

## Tesis de Posgrado

# Estudios sobre la acción de los andrógenos en el epidídimo humano y sus mecanismos regulatorios

Vazquez, Mónica Hebe

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Vazquez, Mónica Hebe. (1986). Estudios sobre la acción de los andrógenos en el epidídimo humano y sus mecanismos regulatorios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1957\\_Vazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1957_Vazquez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Vazquez, Mónica Hebe. "Estudios sobre la acción de los andrógenos en el epidídimo humano y sus mecanismos regulatorios". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1957\\_Vazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1957_Vazquez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

ESTUDIOS SOBRE LA ACCION DE LOS ANDROGENOS EN EL

EPIDIDIMO HUMANO Y SUS MECANISMOS REGULATORIOS

Tesis presentada para optar al título de Doctor  
en Ciencias Químicas

Autora: Lic. Mónica Hebe Vazquez

Director: Dr. Jorge A. Blaquier

Buenos Aires

-1986-

195 f  
Ej: 2.

À mis padres y hermanos



## INDICE

	página
INTRODUCCION	
Breve descripción del aparato genital masculino.	1
Descripción anatómica e histológica del epidídimo humano.	7
El proceso de maduración del espermatozoide.	13
Participación del epidídimo en el proceso de maduración.	18
Evidencias de la existencia de un proceso de maduración en el hombre.	22
El epidídimo como órgano efector de andrógenos.	25
a-Transporte de andrógenos al epidídimo.	25
b-Captación de andrógenos.	30
c-Metabolismo de andrógenos en el epidídimo.	31
d-Unión de andrógenos a proteínas receptoras.	37
e-Unión a aceptores nucleares.	43
f-Estimulación de la transcripción.	45
g-Estimulación de la síntesis proteica.	47

CAPITULO 1  
METABOLISMO DE ANDROGENOS EN EL EPIDIDIMO HUMANO

## MATERIALES Y METODOS

M.1. 1.Reactivos.	62
M.1. 2.Obtención del tejido.	64
M.1. 3.Control histológico.	64
M.1. 4.Cultivo de órgano.	65
M.1. 5.Superfusión.	68
M.1. 6.Preparación de homogenato de epidídimo humano.	70
M.1. 7.Separación de epitelio y estroma.	70
M.1. 8.Determinación de la actividad 5 $\alpha$ reductasa en homogenato de epidídimo humano.	72
M.1. 9.Determinación de la actividad 5 $\alpha$ reductasa y 17 $\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa sobre cortes de tejido y fracciones epitelial y estroma de epidídimo humano.	72
M.1.10.Extracción y separación de esteroides.	73
M.1.11.Cuantificación de la radiactividad.	74
M.1.12.Evaluación de la actividad 5 $\alpha$ reductasa.	76
M.1.13.Evaluación de la actividad 17 $\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa.	77
M.1.14.Otros parámetros del metabolismo.	78
M.1.15.Análisis de resultados.	78

M.1.16.Otras técnicas. 78

## RESULTADOS

PARTE A-Estudio del metabolismo androgénico en tejido epididimario CONTROL. Comparación con tejido tratado con estrógenos in vivo. 79

R.1. 1.Determinación de la actividad  $5\alpha$ -reductasa en distintas regiones del epidídimo humano. 79

R.1. 2.Evaluación del metabolismo androgénico. Análisis por superfusión. 80

R.1. 3.Evaluación de la actividad  $5\alpha$ -reductasa en tejido CONTROL y tratado con estrógenos in vivo. 80

R.1. 3.a)Por superfusión. 90

R.1. 3.b)Por incubación de cortes de tejido con [3H]T. 91

R.1. 4.Evaluación de la actividad  $17\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa. 94

R.1. 5.Aspecto histológico del tejido CONTROL y tratado con estrógenos. 96

PARTE B-Estudio del metabolismo androgénico en tejido epididimario humano mantenido en cultivo de órgano. Efecto de diversos tratamientos hormonales. 99

R.1. 6.Modelo experimental para el estudio del efecto del estado hormonal. 99

R.1. 7.Control histológico del tejido cultivado. 100

R.1. 8.Evaluación del metabolismo androgénico. Análisis por superfusión. 102

R.1. 9.Evaluación de la actividad  $5\alpha$ -reductasa. 105

R.1. 9.a)Por perfusión.	105
R.1. 9.b)Por incubación con [3H]T.	107
R.1.10.Fraccionamiento de tejido epididimario Medición de la actividad 5 $\alpha$ reductasa en epidídimo humano.	115
R.1.11.Evaluación de la actividad 17 $\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa en epidídimo humano.	116
R.1.11.a)Sobre cortes de tejido.	116
R.1.11.b)Sobre fracción epitelial y estroma.	119
DISCUSION	120

## CAPITULO 2 RECEPTORES ANDROGENICOS EN EPIDIDIMO HUMANO

### MATERIALES Y METODOS

M.2.1.Reactivos, soluciones, buffers.	138
M.2.2.Obtención del tejido.	139
M.2.3.Obtención de las fracciones , subcelulares.	140
M.2.4.Ensayo de unión del ligando radiactivo.	143
M.2.5.Preincubación de la fracción citosólica con Mersaly1.	144
M.2.6.Separación de la fracción unida.	145
M.2.7.Cultivo de órgano.	146
M.2.8.Otras técnicas.	147
M.2.9.Expresión y análisis de resultados.	147



## RESULTADOS

### PARTE A-Optimización de las condiciones de ensayo de receptores androgénicos en epidídimo humano

R.2.1.Fracción citosólica.	149
R.2.1.a)Elección del ligando.	149
R.2.1.b)Temperatura y tiempo óptimos de incubación.	150
R.2.1.c)Efecto del agregado de molibdato.	151
R.2.1.d)Efecto del Mersalyl.	152
R.2.2.Fracción microsomal.	155
R.2.3.Fracción nuclear.	155
R.2.3.a)Tiempo de extracción de sitios receptores.	156
R.2.3.b)Temperatura óptima de incubación.	156
R.2.3.c)Tiempo óptimo de incubación.	
R.2.3.d)Almacenamiento del extracto nuclear.	156

### PARTE B-Determinación de receptores androgénicos en tejido epididimario humano mantenido en cultivo de órgano. Efecto de diversos tratamientos hormonales.

R.2.4.Evaluación de los receptores androgénicos en distintas fracciones subcelulares.	161
---	-----

R.2.5.Evaluación de los receptores androgénicos en núcleos purificados.	163
---	-----

DISCUSION	167
-----------	-----

## CAPITULO 3

### PROTEINAS ANDROGENO-DEPENDIENTES EN EL EPIDIDIMO HUMANO

## MATERIALES Y METODOS

M.3. 1.Reactivos.	176
M.3. 2.Obtención del tejido.	176
M.3. 3.Muestras de espermatozoides.	177
M.3. 4.Obtención de fluidos epididimarios.	177
M.3. 5.Obtención de extracto salino de espermatozoides.	178
M.3. 6.Cultivo de órgano.	179
M.3. 7.Ensayo de síntesis proteica.	179
M.3. 8.Análisis electroforético de las proteínas.	181
M.3. 8.a)Preparación de las muestras.	181
M.3. 8.b)Descripción del sistema electroforético.	182
M.3. 8.b)-1-Soluciones.	182
M.3. 8.b)-2-Preparación del gel separador.	183
M.3. 8.b)-3-Condiciones de corrida.	186
M.3. 8.c)Análisis de los perfiles electroforéticos.	187
M.3. 8.c)-1-De las proteínas producidas en cultivo con precursores radiactivos.	187
M.3. 8.c)-2-De los fluidos epididimarios y del extracto salino de espermatozoides.	188
M.3. 9.Determinación del Peso Molecular.	190
M.3.10.Determinación del Punto isoeléctrico.	193
M.3.11.Presencia de azúcares.	194
M.3.12.Obtención y parcial caracterización de un antisuero obtenido a partir de extracto salino de espermatozoides.	
M.3.12.a)Obtención del antígeno.	195
M.3.12.b)Inmunización.	196
M.3.12.c)Verificación del título del antisuero.	196
M.3.12.d)Obtención y purificación parcial del antisuero.	197

M.3.12.e) Adsorción del antisuero.	197
M.3.12.f) Inmunolectroforesis.	198
M.3.12.g) Inmunoadsorción de proteínas específicas epididimarias sintetizadas en cultivo.	199

## RESULTADOS

R.3.1. Identificación de proteínas epididimarias sintetizadas en cultivo de órgano.	201
R.3.2. Carácter secretorio.	209
R.3.3. Análisis electroforético de los fluidos epididimarios y del extracto salino de espermatozoides.	211
R.3.4. Determinación del Peso Molecular de las proteínas específicas epididimarias andrógeno-dependiente.	213
R.3.5. Determinación del Punto Isoeléctrico de las proteínas específicas epididimarias andrógeno-dependientes.	215
R.3.6. Presencia de azúcares en las proteínas específicas epididimarias.	217
R.3.7. Caracterización del antisuero obtenido con extracto salino de espermatozoides	
R.3.7.a) Inmuno difusión bidimensional.	219
R.3.7.b) Inmunolectroforesis.	220
R.3.7.c) Inmunoadsorción de proteínas específicas epididimarias sintetizadas en cultivo.	221

DISCUSION	224
-----------	-----

CONCLUSIONES	239
--------------	-----

APENDICE	250
----------	-----

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

AGRADECIMIENTOS

## INTRODUCCION

### Breve descripción del aparato genital masculino

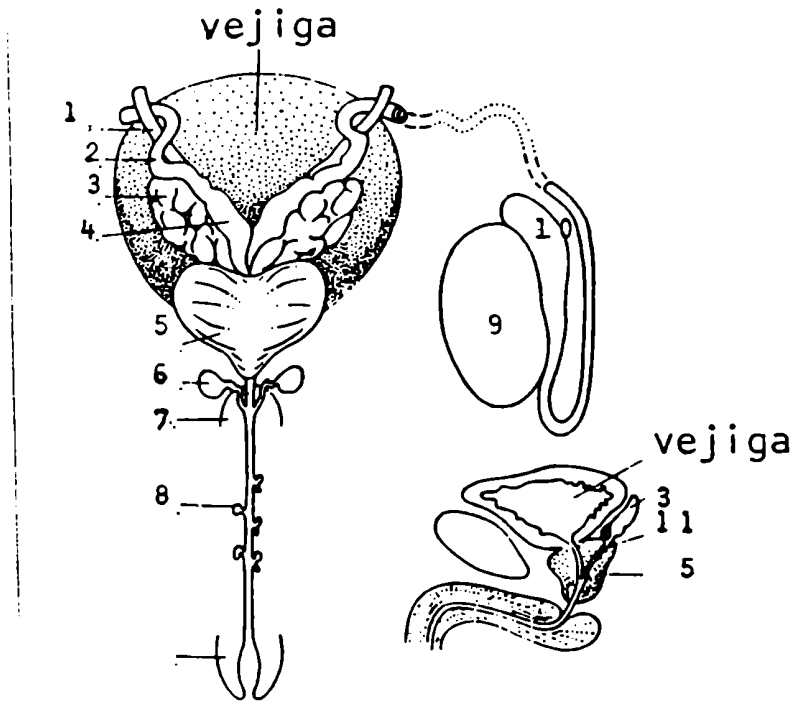
El aparato genital masculino está formado por una serie de estructuras funcionalmente especializadas encargadas de la producción, transporte y almacenamiento de espermatozoides capaces de interactuar con la gameta femenina para dar origen a un nuevo individuo. Sus componentes son un par de gonadas, los testículos; un conjunto de glándulas, y un sistema de conductos.

La FIGURA 1 muestra un esquema del aparato genital masculino, donde se observan los distintos componentes.

El testículo es una glándula ovalada, ubicada en el escroto, recubierta por una cápsula de tejido conectivo denominada túnica albugínea. En su parénquima se pueden diferenciar dos zonas estructuralmente distintas y de funciones específicas:

\*Los túbulos seminíferos, cuyo epitelio presenta dos tipos celulares: las células germinales, que darán origen a las gametas masculinas a través de un proceso denominado espermatogénesis (1), y las células de Sertoli,

FIGURA 1



Representación esquemática del aparato genital masculino en el hombre adulto.

1)uréter; 2)conducto deferente; 3)vesícula seminal;  
4)ampolla; 5)próstata; 6)glándula de Cowper; 7)bulbo cavernoso; 8)glándula de Littre; 9)testículo; 10)epidídimo; 11)conducto eyaculatorio. (Obtenido de: Male Accessory Sex Organs. Brandes D. (editor); pp.10 (1974)).

responsables de funciones nutritivas (2,3 ), fagocitarias (4,5) y de síntesis de una proteína transportadora de andrógenos denominada ABP (androgen binding protein) (6), entre otras.

\*El intersticio, muy irrigado, donde se encuentran las células de Leydig que producen y segregan andrógenos, proceso dependiente de las hormonas luteinizante (LH), con la acción sinérgica de otras hormonas como la folículo estimulante (FSH) y prolactina (7,8,9).

Los espermatozoides formados en los túbulos seminíferos son transportados por unos túbulos pequeños llamados túbulos rectos que convergen en la rete testis, de donde parten los conductos eferentes que se extienden hasta desembocar en la porción inicial del epidídimo.

Según se ha descrito en animales experimentales, inicialmente los conductos eferentes están ligeramente contorneados; inmediatamente antes de ingresar en el epidídimo se transforman en altamente contorneados para formar el bulbo denominado coni vasculosi y desde éste extenderse via un estrechamiento para abrirse en el conducto epididimario. Benoit (10) , y posteriormente Reid y Clealand (11), sostuvieron que en muchas especies los conductos eferentes se transforman en un conducto único que

se une al conducto epididimario. Sin embargo, este hecho no se ha verificado en el hombre.

En los conductos eferentes el epitelio es prismático y consiste en una capa simple de células. Dos tipos celulares están presentes, uno ciliado y otro con microvellosidades; se agrupan de acuerdo a su tamaño, con el resultado que grupos de células mayores alternan con grupos de células menores, disposición que da el aspecto irregular y estrellado, característico del lumen de este conducto. El diámetro del lumen encontrado en la sección de los conductos eferentes próxima al epidídimo prácticamente no varía respecto de este último (12).

El epidídimo está comprendido por un único conducto altamente contorneado, rodeado por una cantidad variable de tejido adiposo. Se encuentra apoyado estrechamente sobre el borde póstero-superior del testículo y se une a éste a través de la túnica albugínea, comunicándose por su extremo superior con los conductos eferentes y continuándose en su extremo distal con el conducto deferente, el que se extiende hasta el cuello de la vesícula seminal. Posteriormente se presenta una descripción detallada de las características histológicas epididimarias.



El epitelio del conducto deferente es columnar, pseudo-estratificado, con estereocilias; la mucosa forma pliegues longitudinales muy altos responsables de las formas irregulares estrelladas observadas en secciones histológicas (13).

Luego de unirse al cordón espermático el conducto entra en la cavidad pélvica y se fusiona con el cuello de la vesícula seminal para formar el conducto eyaculatorio.

La porción terminal muy dilatada es conocida como la ampolla. Su secreción tiene alto contenido en ergotioneina, un material soluble en etanol que contiene ácido siálico y en el hombre contiene además fructosa y un alto contenido en fósforo dado por los niveles de glicerofosforilcolina (13).

Las vesículas seminales son dos sacos lobulados membranosos, con epitelio pseudoestratificado; la mucosa forma un intrincado sistema de pliegues que se proyectan en el lumen y anastomosan para dar lugar a cavidades de diversos tamaños. Contribuyen con una porción substancial del eyaculado, con notable concentración de sustancias reductoras, principalmente ácido ascórbico, ergotioneina y fructosa; también con prostaglandinas (E1 y E2), glicoproteínas e iones ( $K^+$  y  $PO_4^{-3}$ ).

La próstata es un órgano compacto que se encuentra en contacto con la superficie inferior de la vejiga. La uretra entra a la próstata a través de su superficie posterior cerca de su borde anterior y deja la glándula cerca de su ápice. Los dos conductos eyaculatorios penetran la glándula a través de su superficie posterior cerca de su borde superior y terminan en la pared posterior de la uretra. El fluido prostático es rico en enzimas proteolíticas y prácticamente carece de azúcares reductores. Los componentes típicos son el ácido cítrico y la fosfatasa ácida y el zinc, así como colesterol, aminoácidos y fosfolípidos.

Las glándulas de Cowper o bulbouretrales poseen una organización túbulo-alveolar; el epitelio glandular varía con la edad y el estado funcional. Su secreción es rica en albúmina y mucopolisacáridos.

Las glándulas uretrales o de Littre son múltiples glándulas mucosas abiertas a la porción cavernosa de la uretra.

Los órganos accesorios del aparato genital masculino dependen de una continuada estimulación androgénica para la preservación de su estructura normal y para el

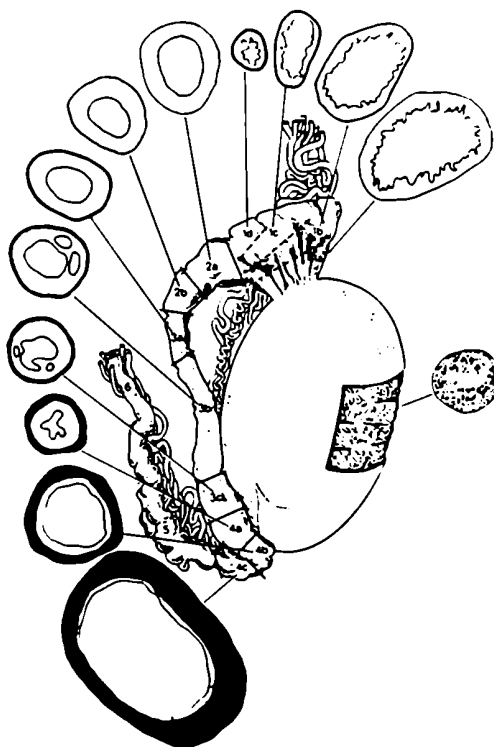
mantenimiento de su integridad funcional. La deprivación androgénica causada por orquidectomía, hipofisectomía y otros procedimientos como la administración de estrógenos, induce a una involución estructural y disminuye su actividad funcional. La terapia androgénica de reemplazo produce la restitución de las propiedades funcionales de las glándulas accesorias; además, los componentes estructurales de las células encargadas de producir tales actividades bioquímicas son rápidamente reconstituidos.

Descripción anatómica e histológica del epidídimo humano.

Si bien los anatomistas distinguen tres regiones: el CAPUT región proximal al testículo, el CORPUS y el CAUDA, éstas no corresponden necesariamente a la misma región en las distintas especies.

Usando la altura y características de las células principales, Holstein ha descrito en el hombre 8 zonas histológicas (14), correlacionables con las tres regiones mencionadas inicialmente, separadas por zonas de transición. En la FIGURA 2 se representan las distintas zonas descriptas.

FIGURA 2



- /1a-d Ductuli eferente; 2a-b Ductuli epididimario / CAPUT
- /3a-c Ductuli epididimario / CORPUS
- /4a-c Ductuli epididimario/ CAUDA
- /5 Ductus deferente/ pars epididimica
- /6 Ductus deferente / pars libera

Diagrama de testículo y epidídimo humanos.

El esquema corresponde a la descripción de Holstein (14). La representación de la sección transversal de los diferentes segmentos epididimarios muestra las diferencias regionales en las características del epitelio y lumen. El contorno negro refleja la capa muscular. (Obtenido de: Techniques of human andrology. Hafez, E.S.E. (editor); pp.60 (1977)).

La estructura del epidídimo humano no difiere en gran medida de la observada en otras especies; sin embargo no se conoce en detalle. Si bien existen numerosas descripciones a partir de estudios de microscopía óptica, poco es lo que se ha estudiado de su ultraestructura.

El epitelio del conducto epididimario humano es de tipo prismático pseudoestratificado. Se han descrito varios tipos celulares. Entre ellos se encuentran:

Células basales: poseen forma piramidal y su altura es de alrededor de 25  $\mu\text{m}$ . El núcleo es oval o cónico, conteniendo uno o dos nucleolos; la cromatina es finamente granular; se encuentran grandes inclusiones intranucleares (15,16). En la membrana celular, en el polo apical, aparecen pliegues estrechos y profundos con estructuras similares a las de la membrana de las células principales. El citoplasma es bastante pobre en organelas. Empleando microscopía electrónica se observan retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y mitocondrias; también aparecen algunas vacuolas e inclusiones. Frecuentemente pueden observarse ramilletes de microfilamentos distribuidos en el citoplasma. Las células basales, idénticas a lo largo del conducto epididimario, no presentan evidencias morfológicas para asignarles una función precisa (12).

Células principales: son mucho más numerosas, altas y prismáticas. En el CAPUT epididimario, región proximal al testículo, alcanzan su altura máxima cercana a los 120  $\mu\text{m}$ , mientras el diámetro no excede los 10  $\mu\text{m}$ . En el CORPUS la altura media es de 80  $\mu\text{m}$  y en el CAUDA es menor que 50  $\mu\text{m}$  (17). Estos datos incluyen las estereocilias, las que pueden superar un tercio del largo total de la célula del CAPUT. Estos son procesos citoplasmáticos no móviles desprovistos de corpúsculos basales. Tienen un esqueleto microfibrilar arraigado profundamente en el citoplasma adyacente. El núcleo está situado en la mitad inferior de la célula, es elongado, de forma oval y orientado en el eje mayor de la célula; contiene 1 o 2 nucleolos prominentes, y la cromatina es fina y dispersa; se pueden observar inclusiones granulares o filamentosas. La localización de organelas citoplasmáticas es similar en todas las regiones del epidídimo, variando solamente en su cantidad relativa de uno a otro segmento. En la región caudal las involucradas en mecanismos secretorios son menos visibles. La región subnuclear está tapizada con retículo endoplásmico rugoso. Algunas de las células desarrollan muchas mitocondrias en la región basal, lo cual está probablemente relacionado con una actividad reabsortiva. La región supranuclear tiene una notable cantidad de

aparato de Golgi; la gran parte del complejo de Golgi está localizado en la vecindad del núcleo. El epitelio del CAPUT se caracteriza por presentar permeabilidad selectiva, la que podría estar dada por las estrechas uniones entre las células (18,19). Variaciones topográficas en las células principales no son tan obvias en el hombre como en otras especies animales tales como la rata o ratón (17, 20, 21). El cambio más notable es la progresiva reducción de la altura celular desde el CAPUT hacia el CAUDA epididimario. Esa disminución del tamaño podría ser causado por la presión de los espermatozoides y el fluido acumulado (22).

Se han descrito otros tipos celulares. Martan y colaboradores (23), empleando métodos histoquímicos, describen un tipo celular que consideran idéntico a las células apicales y claras descritas en otras especies.

La transición entre la región caudal epididimaria y el conducto deferente es progresiva y no presenta cambios notables en la organización del epitelio.

El epidídimo humano está cubierto de una lámina muy vascularizada de tejido conectivo (albugínea) que produce un engrosamiento del órgano logrando una apariencia pseudotubular.

En la región del CAPUT y en la parte proximal del CORPUS se observan también células contráctiles dispuestas en forma idéntica a la descrita en los conductos eferentes. En la porción inferior de CORPUS aparecen células típicas de tejido muscular liso, las que finalmente reemplazan en su totalidad a las contráctiles en el CAUDA y se continúan en el conducto deferente.

Se ha mencionado que el diámetro del lumen de las secciones de conducto eferente cercanas al epidídimo no varía respecto de este último. En el CAPUT epididimario sufre un débil incremento y no varía mucho en la región del CORPUS epididimario. En la región caudal el lumen está considerablemente ensanchado y de forma irregular. Progresivamente toma una apariencia estrellada, característica del conducto deferente.

La capacidad absortiva del epitelio de los segmentos epididimarios ha sido descrita en gran variedad de especies (24,25,26) Más del 90 % del fluido testicular es reabsorbido por los conductos eferentes y por la primera parte del epidídimo, a través del clásico mecanismo de micropinocitosis. El fenómeno de absorción es un aspecto importante del control epididimario del medio intraluminal (27). A partir de estudios realizados empleando u



trazador inyectado en el lumen se determinó la presencia de cuerpos multivesiculares, característicos por contener en su matriz enzimas digestivas proteolíticas e hidrolíticas (17). Sin embargo el hallazgo de un número y distribución similar a lo largo del conducto epididimario no indicaría la existencia de una región preferencial relacionada con la absorción (21). Por otra parte, estudios autorradiográficos realizados en la rata, permitieron determinar que las células claras contienen receptores para aldosterona, sugiriéndose una participación en el proceso de reabsorción de líquido e iones. Con respecto a la regulación hormonal, se ha observado que tanto en el CAPUT (28) como en el CAUDA (29,30) el fenómeno de absorción esta sometido a control androgénico.

El proceso de maduración del espermatozoide.

Se define proceso de maduración del espermatozoide al conjunto de cambios bioquímicos, estructurales y funcionales que sufre la gameta masculina y que culminan con la adquisición de capacidad fertilizante.

La idea de que los espermatozoides sufren una maduración funcional durante su tránsito por el epidídimo data de 1888 (31 ). Poco tiempo después Hammar demostró la

existencia de un incremento gradual de la motilidad de los espermatozoides a través del epidídimo (32).

Las primeras suposiciones sobre la existencia de dicho proceso fueron confirmadas por Young en 1931, quien observó en el cobayo un aumento en el porcentaje de hembras preñadas luego de la inseminación de espermatozoides de cauda distal respecto del obtenido con espermatozoides del cauda proximal (68 vs. 33%) (33). Young concluyó que los cambios funcionales del espermatozoides en su pasaje por el epidídimo no eran atribuibles a alguna acción específica del epidídimo, ni a factores testiculares, sino que eran determinados por la edad del espermatozoide.

Estas conclusiones se oponían a las evidencias obtenidas por Van Der Stricht (34), y posteriormente Benoit (10), quienes atribuían la función de maduración a secreciones epididimarias dependientes de la hormona testicular.

La andrógeno dependencia del proceso de maduración luego fue demostrada en numerosas especies (35, 36, 37).

La adquisición de capacidad fertilizante como resultado de la maduración, se ha demostrado en numerosas especies, entre las que se pueden mencionar conejo (38,39),

cobayo (33), hamster (40) , rata (41), cerdo(42), toro (43) y carnero (44). Este fenómeno se produce en un segmento epididimario denominado segmento de transición, específico para cada especie.

Uno de los cambios asociados temporalmente a la maduración es la adquisición de motilidad progresiva , capacidad que se alcanza durante el tránsito por el conducto epididimario. Hammar (32) y luego Tournade (45) observaron que la motilidad se modificaba cuali y cuantitativamente durante la maduración. Así, los espermatozoides del CAFUT se mueven débilmente in situ en forma circular(41,46) , mientras que los espermatozoides caudales se desplazan vigorosamente con movimiento progresivo y direccional. A diferencia de otras especies, los espermatozoides humanos no parecen pasar a través de una actividad de fase circular a progresional. Aunque no se conocen los cambios involucrados en la adquisición de motilidad, estos podrían estar relacionados con cambios en la estructura flagelar, dados por modificaciones en el estado de oxidación de grupos sulfhidrilo (SH) del espermatozoide (47,48) y aumento de puentes disulfuro (S-S) y fosforilación de microtúbulos (49), estabilizantes celulares responsables de modelar la forma y amplitud del movimiento flagelar. Conjuntamente, cambios bioquímicos

asociados a niveles de AMFc podrían correlacionarse con cambios en la motilidad espermática (50,51) . Finalmente , factores provenientes del plasma seminal podrían ser responsables de la motilidad . Así, Lindhomer en el hombre (50) y Hoskins (51) en el carnero, presentaron evidencias de tal participación. Hoskins (52) caracterizó un factor que denominó glicoproteína EMP (proteína de motilidad progresional), que podría ser el factor responsable de la motilidad. Sin embargo, el desarrollo de motilidad normal no es directamente correlacionable con adquisición de capacidad fertilizante; ya que en el conejo se encontró que espermatozoides retenidos en segmentos proximales adquieren motilidad progresional pero no capacidad fertilizante (39,53):

Numerosos cambios metabólicos pueden asociarse a la maduración de espermatozoides. La actividad biosintética de los espermatozoides es baja (54,55). Estudios de marcación isotópica con aminoácidos precursores han permitido considerar que la maquinaria de síntesis proteica se localizaría en las mitocondrias (56), aunque también se ha determinado que en cantidad es bastante limitada. Por otra parte, a medida que transitan por el epidídimo las actividades glicolítica y respiratoria aumentan (57). Numerosos componentes contenidos en el fluido epididimario

podrían estar involucrados en la actividad metabólica (58,59,60,61), participación que se mencionará detalladamente en otra sección de la introducción.

Entre los cambios estructurales más notorios asociados al proceso de maduración se observó, por microscopía óptica, migración de la gota citoplasmática y reducción de las dimensiones del acrosoma durante el pasaje por el epidídimo en numerosas especies (63,64). Por otra parte, aunque la apariencia estructural del núcleo permanece constante, existe una continuada reducción de la reactividad al Feulgen en los espermatozoides madurantes, debido al constante incremento de formación de uniones disulfuro entre proteínas de la cromatina (48,65).

La membrana plasmática del espermatozoide sufre profundas modificaciones durante el pasaje por el epidídimo. Numerosas técnicas han permitido avanzar en el conocimiento de esos cambios; entre ellas, localización histoquímica de glicoproteínas, identificación de residuos de azúcares terminales en oligosacáridos de superficie, localización de sitios de unión a lectinas, determinación de densidad de sitios acídicos negativos por unión a partículas coloidales, así como marcación, aislamiento y caracterización de proteínas de superficie de

espermatozoides.

Las primeras evidencias de modificaciones a nivel de la membrana plasmática fueron determinadas al observar un incremento en la carga negativa en espermatozoides en su pasaje por el epidídimo (66), hallazgo determinado en numerosas especies, incluyendo el hombre (48). Probablemente, tanto glicoproteínas como glicolípidos serían transportadores de distintos residuos acídicos responsables de la carga negativa de superficie (67,68). La existencia de glicoconjugados de superficie y su cambio durante la maduración se ha demostrado empleando técnicas citoquímicas (68), de aglutinación (69) y tratamiento con lectinas marcadas (70).

#### Participación del epidídimo en el proceso de maduración

Si bien los espermatozoides presentan una débil capacidad de unión de andrógenos (71), no se han encontrado receptores androgénicos en los mismos (78).

En los últimos 20 años se han realizado numerosos estudios con el objeto de determinar cuáles son los factores involucrados en el proceso de maduración y qué papel cumple cada uno de ellos. Numerosos compuestos, cuya

participación a distintos niveles en la maduración de espermatozoides se presume, han sido identificados. Entre ellos se pueden mencionar:

Carnitina:

La formación de acil ésteres de carnitina ( ácido hidroximetil amino butírico) es un paso obligatorio en el transporte de ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial (73). La presencia de altas concentraciones de L-carnitina en el tejido epididimario y en el fluido luminal del epidídimo de la rata (58,74) y hamster (75) , que se modifican con el estado androgénico, y la actividad de la enzima acetiltransferasa en espermatozoides fueron indicativos de un posible rol de la carnitina en la fisiología masculina.

Muchos grupos han medido las concentraciones de carnitina en el fluido seminal humano (76,77,78) para evaluar la función epididimaria, concluyendo que contienen carnitina libre, acilcarnitina de cadena corta, y un derivado altamente polar no identificado.

Al igual que en la rata y en el hamster la carnitina se encuentra en altas concentraciones en el epidídimo humano siendo diez a quince veces mayor que las

correspondientes al plasma (79 ). Esto es el resultado de la captación selectiva de carnitina circulante por el tejido epididimario (6).

Si bien su función no ha sido determinada, estaría estrechamente relacionada con el fenómeno de fertilidad. Como consecuencia de la acumulación de carnitina durante la maduración, las células tendrían una capacidad incrementada para obtener energía a partir del metabolismo, la cual sería usada para sostener la motilidad luego de la eyaculación (80). Por otra parte, los altos niveles de acilcarnitina servirían como fuente de energía de los espermatozoides a medida que transitan por el epidídimo.

#### Glicerilfosforilcolina (GPC):

Dawson y colaboradores (59) fueron los primeros en notar el alto contenido de GPC en el epidídimo y sus observaciones han sido confirmadas y extendidas por numerosos investigadores.

El papel fisiológico de GPC en el plasma epididimario es desconocido. Tendría una función estabilizante de la membrana plasmática de los espermatozoides y en el mantenimiento del balance de presión osmótica en el lumen cuando el NaCl es absorbido (81). Brooks y colaboradores



(82) sugieren que los altos niveles de GPC podr ían reflejar un producto secundario de la oxidación de ácidos grasos derivados de la degradación de lecitina.

#### Ácido siálico y glicoproteínas

El ácido siálico, generalmente unido a proteínas, es un importante componente del epidídimo (61). Estudios bioquímicos no han podido mostrar su producción específica por las células epiteliales.

Los niveles presentes en tejido y fluidos, tanto libre como unido, varían con la especie y en la mayoría de los casos no es posible correlacionarlo con el estado hormonal del órgano (83,84).

Numerosas evidencias se han acumulado demostrando la participación del epitelio epididimario en la síntesis de proteínas específicas, a través de estudios de incorporación de precursores marcados con isótopos radiactivos y posterior análisis de los productos formados (85,86,87). El carácter glicosilado de esas entidades fue sugerido por investigaciones realizadas a fines de la década del 60, y que continúan hasta el presente. En 1966 Neutra y Leblond encontraron que, luego de la administración de [<sup>3</sup>H]galactosa, la marcación se localizaba

en el aparato de Golgi de las células epiteliales de epidídimo de rata y posteriormente sobre la superficie luminal de las células, lo cual sugería su carácter secretorio (88). Tres años más tarde, Fleischer y colaboradores (89) describieron una apreciable actividad de la enzima galactosiltransferasa en aparato de Golgi aislado de epidídimo de toro .

investigaciones realizadas condujeron a la identificación, y en muchos casos a la caracterización, de glicoproteínas específicas en el epidídimo de la rata (90), conejo (91), hamster (92), toro (93) y carnero (94), a través de estudios que se comentarán más adelante.

Evidencias de la existencia de un proceso de maduración en el hombre

Dificultades éticas y técnicas han impedido el conocimiento en detalle de un proceso de adquisición de capacidad fertilizante por el espermatozoide en el hombre, similar al descrito en animales de experimentación.

Las primeras evidencias de cambios en el espermatozoide humano a lo largo de su pasaje por el epidídimo fueron descritas por Belonoschkin (95), y Bedford y colaboradores (48), quienes examinaron la

motilidad de espermatozoides provenientes de distintos segmentos, y encontraron una capacidad aumentada para la motilidad progresiva a lo largo del pasaje por el epidídimo.

Sin embargo se ha mencionado que los cambios en la motilidad no pueden ser asociados directamente con cambios en la habilidad fertilizante (39,53).

En su estudio, Bedford y colaboradores comunicaron que, si bien no observaban modificaciones en la forma del acrosoma en los espermatozoides de distintos segmentos, la cromatina nuclear, el material perinuclear y membranas de organelas de la pieza principal y de la cola se estabilizarían por la formación de puentes disulfuro durante el pasaje por el epidídimo. Además observaron un desarrollo en la capacidad de unir partículas de óxido férrico coloidal cargadas positivamente, indicando un cambio apreciable en la conformación química de la superficie celular del espermatozoide durante el tránsito por el epidídimo.

Sin embargo Young (96) había descripto fertilidad en pacientes con anastomosis entre el conducto deferente y la región del CAPUT epididimario por azoospermia obstructiva, lo cual sugería que los espermatozoides humanos de los

segmentos proximales eran fértiles, hecho poco probable si el hombre presentaba un comportamiento similar al de los animales de experimentación (97,98).

En 1980, Hinrichsen y Blaquier (99) evaluaron la capacidad de espermatozoides epididimarios humanos de penetrar ovocitos, empleando un ensayo en el que se utilizaron ovocitos de hamster desprovistos de zona pellucida. Los espermatozoides fueron obtenidos de las regiones del CAPUT, CORPUS y CAUDA epididimarios. Los resultados mostraron un aumento gradual en la capacidad de unión estrecha de los espermatozoides con los ovocitos y capacidad de penetración solo para los espermatozoides recobrados del segmento caudal epididimario. Estos hallazgos sugirieron la existencia en el hombre de un fenómeno similar al descrito en animales de experimentación. Estos resultados fueron posteriormente confirmados y ampliados por Moore y colaboradores (100)

De estos resultados se infiere la existencia de un proceso de maduración en el epidídimo humano. Sin embargo, los éxitos obtenidos por el tratamiento quirúrgico de las obstrucciones hacen suponer una cierta plasticidad en la función del órgano, tal que en determinadas circunstancias segmentos proximales puedan suplir la función normalmente

desarrollada por células de segmentos más distales.

El epidídimo como órgano efector de andrógenos

Numerosas investigaciones han sido dirigidas al conocimiento del mecanismo de acción de los esteroides en los tejidos blancos de esas hormonas. Las evidencias obtenidas condujeron a postular la existencia de un mecanismo general que incluye una serie de eventos, los cuales se enumeran a continuación:

a) Transporte de andrógenos al epidídimo

Los andrógenos son sintetizados por las células de Leydig en el compartimiento intersticial del testículo y secretados al fluido intersticial. Desde allí pueden llegar al epidídimo por el túbulo seminífero transportados en el fluido de la rete testis a través del conducto eferente hasta el epidídimo, por vía sanguínea pasando de la vena espermática a través del plexo pampiniforme a la arteria que irriga el epidídimo, o por vía linfática.

Dentro de la corriente sanguínea los esteroides sexuales circulan unidos a distintas proteínas. Los primeros datos mostrando la existencia de proteínas ligadoras de andrógenos de alta afinidad y baja capacidad

fueron reportados por Mercier y colaboradores (101).

En el hombre muchas proteínas pueden unir andrógenos en el plasma. Entre ellas se encuentran la  $\alpha_1$  glicoproteína ácida (AAG) la transcortina; la albúmina; la SHBG ( $\beta$ -globulina o proteína ligadora de esteroides sexuales) o TeBG (proteína ligadora de testosterona). La última se caracteriza por unir solo 17 hidroxisteroides tales como T, DHT y androstandiol y, en menor medida estradiol (102,103,104). Los esteroides conjugados no se unen apreciablemente a las proteínas; esto podría explicar su mayor tasa de depuración. Si bien su función no se conoce, se atribuye a estas proteínas la capacidad de transporte de las hormonas en forma inactiva; por otra parte, la unión de los andrógenos a las proteínas los protegería de la acción enzimática actuando de esa forma como reservorio hormonal; finalmente la diferencia entre la capacidad de unión con los esteroides conjugados estaría relacionada con su eliminación renal, captación y metabolismo hepático.

En condiciones normales, la albúmina y TeBG son las proteínas que contribuyen mayormente a la fracción de andrógenos unida a transportadores. Los niveles de TeBG estarían determinados según la relación entre los niveles de estrógenos y andrógenos, de forma tal que la

administración de estrógenos produciría un aumento de niveles de TeEG, resultado obtenido en pacientes con carcinoma prostático sometidos a terapia estrogénica (105) que confirman resultados anteriores (106,107). Sin embargo no se sabe si dicho incremento es producido por los niveles de estrógenos o por los bajos niveles de andrógenos .

Solo una pequeña fracción de las hormonas circulan en forma libre, no ligada a proteínas plasmáticas; ese porcentaje remanente sería el responsable de la acción biológica de la hormona.

Las primeras indicaciones de la existencia de andrógenos en el fluido epididimario fue la observación de

Puntriano (108); subsecuentemente Breuer (109) identificó epiandrosterona y etiocolanolona en fluido epididimario de toro.

El grado en que los andrógenos son retenidos en los túbulos seminíferos y el epidídimo podría depender de la presencia de componentes ligadores en el compartimiento tubular que tendrían una importante función en la distribución de los andrógenos en ese compartimiento.

Los fluidos testiculares de muchos animales y el hombre han mostrado contener una proteína específica ligadora de andrógenos (ABP; androgen binding protein), que posee una alta afinidad por DHT y T. La síntesis de ABP por las células de Sertoli es estimulable tanto por FSH (110,111,112) como por T (113,114). Sin embargo, aún no es clara la importancia relativa de ambos estímulos. Si bien su función no ha sido aun establecida, Hansson y colaboradores (115) han propuesto que, dada su capacidad de unir andrógenos, la ABP podría constituir un medio de transporte para los mismos hacia el epidídimo. Este hecho se correlacionaría con las altas concentraciones de andrógenos necesarias para la maduración de los espermatozoides epididimarios y los altos niveles de esta proteína en el fluido de los segmentos proximales (116). Por otra parte, dada la gran concentración de andrógenos en los conductos eferentes, sería necesario algún mecanismo de protección a la inmediata resorción y metabolismo de las células epiteliales, protección que podría ser provista por la ABP. Sin embargo, Van der Molen (117), basándose en consideraciones de volumen y flujo en los distintos compartimientos, no ha considerado posible la regulación por parte de la ABP de los niveles de andrógenos libres. Estos autores sostienen que la capacidad de unión de la



proteína y su constante de disociación (2 nM), no son suficientes para regular niveles intratesticulares del orden de 20 a 60 nM, los cuales variarían en forma independiente de la presencia de la ABP, considerando que quizá el complejo ABP-DHT podría poseer algún efecto sobre las células germinales. Los investigadores coinciden en que los niveles de ABP testiculares y epididimarios constituyen un buen parámetro para evaluar la funcionalidad de la célula de Sertoli, dando una idea de posibles alteraciones de la regulación hormonal de la espermatogénesis.

La dificultad de la descripción y caracterización de la ABP en la especie humana está dada por la gran similitud entre ésta y la TeBG. En el testículo humano Gulizia y colaboradores han descrito un método para separar ABP y TeBG (118); por otra parte, Goldstein y col. (119) consideran a ambas como proteínas con propiedades físicas e inmunológicas similares, lo cual concuerda con estudios previos (120).

En el epidídimo humano, Furvis y col. (121) y Lipshultz y col. (122) demuestran actividad ligadora de andrógenos similar al ABP; sin embargo el último indica que dada la similitud en las características fisicoquímicas con

la TeBG, no pueden asegurar que ambas existan como entidades separadas.

#### b-Captación de andrógenos

La rápida difusión de las hormonas esteroideas a través de la membrana celular no necesariamente implica la existencia de algún mecanismo para transportarlas al interior de la célula. En general, las hormonas penetran libremente al interior de la célula a favor de un gradiente de concentración. En los tejidos no efectores la hormona pasa a través de la membrana celular en ambas direcciones y su concentración en el interior de la célula no excede la del medio extracelular. En los tejido blanco, las moléculas difunden al interior pero pocas hacia el exterior, con lo cual la concentración intracelular aumenta (123).

Este fenómeno de retención es debido a la existencia, en el medio intracelular, de moléculas con alta afinidad y velocidad de asociación a la hormona, denominadas receptores hormonales.

