ancho de radioactividad que eluye con un  $K_{av}$  entre 0,4 y 0,6 (Figura 15,A). Al igual que para el caso del material presente en el medio de cultivo, el pico que eluye con un  $K_{av}=0$ , es ácido hialurónico de acuerdo a su sensibilidad a hialuronidasa, mientras que el pico que eluye con un  $K_{av}$  de entre 0,4 y 0,6 contiene material del tipo proteoglicano.

Cuando el material asociado a la membrana celular es sometido a cromatografía en DEAE-Sephacel, se obtiene un perfil de elución que se

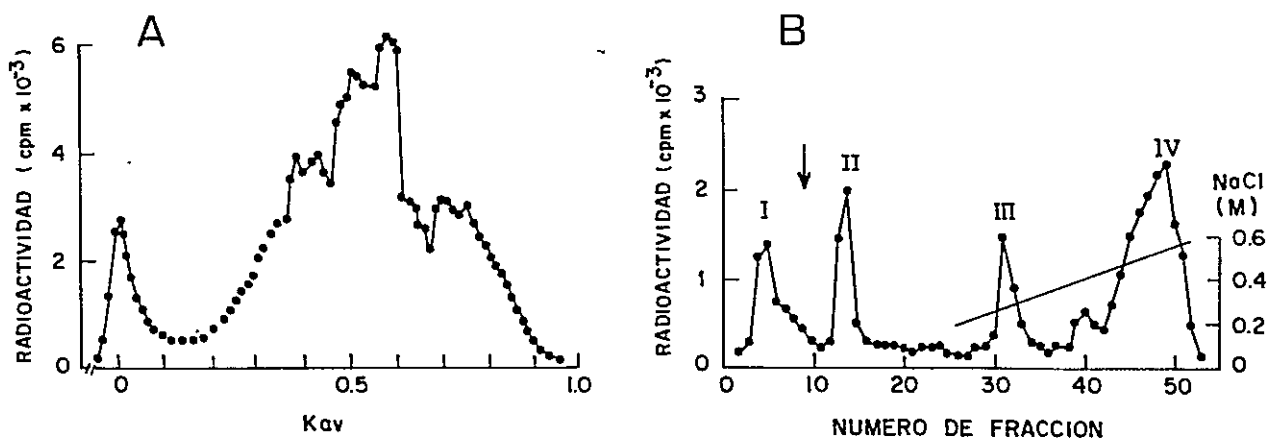


Figura 15. Análisis por filtración en Sepharosa CL-4B (A) y por cromatografía en DEAE-Sephacel (B) de proteoglicanos y ácido hialurónico sintetizados por células somáticas testiculares y que se encuentran asociados a la membrana celular.

caracteriza por la aparición de cuatro picos de radioactividad, los cuales eluyen a la misma concentración de sal que aquellos que se encuentran en el medio de cultivo (Figura 15 B). Las especies asociadas a cada uno de los picos muestran la misma sensibilidad a los tratamientos enzimáticos (hialuronidasa y condroitinasa ABC) y químico (ácido nítrico), que aquellas especies que se encuentran presentes en el medio de cultivo.

c) Caracterización de los proteoglicanos presentes en la fracción intracelular.

Los proteoglicanos presentes en la fracción intracelular se solubilizan con una solución de guanidina 4M, como se indica en Materiales y Métodos, y luego se cromatografían en Sephadex G-50 y en DEAE-Sephacel. El perfil de elución se caracteriza por la presencia del pico I y una disminución importante de los picos II, III y IV (Figura 16), en comparación con los resultados obtenidos con otras fracciones celulares. El pico I, como en los casos anteriores, corresponde a ácido hialurónico como se determina por su sensibilidad al tratamiento con hialuronidasa.

Las células somáticas testiculares sintetizan ácido hialurónico, el cual se encuentra presente en todas las fracciones estudiadas. También sintetizan proteoglicanos de condroitín sulfato y

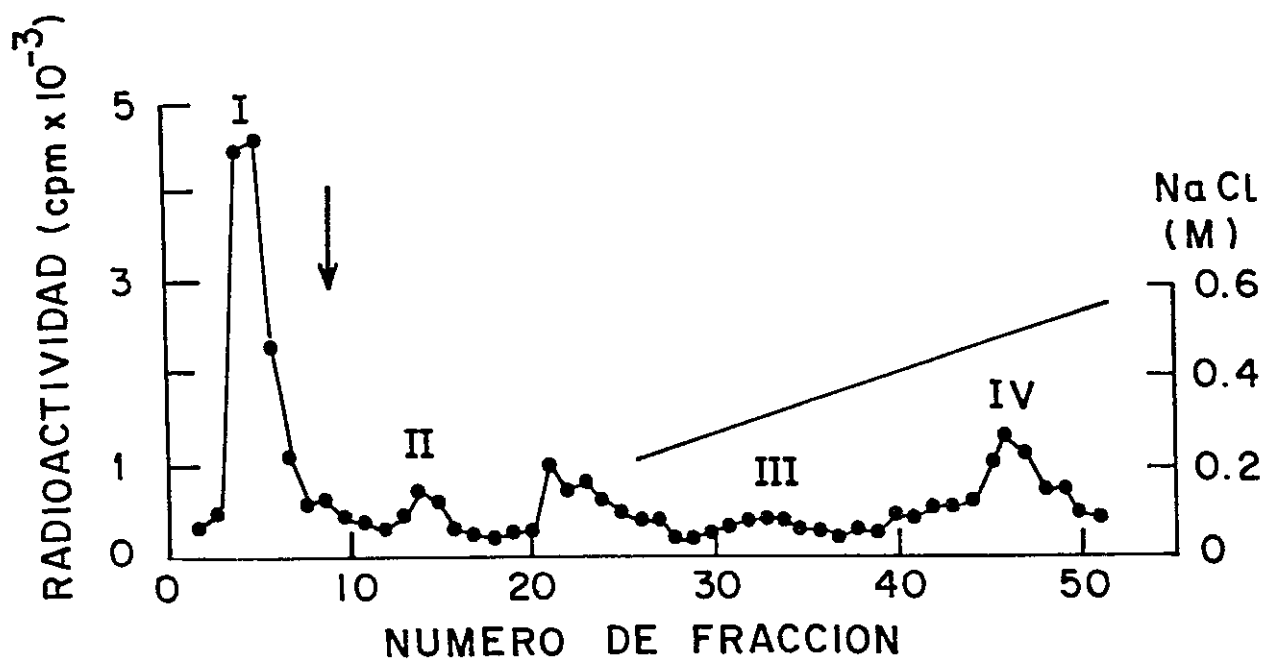


Figura 16. Análisis por cromatografía en DEAE-Sephacel de proteoglicanos y ácido hialurónico sintetizados por células somáticas testiculares, que se encuentran en la fracción intracelular.



proteoglicanos mixtos de heparán y condrotin sulfato que se encuentran fundamentalmente en el medio de cultivo y asociados a la membrana. Estas células también sintetizan glicoproteínas de secreción.

7.- Proporción de los proteoglicanos asociados a la membrana celular y presentes en el medio de cultivo.

Tanto en el medio de cultivo como asociado a la membrana celular se encuentra un proteoglicano mixto que contiene cadenas de heparán sulfato y cadenas de condroitin sulfato, un proteoglicano que contiene sólo cadenas de condroitin sulfato y ácido hialurónico. Sin embargo, la cantidad en que estos compuestos aparecen en ambas fracciones no es igual. Dado que la distribución de proteoglicanos y ácido hialurónico en el medio de cultivo y en la fracción asociado a la membrana celular es muy diferente (ver Tabla 9), no se obtiene una información adecuada al comparar la síntesis neta de cada una de las especies en las diferentes fracciones. Por este motivo, se ha calculado la proporción en que se encuentran el proteoglicano de condroitin sulfato respecto al total de proteoglicano mixto, como también la razón en que se encuentra el ácido hialurónico y el proteoglicano mixto. Esto último debido a que cambios en la proporción en que se encuentran el ácido hialurónico y proteoglicanos de heparán sulfato producen cambios conformacionales en la fibronectina, y por lo tanto afecta la unión de esta glicoproteína con colágeno (Del Rosso et al, 1982).

La proporción en que se encuentran el ácido hialurónico a el proteoglicano mixto es constante en ambas fracciones (1,6 versus 1,4 asociado a la membrana celular y en medio de cultivo, respectivamente). Sin embargo, la razón entre el proteoglicano de condroitín sulfato y el proteoglicano mixto de heparán y condroitín sulfato asociados a la membrana celular es 2 veces mayor que la razón en que se encuentran estos proteoglicanos en el medio de cultivo (5,0 versus 2,7, respectivamente) (Tabla 10).

#### 8.- Localización de proteoglicanos asociados a la membrana celular.

Se sabe que las células de Sertoli son altamente polarizadas, y ya que estas células se encuentran presentes en la capa adherente, parece importante determinar si los proteoglicanos asociados a la membrana celular se encuentran localizados en forma homogénea en toda la membrana celular, o bien se encuentran localizados ya sea en la zona apical de la célula (aquella zona que se encuentra en contacto con el medio de cultivo) o en la zona basolateral de la membrana (aquella zona que se encuentra en contacto con otras células adherentes o en contacto con el soporte de plástico).

Para ésto, las células adherentes son sometidas a tratamientos enzimáticos específicos, ya sea in situ o liberadas de la placa de cultivo bajo distintas condiciones, y los proteoglicanos asociados a la

TABLA 10. Proporción de los tipos de proteoglicanos en las diferentes fracciones.

	Asociados a membrana celular	Medio de cultivo
HA/HS-CS	1,6	1,4
CS/HS-CS	5,0	2,7

Los experimentos se realizan a los 12 días de cultivo.

La proporción de proteoglicanos se calcula luego de la separación de las macromoléculas marcadas en las respectivas fracciones por cromatografía en DEAE-Sephacel.

HS-CS : proteoglicano mixto que contiene cadenas de heparan sulfato y de condroitin sulfato

CS : proteoglicano que contiene sólo cadenas de condroitin sulfato.

HA : ácido hialurónico

Se mide la radioactividad total asociada a cada una de las especies (HA, CS, HS-CS). A partir de estos datos se calcula la proporción entre HA/HS-CS y la proporción entre CS/HS-CS.

Los datos son representativos de varios experimentos.

membrana resistentes al tratamiento son analizados por cromatografía en DEAE-Sephacel (Figura 1).

Cuando las células se tratan *in situ*, solo son sensibles al tratamiento con condroitinasa ABC los proteoglicanos que contienen cadenas de condroitin sulfato y que se encuentran localizados hacia el medio de cultivo. Cuando el tratamiento se realiza luego que las células han sido liberadas mediante tratamiento con EDTA, son sensibles a la enzima, tanto los proteoglicanos que se encuentran en la zona apical como en la zona basolateral.

El análisis de los proteoglicanos insensibles al tratamiento enzimático y que son posteriormente liberados con tripsina, se realiza por DEAE-Sephacel. Los perfiles de elución se muestran en la figura 17.

El patrón de elución en DEAE-Sephacel de los proteoglicanos asociados a la membrana celular, se muestra en la figura 17,A. Como se ha indicado anteriormente, se separan cuatro picos de radioactividad. El pico I corresponde a ácido hialurónico, el pico II a glicoproteínas, el pico III a un proteoglicano mixto de heparán sulfato y condroitin sulfato y el pico IV a un proteoglicano de condroitin sulfato.