Sin embargo, la idea de la entrada de la hormona en forma pasiva en favor de un gradiente de concentración sería cuestionada por algunos grupos de trabajo, los que

sostienen la hipótesis de la existencia de un transporte facilitado de la hormona al interior de la célula (124,125,126). Sumado a eso, tampoco deben olvidarse las evidencias en favor del efecto directo de algunos esteroides sobre la membrana plasmática (127,128,129), que podría ser indicativo de la presencia de receptores hormonales esteroideos en la superficie celular.

#### c-Metabolismo de andrógenos en el epidídimo

En contraste con el ovario o las glándulas adrenales, en los que las principales esteroides secretados a la sangre actúan en la célula efectora como hormonas biológicamente activas, la testosterona producida por el testículo sirve como precursor circulante para la formación in situ de la hormona androgénica activa,  $5\alpha$  dihidrotestosterona. Esta se forma por la reducción irreversible de T, y se encuentra involucrada en acciones diferenciativas (130), de crecimiento (131) y funcionales (132).

La transformación de T a DHT es catalizada por la enzima  $\Delta^4$ -3 cetoesteroide  $5\alpha$  reductasa ( $5\alpha$  reductasa), específica para  $\Delta^4$ ,3 cetoesteroides que no contienen sustitución en C11.

Tanto en tejidos de mamíferos como en bacterias, la enzima se encuentra asociada a la membrana nuclear (133, 134) o en aquellas recuperadas en el precipitado de la centrifugación a alta velocidad, conocida como fracción microsomal. Se caracteriza por tener un absoluto requerimiento de NADPH, el que provee un hidrógeno sobre el carbono 5 del esteroide, uniéndose al carbono 4 un hidrógeno proveniente del medio acuoso (135).

de Larminat y colaboradores describieron las características cinéticas para la actividad 5 $\alpha$ reductasa en epidídimo de rata (137), mono (138) y hombre (139).

En un estudio comparativo realizado sobre 11 especies, Gloyna y Wilson (140) concluyeron que la actividad 5 $\alpha$  reductasa en el epidídimo de rata se encontraba en segundo término en importancia luego de la descrita para la próstata, mientras en ratón, cobayo, gato y toro la actividad enzimática epididimaria era la más importante.

En animales de experimentación se ha descrito que la actividad enzimática esta sujeta a control androgénico. Shimazaki y colaboradores (141, 142) y Moore y Wilson (133) demostraron que la actividad en la próstata ventral de rata caía luego de la castración, restaurándose por la

administración de andrógenos. El control androgénico de la actividad también ha sido descrito en el epidídimo de rata (143).

Estudiando el metabolismo androgénico en el hombre Sulkova y Starka (144), encontraron que, mientras en el testículo las actividades de las enzimas 17 hidroxisteroide deshidrogenasa, 3 hidroxisteroide deshidrogenasa y 4,5 isomerasa eran las más importantes, la actividad enzimática predominante en el metabolismo androgénico en epidídimo humano se asociaba a la 5 $\alpha$  reductasa.

La actividad de esta enzima ha mostrado ser de fundamental importancia en el epidídimo, el cual aparentemente utiliza DHT como hormona fisiológicamente activa.

La reducción de T a DHT conduce a la producción de un metabolito con mayor potencia como andrógeno que su precursor no reducido. Una razón para explicar tal efecto podría ser la incapacidad de la DHT como sustrato para la formación de estrógenos. Sin embargo, la razón quizá más importante sería que la producción de DHT implicaría la formación de un metabolito con alta afinidad por los receptores intracelulares, siendo el efecto neto la

promoción de la difusión de T dentro de la célula con la posterior concentración del metabolito en el medio intracelular (145).

Conjuntamente con la DHT, otros metabolitos de T podrían mediar la acción de los andrógenos. La enzima 3 ( $\alpha, \beta$ ) hidroxiestroide óxido-reductasa cataliza la reducción del grupo cetónico localizado en la posición 3 del anillo A de la T, con formación de 3 ( $\alpha, \beta$ ) androstandioles. La enzima utiliza sustratos que previamente han sido  $5\alpha$  reducidos, siendo la DHT el intermediario natural; se encuentra presente en numerosos tejidos, se localiza en la fracción citosólica, y requiere NADPH o NADH como cofactor (145).

La función específica de los 3 dioles aún no ha sido determinada. Si bien Bruchovsky (131) ha descrito que luego de la administración de 3,17 diol radiactivo, el principal metabolito recobrado era DHT. La importancia de ambos metabolitos  $5\alpha$ reducidos, DHT y Dioles fue descripta por Lubicz-Nawrocki (146) quien mostró que ambos eran más efectivos que T para el mantenimiento de maduración de espermatozoides y sobrevida en animales castrados.

Los andrógenos son aromatizados a estrógenos en tejidos periféricos de ambos sexos. Estos en algunas instancias actúan concertadamente con los andrógenos influyendo en procesos fisiológicos, aunque además ejercen efectos individuales en la función celular y en algunas ocasiones, tienen efectos opuestos a los andrógenos.

La administración de estrógenos para obtener un efecto antiandrogénico en el tratamiento del carcinoma de próstata, produce una reducción significativa de los niveles de T y DHT presentes en testículo y epidídimo (147).

El efecto inhibitorio de la terapia con estrógenos en la producción de andrógenos in vivo e in vitro por el testículo humano ha sido claramente demostrado en el pasado (148,149,150,151,152). Sin embargo aún no es claro si este efecto es directo sobre el testículo por inhibición competitiva de una reacción importante en la vía biosintética, o si la acción es indirecta por supresión de gonadotrofinas debido a un efecto de retroalimentación negativa (153,154).

En relación a ello, a fines de la década del 70 Bird y colaboradores describieron la disminución de los niveles de T plasmática (155) y confirmaron el descenso también

encontrado en la excreción urinaria (155,156) como resultado de la administración de dosis farmacológicas de estrógenos. En un principio esa disminución se atribuyó a una inhibición de la secreción de gonadotrofinas y a un descenso en los niveles plasmáticos de LH (156), sumándose a esto el efecto producido por un aumento de 7 veces en los niveles de  $\beta$ -globulina que, como ya se ha descrito, tiene una alta afinidad de unión para ciertos esteroides C19 y C18 (157).

Estudios realizados por Oshima y colaboradores (150) indicaron una depresión general de las actividades enzimáticas relacionadas con la biosíntesis de andrógenos en el testículo humano in vitro por efecto de los estrógenos, aunque el grado de inhibición para cada enzima era diferente. Sin embargo, estos hallazgos no confirmaban un efecto directo sobre la esteroidogénesis testicular.

Una evidencia indicativa del efecto no mediado por gonadotrofinas se visualizó a partir del hallazgo de la rápida disminución en los niveles plasmáticos y testiculares de T en presencia de niveles normales de LH plasmática luego de la administración de estrogénos (158,159,160).



Realizando estudios en animales de experimentación se encontró una disminución en la retención intracelular de T y 5 $\alpha$ DHT por efecto de altas concentraciones de estrógenos (161) en cultivo de órgano de rata, describiéndose posteriormente una inhibición de la actividad 5 $\alpha$  reductasa prostática en el perro por efecto de varios estrógenos (162). Experimentos realizados in vivo, tanto en rata como en perro, eran coincidentes en mostrar una disminución de la producción de compuestos 5 $\alpha$  reducidos (163,164), sugiriendo en todos los casos efectos directos sobre el metabolismo de andrógenos.

#### d) Unión de andrógenos a proteínas receptoras

Dado que las hormonas están presentes en bajas concentraciones en los fluidos fisiológicos, los métodos de análisis convencional son inadecuados para su estudio, debiendo emplearse hormonas marcadas con átomos radiactivos para poder seguir sus movimientos y cambios de concentración.

Jensen y colaboradores, estudiando el efecto de los estrógenos en útero de rata, fueron los primeros en sintetizar esteroides radiactivos. Sus estudios permitieron determinar la existencia de proteínas

específicas presentes en el citoplasma, capaces de unir selectivamente el esteroide y permitir su acumulación en el tejido blanco (165).

Estas proteínas, llamadas receptores, luego fueron identificadas en numerosos tejidos efectoros para estrógenos (166), progesterona (167), aldosterona (168), glucocorticoides (169), y andrógenos (170).

Las proteínas receptoras para andrógenos fueron identificadas por primera vez en preparaciones de próstata ventral de rata formando un complejo macromolecular con DHT (171,172,173).

Las características del sitio de unión del andrógeno con la proteína receptora pueden ser estudiadas indirectamente correlacionando la estructura y conformación de aquellas con datos bioquímicos de unión a la proteína receptora. Muchas evidencias sugieren que la interacción entre la hormona y el receptor se produciría a través de uniones de hidrógeno participando el oxígeno en posición 17 y el oxígeno en en posición 3 del esteroide, y por fuerzas de Van der Waals que estabilizarían la unión (178,179). La reducción de T a DHT implica una modificación en el anillo A del esteroide que incrementa la planaridad de la molécula. Moléculas muy planas, como el 17  $\beta$ hidroxil 17 $\alpha$

metil- estro, 4, 9, 11 trien -3 ona (R1881; Metiltrienolona) presentan una mayor afinidad por el receptor androgénico, duplicando la correspondiente a DHT (180). Esto sugiere que, en condiciones fisiológicas, la DHT es el esteroide que aparentemente se une con mayor afinidad al receptor androgénico.

Muchos tejidos sensibles a andrógenos han mostrado tener proteínas receptoras capaces de unir T y DHT. Por esta razón, la actividad metabólica relativa de esos dos andrógenos y su afinidad relativa a los receptores, son factores importantes que pueden proveer información sobre el papel clave que cada andrógeno cumple en relación a la respuesta androgénica. Según ha resumido Attramadal (174), la DHT juega un papel preponderante en la próstata ventral (175) y vesículas seminales (176), donde es formada rápidamente a partir de T y se une más firmemente que ésta al receptor (177), siendo metabolizada en escasa proporción a los compuestos más reducidos (Dioles).

En 1968 Anderson y Liao (186) demostraron la retención selectiva de los andrógenos en núcleos de próstata ventral, hallazgo que luego fue confirmado por empleo de técnicas autorradiográficas (187,188); este hecho despertó un notable interés ya que se había descripto que una de las

respuestas bioquímicas tempranas para la acción hormonal era el aumento de la síntesis de ARN en el núcleo celular (189 ) y, pues se había demostrado que la DHT era más activa que T en promover el crecimiento (190).

Dado que el epidídimo es un órgano cuya morfología y funcionalidad son dependientes de andrógenos, resultó de gran interés estudiar la presencia de proteínas receptoras para esos esteroides en dicho tejido . En 1971, Blaquier (181) y Ritzen (182) describieron la existencia de receptores para andrógenos en la fracción citosólica (sobrenadante de la centrifugación de homogenato de tejido a 105000xg) de epidídimo de rata, con alta afinidad para DHT, , sitios que luego fueron caracterizados en varias especies como la rata (183), conejo (184) y mono (185).

La primera evidencia de la existencia de receptores nucleares en epidídimo fue dada por el hallazgo de una activa concentración de andrógenos en el núcleo celular en epidídimo de rata (191 ,192), estudiándose luego la composición de esteroides en esa fracción , la que se encontró que estaba formada en su mayor parte por DHT (193)

Posteriormente los sitios de unión para andrógenos presentes en núcleos de células de rata fueron caracterizados empleando técnicas de marcación con DHT y de

intercambio con R1881 (194 ,195).

Numerosas evidencias se han acumulado en favor de la idea de la existencia de un control de los sitios receptores de hormonas esteroideas en tejidos efectores de esas hormonas. Los primeros hallazgos sobre el control hormonal del número de sitios receptores fueron realizados por Leavitt y colaboradores quienes, estudiando componentes de unión a progesterona en útero, determinaron la estimulación de los sitios receptores mediada por estrógenos (196) y la regulación negativa por la misma progesterona. Por otra parte, Roy y colaboradores (197) describieron la inducción del receptor para andrógenos en hígado de rata por andrógenos, evidencias que permitieron considerar que la concentración de receptores podía ser regulada por la hormona.

En epidídimo de rata, Fodestá y colaboradores (198) mostraron que, en el animal adulto, la castración producía una disminución en el número de sitios de unión para andrógenos presentes en el citoplasma, que alcanzaba niveles indetectables luego de 25 días de castración. Ese decrecimiento podía ser prevenido administrando andrógenos desde el momento de la castración , y, por otra parte, los niveles disminuidos por la castración podían ser

restituidos con terapia androgénica. Posteriormente el análisis de la dinámica de reinducción del receptor androgénico presente en el extracto citosólico epididimario (199,200) permitió confirmar la participación de los andrógenos en el proceso de regulación de los niveles de receptor androgénico.

Teniendo en cuenta las evidencias obtenidas por investigaciones realizadas en animales de experimentación, los estudios se enfocaron hacia la caracterización de receptores androgénicos en tejidos dependientes de esos esteroides en la especie humana. Numerosos investigadores han estudiado las características de los sitios receptores androgénicos en tejido prostático (201,202). En un estudio realizado con tejido epididimario humano realizado por Furvis y colaboradores, (121), se determinó la existencia de un componente con propiedades comunes a receptores androgénicos descritos en otros tejidos. Posteriormente, empleando una técnica descrita para la caracterización de los sitios receptores en la rata, Tezón y colaboradores (203) realizaron una caracterización parcial de los sitios receptores para andrógenos presentes en las fracciones citosólica y nuclear de epidídimo humano, determinándose su especificidad para andrógenos, así como el número de sitios nucleares ( $310 \text{ fmoles/mg ADN}$ ), y la constante de

disociación del complejo hormona-receptor presente en el núcleo ( $K_d = 1,5 \times 10^{-10}M$ ).

Todas estas evidencias eran de gran interés, ya que el complejo receptor-andrógeno debe luego interactuar con estructuras presentes en el núcleo celular, para desencadenar la respuesta del tejido al estímulo hormonal.

#### e-Unión a aceptores nucleares

En la actualidad es ampliamente aceptado que las hormonas esteroideas ejercen su acción en los tejidos efectores primariamente por interacción con el material genético alterando la expresión de algunos genes en forma específica (204,205). Numerosos estudios muestran la unión de esteroides tanto a cromatina como a ADN. La interacción entre el complejo formado por la hormona y el receptor con la material nuclear se produciría sobre regiones específicas de la cromatina del tejido efector denominados "sitios aceptores" (206,207), sitios que se encontrarían localizados cercanos o sobre secuencias de ADN cuya transcripción es inducida por la hormona.

La naturaleza de los sitios aceptores no ha sido aun determinada. Un estudio de caracterización ha permitido clasificarlos dentro de las proteínas no histónicas con un

peso molecular aproximado de 70000 (208).

El destino del receptor luego de la unión al sitio aceptor es completamente desconocido. Si bien la unión inicial a cromatina estaría dada a través de la interacción con proteínas no histónicas, podría existir una subsecuente interacción directa con el ADN adyacente, fenómeno que se considera posible, dada la habilidad de unión de receptores esteroideos a ADN observada en estudios realizados in vitro.

Con el objeto de detectar las secuencias específicas de unión de las moléculas de receptor al ADN, O'Malley y colaboradores en su estudio sobre receptores de progesterona en oviducto de pollo, aislaron fragmentos de ADN y determinaron la unión preferencial del receptor a un fragmento del gen que codifica para la ovoalbúmina (209,210,211) Si bien aún no ha sido determinada la función específica del receptor en el proceso de interacción con el material nuclear, se ha descrito que la subunidad A del receptor de progesterona tendría propiedades típicas de una proteína desestabilizante del ADN, dado por su habilidad de incrementar el ADN de cadena simple, sensible a la actividad de la nucleasa S1(212) Por otra parte, en próstata ventral de rata se estableció



la interacción del receptor para andrógenos con un fragmento de ADN codificador de una de las principales proteínas prostáticas (PBP: prostatic binding protein), observándose modificaciones en la susceptibilidad de dicho gen a ciertas enzimas con el estado hormonal (213,214).

Todas estas interacciones tendrían por objeto permitir la entrada de la ARN polimerasa en la doble hélice del ADN, estimulando los procesos de transcripción.

#### f-Estimulación de la transcripción

El modelo general de la acción de las hormonas esteroideas propone que la interacción del complejo formado entre el receptor y la hormona causa un incremento en la producción de ciertas especies de ARN que tendrían roles claves en la respuesta celular a la acción de los esteroides.

En 1962 se encontró que ribosomas aislados de próstata ventral proveniente de ratas inyectadas con T, eran más efectivos en sintetizar proteínas que aquellos provenientes de animales castrados (215). Estas diferencias, atribuibles al estado hormonal, luego fueron confirmadas a través de la demostración de las variaciones en el contenido ribosomal de acuerdo a los niveles circulantes de

andrógenos, así como por el hallazgo la estimulación aguda de la formación de polirribosomas por efecto de la hormona (216).

Esos resultados se encontraban estrechamente relacionados con los que indicaban que los ARN mensajeros extraídos de núcleos de células prostáticas o ribosomas de animales tratados con andrógenos eran más efectivos en los procesos transcripcionales que los provenientes de animales castrados (217).

Williams-Ashman y colaboradores fueron los primeros en mostrar que los andrógenos podían aumentar la actividad sintetizadora de ARN en preparaciones nucleares (218). La importancia de la participación de los andrógenos en tales eventos también fue indicada por Vिलlee y colaboradores en estudios realizados sobre vesícula seminal (219), así como por Hu y colaboradores (220) quienes determinaron que el complejo formado entre la hormona y el receptor podía estimular la síntesis de ARN en próstata.

Estudios realizados en epidídimo de rata por Blaquier (221) fueron indicativos de una significativa estimulación de la incorporación de uridina a ARN mediada por andrógenos, así como modificaciones en el contenido de ciertos ARN como consecuencia de variaciones en el estado hormonal

(222,223).

Resultados obtenidos a partir de investigaciones realizadas en útero de rata, permitieron sugerir que el incremento del ARN mensajero, luego de la administración de estrógenos, provendría de un aumento en la velocidad de transcripción, de forma tal que la hormona regularía la acumulación de ARN mensajeros específicos como consecuencia de un aumento en el número de iniciaciones o de una modificación entre su acumulación y degradación (224).

Actualmente, el empleo de técnicas que involucran el manipuleo de genes, ha permitido avanzar en el conocimiento de la participación del complejo hormona-receptor sobre la activación del proceso de transcripción. Mediante esos métodos se ha analizado el efecto de los andrógenos sobre la expresión de genes cuyas proteínas son reguladas por andrógenos (225,226) y la regulación hormonal de la expresión de vectores de características conocidas.

#### g-Estimulación de la síntesis proteica

La evidencia de que el andrógeno unido al receptor pueda afectar la síntesis de ARN, no descarta la posibilidad de una participación en el procesamiento, transporte o utilización de ciertos tipos de ARN.

Con el objeto de explorar tal posibilidad, Liang y Liao, investigando el efecto de los andrógenos en sistemas sintetizadores de proteínas en próstata ventral, observaron que en ciertos grupos de ratas los andrógenos administrados a animales castrados podían aumentar la actividad de las enzimas de activación de aminoácidos y su posterior unión al ARN de transferencia (S metil tARN) en citosol de próstata (227). Dado que éste es aparentemente el primer paso en la iniciación de la síntesis de proteínas, tal observación reafirmó la idea de que los andrógenos tuvieran una acción rápida en el mecanismo de la síntesis proteica. Conjuntamente, Ichii y colaboradores determinaron que los andrógenos eran necesarios para mantener, por cierto período de tiempo, los altos niveles de factor de iniciación y, en algunos casos, de factor de elongación del proceso de síntesis de proteínas, lo cual estaba de acuerdo con la idea de la participación androgénica en este proceso (228).

Estudios diseñados para examinar tal efecto en glándulas accesorias del aparato genital masculino, indicaron que la secreción de considerables cantidades de proteínas específicas en próstata y vesículas seminales

(229,230). Investigaciones similares en epidídimo de la misma especie mostraron un incremento en la incorporación de aminoácidos marcados a proteínas en aquellos tejidos estimulados con andrógenos (85,231), observándose también una disminución apreciable en el contenido de proteínas como consecuencia de la castración y una restauración con la terapia androgénica de reemplazo.

Esas evidencias estaban de acuerdo con resultados que indicaban que numerosas enzimas del epitelio epididimario (23,232,233), así como la síntesis de componentes de la secreción epididimaria (234,235) se encontraban bajo control androgénico.

El hallazgo de la respuesta epididimaria a los andrógenos a través de la síntesis de proteínas hizo pensar que, la identificación y caracterización de proteínas específicas epididimarias podría contribuir al conocimiento de la participación de este órgano en el proceso de maduración de espermatozoides. Esta idea surgió pues, según se mencionó anteriormente, en un principio la búsqueda de las entidades epididimarias involucradas en el proceso de maduración se habían confinado a componentes de bajo peso molecular (58,59,61). Sin embargo, las funciones descriptas para esos componentes no parecían estar

directamente relacionadas con la adquisición de capacidad fertilizante resultante del proceso, lo cual indujo a buscar entre las proteínas epididimarias los mediadores epididimarios de los cambios en los espermatozoides madurantes.

La presencia de proteínas específicas en el fluido epididimario fue sugerida por la existencia de diferencias en la composición de ese fluido con respecto al proveniente de la rete testis, en la rata (236), toro (237), carnero (238), ratón, conejo y oveja (239).

En 1976 Cameo y Blaquier (90) identificaron un grupo de proteínas específicas producidas por el epidídimo de la rata y determinaron la dependencia androgénica de su producción; éstas fueron luego caracterizadas, determinándose su peso molecular, punto isoeléctrico y carácter glicoproteico (240,241). El hallazgo se extendió luego a otras especies como hamster, toro y conejo.

La regulación de la síntesis de las proteínas identificadas en rata fue analizada por varios grupos de investigación (242,243,244) los que determinaron una mayor sensibilidad de la síntesis proteica a los andrógenos en los segmentos proximales epididimarios.

La correspondencia entre las proteínas identificadas en el tejido epididimario y aquellas presentes en el fluido luminal fue descrita por Cameo y Elaquier (90), y luego confirmadas por Brooks (245), quien encontró que proteínas sintetizadas por el epidídimo con precursores radiactivos y liberadas al medio presentaban una correspondencia en su movilidad electroforética con la de las principales proteínas secretorias que habían sido caracterizadas previamente en fluido luminal epididimario, lo cual reafirmaba los resultados obtenidos anteriormente.

Teniendo en cuenta que los espermatozoides sufren importantes modificaciones en su composición proteica en su tránsito por el epidídimo durante el proceso de maduración (246,247), y dado que poseen una limitada capacidad de sintetizar macromoléculas (248,249), parecía razonable que la fuente más probable de proveer compuestos fuera el plasma epididimario a través de entidades con capacidad de interactuar con los espermatozoides, fenómeno que permitiría explicar los cambios observados en la maduración relacionados con la antigenicidad, carga de superficie y distribución de receptores para lectinas, observados en numerosas especies.

La idea de la participación de las proteínas epididimarias en el proceso de maduración y, específicamente, en la adquisición de capacidad fertilizante, fue apoyada por los estudios realizados por Orgebin Crist y colaboradores, analizando el proceso de maduración en espermatozoides en tejido epididimario de conejo mantenido en cultivo de órgano. Los investigadores encontraron que el efecto androgénico sobre la adquisición de capacidad fertilizante de espermatozoides mantenidos en cultivo de órgano podía ser eliminado por el agregado de inhibidores de la transcripción y de la síntesis proteica (250), determinando posteriormente que el aumento en la capacidad fertilizante de los espermatozoides mediado por la estimulación androgénica de tejido epididimario era idéntico al encontrado luego de la incubación de los espermatozoides con un extracto citosólico libre de andrógenos obtenido a partir del tejido estimulado con la hormona (251).

Simultáneamente, Lea y colaboradores (241) realizaban la purificación y el estudio de localización en epidídimo de rata de una glicoproteína secretoria llamada AEG (Acidic epidydimal glicoprotein), sugiriendo su posible asociación a espermatozoides; esta proteína, luego caracterizada por el mismo grupo, mostó propiedades similares a las



descriptas por Garberi y colaboradores (240).

Por otra parte, Olson y Hamilton describían la presencia en espermatozoides de rata, de una glicoproteína que se concentraba en la superficie de los espermatozoides presentes en la región caudal del epidídimo, pero no se detectaba en los presentes en los segmentos proximales (252), hallazgo que sugirió su asociación o modificación a lo largo del epidídimo.

A partir de estas evidencias, numerosos estudios fueron enfocados hacia la determinación de la correlación entre las proteínas epididimarias y las presentes en los espermatozoides como resultante del proceso de maduración. La correspondencia entre las movilidades electroforéticas de proteínas epididimarias de numerosas especies con las obtenidas a partir de espermatozoides, se sumaron a los hallazgos anteriores.

En la rata, el empleo combinado de un radioinmunoensayo y un antisuero específico desarrollado contra proteínas específicas epididimarias, permitió determinar el contenido de estas proteínas en los distintos segmentos epididimarios y en los espermatozoides de cada región del órgano (253), la localización de los antígenos y la regulación de la síntesis mediada por andrógenos (255).

La interacción de las proteínas epididimarias con los espermatozoides podría estar asociada a numerosas funciones. Las glicoproteínas poseen gran capacidad de retener agua, propiedad que les da un carácter lubricante, el que contribuiría a reducir la fricción entre millones de células que se mueven continuamente en el epidídimo.

Por otra parte, las glicoproteínas producidas por el epidídimo, al interactuar con los espermatozoides, podrían modificar las características de su superficie, lo que explicaría las diferencias de carga descritas por Bedford entre los espermatozoides del CAPUT y CAUDA epididimarios (66).

Recientemente se ha descrito un efecto de la AEG sobre la motilidad de espermatozoides epididimarios, si bien no se ha encontrado hasta el presente una evidencia clara del efecto específico de esta proteína (256).

Otros grupos de trabajo han orientado sus estudios hacia la determinación del rol que podrían desempeñar estas proteínas en el reconocimiento e interacción de las gametas masculina y femenina. Se ha sugerido que las proteínas específicas epididimarias podrían ser parte de factores de superficie del espermatozoide removidos durante la

capacitación, proceso que culmina con la reacción acrosomal que se desencadena inmediatamente antes de la fertilización. De esta forma tendrían la función de prevenir el desencadenamiento de esa reacción y por lo tanto podrían funcionar como factores decapacitantes. La presencia de estos factores ha sido observada en el cobayo (257), conejo (258) y en la rata (259). Sin embargo si bien se ha descrito que parte de esas proteínas se perderían durante la capacitación, estudios bioquímicos y de microscopía electrónica (260) realizados en espermatozoides de rata mostraron que una fracción de esas proteínas permanecía asociada al espermatozoide en la región post-acrosomal, sugiriendo de esta forma una participación de las proteínas en el fenómeno de reconocimiento entre las gametas durante la fertilización.

Trabajos realizados por Moore en conejo y hamster (261) y por Cuasnicú y colaboradores en rata (262), mostraron que un antisuero dirigido contra proteínas epididimarias que se asocian a espermatozoides, era capaz de inhibir la capacidad fertilizante de espermatozoides maduros; paralelamente, el hallazgo de la adquisición de capacidad de unión a la zona pellucida de ovocito y de fertilidad de espermatozoides inmaduros de hamster incubados con proteínas específicas sintetizadas

por estimulación androgénica (263,264), confirmaron la idea de la existencia de una activa participación de esas entidades en la maduración.

Sin embargo poco es lo que se sabe sobre la función específica que desempeñarían las proteínas en el fenómeno de reconocimiento entre las gametas. En un estudio realizado en la rata, se encontró que una proteína específica epididimaria secretoria, que se encontraba presente en extractos de espermatozoides recuperados de segmentos distales epididimarios, presentaba actividad de tipo lactalbúmina, sugiriéndose una acción concertada con glicosidasas y glicosiltransferasas (265,266,267). Esto podría estar relacionado con los hallazgos de Shur y colaboradores, quienes describieron, en la membrana plasmática de espermatozoides de ratón a la enzima N-acetilglucosamin galactosiltransferasa como uno de los receptores en el espermatozoide necesarios para la unión a la zona pellucida (268,269,270), hallazgo que es apoyado por la descripción realizada por Wasserman y colaboradores sobre la existencia de una glicoproteína en la zona pellucida de ovocito de ratón con actividad receptora de espermatozoides en el residuo oligosacarídico (271,272).

Se podría pensar entonces que la estimulación androgénica de la síntesis proteica en el epidídimo, conduciría a la formación de entidades con capacidad de interacción con los espermatozoides, participando en la formación o activación de una estructura en la gameta masculina, involucrada en el reconocimiento de un sitio complementario en el ovocito.

## OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Usando como modelo experimental el epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano se ha podido demostrar la captación de la testosterona radiactiva agregada al medio por el tejido cultivado y su rápida metabolización a DHT, principal esteroide hallado en la fracción unida específicamente. Así mismo se ha demostrado que el agregado de andrógenos a dichos cultivos en concentraciones fisiológicas ( $10^{-7}M$  T o DHT) provoca una estimulación efectiva de varias funciones del tejido, entre ellas la síntesis de proteínas.

Todas estas evidencias concurren en sugerir que la respuesta del epidídimo humano en cultivo a la estimulación androgénica sigue mecanismos similares a los que se han descrito para este tejido en animales de experimentación.

El objetivo fundamental de este trabajo será ampliar nuestro conocimiento sobre algunos aspectos de la fisiología del epidídimo humano. Nos interesa especialmente estudiar el efecto de diferentes situaciones hormonales sobre la actividad de los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de los andrógenos y la

regulación del número y localización subcelular de los receptores específicos para andrógenos. Además deseamos estudiar la producción de proteínas específicas por el tejido epididimario y su posible interacción con los espermatozoides.

Con el objeto de facilitar la explicación de la metodología empleada y el análisis de resultados, cada tema será tratado en capítulos separados.

En el CAPITULO 1, se estudiarán las características del metabolismo de andrógenos en el epidídimo humano.

Para ello se emplearán dos estrategias experimentales:

\*Método de superfusión: este modelo experimental, permite un estudio dinámico del metabolismo del tejido analizado, a partir del cual es posible calcular una serie de parámetros relacionados con la entrada y salida de los compuestos superfundidos, así como su interconversión y su metabolismo a otros compuestos.

\*Incubación de cortes de tejido con [ $^3$ H]T: a través de este ensayo se evaluará la actividad de las enzimas  $5\alpha$  reductasa y  $17\beta$  hidroxioesteroide deshidrogenasa.

El análisis se dividirá en dos partes:

En la PARTE A se realizará un estudio comparativo entre tejido proveniente de pacientes controles y estrogenizados in vivo.

En la PARTE B se estudiará el metabolismo androgénico en tejido epididimario mantenido en cultivo de órgano, analizándose el efecto de diversos agregados hormonales.

En el CAPITULO 2 se analizarán las características de los sitios receptores para andrógenos y su regulación por andrógenos.

Para ello se empleará una técnica de intercambio de la hormona endógena con un ligando radiactivo, que permite la marcación y evaluación de los sitios receptores.

Este capítulo será dividido en dos partes:

En la PARTE A determinaremos la condiciones óptimas de medición de sitios receptores androgénicos en tejido CONTROL.

En la PARTE B investigaremos la influencia del nivel de andrógenos disponibles en el tejido mantenido en cultivo sobre la concentración de los sitios de unión para



andrógenos y su distribución en distintas fracciones subcelulares, y trataremos de determinar una correlación entre este parámetro y la respuesta del epidídimo humano a la estimulación androgénica.

En el CAPITULO 3 se realizará la identificación de las proteínas epididimarias sintetizadas por el tejido mantenido en cultivo en respuesta a los andrógenos. El estudio de síntesis proteica se hará por incubación del tejido con precursores radiactivos y posterior análisis electroforético de los productos sintetizados. Posteriormente se analizará su posible interacción con espermatozoides, a través del desarrollo y caracterización de un antisuero obtenido a partir de un extracto de espermatozoides.

La respuesta a la estimulación hormonal del epidídimo humano en el sistema de cultivo será comparada con la que se obtiene por la estimulación in vivo del epidídimo de animales de experimentación.

## CAPITULO 1

### METABOLISMO DE ANDROGENOS EN EPIDIDIMO HUMANO

## MATERIALES y METODOS

### M.1.1.Reactivos

[3H] testosterona (T) (50.2 Ci/mmol) y [14C] androstenendiona (A) ( 52 mCi/mmol ) fueron adquiridos a New England Nuclear Co.. Los esteroides no radiactivos provinieron de Steraloids o SIGMA Chemicals Co.. Los reactivos de grado analítico, fueron adquiridos a Fisher Scientific Co. o SIGMA. El medio de cultivo 199 preparado con solución balanceada de Hank (utilizado para los lavados de tejido), o con solución salina de Earle (empleado como medio de cultivo y en las incubaciones ) fue provisto por GIBCO . La composición de las soluciones salinas de Hank y Earle se detallan en la TABLA 1. Para los estudios de metabolismo en condiciones de cultivo de órgano se utilizaron suero fetal bovino (Antisueros SRL), Penicilina (Squibb), estreptomycin (Abbot) e insulina (Lilly). Los solventes utilizados para las extracciones y separaciones cromatográficas fueron de grado analítico Las cromatografías en capa delgada se realizaron con placas de silica Gel (tipo 13181 N 6060) de Eastman Kodak.

TABLA 1

	Sales de Hank (g/l)	Sales de Earle (g/l)
Na Cl	6,8	6,8
K Cl	0,4	0,4
Ca Cl <sub>2</sub>	0,2	0,2
Mg SO <sub>4</sub>	0,2	0,2
KPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	0,125	0,125
Bacto dextrosa	1,0	1,0
Na CO <sub>3</sub> H	0,66	2,2
Roja Fenol	0,02	0,02

TABLA 1- Composición de las soluciones salinas de Hank y Earle

### M.1.2. Obtención del tejido

Los epidídimos se obtuvieron de 23 pacientes (edad promedio 65 años) que fueron sometidos a orquidectomía bilateral como tratamiento médico debido a carcinoma prostático. Las muestras fueron recibidas a temperatura ambiente en solución salina y procesadas inmediatamente. Los tejidos destinados a cultivo de órgano se recibieron en medio de cultivo o solución salina estéril. En la serie de experimentos correspondientes al estudio del efecto de la terapia estrogénica sobre el metabolismo androgénico se obtuvieron muestras provenientes de 5 pacientes que habían recibido terapia hormonal (2,5 mg/día dietilstilbestrol, DES) durante un período entre 4 y 8 meses previo a la castración.

### M.1.3. Control histológico

Se seleccionaron muestras del segmento epididimario denominado CAPUT DISTAL (correspondiente al segmento 2b en el diagrama de Holstein) (FIGURA 2 ) para realizar los controles histológicos. Fragmentos de aproximadamente 2mm<sup>3</sup> se fijaron en solución de Bouin, se deshidrataron e incluyeron en parafina, luego de lo cual se obtuvieron secciones de 5 um, que se tiñieron con hematoxilina-eosina.

Los preparados así obtenidos se observaron en un microscopio (Nikon, Labophot, Microflex) y se obtuvieron fotografías con diferentes aumentos (detallados en la leyenda de cada figura).

#### M.1.4. Cultivo de órgano

La técnica descrita a continuación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, para lo cual se empleó una cámara de flujo laminar (Edgegard, BAKER, Co.). El tejido epididimario fue disecado cuidadosamente; se eliminó la cápsula y se separó el tejido graso. Una vez lavado exhaustivamente con medio 199 conteniendo sales de Hank y penicilina-estreptomicina (100 UI/ml y 100 ug/ml respectivamente) el tejido se colocó en una cápsula de Petri (Falcon, Dickinson and Co.) y se cortó en pequeñas y delgadas porciones, dejándose en esas condiciones durante 30-60 minutos, realizando varios cambios de medio.

Posteriormente el tejido se transfirió a grillas de acero inoxidable (Falcon) colocadas en el interior de cápsulas de cultivo de órgano (Falcon 3037, 60x15 mm). El espacio de la cápsula ubicado bajo la grilla fue cubierto con 0.7 ml de medio de cultivo 199 conteniendo sales de Earle suplementado con Insulina (0.2 U/ml), suero fetal

bovino (10%, v:v) y penicilina-estreptomicina en las mismas proporciones que las mencionadas anteriormente. En la cámara externa se colocó agua estéril (generando una cámara húmeda para evitar la evaporación y por lo tanto la concentración del medio de incubación).

La incubación se realizó a 32 C, por un período de hasta 6 días en atmósfera de aire y CO<sub>2</sub> en una proporción 95:5%. El primer cambio de medio se realizó luego de 12 horas de iniciado el cultivo, luego de lo cual se renovó cada 2 días.

El suero fetal bovino fue tratado previamente con carbón, empleando un método descrito por Wilson y French (273), de forma tal de eliminar el andrógeno endógeno.

Los esteroides fueron disueltos en Etanol (Merck) y agregados al medio de cultivo de forma tal que la concentración alcohólica no sobrepasase el 0.7% (v/v) .

Los tejidos fueron agrupados en varios lotes, los que fueron cultivados en diversas condiciones hormonales, que se detallan a continuación:

**DEFLECIONADO:** tejido cultivado durante 6 días en presencia de medio completo conteniendo 0.7% (v/v) de etanol como vehículo.

MANTENIDO: tejido cultivado durante 6 días en medio completo conteniendo T o DHT 10-7M durante todo el tiempo de cultivo.

ESTIMULADO: tejido cultivado durante tres días en medio completo con vehículo y los tres días subsiguientes con medio conteniendo T o DHT 10-7M.

COCULTIVADO: tejido cultivado durante 6 días en un medio completo conteniendo T o DHT 10-7M. Sobre la grilla de cultivo se colocaron además pequeños explantos provenientes de tejido de la rete testis (en una proporción correspondiente a 1 explanto de rete testis por 5 de epidídimo).

T12: tejido cultivado durante 12 horas en un medio completo conteniendo vehículo.

Transcurrido el tiempo de cultivo los tejidos fueron derivados para los ensayos de superfusión y metabolismo in vitro, que se detallan en M.1.5 y M.1.8.

En todos los casos, los resultados obtenidos con tejidos cultivados en distintas condiciones hormonales fueron comparados con los obtenidos con un CONTROL no cultivado.



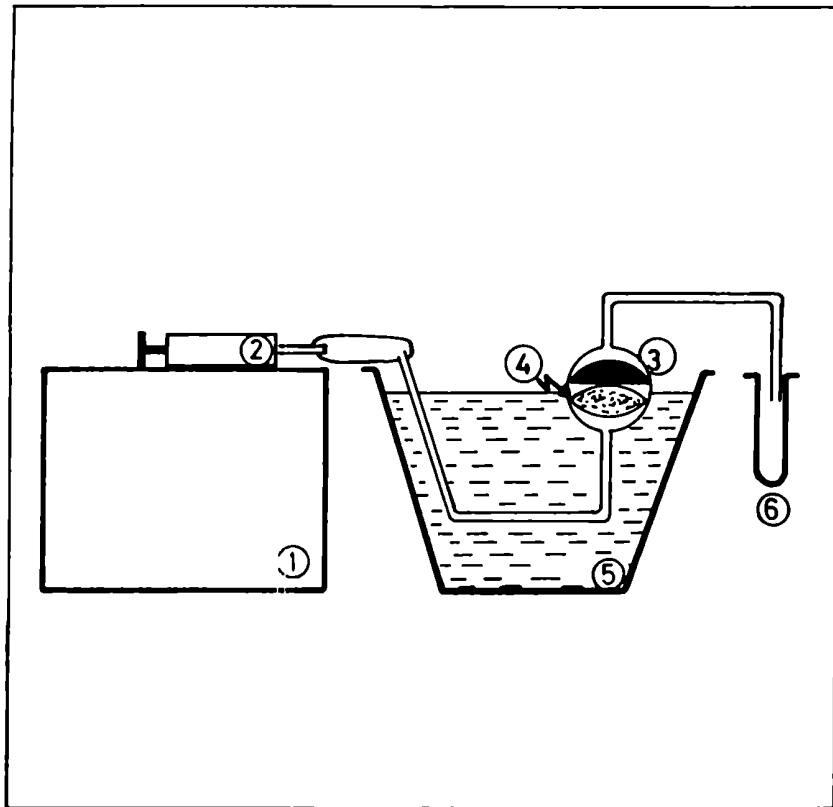
#### M.1.5. Superfusión

Esta técnica fue desarrollada por Gurpide colaboradores (274,275 ) y ha sido adaptada para los estudios realizados en epidídimo humano. El método consiste en superfundir pequeños trozos de tejido en un medio conteniendo un par de esteroides metabólicamente relacionados distinguibles isotópicamente.

Para estudiar el metabolismo androgénico en epidídimo humano, se seleccionaron como precursores [3H]T y [14C]A. En la FIGURA 3 se muestra un esquema del sistema empleado en la superfusión.

Se preparó una mezcla con cantidades apropiadas de los trazadores y se evaporó a sequedad. El extracto seco de los trazadores isotópicos se resuspendió en 300 ul de etanol, agregándose luego 30 ml de Medio 199 conteniendo sales de Earle. El medio de superfusión así obtenido se colocó en la jeringa de 30 ml y ésta en una bomba Harvard que produce un flujo constante (8 ml/h). La jeringa se conectó a un tubo de Teflon que la unía a un tubo de vidrio que se extendía hasta alcanzar la cámara de superfusión. Dentro de la cámara, sobre un soporte poroso, se colocaron entre 70 y 330 mg de tejido epididimario "fresco" (no

FIGURA 3



Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano. Análisis por superfusión. Representación esquemática del aparato de superfusión.

1) Bomba Harvard (flujo constante); 2) jeringa; 3) cámara de superfusión; 4) soporte poroso; 5) baño termostaticado; 6) tubo para coleccionar el superfusado.

cultivado) o cultivado cortado en trozos de 2 mm<sup>3</sup>. Finalmente, el líquido de superfusión saliente de la cámara (superfusado), se recogió en tubos de ensayo.

La cámara de superfusión y el tubo de vidrio conectado con la jeringa se sumergieron en un baño de agua mantenido a 34C.

En una serie de experimentos preliminares se determinó que luego de 1 hora de iniciado el experimento se alcanzó el estado estacionario isotópico. Por lo tanto el volumen correspondiente a ese período inicial de superfusión se descartó, luego de lo cual se recogieron alícuotas correspondientes a períodos de 20 minutos por un espacio de hasta 2 horas.

Para los estudios correspondientes a metabolismo androgénico en tejido CONTROL y tratado con estrógenos, el rango de concentración de sustratos empleada fue de 7 a 40 pmoles / ml de medio de superfusión para el radioisótopo [3H]T y de 360 a 1400 pmoles/ ml para [14C]A. Para los experimentos sobre la influencia del estado hormonal en tejido cultivado, se trabajó con un rango de 8 a 38 pmoles/ml de medio para [3H] T y 380 a 480 pmoles/ml de medio para el precursor [14C] A.

Una vez finalizado el ensayo el tejido se transfirió inmediatamente a un filtro, se lavó exhaustivamente con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4), se cortó en pequeños trozos y se suspendió en 0.5 ml de PBS, luego de lo cual los esteroides se extrajeron y analizaron según se detalla en M.1.10.

#### M.1.6 Preparación de homogenato de epidídimo humano

Para obtener un homogenato de tejido epididimario humano, el tejido se cortó en trozos pequeños y se homogeneizó en presencia de buffer Krebs-Ringer-Fosfato (pH 5.5), empleando un homogeneizador Polytron (Brinkmann) realizando 3 pulsos de 15 segundos cada vez, luego de lo cual se filtró a través de una malla de nylon. Toda esta operación se realizó a 0-4°C, y el extracto se mantuvo a esa temperatura .

Posteriormente se determinó el contenido de proteínas empleando la técnica de Bradford (276).

#### M.1.7. Separación de epitelio y estroma

La técnica de separación de epitelio y estroma de tejido epididimario humano se basa en el método descrito por Bruchoovsky y colaboradores (277), para el estudio de la

actividad 5 $\alpha$ reductasa en tejido prostático.

El tejido proveniente de la región del CAPUT DISTAL previamente disecado, cortado en pequeños trozos y pesado, fue colocado sobre una malla de acero (malla: 30, grilla:0.55 mm) ejerciéndose presión sobre el filtro a través de un émbolo de Teflon, mientras se agregaba medio de cultivo hasta alcanzar una proporción de 10 volúmenes respecto de la cantidad de tejido (ml/gr. de tejido).

De esta forma se obtuvo un filtrado, constituido en su mayor parte por células epiteliales, y estructuras membranosas blanquecinas que quedaron adheridas al filtro metálico correspondientes al estroma. Del filtrado se tomaron alícuotas de 0.5ml y se colocaron en cápsulas de cultivo de tejido (Falcon).

El estroma se lavó con buffer fosfato salino PBS (pH7.4), se colocó sobre un papel de filtro y se transfirió a cápsulas de cultivo agregándose luego 0.5 ml de medio de cultivo.

Sobre ambas fracciones se midió la actividad 5 $\alpha$  reductasa y 17 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa, utilizando el ensayo descrito en M.1.9.

#### M.1.8 Determinación de la actividad $5 \alpha$ reductasa en homogenato de epidídimo humano

Se tomaron alícuotas de homogenato de epidídimo humano obtenidas según M.1.6, con un contenido de proteínas correspondientes a 0.5 mg/ml de homogenato filtrado, y se llevaron a un volumen final de 1 ml. Estas alícuotas se incubaron con  $[3H]T$   $10^{-7}M$  como sustrato, en presencia de NADPH a una concentración  $5 \times 10^{-4}M$ . La incubación se llevó a cabo durante 30 minutos a 34 C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se puso fin a la reacción por agregado de 5 volúmenes de Cloroformo:Metanol (2:1; v/v), luego de lo cual los esteroides se extrajeron y analizaron según se describe e M.1.10

#### M.1.9. Determinación de la actividad $5 \alpha$ reductasa y $17 \beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa sobre cortes de tejido y fracciones epitelial y estroma de epidídimo humano

Los tejidos epididimarios provenientes de los distintos lotes cultivados así como del lote CONTROL y tratado con estrógenos in vivo, se lavaron exhaustivamente con buffer PBS, se colocaron sobre papel de filtro y pesaron. Se transfirieron a la cavidad interior de las cápsulas de cultivo de órgano agregándose 0,5 ml de medio

199 conteniendo el sustrato [ $^3\text{H}$ ]T 5 10<sup>-7</sup> M (actividad específica: 3.35 Ci/mmol). Este último agregado se realizó también sobre las fracciones correspondientes a epitelio y estroma obtenidos según M.1.7. En el espacio exterior de la cápsula se colocó agua, y se incubó durante 2 horas a 25 C sobre baño termostaticado. Transcurrido ese tiempo las cápsulas se colocaron sobre hielo, el medio se separó, el tejido se lavó intensamente con PBS frío, se cortó en trozos muy pequeños, transfiriéndose luego el tejido con medio a viales de conteo a los que se agregó 0.5 ml de PBS; posteriormente, tejido y medio se extrajeron y procesaron según se detalla en M.1.10.

#### M.1.10.Extracción y separación de los esteroides.

El tejido suspendido en PBS se extrajo con 5 volúmenes de cloroformo:metanol (2:1;v/v). Previo a la extracción se agregó una mezcla conteniendo 50 ug de cada uno de los esteroides a analizar (T, DHT, Dioles, A, y 5  $\alpha$  A). La fase orgánica inferior se evaporó a sequedad y se aplicó en placas de sílica gel. El sistema seleccionado para la separación de los esteroides estudiados es una mezcla compuesta por cloroformo:hexano:acetona (4:3:1; v/v) (275). Los esteroides estándares se localizaron por visualización bajo luz ultravioleta o por empleo de una mezcla de sulfato

cérico (solución saturada ) en 12% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calentamiento de la placa a 120 C durante 5 minutos. La FIGURA 4 muestra el esquema de separación, donde se observa la ubicación de los esteroides analizados. Las zonas correspondientes a cada esteroide se cortaron, se transfirieron a viales de vidrio, y se incubaron durante 12 horas con 0.5 ml de metanol, de forma tal de extraer el esteroide en la fase orgánica. Los medios de incubación fueron extraídos y analizados en forma idéntica.

#### M.1.11. Cuantificación de la radiactividad.

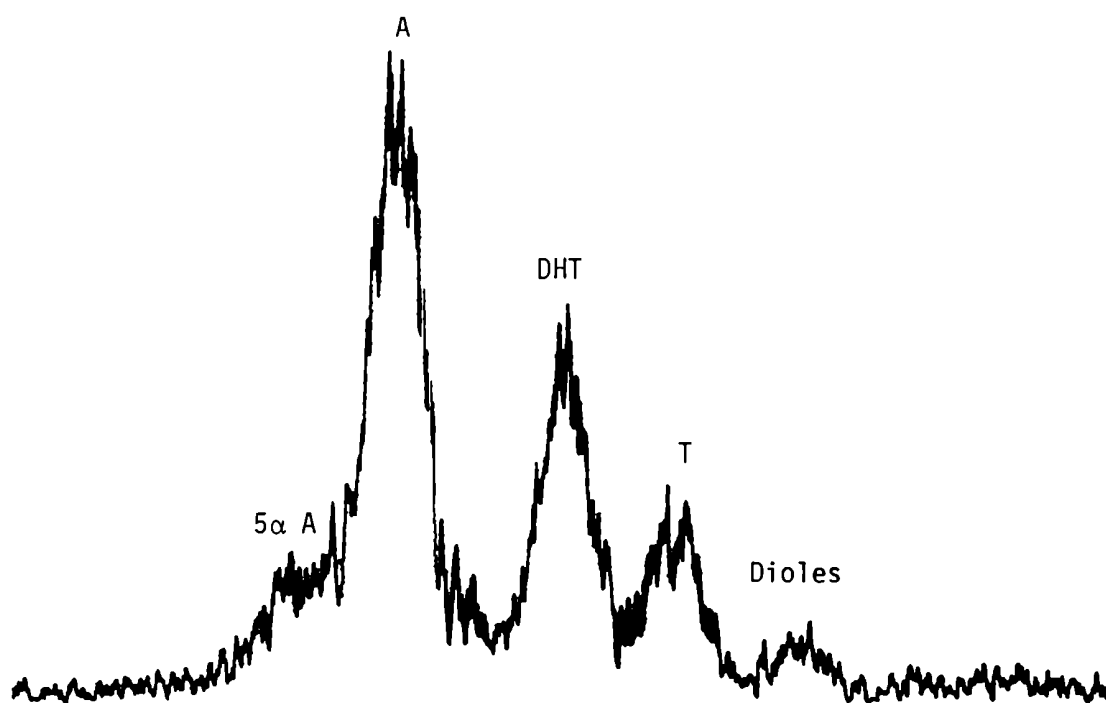
Los extractos se colocaron en viales de vidrio. Se agregaron 10 ml de solución centellante (4 g de Omnifluor, New England Nuclear, por cada litro de tolueno) conteniendo Triton X-114 (7:3; v/v).

Para la cuantificación de la radiactividad se utilizó un contador de centelleo líquido Beckman LS 100.

La radiactividad para ambos isótopos se midió separadamente en los canales restringidos. Previamente se hizo una curva de "quenching" para cada isótopo en los canales restringidos de forma tal de poder calcular la eficiencia real en cada muestra a cuantificar.



FIGURA 4



Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano. Análisis por superfusión. Radiocromatograma correspondiente a la separación cromatográfica de extracto de tejido superfundido en las condiciones indicadas en MATERIALES y MÉTODOS.

El sistema de separación está formado por una mezcla de Cloroformo:hexano:acetona (4:3:1; v/v). Se observan los picos de los precursores (A y T) y metabolitos (DHT, Dioles y 5 α A).

En aquellos casos en que se midió simultáneamente la radiactividad en los isótopos [3H] y [14C], en la lectura correspondiente al canal de 3H se sustrajo la contribución de 14C. Por otra parte se determinó que la contribución del canal de [3H] en el de [14C] era despreciable.

#### M.1.12. Evaluación de la actividad 5 $\alpha$ reductasa

La actividad de la enzima 5  $\alpha$  reductasa se calculó a partir de la conversión de T en productos 5  $\alpha$  reducidos (DHT y Dioles) a partir del cociente entre la cantidad de DHT + Dioles presentes en el tejido y medio (obtenidos a partir de la separación cromatográfica y posterior conteo de radiactividad) y la radiactividad total detectada en la placa cromatográfica (productos + sustrato); este valor multiplicado por cien representó el porcentaje de conversión; dicho valor se multiplicó por los pmoles de T iniciales y dividió por el peso de tejido (expresado en gramos) y el tiempo total de incubación (expresado en horas). De esta forma la actividad enzimática se expresó en pmoles de DHT + Dioles por gramo de tejido y hora de incubación.

A partir de los experimentos de superfusión se calculó la actividad de la enzima  $5\alpha$  reductasa la cual se expresó a partir del número de picomoles de compuestos  $5\alpha$  reducidos (DHT + Dioles +  $5\alpha$  A) por gramo de tejido y hora de incubación. Dicha actividad se calculó como porcentaje de conversión de los compuestos  $5\alpha$  reducidos para cada isótopo, valor que en cada caso se multiplicó por los picomoles de sustrato superfundido y se dividió por el peso de tejido presente en el ensayo y el tiempo total de incubación.

#### M.1.13. Evaluación de actividad $17\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa

La actividad de la enzima  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa se determinó a partir de la cantidad de [ $^3$ H]A producida luego de la incubación del tejido con [ $^3$ H]T, y se calculó a partir de las dpm cuantificadas en la placa cromatográfica respecto de la radiactividad total recuperada, multiplicada por la [ $^3$ H]T colocada en el medio de incubación, dividida por el peso de tejido (expresado en gramos) y el tiempo de incubación (expresado en horas).

#### M.1.14. Otros parámetros del metabolismo

A partir de los experimentos de superfusión se pueden obtener una serie de parámetros dinámicos que contribuyen a la descripción de las vías metabólicas principales de un tejido. Dichos parámetros han sido calculados para los casos estudiados y un detallado desarrollo de su cálculo se describe en el APENDICE.

#### M.1.15. Análisis de resultados

El análisis de resultados se realizó empleando el test "t" de Student en aquellos casos en que se compararon 2 lotes independientes; en aquellos estudios en que se compararon varios grupos se utilizó análisis de varianza o test no paramétrico, aclarado en cada caso.

#### M.1.16. Otras técnicas

La determinación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford (276).

La determinación del contenido de ADN se realizó empleando la técnica de Burton (278).

## RESULTADOS

PARTE A- Estudio del metabolismo androgénico en tejido epididimario CONTROL. Comparación tejido tratado con estrógenos in vivo.

R.1.1. Determinación de la actividad  $5\alpha$  reductasa en distintas regiones del epidídimo humano.

Dada su importancia en el metabolismo de andrógenos en el epidídimo, en primer lugar se midió la actividad de la enzima  $5\alpha$  reductasa en los segmentos epididimarios CAPUT DISTAL, CORPUS PROXIMAL y CORPUS DISTAL, con el objeto de seleccionar aquel que presente mayor actividad de esta enzima.

El ensayo se realizó sobre tejido "fresco" procesado inmediatamente luego de la extirpación, según se ha descrito en MATERIALES y METODOS, con el objeto de determinar la existencia de diferencias en los niveles enzimáticos en las diversas regiones.

Los resultados de la actividad enzimática obtenidos a partir de este ensayo se expresaron en pmoles de compuestos  $5\alpha$  reducidos de T (DHT + Dioles) por mg de ADN en 30 minutos de incubación. Los valores obtenidos se presentan en la FIGURA 5. Según se observa, el segmento CAPUT DISTAL presentó una actividad enzimática significativamente mayor que los otros segmentos ( $p < 0,01$ ), resultado que confirma el obtenido por de Larminat y col. (139).

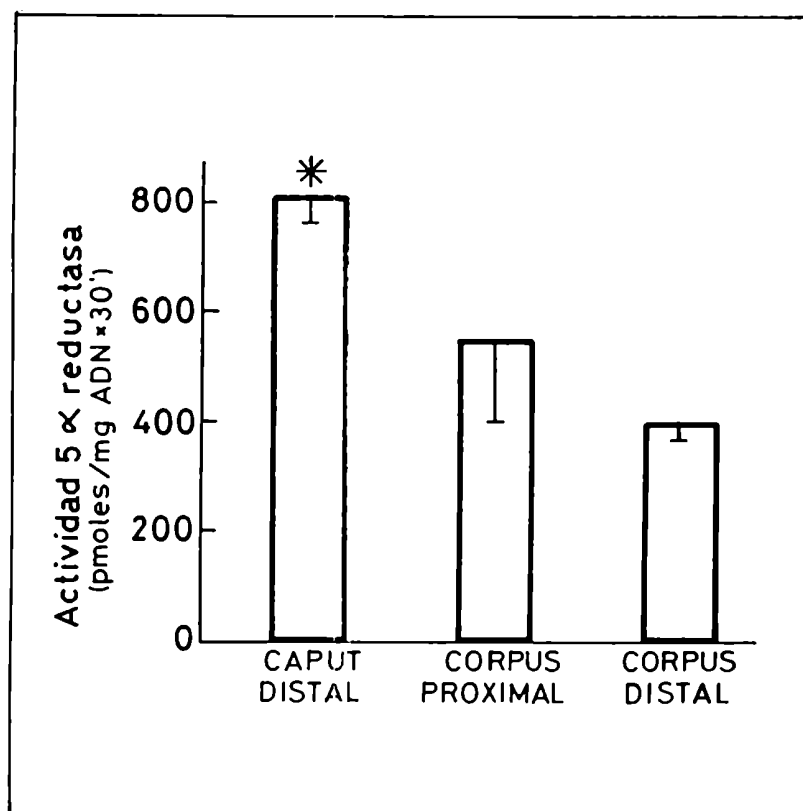
A raíz de estos resultados, todos los estudios posteriores se realizaron con dicho segmento.

R.1.2. Evaluación del metabolismo androgénico. Análisis por superfusión.

La técnica de superfusión desarrollada en primer término para el estudio del metabolismo de estrógenos en endometrio humano fue adaptada para analizar las características del metabolismo de andrógenos en el epidídimo humano.

Según se comentó previamente y se explica detalladamente en el APENDICE, en base a este modelo se pueden calcular una serie de parámetros que describen algunas características del metabolismo androgénico, relacionados con la entrada y liberación de los precursores

FIGURA 5



Metabolismo de andrógenos en el epidídimo humano. Actividad 5 α reductasa en los segmentos CAPUT DISTAL, CORPUS PROXIMAL y CORPUS DISTAL epididimarios.

La actividad enzimática se midió en homogenato de tejido según se indicó en M.1.6.

La actividad se expresa en pmoles (DHT + Dioles)/mg ADN x 30 min. ( $\bar{x} \pm ES$ ), correspondiente a 5 determinaciones independientes.

\*  $p < 0,01$

superfundidos al tejido, coeficientes indicativos de su interconversión y vías metabólicas preferenciales.

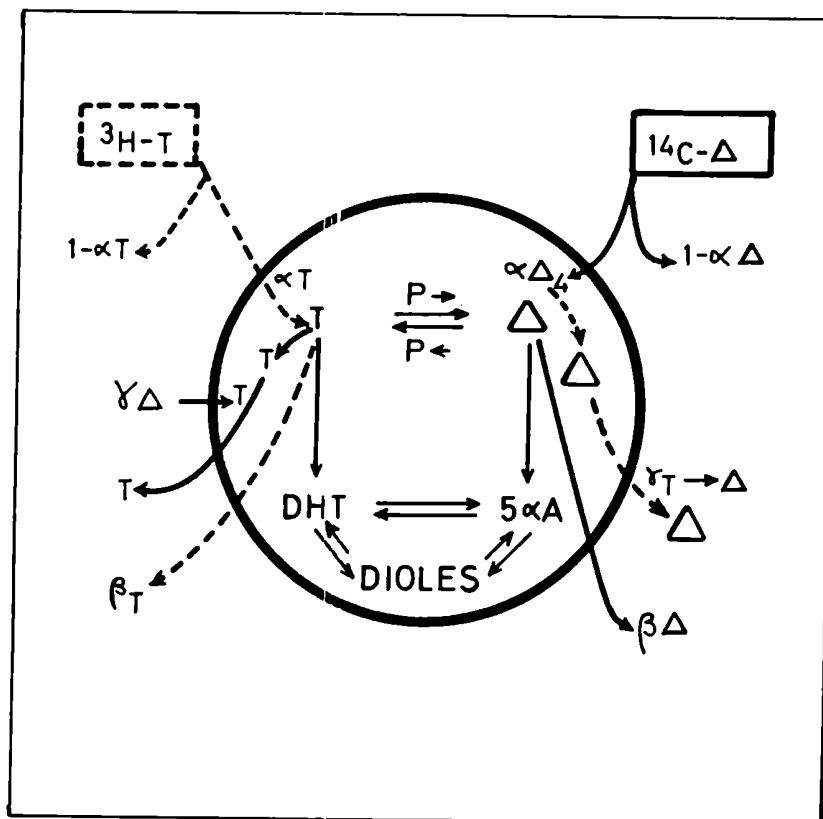
Los esteroides seleccionados como trazadores fueron [3H]T y [14C]A, los cuales se superfundieron y analizaron según se ha detallado en MATERIALES Y METODOS (M.1.5 ). Un esquema que muestra dichos parámetros, ejemplificado específicamente para los andrógenos superfundidos en epidídimo humano , se presenta en la FIGURA 6.

El estudio se realizó sobre 3 muestras CONTROL, pertenecientes a tejido epididimario humano de pacientes con carcinoma prostático, que no recibieron terapia hormonal o de radiación, . Paralelamente se estudió el metabolismo tejido proveniente de tres pacientes que recibieron terapia estrogénica (DES 2,5 mg/día).

En primer lugar se calcularon las concentraciones de todos los metabolitos analizados (DHT, Dioles, 5 $\alpha$ A), así como las correspondientes a los precursores (T y A), para ambos isótopos, en tejido y superfusado en estado estacionario isotópico. Los resultados se presentan en la TABLA 2. Según se observa, se encontró una activa interconversión entre ambos precursores, T y A, que se evidenció por la presencia de [3H]A y [14C]T. Por otra parte, se detectaron importantes cantidades de compuestos



FIGURA 6



Metabolismo androgénico en epidídimo humano. Análisis por superfusión. Esquema que representa los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\rho$  analizados para el par de precursores seleccionados [ $3H$ ]T y [ $14C$ ] A.( $\Delta$ )

La línea punteada refiere al destino del precursor T, y las líneas llenas gruesas al correspondiente a A. También se representan una serie de conversiones de los precursores a sus metabolitos, los que fueron analizados en forma conjunta.

TABLA 2

Exp	Medio de Sup.				Tejido			Superfusado				
	T	A	T	A	DHT	Diol	5 $\alpha$ A	T	A	DHT	Diol	5 $\alpha$ A
CONTROL												
1 [3H]	8,0	-	22	3,6	5,5	4,5	0,13	6,6	0,21	0,22	0,02	
0,01												
[14C]	-	1400	350	2500	920	120	25	43	330	3,1	0,82	
1,9												
2 [3H]	7,0	-	72	5,5	84	30	32	7,5	0,11	0,22	0,22	
0,33												
[14C]	-	360	210	2300	400	460	1000	4,8	170	17	7,4	14
3 [3H]	10	-	80	19	48	12	12	7,5	0,11	0,21	0,22	
0,34												
[14C]	-	480	250	4100	2300	250	1600	4,9	340	16	7,3	14
TRATADO CON ESTROGENOS												
4 [3H]	12	-	59	2,0	0,35	5,3	0,15	13	0,12	0,04	0,04	
0,1												
[14C]	-	890	1100	2900	37	41	19	82	700	2,5	0,81	
0,13												
5 [3H]	34	-	-		0,12	23	0,05	-	-	0,2	0,53	
0,04												
[14C]	-	580	-	-	2,6	82	1,5	-	-	4,3	2,3	
1,6												
6 [3H]	40	-	63	2,0	5,0	3,2	0,3	8,2	0,14	0,12	0,2	
0,01												
[14C]	-	860	130	720	130	32	67	7,3	170	4,4	4,7	
1,4												

TABLA 2-Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano . Análisis por superfusión. Concentraciones de esteroides en tejido y superfusado evaluadas en tejido control y tratado con estrógenos.

Las concentraciones de los precursores (T y A) y metabolitos (DHT, Dioles y 5  $\alpha$  A) se expresan en pmol/g.tej en tejido y pmol/ ml en superfusado y en medio superfundido.

5  $\alpha$  reducidos (DHT, Dioles y 5 $\alpha$  A) tanto en el tejido como en el superfusado, lo cual fue indicativo de un activo metabolismo y secreción.

A partir de estos resultados y conociendo las cantidades de precursores superfundidas en cada ensayo, así como los volúmenes de medios en las distintas fracciones y peso de tejido, se calcularon los coeficientes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$  y  $\gamma$  para cada experimento, resultados que se presentan en la TABLA 3. Los coeficientes de entrada ( $\alpha$ ) y liberación ( $\beta$ ) fueron similares para ambos compuestos superfundidos y no se modificaron significativamente luego de la terapia estrogénica. Los coeficientes de salida interconvertidos ( $\gamma$ ) tendieron a variar entre los distintos experimentos, lo cual hizo difícil su comparación. Sin embargo el tejido CONTROL liberó más A formada a partir de [3H]T que T formada a partir de [14C]A.

En la TABLA 4 se muestran los resultados correspondientes al coeficiente que indica el grado de interconversión intracelular de los precursores ( $\rho_{TA}$  y  $\rho_{AT}$ ), que expresan la fracción de precursores que entran a las células y son convertidos en productos antes de dejar las células o ser metabolizadas en forma irreversible. En el tejido normal  $\rho_{TA}$  resultó mayor que  $\rho_{AT}$ , mientras se

TABLA 3

PARAMETRO	CONTROL	TRATADO
	( $\bar{x} \pm ES; n=3$ )	
$\alpha$ T	0,37 $\pm$ 0,12	0,48 $\pm$ 0,17
$\alpha$ A	0,44 $\pm$ 0,23	0,51 $\pm$ 0,15
$\beta$ T	0,24 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,13
$\beta$ A	0,27 $\pm$ 0,22	0,11 $\pm$ 0,06
( $\beta / \alpha$ ) T	0,79 $\pm$ 0,36	0,38 $\pm$ 0,39
( $\beta / \alpha$ ) A	0,54 $\pm$ 0,24	0,23 $\pm$ 0,16
$\gamma$ T-A	0,041 $\pm$ 0,034	0,011 $\pm$ 0,006
$\gamma$ A-T	0,018 $\pm$ 0,007	0,036 $\pm$ 0,040

TABLA 3- Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano. Análisis por perfusión. Coeficientes de entrada ( $\alpha$ ), de liberación no convertido ( $\beta$ ) e interconvertido ( $\gamma$ ) del par [ $^3$ H]T y [ $^{14}$ C]A en tejido control y tratado con estrógenos.

El cálculo de los coeficientes se detalla en el APENDICE.

TABLA 4

	PARAMETRO ( $\bar{x} \pm ES; n=3$ )		
	$\rho$ T-A	$\rho$ A-T	$\rho$ T-A/ $\rho$ A-T
CONTROL	35 $\pm$ 5	4,0 $\pm$ 0,8	8,7 $\pm$ 0,5
TRATADO	6,6 $\pm$ 1,1	13 $\pm$ 5	0,5 $\pm$ 0,1 *

TABLA 4- Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano. Análisis por superfusión. Factor de conversión intracelular ( $\rho$ ) del par [3H]T y [14C]A en tejidos control y tratado con estrógenos.

El parámetro se calculó según se detalla en el APENDICE.

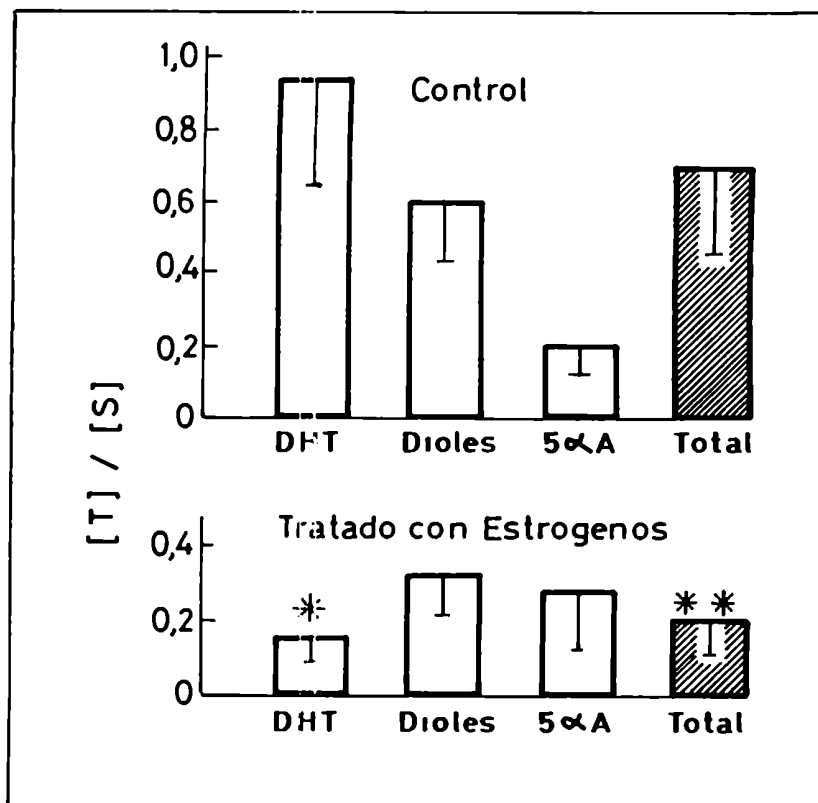
\*  $p < 0.0001$

observó lo opuesto en tejidos de pacientes estrogenizados. El tratamiento con estrógenos produjo un cambio claro del metabolismo hacia la vía reductiva frente a una predominancia de la vía oxidativa en el tejido CONTROL.

Sin embargo, cuando se calculó el cociente entre la cantidad de T y DHT intracelular en ambos lotes, se encontró un valor significativamente mayor en los tejidos tratados con estrógenos respecto de los controles (Control:  $0.37 \pm 0.05$  ;n=3 / Tratado:  $16 \pm 5$  ;n=3  $p < 0,025$ ). Esto indicó que, si bien la vía reductiva era cualitativamente importante en los tejidos tratados, cuantitativamente era muchas veces menor que la correspondiente al CONTROL.

Finalmente se evaluó la retención de compuestos  $5 \alpha$  reducidos en los controles y se comparó con los valores obtenidos en los tejidos de pacientes tratados con estrógenos. Los resultados se obtuvieron calculando el cociente entre los niveles de metabolitos en tejido y superfusado. Los valores obtenidos, expresados como promedio de 3 experimentos se muestran en la FIGURA 7. Como se observa, se encontró una significativa disminución en la retención en el tejido estrogenizado respecto del CONTROL, descenso que fue particularmente evidente para la

FIGURA 7



Metabolismo androgénico en epidídimo humano. Análisis por superfusión. Retención de metabolitos (DHT, Diones y 5αA) en tejidos control y tratados con estrógenos in vivo.

La retención de los compuestos se calculó a partir del cociente entre los niveles detectados en tejido y superfusado ( $\bar{x} \pm ES$ ).

\*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.025$

DHT( $p < 0,01$ ) compuesto descrito como el biológicamente activo en los tejidos efectores de andrógenos.

R.1.3 Evaluación de la actividad  $5\alpha$  reductasa en tejido CONTROL y tratado con estrógenos in vivo.

R.1.3.a) Por perfusión

La presencia de compuestos  $5\alpha$  reducidos en el tejido y perfusado fue indicativa del metabolismo de ambos precursores en el tejido epididimario humano en las condiciones ensayadas.

A partir de los resultados presentados en la TABLA 2, se había determinado que el tejido CONTROL era capaz de convertir  $\Delta 4-3$  ceto esteroides a  $5\alpha$  reducidos en condiciones relativamente similares a las descritas en otros tejidos blanco de andrógenos y sin agregado de NADPH exógeno. Por otra parte, el tejido tratado con estrógenos presentaba una escasa proporción de compuestos  $5\alpha$  reducidos de T y A, tanto en el tejido como en el perfusado.

Según se mencionó anteriormente, a partir de los resultados de perfusión se puede obtener una expresión de la actividad  $5\alpha$  reductasa calculando el porcentaje de

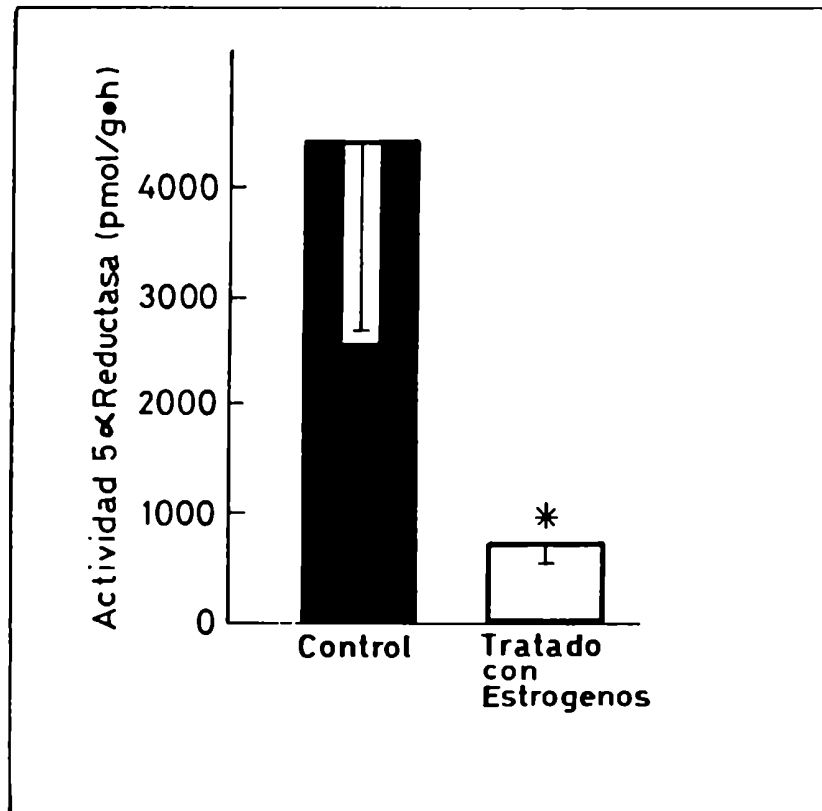


conversión de T y A a compuestos 5  $\alpha$  reducidos presentes en el tejido y en el superfusado, multiplicando dicho valor por la radiactividad total recuperada y dividiendo por el tiempo de incubación y al peso de tejido. Los resultados de este análisis se presentan en la FIGURA 8. Según se observa, los niveles de actividad enzimática en el tejido estrogenizado disminuyeron drásticamente, alcanzando un nivel correspondiente al 10% de los valores controles.

También se analizó la composición de los metabolitos 5  $\alpha$  reducidos de T en los tejidos controles y tratados con estrógenos; los resultados de este estudio se presentan en la TABLA 5. La proporción relativa de DHT en la fracción de metabolitos 5  $\alpha$  reducidos prácticamente no se modificó como consecuencia del tratamiento estrogénico; sin embargo se encontró un aumento significativo en la proporción relativa de Dioles en los tejidos tratados; conjuntamente los niveles de 5  $\alpha$  A decrecieron en 2,3 veces en el tejido estrogenizado; sin embargo su contribución no sobrepasó el 25% en tejido CONTROL.

R.1.3.b) Por incubación de cortes de tejido con [3H]T

FIGURA 8



Metabolismo androgénico en epidídimo humano. Análisis por superfusión. Actividad 5 α reductasa en cortes de tejido control y tratado con estrógenos.

La actividad se evaluó según se detalla en M.1.12., y se expresa en pmoles (LHT + Dicoles + 5 α A) /g.tej.h. ( $\bar{x} \pm ES$ ).

\*p<0,01

TABLA 5

Composición 5  $\alpha$  reducidos

LOTE	DHT	Dioles	5 $\alpha$ A
CONTROL	60 $\pm$ 17	15 $\pm$ 3	24 $\pm$ 13
TRATADO	52 $\pm$ 7	36 $\pm$ 4 *	13 $\pm$ 3

TABLA 5- Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano.  
Análisis por perfusión

Composición de metabolitos 5  $\alpha$  reducidos (DHT, Dioles y 5  $\alpha$  A) en tejidos control y tratados con estrógenos.

La composición se expresa en porcentaje de cada metabolito respecto del total de esos compuestos (DHT + Dioles + 5  $\alpha$  A) ( $\bar{x} \pm ES$ ).

Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones independientes.

\*  $p < 0,025$ .

La actividad de la enzima 5  $\alpha$  reductasa también fue evaluada a través de un ensayo consistente en la incubación de cortes de tejido en un medio conteniendo [3H]T en las condiciones detalladas en MATERIALES y METODOS.

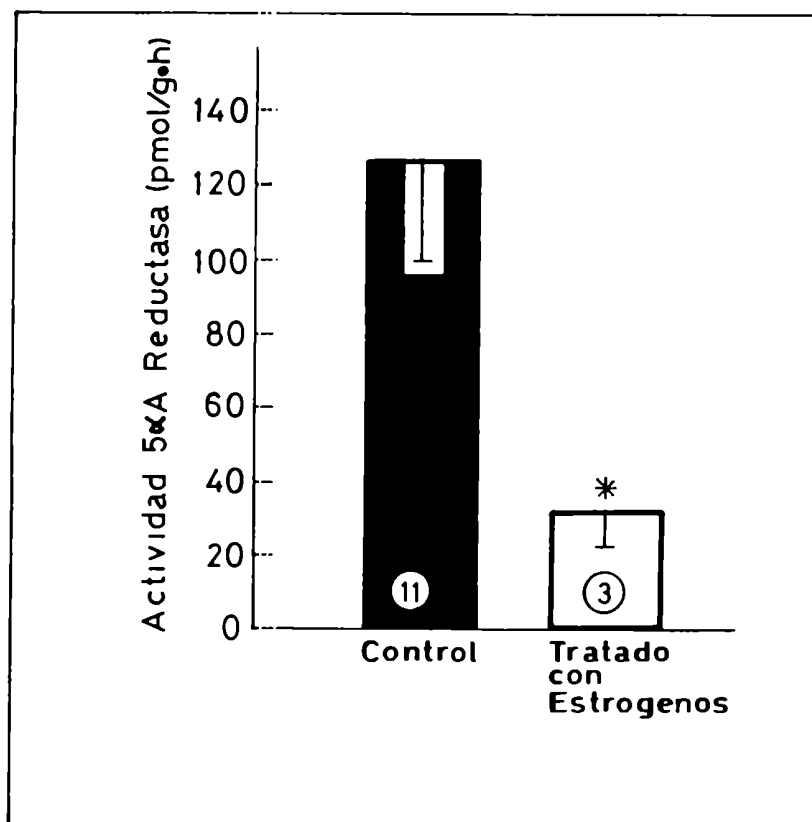
La medición se realizó sobre 11 tejidos CONTROL y 3 derivados de pacientes sujetos a terapia estrogénica. Según se observa en la FIGURA 9, la actividad enzimática en las muestras tratadas se redujo a un 20 % ( $p < 0.005$ ) del valor encontrado en los tejidos no tratados con estrógenos. Este valor concuerda con los resultados obtenidos empleando la técnica de perfusión.

A partir del análisis de la composición de los metabolitos 5  $\alpha$  reducidos se determinó que el porcentaje de DHT era del  $60 \pm 6\%$  en los controles, valor que disminuyó a  $47 \pm 8\%$  en los tejidos de pacientes estrogenizados. Por otra parte, la relación entre DHT y Diones no cambió significativamente cuando se midió con esta técnica.

R.1.4. Evaluación de la actividad 17  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa.

A partir del ensayo de incubación del tejido con [3H]T se evaluó el grado de conversión de T a A, indicativo de actividad 17  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa, la que se

FIGURA 9



Metabolismo androgénico en epidídimo humano. Actividad 5 α reductasa en cortes de tejido control y tratado con estrógenos in vivo incubados con [3H]T.

La actividad se determinó según se indica en M.1.9. y se expresa en pmoles (DHT + Diones + 5 α A)/ g.tej. h. ( $\bar{x} \pm ES$ ).

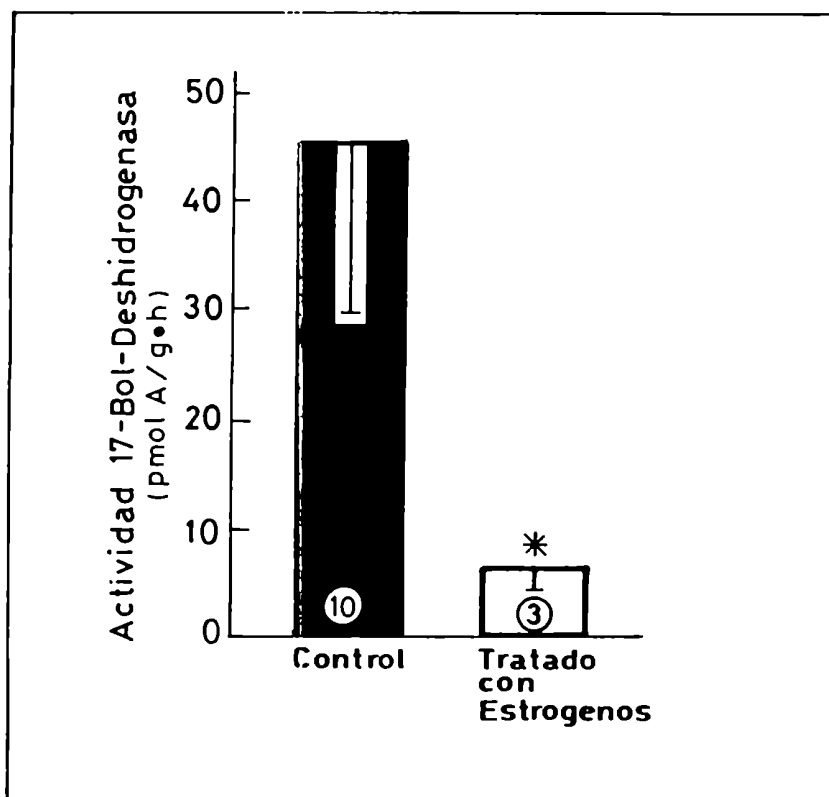
\*  $p < 0,005$ .

expresó en picomoles de A obtenidos a partir de 1 por unidad de peso y tiempo. Este análisis se realizó tanto en tejido CONTROL como tratado con estrógenos in vivo. Según se muestra en la FIGURA 10, la actividad de esta enzima se redujo en las muestras estrogenizadas en un 90 % respecto del CONTROL.

#### R.1.5 Aspecto histológico del tejido CONTROL y tratado con estrógenos .

Se realizaron estudios histológicos de cortes de tejido CONTROL y ESTROGENIZADO, con el objeto de verificar el efecto de la administración crónica de estrógenos sobre el epitelio del CAFUT epididimario. Las imágenes obtenidas, que se presentan en la FIGURA 11, permiten observar un decrecimiento de aproximadamente 5 veces de la altura del epitelio en los pacientes estrogenizados (FIGURA 11 c,d) respecto de la correspondiente a los tejidos controles (FIGURA 11 a,b). Además se encontró una marcada reducción en el tamaño y número de estereocilias que se ubican en el borde apical de las células epiteliales principales.

FIGURA 10

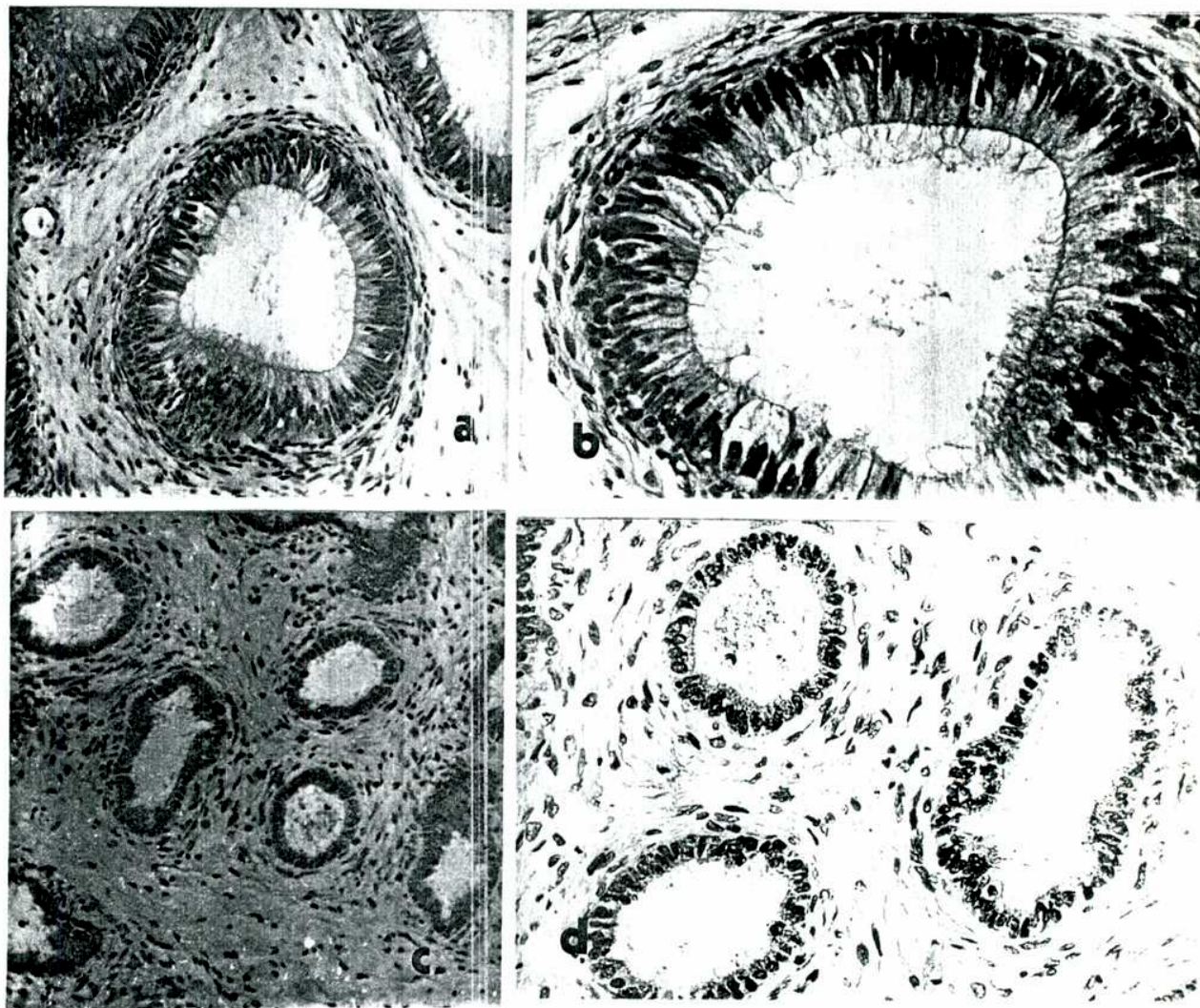


Metabolismo androgénico en el epidídimo humano. Actividad 17  $\beta$ hidroxiesteroide en cortes de tejido control y tratado con estrógenos.