Cuando los proteoglicanos asociados a la membrana celular producidos por células somáticas testiculares en condiciones de cultivo de largo término, se tratan, *in situ*, con condroitinasa ABC se obtiene el perfil de elución en DEAE-Sephacel que se muestra en la figura 17,B. Al comparar con la situación A, se observa que desaparece principalmente el

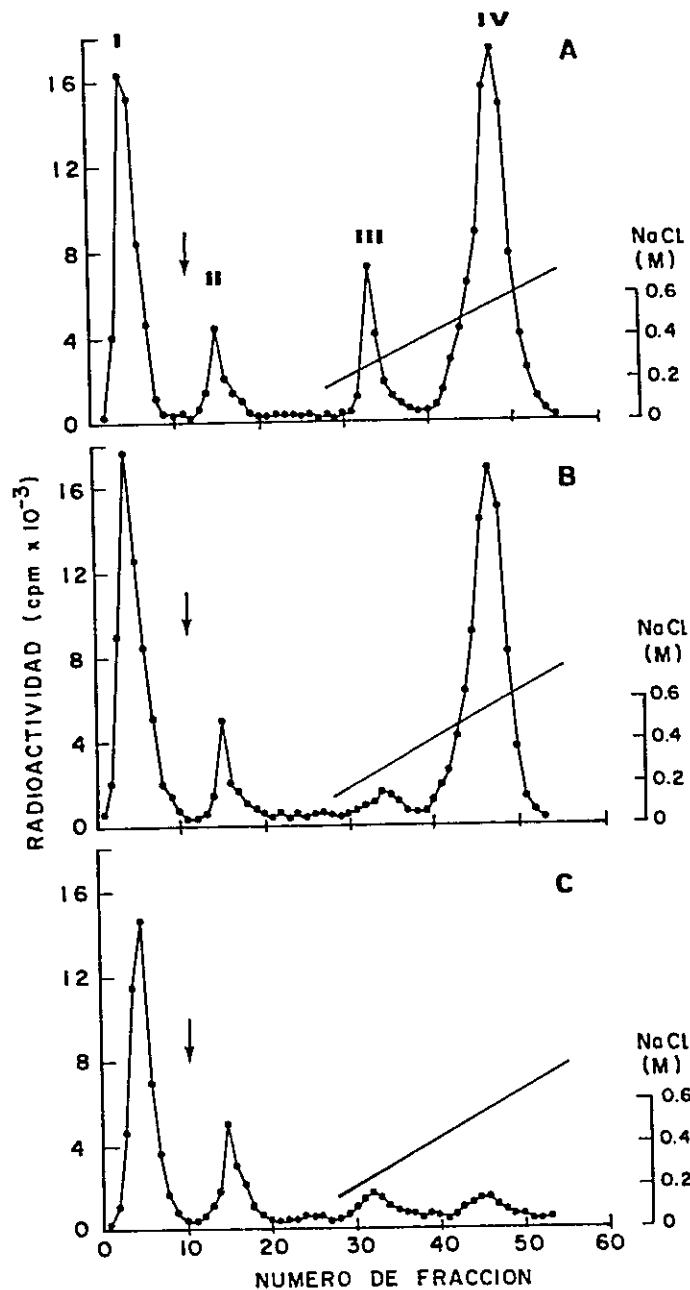


Figura 17. Cromatografía en DEAE-Sephacel de proteoglicanos producidos por células somáticas testiculares.

A) Perfil de elución de proteoglicanos asociados a la membrana celular luego de ser liberados por tratamiento con tripsina.

B) Perfil de elución de proteoglicanos asociados a la membrana luego que las células son tratadas, in situ, con condroitinasa ABC y los proteoglicanos remanentes liberados con tripsina.

C) Perfil de elución de proteoglicanos asociados a la membrana celular luego que las células son liberadas desde la placa de cultivo por tratamiento con EDTA, luego tratadas con condroitinasa ABC y los proteoglicanos remanentes liberados con tripsina.

La flecha indica la adición de tampón de equilibrio que contiene NaCl 0,15M.

proteoglicano mixto de heparán y condroitín sulfato. En esta condición experimental, producto del tratamiento con la enzima, la razón entre el proteoglicano de condroitín sulfato y el proteoglicano mixto aumenta de 5,1 (observada en A) a 16. Bajo estas condiciones, el ácido hialurónico permanece constante.

Cuando las células adherentes se liberan previamente de la placa de cultivo mediante un tratamiento no enzimático (tratamiento con EDTA) y luego se tratan con condroitinasa ABC, se observa que desaparecen tanto el proteoglicano mixto como el proteoglicano de condroitín sulfato (Figura 17,C). Al igual que en la situación anterior, el ácido hialurónico no se ve afectado. La liberación de las células por EDTA, seguido por tratamiento controlado con tripsina, no modifica el patrón de elución en DEAE-Sephacel, el cual es igual al no tratado (A).

Estos resultados sugieren que los proteoglicanos asociados a la membrana celular no están distribuidos homogéneamente, sino que tienen una localización preferencial. El proteoglicano mixto se encuentra ubicado hacia el medio de cultivo y esto le impide interactuar en uniones del tipo célula-célula o célula-matriz. El proteoglicano de condroitín sulfato está interactuando en uniones célula-célula o célula-matriz, cuando las células están organizadas en la capa adherente de los cultivos de largo término.

9.- Estudios de adhesión de células germinales a capa adherente de células somáticas en cultivo de largo término.

Con el objeto de estudiar la capacidad de estromas funcionales de cultivos de largo término, para unir preferencialmente (attachment) células germinales, se realizan una serie de experimentos de adhesión. Las células germinales fueron separadas por gradiente de BSA, y las diferentes fracciones celulares obtenidas según se indica en Materiales y Métodos, fueron marcadas con <sup>51</sup>Cr para los estudios de adhesión.

Las diferentes fracciones celulares separadas no muestran capacidad de adhesión a soportes plásticos ni a soportes plásticos recubiertos con BSA. Sin embargo, sólo la fracción enriquecida en espermatoцитos en paquiteno (Figura 18), se adhieren a la capa adherente de cultivos de largo término. Esto indica, que receptores o ligandos adhesivos presentes en las células germinales, reconocen en el estroma su contraparte adhesiva. Esta adhesión, no corresponde a un mero depósito o asociación débil entre las células germinales y las células de estroma, puesto que la adhesión es resistente a lavados con soluciones salinas fisiológicas y sólo es destruida por tratamiento con solución de tripsina a 37°C. Se realizaron controles con células sanguíneas aisladas <sup>51</sup>(fundamentalmente globulos rojos) marcados con <sup>51</sup>Cr mostrando que tampoco se adhieren a la capa adherente de cultivos de largo término, sugiriendo que mecanismos específicos de adhesión están involucrados en la

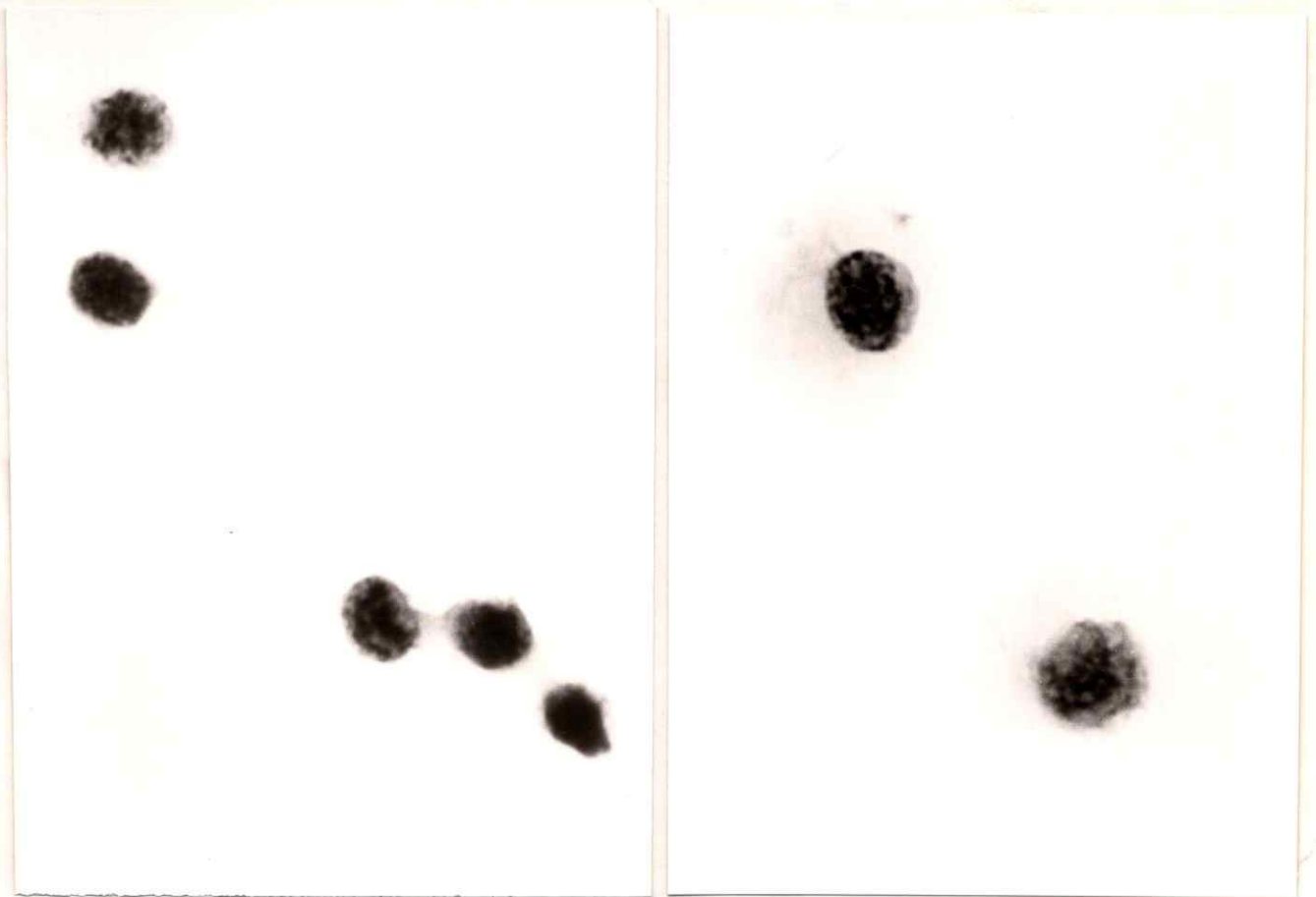


Figura 18. Morfología de células germinales. Las células germinales son separadas por gradiente en BSA. Las microfotografías corresponden a las células presentes en la fracción enriquecida en espermatocitos paquitenos, la cual se utiliza en los estudios de adhesión. Las células se tifican con May-Grunwald Giemsa (x 400).



interacción entre los espermatocitos en paquiteno y el estroma testicular.

La participación de los proteoglicanos asociados a la membrana celular en los mecanismos de adhesión, se estudió en cultivos de largo término, en los cuales se alteró la presentación de estas moléculas en la membrana celular por tratamiento con condroitinasa ABC (Tabla 11). En cultivos no tratados, proporción de los proteoglicanos CS/HS-CS es igual a 5,1 y se adhiere el 18,5% de las células germinales agregadas (adhesión relativa = 1,0). Si la monocapa es tratada con condroitinasa ABC, se observa que la adhesión relativa aumenta a 1,3 mientras que la razón entre los proteoglicanos aumenta a 15,7. Puesto que, la condroitinasa ABC hidroliza las cadenas de condroitin sulfato presentes en el proteoglicano mixto y que se encuentra expuesto hacia el medio de cultivo (Figura 17,B), podemos deducir que son las cadenas de heparán sulfato de este proteoglicano o el núcleo proteico son quienes están comprometidos en el reconocimiento y adhesión de las células germinales, mientras que las cadenas de condroitin sulfato dificultarían dicha interacción.

Esta conclusión, es apoyada por la observación de que la adición de condroitin sulfato a monocapas de células adherentes, previamente tratadas con condroitinasa ABC, produce una disminución en la adhesión de las células germinales. En estas condiciones, la adhesión celular es similar al obtenido con cultivos no tratados (1,0).

TABLA 11. Correlación entre la adhesión de células germinales a monocapa de cultivos de largo término y la eliminación selectiva de proteoglicano mixto.

Estroma	Adhesión relativa	CS HS-CS	HS-CS (cpm/10 <sup>6</sup> células)	CS
No tratado	1,0	5,1	17.250	88.150
Tratado con				
Condroitinasa ABC	1,3	15,7	5.500	86.600
Condroitinasa ABC + CS	1,0	15,7	5.500	86.600

Luego de tratar el estroma con condroitinasa ABC se analizan los proteoglicanos remanentes asociados a membrana por cromatografía en DEAE-Sephacel.

Los experimentos de adhesión se realizan en presencia o ausencia de condroitin sulfato (CS) (0,5 mg/ml). Al porcentaje de adhesión obtenido con el estroma intacto (18,5%) se le asigna un valor de adhesión relativa igual a 1.

Los resultados permiten concluir que las células somáticas testiculares en cultivos de largo término, producen diferentes componentes de matriz extracelular, que se distribuyen tanto en el medio de cultivo como asociados a la membrana celular. Los proteoglicanos asociados a la membrana celular, participarían en mecanismos de adhesión de las células germinales a las células de estroma.

## D. DESARROLLO SEXUAL DE LA RATA Y SU IMPACTO EN LA GENESIS DE UN MICROAMBIENTE ESPERMATOGENICO.

Si el microambiente testicular produce los estímulos necesarios para la adhesión, proliferación y eventualmente diferenciación de las células germinales, este microambiente no debe ser constante sino variar durante los estadios críticos del desarrollo sexual del animal. Con el objeto de comprobar esta hipótesis se estudian las características del microambiente durante dos etapas del desarrollo sexual del animal. Este estudio se realizó a nivel de los componentes celulares del microambiente, los factores producidos por las células somáticas y los componentes de la matriz extracelular. Para ésto se utilizaron cultivos de células testiculares provenientes de ratas inmaduras y ratas púberes. En la tabla 12, se resumen algunas de las principales características diferenciales de los animales en estos dos estados de desarrollo.

1.- Características edad-dependientes de las células somáticas testiculares en cultivos de largo término.

a.- Proliferación celular.

Los cultivos de largo término provenientes tanto de testículos de ratas inmaduras como púberes, generan una capa de células adherentes

TABLA 12. Características diferenciales en la función testicular de ratas inmaduras y púberes.

	Ratas	
	Inmaduras	Púberes
Edad (días)	18-20	40-45
Peso (gr)	40	120
Peso testículo (mg)	106	670
Esteroides (ng/testículo)	5	190
Testosterona (ng/testículo)	0,8	5,4
Células de Leydig/testículo(10 <sup>-6</sup> )	2	18
ABP* (µl eq)	60	130
Espermatogénesis	No	Si

Datos tomados de Tapanainen et al, 1984.

\* Dato obtenido de Rich et al, 1983.

heterogénea. No se observan diferencias importantes en las características morfológicas de las células presentes en la capa adherente, observándose células de Sertoli, células de Leydig y células peritubulares de morfología similar a las ya descritas en la figura 5. Estas células proliferan activamente hasta los 12 y 8 días en ratas inmaduras y púberes, respectivamente. Luego de esta etapa se observa, en ambos casos, una etapa de reposo proliferativo donde se alcanza la confluencia (Figura 19).

El número de células adherentes con el que se alcanza la confluencia es dos veces mayor en los cultivos provenientes de ratas inmaduras que en aquellos provenientes de ratas púberes. En ambos casos, el tiempo calculado de duplicación promedio de la población celular es de alrededor de 48 horas.

Las diferencias observadas pueden ser consecuencia de la composición celular obtenidas en ambos cultivos, producto de la composición celular diferencial que tienen los testículos a las dos edades estudiadas.

#### b.- Síntesis de ABP y testosterona.

No sólo se observan diferencias en la proliferación celular en los cultivos provenientes de ratas en las dos edades, sino también en la síntesis de factores difusibles, tales como ABP y testosterona.

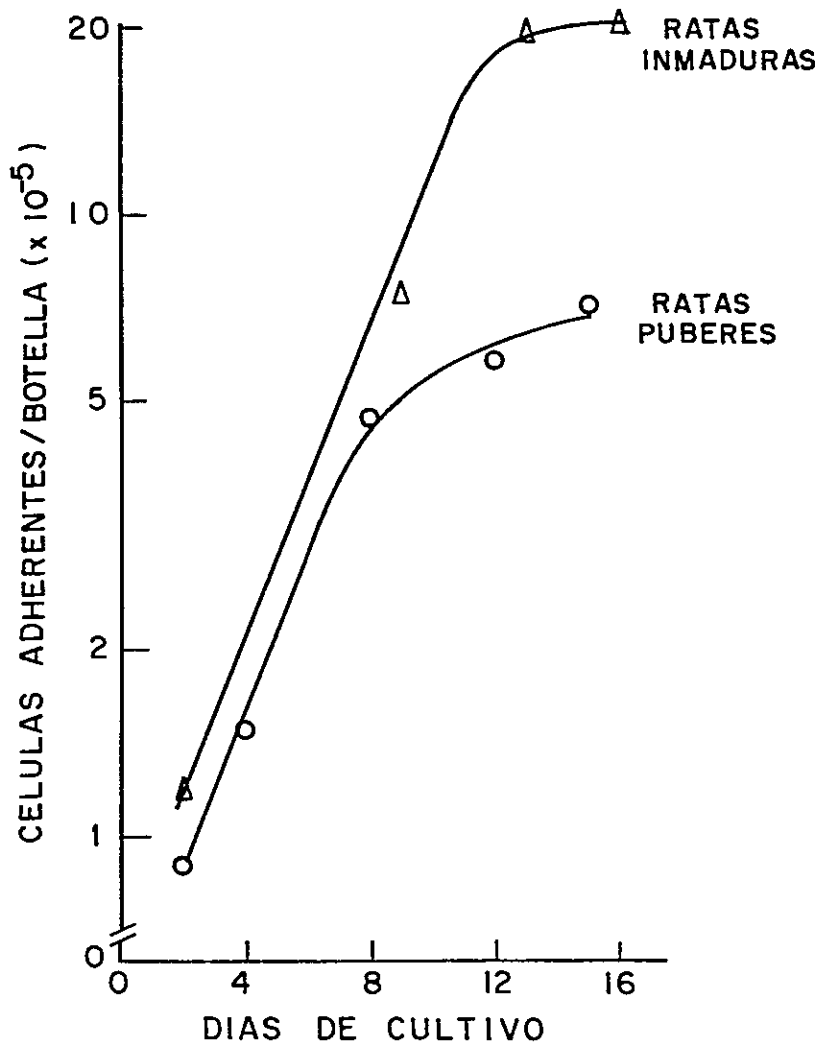


Figura 19. Curva de crecimiento de las células adherentes de cultivos de largo término provenientes de ratas inmaduras ( $\Delta$ ) y púberes (o). En ambos casos se siembran  $3,4 \times 10^5$  células testiculares por botella. A los tiempos señalados, las células de la capa adherente se liberan y se cuentan en el hemocitómetro.

Las células de Sertoli presentes en los cultivos de largo término provenientes de ratas inmaduras y púberes sintetizan ABP. Como se observa en la Tabla 13, las células provenientes de ratas púberes producen dos veces mas ABP que las células provenientes de ratas inmaduras (0,144 versus 0,285 pmoles, respectivamente). De manera similar, las células de Leydig presentes en ambos tipos de cultivos, producen y liberan testosterona al medio de cultivo. Los cultivos de largo término provenientes de ratas púberes sintetizan 5 veces mas testosterona que aquellas provenientes de ratas inmaduras.

Los cambios en la síntesis de ABP y testosterona por las células somáticas testiculares, se corresponde con datos obtenidos in vivo o en cultivos de fenotipos aislados (Tapanainen et al, 1984; Rich et al, 1983).

## 2.- Generación de componentes de matriz extracelular por células somáticas testiculares en cultivos de largo término

### 2.1.- Síntesis y distribución de colágeno.

Los resultados que se presentan en la Tabla 14,A muestran que las células somáticas en cultivos de largo término provenientes de ratas inmaduras sintetizan un 40% mas colágeno que aquellas provenientes de ratas púberes. Las moléculas de colágeno recién sintetizadas se encuentran distribuidas tanto en el medio de cultivo como en la fracción



TABLA 13. Síntesis de ABP y testosterona por células somáticas testiculares en cultivos de largo término.

	ABP 6 (pmoles/10 célulasx48 hrs)	Testosterona 6 (pg/10 célulasx3 hrs)
Ratas Inmaduras	0,144	460
Ratas Púberes	0,285	2.400

Los cultivos de largo término se establecen como se indica en Materiales y Métodos, a partir de testículos de ratas inmaduras y de ratas púberes. Las mediciones se realizan luego de 12 días de establecido el cultivo.

Síntesis de ABP: El medio de cultivo de largo término se reemplaza por Medio 199 libre de suero. Luego de 48 horas de incubación se determina la producción de ABP en una alícuota del medio, como se indica en Materiales y Métodos.

Síntesis de testosterona: El medio de cultivo de largo término se reemplaza por Medio 199 libre de suero. Luego de incubar por 3 horas en presencia de 2 UI/ml de hCG, se determina la síntesis de testosterona por RIA, como se indicó en Materiales y Métodos. Los datos son representativos de varios experimentos.

celular. Tanto en las ratas inmaduras como en las ratas púberes alrededor del 67% del colágeno es exportado y se encuentra en el medio de cultivo. El resto se encuentra intracelularmente.

No sólo la cantidad de colágeno es diferente en ambos tipos de rata, sino que también la relación entre estas moléculas y las proteínas totales sintetizadas. Así, tanto en el medio de cultivo como en la fracción celular esta relación disminuye significativamente en la transición del estado inmaduro a púber. En esta transición, la relación de colágeno respecto proteínas totales expresada como porcentaje de colágeno, disminuye alrededor de un 60% en el medio de cultivo (16,4% a 7,0%), mientras que en la fracción celular, la disminución es mas pronunciado, correspondiendo a cerca de un 90% (33,3% a 4,3%).

La tabla 14,B muestra que las células somáticas testiculares provenientes de ratas púberes sintetizan tres veces mas proteínas no colagenosas que las células de ratas inmaduras. La distribución de estas proteínas es también dependiente de la edad. Mientras en las ratas inmaduras un 85% de las proteínas no colagenosas se encuentran en el medio de cultivo, en las ratas púberes sólo un 50% de estas proteínas se encuentran presentes en el medio de cultivo.

## 2.2.- Caracterización y distribución de tipos de procolágenos.

Tanto las ratas inmaduras como las ratas púberes sintetizan procolágenos tipos I y III. En ambos animales el procolágeno tipo I se

TABLA 14. Síntesis y distribución de colágeno y proteínas no colágeno producido por células somáticas testiculares provenientes de ratas inmaduras y púberes.

A. Síntesis de colágeno+		
(cpm/106 células)		
	Ratas inmaduras	Ratas púberes
Total	16.910 ± 450	12.440 ± 1.100
Medio de cultivo	11.310 ± 1.080	8.420 ± 780
Fracción celular	5,600 ± 1.530	4.020 ± 320

---

B. Proteínas no colagenosas#		
6 (cpm/10 células)		
	Ratas Inmaduras	Ratas Púberes
Total	70.610 ± 2.980	214.390 ± 6.690
Medio de cultivo	60.650 ± 3.940	107.660 ± 5.850
Fracción celular	10.050 ± 1.890	106.740 ± 4.200

Las determinaciones se realizan a los 12 días cultivo.

La síntesis de colágeno y proteínas no colagenosas se realiza como se indica en Materiales y Métodos.

+ Cada valor representa las cpm de prolina tritiada incorporada en el material colagenasa sensible. Los datos representan el promedio ± desviación estándar de tres experimentos.

# Cada valor representa las cpm de prolina tritiada incorporada en material no sensible al tratamiento con colagenasa. Los datos representan el promedio ± desviación estándar de 3 experimentos.

distribuye tanto en el medio de cultivo como en la fracción celular, mientras que el procolágeno tipo III sólo está presente en el medio de cultivo. El 50% del total del procolágeno tipo I sintetizado por las células provenientes de ratas inmaduras se encuentra presente en el medio de cultivo, mientras que en los cultivos provenientes de ratas púberes este tipo representa sólo un 33% (Tabla 15).

Cambios en la cantidad extracelular de procolágeno tipo III puede tener significado fisiológico, ya que la razón entre los colágenos tipos III y I parece ser importante en definir la arquitectura del tejido y sus propiedades mecánicas (Miskulin et al, 1986).

La proporción en que se encuentran los procolágeno tipo III y procolágeno tipo I en el medio de cultivo, es dependiente de la edad del animal. Así, mientras en cultivos provenientes de ratas inmaduras la razón entre los procolágenos presentes en el medio es de 5,7, en los cultivos provenientes de ratas púberes esta razón disminuye a 1,7.

La estrecha asociación que se establece entre el colágeno III y el colágeno I, se piensa que juega un rol importante en definir la arquitectura tisular (Miskulin et al, 1986), de ahí la importancia en los cambios detectados en la razón procolágenos III/I, durante la transición del estado inmaduro a púber.

TABLA 15. Tipos de procolágenos producidos por células somáticas testiculares provenientes de ratas inmaduras y púberes.