La actividad se determinó según se indica en M.1.9 y se expresa en pmoles A/q.tej.h. ( $\bar{x} \pm ES$ ).

\*  $p < 0,0005$

FIGURA 11



Metabolismo androgénico en epidídimo humano. Aspecto histológico de los tejidos control y tratado con estrógenos.

Micrografías obtenidas de epidídimo humano del segmento CAPUT DISTAL. a) y b) tejido de pacientes no tratados ( aumento x365 y x730 respectivamente). c) y d) tejido de pacientes tratados con terapia de estrógenos ( aumento x365 y x730 respectivamente).



FARTE B-Estudio del metabolismo androgénico en tejido epididimario humano mantenido en cultivo de órgano. Efecto de diversos tratamientos hormonales.

R.1.6. Modelo experimental para el estudio del efecto del estado hormonal.

Luego de la evaluación del metabolismo androgénico en tejido epididimario humano CONTROL, se analizó el efecto del estado hormonal del órgano sobre las características del metabolismo androgénico teniendo en cuenta que, según se ha mencionado en la INTRODUCCION, en animales de experimentación se han observado importantes influencias hormonales sobre la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo androgénico.

Por lo tanto, se cuantificó la capacidad del epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano de convertir la T en compuestos  $5\alpha$  reducidos, DHT y Dioles, en diversas condiciones hormonales.

Para ello, se empleó una técnica de cultivo de órgano, en la que el tejido se mantuvo por hasta 6 días en un medio completo, con o sin el agregado de hormonas, en

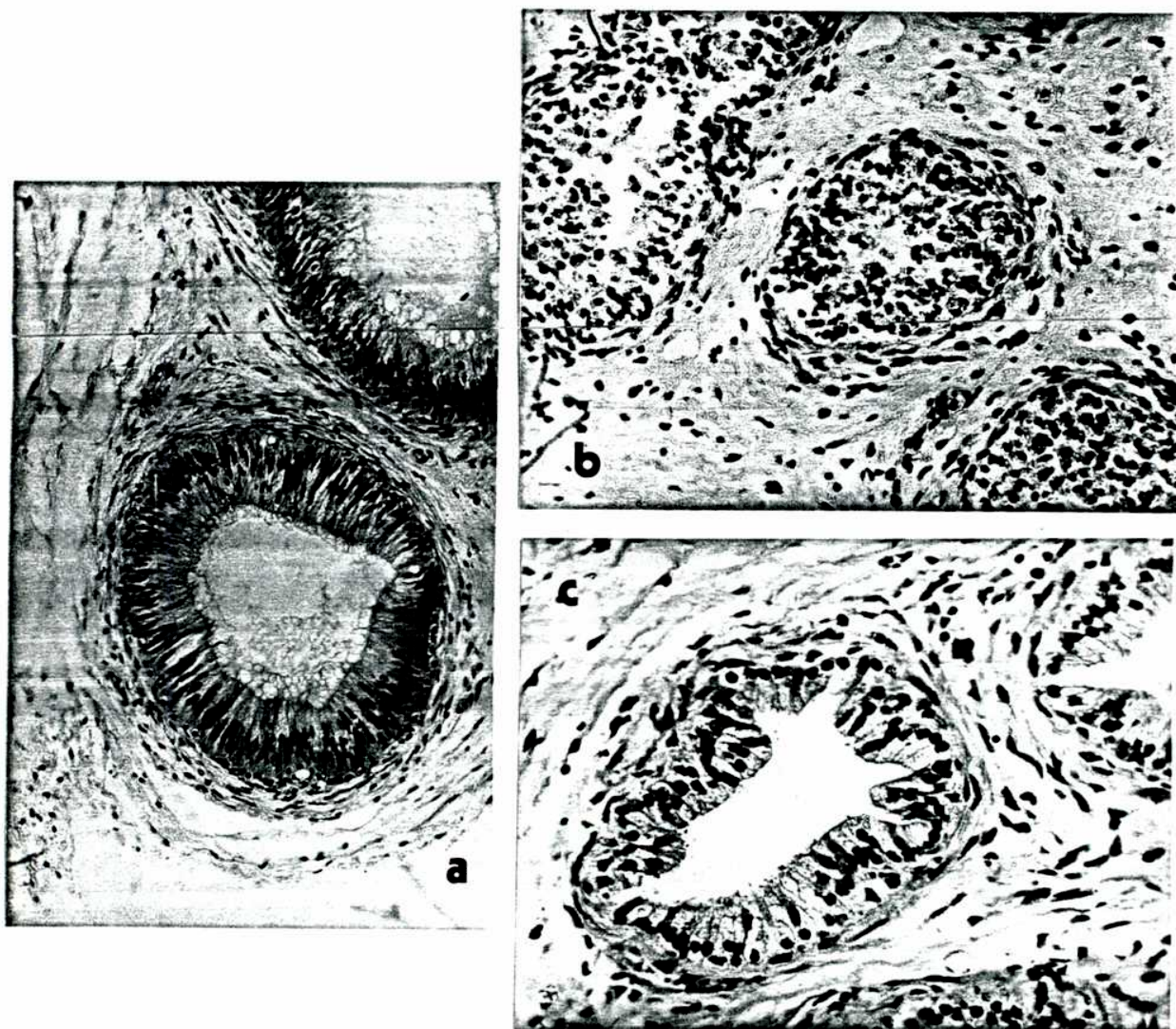
condiciones descritas en M.1.4. Se distinguieron varios lotes, entre ellos el DEPLECIONADO, en el que el tejido colocó en un medio libre de andrógenos, el ESTIMULADO y MANTENIDO, en los cuales el medio contenía T o DHT  $10^{-7}$  M durante distintos tiempos de cultivo. En algunos casos el tejido epididimario fue cultivado simultáneamente con tejido testicular; este lote se denominó CoCULTIVADO.

Una vez culminado el período de cultivo, los medios se descartaron y los tejidos se derivaron para los estudios de metabolismo androgénico por superfusión e incubación in vitro, análisis que se describen en los párrafos siguientes.

#### R.1.7. Control histológico del tejido cultivado

Se analizaron las características morfológicas de los tejidos cultivados en ausencia o presencia de andrógenos en el medio de cultivo, los cuales fueron comparados con las correspondientes a tejido no cultivado. Los cortes histológicos para tejido CONTROL, DEPLECIONADO y MANTENIDO aparecen en la FIGURA 12. Según se observa, el tejido CONTROL presentó un característico epitelio columnar alto, con gran cantidad de estereocilias. El análisis del tejido cultivado en un medio completo carente de andrógenos mostró

FIGURA 12



Metabolismo androgénico en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Control histológico del tejido.

Micrografías obtenidas de epidídimo humano del segmento CAPUT DISTAL. a) Sección de tejido control (no cultivado) (aumento x270), b) sección de tejido cultivado en ausencia de andrógenos (lote deplecionado) (x360); c) Sección de tejido cultivado en presencia de DHT  $10^{-7}$  M durante el lapso de cultivo (lote mantenido) (x360).

un decrecimiento en el tamaño celular y en el tamaño y número de estereocilias; además, la falta de andrógenos se manifestó en forma de una apreciable desorganización del epitelio, evidenciado por la pérdida de polarización celular. El tejido cultivado durante 6 días en presencia de andrógenos mantuvo las características morfológicas prácticamente idénticas a las observadas en el tejido CONTROL; la estimulación androgénica produjo un notable aumento de la altura del epitelio, fenómeno similar al descrito previamente por Tezón y Blaquier (285).

#### R.1.8.1 Evaluación del metabolismo androgénico. Análisis por perfusión

El metabolismo androgénico en tejido cultivado fue evaluado en forma similar a la descrita para el estudio en el tejido CONTROL.

Luego de transcurrido el tiempo en el que el tejido se mantuvo en cultivo de órgano, el metabolismo androgénico en los cortes de tejido fue analizado a través de la técnica de perfusión.

En este caso también se seleccionaron [ $^3$ H]T y [ $^{14}$ C]A como trazadores isotópicos.

En primer lugar se calcularon las concentraciones tanto de los precursores T y A como de los metabolitos en el tejido y en el superfusado en las distintas condiciones experimentales. En todos los casos se observó una activa interconversión de los precursores, así como una apreciable formación de metabolitos  $5 \alpha$  reducidos de T y A. Sin embargo, comparando los resultados de los distintos lotes experimentales, no fue posible detectar diferencias significativas en los diversos grupos sometidos a los distintos tratamientos hormonales.

A partir de esos resultados se calcularon algunos parámetros dinámicos en los diversos grupos experimentales, relativos a la entrada y liberación de los precursores superfundidos definidos detalladamente en el APENDICE, descriptivos del metabolismo androgénico. Los valores obtenidos para el lote MANTENIDO no fueron diferentes de los correspondientes al lote ESTIMULADO. El resultado correspondiente al promedio de tres determinaciones independientes se presentan en la TABLA 6. Al igual que para los estudios presentados en la PARTE A se encontró una notable variabilidad de los resultados, que condujo a desviaciones apreciables. A pesar de ello, los valores de los diversos coeficientes fueron similares en los distintos lotes cultivados. no observándose modificaciones

TABLA 6

PARAMETRO	LOTE ( $\bar{x} \pm ES$ ; n=3)	
	DEFLECCIONADO	ESTIMULADO
$\alpha$ T	0,51 $\pm$ 0,21	0,45 $\pm$ 0,24
$\alpha$ A	0,45 $\pm$ 0,2	0,39 $\pm$ 0,2
$\beta$ T	0,11 $\pm$ 0,1	0,07 $\pm$ 0,02
$\beta$ A	0,11 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,23
( $\alpha/\beta$ ) T	0,40 $\pm$ 0,3	0,39 $\pm$ 0,3
( $\alpha/\beta$ ) A	0,44 $\pm$ 0,3	0,45 $\pm$ 0,3
$\gamma$ T-A	0,11 $\pm$ 0,1	0,38 $\pm$ 0,2
$\gamma$ A-T	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
$\rho$ T-A	0,30 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,9
$\rho$ A-T	0,17 $\pm$ 0,1	0,09 $\pm$ 0,03

TABLA 6-Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Análisis por perfusión. Coeficientes de entrada ( $\alpha$ ), liberación no convertidos ( $\beta$ ) e interconvertidos ( $\gamma$ ), coeficientes de conversión intracelular ( $\rho$ ) del par [3H]T y [14C]A en tejido cultivado en distintas condiciones hormonales.

Los coeficientes se calcularon según se detalla en el APENDICE.

importantes como consecuencia del agregado de andrógenos con respecto al lote deplecionado de hormonas. Cuando se compararon los valores de los coeficientes para los distintos lotes cultivados con los correspondientes al lote CONTROL, tampoco se encontraron diferencias significativas.

R.1.9. Evaluación de la actividad  $5\alpha$  reductasa.

R.1.9. a) Por superfusión

Posibles variaciones de la actividad  $5\alpha$  reductasa, producidas como consecuencia del tratamiento hormonal, fueron analizadas en los distintos grupos de tejido epididimario mantenido en condiciones de cultivo de órgano.

Los resultados del análisis de superfusión se muestran en la TABLA 7 ; en este caso, la actividad enzimática fue evaluada como se indicó en M.1.11, expresándose el valor obtenido en cada grupo cultivado como porcentaje respecto del valor obtenido para el CONTROL.

Cuando los valores correspondientes a los tejidos cultivados en ausencia o presencia de andrógenos se compararon con el obtenido para el tejido CONTROL, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los

TABLA 7

Actividad 5 $\alpha$ reductasa	
LOTE	(pmoles / g. h.) ( $\bar{x} \pm ES$ )
CONTROL	4616 $\pm$ 1771
DEPLECIONADO	11340 $\pm$ 8076
ESTIMULADO	3970 $\pm$ 1983

TABLA 7-metabolismo de andrógenos en el epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Análisis por superfusión. Actividad 5  $\alpha$  reductasa en los distintos lotes experimentales.

Las características experimentales de los distintos lotes analizados se detallan en MATERIALES y METODOS.

La actividad 5  $\alpha$  reductasa se expresa en pmoles / g. tej. h. Los resultados corresponden a tres determinaciones independientes.



casos analizados.

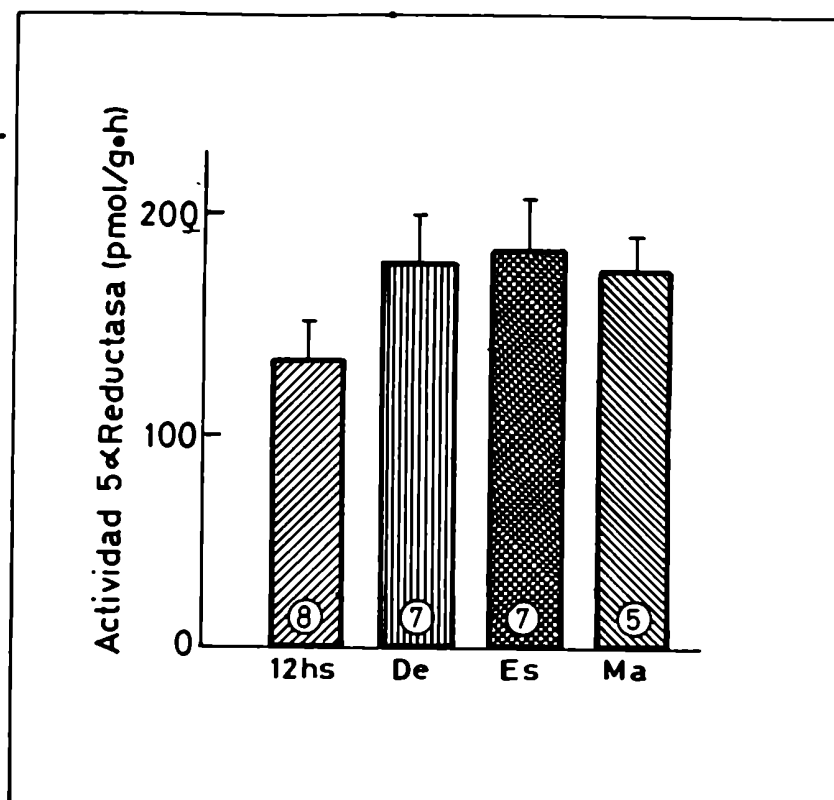
El análisis de la actividad  $5\alpha$  reductasa en los diversos lotes cultivados mostró un valor mayor, aunque no significativo de la actividad enzimática en el tejido deplecionado de andrógenos, respecto del correspondiente al tejido cultivado en presencia de la hormona.

R.1.9. b. Por incubación con [3H]T

Los niveles enzimáticos de la actividad  $5\alpha$  reductasa también fueron evaluados a través de la incubación del tejido proveniente de los lotes cultivados con [3H]T como sustrato de la reacción enzimática.

Los resultados de este ensayo se presentan en la FIGURA 13. Según se observa, los niveles de actividad en los distintos lotes fueron marcadamente similares entre sí (alrededor de 200 pmol / g.tej.h), similares a los resultados obtenidos por superfusión. Cuando se compararon los valores de la actividad enzimática de los lotes cultivados con los correspondientes al CONTROL se encontró que los tejidos cultivados durante 12 horas presentaban niveles de actividad enzimática similares a los evaluados en los controles no cultivados; sin embargo, en todos los tejidos cultivados se encontró una actividad

FIGURA 13



Metabolismo androgénico en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Actividad 5α reductasa en cortes de tejido previamente cultivado en distintas condiciones hormonales.

La actividad se determinó según M.1.9 y se expresa en pmoles (DHT + Dloles) /g.tej. h.. Las barras corresponden a los resultados para los lotes 12hs:(tejido cultivado 12 hs sin andrógenos), De (deplecionados de andrógenos), Es (estimulados con andrógenos durante 3 días luego de una depleción de la hormona por el mismo tiempo y Ma (cultivado en presencia de andrógenos durante todo el lapso del cultivo. Los números dentro de las barras representan el número de determinaciones independientes.

significativamente superior ( $p < 0,025$ ) que la evaluada para el control, la que alcanzó valores de  $105,7 \pm 15,2$  fmoles/gr.h. ( $n=10$ ).

A partir de este análisis se evaluó el efecto de la ausencia o presencia de andrógenos sobre la composición de metabolitos  $5\alpha$  reducidos, DHT y Dioles, no encontrándose diferencias significativas entre los lotes cultivados, así como tampoco respecto del tejido CONTROL. Los resultados de este análisis aparecen en la TABLA 8.

Dado que los valores obtenidos para la actividad  $5\alpha$  reductasa en tejidos estimulados con T no eran apreciablemente distintos de los correspondientes a los cultivados en ausencia de andrógenos, se realizó una serie de experimentos estimulando con DHT a la misma concentración (la que había mostrado un efecto similar al de T sobre la morfología epididimaria del tejido cultivado), de forma tal de reducir un posible efecto de dilución isotópica. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron diferentes de los correspondientes a la estimulación con T.

Algunos autores han argumentado que componentes testiculares transportados en el fluido testicular serían necesarios para la producción del efecto androgénico en el epidídimo en algunas especies. Teniendo en cuenta la

TABLA 8

Composición 5  $\alpha$  reducidos

LOTE	DHT	Dioles
DEPLECIONADO	57 $\pm$ 3	43 $\pm$ 8
ESTIMULADO	57 $\pm$ 6	43 $\pm$ 4
MANTENIDO	57 $\pm$ 5	43 $\pm$ 5

TABLA 8- Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano . Composición de compuestos 5  $\alpha$  reducidos (DHT y Dioles) en los distintos lotes cultivados.

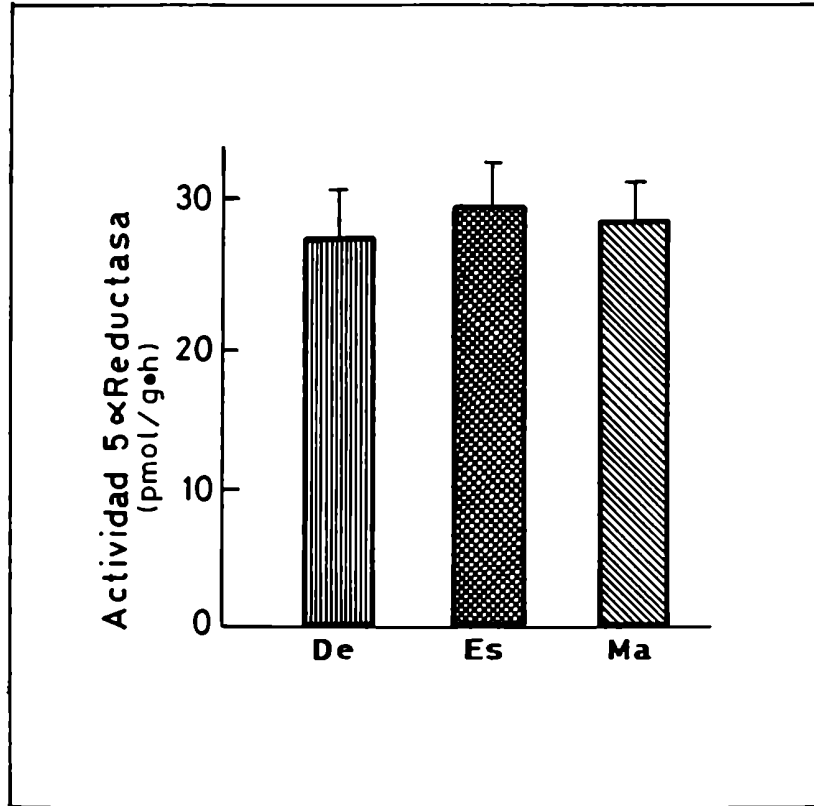
La composición se calculó a partir del porcentaje de cada metabolito respecto del total de esos compuestos ( $\bar{x} \pm ES$ ).

Los resultados corresponden al promedio de 7 determinaciones independientes.

falta de respuesta al estímulo androgénico, se realizó un experimento piloto en el que se agregaron trozos de tejido testicular al cultivo de tejido epididimario en una proporción de un 20% en peso. Ese cocultivo se mantuvo en las mismas condiciones que el lote MANTENIDO. Sin embargo la actividad 5  $\alpha$  reductasa, resultó ser similar a la del tejido cultivado sin el agregado del componente testicular (  $229 \pm 40$  pmoles (DHT + Dioles)/g.h; ; n=2 ).

Dado que la actividad de la enzima 5  $\alpha$  reductasa requiere la presencia de NADPH como cofactor, y que los niveles endógenos del cofactor no se conocían en las condiciones de ensayo del tejido cultivado, se realizó un estudio de la actividad de la enzima en tejido con agregado exógeno de NADPH a una concentración  $5 \times 10^{-4}$  M, descripta como óptima para la enzima epididimaria en otros mamíferos. La actividad se ensayó sobre una alícuota de homogenato en la cual la concentración de proteína total no superó 0,5 mg/ml; esta concentración fue elegida en un estudio previo, en el que se encontró que a concentraciones mayores se producía una disminución de la actividad enzimática. La actividad se midió en tejidos cultivados en ausencia (DEFLECCIONADO) y presencia (ESTIMULADO y MANTENIDO) de andrógenos. Los resultados de este estudio se presentan en la FIGURA 14. Los resultados

FIGURA 14



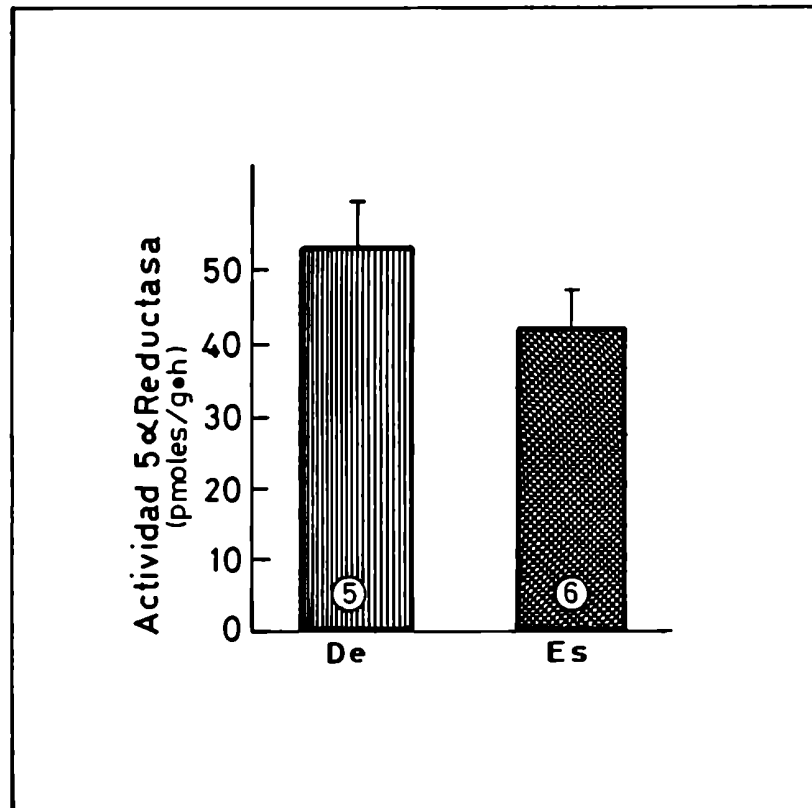
Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Actividad 5 $\alpha$ reductasa en homogenato de tejido en presencia de NADPH exógeno.

La actividad se evaluó según se detalla en M.1.8 en presencia de NADPH  $5 \times 10^{-4}M$ . y se expresa en pmoles (DHT + Dioles)/ g.tej. h. La medición se realizó sobre los tejidos de los lotes De, Es y Ma cuyas características se describen en la FIGURA 13. Los resultados corresponden a 5 determinaciones independientes ( $\bar{x} \pm ES$ ).

en ambos grupos fueron similares, no observándose diferencias en la actividad en ambos lotes luego del agregado de cofactor.

La concentración de T seleccionada para el presente estudio es la óptima para la estimulación de la síntesis proteica y de ADN, y para mantener la morfología del epidídimo humano (285). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito en el epidídimo humano una concentración óptima para la estimulación de esta enzima luego de un período de depleción androgénica. Desafortunadamente, la cantidad de tejido epididimario mantenido en cultivo de órgano resulta insuficiente para la realización de un estudio dirigido a la determinación de dicha concentración. Sin embargo considerando que quizá la concentración utilizada fuera menor que la necesaria para producir el efecto estimulador, los tejidos fueron estimulados con una concentración androgénica mayor, agregando al medio de cultivo del lote ESTIMULADO DHT a una concentración  $5 \times 10^{-6}M$  en DMF (dimetilformamida) 5%. El esquema de cultivo se modificó parcialmente, ya que el tiempo de depleción alcanzó a dos días, seguido del mismo período de estimulación. Los resultados se muestran en la FIGURA 15. Analizando los resultados se observa que, a pesar de haber empleado una dosis mayor de estimulación, no se pudo

FIGURA 15



Metabolismo androgénico e epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Actividad 5α reductasa en cortes de tejido cultivado con DHT  $5 \times 10^{-6}$ M.

La actividad de la enzima se evaluó sobre tejido cultivado en ausencia (De) y en presencia de andrógenos luego de un período de depleción (Es). La concentración seleccionada para la estimulación fue de  $5 \times 10^{-6}$  de DHT. Los números dentro de las barras representan el número de determinaciones independientes.



encontrar un efecto estimulador de los andrógenos sobre la actividad  $5\alpha$  reductasa.

R.1.10. Fraccionamiento de tejido epididimario: Medición de actividad  $5\alpha$  reductasa en epitelio y estroma.

A partir de los tejidos provenientes de los distintos lotes cultivados, así como de tejido CONTROL, se obtuvieron dos poblaciones celulares, una enriquecida en células epiteliales y otra en tejido conectivo o estroma, sobre las que se midieron la actividad enzimática  $5\alpha$  reductasa .

Para ello, según se detalló en M.1.7, luego de picar finamente el tejido, se realizó la separación de las subpoblaciones celulares empleando un método consistente en la disrupción del tejido y filtración selectiva a través de una malla metálica.

Se obtuvieron alícuotas del filtrado (enriquecido en células epiteliales) y de la fracción retenida en el filtro (estroma), y se incubaron en un medio conteniendo [3H]T, luego de lo cual se evaluó la formación de compuestos  $5\alpha$  reducidos, índice de la actividad  $5\alpha$  reductasa, expresada en relación al peso total de tejido por hora de incubación.

En la TABLA 9 se presentan los resultados correspondientes a la medición de la actividad enzimática en los diversos lotes cultivados. Los resultados corresponden a cuatro determinaciones independientes. Según se observa en en todos los lotes cultivados, la actividad  $5\alpha$  reductasa predominó en la fracción enriquecida en epitelio, mientras que el estroma no superó en ningún momento el 15% de la actividad total.

R.1.11. Evaluación de la actividad  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa en epidídimo humano .

R.1.11.a) Sobre cortes de tejido

Según se mencionó previamente la actividad de esa enzima se mide a través de la formación de  $[3H]A$  luego de la incubación del tejido con  $[3H]T$ . Dicho estudio se realizó sobre muestras de tejido CONTROL y cultivado en distintas condiciones hormonales. Los resultados de ese estudio se presentan en la FIGURA 16. Los tejidos cultivados presentaron una actividad menor respecto de la correspondiente al tejido CONTROL. Sin embargo, cuando se comparó el efecto de la ausencia (DEPLECIONADO) o presencia de andrógenos en el medio de cultivo sobre la actividad enzimática, las diferencias observadas no fueron

TABLA 9

LOTE	Actividad 5 $\alpha$ reductasa	
	( $\bar{x} \pm ES$ )	
	Actividad Total <sup>^</sup>	Fracción epitelial (%) <sup>@</sup>
CONTROL	91 $\pm$ 17	88,2 $\pm$ 1,9
DEPLECIONADO	278 $\pm$ 10	93,5 $\pm$ 0,7
ESTIMULADO	265 $\pm$ 92	89,2 $\pm$ 1,1
MANTENIDO	343 $\pm$ 99	89,5 $\pm$ 1,5
Co-CULTIVADO	200	85

TABLA 9- Metabolismo de andrógenos en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Actividad 5  $\alpha$  reductasa en epitelio y estroma.

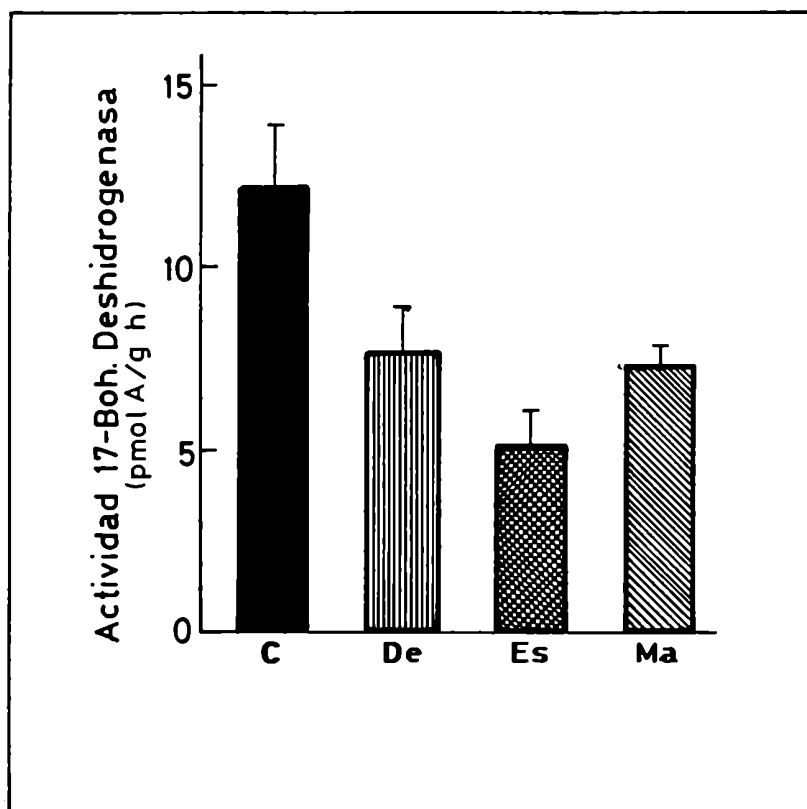
El fraccionamiento del tejido se realizó según se detalla en MATERIALES y METODOS ( M.1.7).

<sup>^</sup>La actividad total de la enzima 5  $\alpha$  reductasa se expresa en pmoles de compuestos 5  $\alpha$  reducidos/g.tej.h;

<sup>@</sup>La actividad enzimática presente en la fracción epitelial se expresa como porcentaje del total (Epitelio + Estroma).

Los resultados corresponden al promedio de 4 determinaciones independientes, excepto en el caso del lote cocultivado con testículo, determinado solo en un caso.

FIGURA 16



Metabolismo androgénico e epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Actividad 17  $\beta$  hidroxioesteroide deshidrogenasa en tejido previamente cultivado en distintas situaciones hormonales.

La actividad se midió en tejido control no cultivado (C) y cultivado en ausencia (De) o presencia de andrógenos (Es, Ma). La actividad se expresa en pmoles A/g.tej.h. ( $\bar{x} \pm ES$ ).

significativas.

R.1.11.b) Sobre fracción epitelial y estroma

El análisis de la actividad  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa en las fracciones epitelial y estroma, obtenidas a partir de tejido CONTROL no cultivado, indicó que la mayor parte de la actividad enzimática se localizaba en la fracción epitelial, alcanzando aproximadamente un 80% del total evaluado; por otra parte, dicho valor no se modificó en el tejido cultivado en ausencia o presencia de andrógenos.

## DISCUSION

Como en otros tejidos blanco para andrógenos, la acción de la T testicular en el epidídimo es ejercida principalmente a través de su metabolito  $5\alpha$ reducido, la DHT, producida localmente por la acción de la enzima  $5\alpha$ reductasa.

Numerosas investigaciones han permitido determinar que la DHT es el andrógeno biológicamente activo en tejidos efectores de esas hormonas (131,132,133) y, por consiguiente, que la  $5\alpha$  reducción de T es un paso fundamental en el mecanismo de acción de andrógenos. Sumado a esto, se ha descrito la regulación de la actividad de esta enzima por diversas hormonas, principalmente por andrógenos, mecanismo que podría estar involucrado en la regulación de la función epididimaria dependiente de andrógenos.

Por lo tanto resultó de gran interés estudiar la actividad de la enzima responsable de la reducción de T en el tejido epididimario humano y sus posibles modificaciones en diversos estados hormonales.

El sistema cromatográfico seleccionado para la separación de los esteroides analizados fue descrito previamente (275), y permite una separación nítida de los esteroides estudiados T, A, DHT, Dioles y 5  $\alpha$ A, si bien no permite discriminar entre los isómeros 3  $\alpha$  y 3  $\beta$  del androstandiol, dado que presentan la misma movilidad cromatográfica.

A partir de la radiactividad total recobrada en la placa y la correspondiente a cada esteroide analizado se calcularon los porcentajes de conversión para cada compuesto.

En la expresión de la actividad de la enzima se incluyeron las contribuciones de los metabolitos DHT y Dioles. Los Dioles son medidos en adición a la DHT pues el producto de la reacción primaria es el sustrato para la segunda, correspondiente a la reducción del 3 ceto por la 3 (  $\alpha$  ,  $\beta$  ) hidroxisteroide deshidrogenasa. En algunos casos también se incluyó la 5  $\alpha$  A como parte de la expresión de la actividad de la enzima, compuesto que se había encontrado en un análisis del metabolismo androgénico en epidídimo humano empleando A como precursor (144).

Empleando un procedimiento similar, la actividad de la enzima  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa fue medida a partir de la radiactividad asociada a T convertida en A, recuperada en la placa cromatográfica, luego de la incubación de cortes de tejido y posterior separación.

La activa conversión de T a metabolitos  $5\alpha$  reducidos determinados en este estudio coinciden con los obtenidos por Gloyna y Wilson (140), Sulkova y Starka (144), de Larminat y colaboradores (139), Kinoshita y colaboradores (289) y Tezón y colaboradores (203), quienes habían descrito un apreciable metabolismo de T a compuestos  $5\alpha$  reducidos en epidídimo humano.

La máxima actividad de la enzima  $5\alpha$  reductasa encontrada en homogenato del segmento CAPUT distal, confirma resultados previos de estudios en animales (290) y se pueden correlacionar con los de de Larminat y colaboradores (139), quienes habían encontrado que la máxima captación de andrógenos se producía en el segmento proximal al testículo, encontrándose en dicho segmento la mayor metabolización de T a DHT y Dioles. Esta apreciable metabolización de T podría ser fisiológicamente importante en el mecanismo de la acción de los andrógenos en el epidídimo humano. Purvis y colaboradores (121) midieron la



concentración de andrógenos endógenos en testículo y epidídimo humano y encontraron que la relación T/DHT alcanzaba un valor de 106 en el testículo y se reducía a 3,6 en el epidídimo, cambio debido no solo a la disminución del contenido de T en el epidídimo sino por el hecho que el epidídimo contenía más del doble de DHT que el testículo, y producida localmente.

Los siguientes ensayos para la medición de la actividad de las enzimas estudiadas se llevaron a cabo con cortes de tejido ya que, estudios realizados por Moore y Wilson indicaban que la actividad detectada por incubación de cortes había mostrado ser en promedio un 25% más alta que la determinada en homogenato (135).

La aplicación del modelo experimental de superfusión permitió determinar algunos parámetros descriptivos del metabolismo androgénico. Esta técnica se caracteriza por la infusión de un medio conteniendo dos compuestos biológicamente relacionados marcados con isótopos radiactivos. A partir de los resultados experimentales es posible calcular, en base a un modelo matemático, parámetros relacionados con la entrada y salida de los precursores superfundidos a la célula así como vías metabólicas preferenciales del tejido estudiado.

Este esquema experimental presenta una serie de ventajas respecto de los métodos tradicionales de evaluación de metabolismo ya que es un estudio dinámico en el que existe continua remoción de sustratos y productos, lo que elimina efectos de inhibidores o variaciones en la concentración de sustrato ; además las concentraciones de andrógenos empleadas son semejantes a las fisiológicas, no siendo necesario trabajar con un exceso de sustrato ni a tiempos tan cortos de forma tal que la concentración de sustrato permanezca constante.

El resultado del análisis de los precursores y metabolitos fue indicativo de una activa interconversión entre T y A, así como también de una apreciable  $5\alpha$  reducción.

El descenso generalizado en la formación de compuestos  $5\alpha$  reducidos en tejido sometido a terapia de estrógenos in vivo está de acuerdo con los estudios realizados por Leinonen y colaboradores quienes, determinando las concentraciones de algunos andrógenos en el epidídimo humano en tejido control y estrogenizado in vivo, concluyeron que las concentraciones de A, T y DHT disminuían significativamente como consecuencia de la terapia estrogénica (291).

Los valores correspondientes a los coeficientes de entrada ( $\alpha$ ) y liberación ( $\beta$ ) no se modificaron con la naturaleza y concentración de los compuestos superfundidos, así como tampoco fueron afectados por la administración de estrógenos, lo cual sugirió la presencia de un mecanismo pasivo de entrada y liberación de los precursores de la célula epididimaria.

Sin embargo debe tenerse en cuenta que, en las condiciones ensayadas, no puede ser medido un posible efecto de proteínas transportadoras de andrógenos presentes tanto en el fluido luminal así como en la sangre, las que podrían afectar los niveles de andrógenos libres captados por el tejido.

La determinación de las vías metabólicas principales se realizó a partir del análisis de las actividades de la 5  $\alpha$  reductasa y 17  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa, así como a partir del coeficiente  $\rho$ , relacionado con la interconversión de los precursores seleccionados.

Los resultados correspondientes al análisis comparativo entre los tejidos Control y Estrogenizado confirman la importancia cuantitativa de la formación de metabolitos 5  $\alpha$  reducidos en el epidídimo humano (139,292)

la diferencia más apreciable entre los tejidos controles y tratados con estrógenos fue la marcada caída de la actividad de la enzima  $5 \alpha$  reductasa, determinada tanto por el método de superfusión como por la incubación de cortes de tejido con  $[3H]T$ , y producida como consecuencia del tratamiento con estrógenos, inhibición previamente descrita en varios tejidos blanco de andrógenos (293,294,295), aunque solo en forma indirecta en el epidídimo humano (147).

Los tejidos tratados con estrógenos in vivo mostraron además una disminución en la formación de A a partir de T, observada a través de la evaluación de la  $17 \beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa y por los valores de la relación del coeficiente  $\rho TA / \rho AT$ . Este hecho quedó además reflejado en la disminución de la liberación de A no convertida, obtenida a partir del parámetro  $(\beta / \alpha)A$ .

La comparación del valor de la relación  $\rho TA \neq \rho AT$  entre los tejidos control y tratado con estrógenos in vivo sugirió una desviación del equilibrio  $T \rightleftharpoons A$  hacia la vía reductiva en el tejido estrogenizado. Sin embargo esa desviación no fue cuantitativamente importante, y no prosiguió hacia metabolitos biológicamente activos, pues la actividad  $5 \alpha$  reductasa se redujo, en tejidos

estrogenizados, a un 20% del control.

Los niveles de actividad 17  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa también disminuyeron significativamente luego de la terapia estrogénica.

La predominancia de la vía reductiva en el tejido estrogenizado podría ser explicada considerando una posible regulación por los estrógenos de los cocientes intracelulares NADP<sup>+</sup>/NADPH, los que, de esa forma, afectarían la dirección del proceso de interconversión modulando la actividad de la 17  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa en uno u otro sentido. Un fenómeno de este tipo ha sido descrito por Yochin y Maloney en endometrio de rata (296,297), tejido en el que se encontró que los estrógenos ejercían un efecto regulador de los niveles de cofactor en la forma reducida y oxidada.

En relación a la regulación de los niveles de cofactor, en epidídimo de rata se ha descrito la regulación hormonal por andrógenos del ciclo de la pentosa fosfato (298), pero no se tienen hasta el presente evidencias de la existencia de un efecto producido por los estrógenos. Por otra parte, la predominancia de la vía oxidativa en la próstata de rata luego de la terapia estrogénica (299) podría ser explicada por diferencias

tanto del tejido en estudio, como de la especie en cuestión.

La composición de los metabolitos  $5\alpha$  reducidos descripta para el tejido control se modificó como consecuencia del tratamiento estrogénico, observándose un incremento en el porcentaje de Dioles a expensas principalmente de los niveles de  $5\alpha$  A. Este incremento, sin embargo, no fue detectado a través del ensayo de incubación con [ $^3$ H]T.

Los estrógenos no solo afectaron la producción de compuestos  $5\alpha$  reducidos, sino que también disminuyeron significativamente su retención; en los pacientes tratados con estrógenos, la retención de DHT, Dioles y  $5\alpha$  A se redujo a un tercio del valor del control ( $p < 0,025$ ). Este efecto fue más pronunciado para DHT ( $p < 0,01$ ) que es el metabolito de mayor acción biológica.

El balance de los estudios de metabolismo androgénico en epidídimo humano control mostró una importante formación de compuestos  $5\alpha$  reducidos de T, así como su retención, probablemente relacionada con la presencia de proteínas receptoras de andrógenos involucradas de acción androgénica característico de los tejidos blanco de esas hormonas. El tratamiento con estrógenos in vivo produjo una disminución

en la conversión de T a A; por otra parte, esa disminución no trajo aparejado un aumento cuantitativo en la formación de compuestos  $5 \alpha$  reducidos, los cuales alcanzaron a valores del 20% del control, y además pues fueron liberados al medio en su mayor parte. Todas estas modificaciones produjeron en el medio intracelular una disminución significativa de metabolitos  $5 \alpha$  reducidos de T, involucrados en la morfología y funcionalidad del órgano.