	Procolágeno I	Procolágeno III	Procolágeno III/I
	(cpm/botella)		
<b>Ratas Inmaduras</b>			
Medio de cultivo	2.130 ± 160	12.080 ± 870	5,7
Fracción celular	2.070 ± 150	0	
<b>Ratas Púberes</b>			
Medio de cultivo	6.840 ± 640	11.660 ± 1.070	1.7
Fracción celular	13.580 ± 140	0	

Los procolágenos se separan por cromatografía en DEAE-celulosa como se describe en Materiales y Métodos. La radioactividad representa las cpm/botella de cultivo de material sensible a colagenasa. Los datos se presentan como el promedio ± desviación estandar de 3 experimentos.

### 2.3.- Síntesis y distribución edad-dependiente de proteoglicanos.

Al comparar la síntesis de proteoglicanos producidas por las células testiculares provenientes tanto de ratas inmaduras como de ratas púberes, se observa en ambos casos una activa síntesis de estas moléculas. La síntesis total de estas macromoléculas es mayor en los cultivos de células que provienen de ratas inmaduras que en aquellos cultivos que provienen de ratas púberes (Tabla 16). Ambos tipos de cultivos sintetizan ácido hialurónico como también proteoglicanos que contienen cadenas de heparán sulfato, condroitín sulfato y dermatán sulfato. La cantidad de ácido hialurónico, expresada como porcentaje respecto del total de proteoglicanos es también dependiente de la edad del animal. Así, mientras en cultivos de células provenientes de ratas inmaduras el ácido hialurónico representa un 37% del total de los proteoglicanos, en cultivos de células de animales púberes este porcentaje es sólo de un 14%. El contenido de condroitín sulfato también es diferente en ambos animales y aumenta desde un 21% en cultivos provenientes de ratas inmaduras a un 41% en cultivos de ratas púberes. Sin embargo, el porcentaje de dermatán sulfato y de heparán sulfato es independiente de la edad del animal, manteniéndose constante en ambos tipos de cultivos (Tabla 16).

La distribución celular de los proteoglicanos y el ácido hialurónico sintetizados por células somáticas testiculares en cultivos de largo término, es claramente diferente en cultivos de células provenientes de ratas inmaduras y púberes (Tabla 17).

TABLA 16. Síntesis y composición de proteoglicanos producidos por células somáticas en cultivo de largo término provenientes de testículos de ratas inmaduras y púberes.

	Ratas Inmaduras	Ratas Púberes
Síntesis de proteoglicanos* (cpm/106 células)	163.200 ± 30.100	92.700 ± 25.800
Acido Hialurónico **	37,0 ± 2,6	14,0 ± 4,5
Condroitín Sulfato **	21,0 ± 1,7	41,0 ± 4,0
Dermatán Sulfato **	13,0 ± 3,0	11,0 ± 3,0
Heparán Sulfato **	30,0 ± 0,7	35,0 ± 3,0

\* Representa los proteoglicanos presentes en el medio de cultivo y asociados a la fracción celular.

\*\* Porcentaje de los tipos de glicosaminoglicanos respecto a la cantidad total de proteoglicanos sintetizados. Las mediciones se realizan a los 12 días de cultivo y los valores corresponden al promedio ± desviación estandar de 3 experimentos.

TABLA 17. Distribución de proteoglicano y ácido hialurónico producidos por células somáticas testiculares.

Ratas	Acido Hialurónico		Proteoglicanos	
	Inmadura	Puber	Inmadura	Puber
	(% )		(% )	
Fracción:				
Medio de cultivo	60	25	73	62
Asociados a membrana	10	23	17	38
Intracelular	30	52	10	0

El ácido hialurónico (HA) y los proteoglicanos (PG) se separan por cromatografía en DEAE-Sephacel. El material que eluye como el pico I de una columna de DEAE-Sephacel corresponde a HA mientras que el material que eluye como los picos III y IV corresponde a PG. Los datos son representativos de varios experimentos.



Es notable la ausencia intracelular de proteoglicanos en ratas púberes, lo que indicaría un rápido transporte de estos compuestos a la membrana celular y al medio de cultivo.

Aunque en ambos tipos de cultivos las especies sintetizadas son las mismas, aparecen importantes diferencias cuantitativas. Significativo es la notable disminución del ácido hialurónico y el cambio en el patrón de distribución celular en las ratas inmaduras y púberes. Otro hecho importante es el aumento de proteoglicanos que contienen cadenas de condroitín sulfato en las ratas púberes, aunque se mantiene el patrón de distribución en los dos tipos de cultivos.

2.4.- Características edad-dependiente de los tipos de proteoglicanos y la proporción en que se encuentran.

Los proteoglicanos asociados a cada una de las fracciones celulares descritas fueron sometidos a análisis cromatográfico, por filtración en gel y por cromatografía de intercambio iónico. En todos los casos, por cromatografía de intercambio iónico del material proveniente tanto de ratas inmaduras como púberes, y ulterior análisis enzimáticos se separan cuatro especies diferentes, que corresponden a ácido hialurónico, glicoproteínas, un proteoglicano mixto que contiene cadenas de heparán sulfato y condroitín sulfato, y un proteoglicano que contiene sólo cadenas de condroitín sulfato. (Figuras 20, 21 y 22).

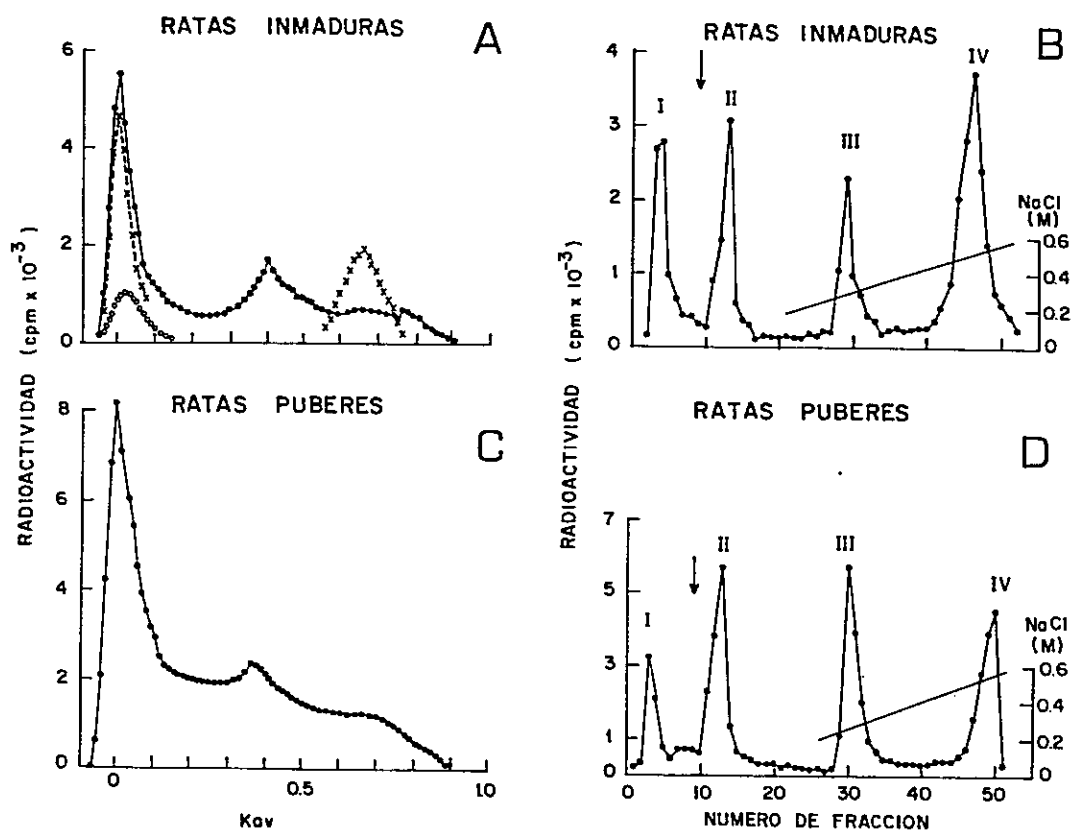


Figura 20. Síntesis de proteoglicanos y ácido hialurónico por células somáticas testiculares: Resultados obtenidos en el medio de cultivo. Se muestran los perfiles de elución en Sepharosa CL-4B (\*-\*) de ratas inmaduras (A) y púberes (B). En A también se muestran los perfiles de elución del material previamente tratado con NaOH 0,2 N (x-x) y hialuronidasa (o-o). Los perfiles de elución en DEAE-Sephacel de ratas inmaduras y púberes se muestran en C y D, respectivamente. La flecha indica la adición de tampón de equilibrio que contiene NaCl 0,15M.

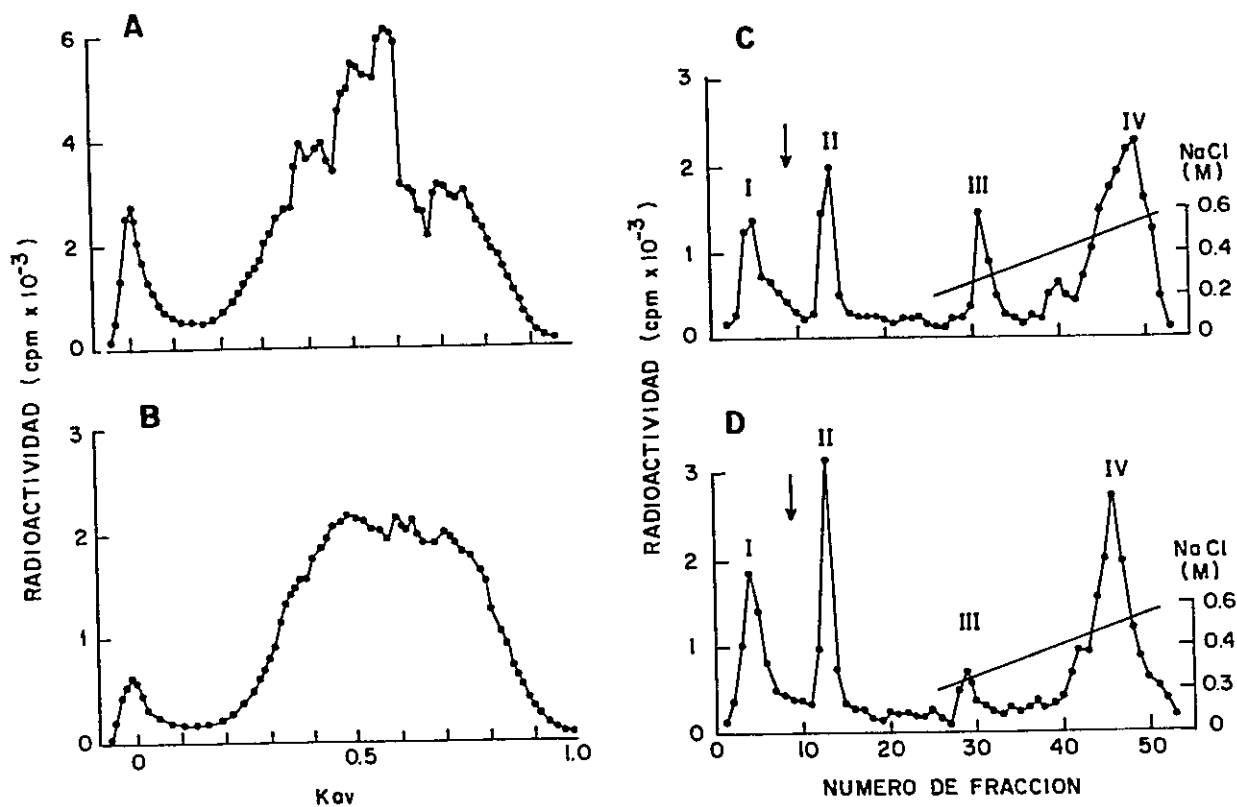


Figura 21. Síntesis de proteoglicanos y ácido hialurónico por células somáticas testiculares: Resultados obtenidos con la fracción asociada a la membrana celular. Se muestran los perfiles de elución en Sepharosa CL-4B de ratas inmaduras (A) y púberes (B); y los perfiles en DEAE-Sepharcel de ratas inmaduras (C) y púberes (D).

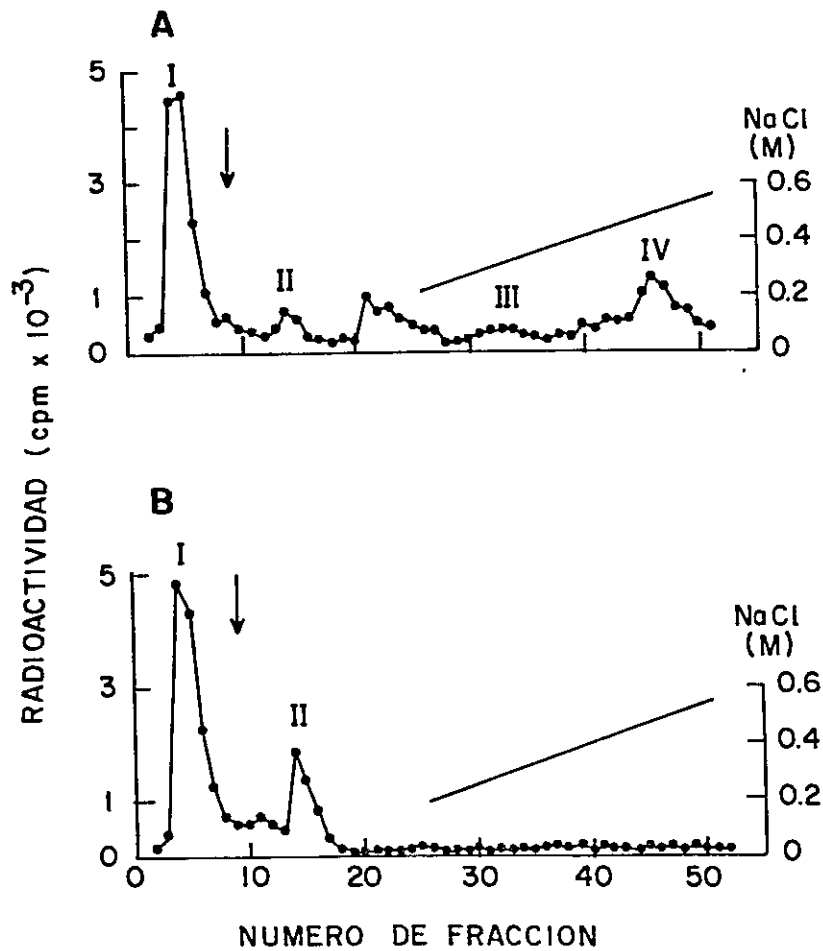


Figura 22. Síntesis de proteoglicanos y ácido hialurónico por células somáticas testiculares: Resultados obtenidos en la fracción intracelular. Se muestran los perfiles de elución en DEAE-Sephacel de ratas inmaduras (A) y púberes (B).

Estos datos muestran que los tipos de proteoglicanos sintetizados por las células somáticas provenientes de ratas inmaduras y púberes son similares, no observándose diferencias cualitativas importantes entre ellos. Sin embargo, el contenido de los proteoglicanos en ambos grupos de animales, en el medio de cultivo, la proporción entre el proteoglicano de condroitín sulfato y el proteoglicano mixto en las ratas inmaduras es tres veces mayor que en las ratas púberes. En cambio, en la fracción asociada a la membrana celular, esta razón es 1,5 veces mayor en los cultivos provenientes de ratas púberes que en aquellos provenientes de ratas inmaduras (Tabla 18).

La diferencia observada se debe principalmente a variaciones en la cantidad del proteoglicano mixto, puesto que la síntesis del proteoglicano de condroitín sulfato se mantiene constante. Así, la disminución de la razón de entre proteoglicanos en el medio de cultivo se debe a un aumento de la cantidad de proteoglicano mixto exportado hacia esa fracción. La razón entre ácido hialurónico y el proteoglicano mixto, que como lo hemos mencionado es un importante indicador de adhesión celular, también varía con la edad de la rata.

En la Tabla 19, se presenta un resumen con las principales diferencias observadas en los cultivos de células testiculares provenientes de ratas inmaduras y púberes.

TABLA 18. Proporción de los tipos de proteoglicanos sintetizados por células somáticas testiculares.

	Medio de cultivo		Asociado a membrana celular	
	Ratas Inmaduras	Ratas Púberes	Ratas Inmaduras	Ratas Púberes
CS/HS-CS	2,7	0,9	5,0	7,5
HA/HS-CS	1,4	0,5	1,6	3,6

La proporción de proteoglicanos se calcula luego de la separación de las macromoléculas marcadas en las respectivas fracciones por cromatografía en DEAE-Sephacel.

HS-CS : proteoglicano que contiene tanto cadenas de heparan sulfato como de condroitin sulfato

CS : proteoglicano que contiene solo cadenas de condroitin sulfato.

HA : ácido hialurónico

TABLA 19. Resumen de las características de los cultivos de largo término de células testiculares provenientes de ratas inmaduras y púberes.

	Ratas Inmaduras	Ratas Púberes	
Capa células Adherentes	Heterogénea	Heterogénea	
Número de células/cm <sup>2</sup> en confluencia	7,8 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>4</sup>	
ABP (pmoles/10 <sup>6</sup> células)	0,144	0,285	
Testosterona (pg/10 <sup>6</sup> células)	460	2.400	
Síntesis de colágeno (cpm/10 <sup>6</sup> cél.)	16.910	12.440	
Tipos de colágeno	I, III	I, III	
Procolágeno III/I	5,7	1,7	
Síntesis de PG (cpm/10 <sup>6</sup> células)	163.200	92.700	
Tipos de Proteoglicanos	HA,CS,HS-CS	HA,CS,HS-CS	
HA/HS-CS	medio de cultivo	1,4	0,5
	asoc. a membrana	1,6	3,6
CS/HS-CS	medio de cultivo	2,7	0,9
	asoc. a membrana	5,0	7,5

PG: Proteoglicano. HA: Acido hialurónico; CS: proteoglicano de condroitin sulfato, HS-CS: proteoglicano mixto de heparán y condroitin sulfato.

## DISCUSION

Los hallazgos mas relevantes obtenidos en esta tesis se pueden resumir de la siguiente manera:

- a. Las células somáticas testiculares sintetizan activamente colágeno y proteoglicanos.
- b. La síntesis de proteoglicanos es dependiente de las interacciones celulares, como puede apreciarse en los cultivos mixtos de células de Sertoli y células intersticiales.
- c. Es posible cultivar las células testiculares en condiciones de largo término. En estas condiciones se observa proliferación de la células somáticas y células germinales. Las células somáticas se organizan formando estructuras características, sintetizan ABP y testosterona y componentes de matriz extracelular.
- d. Los proteoglicanos asociados a la membrana de las células de Sertoli no se encuentran distribuidos homogeneamente en ella, sino en forma polarizada.
- e. La síntesis de componentes de matriz extracelular no es constante durante el desarrollo sino que varía dependiendo del estado de maduración sexual del animal.

En base a estos hallazgos, y otros datos tomados de la literatura, es que en esta tesis se plantea la existencia de un microambiente espermatogénico con rol en la proliferación y diferenciación de la célula germinal.



## 1. Marco conceptual de un microambiente testicular.

Durante el proceso espermatogénico, tanto la maduración de las células germinales como su tránsito desde la zona basal a la zona adluminal del túbulo seminífero, ocurren en estrecho contacto con las células de Sertoli. Estos hechos, junto a la evidencia que la regulación que testosterona y FSH, (las principales hormonas que regulan la espermatogénesis) no actúan directamente sobre las células germinales, sino que ejercen su acción a través de las células de Sertoli (Grootegoed et al, 1989), sugiere que la mayoría de las etapas y procesos propios de la diferenciación de la célula germinal ocurren en estrecho contacto con las células de Sertoli (Wright et al, 1989).

No obstante, es importante tener presente las diversas evidencias que indican que en el testículo no sólo se establecen las relaciones funcionales descritas, sino además, los diferentes fenotipos celulares interactúan, ya sea mediante una interacción directa célula-célula o a través de factores difusibles, afectándose mutuamente en la capacidad funcional de cada una de ellas (Mather, 1984).

La dependencia de las células de Sertoli respecto de la funcionalidad de las células de Leydig es un hecho bien establecido, que se ha confirmado por la evidencia que la inhibición en la producción de testosterona genera una disfunción de las células de Sertoli. La influencia recíproca entre estos tipos celulares aumenta significativamente si cocultivos de ambos tipos celulares se establecen

Por otro lado, el patrón biosintético de componentes de matriz extracelular producidos por las células de Sertoli y por las células intersticiales cambia cuando estas células se encuentran en cultivos mixtos (ver Tabla 3). Estos cambios en la composición de la matriz extracelular, deberían afectar la estructura, función e interacción que las células de Sertoli establecen con las células germinales.

Por las razones expuestas, propongo que además de las células de Sertoli, otras células somáticas testiculares, como células peritubulares, células de Leydig y fibroblastos, junto a factores secretados por estas células (testosterona, ABP, transferrina) y componentes de matriz extracelular participen en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células germinales. A este conjunto celular y de macromoléculas denomino microambiente. En este microambiente deben establecerse interacciones entre los distintos fenotipos testiculares, ya sea del tipo célula-célula o dependientes de factores solubles. Estas interacciones celulares, junto con las que se establecen entre las células y la matriz extracelular debe ejercer influencia tanto en la morfología como en la función celular. En este sentido, se debiera esperar que el establecimiento de estas interacciones provoque cambios importantes en la síntesis y secreción de hormonas y proteínas de exportación, como en la síntesis de componentes de matriz extracelular. Una representación esquemática del microambiente se muestra en la figura 23. La proposición de la existencia de un microambiente espermatogénico, no significa menoscabar la participación de las células de Sertoli en la

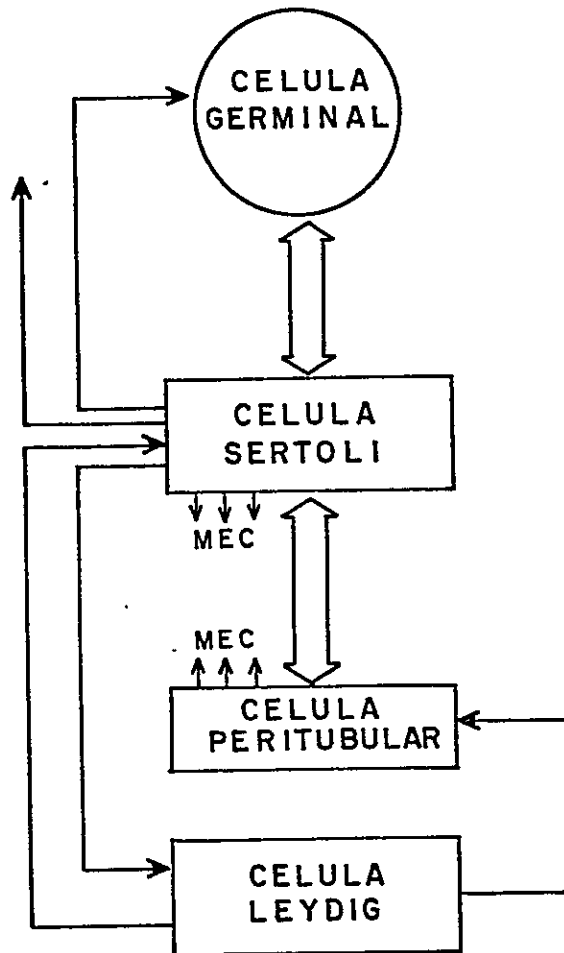


Figura 23. Representación esquemática del microambiente espermatozoario. Las flechas indican interacciones, ya sea del tipo célula-célula, mediadas por factores solubles o interacciones del tipo célula-matriz extracelular.

espermatogénesis. Así, el efecto regulatorio ejercido por los componentes celulares, los compuestos solubles o de matriz extracelular sobre la proliferación y diferenciación de las células germinales ocurre a través de las células de Sertoli. No existen evidencias que alguno de los otros fenotipos somáticos actúen directamente sobre las células germinales.

Dado que, como se ha señalado, la matriz extracelular modula la función y morfología de las células de Sertoli, la interacción entre estas células y las células germinales dependerá de la composición y organización de la matriz extracelular con la cual se encuentran interaccionando. Estos cambios morfológicos y funcionales modificarán, finalmente, el tipo de información transmitida a la célula germinal en diferenciación. De ser así, la composición de este microambiente debería ser dependiente o consecuencia del estado de desarrollo sexual del animal.