Las investigaciones realizadas por numerosos grupos de trabajo han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos por los cuales en numerosos mamíferos los andrógenos regulan su propio metabolismo en órganos efectores como el epidídimo; en muchos casos, tales observaciones estuvieron basadas en la determinación de modificaciones producidas como consecuencia de la castración y posterior reemplazo hormonal. Numerosas evidencias experimentales apoyan la idea de la regulación de la actividad de esta enzima por los andrógenos. En el epidídimo de rata se ha descrito que la actividad disminuye paulatinamente luego de la castración y puede ser revertida por la terapia hormonal androgénica así como prevenida si se mantiene al animal castrado con inyecciones diarias del andrógeno (143,300,301). Un fenómeno similar

ha sido observado en la próstata de la misma especie (141,142,302,303).

La imposibilidad de la aplicación de un modelo similar en el hombre impidió un avance equivalente al logrado en animales experimentales.

Un sistema de cultivo de órgano desarrollado por Tezón y Blaquier para el epidídimo humano (203) mostró una rápida captación y metabolismo de T agregada al medio de cultivo hacia compuestos  $5\alpha$  reducidos. Este modelo fue entonces utilizado para estudiar el metabolismo androgénico en epidídimo humano mantenido en ausencia o presencia de andrógenos. La aplicación de la técnica de superfusión al tejido previamente cultivado en diversas condiciones hormonales, reveló la ausencia de diferencias significativas en los parámetros analizados a partir de este método.

La actividad de la enzima  $5\alpha$  reductasa evaluada sobre cortes de tejido provenientes del cultivo deplecionado, estimulado y mantenido con andrógenos fue consistentemente mayor que la correspondiente a tejido control no cultivado. Este aumento en la actividad enzimática pudo ser detectado al cabo de 12 horas de cultivo, alcanzando a un 25% de incremento respecto de la actividad medida en el respectivo



tejido control (homólogo). El incremento luego alcanzó aproximadamente a un 50% en los distintos lotes cultivados por 6 días.

La ausencia de cambios en la actividad de la enzima en tejido epididimario humano luego del agregado de hormona al medio de cultivo, ya sea desde el inicio del cultivo como luego de tres días de depleción hormonal, condujo a suponer la posible existencia de un fenómeno de dilución isotópica, dado que el andrógeno seleccionado para estimular el tejido es además el sustrato utilizado para medir la actividad de la enzima. Sin embargo el empleo de DHT en reemplazo de T como andrógeno estimulador no produjo modificaciones apreciables en los niveles de actividad enzimática.

Conjuntamente, la actividad de la  $5\alpha$  reductasa epididimaria tampoco fue afectada por la incubación simultánea de tejido testicular con el epididimario, sugiriendo que el efecto (o su falta) no es debido a algún otro factor de origen testicular diferente a los andrógenos.

Según se mencionó anteriormente, en el epidídimo de rata se ha demostrado que los andrógenos estimulan el "shunt" de las pentosa fosfato, vía que produce NADPH como producto secundario, cofactor de la enzima productora de

DHT. Considerando que quizá en el hombre los andrógenos no estuvieran involucrados en tal regulación, o lo hicieran de manera distinta, los niveles intracelulares del cofactor podrían ser limitantes de los niveles de actividad. Por lo tanto se decidió ensayar la actividad  $5\alpha$  reductasa en presencia del cofactor. El ensayo en este caso se hizo sobre homogenato de epidídimo, realizándose previamente una curva de concentración óptima de la enzima, estudio en el que se encontró la máxima actividad con 0,5 mg/ml de proteína de homogenato filtrado. Este ensayo se realizó pues en el epidídimo de la rata se había descrito que la concentración de la enzima en el ensayo no debía ser muy alta ya que se modificaba la linealidad del ensayo si la concentración de sustrato caía cerca de un 60% de la concentración inicial (135). Por otra parte, la concentración de cofactor empleada en este ensayo fue de  $5 \times 10^{-4}M$ , la cual había mostrado ser la óptima en estudios realizados en rata (135). Nuevamente los resultados obtenidos fueron similares para los lotes cultivados, descartando la suposición realizada.

Un estudio similar realizado con fracción microsomal (obtenida en el precipitado de la centrifugación a 105000 xg de un sobrenadante de la centrifugación a 10000 xg ) proveniente tanto del lote deplecionado como estimulado, no

dio diferencias en la actividad de la  $5\alpha$  reductasa (datos no mostrados). Esta fracción subcelular había mostrado la actividad máxima en el tejido epididimario control (139).

Trabajos realizados por Robaire y colaboradores en epidídimo de rata indicaron que la administración de andrógenos con capacidad para mantener el peso del órgano de animales castrados restauraba solo el 10% de la actividad de la enzima presente en el segmento caput (304)

Por lo tanto resultó de interés estudiar el efecto estimulador de la actividad  $5\alpha$  reductasa en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano, estimulado a una concentración de andrógenos mayor que la necesaria para el mantenimiento de los sitios receptores para andrógenos y para la síntesis de proteínas (ver capítulos 2 y 3). Sin embargo, una serie de experimentos realizadas con tejido estimulado con DHT  $5 \times 10^{-6}M$  no modificaron los resultados obtenidos previamente en los lotes analizados.

El estudio de fraccionamiento subcelular de la enzima  $5\alpha$  reductasa mostró una localización preferencial en la fracción epitelial, coincidente con hallazgos de Djoseland en estudios similares realizados en rata (305) en los que se había encontrado un 73% de la actividad localizada en la fracción epitelial y el resto en el estroma (306). Sin

embargo estos resultados difieren de los obtenidos por Wilkin y colaboradores (277), empleando un método similar en la próstata humana, tejido en el que se encontraron dos actividades enzimáticas asociadas a ambas fracciones subcelulares, en magnitudes similares.

Sumado a esto, la constancia en la distribución de la actividad enzimática entre las fracciones en los tejidos durante un período de cultivo, descartó la posibilidad de un aumento aparente en los niveles de actividad de la enzima atribuible a alguna proliferación del estroma.

Luego del análisis presentado, resulta difícil explicar la aparente insensibilidad de la  $5\alpha$  reductasa a la modulación androgénica, evaluada en el tejido epididimario mantenido en cultivo de órgano. La dificultad en el esclarecimiento de este comportamiento se encuentra acrecentada por la imposibilidad de solubilizar y aislar la enzima. Hasta el presente el estudio con cortes de tejido o fracciones enriquecidas ha impedido hacer estudios dirigidos a determinar los factores y mecanismos reguladores de esta enzima.

Muchas conjeturas pueden hacerse en base a los resultados obtenidos. Principalmente las que surgen del análisis morfológico del tejido cultivado. El tejido

mantenido en cultivo mostró una apreciable desorganización de la arquitectura celular; teniendo en cuenta que la  $5\alpha$  reductasa es una enzima de membrana, podría sugerirse durante el cultivo, la pérdida o modificación de algún factor (o factores) modulador de la actividad.

Por otra parte, si bien se ha mencionado la regulación por parte de los andrógenos de la enzima en tejidos blanco de esas hormonas, también existen numerosas evidencias de la existencia de actividad  $5\alpha$  reductasa en riñón no afectada por los andrógenos (castración y posterior estimulación) (307), así como una actividad aumentada luego de la castración para la enzima hipofisaria (308) y la regulación de la enzima hepática por otras hormonas, como la tiroidea (309), corticosteroides y estrógenos (310).

Estas evidencias inducen a pensar la existencia de otro tipo de regulación para la enzima de epidídimo humano.

Finalmente, también podría sugerirse una ausencia de regulación negativa, y por consiguiente una actividad no modulada, necesaria para la mantención de altos niveles androgénicos en el tracto reproductivo destinados al estímulo de otros órganos accesorios del aparato genital. Esta idea surge en base a una serie de estudios realizados en ratas castradas mantenidas con andrógenos, las que luego

de la epididectomía o venectomía diferencias mostraron una deficiencia significativa en los receptores para andrógenos medidos en próstata y vesículas seminales (311). Estos resultados indicarían una función androgénica del epidídimo, fenómeno que requeriría niveles constantes altos de metabolitos  $5 \alpha$  reducidos especialmente DHT para una función normal de otros órganos accesorios del tracto reproductivo.

## CAPITULO 2

### RECEPTORES ANDROGENICOS EN EPIDIDIMO HUMANO

## MATERIALES Y METODOS

### M.2.1.Reactivos, soluciones, buffers:

El ligando seleccionado para los estudios de receptor fue el 17  $\beta$ -hidroxil 17 $\alpha$ metil-estra 4, 9, 11 trien- 3-ona (metiltrienolona, R1881). El ligando radiactivo [17-metil-<sup>3</sup>H]R1881 (actividad específica: 87 Ci/mmol), así como el ligando no radiactivo fueron provistos por New England Nuclear Corp.

Los reactivos empleados en la preparación de los buffers fueron adquiridos a Fisher Scientific Co. o a SIGMA Chemical Co.. El Sephadex G-25 fue provisto por Pharmacia Fine Chemicals. El Mersalyl (ácido Salirgánico, SIGMA), se preparó en solución de NaCl 0.6M de forma tal que su concentración final fue 10 mM .

La composición de los buffers empleados para la obtención de las fracciones subcelulares, se detalla a continuación:

Buffer de Homogeneización : TES (N-Tris [hidroximetil] metil 2 aminoetano ácido sulfónico) 20 mM, pH 7.4; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM; EDTA 0.5 mM; CaCl<sub>2</sub> 2mM; MgCl<sub>2</sub> 1.5mM; Sacarosa, 0.25



M; Mercaptoetanol 1mM; glicerol 10% (v:v) y azida sódica 0.05%.

Buffer de lavado de núcleos: TES 20 mM, pH 7.4; EDTA 0.5 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.5mM; Sacarosa, 0.44 M; Mercaptoetanol, 1mM.

Buffer de lavado de núcleos con TRITON: Idem buffer de lavado de núcleos con TRITON X100 0,3% (v/v) (Calbiochem.).

Buffer Hipotónico: Tris 1mM, pH 8.8; NaCl 20 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; mercaptoetanol 0.5 mM.

Buffer extracción: TES 10 mM, pH 7.5; EDTA 2 mM; NaCl 1.2M; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; mercaptoetanol 2 mM.

Buffer separación: Tris 10 mM, pH 7.4; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; 0.6 M NaCl; 0.5 mM EDTA, DTT 2 mM.

#### M.2.2. Obtención del tejido

Los tejidos epididimarios fueron obtenidos y tratados de manera similar a la descrita en M.1.1. Las muestras provinieron de 18 pacientes (edad promedio: 67 años). En ninguno de los casos los pacientes habían recibido terapia previa hormonal o de radiación. Los tejidos utilizados para los experimentos correspondientes a la optimización de

las condiciones para la determinación de los sitios receptores para andrógenos fueron colocados en un baño de hielo a su arribo al laboratorio y mantenidos en esas condiciones hasta el momento de su procesamiento.

### M.2.3. Obtención de las fracciones subcelulares

El objetivo fue obtener preparaciones solubles que contuviesen actividad de receptores para andrógenos a partir de fracciones enriquecidas en núcleos y microsomas, y también de la fracción soluble del citoplasma (citosol).

Todas las operaciones, salvo indicación especial, se realizaron a 0-4C trabajando en baño de hielo. El tejido se disecó cuidadosamente para eliminar la cápsula, luego de lo cual se pesó, se colocó en una cápsula de Petri grande y se cortó finamente. Se transfirió a un vaso de precipitados de 5 ml, se agregó buffer de homogeneización y, empleando un homogeneizador Polytron (Brinkmann) (tres pulsos de 15 segundos, velocidad 5, dejando entre un pulso y otro intervalos de 20 segundos) se obtuvo el homogenato. Este se filtró en primer lugar a través de un tamiz de acero y luego a través de una malla de nylon. El filtrado resultante se centrifugó durante 30 minutos a 800 xg. Se obtuvo entonces un precipitado (fracción nuclear cruda) y

un sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó a 10,000 xg por 1 hora y, luego de descartar el precipitado, el sobrenadante de esta centrifugación fue centrifugado durante 1 hora a 105,000 xg ; al cabo de ese tiempo luego de descartar una capa grasosa presente en la superficie, se recogió el líquido sobrenadante, denominado CITOSOL, el cual se conservó en hielo hasta el momento de su uso. El precipitado de esta centrifugación (fracción microsomal) se resuspendió en 0.5-1 ml de buffer extracción diluido a la mitad de su concentración con buffer hipotónico y se dejó en un baño de hielo durante un lapso no menor de 2 horas con agitación ocasional; transcurrido ese tiempo se centrifugó a 1,200 xg durante 45 minutos. El sobrenadante de dicha centrifugación, que contiene componentes de membrana extraíbles con alta concentración salina , se denomina FRACCION MICROSOMAL soluble. El precipitado obtenido en la centrifugación a baja velocidad (800 xg)(fracción nuclear cruda) , se resuspendió en 10 ml de buffer de homogeneización y se recentrifugó a la misma velocidad durante 20 minutos . El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de buffer hipotónico; se removió suavemente con varilla de vidrio y se dejó durante 30 minutos en hielo . La suspensión fue luego sonicada (tres pulsos de 10 segundos cada uno a 30

Kc, setting 40 W, Sonifier Cell Disruptor, Model W140, H. Systems Ultrasonics) y a continuación se agregó el mismo volumen de buffer extracción de manera tal que la concentración final de NaCl fuera 0.6 M. La suspensión fue nuevamente sonicada en las mismas condiciones, y se dejó extraer un tiempo no menor de 2 horas, agitando la suspensión ocasionalmente. Pasado ese tiempo se centrifugó a 12,000 xg durante 45 minutos; el sobrenadante denominado FRACCION NUCLEAR soluble, se mantuvo en hielo hasta su empleo. El precipitado de la última centrifugación estaba constituido por cromatina y se utilizó para determinar el contenido de ADN.

En una segunda serie de experimentos el procedimiento de obtención de las fracciones subcelulares fue modificado con el objeto de obtener núcleos con mayor grado de purificación. Para ello, la fracción nuclear cruda se resuspendió en 10 ml de buffer de lavado de núcleos con TRITON X-100 empleando una jeringa de 30 ml con un dispositivo formado por una cánula de Teflon conectado en lugar de la aguja, succionando y expulsando varias veces el contenido suavemente. La suspensión se centrifugó a 1,000 xg durante 20 minutos; el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió de la misma forma, empleando el buffer de lavado de núcleos sin TRITON X-100. Se

recentrifugó en las mismas condiciones y se repitió el último lavado una vez más. Posteriormente se resuspendió en buffer hipotónico y se continuó con el procedimiento de extracción idéntico al detallado anteriormente.

#### M.2.4. Ensayo de unión del ligando radiactivo

La determinación del número de sitios receptores para hormonas se basa en el intercambio del esteroide endógeno, unido al sitio receptor, por el ligando radiactivo, la posterior separación de la fracción unida y la evaluación de la radiactividad presente en la misma.

La medición se realizó sobre una alícuota de 0.2 ml de los extractos obtenidos según se detalló en M.2.3.

Para la medición de número de sitios totales en condiciones de intercambio se utilizó como ligando [ $^3$ H]R1881 a una concentración 10 nM para las incubaciones con el extracto citosólico y 20 nM para los extractos microsomal y nuclear.

La evaluación de la unión no específica se realizó simultáneamente, mediante una serie paralela conteniendo el ligando radiactivo en conjunto con un exceso (500 veces) del ligando no radiactivo. El valor obtenido de este

ensayo se sustrae del valor de la unión total obteniéndose de esa forma la unión específica al receptor.

Para los ensayos con el extracto citosólico la incubación se realizó a 4 C durante 16 horas. En la primera serie de experimentos de determinación del número de sitios nucleares las incubaciones se realizaron a 4 C durante 16 horas. El tiempo y temperatura óptimos de incubación para la segunda serie de experimentos de evaluación de sitios nucleares se determinaron experimentalmente.

#### M.2.5. Preincubación de la fracción citosólica con Mersalyl

Los extractos citosólicos obtenidos según se indica en M.2.3. en algunos casos fueron tratados con un compuesto órgano-mercurial, Mersalyl, antes de derivarse para el estudio de receptor. La incubación intenta disociar el complejo formado por el receptor androgénico y la hormona endógena y facilitar su intercambio por el ligando radiactivo. Para ello se agregó a los citosoles una cantidad de solución de Mersalyl 10 mM suficiente para que la concentración final del compuesto fuera 0.2 mM. La incubación se realizó en baño de hielo durante exactamente

30 minutos, luego de lo cual se agregó ditioneitol (DTT) hasta obtener una concentración final 25 mM (o mercaptoetanol a una concentración final 12 mM). El extracto fue luego utilizado para el ensayo de unión con el esteroide radiactivo.

#### M.2.6. Separación de la fracción unida.

La separación de la fracción de ligando radiactivo unido a receptor del ligando libre, fue realizada al final de la incubación, empleando las siguientes técnicas.

Para la fracción citosólica la separación de las fracciones se llevó a cabo mediante la adsorción del esteroide libre con carbón, según la técnica descrita por Wilson y French (273).

Para ello se agregó a los tubos colocados en un baño de hielo 1 volumen de una suspensión de carbón 1%, dextran 0.5% en buffer de homogeneización; se dejó incubando durante 10 minutos con agitación ocasional, y luego se centrifugó a 1,200 xg por 10 minutos, recogiendo del sobrenadante dos alícuotas de 140 ul, las que se transfirieron a viales para determinación de la radiactividad.

Para la separación de la fracción nuclear y/o microsomal, se empleó una técnica basada en la cromatografía de exclusión en geles para separar la fracción unida de la libre. Una alícuota fue aplicada en una columna de Sephadex G-25, eluída con buffer "separación" y recogida la fracción unida a proteínas (correspondiente al volumen de exclusión  $V_0$ ), la cual había sido determinada previamente por calibración de la columna con Azul Dextran 2000 (SIGMA). Dicha fracción se dividió en dos alícuotas, las que fueron transferidas a viales para cuantificar la radiactividad presente.

#### M.2.7. Cultivo de órgano

La preparación del tejido y las condiciones de la técnica de cultivo de órgano empleadas para los estudios de receptor fueron las mismas que las descritas para los estudios de metabolismo detalladas en M.1.4 .

En una primera serie de experimentos se midió el número de sitios receptores para andrógenos en las distintas fracciones subcelulares obtenidas a partir de tejidos cultivados durante 6 días en las condiciones descritas para los lotes DEPLECIONADO, ESTIMULADO y MANTENIDO, comparándose los resultados obtenidos con los



correspondientes a un tejido CONTROL no cultivado, procesado en idénticas condiciones.

En una segunda serie se midieron los receptores androgénicos en extracto nuclear con mayor grado de purificación obtenido a partir de tejido cultivado en ausencia (DEPLECIONADO) y presencia (MANTENIDO) de andrógenos durante 6 días de cultivo.

#### M.2.8.Otras técnicas

La medición del contenido de ADN se realizó empleando la técnica de Burton (278), realizando una modificación, consistente en la incubación del último precipitado a 20 C durante 30 minutos en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.5%.

#### M.2.9.Expresión y análisis de resultados.

Los resultados se expresaron en pmoles de sitios receptores por gramo de tejido. El número de pmoles se obtuvo a partir de la medición de la radiactividad presente en cada muestra, determinación de la eficiencia real medida en cada muestra y cálculo de pmoles presentes en base a la actividad específica conocida del ligando agregado. Conociendo el peso total de tejido y el volumen del

extracto nuclear el valor obtenido se expresó por unidad de peso en gramos.

Los resultados obtenidos para los distintos lotes cultivados comparados se analizaron empleando análisis de varianza. Cuando se compararon dos valores obtenidos para dos lotes experimentales se emplearon el test "t" de Student para muestras independientes o de diferencias pareadas.

## RESULTADOS

### PARTE A-Optimización de las condiciones de ensayo de receptores androgénicos en epidídimo humano

#### R.2.1. Fracción citosólica

En primer lugar se determinaron las condiciones óptimas de medición de los sitios receptores para andrógenos presentes en la fracción citosólica, obtenida a partir de tejido epididimario humano según se indicó en MATERIALES y METODOS en M.2.3.

##### R.2.1.a) Elección del ligando :

Se analizó la capacidad de unión del receptor para andrógenos al compuesto metiltrienolona o R1881 marcado radiactivamente ( $[^3H]R1881$ ), para lo cual cortes de tejido fueron incubados con el ligando a una concentración 10 nM, la que resultó ser óptima en ensayos similares en otros tejidos. En una serie paralela el tejido se incubó con  $[^3H]T$  a la misma concentración que el R1881, luego de lo cual en ambos casos se aisló la fracción citosólica y se determinó el número de sitios, y se compararon los

resultados obtenidos. En ambos casos la unión no específica se evaluó por incubación con un exceso (500 veces) de ligando no radiactivo conjuntamente con el ligando radiactivo. Los tejidos incubados con el ligando R1881 presentaron un número de sitios correspondientes a 1.010 fmoles/g.tej. frente a 420 fmoles/g.tej. para los tejidos incubados con [3H]T.

Dado que el ligando seleccionado es un progestágeno, se realizó una incubación del [3H]R1881 con un exceso de 500 veces del compuesto acetónico de triamcinolona, de forma tal de eliminar las posibles interferencias por unión del ligando al receptor de progesterona. La falta de modificación en los valores obtenidos respecto de los controles competidos con el ligando no radiactivo fueron indicativos de una ausencia de interferencia.

#### R.2.1.b) Temperatura y tiempo óptimos de incubación:

Experimentalmente se corroboró que la incubación del extracto citosólico de epidídimo humano durante tiempos largos y bajas temperaturas (16 horas, 4 C) resultó más favorable para la medición del número de sitios receptores que la utilización de tiempos cortos y altas temperaturas (4 horas ; 37 C).

Los valores obtenidos fueron de 923 fmoles/g.tej. para el primer caso frente a 528 fmoles/g.tej. para el segundo. En esta serie de estudios el ligando seleccionado fue R1881.

R.2.1.c) Efecto del agregado de molibdato:

El efecto estabilizante del molibdato de sodio ha sido descrito para los receptores solubles de numerosas hormonas esteroideas, como glucocorticoides, progesterona y andrógenos. Por lo tanto resultó de interés estudiar el efecto del agregado del anión al buffer de homogeneización sobre el número y distribución de los receptores androgénicos epididimarios en las distintas fracciones subcelulares.

Los extractos obtenidos en presencia del anión presentaron un número de sitios para andrógenos significativamente mayor que los correspondientes a los extractos preparados sin molibdato. Los resultados fueron de  $993 \pm 181$  fmoles/g.tej. frente a  $384 \pm 31$  en ausencia del anión, lo cual significó un incremento aproximado de veces ( $n=4$ ;  $p < 0.05$ ).

Por otra parte se estudió si el agregado de molibdato producía alguna modificación sobre la distribución de los receptores en las distintas fracciones subcelulares. Los resultados correspondientes a este estudio, que se presentan en la TABLA 10 , fueron indicativos de una ausencia de efecto en dicha distribución.

#### R.2.1.d) Efecto del Mersalyl:

Coty (286) , Traish (287) y de Larminat y col (288) han demostrado el efecto disociante del complejo receptor - hormona endógena por la acción del reactivo mercurial Mersalyl (ácido salirgánico) y su reversibilidad. Por lo tanto se analizó el efecto de la preincubación del extracto citosólico con este compuesto, de forma tal de obtener una marcación eficiente de los sitios receptores por desplazamiento de la hormona endógena unida.

Los resultados del estudio del efecto del Mersalyl aparecen en la TABLA 11 . Como resultado de 6 experimentos independientes, se determinó que la preincubación del extracto con el compuesto en estudio produjo un aumento del número de sitios medibles que alcanzó a  $207 \pm 67\%$  con respecto al CONTROL.

TABLA 10

LOTE	n	FRACCION <sup>^</sup> ( $\bar{x}$ $\pm$ ES)		
		CITOSOLICA	NUCLEAR	MICROSOMAL
- Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	2	50 $\pm$ 18	29 $\pm$ 20	21 $\pm$ 2
+ Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	4	58 $\pm$ 12	24 $\pm$ 8	19 $\pm$ 5

TABLA 10- Receptores para andrógenos en epidídimo humano. Efecto del agregado de Molibdato de sodio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) sobre la distribución de los sitios receptores para andrógenos en las fracciones subcelulares citosólica, nuclear y microsomal.

La obtención de las fracciones subcelulares, así como la medición de los sitios de unión para andrógenos se detalla en MATERIALES y METODOS (M.2.3. y M.2.4) .

<sup>^</sup>Los resultados se expresan como porcentaje del número de sitios en cada fracción subcelular respecto del número total (obtenido a partir de la suma de los niveles de receptor en las tres fracciones), evaluados en cada ensayo independiente.

TABLA 11

LOTE	n	RECEPTOR CITOSOLICO (fmoles/g.tej.)
-Mersalyl	6	1051 + 236
+ Mersalyl	6	1832 + 474 *

TABLA 11- Receptores para andrógenos en el epidídimo humano. Efecto de la preincubación del extracto citosólico con el compuesto Mersalyl sobre el número de sitios receptores para andrógenos presentes en ese extracto.

El extracto se obtuvo e incubó según se ha descrito en MATERIALES y METODOS (M.2.3., M.2.4 y M.2.5).

n representa el número de determinaciones independientes.

\*  $p < 0,05$  (test "t" para diferencias pareadas)



#### R.2.2.Fracción microsomal

Se analizó la presencia de sitios de unión para andrógenos en la fracción microsomal obtenida según se indicó en M.2.3. Consistentemente, el  $17\% \pm 4$  ( $n=5$ ) de los sitios medibles se localizó en esta fracción.

Se descartó la posibilidad de una contaminación nuclear responsable de los sitios de unión medidos en la fracción microsomal, ya que los niveles de ADN en esta fracción no superaron el 4% del contenido total del ADN.

#### R.2.3.Fracción nuclear

En una primera serie de ensayos, la determinación del número de receptores androgénicos nucleares en el epidídimo humano se realizó por incubación del extracto nuclear crudo, obtenido según se ha detallado en M.2.3, a 5°C durante 16 horas. Esas condiciones fueron las adecuadas para la medición de receptores nucleares en otros tejidos humanos efectores de andrógenos.

Dada la importancia funcional de los receptores nucleares en el mecanismo de la acción hormonal y, teniendo en cuenta que el empleo de la técnica de cultivo de órgano presenta la limitación en la cantidad de tejido disponible,

en una segunda serie de experimentos, los estudios se enfocaron hacia la medición de los sitios nucleares en una fracción nuclear purificada. Se modificaron las condiciones de obtención de la fracción nuclear, agregando un lavado con un buffer conteniendo detergente (Triton X100, SIGMA) con el objeto de obtener núcleos altamente purificados. Sobre esa fracción, en primer término, se determinaron las condiciones óptimas de medición de sitios receptores para andrógenos:

#### R.2.3 a) Tiempo de extracción de sitios receptores:

En primer lugar se analizó el tiempo de extracción de los sitios presentes en el núcleo por incubación con una alta concentración salina (0.6 M NaCl) determinándose luego el número de sitios por incubación con el ligando a bajas temperaturas (4°C) y tiempos largos (16 horas). En estas condiciones se encontró que la extracción de los sitios nucleares durante 12 horas permitió recuperar 322 fmoles /gr.tej frente a 193 fmoles/gr.tej. cuando el tiempo de extracción fue de 2 horas.

#### R.2.3 b) Temperatura óptima de incubación:

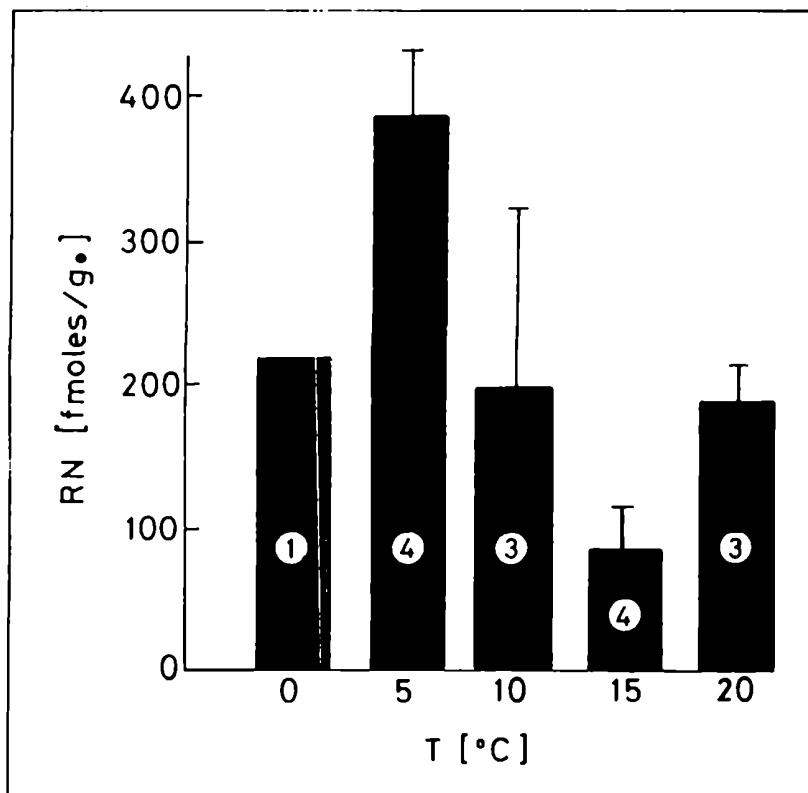
Posteriormente se estudió la temperatura de incubación del extracto nuclear con el ligando. Resultados de esta serie de experimentos se presentan en la FIGURA 17, en la cual se expresan en fmoles de sitios de unión para andrógenos en el extracto nuclear por gramo de tejido. Según se observa en el histograma los valores obtenidos a 5 C duplicaron tanto el correspondiente a 0 C como a temperaturas mayores (10, 15 y 20 C).

#### R.2.3 c) Tiempo óptimo de incubación:

El extracto nuclear se incubó con el ligando R1881 a diversos tiempos, desde 15 minutos a 24 horas, con el objeto de determinar el tiempo óptimo de intercambio del ligando con la hormona endógena, sin producir una apreciable disminución por inactivación de los sitios de unión. Los resultados se presentan en la FIGURA 18. El máximo de unión se alcanzó luego de 9 horas de incubación y se mantuvo en un valor prácticamente constante hasta 24 horas. En base a estos resultados se decidió continuar con 16 horas de incubación en los siguientes ensayos.

#### R.2.3 d) Almacenamiento del extracto nuclear:

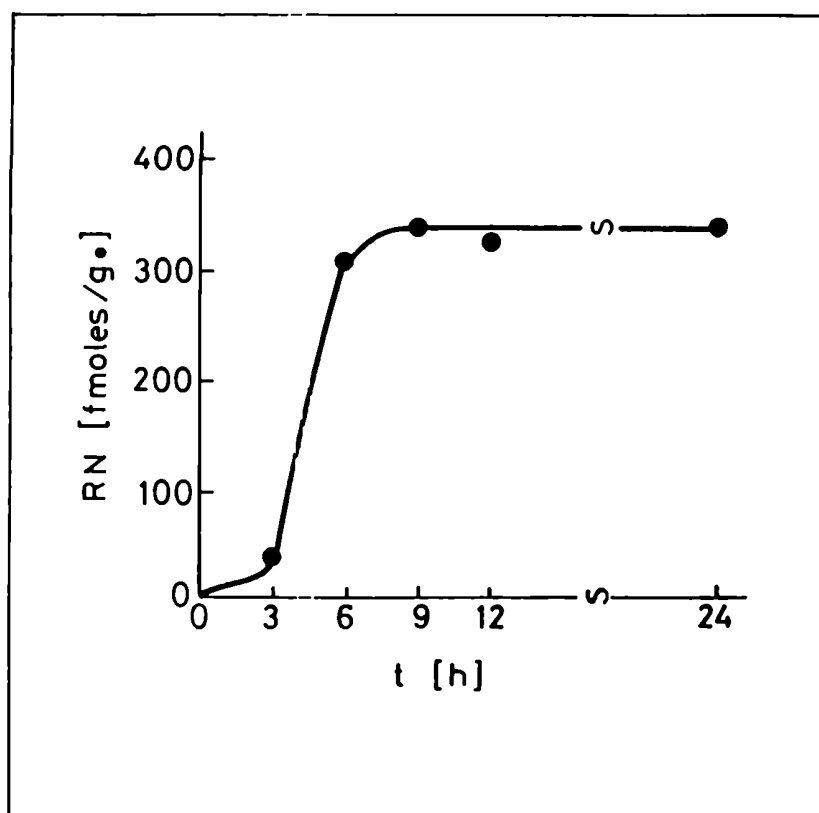
FIGURA 17



Receptores androgénicos en epididimo humano. Efecto de la temperatura sobre el número de sitios de unión para andrógenos en extracto nuclear purificado.

Los extracto nucleares obtenidos según M.2.3 fueron incubados con [<sup>3</sup>H]R1881 con y sin un exceso de 500 veces de R1881, a las temperaturas indicadas en la figura. Las barras representan la unión específica  $R_n$  ( $\bar{x} \pm ES$ ). El número de observaciones independientes se indica dentro del círculo de cada barra.

FIGURA 18



Receptores androgénicos en epidídimo humano. Tiempo óptimo de incubación del extracto nuclear con el ligando [3H]R1881.

Los extractos nucleares fueron incubados con [3H]R1881 a 5 C por períodos de tiempo indicados en la figura. Los resultados se expresan como la unión específica del ligando al receptor en fmoles/g tej.

Con el objeto de obtener cantidades apreciables de extracto nuclear, necesarias para numerosos experimentos, se ensayó un almacenamiento de la fracción nuclear purificada por congelamiento del extracto a bajas temperaturas (-20 C). Sin embargo, esto trajo como consecuencia una pérdida total de la capacidad de unión de los extractos descartando de esta forma su posible almacenamiento.

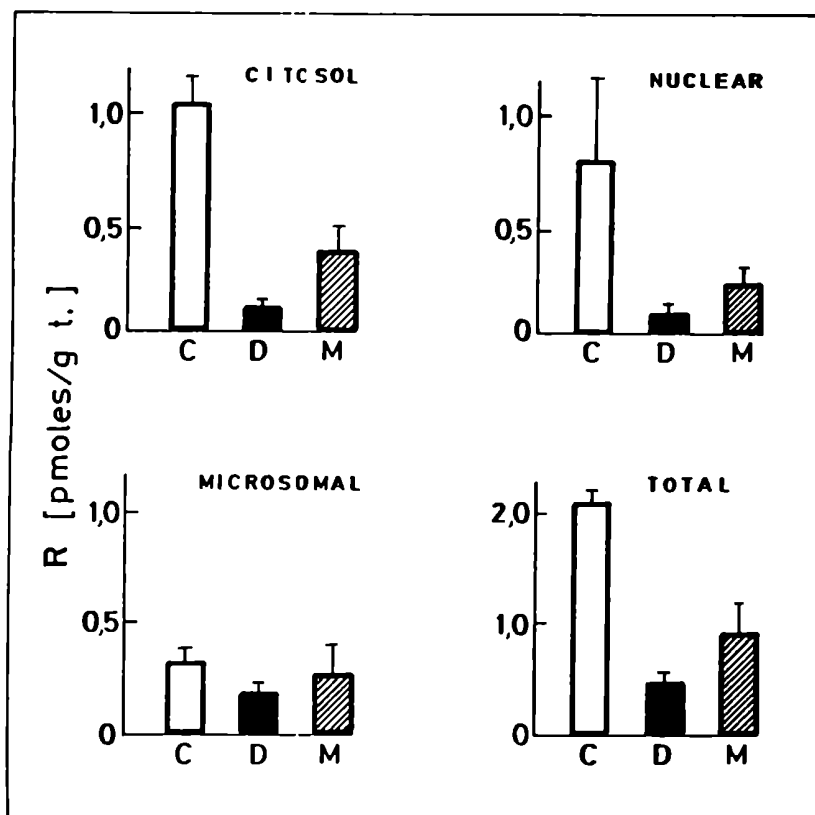
PARTE B-Determinación de receptores para andrógenos en tejido epididimario humano mantenido en cultivo de órgano. Efecto del diversos tratamientos hormonales.

R.2.4.Evaluación de los receptores androgénicos en distintas fracciones subcelulares

Una vez elegidas las condiciones óptimas para la medición de los sitios receptores en las distintas fracciones subcelulares , se evaluaron los niveles de receptor androgénico en tejido CONTROL (no cultivado) y se compararon con los obtenidos con tejido cultivado en ausencia (DEPLECIONADO) y presencia (ESTIMULADO y MANTENIDO ) de andrógenos según las condiciones detalladas en M.2.4.

En la FIGURA 19 se muestra el resultado de 5 experimentos independientes, en la que se comparan los niveles en las distintas fracciones subcelulares . Los sitios totales para andrógenos (correspondientes a la suma de los presentes en las fracciones citosólica, microsomal y nuclear) evaluados en el tejido CONTROL alcanzaron a 2,15 pmoles/g.tej., valor que cayó un 80% cuando el tejido se

FIGURA 19



Receptores androgénicos en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Efecto del cultivo y de la presencia de andrógenos en el medio de cultivo sobre los sitios de unión para andrógenos en las diversas fracciones subcelulares.

Las fracciones subcelulares fueron incubadas con el ligando según se detalla en M.2.4. Los resultados son expresados en pmoles de unión específica /g.tej. en las diversas condiciones: C:control; D: deplecionado; Ma: mantenido.



cultivó en ausencia de andrógenos ( $p < 0,01$ ), restaurándose parcialmente cuando luego de 3 días de depleción androgénica el tejido estuvo en contacto con la hormona durante otros 3 días.

Del análisis de los niveles de receptores para andrógenos en las distintas fracciones surge que los tejidos cultivados en ausencia de andrógenos presentaron una disminución en los niveles de receptor evaluados, caída que fue significativa en las fracciones citosólica y nuclear ( $p < 0,01$ ). El agregado de andrógenos produjo un incremento de los receptores androgénicos en todas las fracciones, aunque solo en forma significativa respecto del lote deplecionado de andrógenos en la fracción citosólica.

El lote MANTENIDO no presentó diferencias significativas respecto del ESTIMULADO.

Un análisis de la distribución de los sitios receptores en las distintas fracciones en los lotes estudiados no mostró diferencias significativas debidas al tratamiento hormonal del tejido epididimario.

R.2.5.Evaluación de los receptores androgénicos en núcleos purificados.

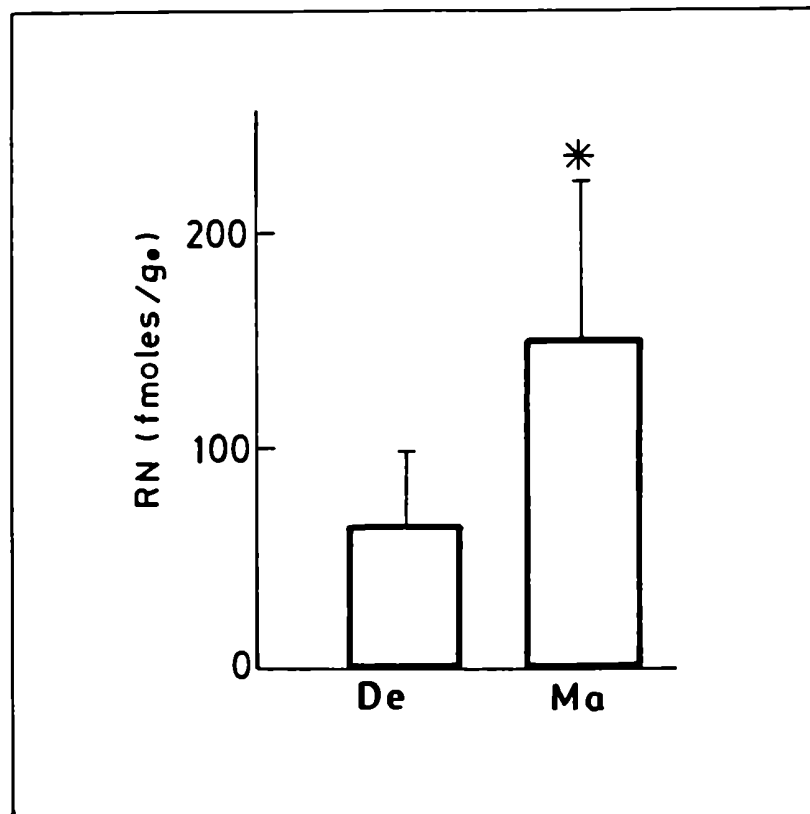
Se sabe que los sitios receptores funcionalmente activos mediadores de la acción hormonal se encuentran asociados a la fracción nuclear. Por lo tanto, los estudios se centralizaron en la determinación de niveles de receptores nucleares en presencia y ausencia de andrógenos de forma tal de determinar la posible existencia de una modulación en el número de sitios receptores por andrógenos.

Los resultados de dichos experimentos se muestran en la FIGURA 20, donde se observa que los niveles correspondientes a receptores en tejido deplecionado de andrógenos alcanzaron a niveles de 60 fmoles/ g.tej., valor que aumentó prácticamente 2,5 veces (n=3) cuando el tejido se mantuvo bajo estímulo androgénico durante los 6 días de cultivo ( $p < 0,01$ ).

El aumento registrado en el número de sitios nucleares proveniente del estímulo hormonal fue confirmado cuando los receptores se expresaron por mg de ADN nuclear (De:  $373 \pm 152$ ; Ma:  $979 \pm 305$  fmoles/ mg ADN; n=3).

El aumento en la capacidad de unión detectada en los extractos nucleares por acción de los andrógenos podría ser causado por diferencias en la localización subcelular, como resultado de la presencia o ausencia de andrógenos en el

FIGURA 20



Receptores androgénicos en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Efecto de la presencia o ausencia de andrógenos en el medio de cultivo sobre los sitios de unión para andrógenos en la fracción nuclear purificada.

La fracción nuclear se obtuvo según se detalla en M.2.3. Los resultados expresan la unión específica en pmoles de Receptor nuclear/ g.tej. en los lotes deplecionado (De) y mantenido (Ma).

medio de cultivo. Para descartar esa posibilidad, los tejidos cultivados en presencia de andrógenos, 3 horas antes de finalizar el tiempo de cultivo fueron expuestos a T a la misma concentración que la agregada al lote MANTENIDO con el objeto de favorecer la localización nuclear de los sitios presentes fuera del compartimiento nuclear. El resultado de 2 experimentos indicó la ausencia de sitios presentes en el compartimiento nuclear luego de la incubación con andrógenos.

Por lo tanto los resultados obtenidos indican que las diferencias detectadas en el número de sitios receptores para andrógenos en tejidos cultivados en ausencia o presencia de andrógenos fueron producidas por efecto del agregado de andrógenos al medio de cultivo, agregado que previno la caída del número de sitios producida por la ausencia de la hormona en el medio de cultivo.

## DISCUSION

En numerosos tejidos que responden a la estimulación androgénica se ha observado que la respuesta hormonal es mediada por la acción de proteínas denominadas "receptores" hormonales. Dado que en el epidídimo humano se había descrito la existencia de esas proteínas, se realizó una caracterización de dichos sitios receptores en el sistema del tejido mantenido en cultivo de órgano, estudiando las modificaciones de los receptores por variadas condiciones hormonales.