2. Búsqueda de un modelo para estudiar las características del microambiente.

Para estudiar esta proposición de microambiente, en esta tesis se utilizó un sistema de cultivo de largo término en el que coexisten todos los fenotipos testiculares. Los resultados presentados demuestran que en este sistema de cultivo, las células testiculares, junto con proliferar y mantener sus propiedades funcionales, se organizan de una manera que no es azarosa sino específica, probablemente debido a las interacciones celulares que se establecen.

Las células somáticas se adhieren a la placa de cultivo, y esta capa adherente se organiza formando estructuras del tipo nódulo, como aquellas que se muestran en la figura 6. Las células de Sertoli forman este tipo de estructura cuando se establecen interacciones con otros fenotipos de estroma o bien cuando interaccionan con una matriz extracelular preformada, como se observa en cocultivos de células de Sertoli y peritubulares (Tung and Fritz 1986), y en cocultivos de células de Sertoli y células de Leydig sobre una matriz extracelular (Saez et al, 1989).

En este sistema de estudio, las células somáticas no sólo proliferan y se organizan sino que también mantienen su funcionalidad. Es así como las células de Sertoli presentes en la capa adherente sintetizan y liberan ABP al medio de cultivo. Es importante hacer notar que la cantidad secretada permanece relativamente constante hasta aproximadamente los 20 días de cultivo, a diferencia de lo que ocurre en cultivos de células de Sertoli aisladas donde se observa una importante disminución de la producción de ABP, en función del tiempo de cultivo (Rich et al, 1983). Esta diferencia entre los cultivos de células de Sertoli y cultivo de largo término sugiere la existencia de interacciones celulares en los cultivos de largo término, y que éstas son importantes en la regulación de la síntesis de ABP. Esta observación es consistente con datos previos de la literatura que indican que la producción de esta proteína permanece constante cuando se cocultivan células de Sertoli con células peritubulares (Tung and Fritz, 1980).

### 3. Génesis de matriz extracelular por células somáticas.

Las células somáticas testiculares en cultivos de largo término, sintetizan activamente colágenos tipo I y III (Rodríguez et al,1990), como también ácido hialurónico, una especie de proteoglicano de condroitin sulfato y una especie de proteoglicano que contiene cadenas de condroitin sulfato y heparan sulfato presumiblemente unidas a un mismo núcleo proteico (Rodríguez and Minguell, 1989,b).

La matriz extracelular ejerce un efecto importante sobre la morfología, migración, proliferación y diferenciación celular. En el modelo del testículo, estudios realizados utilizando cultivos celulares han demostrado que la matriz ejerce un efecto directo sobre la morfología de las células de Sertoli lo que resulta fundamental para una apropiada interacción de éstas con las células germinales (Tung and Fritz, 1984). Al cultivar células de Sertoli sobre una matriz extracelular, éstas forman monocapas polarizadas con una morfología muy similar a la observada in vivo, y también pueden formar estructuras similar a un túbulo ("cords"), lo cual no ocurre si el cultivo se realiza sobre plástico (Hadley et al, 1985).

Pero la matriz extracelular tiene también otras funciones, entre las cuales resulta importante la capacidad que tiene de unir factores de crecimiento. Los proteoglicanos, que forman parte de la matriz extracelular, pueden unir factores de crecimiento, de esta manera los concentran para luego presentarlos, en su conformación apropiada, a

la célula blanco, como ha sido reportado para el caso de fibroblastos y células de estroma hematopoyéticas (Fransson,1987; Roberts et al,1988).

En los procesos de proliferación, diferenciación y migración celular, no sólo son importantes los componentes de matriz extracelular como tal, sino también aquellos que se encuentran asociados a la membrana celular, ya que permiten el establecimiento de interacciones célula-matriz extracelular depositada o bien de interacciones con otras células (Minguell and Tavassoli, 1989). Es posible visualizar la matriz extracelular, entonces, como una proyección de las células hacia el medio, donde las moléculas asociadas a la membrana interaccionan tanto con el citoesqueleto como con las moléculas depositadas extracelularmente. Así, cualquier cambio en la composición o estructura de la matriz extracelular será transmitido hacia la célula, con efecto en su morfología y/o función. De esta forma se establece una relación dinámica entre las células y la matriz extracelular.

En este contexto es importante destacar que los proteoglicanos asociados a la membrana celular de las células de Sertoli no se encuentran localizados homogéneamente en la superficie celular sino ocupando zonas preferentes, esto es se encuentran polarizados. La localización heterogénea de estos compuestos significa que en las condiciones de cultivo utilizadas, las células de Sertoli se polarizan, al menos parcialmente, proceso que probablemente se deba al establecimiento de una matriz extracelular producida en forma cooperativa por los diferentes fenotipos presentes en el cultivo. Es posible por

tanto, especular respecto al rol que pudieran tener los proteoglicanos de acuerdo a su localización en la membrana. La localización basolateral del proteoglicano de condroitín sulfato sugiere que esta macromolécula está implicada en la interacción de las células de Sertoli con la matriz extracelular depositada o en el contacto con las células vecinas. Por otro lado, si bien los datos de adhesión de células germinales no pertenecen a determinar el mecanismo exacto implicado en este proceso, sugieren fuertemente la participación del proteoglicano mixto asociado a la membrana celular en dicho proceso. Un mecanismo posible es mediante la unión de las cadenas de heparán sulfato a sitios específicos en la célula germinal. Otra explicación posible para este proceso es que sea el núcleo proteico del proteoglicano quien esté involucrado en la adhesión. Ambas alternativas explicarían el efecto inhibitorio que producen las cadenas de condroitín sulfato, y la necesidad de su remoción. También se puede pensar que la adhesión no ocurra a través del proteoglicano, sino a través de otra molécula asociada a la membrana celular y la presencia del proteoglicano mixto sólo interferiría en dicha unión. Esta última alternativa le asigna al proteoglicano mixto sólo un rol pasivo.

La observación que la cantidad de proteoglicano mixto asociado varía durante la transición de animal inmaduro a púber y los datos obtenidos recientemente (razón por la cual no se incluyen), que indican que las células germinales no se adhieren a las células de estroma provenientes de ratas púberes, debido a la menor cantidad de proteoglicano mixto encontrada en estas células, hace suponer que estas

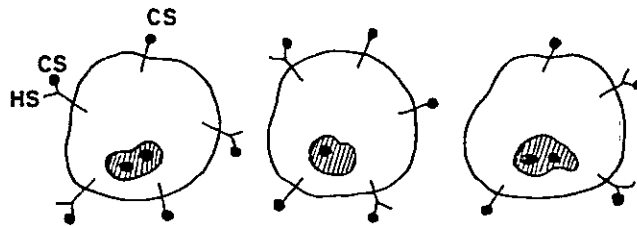


macromolécula no poseen un rol pasivo en este proceso.

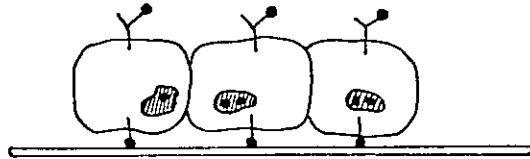
La definición de apical en estos experimentos, está dada por la accesibilidad que tiene la enzima, por lo tanto es posible que in vivo, el proteoglicano mixto no se encuentre sólo en la parte apical sino también en la zona basolateral (que en las condiciones del cultivo aquí utilizadas, también podría ser accesible a la enzima). Tampoco es descartable, y existen evidencias en otros sistemas, que el proteoglicano mixto pueda migrar a través de la membrana desde la zona basolateral a la zona apical (Bernfield and Sanderson, 1990), y de esta manera participar en la interacción con la célula germinal durante su tránsito desde la posición basal a la posición adluminal del túbulo; sin embargo no se conoce cual es la señal que permite la liberación de la célula germinal en este compartimento. En la Figura 24 se muestra una representación de un corte de un túbulo seminífero y la localización postulada para los proteoglicanos asociados a la membrana celular.

Los resultados indican que en cada uno de los estados de desarrollo sexual estudiado, las células somáticas testiculares generan una matriz extracelular diferente. Ya se ha mencionado el rol que juega la matriz extracelular en alterar la morfología y función de las células de Sertoli, por lo tanto dos matrices de diferente composición ejercerán funciones diferentes sobre las células de Sertoli.

CELULAS DE SERTOLI EN SUSPENSION



CELULAS DE SERTOLI EN MONOCAPA



CELULAS DE SERTOLI EN TUBULO SEMINIFERO

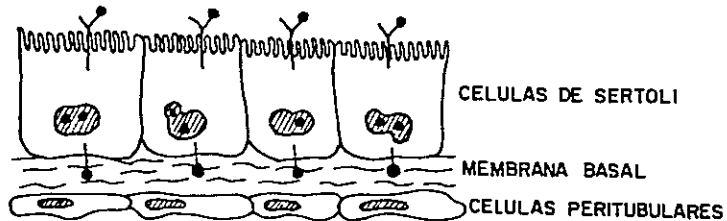


Figura 24. Localización de los proteoglicanos asociados a la membrana celular de las células de Sertoli. a) Se muestra la localización de los proteoglicanos cuando las células se encuentran en suspensión, b) la polarización de estos compuestos cuando las células están en cultivo, y c) una representación del túbulo seminífero y de las interacciones que establecerían las células de Sertoli con los elementos de la membrana basal.

#### 4. Cambios en componentes del microambiente espermatogénico durante el desarrollo sexual del animal.

Una de las características interesantes del sistema germinal, es que a pesar de estar presentes desde el nacimiento tanto las células somáticas como germinales, el proceso espermatogénico se activa en un momento determinado del desarrollo. En efecto, durante la pubertad ocurren cambios significativos en la producción de hormonas los cuales tienen importancia en gatillar la espermatogénesis. Sin embargo, no se ha realizado el estudio de las características del microambiente, - en particular de los componentes de la matriz extracelular- desde la perspectiva en que en este trabajo ha sido definido, esto es, analizando los cambios tanto cuanti como cualitativos que ocurren en la transición de animales inmaduros a púberes.

Utilizando el sistema de cultivo de largo término, se analizaron las características de las células somáticas, los factores sintetizados y las características de los componentes de matriz extracelular producidos por estas células, cuando provienen de testículos de ratas en dos estados de desarrollo sexual: ratas inmaduras y púberes.

Aunque los tipos de componentes de matriz extracelular sintetizados y los factores producidos en ambos casos son los mismos, se encuentran diferencias cuantitativas importantes. Esto significa que el entorno con el cual se encuentran interaccionando las células germinales es diferente en ambos estados de desarrollo. Un resumen de algunas de las diferencias observadas se muestra en la Tabla 19.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que tanto la síntesis de algunos de los productos secretados por las células somáticas, como la síntesis de componentes de matriz extracelular, difieren notablemente en cultivos de células provenientes de ratas inmaduras y en cultivos de células de ratas púberes.

Estos datos muestran que las células testiculares son funcionalmente diferentes en ambos estados de desarrollo, en condiciones de cultivo, donde por tanto, no reciben ninguna información extrasistema. Esto significa que al momento de poner las células en cultivo, éstas tienen la información referente al estado de maduración sexual del animal y logran mantenerla en cultivo por varios días.

Es interesante saber si la maduración sexual de la rata macho es conducida por un tipo celular, en función de la edad por ejemplo, o todas las células somáticas maduran sincrónicamente. No existen datos concluyentes al respecto, sin embargo existen evidencias que indican que las células de Sertoli pierden su capacidad de respuesta frente a FSH en función de la edad y que esta característica se conserva durante varios días con las células en cultivo (Rich et al, 1983). Esto significa que las células de Sertoli son capaces de continuar algunos aspectos de su programa de maduración en cultivo. Por tanto, se podría pensar que sea esta célula la responsable de transmitir dicha información al resto de las células testiculares. Las células de Sertoli, se sabe que ejercen un importante efecto regulatorio sobre la síntesis de testosterona por las células de Leydig, a través de secreción de factores que estimulan la

síntesis de dicha hormona (Janecki et al,1985) o factores que la inhiben (Sharpe et al,1981).

Una de las características mas significativas de los cambios que ocurren durante la pubertad, es el gran aumento en la síntesis de testosterona. Se puede especular, entonces, que esta hormona sea la vía por la cual se transmita la información del estado de madurez sexual del animal.