En una primera serie de estudios se determinaron las condiciones óptimas de ensayo para la determinación de los sitios receptores en diversas fracciones subcelulares, las que se obtuvieron a partir de un esquema de fraccionamiento basado en una serie de centrifugaciones diferenciales, que condujo a la separación de las fracciones citosólica, microsomal y nuclear. Las fracciones microsomal y nuclear luego fueron incubadas con un buffer hipotónico y posteriormente con un buffer de alta concentración salina, de forma tal de extraer los sitios receptores presentes en esos extractos.

Como método de cuantificación de los sitios de unión se utilizó la marcación del receptor androgénico empleando un ensayo de intercambio de la hormona endógena con un radioligando, técnica descrita por Bonne y Raynaud (312) y posteriormente adaptada por Tezón y colaboradores (195) en estudios sobre receptores androgénicos en epidídimo de rata.

En este estudio el ligando seleccionado para todas las fracciones fue un compuesto sintético denominado metiltrienolona o R1881. El mayor número de receptores marcados luego de la incubación de los extractos con el ligando (respecto de los valores obtenidos con [3H]T como ligando) confirmó los resultados obtenidos en otros sistemas en los que se había mostrado la rápida y específica asociación del compuesto con el receptor androgénico, la baja afinidad por las proteínas de transporte plasmáticas y la ventaja de una ausencia de metabolización de éste durante el ensayo.

La específica asociación del R1881 al receptor para andrógenos confirma los resultados obtenidos previamente por Menon y colaboradores (313), quienes demostraron la unión específica del compuesto a moléculas presentes tanto en el extracto citosólico como nuclear de epidídimo humano.

Los autores determinaron que si bien el receptor citoplasmático tenía ciertas características del receptor de progesterona, dado que el R5020 (competidor de progesterona) era un competidor más efectivo que DHT, el ligando se asociaba a una entidad nuclear específica para andrógenos, presentando la máxima afinidad por DHT, seguida por R1881 y prácticamente nada por el R5020. Estos resultados confirmaban los obtenidos por Purvis y colaboradores (121). Posteriormente Tezón y colaboradores (203) determinaron la constante de disociación del complejo hormona-receptor de  $1.5 \times 10^{-10}$  empleando como ligando R1881 en un extracto nuclear que estaba constituida en un 83 % por DHT.

En el presente estudio, la falta de efecto competitivo del compuesto acetónico de triamcinolona sobre los receptores presentes en el extracto citosólico señaló la ausencia de unión del ligando a receptores de progesterona (314) .

La incubación del extracto citosólico con el ligando a baja temperatura y tiempo prolongado resultó ser más favorable para la determinación de los receptores androgénicos en el epidídimo humano.

Numerosos trabajos han mostrado que el molibdato de sodio estabiliza los receptores para hormonas esteroideas (315,316,317,318,319,320) , sin alterar la afinidad del receptor para andrógenos (321), impidiendo cambios en otras propiedades fisicoquímicas (321,322). En el epidídimo humano, la inclusión del anión en el buffer de homogeneización provocó un aumento en el número de sitios totales para andrógenos, alcanzando a triplicar los niveles evaluados en ausencia del compuesto. Sin embargo, el agregado del anión no modificó la distribución de los receptores en las distintas fracciones subcelulares.

Los grupos sulfhidrilos presente en las moléculas de las proteínas receptoras parecen ser esenciales para mantener la integridad del sitio de unión a la hormona (323)<sup>4</sup>. Una reacción reversible de la molécula de receptor con el compuesto Methylmercaptol desplaza el ligando unido al receptor. La incubación del extracto citosólico de epidídimo humano con ese compuesto aumentó el número de sitios medidos en ese extracto prácticamente al doble, resultados que coinciden con los obtenidos por Traish y colaboradores (287), Coty (286) y de Larminat y colaboradores (288). Cuando el extracto nuclear fue incubado con el compuesto se encontró una disminución en el número de sitios receptores (datos no mostrados),



omitiéndose ese paso posteriormente. Este efecto había sido observado por de Larminat y col. en receptores para andrógenos en próstata humana (202).

Por lo tanto los estudios se hicieron sobre la fracción citosólica obtenida en presencia de molibdato, preincubada con Mersalyl, e incubada con el ligando R1881 a bajas temperaturas y tiempos prolongados.

A partir del estudio de tiempo y temperatura óptimos de incubación del extracto nuclear con el ligando se determinó que las condiciones seleccionadas para el extracto citosólico eran también las mejores para el extracto nuclear.

De la cinética de tiempo también puede deducirse que los sitios androgénicos nucleares permanecen estables durante el lapso del ensayo. Este hecho se evidenció a través de la meseta o "plateau" que comenzó luego de 9 horas de iniciada la incubación y permaneció por un lapso de 15 horas en un valor prácticamente constante.

Con respecto a la fracción microsomal se determinó consistentemente la presencia de sitios de unión para andrógenos e esa fracción. Sin embargo este hecho no es sorprendente, ya que receptores esteroideos presentes en

microsomomas han sido descriptos en útero de cerdo (324) y para andrógenos en riñón de rata (325) y próstata ventral de rata (326). En el último órgano mencionado, si bien se pudo determinar la especificidad de tejido y ligando, así como la constante de afinidad y el número de sitios de unión, no fue posible establecer su significado fisiológico a esa localización. En el epidídimo humano la concentración de los sitios de unión en microsomomas alcanzó un valor aproximado de 300 fmoles/g.tej., el cual si bien es menor que el correspondiente a las otras fracciones, es suficientemente alto para ser considerado como una contaminación nuclear. Sumado a eso, la detección de solo un 4% de ADN en esa fracción, hace aún más difícil pensar en tal idea.

Los estudios luego se orientaron a la determinación de los niveles de receptor en tejido mantenido en condiciones de cultivo de órgano, con el objeto de analizar el efecto de la presencia o ausencia de andrógenos sobre el número y distribución de los sitios de unión en las distintas fracciones subcelulares.

El procedimiento del cultivo per se produjo una disminución significativa en el número de sitios receptores, lo cual pudo observarse en los niveles

registrados de 12 hs. de iniciado el cultivo. Este fenómeno podría interpretarse como el resultado de la degradación de moléculas de receptores como consecuencia de la liberación de enzimas proteolíticas durante el proceso de homogeneización, dada la abundancia de lisosomas en el tejido e involución. Sin embargo, en contra de esta posibilidad puede argumentarse el hecho que el molibdato de sodio, conocido inhibidor de proteasas (327) estuvo presente en el medio de homogeneización. Sumado a esto, trabajos previos en epidídimo de rata, demostraron la ausencia de un incremento en la actividad proteolítica o la posible presencia de factores capaces de degradar la molécula de receptor, como responsables de la disminución en el número de receptores medidos por técnicas similares en extracto citosólico de animales castrados (195).

A pesar de las pérdidas ocasionadas como consecuencia del mantenimiento del tejido en cultivo de órgano, se encontraron diferencias apreciables en los niveles de sitios receptores para andrógenos cuando se compararon tejidos cultivados en ausencia o presencia de DHT en el medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en epidídimo (199, 200) y próstata ventral de rata (328), tejidos en los que se había encontrado una disminución del número de receptores para

andrógenos luego de la castración, con un incremento posterior, resultado de la estimulación androgénica.

Coincidentemente, los estudios realizados con extracto de núcleos purificados permitieron detectar modificaciones en los niveles de receptor nuclear debidos a la presencia o ausencia de hormona en el medio de cultivo. Los explantes cultivados en ausencia de hormona redujeron su capacidad de unión a un 20% del valor control, mientras que el estímulo androgénico desde el inicio del cultivo previno esa caída, encontrándose en el lote mantenido con hormona niveles de receptor androgénico que duplicaron los detectados en el grupo deplecionado de andrógenos.

La existencia de una respuesta del epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano similar a la descrita en animales confirma la validez del empleo del modelo experimental elegido para el estudio de la respuesta del epidídimo en diversas situaciones hormonales sobre parámetros de la acción hormonal.

Finalmente, los resultados obtenidos con tejido epididimario humano cultivado sugerirían para el hombre un comportamiento similar al descrito en numerosos mamíferos para tejidos dependientes de andrógenos, en los que se ha demostrado la capacidad de las hormonas de regular sus

propios receptores.

## CAPITULO 3

### PROTEINAS ANDROGENO-DEPENDIENTES EN EPIDIDIMO HUMANO

## MATERIALES Y METODOS

### M.3.1 Reactivos

Para la marcación de proteínas en tejido cultivado se empleó una mezcla de [<sup>3</sup>H]L-aminoácidos y [<sup>14</sup>C]L-aminoácidos uniformemente marcada, provista por New England Nuclear. Los esteroides fueron adquiridos a SIGMA Chemical Co. Todos los materiales necesarios para el desarrollo del cultivo de órgano fueron descritos en M.1.1. Los reactivos empleados para la aplicación de la técnica de electroforesis fueron adquiridos a BIO RAD , Pharmacia Fine Chemicals y LKB.

### M.3.2. Obtención del tejido

Los tejidos epididimarios seleccionados para realizar la presente serie de experimentos se obtuvieron de 20 pacientes (edad promedio: 65 años). Los pacientes no habían recibido terapia previa hormonal o de radiación.

Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente en solución salina y procesadas dentro de las dos horas de su llegada. También se obtuvo tejido prostático y testicular, que fueron utilizados para la caracterización

de un antisuero, cuya obtención se describe en M.3.12.

### M.3.3. Muestras de espermatozoides

Se realizó una serie de estudios con espermatozoides humanos provenientes de eyaculados normales (número de espermatozoides mayor que  $2 \times 10^7$  células/ml, motilidad mayor que el 50% y con un porcentaje menor del 40% de formas anormales). Las muestras fueron centrifugadas a 500 xg durante 10 minutos, con el objeto de separar los espermatozoides del fluido seminal. Los espermatozoides recuperados en el precipitado de esa centrifugación fueron resuspendidos en buffer PBS, luego de lo cual la suspensión se recentrifugó en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente. Este lavado se repitió una vez más.

Los espermatozoides fueron utilizados para la preparación de un antisuero y su caracterización (M.3.12).

### M.3.4. Obtención de fluidos epididimarios.

La porción distal o CAUDA del epidídimo se perfundió en sentido retrógrado por el conducto deferente con buffer PBS empleando una jeringa, obteniéndose de esta forma el contenido del CAUDA epididimario.



Se tomó una gota del fluido obtenido, se colocó en un portaobjetos y se analizó la presencia de espermatozoides u otros tipos celulares en la suspensión.

El fluido se centrifugó a 500 xg durante 10 minutos, se descartó el precipitado y, el sobrenadante libre de componentes celulares se denominó FLUIDO DEL CAUDA EPIDIDIMARIO (FCauE), el que se conservó a -70 C hasta su análisis.

Conjuntamente, el segmento proximal al testículo o CAPUT fue cortado en trozos pequeños, y colocado en una cápsula de Petri con medio de cultivo con agitación ocasional. Luego de 30 minutos se recogió el líquido conteniendo los espermatozoides y se centrifugó a baja velocidad, recuperándose el fluido en el sobrenadante. Este fluido se denominó FCapE (FLUIDO DEL CAPUT EPIDIDIMARIO).

#### M.3.5. Obtención de extracto salino de espermatozoides

Los espermatozoides obtenidos a partir de eyaculados normales, lavados según se indicó en M.3.3., se resuspendieron en buffer Tris-NaCl (Tris 20 mM, pH 7.4, NaCl 0.6M) y se incubaron a 0-4 C durante 2 horas agitando

ocasionalmente. Transcurrido ese tiempo la suspensión se centrifugó a 1500 xg durante 15 minutos, luego de lo cual el sobrenadante se dializó contra agua y posteriormente se liofilizó hasta obtener un extracto seco. El extracto liofilizado se mantuvo a -20 C.

Para la diálisis los extractos se colocaron en tubos de diálisis pretratados con etanol 70 % (v/v), durante 30 minutos, luego de lo cual se colocaron en una solución conteniendo NaCO<sub>3</sub>H-EDTA (NaCO<sub>3</sub>H 1N, EDTA 1mM) por 30 minutos, transfiriéndose luego a un recipiente conteniendo agua bidestilada donde se mantuvieron hasta su uso.

#### M.3.6.Cultivo de órgano.

La técnica de cultivo de órgano empleada para estos estudios es idéntica a la detallada en M.1.4. En este caso los ensayos se realizaron sobre los lotes DEPLECIONADO Y ESTIMULADO.

#### M.3.7.Ensayo de síntesis proteica.

Transcurridos seis días de cultivo el medio fue removido y los tejidos fueron lavados con solución salina de Hank. El tejido contenido en dos cápsulas se transfirió a una nueva cápsula de cultivo de órgano (aproximadamente

0.1 g de tejido) y se agregó el medio de incubación para el estudio de síntesis proteica.

Dicho medio estaba constituido por solución salina de Earle, Penicilina-Estreptomicina en las mismas cantidades que las empleadas para el cultivo y 10 uCi de mezcla de aminoácidos marcados con [3H] para los tejidos provenientes del lote ESTIMULADO y 8 uCi de la mezcla marcada con [14C] para los tejidos del lote DEPLECIONADO.

Como los aminoácidos marcados están disueltos en ácido clorhídrico (HCl 1 N) su agregado acidifica el medio de cultivo. Por consiguiente éste fue neutralizado con una solución estéril de NaOH 0.2N, previo a su contacto con el tejido .

La incubación se realizó a 32 C, bajo atmósfera de aire:CO<sub>2</sub> (95:5; %) por espacio entre 1 y 24 horas.

Transcurrido ese tiempo las cápsulas de cultivo se colocaron sobre hielo. El medio fue separado y centrifugado a 1,000 xg durante 10 minutos, colocándose luego a -70 C en donde se mantuvo hasta su procesamiento. El tejido fue lavado exhaustivamente con buffer PBS, se secó sobre papel de filtro y se preparó un homogenato según se indicó en M.2.3., empleando buffer Tris-Glicina ( TRIS

0,025M; Glicina 0,192M ;pH 8.3) como medio de homogeneización. El homogenato se filtró a través de una malla de nylon y fue centrifugado a 105,000 xg durante 60 minutos, obteniéndose así la fracción citosólica, la que se conservó a -70 C.

### M.3.8.Análisis electroforético de las proteínas epididimarias

#### M.3.8a)Preparación de las muestras

El extracto citosólico, así como el medio de cultivo correspondiente, fueron dializados contra buffer Tris-Glicina (pH 8.3) diluído 20 veces con agua y luego se determinó el contenido de proteínas empleando para ello la técnica de Bradford (276).

Posteriormente se preparó una mezcla conteniendo igual cantidad de proteínas totales de citosol de los lotes DEPLECIONADO y ESTIMULADO correspondientes a un mismo paciente, a la que se agregó 10 ul de glicerol (Sintorgan) para aumentar su densidad y 5 ul de azul de bromofenol al 0.1% en agua destilada (p/v) como indicador del frente de desplazamiento iónico de la electroforesis . De la misma forma se preparó una mezcla de proteínas provenientes del

medio de incubación de los lotes DEPLECIONADO y ESTIMULADO, a la que se le agregó azul de bromofenol y glicerol en las mismas cantidades que las mencionadas anteriormente.

M.3.8.b) Descripción de sistema electroforético

M.3.8.b)-1-Soluciones

-1- Buffer TRIS 1,5M (pH 8,8)

-2-Acrilamida (BIO RAD)..... 21,5 % Peso/Volumen

Final

N,N Metilen bis Acrilamida..... 0,56% Peso/Volumen

Final

Buffer -1- 47,2 % Peso/Volumen

Final

Agua Bidestilada..... hasta volumen final

La mezcla se agitó hasta disolución total de sus componentes y se mantuvo a 4C hasta su uso.

-3-Persulfato de amonio (BIO RAD) 10% Peso/Volumen en agua bidestilada

Esta solución se prepara inmediatamente antes de su utilización.

-4-N,N,N',N' tetrametilen diamina (TEMED) (BIO RAD)

-5-Acrilamida..... 4 % Peso en Volumen

N,N Metilen bis Acrilamida..... 0,12% Peso en Volumen

Rivoflavina 0,0004 % Peso en Volumen

Tris Base ..... 0,6 % Peso en Volumen

Cl H hasta pH 6,7 0,05 % Peso en           
Volumen

Esta solución se mantiene a resguardo de la luz

-6-TRIS Base ..... 0,6% Peso en Volumen

Glicina ..... 2,8% Peso en Volumen

pH 8,3

#### M.3.8.b)-2-Preparación del gel separador

Para el análisis de las proteínas se empleó electroforesis en geles de poliacrilamida en un gradiente lineal del 6 al 12% de concentración de acrilamida y 3% de

Bis-acrilamida, utilizando una técnica descripta por O'Farrel (279) parcialmente modificada.

Las soluciones empleadas para el armado de los geles se ha detallado en M.3.8.b)-1-. Para el armado de los geles se prepararon dos soluciones "A" y "B", las que contenían:

	.....Solución "A"	.....Solución "B"
Sol. -2-.....	4,24 ml.....	8,46 ml
Sol. -1-.....	2 ml.....	-
Glicerol.....	0,8 ml.....	10,08 ml
Agua Bidest....	9,12 ml.....	-

Las mezclas se agitaron exhaustivamente hasta lograr homogeneidad; el oxígeno presente en las mezclas (inhibidor de la polimerización) se desplazó conectando el recipiente conteniendo la mezcla a una bomba de vacío durante 15 minutos o por desplazamiento por inyección con gas nitrógeno durante 3 minutos a cada solución.

Posteriormente se agregó 40ul de -3- y 10 ul de -4- a cada una de las soluciones.

El gradiente se obtuvo mezclando ambas soluciones a través de un sistema de cánulas de Teflon diseñadas para el armado de un gradiente lineal.

Para ello la solución "A" se vertió sobre la solución "B" a través de una tubuladura conectada a una bomba peristáltica (DESAGA, Heidelberg) productora de un flujo constante. La mezcla así obtenida se mantuvo con agitación constante y luego se transfirió desde el recipiente mezclador, a través de dos tubuladuras de igual calibre que las primeras, hasta la cámara soporte del gel construída con dos vidrios rectangulares unidos a través de espaciadores de acrílico de 2.8 mm (Pharmacia) . La cámara se llenó de abajo hacia arriba, habiendo sellado previamente el extremo inferior de la cámara con agar al 1% en agua, (Bacto-agar DIFCO, p/v). Una vez completado el llenado, se colocó agua sobre la superficie de la mezcla a gelificar. Una vez gelificado, se retiró el agua de la cámara y se enjuagó con la solución de gel espaciador (-5-) ,luego de lo cual se agregó esa mezcla sobre el espacio libre entre los vidrios, colocando una estructura de acrílico con hendiduras, de forma tal que al agregar la solución del gel espaciador se produjeran zonas separadoras o "dientes" quedando entre ellas espacios destinados a colocar las muestras a analizar.



Para los experimentos de identificación de proteínas epididimarias se utilizaron soportes cuyas dimensiones eran de 8 cm de largo x 7.6 cm de ancho x 0.28 mm de espesor. En una serie de estudios posteriores se realizaron electroforesis semipreparativas para lo cual las dimensiones de los soportes se modificaron aumentándose las cantidades de las soluciones "A" y "B" en forma proporcional.

#### M.3.8.b)-3-Condicionés de corrida.

Las corridas electroforéticas se realizaron en un aparato de electroforesis (GE-2/4. Pharmacia), en el que el buffer de corrida se mantuvo entre 5 y 7 C refrigerando con un baño termostático (MGW Lauda K4R Electronic).

Las muestras preparadas según se detalló en M.3.8.a) fueron colocadas en los espacios del gel espaciador, empleando una jeringa de 50-100 ul (Hamilton). En uno de los espacios se colocó una solución conteniendo 5 ug de albúmina humana, glicerol y azul de bromofenol, la que se tomó como indicador. La localización de la banda correspondiente a la albúmina en el sistema de separación empleado se tomó como referencia para asignar un valor de movilidad electrofoética a la localización de las bandas de

las proteínas en estudio.

La corrida se inició a 35 mA/ gel en los estudios de identificación. El voltaje inicial fue aproximadamente de 100 volts y alcanzó aproximadamente 400 volts al finalizar la corrida, luego de 3 - 4 horas.

Al cabo de ese tiempo las cámaras se desarmaron, se midió la ubicación del marcador del frente, y luego el gel se envolvió en papel de aluminio y se conservó a -70 C.

Cuando las dimensiones de las cámaras se modificaron, se corrigieron las condiciones de corrida, siendo la corriente aplicada de 77 mA/gel.

#### M.3.8.c) Análisis de los perfiles electroforéticos

M.3.8.c)-1-De las proteínas producidas en cultivo con precursores radiactivos

Los geles mantenidos a -70 C se descongelaron rápidamente para ser analizados y fueron seccionados longitudinalmente, separando de esta forma los distintos canales a analizar. Cada canal fue cortado transversalmente en bandas de 1 mm de ancho y cada una de éstas fue colocada en viales de vidrio y disueltas por

incubación con 0.08 ml de agua oxigenada al 30%, a 37 C durante 16 horas. Posteriormente se les agregó 10 ml de solución de tolueno centellante conteniendo TRITON X-114 (7:3; v/v). Los viales fueron tapados y agitados vigorosamente. La radiactividad correspondiente a cada isótopo fue medida en las mismas condiciones que las especificadas en M.1.11.

Cada fracción fue correlacionada con una movilidad electroforética determinada conociendo el número total de fracciones, el largo del gel y la movilidad correspondiente a la albúmina humana.

M.3.8.c)-2-De los fluidos epididimarios y del extracto salino de espermatozoides:

La movilidad electroforética de las proteínas presentes en el fluido epididimario del CAPUT (FCapE) y CAUDA (FCaE), así como del extracto salino de proteínas de espermatozoides, se determinó realizando electroforesis en geles de poliacrilamida en las condiciones mencionadas en M.3.8.b.

Los fluidos conservados a bajas temperaturas fueron dializados contra buffer TRIS-Glicina (pH8,3), luego de lo cual se determinó el contenido de proteínas empleando la

incubación con 0.08 ml de agua oxigenada al 30%, a 37 C durante 16 horas. Posteriormente se les agregó 10 ml de solución de tolueno centellante conteniendo TRITON X-114 (7:3; v/v). Los viales fueron tapados y agitados vigorosamente. La radiactividad correspondiente a cada isótopo fue medida en las mismas condiciones que las especificadas en M.1.11.

Cada fracción fue correlacionada con una movilidad electroforética determinada conociendo el número total de fracciones, el largo del gel y la movilidad correspondiente a la albúmina humana.

M.3.8.c)-2-De los fluidos epididimarios y del extracto salino de espermatozoides

La movilidad electroforética de las proteínas presentes en el fluido epididimario del CAPUT (FCapE) y CAUDA (FCaE), así como del extracto salino de proteínas de espermatozoides, se determinó realizando electroforesis en geles de poliacrilamida en las condiciones mencionadas en M.3.8.b.

Los fluidos conservados a bajas temperaturas fueron dializados contra buffer TRIS-Glicina (pH8,3), luego de lo cual se determinó el contenido de proteínas empleando la

técnica de Bradford (276)

El extracto salino dializado contra agua y liofilizado se resuspendió en un volumen mínimo de buffer Tris-Glicina (pH 8.3), midiéndose luego el contenido de proteínas por la técnica de Bradford.

Se prepararon alícuotas conteniendo 100 ug de proteína de cada extracto, sobre las que se agregó BPB y glicerol en las cantidades indicadas anteriormente, obteniéndose así las muestras para analizar por electroforesis.

La visualización de las bandas se realizó por tinción y posterior referencia de sus movilidades con la movilidad de la albúmina humana colocada en uno de los canales como marcador de movilidad electroforética, determinando el parámetro  $R_a$  ( $R$  albúmina). La tinción consistió en la inmersión del gel en una solución al 1% de azul Coomassie (solución acuosa al 2%, p/v) : ácido acético : agua (4:1:5, v/v) durante 12 horas a temperatura ambiente y la decoloración se llevó a cabo lavando el gel con una solución de metanol: ácido acético:agua (16:4:80).

#### M.3.9. Determinación del Peso Molecular

La determinación del peso molecular de las proteínas epididimarias sintetizadas en cultivo de órgano bajo estímulo androgénico se realizó empleando una técnica de separación en electroforesis en geles al 12,6% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de amonio (SDS) descripta por King y Laemmli (280).

Las muestras de las proteínas analizadas se obtuvieron realizando el siguiente procedimiento: se hicieron corridas electrofoéticas semipreparativas de las proteínas del extracto citosólico del tejido estimulado con andrógenos y se obtuvieron las secciones de geles correspondientes a las bandas seleccionadas, confirmando su selección por comparación de su movilidad electroforética y la correspondiente a un perfil en el que se sembraron simultáneamente los extractos de ambos lotes, pudiendo en ese caso calcular el cociente isotópico y determinar el pico de estimulación.

Cada una de las secciones fue calentada a 100 C durante 5 minutos en un tubo con un buffer conteniendo SDS al 1% , luego de lo cual se agregó 10 ul de glicerol para aumentar su densidad y 5 ul de BPB al 0,1%, como indicador del frente iónico; se agitó vigorosamente y se colocó la suspensión en los separadores o dientes. En uno de los

dientes se colocó una mezcla de marcadores de peso molecular en un rango entre 94.000 y 14.400 de peso molecular, constituido por fosforilasa b(94.000), albúmina (67.000), ovalbúmina (43.000), anhidrasa carbónica (30.000), inhibidor de tripsina (20.000) y  $\alpha$ lactalbúmina (14.400).

La corrida electroforética se inició a 60 volts, y se mantuvo a ese voltaje hasta que la muestra atravesara el espaciador, luego de lo cual el voltaje se elevó a 120 volts, manteniéndose constante hasta que el indicador del frente iónico migrara hasta 1-2 cm por encima del borde inferior del gel separador.

La corrida electroforética se realizó a 17-21°C.

Una vez finalizada la corrida se recuperó el gel separador y se separó la sección correspondiente al perfil electroforético de los marcadores de peso molecular, los que fueron teñidos.

Las secciones longitudinales correspondientes a las muestras en estudio se individualizaron y cada una fue cortada transversalmente en bandas de 1 mm de ancho y tratadas de manera idéntica a la descrita en M.3.8.c)-1-.

Se determinaron las movilidades relativas al frente de iones ( $R_f$ ) para cada pico radiactivo. Conjuntamente se calcularon los  $R_f$  para cada marcador de peso molecular teñido. Con estos datos se calculó el o los peso(s) molecular(es) relativo(s) para cada banda, para lo cual en primer lugar se determinó la correlación lineal entre los  $R_f$  y los logaritmos de los Pesos moleculares de los marcadores (relación de tipo lineal), luego de lo cual, conociendo los  $R_f$  de las bandas e estudio se calcularon los pesos moleculares.

#### M.3.10. Determinación del punto isoeléctrico

Se determinó el punto isoeléctrico de las proteínas específicas epididimarias seleccionadas, sintetizadas por el tejido en respuesta a los andrógenos, luego de la incubación con aminoácidos radiactivos.

Para ello se utilizó un lecho de Sephadex de 10x 10x 0,2 cm, conteniendo amfolitos (LKB pH 3-10 y pH 5-7) al 3%, empleando una técnica sugerida por la firma LKB.

Las muestras conteniendo las proteínas a ser analizadas fueron enfocadas en el sistema manteniendo una temperatura de 0-4°C, empleando una potencia de 10 watts durante dos horas.



Una vez finalizada la corrida, se determinó el pH en uno de los canales, luego de lo cual se obtuvieron fracciones longitudinales de las distintas corridas, analizándose la radiactividad presente en cada una, y determinando a partir de ello el(los) punto(s) isoeléctricos para cada banda en estudio.

#### M.3.11. Presencia de azúcares

Se realizó un estudio preliminar con el objeto de determinar la presencia de azúcares en las proteínas seleccionadas en cultivo.

Dicho análisis se realizó enfrentando las proteínas secretorias sintetizadas bajo estímulo androgénico a Concanavalina A inmovilizada en una matriz de sepharosa activada con bromuro de cianógeno.

El acoplamiento de la Concanavalina A se realizó empleando una técnica descrita por Kumel y colaboradores (281).

Las proteínas se obtuvieron a partir de los medios de incubación provenientes del ensayo de síntesis proteica, de los lotes DEPLeCIONALO y ESTIMULADO, los que fueron sembrados separadamente en la columna, luego de lo cual se

dejó equilibrar y se recojió la fracción no retenida, la que fue sembrada nuevamente; este último paso fue repetido en dos oportunidades. Posteriormente, la fracción no retenida fue guardada hasta su análisis. La fracción retenida en la columna fue eluida por desplazamiento con un buffer conteniendo  $\alpha$  metil manósido a una concentración 0,1 M.

Ambas fracciones fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente y posterior identificación de las bandas radiactivas, de la misma manera que la descrita en M.3.8.c)-1-.

M.3.12. Obtención y parcial caracterización de un antisuero a partir de extracto salino de espermatozoides.

M.3.12.a) Obtención del antígeno

Se obtuvo un extracto de proteínas de espermatozoides provenientes de eyaculados normales, incubando las células con NaCl a una concentración 0,6M durante 2 horas.

La suspensión se centrifugó a 1,500 xg durante 15 minutos. El sobrenadante luego fue desalado por diálisis contra 500 volúmenes de agua destilada, luego de lo cual el extracto fue liofilizado y conservado refrigerado a -20 C

hasta obtener una cantidad necesaria para realizar la inmunización.

#### M.3.12.b) Inmunización

El extracto salino de espermatozoides liofilizado se resuspendió en un volumen mínimo de agua destilada y se midió el contenido de proteínas.

Se tomaron alícuotas conteniendo 500 ug de proteínas (aproximadamente en un volumen de 0.5 ml), se emulsificaron con un volumen igual de adyuvante de Freund y se inyectaron por vía subcutánea en dos conejos (New Zealand White) . El adyuvante de Freund utilizado fue completo para la primera inyección e incompleto para las siguientes. Las inyecciones se repitieron cada dos semanas.

#### M.3.12.c) Verificación del título del antisuero

Los conejos fueron sangrados periódicamente, antes de cada inmunización, con el objeto de verificar el título del antisuero en cada caso.

Para ello se realizaron sangrías en la vena marginal de la oreja y la sangre obtenida se dejó coagular; luego de separar el coágulo, se centrifugó a 360 xg durante 20 minutos descartando el precipitado. Con el suero así

obtenido se realizaron varias diluciones, sobre las que se analizó el título del antisuero empleando la técnica de inmunodifusión doble de Duchterlony (282) en agar.

Cuando el título obtenido fue tal que el suero dio positivo a una dilución 1:8 los animales fueron sangrados.

La sangría se realizó por la arteria aorta, anestesiando el animal con Fabontal (0.7 ml / kg de peso).

#### M.3.12.d) Obtención y purificación parcial del antisuero

De la misma forma que para los controles periódicos, la sangre se dejó coagular y posteriormente se centrifugó a 360 xg.

Las inmunoglobulinas presentes en el suero contenido en el sobrenadante de la centrifugación se precipitaron por agregado de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 45% de saturación. Las proteínas precipitadas se purificaron por medio de la cromatografía en DEAE descrita por Fahey y Terry (283).

#### M.3.12.e) Adsorción del antisuero

La adsorción del antisuero se realizó acoplado los antígenos (suero humano, extractos citosólicos testicular y prostático) a una matriz de Sepharosa 4B activada con

bromuro de cianógeno (Pharmacia) ,empleando una técnica descripta por Bonavida (284).

Los extractos citosólicos testicular y prostático se obtuvieron a partir de una técnica similar a la descripta en M.2.3. El tejido fue disecado, homogeneizado y centrifugado a alta velocidad, conservándose el citosol a baja temperatura.

La fracción de inmunoglobulinas del antisuero obtenido se sembró en cada una de las columnas (secuencialmente) luego de lo cual se eluyeron las proteínas no retenidas con buffer PBS. El pasaje de las inmunoglobulinas por cada columna se repitió tres veces.

El líquido eluido fue recogido en varias fracciones, las que fueron analizadas por su absorción a 280 nm que permitió seleccionar la fracción conteniendo las inmunoglobulinas específicas.

#### M.3.12.f) Inmunolectroforesis

Las proteínas contenidas en el extracto citosólico de epidídimo humano se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente lineal del 6 al 12% en condiciones no desnaturalizantes, preparado según se

detalló en M.3.8.

Finalizada la corrida electroforética se obtuvieron secciones longitudinales y se colocaron en placas de 11 x 6.5 cm, ubicándose el gel en el centro y cubriendo el espacio libre de la placa con una solución con agar al 1.5 % disuelto en buffer. Una vez solidificado el agar, se realizaron dos secciones longitudinales paralelas al gel de 1.5 mm de espesor, equidistantes a 1,2 cm a ambos lados del gel. En ese espacio se colocaron los sueros a analizar. Las placas se incubaron durante 48 horas, luego de lo cual se analizó la localización de las bandas de precipitación.

M.3.12.g) Inmunoadsorción de proteínas específicas epididimarias sintetizadas en cultivo.

A partir de la técnica descrita en M.3.7 se obtuvieron proteínas epididimarias humanas radiactivas secretadas al medio de cultivo, tanto para el lote DEPLECIONADO como para el ESTIMULADO.

El extracto de proteínas radiactivas se sembró en una columna de Sepharosa 4B acoplada al anticuerpo; se dejó equilibrar, se recogió la fracción no retenida. El llenado de la columna con la muestra de proteínas se repitió tres veces. Las proteínas retenidas fueron eluidas por agregado

de tiocianato de sodio (NaSCN) 4M, compuesto disociante del complejo antígeno-anticuerpo.

El extracto de proteínas para cada lote, reconocido por el antisuero mediante esta técnica, fue analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradientes del 6 al 12% según se ha descrito en M.3.8, con posterior análisis de las bandas radiactivas.

## RESULTADOS

### R.3.1. Identificación de proteínas específicas epididimarias producidas en cultivo de órgano

En una gran variedad de mamíferos se ha demostrado que los andrógenos estimulan la síntesis de un grupo reducido de proteínas específicas en el epidídimo.

Empleando el modelo experimental del cultivo de órgano, en el que el epidídimo humano es sensible a la estimulación androgénica, se estudió la síntesis de proteínas y se analizó su producción en ausencia (DEFLECIONADO) y presencia (ESTIMULADO) de andrógenos, con el objeto de seleccionar aquellas sintetizadas bajo regulación hormonal.

Como método de determinación de la síntesis proteica se empleó la incubación del tejido con aminoácidos radiactivos, con posterior identificación en geles de poliacrilamida de las bandas de proteínas radiactivas y análisis de las modificaciones de los perfiles de incorporación como consecuencia del estado hormonal.



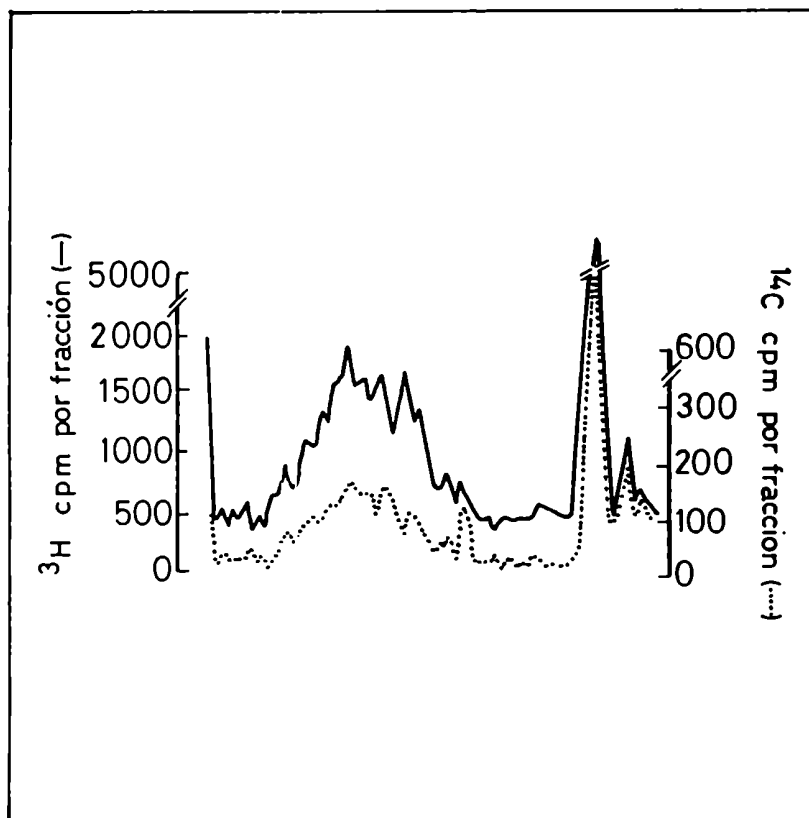
Las incubaciones con los precursores radiactivos fueron llevadas a cabo por períodos extendidos de tiempo, con el objeto de favorecer la equilibración del precursor con los "pools" intracelulares.

Como resultado de este estudio, que se presenta en la FIGURA 21 se encontró una distribución discreta de picos para ambos isótopos, determinándose que el perfil electroforético correspondiente al extracto citosólico proveniente del tejido ESTIMULADO (marcado homogéneamente con aminoácidos tritiados) era diferente del obtenido para el extracto del tejido DEPLECIONADO (marcado con  $^{14}\text{C}$  aminoácidos).

El extracto citosólico de tejido DEPLECIONADO fue seleccionado como control interno; a partir de ello se realizó electroforesis conjunta de ambos extractos, lo cual permitió analizar la estimulación relativa al control de la síntesis en las distintas proteínas como resultado del agregado de andrógenos.

En la FIGURA 22 se muestra la representación gráfica del cociente  $[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}]$  para cada fracción en un perfil electroforético. La línea de base corresponde al índice promedio calculado sobre la totalidad del gel, por encima de la que se observan los picos de estimulación, los que en

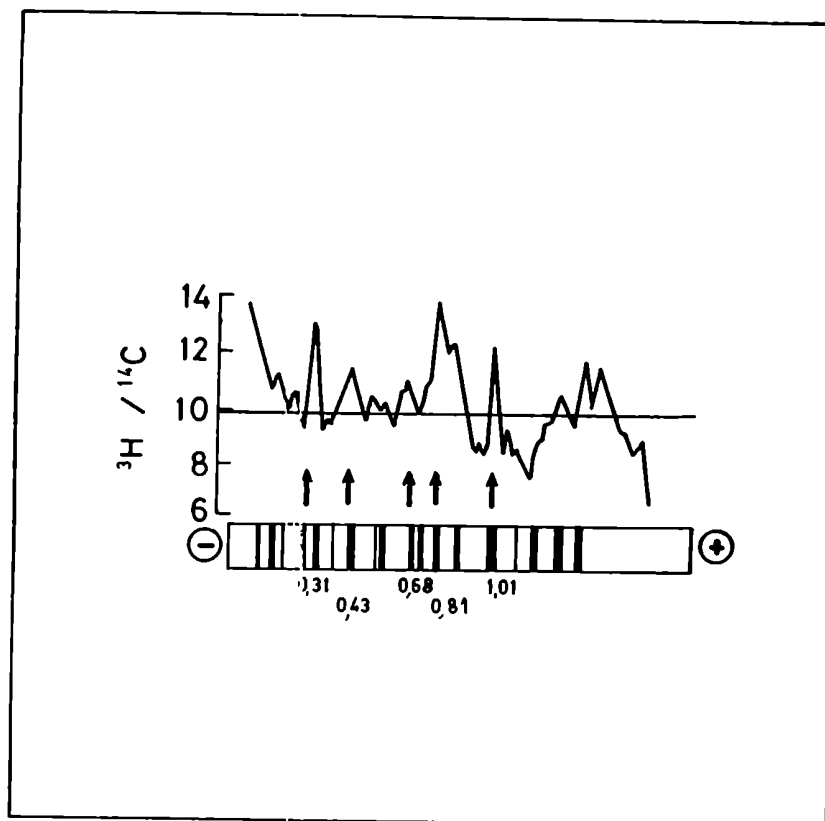
FIGURA 21



Proteínas específicas andrógeno-dependientes en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Incorporación de precursores (aminoácidos radiactivos marcados con [3H] y con [14C] ) a proteínas de tejido cultivados en ausencia (línea punteada) y en presencia (línea llena) de andrógenos.

Los perfiles corresponden a la distribución de la radiactividad incorporada por los tejidos luego de la realización de ensayo de síntesis proteica ( M.3.7) y posterior análisis electroforético para cada extracto citosólico.

FIGURA 22



Proteínas específicas andrógeno-dependientes en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Estimulación por andrógenos de la síntesis de proteínas epididimarias.

Cocientes isotópicos ( $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ), relacionando los productos marcados en tejidos cultivados en presencia y ausencia de andrógenos, respectivamente, relación indicativa de tal estimulación, que queda visualizada a través de los picos señalados con las flechas. En la figura también se muestra una representación esquemática de las bandas observadas por tinción de un perfil electroforético de un extracto citosólico de epidídimo humano, obtenido según se detalla en M.3.8.. Los números corresponden a las movilidades  $R_f$  seleccionadas en el presente estudio.

muchos casos se corresponden con bandas teñidas, según una técnica detallada en MATERIALES y METODOS . El análisis descripto se repitió con 20 tejidos diferentes y, a partir de ello, se calculó la movilidad relativa promedio de cada una de las bandas que aparecían como picos de estimulación.

Dada la complejidad del perfil electroforético del extracto obtenido a partir de tejido epididimario, para continuar los estudios se llevó a cabo una selección de los picos de estimulación. Para ello se eligieron aquellas bandas que presentaran las siguientes características: \* Frecuencia de aparición mayor del 50% en el extracto de tejido estimulado con andrógenos. \* Inhibición selectiva de la síntesis por acetato de ciproterona, compuesto cuya acción antiandrogénica ha sido descrita en varios tejidos blanco de andrógenos.

Las bandas seleccionadas en base a la frecuencia de aparición, presentaron las siguientes movilidades relativas a la albúmina humana (Ra) :

$0.31 \pm 0.02$ ;  $0.43 \pm 0.01$ ;  $0.68 \pm 0.02$ ;  $0.81 \pm 0.02$ ;  
 $1.01 \pm 0.02$ .

Los picos de estimulación correspondientes a las bandas seleccionadas, se indican con flechas en la FIGURA 23.

En la TABLA 12 se muestra la frecuencia de aparición de la bandas encontradas en el tejido, calculada sobre las 20 determinaciones. La banda cuya movilidad electroforética era similar a la del marcador de albúmina humana fue detectada en el 95 % de los casos, mientras el resto presentó una frecuencia entre el 75 y 50 % de las determinaciones experimentales.