Por lo tanto, si las células de Sertoli conservan el programa de maduración, pueden producir un incremento de la síntesis de testosterona durante la pubertad. Es sabido que todos los fenotipos somáticos testiculares poseen receptores para andrógenos (Nakhla et al,1984) y por lo cual pueden responder adecuadamente a aumentos en la concentración de testosterona. Existen datos en la literatura que indican que testosterona ejerce un efecto sobre el depósito de componentes de matriz extracelular como fibronectina y colágeno tipo IV (Skinner et al, 1985), modificando de esta manera la conformación de la matriz extracelular.

El uso de cultivos mixtos, poniendo en un mismo cultivo células provenientes de ratas en diferentes estados de desarrollo, podría ayudar a dilucidar si son todas las células las que maduran sincrónicamente o bien una sólo es aquella que dirige la maduración.

## 5. Conclusiones

1. Los resultados muestran que el sistema de cultivo de largo término propuesto se producen interacciones celulares, como se revela morfológicamente por la formación de estructuras características, la producción de compuestos sintetizados específicamente por algunas de las células somáticas y el establecimiento de una matriz extracelular. Estos datos, permiten postular que en el testículo se genera un microambiente espermatogénico que permite el alojamiento de las células germinales y su eventual proliferación.

2. Este microambiente participa en la regulación de la espermatogénesis, por lo cual no debe ser constante constante sino cambiar durante los distintos estados de maduración sexual del animal. De esta manera, las células germinales interaccionan con estos microambientes de diferente conformación, recibiendo en cada caso señales diferentes para la proliferación y diferenciación celular.

## APENDICE

Estudios de localización de proteoglicanos asociados a la membrana celular por inmunofluorescencia.

Como otra forma de avalar los resultados obtenidos con tratamientos enzimáticos y posterior análisis de los proteoglicanos remanentes por cromatografía en DEAE-Sephacel, se han realizados estudios preliminares utilizando técnicas de inmunofluorescencia.

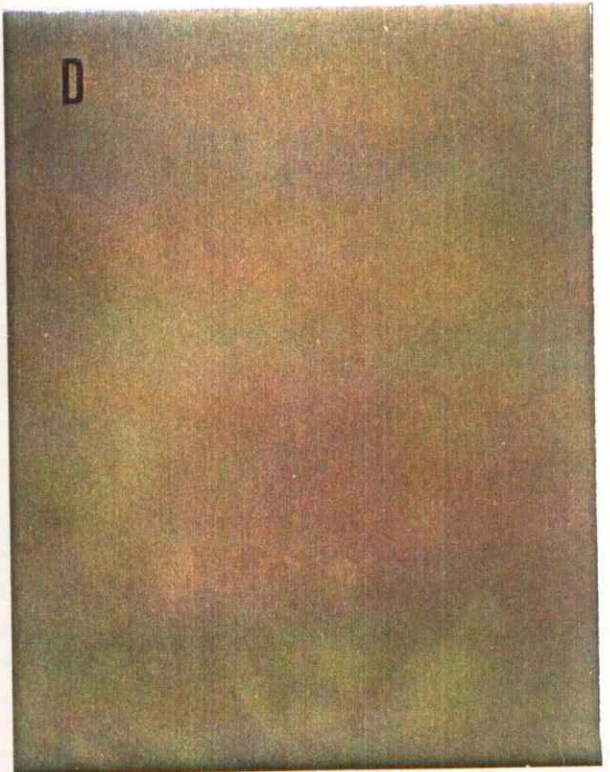
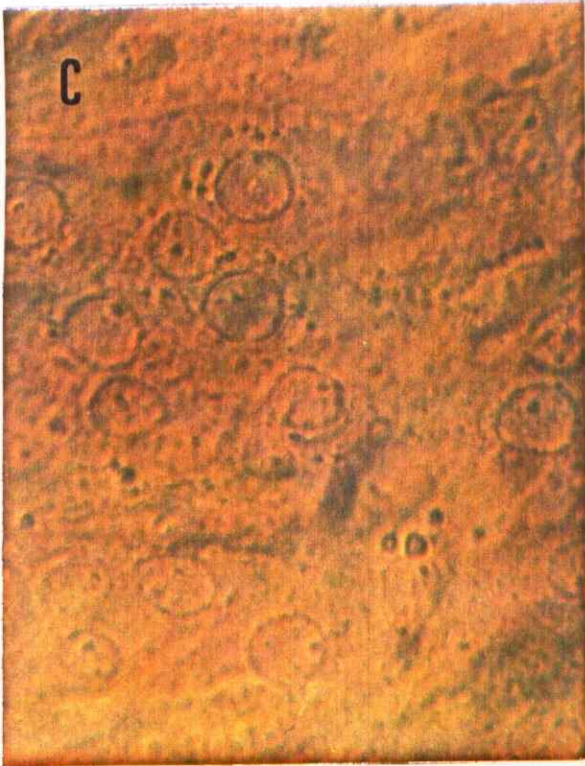
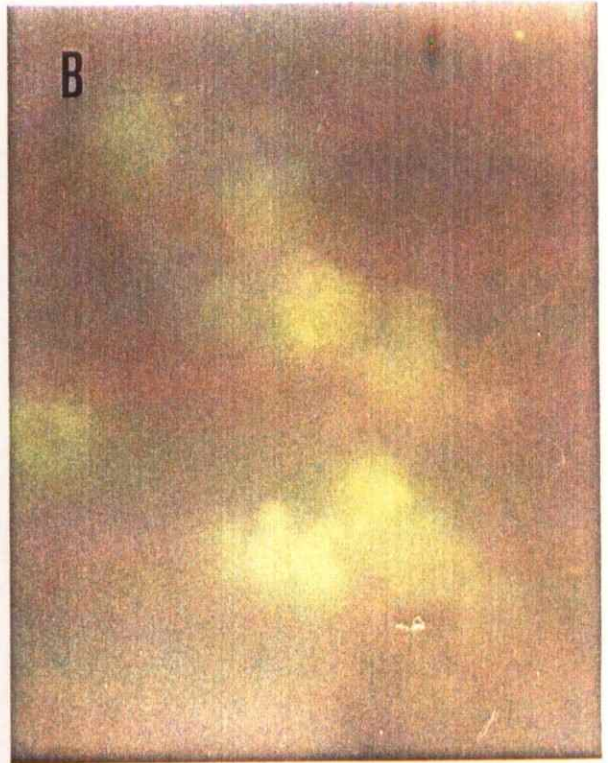
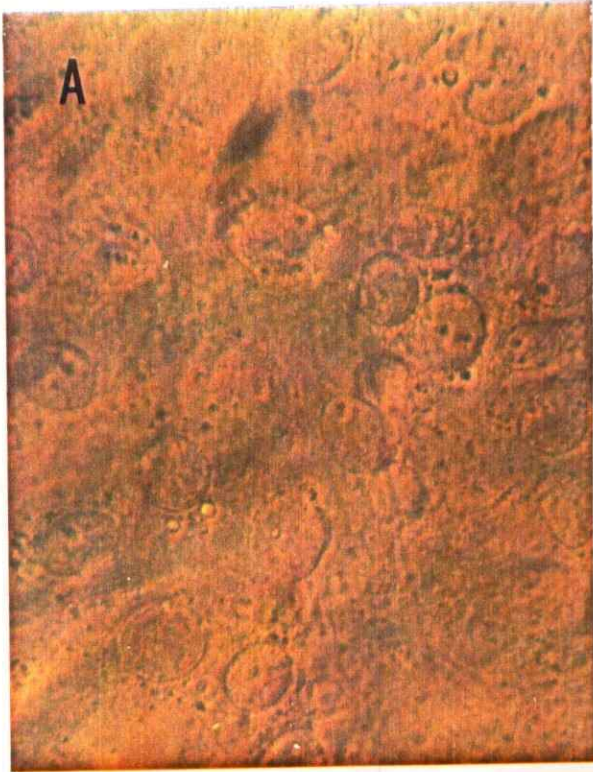
Los cultivos de largo término se establecen según se indica en Materiales y Métodos. A los 12 días de cultivo se evidencia la presencia de proteoglicanos asociados a la membrana celular mediante un anticuerpo monoclonal anti condroitín sulfato (primer anticuerpo). Luego se agrega el segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína.

Como se observa en la figura 25, las células de Sertoli que se encuentran en el cultivo reaccionan con el anticuerpo utilizado, lo que demuestra la presencia de proteoglicanos que contienen cadenas de condroitín sulfato asociados a la membrana y que se encuentran localizados hacia el medio de cultivo. Es interesante que las otras células presentes en el cultivo no reaccionan con el anticuerpo, lo que indica que no exponen el proteoglicano de condroitín sulfato hacia el medio. Esto hace suponer que el proteoglicano detectado en las células de Sertoli corresponde al proteoglicano mixto.

**Figura 25.** Inmunocitoquímica de cultivos de largo término.

Los cultivos se mantienen por 12 días y luego se agrega el primer y segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo está conjugado con fluoresceína. En A y B se agrega el primer anticuerpo anti condroitín sulfato al cultivo intacto, mientras que en C y D ha sido tratado previamente con condroitinasa ABC. A y C muestran la imagen de un campo de los cultivo con contraste de fase, que es el mismo que se muestra fluorescente en B y D.





No todas las células de Sertoli se encuentran polarizadas de igual manera, lo que se deduce de que no todas presentan el proteoglicano mixto expuesto al medio de cultivo.

Cuando los cultivos de largo término son tratados con condroitinasa ABC, no reaccionan con el anticuerpo monoclonal como se observa en la figura 25 (D). Esto se corresponde con aquellos resultados obtenidos con el análisis cromatográfico de los proteoglicanos remanentes luego del tratamiento enzimático.

## REFERENCIAS

- Aumailley, M., Krieg, T., Razaka, G., Müller, P.K. and Bricand, H. (1982). Influence of cell density on collagen biosynthesis in fibroblast cultures. *Biochem. J.* 206, 505-510.
- Bellvé, A.R. and Feig, L.A. (1984). Cell proliferation in the mammalian testis: Biology of the seminiferous growth factor (SGF). *Recent Progress in hormone Research* 40, 531-567.
- Bergh, A. (1982) Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules. *Int. J. Androl.* 5, 325-330.
- Bernfield, M. and Sanderson, R.D. (1990) Syndecan, a developmentally cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Trans. R. Soc. Lond.* 327, 171-186.
- Borland, K., Muffly, M.E. and Hall, P.F. (1986). Production of components of extracellular matrix by cultured rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 35, 997-1008.
- Cailleau, J., Heyns, W. and Verhoeven, G. (1984). A filter disc assay for the measurement and characterization of androgen binding protein in unconcentrated media from Sertoli cell-enriched cultures. *J. Steroid Biochem.* 21, 691-696.
- Campbell, A.D., Long, M.W. and Wicha, M.S. (1987). Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage. *Nature.* 328, 744-746.
- Carney, S.L. (1986). Proteoglycans, in Chaplin M.F., Kennedy J.F. (eds): *Carbohydrate Analysis*. Oxford, IRL Press, pp 97-141.
- Clermont, Y. and Hermo, L. (1976). in *Stem Cells of Renewing Cell Populations* (Cairnie, A.B., Lala, P.K. and Osmond D.G. eds.) pp 273. Academic Press. N.Y.
- David, G., Lories, V., Heremans, A., Van Der Schueren, B., Cassiman, J.J. and Van Der Berghe, H. (1989). Membrane-associated chondroitin sulfate proteoglycans of human lung fibroblasts. *J. Cell Biol.* 108, 1165-1175.
- D'Agostino A., Monaco, L., Stefanini, J., Geremia, R. (1984). Study of the interaction between sperm cells and Sertoli cells in vitro. *Exp. Cell. Res.* 150, 430-435.

Del Rosso, M., Cappelletti, R., Dini, G., Fibbi, G., Vannuchi, S., Chiarugi, V. and Guazzelli, C. (1981). Involvement of glycosaminoglycans in detachment of early mieloid precursors from bone-marrow stromal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 676,129-136.

Del Rosso, M., Fibbi, G., Pasquali, F., Cappelletti, R., Vannuchi, S. and Chiarugi, V. (1982). Effects of hyaluronate and heparan sulphate on collagen-fibronectin interactions. *Int. J. Biol. Macromol.* 4,139-144.

Dexter, T.M., Allen, T.D. and Lajtha L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell. Physiol.* 91, 335-344.