Con el objeto de confirmar la dependencia androgénica de la síntesis de las proteínas en estudio, se analizó el efecto del agregado de acetato de ciproterona al medio de cultivo. Para ello, los tejidos estimulados se dividieron en dos lotes, recibiendo en un caso conjuntamente con el andrógeno el antiandrógeno a una concentración 10 uM, realizándose luego un análisis electeoforético conjunto del DEPLECIONADO y ESTIMULADO o DEPLECIONADO y ESTIMULADO/Acetato de Cyproterona. Los resultados de este estudio se presentan en la FIGURA 23. Según se observa, los picos de estimulación correspondientes a las bandas de mayor estimulación en presencia de andrógenos en el lote ESTIMULADO (línea llena), disminuyeron por debajo de la

TABLA 12

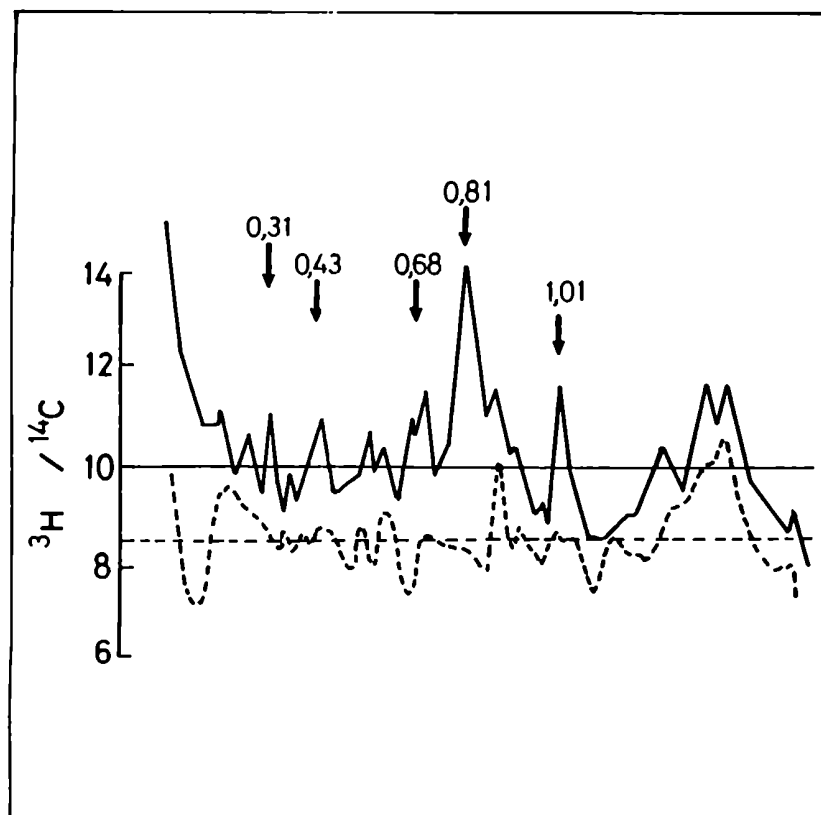
Ra	Frecuencia de aparición en tejido (%)
0,31 + 0,02 —	55
0,43 + 0,01 —	55
0,68 + 0,02 —	75
0,81 + 0,02 —	50
1,01 + 0,02 —	95

TABLA 12- Proteínas específicas andrógeno-dependientes en el epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Frecuencia de aparición de las proteínas estimuladas por androgénos presentes en el extracto citosólico de tejido epididimario.

Los tejidos fueron mantenidos en condiciones de cultivo de órgano (M.1.4), y la síntesis de proteínas fue analizada según el ensayo descrito en M.3.7

Ra = movilidad de la banda relativa a la correspondiente a la albúmina humana.

FIGURA 23



Proteínas específicas andrógeno-dependientes en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Efecto del agregado de acetato de cyproterona conjuntamente con el andrógeno al medio de cultivo sobre la estimulación de las proteínas específicas epididimarias.

Los tejidos fueron cultivados en ausencia de andrógenos, en presencia de andrógenos (línea llena) y en presencia de andrógenos conjuntamente con Acetato de Cyproterona (línea punteada), luego de lo cual se realizó un ensayo de síntesis proteica y se analizaron los productos obtenidos.

línea de base cuando, conjuntamente con el andrógeno, se agregó el antiandrógeno (línea punteada). El efecto general del antiandrógeno fue una reducción en la incorporación del precursor a las proteínas, alcanzando un valor medio 20 % menor que el correspondiente al deplecionado.

En vista de estos resultados, en los estudios siguientes se analizó la presencia de las 5 bandas seleccionadas a partir de este análisis.

#### R.3.2. Carácter secretorio

Una vez identificadas las proteínas epididimarias producidas por el tejido en respuesta a los andrógenos, se realizó un estudio similar sobre los medios de incubación provenientes del ensayo con los precursores marcados, con el objeto de determinar el carácter secretorio de las proteínas.

El análisis se realizó sobre 8 medios de cultivo. A partir del cociente isotópico entre el medio estimulado y deplecionado, nuevamente se determinó un perfil complejo. Sin embargo, cuando se calculó la frecuencia de aparición para cada banda, resultados que aparecen en la TABLA 13, se encontró que las de mayor frecuencia presentaron



TABLA 13

Ra	Frecuencia de aparición en el medio de cultivo (%)
0,31 + 0,02 —	100
0,43 + 0,01 —	75
0,68 + 0,02 —	85
0,81 + 0,02 —	62
1,01 + 0,02 —	75

TABLA 13- Proteínas específicas andrógeno-dependientes en el epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Frecuencia de aparición de las proteínas estimuladas por andrógenos presentes en el medio de incubación.

Las condiciones experimentales se detallan en MATERIALES Y METODOS (M. 1.4.y M.1.7.)

Ra = movilidad de la banda relativa a la correspondiente a la albúmina humana.

movilidades  $R_a$  coincidentes con las correspondientes al tejido, hecho que sugería una secreción selectiva de proteínas sintetizadas por el tejido.

Dado que se encontraba una estimulación por parte de los andrógenos en la síntesis y secreción de las proteínas, en un estudio posterior se trató de distinguir el efecto de la hormona sobre cada proceso. Se compararon los cocientes isotópicos calculados en tejido y medio para cada banda en estudio. En la TABLA 14 se muestran los valores de los cocientes para tejido y medio y la relación medio a tejido en cada caso. Dicha comparación indicó que, bajo estimulación androgénica todos esos cocientes mostraron mayores aumentos en el medio que en el tejido, con excepción de la banda con  $R_a$  0,68. Este hecho sugiere que los andrógenos podrían activar los procesos secretorios de esas proteínas, principalmente para las de  $R_a$  0,31 y 0,43, las que presentaron los valores más altos de ese cociente.

### R.3.3. Análisis electroforético de los fluidos epididimarios y del extracto salino de espermatozoides

Los fluidos epididimarios obtenidos según se ha descrito en MATERIALES y METODOS, fueron analizados empleando electroforesis en geles de poliacrilamida no

TABLA 14

Ra	[3H/14C]tej.	[3H/14C]medio @
0,31 $\pm$ 0,02	24	102
0,43 $\pm$ 0,01	52	99
0,68 $\pm$ 0,02	72	35
0,81 $\pm$ 0,02	9	30
1,01 $\pm$ 0,02	11	24

TABLA 14- Proteínas específicas andrógeno-dependientes en el epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Estimulación androgénica de la secreción de las proteínas epididimarias sintetizadas en cultivo en respuesta a los andrógenos.

El efecto de los andrógenos sobre la estimulación de la secreción se evaluó comparando los cocientes isotópicos multiplicados por cien (@) de cada banda analizada tanto en tejido como en medio.

Ra = movilidad de la banda relativa a la correspondiente a la albúmina humana .

desnaturalizantes e identificando las bandas teñidas por su movilidad relativa a la albúmina humana.

Un análisis similar se llevó a cabo sobre el extracto salino de espermatozoides... obtenido por incubación de espermatozoides normales con NaCl 0,6M.

Sobre los perfiles electroforéticos se analizó la presencia de las bandas seleccionadas en tejido. El resultado de dicho análisis se presenta en la TABLA 15.

Según se observa, la banda de movilidad 0,43 se detectó solo en el fluido de CAUDA, mientras que las otras bandas fueron detectadas tanto en el FCapE como en el FCaE. Los perfiles de extracto de espermatozoide mostraron consistentemente la presencia de las bandas con movilidades 0,43 y 0,31, mientras que el resto de las bandas se observaron solo ocasionalmente.

#### R.3.4.Determinación del Peso Molecular de las proteínas específicas epididimarias andrógeno-dependientes.

Una vez identificadas las de proteínas sintetizadas por el tejido epididimario en respuesta a los andrógenos, se determinó, en primer lugar, el Peso Molecular relativo, utilizando un sistema de electroforesis en geles de

TABLA 15

Ra	FCapE	FCauE	Extracto salino de espermatozoides
0,31 $\pm$ 0,02	+	++	++
0,43 $\pm$ 0,01	-	++	++
0,68 $\pm$ 0,02	+	+	+
0,81 $\pm$ 0,02	+	-	+
1,01 $\pm$ 0,02	+	+	+

TABLA 15- Proteínas específicas andrógeno-dependientes en el epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Presencia de las bandas seleccionadas en cultivo de órgano en fluidos epididimarios y extracto salino de espermatozoides. FCapE=Fluido de Caput Epididimario; FCauE=Fluido de Cauda Epididimario

Los signos + indican la presencia en menor (+) o mayor (++) intensidad de tinción de las bandas analizadas. El signo - indica la ausencia de la banda con Ra en estudio.

Ra = movilidad de la banda relativa a la correspondiente a la de la albúmina humana.

poliacrilamida al 12.6% en presencia de dodecil sulfato de sodio.

Las muestras a analizar se obtuvieron a partir de las bandas electroforéticas en gradientes de poliacrilamida (6-12%), sistema en el que se había realizado su identificación a través de su movilidad relativa a la albúmina o Ra.

En la TABLA 16 se observan los resultados obtenidos en el presente estudio. Si bien se observó un apreciable grado de heterogeneidad en el perfil electroforético analizado, se pudo identificar un pico principal para cada banda analizada, a partir del que se calculó el peso molecular que se presenta en la tabla.

#### R.3.5. Determinación del Punto Isoeléctrico de las proteínas específicas epididimarias andrógeno-dependientes

Se determinó el o los puntos isoelectrónicos de las proteínas que el epidídimo humano mantenido en condiciones de cultivo de órgano sintetiza luego de la estimulación androgénica.

TABLA 16

Ra	Masa Molecular ( $\bar{x}$ $\pm$ ES)
0,31 $\pm$ 0,02	38000 $\pm$ 2800
0,43 $\pm$ 0,01	21000 $\pm$ 1000
0,68 $\pm$ 0,02	69000 $\pm$ 1600
0,81 $\pm$ 0,02	13900 $\pm$ 400
1,01 $\pm$ 0,02	29000 $\pm$ 400

TABLA 16- Proteínas específicas epididimarias en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Determinación del peso molecular de las proteínas estimuladas por andrógenos presentes en extracto citosólico de tejido epididimario.

La determinación del peso molecular se realizó según una técnica descrita en M.3.9.

Ra = movilidad de la banda relativa a la correspondiente a la albúmina humana .

Para ello, luego de la electroforesis semipreparativa de los extractos proteicos estimulados con la hormona y posterior aislamiento de los componentes de cada banda, se determinó esta propiedad empleando un método comentado en MATERIALES y METODOS.

El resultado de este análisis se muestra en la TABLA 17. Todas las proteínas analizadas presentaron puntos isoeléctricos que oscilaron entre 5,1 y 6,8. Nuevamente se encontró para cada proteína una parcial heterogeneidad, que fue apreciable para la banda de Ra 0,81, en la que se determinaron dos valores de punto isoeléctrico.

#### R.3.6. Presencia de azúcares en las proteínas específicas epididimarias

Según se ha descrito en M.3.11., además de los estudios anteriores orientados a la caracterización de las proteínas específicas de epidídimo humano, se realizó un estudio preliminar con el objeto de determinar la presencia de azúcares en las entidades estudiadas.

Este estudio fue realizado tanto en un extracto citosólico de tejido cultivado con andrógenos con precursores radiactivos, así como con el medio de incubación de ese ensayo.



TABLA 17

Ra	Punto Isoeléctrico
$0,31 \pm 0,02$	5,8
$0,43 \pm 0,01$	6,2
$0,68 \pm 0,02$	5,1
$0,81 \pm 0,02$	6,2-6,8
$1,01 \pm 0,02$	6,8

TABLA 17-Proteínas específicas andrógeno-dependientes en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Determinación del punto isoelectrico de las proteínas estimuladas por andrógenos presentes en extracto citosólico de tejido epididimario.

La determinación del punto isoelectrico de las proteínas se llevó a cabo empleando el método descrito en M.1.10.

Ra = movilidad de la banda relativa a la correspondiente a la albúmina humana .

Las bandas con movilidades electroforéticas relativas a la albúmina 0,31, 0,43, 0,68 y 0,82 fueron retenidas por la columna de concanavalina A y eluidas posteriormente luego de la adición del  $\alpha$ -metil-manósido. La banda de movilidad  $R_f$  1,01 fue retenida solo parcialmente por la lectina seleccionada.

Los resultados obtenidos indicaron la posible presencia de residuos glucosa y/o manosa en las proteínas retenidas y posteriormente desplazadas por el metil-manósido.

R.3.7 Caracterización del antisuero obtenido con extracto salino de espermatozoides.

R.3.7a) Inmunodifusión bidimensional

En primer lugar se analizó la especificidad de tejido del antisuero, empleando una técnica de inmunodifusión bidimensional. Para ello el antisuero obtenido se enfrentó a extracto citosólico de epidídimo humano, fluido de CAUDA epididimario, extracto citosólico de próstata humana, extracto citosólico de testículo humano y suero humano. Como resultado de este ensayo se observaron bandas de precipitación en los extractos citosólicos epididimario y

prostático, así como en el fluido caudal epididimario.

Posteriormente la fracción que reconocía antígenos prostáticos fue eliminada por adsorción del antisuero con citosol prostático. Luego de este tratamiento, el antisuero dio reacción positiva con extracto citosólico epididimario y fluido del CAUDA epididimario.

#### R.3.7.b) Inmunolectroforesis

Dado que el antisuero presentó una reacción positiva con el extracto citosólico epididimario humano, se trató de determinar la identidad de los antígenos reconocidos. En un primer intento, se realizó inmunolectroforesis de extracto citosólico epididimario humano, el que se enfrentó al antisuero.

Este análisis permitió determinar que los antígenos reconocidos por el antisuero en las condiciones ensayadas presentaban  $R_a$  de 0,31 y 0,43, valores coincidentes con proteínas identificadas en tejido epididimario humano mantenido en cultivo de órgano, sintetizadas en respuesta a los andrógenos, y con bandas con las mismas movilidades presentes en FCauE y en extracto salino de espermatozoides.

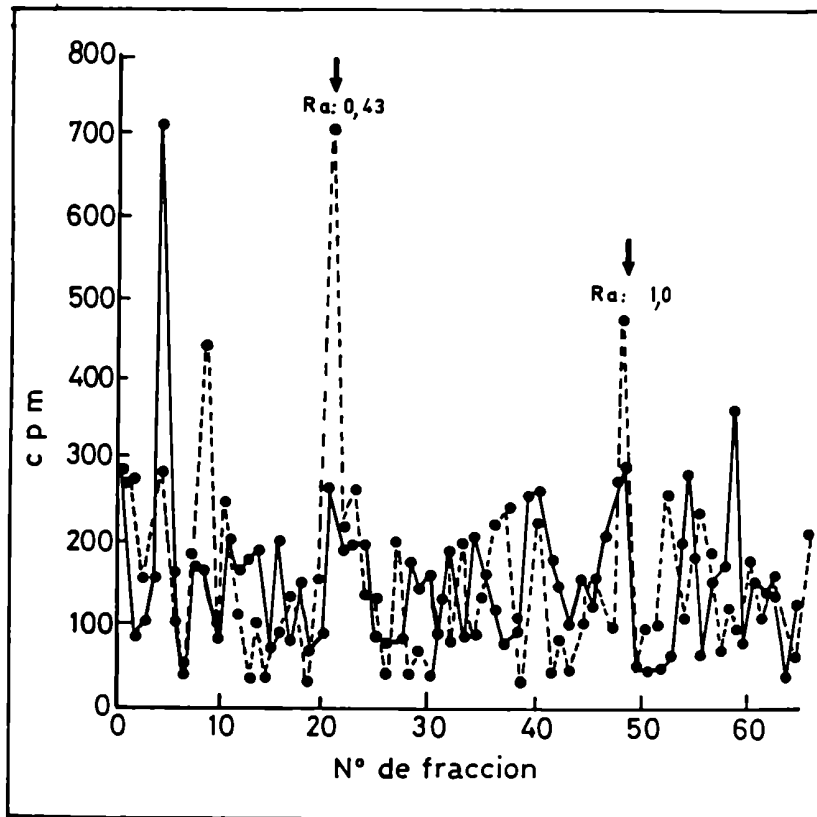
R.3.7c) Inmunoadsorción de proteínas específicas epididimarias sintetizadas en cultivo de órgano

Luego de los resultados obtenidos por inmunolectroforesis, se trató de determinar si el antisuero, obtenido contra antígenos de superficie de espermatozoides, reconocía alguna de las proteínas identificadas previamente a partir del ensayo de marcación isotópica en tejido epididimario mantenido en condiciones de cultivo de órgano.

Para ello el antisuero fue inmovilizado en una matriz de Sepharosa 4B, luego de lo cual se enfrentó al medio de cultivo proveniente del grupo deplecionado y luego al medio proveniente del tejido estimulado con andrógenos. El resultado de este estudio se presenta en la FIGURA 24, en la que se observa el perfil electroforético de los antígenos recuperados luego de la interacción de ambos medios con el antisuero.

Los tejidos estimulados con hormona secretaron componentes que fueron reconocidos por el antisuero y que presentaban movilidades  $R_f$  0,43 y 1,0, coincidentes con algunas movilidades de proteínas seleccionadas en tejido por su frecuencia y carácter androgénico dependiente de su síntesis, así como su presencia en el medio. Sin embargo,

FIGURA 24



Proteínas específicas andrógeno-dependientes en epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano. Antígenos epididimarios reconocidos por un antisuero obtenido contra extracto salino de espermatozoides.

El tejido epididimario fue cultivado en presencia (línea punteada) y ausencia (línea llena) de andrógenos, derivado para el estudio de síntesis proteica y obtenidos los medios de esa incubación, los que fueron enfrentados al antisuero en estudio inmovilizado en una matriz de Sepharosa (M.3.12.e). La figura representa los perfiles electroforéticos de las fracciones de esos extractos reconocidas por el antisuero.

el antisuero no reconoció ninguna de las bandas provenientes de un tejido deplecionado de andrógenos.

Estos resultados fueron de gran interés, teniendo en cuenta que el antisuero reconoce antígenos presentes en cortes de tejido epididimario, así como sobre espermatozoides epididimarios y eyaculados (ver DISCUSION).

## DISCUSION

En animales de experimentación se ha tratado de determinar la participación del epidídimo en la maduración de espermatozoides, proceso en el que la gameta masculina sufre numerosos cambios que culminan con la adquisición de capacidad fertilizante.

Dado que dicha maduración funcional implica cambios en la capacidad del espermatozoide para reconocer sus receptores específicos de especie en el óvulo y suponemos que este cambio se produce en la membrana plasmática, la identificación de glicoproteínas sintetizadas por el epidídimo en respuesta a los andrógenos es de especial interés en este aspecto, pues dichas sustancias son componentes de superficie celular. Esas entidades podrían entonces interactuar con los espermatozoides en maduración en el lumen epididimario, habiendo en el presente numerosas evidencias de tal interacción (241, 243, 254).

Usando un modelo experimental en el cual el epidídimo humano es mantenido en cultivo de órgano, se ha identificado un grupo de proteínas, sintetizadas por el tejido en respuesta a la estimulación androgénica.

Evidencias de respuesta similar han sido descritas en la rata (90) y en el hamster (235), especies en las que se identificaron proteínas específicas epididimarias andrógeno dependientes.

El criterio elegido para definir su andrógeno dependencia fue la selección de las bandas sintetizadas por tejidos estimulados con la hormona y ausentes tanto en tejidos cultivados en medio carente de andrógenos como en tejidos cultivados en presencia de la hormona y un antiandrógeno de acción conocida.

De esa forma se seleccionaron bandas con movilidades electroforéticas referidas a la albúmina de 0,31- 0,43- 0,68- 0,81- 1,01.

Por otra parte, el análisis de los medios de la incubación con precursores radiactivos, presentó un perfil electroforético similar al del tejido.

Si bien no es una prueba de identidad la identificación de bandas con la misma movilidad electroforética en el tejido, medio de cultivo y fluido epididimario sugiere el carácter secretorio de las proteínas en estudio.



La andrógeno dependencia de la secreción de proteínas específicas epididimarias ha sido descrita en animales de experimentación (90, 329). En los estudios realizados en epidídimo humano la estimulación androgénica de la secreción de las proteínas seleccionadas quedó evidenciada a través del incremento de la relación del contenido de proteínas totales radiactivas entre los medios y tejidos homólogos analizados y, posteriormente, a partir de los valores de la comparación de los cocientes isotópicos del medio de incubación y del tejido, para cada banda. Estos resultados mostraron la estimulación específica de la secreción para cuatro de las cinco bandas estudiadas.

Por lo tanto, la respuesta del epidídimo humano a la estimulación androgénica en relación a la síntesis proteica resulta ser similar a la descrita en algunos animales de experimentación a través de estudios empleando metodologías similares (90, 244, 245, 263, 330), así como por estudios autorradiográficos combinados con microscopía óptica y electrónica (86, 87, 331) y por estudios inmunohistoquímicos (332).

Del análisis de algunas propiedades de las proteínas estudiadas surge que las proteínas de epidídimo humano poseen bajo peso molecular así como puntos isoeléctricos a

pH ácido , características similares a las encontradas en estudios realizados epidídimo de animales de experimentación (235, 240, 247, 252, 333) Además, el reconocimiento por la lectina Concanavalina A de las bandas seleccionadas sugieria carácter glicoproteico (235, 334) Resulta importante resaltar, sin embargo, que la caracterización se llevó a cabo a partir de las bandas provenientes de geles no desnaturalizantes, existiendo la posibilidad de la presencia de varias proteínas en una banda en particular. Por lo tanto los resultados deben ser confirmados empleando técnicas específicas de reconocimiento de cada una de las proteínas.

El análisis de los perfiles electroforéticos de los fluidos de CAPUT y CAUDA epididimarios indicó la presencia de bandas con igual movilidad electroforética que las de las proteínas estimuladas en cultivo, con excepción de la de Ra 0,43, la que no fue detectada en el fluido del segmento proximal al testículo. Sin embargo, la ausencia de esta banda podría ser consecuencia de una limitación del método de detección empleado; la proteína podría estar en concentraciones inferiores al límite de detección de la técnica de tinción empleada.

El extracto salino de espermatozoides eyaculados mostró, en el análisis electroforético, la presencia de las bandas con Ra 0,3 y 0,43 en todos los casos estudiados y, ocasionalmente, el resto de las proteínas seleccionadas en estudio.

La presencia de bandas con movilidades electroforéticas idénticas en extracto citosólico de tejido y en fluido epididimarios, así como en extracto salino de espermatozoides, sugirió una posible interacción de las proteínas epididimarias humanas con los espermatozoides, fenómeno que podría estar relacionada con el proceso de maduración del espermatozoide.

Se considera que la aparición de antígenos en la superficie de los espermatozoides durante el proceso de maduración podría efectuarse mediante tres mecanismos:

\*) Inserción de componentes citoplásmicos en la membrana plasmática.

\*\*\*) Exposición y modificación de componentes preexistentes en la superficie celular.

\*\*\*) Asociación e incorporación de componentes exógenos a la membrana celular.

Numerosos estudios sugieren que el \*\*\* es el mecanismo que opera durante la maduración del espermatozoide en numerosos mamíferos. La caracterización de antisueros obtenidos contra proteínas epididimarias o de espermatozoides permite determinar la posible interacción de determinados ligandos del epidídimo con los espermatozoides madurantes.

Evidencias sugiriendo que productos secretados por el epidídimo podrían asociarse a espermatozoides han sido obtenidas en numerosos mamíferos, inicialmente por análisis inmunolectroforético (238), análisis electroforético del fluido luminal proveniente del tracto reproductivo y espermatozoides (90, 235, 236, 239, 247) y análisis de localización inmunocitoquímica realizado sobre secciones histológicas de tejido epididimario, empleando antisueros obtenidos contra proteínas epididimarias o de fluido luminal (91, 237, 241, 254).

Con el objeto de estudiar la existencia de un fenómeno similar en el hombre se preparó un antisuero dirigido contra extracto salino de espermatozoide, presumiblemente rico en glicoproteínas y glicolípidos extraídos de su superficie, el que había mostrado presentar algunas bandas con movilidades electroforéticas idénticas a

las de proteínas sintetizadas por el epidídimo en forma dependiente de andrógenos.

Las primeras evidencias en favor del origen epididimario de los antígenos de espermatozoides detectados por el antisuero fueron provistas por los ensayos de inmunodifusión en los que se encontró la presencia de bandas de precipitación cuando el antisuero se enfrentó a citosol epididimario y la ausencia de bandas con suero y citosol de testículo, así como la subsecuente pérdida de reacción cruzada con prósta luego de la adsorción del antisuero con extracto citosólico de ese tejido.

La presencia en el antisuero de inmunoglobulinas que reconocen antígenos prostáticos no fue sorprendente, dado que el antisuero fue obtenido a partir de un extracto proveniente de espermatozoides eyaculados, los cuales estuvieron en contacto con fluido prostático. Es conocida la presencia de antígenos de cobertura en espermatozoides humanos provenientes del plasma seminal, secretados por las glándulas accesorias del aparato genital (335, 336, 337, 338).

Los estudios de inmunolectroforesis permitieron identificar antígenos epididimarios reconocidos por el antisuero, presentes en el extracto citosólico de tejido

control, con movilidades Ra 0,3 y 0,43 . Además, el ensayo de inmunoadsorción reveló el reconocimiento por el antisuero de bandas con Ra 0,43 y 1,01 de un extracto de medio de cultivo estimulado con andrógenos marcado con precursores radiactivos . La ausencia de la banda de Ra 1,01 en la inmunoelectroforesis podría ser consecuencia de una baja concentración del antígeno en el citosol epididimario control , insuficiente para producir una banda de precipitación, pero suficiente para ser visualizado con una técnica más sensible que la anterior, marcando las proteínas con isótopos radiactivos. En contraste, el antígeno con Ra 0,3, detectado en la inmunoelectroforesis, no fue detectada en el ensayo de inmunoadsorción. Este hecho podría deberse a una baja tasa de síntesis y degradación de la proteína, lo cual impediría su acumulación en cantidad suficiente para ser detectado en el experimento de marcación de proteínas y, por lo tanto ser luego reconocido por el antisuero. Otra explicación a este hecho podría ser la modificación del antígeno reconocido en el citosol al ser secretado modificación que no produciría diferencias detectables en el perfil electroforético pero que conduciría a una falta de reconocimiento por el antisuero en el medio analizado.

La presencia en el antisuero de inmunoglobulinas con capacidad de reconocimiento de proteínas epididimarias específicas andrógeno- dependientes sintetizadas en cultivo refuerza la idea de una posible interacción de componentes epididimarios sobre la gameta masculina, ya que un extracto de espermatozoides fue el antígeno a partir del cual se obtuvo el antisuero.

Por otra parte, los resultados presentados son apoyados por un análisis de localización, por inmunofluorescencia indirecta, de los antígenos reconocidos por el antisuero obtenido, estudio realizado en nuestro laboratorio tanto sobre cortes de tejido epididimario, como sobre espermatozoides (339).

En ese análisis, una evidencia más apoyando la especificidad de tejido del antisuero empleado fue dada por: a) la ausencia de fluorescencia en cortes de tejido testicular (tanto en el epitelio tubular como en el contenido luminal) y prostático; b) la localización de la fluorescencia sobre el epitelio epididimario; c) la desaparición de la fluorescencia en tejido epididimario luego de la adsorción del antisuero con citosol epididimario.

La consistente reacción negativa obtenida en próstata y testículo sugiere que los antígenos estudiados están ausentes o inaccesibles en el tejido y espermatozoides testiculares, y que las inmunoglobulinas dirigidas contra antígenos prostáticos fueron removidas satisfactoriamente por el procedimiento de adsorción.

El análisis realizado sobre tejido proveniente de distintos segmentos mostró marcación fluorescente en los cortes correspondientes al CAPUT distal, CORPUS y CAUDA. La inmunofluorescencia se localizó en las células epiteliales epididimarias, con algunas diferencias en la intensidad y distribución de la marcación, y en los espermatozoides contenidos en el lumen. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por estudios similares realizados en tejido epididimario de otros mamíferos, empleando antisueros obtenidos contra proteínas específicas epididimarias de hamster purificadas por isoelectroenfoque (91), de epidídimo de ratón por empleo de anticuerpos monoclonales (340), y de epidídimo de rata usando tanto un antisuero contra una sialoproteína de 37.000 (244), como contra la AEG (241) o la denominada D-E (240), estudios en los que se encontraron antígenos reconocidos por los antisueros en las regiones del CAPUT y CORPUS epididimarios, localizados en las células principales.



El análisis de localización de la fluorescencia en el tejido en la región caudal mostró una concentración de la marca en las estereocilias. Esto podría representar el estadio inicial de una activa absorción y degradación del exceso de antígeno no unido a los espermatozoides, similar al mecanismo de absorción del material luminal descrito para numerosos mamíferos en muchas áreas del tracto reproductivo, incluyendo el cauda epididimario (341, 342, 343). Este fenómeno también podría atribuirse a un alto "turnover" del antígeno asociado a una continua liberación en el fluido extracelular, fenómeno sugerido por Moore, en estudios realizados en epidídimo de hamster y conejo (91), y descrito en otros tipos celulares (344).

La semejanza con otros mamíferos indicaría que el mecanismo y la especialización epitelial para la secreción y absorción de antígenos asociados a espermatozoides en el epidídimo serían bastante similares en las especies examinadas.

En ese estudio también se determinó el número de espermatozoides marcados con inmunofluorescencia en los distintos segmentos epididimarios, estudio que permitió observar incremento gradual en el número de células marcadas con mayor intensidad de fluorescencia en sentido

céfalo-caudal. Este aumento determinado en espermatozoides humanos resultó ser similar al observado en la asociación de proteínas epididimarias a espermatozoides en la rata entre los segmentos del CAPUT y CAUDA, descrito por Kohane y colaboradores (253), reafirmando de esta forma la hipótesis por la cual antígenos epididimarios serían agregados en forma progresiva a la superficie de los espermatozoides.

Los espermatozoides obtenidos de los distintos segmentos epididimarios presentaron una distribución heterogénea de la marcación de fluorescencia. En los espermatozoides recuperados de las regiones del CAPUT y CORPUS epididimarios gran cantidad de células presentaron una importante marcación fluorescente localizada en el borde del casquete acrosomal. Los correspondientes al segmento distal o CAUDA presentaron la fluorescencia distribuida homogéneamente sobre el acrosoma. La observación de marcación solo en el borde del acrosoma en los espermatozoides proximales podría deberse a una escasa cantidad de isocianato de fluoresceína (FITC) distribuidas en la superficie celular, asociado con una superposición en el mismo plano óptico producida en el borde celular, originando una mayor intensidad, suficiente para ser detectada.

A pesar de las diferencias mencionadas, la localización de los antígenos sobre la cabeza del espermatozoide, está de acuerdo con los estudios de Mancini y colaboradores (345), quienes analizando la localización inmunohistoquímica de antígenos en espermatozoides humanos, describieron a la región del casquete acrosomal, cuello y pieza media como las zonas inmunológicas más reactivas, y sugirieron en esas regiones la presencia de antígenos de cobertura provenientes de fluidos testiculares y epididimarios.

La detección y posterior caracterización de factores proteicos epididimarios producidos en respuesta a la estimulación androgénica que interaccionan con espermatozoides madurantes permite sugerir la participación del epidídimo en el proceso de maduración y como consecuencia de ello la adquisición de capacidad fertilizante.

Según se ha mencionado en la INTRODUCCION, numerosos trabajos han contribuido a determinar el posible rol fisiológico de las proteínas epididimarias en la maduración (256, 261, 262, 263, 26, 267). Estos estudios han conducido a proponer la participación de estas estructuras en la modificación de la superficie celular del

espermatozoide provocando un aumento en la fertilidad (264), el cual podría ser consecuencia de un aumento en la capacidad de unión del espermatozoides a la zona pellucida del ovocito, fenómeno que fue sugerido en base al incremento en la capacidad de unión del espermatozoide a la zona pellucida durante su tránsito por el epidídimo, descrito en ratón (346), carnero(347) y hamster (263), y además por la identificación de proteínas receptoras para espermatozoides en la zona pellucida.

En el hombre aún no se ha podido determinar la específica participación de factores epididimarios en la maduración. Numerosos estudios de caracterización de antígenos de espermatozoides humanos fueron realizados a fines de la década del 60, y describieron la existencia de antígenos de plasma seminal en la superficie del espermatozoide, caracterizando una proteína con propiedades idénticas a la lactoferrina (348, 349). Recientemente, Wolf y colaboradores han descrito un antígeno en espermatozoides humanos, a partir del desarrollo de anticuerpos monoclonales, estudios que indicaron a ese antígeno como una proteína de cobertura, y cuya función aún no ha sido determinada (350).

Teniendo en cuenta todas estas evidencias, si bien hasta el presente no se ha descrito una función para las proteínas epididimarias humanas identificadas en el presente estudio, su posible participación en el proceso de maduración podría ser sugerida a partir de la correlación encontrada entre el aumento gradual de espermatozoides fluorescentes y la adquisición progresiva de la capacidad de unión y penetración a ovocitos de hamster libres de zona pellucida, fenómeno previamente descrito por Hinrichsen y Blaquier (99), y confirmado por Moore y colaboradores (100).

## CONCLUSIONES

El epidídimo juega un rol prominente en el desarrollo de una fertilidad normal en el macho.

Cuando los espermatozoides dejan el testículo son inmóviles e incapaces de fertilizar ovocitos. Esas funciones se desarrollan mientras los espermatozoides se encuentran en el epidídimo en contacto con un microambiente cuya composición es distinta de la del plasma sanguíneo.

En el presente existe un total acuerdo indicando que la principal función del epidídimo es su participación en el proceso de maduración de espermatozoides. Muchos investigadores han dedicado sus esfuerzos a definir el ambiente epididimario, de forma tal de poder describir aquellas funciones desempeñadas por el epidídimo en relación a la maduración de espermatozoides y para determinar los mecanismos de control de las funciones epididimarias.

El conocimiento de la función epididimaria y regulación por los andrógenos ha progresado rápidamente en recientes años como consecuencia de la introducción de nuevas metodologías, fenómeno que ha permitido un análisis

cuidadoso de los cambios producidos en el espermatozoide así como la identificación y caracterización de factores producidos por el epidídimo en relación a ese proceso.

En el hombre, la escasez de conocimiento en relación a la función específica epididimaria podría ser causante de la falta de entendimiento en algunos aspectos de la infertilidad masculina. La disminución o falta de motilidad de espermatozoides, la ausencia de morfología normal, o la infertilidad idiopática podría ser atribuible a algún grado de malformación epididimaria más que a alguna disfunción testicular.

Si bien existen algunos métodos para chequear la función epididimaria, la falta de un conocimiento más específico hace prácticamente imposible la terapéutica aún en aquellos casos en los cuales es posible mostrar una insuficiencia epididimaria.

Por lo tanto el conocimiento de la fisiología epididimaria resulta de considerable importancia potencial.

Los trabajos presentados han tratado de ahondar en el conocimiento de la fisiología del epidídimo humano, tratando de analizar el efecto de los andrógenos sobre parámetros de la acción hormonal en ese órgano. Los

El tratamiento con estrógenos disminuye significativamente la retención de los compuestos  $5\alpha$  reducidos de T (DHT, Diones y  $5\alpha A$ ), siendo esa caída más apreciable en el caso de la DHT.

Todos esos efectos podrían entonces contribuir a una marcada regresión del epitelio epididimario observada en los pacientes estrogenizados, la cual es pensada ser principalmente el resultado de la inhibición de la biosíntesis de andrógenos causada por la hipofisectomía química.

Empleando un modelo experimental descrito previamente que permite mantener el tejido epididimario humano en condiciones de cultivo de órgano no fue posible encontrar diferencias significativas en la actividad de las enzimas  $5\alpha$  reductasa y  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa en tejidos cultivados en ausencia o presencia de andrógenos.

La actividad  $5\alpha$  reductasa no se modifica por el co-cultivo con tejido testicular, así como tampoco por la estimulación con dosis de andrógenos mayores que las descritas para la estimulación de la síntesis proteica en ese sistema.



resultados alcanzados indican que:

El epidídimo humano presenta un activo metabolismo de T a su metabolito  $5\alpha$  reducido DHT, así como a otros compuestos (Dioles, A,  $5\alpha$  A), siendo la  $5\alpha$  reducción la vía metabólica principal del metabolismo androgénico.

La actividad de la enzima  $5\alpha$  reductasa se localiza en un 85% en una fracción enriquecida en células epiteliales.

La actividad de la enzima  $5\alpha$  reductasa disminuye significativamente en tejidos de pacientes tratados con estrógenos in vivo (2,5 mg DES /día durante 6 a 8 meses) respecto del tejido epididimario control. Este fenómeno fue observado a través de los experimentos de incubación de cortes de tejido con el sustrato de la enzima así como a partir de los estudios de superfusión; estos últimos además mostraron una desviación de la interconversión de A hacia la vía reductiva para los tejidos tratados con estrógenos.

La terapia estrogénica conduce a una disminución de la actividad de la enzima  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa que alcanza niveles significativamente menores respecto de los valores obtenidos con tejido control.

Los niveles de actividad 5  $\alpha$  reductasa en los distintos lotes cultivados no cambia cuando la incubación del tejido con el sustrato se realiza en presencia de cofactor (NADPH  $5 \times 10^{-4}M$ ) agregado en forma exógena.

Por lo tanto, los resultados del análisis dirigido a la determinación de las modificaciones del metabolismo de andrógenos debidas al estado androgénico del órgano sugerirían la ausencia de una influencia androgénica sobre la actividad de la 5  $\alpha$  reductasa y 17  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa en el tejido epididimario humano en las condiciones ensayadas.

A partir de un estudio de determinación de las condiciones óptimas de medición de los sitios receptores androgénicos presentes en epidídimo humano se encontró:

El compuesto sintético R1881 mostró una unión específica a los sitios receptores para andrógenos medidos en todos los extractos analizados.

El pretratamiento del extracto citosólico con el compuesto mersalyl, así como la inclusión del anión molibdato en el buffer de homogeneización produjo un incremento en el número de sitios solubles detectados.

La incubación de los extractos microsomal y nuclear con alta concentración salina durante tiempos prolongados condujo a un aumento en el número de sitios recuperados en esos extractos.

La incubación de los extractos nuclear y microsomal en condiciones de intercambio del ligando con la hormona endógena fue óptima a baja temperatura y tiempos largos.

El cultivo de tejido epididimario condujo a una apreciable caída en el número de sitios receptores para andrógenos ensayados en las condiciones determinadas previamente. En los tejidos cultivados en ausencia de andrógenos se detectaron solo un 20% de los sitios originales evaluados en un tejido control. La inclusión de DHT en el medio de cultivo resultó en un incremento significativo de los sitios de unión para andrógenos en los tejidos que duplicó los valores correspondientes al tejido deplecionado de hormona.

Si bien el cultivo per se conduce a una disminución significativa del número de receptores respecto de los tejido control los sitios remanentes detectados en los tejidos tratados con andrógenos podrían constituir la fracción de sitios receptores suficiente para producir una completa respuesta biológica. Esta idea surge al comparar

los resultados obtenidos en el hombre con los correspondientes a estudios realizados en rata en los que se encontró que luego de 20 días de castración solo el 29 % de los sitios de unión para andrógenos del control se detectaban en esos tejidos (195). Sin embargo esta cantidad fue suficiente para gatillar una respuesta a la estimulación hormonal que conducía al tejido a condiciones similares a las del tejido normal. Similarmente, los tejidos humanos conteniendo solo el 40 % de los sitios evaluados en los tejidos control fueron capaces de responder a los andrógenos con un incremento en la incorporación de precursores de proteínas y ADN (285), así como la síntesis y secreción de proteínas específicas epididimarias.

Del análisis de la síntesis proteica de tejido epididimario humano matenido e cultivo de órgano surge que:

La estimulación androgénica del tejido epididimario incrementó la síntesis de un grupo de proteínas , las que fueron identificadas por su movilidad relativa a la albúmina humana en el sistema de separación empleado.

Las proteínas seleccionadas en el presente estudio son andrógeno - dependientes, fenómeno confirmado por la inhibición de su estimulación en tejido cultivado con andrógenos en presencia de un antiandrógeno.

Las proteínas estimuladas en cultivo son secretorias, lo cual queda evidenciado por su presencia en el medio de cultivo así como se sugiere por la visualización de bandas con la misma movilidad electroforética en los fluidos epididimarios.

La andrógeno - dependencia del carácter secretorio de las proteínas específicas epididimarias queda evidenciado a partir del análisis de los cocientes para cada banda en tejido y medio de incubación.

Las proteínas específicas epididimarias identificadas en el epidídimo humano presentan pesos moleculares bajos y puntos isoeléctricos a pH ácido, sugiriéndose además su carácter glicoproteico, características similares a las descritas para proteínas específicas epididimarias descritas en animales de experimentación.

El extracto salino de proteínas de espermatozoides eyaculados presentan proteínas con movilidades electroforéticas coincidentes con algunas bandas

identificadas en el tejido y medio, así como en fluidos epididimarios.

Un antisuero desarrollado contra el extracto salino de espermatozoides , luego de su caracterización, resultó ser específico de epidídimo no mostrando reacción con suero, testículo y próstata humanos.

Ese antisuero, reconoció por inmunolectroforesis proteínas epididimarias de extracto citosólico de ese tejido. Además, un estudio de inmunoadsorción mostró el reconocimiento del antisuero de las proteínas específicas epididimarias con movilidades electroforéticas 0,43 y 1,01, presentes en el medio de incubación de un tejido estimulado con andrógenos , no mostrando ese reconocimiento sobre un medio no estimulado con hormona.

En un estudio de inmunofluorescencia indirecta el antisuero mostró una reacción positiva con cortes de tejido epididimario humano proveniente de los segmentos CORPUS y CAUDA, obteniéndose resultados negativos sobre cortes de tejido testicular.

Ese antisuero reconoció antígenos localizados sobre la membrana plasmática de espermatozoides a través de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Este hallazgo fue

una evidencia más indicando la posible interacción de las proteínas epididimarias con los espermatozoides en su tránsito por el epidídimo.

Los resultados obtenidos han permitido avanzar el conocimiento de la respuesta del órgano a la presencia o ausencia de andrógenos. El comportamiento descrito para el epidídimo humano mantenido en cultivo de órgano resulta similar al hallado en numerosos animales experimentales; este hecho valida la aplicación del modelo experimental utilizado para la realización de los estudios dirigidos al conocimiento de la fisiología del órgano y conduce a continuar con los estudios en animales como modelos experimentales descriptivos de la fisiología para determinar las características funcionales del epidídimo.

Específicamente en el campo de la fertilidad humana, la existencia de un 30 % de casos de esterilidad en los cuales no se conoce el origen de la patología (351), hace aún más evidente la necesidad de un conocimiento de los fenómenos relacionados con la fecundación y los órganos involucrados en tal proceso. Esa importancia es reafirmada si se tiene en cuenta que entre un 10 y 15 % de la población presenta imposibilidad de procreación (352).