Dufau, M.L., Winters, C.A., Hattori, M., Aquilano, D., Baraffao, L.L.S., Nozu, K., Banleal, A. and Catt K.J. (1984). Hormonal regulation of androgen production by the Leydig cell. *J. Steroid Biochem* 20, 161-173.

Feig, L.A., Bellvé, A.R., Erickson, N.H. and M. Klagsbrun.(1980). Sertoli cells contain a mitogenic polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 77, 4774-4778.

Fransson, L.A. (1987). Structure and function of cell-associated proteoglycans. *Trends Biochem. Sci.* 12,406-411.

Galdieri, M., Monaco, L. and Stefanini, M. (1984). Secretion of Androgen binding protein by Sertoli cell is influenced by contact with germ cells. *J. Androl.* 5, 409-415.

Grootegoed, J.A., Den Boer, P.S. and Mackenbach, P. (1989). Sertoli Cell-Germ Cell Communication. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 564, 232-242.

Grotjan, H.E.Jr. and Heindel, J.J. (1982). Effect of spent media from Sertoli cell cultures on in vitro testosterone production by rat testicular interstitial cells. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 383, 456-457.

Hay, E.D. (1981). Extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 91,205s-223s.

Hadley, M.A., Byers, S.W., Suárez-Quian, C.A., Kleinman, H.K. and Dym, M. (1985). Extracellular matrix regulates Sertoli cells differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J. Cell Biol.* 101,1511-1522.

Hadley, M.A., Djakiew, D., Byers, S.W. and Dym, M.(1987). Polarized secretion of androgen-binding protein and transferrin by sertoli cells grown in a bicameral culture system. *Endocrinology* 120, 1097-1103.

Holmes, S.D.; Bucci, L.R.; Lipshulta, L., Smith R.G. (1983). Transferrin binds specifically to pachytene spermatocytes. *Endocrinology* 113,1916-1918.

Höök, M., Kjellén, L. and Johansson, S. (1984). Cell-surface glycosaminoglycans. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 847-869.

Hutson, J.C. and Stocco, D.M. (1981). Peritubular cell influence on the efficiency of androgen binding protein secretion by Sertoli cells in culture. *Endocrinology* 108, 1362-1368.

Iscove, N.N.; Senn, J.S. Till J.E. and McCulloch, E.A. (1971). Colony formation by normal and Leukemic human marrow cells in culture: Effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood* 37, 1-5.

Janecki, A., Jaknbowiak, A. and Lukavayk, A. (1985). Stimulatory effect of Sertoli cell secretory products on testosterone secretion by purified Leydig cells in primary culture. *Mol. and Cell. Endocr.* 42, 235-243.

Jutte, N.H.P.M., Jansen, R. Groteaped, J.A., Rommerts, F.F.G. and van der Molen, H.J. (1983) FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J. Reprod. Fert.* 68, 219-226.

Kuopio, T., Paranko, J. and Pelliniemi, L.J. (1989). Basement membrane and epithelial features of fetal-type Leydig cells in rat and human testis. *Differentiation* 40, 198-206.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-683.

Lam, D.M.K.; Furrer, R. and Bruce, W.ER. (1970) The separation, physical characterization, and differentiation kinetics of spermatogonist cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 65, 192-199.

Limeback, H.F., Sodek, J. and Brunette, D.M. (1978). Nature of collagens synthesized by monkey periodontal-ligament fibroblast in vitro. *Biochem. J.*, 170, 63-71.

Linsenmayer, T.F. (1981). Collagen. In: Hay, D. (ed) *Cell Biology of Extracellular Matrix*, p. 5. Plenum Press, New York.

Louis, B.G. and Fritz, I.B. (1979). Follicle-stimulating hormone and testosterone independently increase the production of androgen binding protein by sertoli cells in culture. *Endocrinology* 104, 454-461.

Mather, J.P. (1984). *Mammalian cell culture*. Edited by J.P. Mather, pag 167-193.

Mather, J.P., Wolpe, S.D., Gunsalus, G.L., Bardin, C.W. and Phillips, D.M. (1984). Effect of purified and cell-produced extracellular matrix components on Sertoli cell function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 438, 572-575 (Abstr.)

- Mather, J.P., and Phillips, D.M. (1984). Establishment of a peritubular myoid-like cell line and interactions between established testicular cell lines in culture. *J. Ultrastruc. Res.* 87, 263-274.
- Minguell, J.J., Martinez, J. and Walter, T. (1982). Effect of hydrocortisone on the growth of human bone marrow fibroblasts. *Brit. J. Haematol.* 52,307-310.
- Minguell, J.J. and Tavassoli, M. (1989). Proteoglycan synthesis by hemopoietic progenitor cells. *Blood* 73, 1821-1827.
- Miskulin, M., Dalgleish, R., Kluge-Beckerman, B., Rennard, S.I., Tolstoshev, M.B. and Crystal, R.G. (1986). Human type III collagen gene expression is coordinately modulated with the type I collagen genes during fibroblasts growth. *Biochemistry* 25, 1408-1413.
- Nakhla, A.M., Mather, J.P., Janne, O.A. and Bardin, C.W. (1984). Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, Myoid, and Epithelial cells: Effect of time in culture and cell density. *Endocrinology* 115, 121-128.
- Oohira, A., Wight, T.N. and Borustein, P. (1983). Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in cultures. *J. Biol. Chem.* 258, 2014-2021.
- Oonk, R.B., Grotegoed, J.A. and van der Molen, H.J. (1985). Comparison of the effects of insulin and follitropin on glucose metabolism by Sertoli cells from immature rats. *Molec. and Cell. Endocr.* 42,39-48.
- Pelliniemi, L.J., Paranko, J., Grund, S.K., Frojzman, K., Foidart, J.M. and Lakkala-Paranko, T. (1985). Extracellular matrix in testicular differentiation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 438, 405-416.
- Peterkofsky, D. and Diegelman, R. (1971). Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* 10,988-994.
- Potten, C.D.; Schofield, R. and Lajtha, L.G. (1979). A Comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 560, 281-299.
- Rapraeger, A. (1989). Transforming growth factor (type  $\beta$ ) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia. *J. Cell Biol.* 109, 2509-2518.
- Reventos, J., Ferrard-Sapori, M.H., Chatelain, P.G. and Saez J.M. (1989). Leydig cell and extracellular matrix effects on Sertoli cell function: Biochemical and Morphologic studies. *J. Androl.* 10, 359-365.
- Rich, K.A., Bardin, W., Gunsalus, G.L. and Mather, J.P. (1983). Age-dependent pattern of androgen-binding protein secretion from rat Sertoli cells in primary culture. *Endocrinology* 113,2284-2293.

- Rivarola, M.A., Sanchez, P. and Saez, J.M. (1985). Stimulation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid synthesis in spermatogenic cells by their coculture with Sertoli cells. *Endocrinology* 117,1796-1802.
- Roberts, R., Gallagher, J., Spooner, E., Allen, T.D., Bloomfield, F. and Dexter, T.M. (1988). Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism of stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332,376-378.
- Rodriguez, J.P. and Minguell, J.J. (1989). Synthesis of extracellular matrix components by somatic testicular cells from immature and pubertal rats. *Int. J.Androl.* 12, 231-239.
- Rodriguez, J.P. and Minguell, J.J. (1989). Synthesis of proteoglycans and hyaluronic acid by long-term cultures of testicular cells from immature and pubertal rats. *Cell Biochem. Funct.*7, 293-300.
- Rodriguez, J.P., Fernández, M. and Minguell, J.J. (1990). Interstitial collagen by somatic testicular cells in culture. *Cell Biochem. Funct.* (en prensa)
- Russell, L. (1977a). Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am J. Anat* 148, 301-312.
- Russell, L. (1977b) Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.* 148, 313-328.
- Sáez, J.M, Arallet, O., Naville, D., Perrard-Sapori, M.H. and Chatelain, P.G. (1989). Sertoli-Leydig Cell Communications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 564, 210-231.
- Sanborn, B.M., Steinberger, A., Tcholakian, R.A. and Steinberger, E. (1977). Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli cells. *Steroids* 29, 493-502.
- Sanborn, B.M., Wagle, J.R., Steinberger, A. and Greer-Emmer, D. (1986). Maturation and hormonal influences on Sertoli cell function. *Endocrinology* 118,1700-1709.
- Sharpe, R.M., Fraser, H.M.; Cooper, I. and Rommerts, F.F.G.(1981) Sertoli-Leydig cell communication via an LHRH-like factor. *Nature* 290, 785-787.
- Sharpe, R.M., Fraser, H.M., Cooper, I. and Rommerts, F.F.G.(1982). The secretion, measurement, and function of a testicular LHRH-like factor. *Ann N.Y.Acad. Sci.* 383, 272-294.
- Shively, J.E. and Conrad, H.D. (1976). Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin. *Biochemistry* 15,3932-3942.

Skinner, M.K. and Fritz, I.B. (1985a). Structural characterization of proteoglycans produced by testicular peritubular cells and Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* 260, 11874-11883.

Skinner, M.K., Tung, P.S. and Fritz, I.B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J. Cell Biol.* 100, 1941-1947.

Skinner, M.K. and Fritz B. (1985b). Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulate Sertoli cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82, 114-118.

Steinberger, A. (1975). In vitro techniques for the study of spermatogenesis. *Meth. in Enzymol.* 39, 283-296.

Steinberger, A., Dighe R.R. and Diaz, J. (1984). Testicular peptides and their endocrine and paracrine functions. *Arch. Biol. Med. Exp.* 17, 267-271.

Suárez-Quian, C.A., Hadley, M.A. and Dym, M. (1985). Effect of substrate on the shape of Sertoli cells in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 438, 417-434.

Tapanainen, J., Kuopio, T., Pelliniemi, L.J. and Huhtaniemi, I. (1984). Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biol. Reprod.* 31, 1027-1035.

Tres, L.L. and Kierszbaum, A.L. (1983). Viability of rat spermatogenic cells in vitro is facilitated by their coculture with Sertoli cells in serum-free hormone-supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80, 3377-3381.

Tung, P.S. and Fritz, I.B. (1980). Interactions of Sertoli cells with myoid cells in vitro. *Biol. Reprod.* 23, 207-217.

Tung, P.S. and Fritz, I.B. (1984). Extracellular matrix promotes rat Sertoli cell histotypic expression in vitro. *Biol. Reprod.* 30, 213-229.

Tung, P.S. and Fritz, I.B. (1986). Extracellular matrix components and testicular peritubular cells influence the rate and pattern of Sertoli cell migration in vitro. *Dev. Biol.* 113, 119-134.

Uitto, J., Booth, B.A., Polak, K.L. (1980). Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. II. Isolation and further characterization of type I and type III procollagens synthesized in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 624, 545-561.



Wasteson, A., Uthne, K. and Westermark, B. (1973). A novel assay for the biosynthesis of sulphated polysaccharide and its application to studies on the effects of somatomedin on cultured cells. *Biochem. J.* 136,1069-1074.

Wiebe, J.P.(1976). Steroidogenesis in rat Leydig cells:changes in activity of 5-ane and 5-ene 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases during sexual maturation. *Endocrinology* 98,505-513.

Whiteside, M., Worrall, J.G., Prince, R.K., Buckingham, R.B. and Rodnan, G.P. (1985). Soluble mediators from mononuclear cells increase the synthesis of glycosaminoglycans by dermal fibroblast cultures derived from normal subjects and progressive systemic sclerosis patients. *Arth. Rheum.* 28, 188-197.

Wolf, N.(1979). The haemopoietic microenvironment. *Clin. Haematol.* 8, 469-500.

Wright, W.W., Musto, N.A., Mather, J.P. and Bardin, C.W. (1981). Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78, 7565-7569.

Wright, W.W., Zabludoff, S.D., Erickson-Lawrence, M. and Karzai, A.W. (1989). Germ cell-Sertoli cell interactions: Studies of cyclic protein-2 in the seminiferous tubule. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 564, 173-185.

Yamada, K.M. (1983). Cell surface interactions with extracellular materials. *Ann. Res. Biochem.* 52, 761-799.

Yanagishita, M. and Hascall, V.C. (1984). Proteoglycans synthesized by rat ovarian granulosa cells in culture: Isolation, fractionation and characterization of proteoglycans associated with the cell layer. *J. Biol. Chem.* 259,10260-10269.