En relación a ello, estudios realizados con el antisuero caracterizado en el presente trabajo, el cual ha mostrado presentar reactividad con proteínas epididimarias sintetizadas en respuesta a los andrógenos por el órgano, han revelado modificaciones significativas en la distribución y cantidad de antígenos reconocidos por el antisuero en espermatozoides de pacientes estériles sin causa aparente (353). En ese estudio, el análisis realizado sobre 26 pacientes con esterilidad sin una causa explicable a partir de ensayos convencionales, reveló la existencia de un subgrupo de 16 pacientes, los cuales mostraron una modificación de la localización de los antígenos en la superficie de los espermatozoides respecto de la correspondiente a 18 muestras normales, así como una disminución de la cantidad de antígeno asociado a esos espermatozoides, observado a través de un estudio de inmunofluorescencia indirecta.

Este hallazgo contribuye aún más a considerar la necesidad de un conocimiento de la fisiología epididimaria y específicamente del proceso de maduración en el hombre con el objeto de determinar las características estructurales y funcionales de los espermatozoides los cuales, luego de su interacción con la gameta femenina, dan origen a una nueva vida.



## APENDICE

### DESCRIPCION DEL MODELO DE SUPERFUSION.

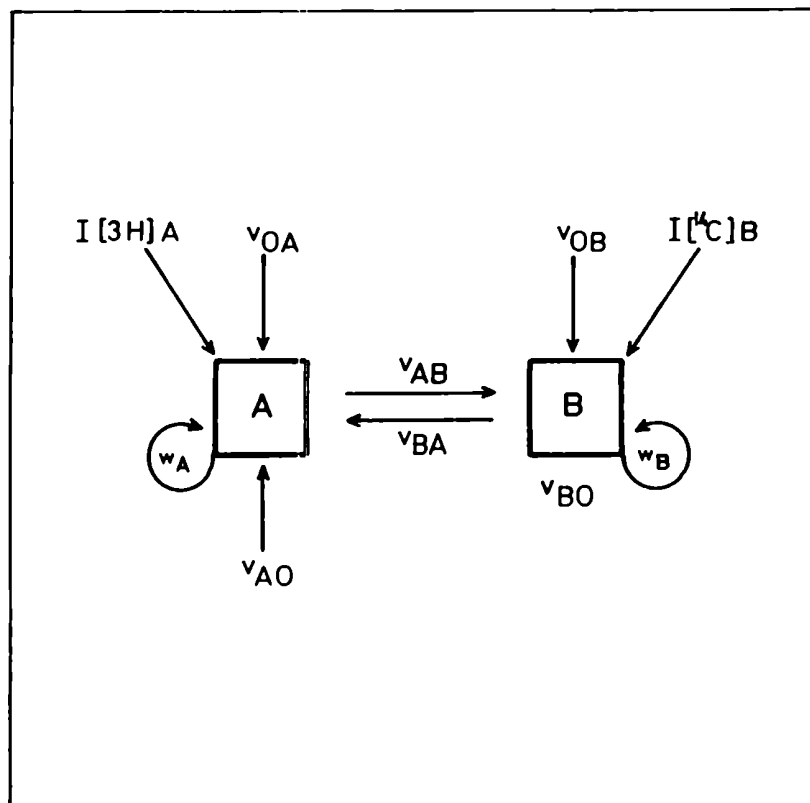
Desarrollo matemático. Derivación de fórmulas.

El modelo teórico matemático asociado a la metodología de superfusión ha sido derivado a partir del esquema descrito en la FIGURA 25.

En dicho modelo A y B son los "pooles" intracelulares de los compuestos A y B. Las velocidades  $v_{AB}$  y  $v_{BA}$  representan velocidades de intercambio entre dichos "pooles";  $v_{OA}$  y  $v_{OB}$  son las velocidades a las cuales los compuestos entran al "pool" desde otras fuentes;  $v_{AO}$  y  $v_{BO}$  denotan las velocidades que se refieren a la remoción de los compuestos de esos "pooles";  $v_A$  corresponde a la velocidad a la cual el compuesto A deja el "pool" y retorna a él sin la formación intermedia de B y  $w_B$  es la velocidad de reciclado de B sin involucrar al compuesto A.

Una característica importante del modelo es que incluye un número indeterminado de fuentes que intercambian A y B. Estos otros reservorios podrían representar otros espacios de distribución de los compuestos A y B u otros

FIGURA 25



Modelo teórico para el análisis de superfusión. Esquema en el que se representan dos "pooles" en un sistema multicompartimental.

Las "v" representan velocidades (nmoles/h); "w" velocidades de reciclado del material en cada reservorio sin intermediario de otro compartimiento; I velocidades de infusión de los compuestos [3H]A y [14C]B.

compuestos que se conviertan reversiblemente en A o B. Similarmente, el reciclado indicado por  $w_A$  y  $w_B$  podría involucrar la conversión reversible de A y B en otros compuestos.

En el estado estacionario, las velocidades de entrada y liberación de los materiales del "pool" son idénticas y por lo tanto:

$$v_{OA} + v_{BA} + w_A = v_{AO} + v_{AB} + w_A$$

$$v_{OB} + v_{AB} + w_B = v_{BO} + v_{BA} + w_B$$

Si se infunde un compuesto A marcado radiactivamente y se continúa la infusión por un tiempo adecuado, se podrán esperar valores constantes de las actividades específicas (dpm/nmoles) de A y B. Si se infunden simultáneamente dos trazadores  $[^3H]A$  y  $[^{14}C]B$ , una vez que se ha alcanzado el estado estacionario se obtienen cuatro actividades específicas  $a[^3H]A$ ,  $a[^{14}C]A$ ,  $a[^3H]B$  y  $a[^{14}C]B$  (a es la actividad específica en el estado estacionario para cada compuesto y en ambos isótopos).

Considerando el balance isotópico con respecto a  $^3H$  para A se obtiene:

$$I_{[3H]A} + v_{BA} \times a_{[3H]B} + w_A \times a_{[3H]A} = (v_{AB} + v_{AO} + w_A) \times a_{[3H]A}$$

donde  $I_{[3H]A}$  representa la velocidad de infusión de  $[3H]A$ ,  $v_{BA} \times a_{[3H]B}$  la velocidad a la cual desde el "pool" B llega el  $3H$  al "pool" A y  $w_A \times a_{[3H]A}$  el reciclado del  $[3H]A$ . El segundo término de la igualdad denota la velocidad a la cual  $[3H]A$  deja el "pool". Eliminando  $w_A \times a_{[3H]A}$  que aparece en ambos términos resulta:

$$I_{[3H]A} + v_{BA} \times a_{[3H]B} = (v_{AB} + v_{AO}) \times a_{[3H]A} \quad -1-$$

Para el isótopo  $^{14}C$  en el "pool" A

$$v_{BA} \times a_{[14C]B} = (v_{AB} + v_{AO}) \times a_{[14C]A} \quad -2-$$

De -1- y -2- se observa que  $v_{BA}$  y  $(v_{AB} + v_{AO})$  pueden ser calculados de los datos experimentales.

Por otra parte, otro parámetro que puede calcularse a partir del desarrollo presentado es el factor de transferencia o conversión ( $\rho$ ) del material de un "pool" a otro ( $AB, BA$ ), que puede ser calculado en base a la siguiente expresión:

$$\rho_{AB} = v_{AB} / (v_{AB} + v_{AO}) = I_{14CB} \times a_{3HB} / I_{3HA} \times a_{14CB}$$

$$\rho_{AB} = (3H/14C)_B / (3H/14C)_{\text{superfundido}} \quad -3-$$

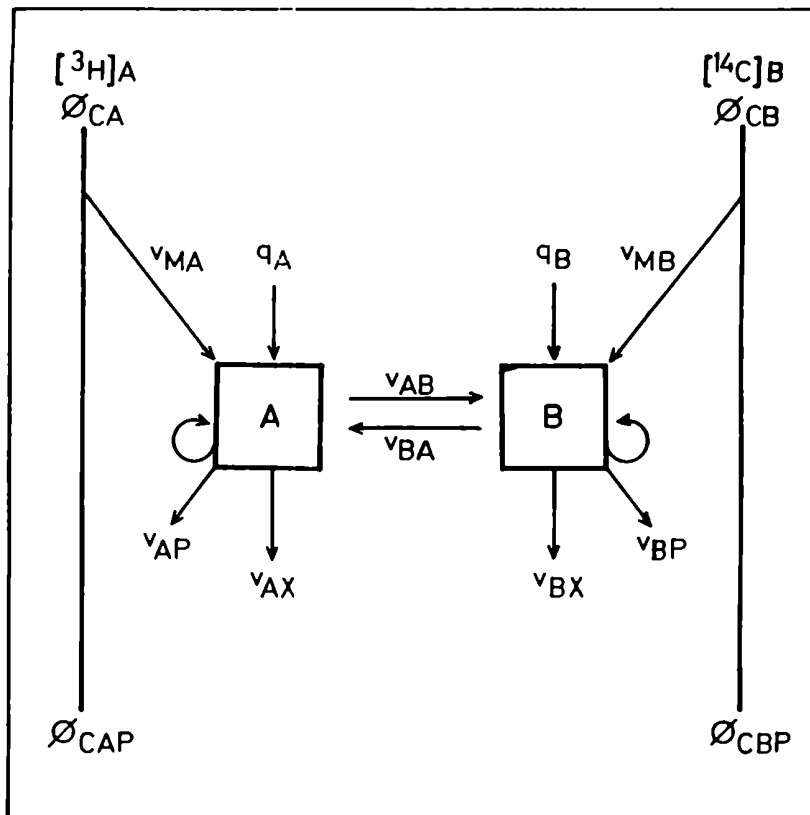
Es importante notar que el factor de transferencia puede ser estimado simplemente de los cocientes isotópicos en la mezcla superfundida y en uno de los "pooles" sin necesidad de medir actividades específicas. Por otra parte, dado que el cociente en B es determinado por el grado de conversión de A a B y que un posterior metabolismo de B no altera el cociente.

Sin embargo el modelo de la FIGURA 25 ha sido extensivamente utilizado en interpretaciones de experimentos in vivo para realizar un análisis de los aspectos cuantitativos del metabolismo esteroideo.

Cuando se superfunden cortes de tejido con una solución conteniendo  $[3H]A$  y  $[14C]B$ , solo una fracción de cada trazador superfundido ( $\phi A$  y  $B$ ) entra a la célula. Por lo tanto el modelo de la FIGURA 25 se modifica y se transforma en el presentado en la FIGURA 26.

Los trazadores son superfundidos a velocidad constante y sin reciclado;  $v$  representa la velocidad de flujo;  $c_A$  y  $c_B$  representan las concentraciones de los compuestos en el medio superfundido;  $v_{MA}$  y  $v_{MB}$ , corresponde a la velocidad de entrada de los compuestos a la célula;  $v_{AB}$  y  $v_{BA}$ , las

FIGURA 26



Modelo teórico para el análisis de superfusión. Esquema en el que se representan 2 compuestos A y B, para un sistema experimental de cortes de tejido superfundidos con una mezcla de  $[^3\text{H}]A$  y  $[^{14}\text{C}]B$  a una velocidad constante sin reciclado. El significado de los símbolos de la figura se detalla en el texto.

velocidades de interconversión entre A y B;  $Q_A$  y  $Q_B$  denota las velocidades de síntesis de A y B a partir de precursores intracelulares;  $v_{Ap}$  y  $v_{Bp}$ , velocidades de salida de A y B desde el tejido al medio;  $v_{AX}$  y  $v_{BX}$  velocidades de metabolismo irreversible de A y B a otros productos; finalmente  $c_{Ap}$  y  $c_{Bp}$  la concentración de A y B en el medio de perfusión (recogido luego de estar en contacto con el tejido). A partir de este modelo derivan los siguientes parámetros:

1-Fracción de trazador que entra a las células ( $\alpha$ ).

Si  $\alpha$  es la fracción perfundida de  $^3H$ -A que entra en el tejido,  $1 - \alpha$  es la fracción que no penetra en el interior celular, con lo cual:

$$1 - \alpha = c_{Ap} \text{ } ^3H \text{ (pasa a través)} / c_{A^3H} \quad -4-$$

La concentración total de  $^3H$ A en el medio de perfusión proviene de la contribución de la correspondiente al trazador que no entró al tejido y la concentración de  $^3H$ A que entró al tejido y fue liberada al medio sin modificarse (o como tal):

$$c_{Ap} \text{ } ^3H = c_{Ap} \text{ } ^3H \text{ (no entra al tejido)} + c_{Ap} \text{ } ^3H \text{ (del tejido)} \quad -5-$$

La estimación del parámetro requiere la distribución experimental entre ambas concentraciones de  $[3H]A$  presentes en el superfusado. Esta discriminación se puede lograr marcando el compuesto intracelular con otro isótopo.

Si se superfunden  $[3H]A$  y  $[14C]B$  y  $B$  puede convertirse en  $A$  a través de reacciones enzimáticas intracelulares, el compuesto  $A$  se encontrará marcado con ambos isótopos  $3H$  y  $14C$ .

Al estado estacionario isotópico, se puede esperar que el cociente  $3H/14C$  en el compuesto intracelular sea idéntico al cociente del compuesto liberado al medio. Por lo tanto midiendo la concentración de  $A$  en el isótopo  $14C$  en el perfusado ( $c_{Ap} 14C$ ) se puede estimar la concentración de  $A$  en  $3H$  mediante la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} c_{Ap} 3H \text{ (proveniente del tejido)} / c_{Ap} 14C &= \\ &= c_A 3H \text{ tej.} / c_A 14C \text{ tej.} \end{aligned}$$

$$c_{Ap} 3H \text{ (proveniente del tejido)} = \quad \quad \quad -6-$$

$= (c_A 3H / c_A 14C)_{\text{tej.}} \times c_{Ap} 14C$  donde  $(c_A 3H / c_A 14C)_{\text{tejido}}$  denota el cociente isotópico del compuesto  $A$  aislado del tejido en el estado estacionario.



Por tanto, se puede reemplazar en la expresión de (-4-) teniendo en cuenta -5- y -6-

$$\alpha_A = \frac{= 1 - [c_{Ap\ 3H} - (c_{A\ 3H} / c_{A\ 14C})_{tej.} \times c_{Ap\ 14C}] / c_{A\ 3Hsuperf}}{-7-}$$

Dado que la conversión de A a B es reversible (como se muestra en la FIGURA), la expresión de B es simétrica:

$$\alpha_B = \frac{= 1 - [c_{Ap\ 14C} - (c_{B\ 14C} / c_{B\ 3H})_{tej.} \times c_{Bp\ 3H}] / c_{B14Csuperf}}{-8-}$$

2-Fracción de trazador superfundido que retorna al medio desde el tejido ( $\beta$ )

Se define  $\beta$  como el cociente entre la concentración de [3H]A en el superfusado que proviene del tejido y la concentración del trazador superfundida:

$$\beta_A = c_{Ap\ 3H\ sup} \text{ (desde el tejido)} / c_{A\ 3H}$$

$$\beta_A = (\text{conc } [3H]_{Atej.} / \text{conc } [14C]_{Atej.}) \times c_{Ap\ 14C} / c_{A3H}$$

3- Fracción de trazador superfundido que aparece en el superfusado como un metabolito ( $\gamma$ )

El compuesto [3H]A puede metabolizarse a un compuesto L, el cual aparece en el superfusado, y la fracción de ese metabolito respecto de A se calcula en base a la siguiente expresión:

$$\gamma_{A \rightarrow L} = c_{Lp} \text{ 3H} / c[\text{3H}]A \quad -10-$$

4-Factor de conversión ( $\rho$ )

De acuerdo a la definición de AB dada en la ecuación -3- y, teniendo en cuenta la expresión -7- para estimar la entrada de trazadores al tejido, la expresión AB resulta:

$$\begin{aligned} \rho_{AB} &= (I_{B14C} \times a_{Bt3H}) / (I_{A3H} \times a_{Bt14C}) = \\ &= (3H / 14C)_{Btej.} / [(A/B) (3H/14C)_{superfundido}] \end{aligned} \quad -11-$$

y similarmente

$$\rho_{BA} = [(A/B) (3H/14C)_{superfundido}] / (3H/14C)_{Atej.} \quad -12-$$

BIBLIOGRAFIA

- 1 . Steinberger, E. ; y Steinberger, A. En: Handbook of Physiology, Section 7, Vol. V, pp 1. D. Hamilton y R.O. Greep (editores), American Physiological Society, Washington (1975).  
  
Vilar, O.; Perez del Cerro, M.I.; Mancini, R.E. Exptl. Cell. Res. (1962), 27:158.  
  
Fawcett, D.W. E : Handbook of Physiology, Section 7, Vol. V, pp. 21. Hamilton D. y Greep R.O. (editores). American Physiological Society, Washington (1975).
- 4 . Maximov, A. Beitr. Pathol. Anat. Allgem. Pathol.(1899), 26:230.
- 5 . Clegg, E.J.; y Mac Millan, E.W. J. Anat. (London) (1965), 99:219.
- 6 . Hansson, V., Ritzen, E.M; French, F.; y Nayfeh, S. En: Handbook of Physiology, Section 7, Vol. V, pp 173. Hamilton D.y Greep R.O. (editores), American Physiological Society, Washington (1975).
- 7 . Eik-Nes, K.B. En: Handbook of Physiology, Section 7, Vol. V, pp. 95. Hamilton D. y Greep R.O. (editores), American Physiological Society, Washington (1975).
- 8 . Lostroh, A.J. Endocrinology (1969), 85:438.
- 9 . Greep, R.O; Ferold, H.C.; y Hisaw, F.L. Anat. Record (1936), 65:261.
- 10 . Benoit, J. Arch. Anat. Histol. Embryol; Strasbourg (1926), 5: 173.
- 11 . Reid, B.L.; and Cleland, K.W. Australian J. Zool. (1957), 5:223.

- 12 . Vendrely, E. En: Progress in Reproductive Biology, Vol 8, pp. 21 (Epididymis and Fertility Biology and Pathology). C. Bollack y A. Clavert (editores) (1981).
- 13 . Burgos, M.H. En: Male Accessory Sex organs. Structure and Function in mammals, Cap. 5, pp.151. Brandes, D. (editor) (1974).
- 14 . Holstein, A.F. Zwanql. Abh. Geb. Norm. Path. Anat. (1969), 20: 1.
- 15 . Horstmann, E. Z.Zellforsch. mikrosk Anat. (1962)57: 692.
- 16 . Horstmann, E.; Richter, R.; y Roosen-Runge, E.
- 17 . Hamilton, D. En: Handbook of Physiology. Section, Vol. V; pg. 259; D. Hamilton y R. Greep (editores), American Physiological Society, Washington (1975).
- 18 . Hinton, B.T.; y Howards, S.S. J. Reprod. Fert. (1981), 63: 95.
- 19 . Hinton, B. T.; Howards, S.S. Biol. Reprod. (1982), 27: 1181.
- 20 . Soranzo, L. Biol. Cell. (1979), 35: 18a.
- 21 . Vendrely, E.; Fain-Maurel, M.A.; y Dadoune, J.P. Biol. Cell (1980), 38:16a.
- 22 . Glover, T.D. J. Reprod. Fert. (1976), suppl. 24:95.
- 23 . Martan, J.; Risley, P.L.; Hruban, Z. Fertil. Steril. (1964), 15: 180.
- 24 . Friend, D.S. J. Cell. Biol. (1969), 41:269.
- 25 . Nicander, L. Z. Zellforsch, Mikroskop. Anat (1965), 66:829.
- 26 . Nicander, L.; Paulsoon, S.; Selander, V. 4th Scand. Congr. Cell. Res. (1965), pp. 51-52.

- 27 . Turner, T.T. J. Reprod. Fert. (1984), 12:509.
- 28 . Moore, H.D; y Bedford, J.M. Anat. Rec. (1979), 193:313.
- 29 . Wong, F.Y.D; y Yeung, C. Endocrinology (1977), 101:1931.
- 30 . Wong, F.Y.D; y Yeung, C. J. Endocr. (1977), 72: 12 pp.
- 31 . Von Ebner. Arch. Mikroskop. Anat. (1888), 31:236.
- 32 . Hammar, J.A. Arch. Anat. Entwicklungsgeschichte Suppl. (1897), 1.
- 33 . Young, W.C. J. Exptl. Biol. (1931), 8: 151.
- 34 . Van der Stricht, O. Comp. Rend. Soc. Biol. (1893), 45: 799.
- 35 . Burgos, M.H.; Blaquier, J.A.; Cameo, M.S.; y Gutierrez, L. En: Biology of Reproduction. Basical and Clinical Studies, N. 37, pp. 367. J.T. Velarde and J.B.A. Kasprov (editores) (1972).
- 36 . Dyson., A.L.; Orgebin-Crist, M.C. Endocrinology (1973), 93: 391.
- 37 . Blaquier, J.A.; Cameo, M.S.; and Burgos, M.H. Endocrinology (1972), 90: 893.
- 38 . Bedford, J.M. J. Exp. Zool. (1966), 163:319.
- 39 . Orgebin-Crist, M.C. Nature (1967), 216:816.
- 40 . Horan, A.H.; Bedford, J.M. J. Reprod. Fert. (1972), 30:417.
- 41 . Blandau, R.J.; y Rumery, R.E. Fert. Steril. (1964), 15:571.
- 42 . Eskbenshade, K.L.; Clegg, E.D. Biol. Reprod. (1980), 23:530
- 43 . Fournier-Delpech, S.; Colas, G.; Courrot, M.; Ortevant, R.; Brice, G. Ann. Bio. Anim. Biochim. Biophys. (1979), 19:597.

- 44 . Setchell, B.P.; Scott, T.W.; Voglmayr, J.K.; y Waites, G.M.H. Biol. Reprod. Suppl. (1969), 1:40.
- 45 . Tournade, A. C.R. Soc. Biol. (Paris) (1913), 74:738.
- 46 . Burgos, M.H.; Tovar, E.S. Fertil. Steril. (1974), 25:985.
- 47 . Calvin, H.; Bedford, J.M. J. Reprod. Fert. Suppl. (1971), 13:65.
- 48 . Bedford, J.M.; Calvin, H.; Cooper, G.W. J. Reprod. Fert. Suppl. (1973), 18:199.
- 49 . Tongkao, D.; Chubavatnatol, M. En: The spermatozoon.p. 129. D.W. Fawcett and M.D. Bedford (editores). Urban and Schwarzenberg, Baltimore (1979).
- 50 . Lindhomer, C. Biol. Reprod.(1974), 10:533.
- 51 . Hoskins, D.D.; Stephens, D.T.; y Hall, M.L. J. Reprod. Fert. (1974), 37:131.
- 52 . Acott, T.S.; y Hoskins, D.D. J.Biol. Chem. (1978), 253: 6744.
- 53 . Cummins, J.M. J. Expt. Zool. (1976), 197:187.
- 54 . Murdoch, R.N.; White, I.G.. J. Biol. Sci. (1968), 21:111.
- 55 . Voglmayr, J.K.;; Waites, G.M.H; y Setchell, B.P. Nature (1966), 210:861.
- 56 . Bragg, F.W.; y Handel, M.A. Biol. Reprod. (1979), 20:333.
- 57 . Dacheux, S.L.; O'Shea, T.; y Paquignon, M. J. Reprod. Fert. (1979), 55:287.
- 58 . Marquis, N.R.; y Fritz, J.B. J. Biol. Chem (1965):240:2193.

- 59 . Dawson, R.M.C; y Rowland, J.W. Quart. J.Exptl. Physiol. (1959)44:26.
- 60 . Bose, A.R.; Kar, A.B.; Das Gupta , F.R. Current Sci. India (1966), 35: 336.
- 61 . Dadoune, J.P. En: Progress in Reproductive Biology and Pathology, VI:8,p.34. C. Bollack y A. Clavert (editores) (1981).
- 62 . Bedford, J.M. En: Handbook of Physiology, Section 7, VI V, pp. 303-317. D. Hamilton and R.O. Greep (editores). American Physiological Society, Washington (1975).
- 63 . Paufler, S.K.; y Footr, R.H. J. Reprod. Fert. (1968), 17:125.
- 64 . Jones, R.C. J. Reprod. Fert. Suppl. (1971), pg. 13.
- 65 . Gledhill, B.L. Acta Vet. Scand. (1966), 7:131.
- 66 . Bedford, J.M. Nature (1963), 200:1178.
- 67 . Burry, R.W.; Wood, J.G. J. Cell Biol.(1979), 82:726.
- 68 . Flechon, J.E. Inserm. int. Symp. Nouzilly (Kargel. Basel), (1975):35
- 69 . Nicolson, G.L.; Yanagimachi, R. Science (1972), 177:276.
- 70 . Nicolson, G.L; Usui, N.; Yanagimachi, R.; Yanagimachi, H.; Smith, J.R. J. Cell Biol. (1977), 74:950.
- 71 . Sanborn, B.M.; Elkington, J.S.H.; Steinberger, A.; Steinberger, E.; Meistrich, M. En: Current Topics in Molecular Endocrinology. V.2. pp 293. French F.S.; Hansson, V.; Ritzen, E.M.; Nayfeh, S.N. (editores). Plenum Press, N.Y. (1975)
- 72 . Amann, R.P.; Hammeistedt, R.H. Biol. Reprod. (1976), 15:670.
- 73 . Fritz, I.B. Adv. Lipid Res. (1963), 1:285

- 74 . Bohmer, T.; Sar, F. M.; Stumpf, W.E.; Hansson, V. *Int. J. Androl.* (1979), 2:62.
- 75 . Casillas, E.R.; Villalobos, F.; y Gonzalez, R. J. *Reprod. Fert.* (1984), 72:197.
- 76 . Frenkel, G.; Peterson, R.N.; Davis, J.E.; y Freund, M. *Fertil. Steril.* (1974), 25:84.
- 77 . Kolhengkul, S.; Tanphaichitr, V.; Muangmun, V.; y Tanphaichitr, N. *Fertil. Steril.* (1977), 28:1333.
- 78 . Frankel, J. y Lewin, M. *Intern. J. of Androl.* (1979), 2:299.
- 79 . Bohmer, T; Hoel, P.; Purvis, K.; y Hansson, V. *Arch. Androl.* (1978), 1:53.
- 80 . Carter, A.L.; Stratman, F.W.; Hutson, S.M.; y Lardy, H.A. (1980).
- 81 . Scott, T.W.; Wales, R.G.; Wallace, J.C.; y White, I.G. *J. Reprod. Fert.* (1963), 6:49.
- 82 . Brooks, D.E.; Hamilton, D.W.; y Mallek, A.H. *J. Reprod. Fert.* (1974), 36:141.
- 83 . Rajalakshmi, M.; y Prasad, M.R.N. *J. Endocr.* (1968), 41:471.
- 84 . Arora, R.; Dinakar, N.; Prasad, M.R.N. *Contraception* (1975), 11:689.
- 85 . Blaquier, J.A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1973), 52:1177.
- 86 . del Rio, A.G. *Arch. Androl.* (1979), 3:231.
- 87 . Flickinger, Ch.J. *Biol. Reprod.* (1979), 20:1015.
- 88 . Neutra, M.; y Leblond, C.P. *J. Cell. Biol.* (1966), 30:137.
- 89 . Fleischer, B.; Fleischer, S; y Ozava, H. *J. Cell Biol.* (1969), 43:59.



- 90 . Cameo, M.; y Blaquier, J. J. Endocr. (1976), 69:47.
- 91 Moore, H.D.M. Biol. Reprod. (1980), 22:705.
- 92 . Gonzalez Echeverria, M; Cuasnicu, P.S.; y Blaquier, J.A. J. Reprod. Fert.(1982), 64:1.
- 93 . Brandt, H.; Acott, T.S.; Johnson, D.D.; Hoskins, D.D.Biol. Reprod. (1978), 19:830.
- 94 . Voglmayr, J.K.; Waites, M.H.; Setchell, B.F. Nature (1966), 210:861.
- 95 . Belonochkin, B. Arch. Gynak (1942), 174:357.
- 96 . Young, D.H. J. Reprod. Fert. (1970), 23:541.
- 97 . Gaddum, P.; y Glover, T.D. J. Reprod. fert. (1965), 9: 119.
- 98 . Lubicz- Nawrocki; C.M.; y Chang, M.C. J. Reprod. Fert. (1978), 53:147.
- 99 . Hinrichsen, M.J.; y Blaquier, J.A. J. Reprod. Fert. (1980), 60:291.
100. Moore, H.D.M.; Hartman, T.D.; Pryor, J.P.Int. J. Androl.(1983), 6:310.
101. Mercier, A. Excerpta Med. ICS (1965), 101:212.
102. Bardin, C.W; Allison, J.E.; Stanley, A.J.; y Grumbek, L.G. Endocrinology (1969), 84:435.

103. Rivarola, M.A.; Forest, M.G.; y Migeon, C.J. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1968), 28:34.
104. Corvol, P.; y Bardin, C.W. Biol. Reprod. (1973), 8:277.
105. Vermeulen, A. En: Androgens and antiandrogens; pp. 53. L. Martini y M.Motta (editores). Raven Press, N.Y. (1977).
106. Pearlman, W. H.; Crepy, O.; y Murphy, M. J. Clin. Endocr. (1967), 27:1012.
107. Forest, M.G.; Rivarola, M.A.; y Migeon, C.J. Steroids (1968), 12:323.
108. Puntriano, . En: Male Accessory Sex Organs. D. Brandes (editor). (1974).
109. Breuer, A. En: Male Accessory Sex Organs. D. Brandes (editor). (1974).
110. Vernon, R.G.; Kopeck, B.; y Fritz, I.B. Mol. Cell. Endocr. (1974), 1:167.
111. Sanborn, B.M.; Elkington, J.S.H.; Chowdhury, M.; Tcholakian, R.K; y Steinberg, E. Endocrinology (1975), 96:304.
112. Means, A.R.; Fakunding, J.L.; Huckings, C.; Tindall, D.J.; y Vitale, R. Rec. Prog. Horm. Res. (1976), 32 :477.
113. Louis, B.G.; y Fritz, J.B. Mol. Cell. Endocr. (1977), 7:9.

114. Elkington, J.S.H.; Sanborn, B.M.; Martin, A.K.; Chowdhury, M.; y Steinberger, E. *Mol. Cell. Endocr.* (1977), 6:203.
115. Purvis, K.; Calandra, R.; y Hansson, V. En: *Androgens and antiandrogens* pp.37. L. Martini y M.Motta (editores), Raven Press, N.Y. (1977).
116. Guerrero, R.; Ritzen, E.M.; Purvis, K.; Hansson, V.; y French, F.S. En: *Hormonal Regulation of Spermatogenesis.* pp. 213. F.S. French; V. Hansson; E.M. Ritzen; y S.N. Nayfeh (editores). Plenum Press, N.Y. (1975).
117. Rommertz, F.F.G.; Grootegoed, J.A.; y Van der Molen, H.J. *Steroids* (1976), 28:43.
118. Gulizia, S.; Sanborn, B.M.; D'Agata, R.; y Steinberger, E. En: *Recent Advances en Male Reproduction: Molecular Basis and Clinical implications; V.7; pp.47.* D'Agata, R.; Lipsett, M.B.; Polosa, P.; and Van der Molen, H.J. (editores). Raven Press, N.Y. (1983).
119. Musto, N.; Gunsalus, G.; Cheng, C.H.; Tsong, Goldstein, M.; Phillips, D.; y Bardin, C.W. En: *Recent advances en male reproduction: Molecular Basis and Clinical implications; V.7; pp.37.* D'Agata, R.; Lipsett, M.B.; Polosa, P.; and Van der Molen, H.J. (editores). Raven Press, N.Y (1983).
120. An-Fei Hsu; Nankin, N.H.; y Troen, P. En: *The testis in normal and infertile men.* pp. 421. Troen P. y Nankin, R.H. (editores, Raven Press, N.Y. (1977).
121. Purvis, K.; Calandra, R.S.; Sander, S.; y Hansson, V. *Intern. J. Androl.* (1978), 1:531.

122. Lipshultz, L.I.; Yu-Hui Tsai; Sanborn, B.M.; y Steinberger, E. Fert. Steril. (1977), 28:947.
123. Gorski, J.; Gannon, F. A. Rev. Physiol. (1976), 38:245.
124. Giorgi, E.P. J. Endocr. (1976), 68:109.
125. Giorgi, E.P.; Shirley, I.M.; Grant, J.K.; Stewart, J.C. Biochem J. (1973), 132:465.
126. Atger, M. J. Steroid Biochem. (1974), 5:342.
127. Pietras, R.J.; Szeco, C.M. Nature (1977), 265:69.
128. Nenci, I.; Fabris, G.; Marzole, A.; Marchetti, E. En: Pharmacological modulation of steroid action pp.99. Genazzani, E.; Di Carlo, F.; Mainwaring, W.I.P. (editores). Raven Press Ny (1980).
129. Godeau, F.; Schorderet-Slatkine, S; Hubert, P.; Baulieu, E.E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1978), 75:2353.
130. Bruchovsky, N.; Meak' J.W. Cancer Res. 9(1973), 35:935.
131. Bruchovsky, N. Endocrinology (1971), 89:1212.
132. Wilson, J.D.; y Loeb, F.M. En: Developmental and Metabolic Control Mechanisms and Neoplasia. pp.375. The University of Texas, M.D.A. Hosp. and Tumor Inst. The Williams and Wilkins, Co. Baltimore (1965).

133. Moore, R.J.; y Wilson, J.D. *Endocrinology* (1973), 93: 581.
134. Nozu, K.; Tamaoki, E. *Biochem. Biophys. Acta* (1974), 348:321.
135. Moore, R.J.; y Wilson, J.D. *Methods in Enzymology*, V. XXXVI, Part A, pp.466. O'Malley, B.W. y Hardman, J.G. (editores) (1975).
136. Morfin, R.F.; Aliapoulos, M.A.; Chamberlain, J.; Ofner, P. *Endocrinology* (1970), 87:394.
137. de Larminat, M.; Cuasnicu, P.; y Blaquier, J.A. *J. Steroid Biochem.* (1980), 13:1207.
138. de Larminat, M.; y Blaquier, J.A. *Steroids* (1978), 31:129.
139. de Larminat, M.; Hinrichsen, M. J.; Scorticati, C.; Ghirlanda, J.M.; Blaquier, J.A. *J. Reprod. Fert.* (1980), 59:397.
140. Gloyna, R.E.; y Wilson, J.D. *J. Clin. Endocr. Metab.* (1969), 29:970.
141. Shimazaki, J. *Endocrinol. Jap.* (1969), 16:543.
142. Shimazaki, J. *Endocrinol. Jap.* (1972), 19:69.
143. de Larminat, M.; Monsalve, A.; Charreau, E.; Calandra, R.S.; Blaquier, J.A. *J. Endocr.* (1978), 79:157.
144. Sulcova, J.; Starika, L. *Endocr. Exp.* (1973), 7:113.

145. Wilson, J.D.; En: Handbook of Physiology, Section 7, Cap.25, Vl. 5, pp. 491. D. Hamilton, y R. Greep (editores), American Physiological Society, Washington (1975).
146. Lubicz-Nawrocki C.M. J. Endocrinol. (1973), 58:193.
147. Suescun, M.O.; Campo, S.; Rivarola, M.A.; Gonzalez Echeverria, F.; Scorticati, C.; Ghirlanda, J.; Tezon, J.; Blaquier, J.A.; y Calandra, R. Arch. Androl. (1981), 7:297.
148. Migeon, C.J.; Rivarola, M.A.; y Forest, M.G. The Johns Hopkins Med. J. (1968), 123:128.
149. Murota, S.; Shikita, M.; y Tamaoki B. Biochim. Biophys. Acta (1966), 117:241.
150. Oshima, H.; Sarada, T; Ochiai, K.; y Tamaoki, B. Invest. Urol. (1974), 12:43.
151. Slaunwhite, W.R.; Sandberg, A.A.; Jackson, J.E.; y Staubitz, W.J. J. Clin. Endocrinol. (1962), 22:992.
152. Yanaihara, T.; y Troen, P. (1972). J. Clin. Endocr. (1972), 34:968.
153. Greep, R.O. En: Sex and Internal Secretions, V. 1; Young, W.C. (editor). Williams and Wilkins, Baltimore (1961).
154. Price, D.; y William Ashman, M.G. En: Sex and Internal Secretions, V. 1, Young, W.C. (editor), Williams and Wilkins, Baltimore (1961).

155. Bird, C.E.; Green, R.N.; y Clark, A.F. J. Clin. Endocr. (1969), 29: 123.
156. Forchielli, E.; Rao, G.S.; Sardo, I.R.; Gibrel, N.B.; Pochi, P.E.; Strauss, J.S.; y Dorfman, R.I. Acta Endocr. (1965), 30:51.
157. Bird, C.E.; Green, R.N.; Calandra, R.S.; Connolly, J.G.; y Clark, A.F. Acta Endocr. (1971), 67:733.
158. Chowdhury, M.; Tcholakian, R.K.; y Steinberger, E. J. Endocrinol. (1974), 60:375.
159. Tcholakian, R.K.; Chowdhury, M.; y Steinberger, E. J. Endocrinol. (1974), 63: 411.
160. Dorner, G.; Syahl, F.; Rohde, W.; y Schnoor, D. Endokrinologie (1975), 66:211.
161. Griffiths, K.; Harper, M.E.; Groom, M.A.; Fike, A.W.; Farhmy, A.R.; Pierepoint, C.G. En: Some aspects of the aetiology and biochemistry of prostatic cancer. Proc. 3er. Terous Workshopp. pp.88. Griffiths, K. y Pierepoint, C.G. (editores). Caephilly, Alpha, Omega, Alpha (1970).
162. Groom, M.; Harper, M.E.; Fahny, A.R.; Pierepoint, C.G.; Griffiths, K. Biochem. J. (1971), 122:125.
163. Leave, I.; Morfin, R.F.; Ofner, F.; Cavazos, L.F.; Leeds, E.B. Endocrinology (1971), 89:465.
164. Montserrat, M.; Fenc1, A.; Ville, A. Steroids (1973):537.
165. Jensen, E.V.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stumpf, W.E.; Jungbwt, F.W.; de Sombre, E.R. Proc. Nat. Acad. Sci. (1968), 59:632.

166. Noteboom, W.D.; Gorski, J. Arch. Biochem. Biophys. (1965), 111:559.
167. Sherman, M.R.; Corvol, P.L.; O'Malley, B.W.. J. Biol. Chem. (1970), 245:6085.
168. Edelman, I.S.; Fimognar, G.D. Rec. Progr. Horm. Res. (1968), 24:1.
169. Baxter, J.D.; Rousseau, G.G.; Benson, M.C.; Gareau, R.L.; Ito, J.; Tomkins, G.M. Proc. Nat. Acad. Sci. (1972), 69:1892.
170. Tang, S.; Liao, S. J. Biol. Chem. (1971), 246:16.
171. Fang, S.; Anderson, K.M.; y Liao, S. J. Biol. Chem. (1969), 244:6854.
172. Liao, S.; Fang, S. Vit. Horm. (1969), 27:17.
173. Mainwaring, W.I.F. J. Endocrinol. (1969), 44:323.
174. Attramadal, A.; Weddington, S.C.; Nass, O.; Djoseland, O.; Hansson, V. En: Prostate Hyperplasia and Neoplasia. Liss, NY (1976).
175. Liao, S.; Liang, T.; Fang, S.; Castañeda, E., Shao, T.C. J. Biol. Chem. (1973), 248:6154.
176. Liao, S.; Tymoczko, J.L.; Liang, T.; Anderson, K.M.; Fang, S. Adv. Biosc. (1971), 7:155.
177. Gonzalez Diddi, M.; Komisar, K B.; Beyer, C. Endocrinology (1972), 91:1130.



178. Delettre, J.; Motron, J.P.; Ojasoo, J.; Raynaud, J.F.  
En: Perspectives in Steroid Receptor Research. pp.1.  
Bresciani, F. (editor), Raven Press, N.Y. (1980).
179. Cunningham, G.R.; Lobl, T.J.; Cockrell, C.; Shao,  
T.C.; Tindall, D.J. Steroids (1983), 41:617.
180. Raynaud, J.P.; Azadian-Boulanger, G.; Bonne, C.;  
Perronnet, J.; Sakiz, E. En: Androgens and  
Antiandrogens. pp. 281. Martini, L. y Motta M.  
(editores). Raven Press, N.Y. 91977).
181. Blaquier, J.A.T. Biochem Biophys. Res. Comm.  
(1975), 45:1076.
182. Ritzen, E.M.; Nayfeh, S.N.; French, F.S.; Dobbins,  
M.C. Endocrinology (1971), 89:143.
183. Hansson, V.; Djoseland, O. Acta Endocrinologica  
(1972), 71:614.
184. Danzo, B.J.; Orgebin Crist, M.C.; Toft, D.O.  
Endocrinology (1972), 92:310.
185. Blaquier, J.A. Endoc Res. Comm. (1974), 1:155.
186. Anderson, K.M.; Liao, S. Nature (1968), 219:277.
187. Sar, M.; Liao, S.; Stumpf, W.E. Endocrinology,  
(1970), 86:1008.
188. Tveter, K.J.; Attramadal, A. Endocrinology (1969),  
85:350.
189. Liao, S.; Leininger, K.R.; Sagher, D.; Barton, R.W.  
Endocrinology (1965), 77:763.

190. Liao, S.; Fang, Vitam. Horm. (1969), 27:17.
191. Charreau, E.H.; Baldi, A.; Blaquier, J.A.; Wassermann, G. Acta Endocrin. Panam. (1970), 1:39.
192. Blaquier, J.A.. Acta Physiol. Latino Americana (1971), 21:97.
193. Blaquier, J. A., Calandra, R.S. Acta Physiol.Latino Americana (1972), 22:116.
194. Blaquier, J.A., Calandra, R.S. Endocrinology (1973), 93:51.
195. Tezon, J.G.; Vazquez, M.H.; Blaquier, J.A. Endocrinology (1982), 111:2039.
196. Leavitt, W.W.; Toft, D.O.; Srott, C.A.; O'Malley, B.W. Endocrinology (1974), 94:1041.
197. Roy, K. Milin, B.S.; Mc. Minn, D.M. Biochem. Biophys. Acta (1974), 354:213.
198. Fodesta, E.J.; Calandra, R.S.; Rivarola, M.A.; Blaquier, J.A. Endocrinology (1975), 97:399.
199. Calandra, R.S.; Blaquier, J.A.; del Castillo, E.J.; Rivarola, M.A. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1975), 67:97.
200. Tezon, J.G.; Blaquier, J.A. Endocrinology (1983), 113:1025.
201. Bruchovsky, N.; Callaway, T.; Lieskovsky, G.; Rennie, P.S. En: Steroids Receptors and Hormone-dependent Neoplasia. pp.121. Wittliff, J.L. y Dapunt D. (editores). N.Y. masson Publishing USA Inc. (1980).

202. de Larminat, M.A.; Pasik, L.; Bellora, O.; Arturi, J.; Scorticati, C. (enviado a publicación).
203. Tezon, J.G.; Cuasnicu, P.S.; Scorticati, C.; y Blaquier, J.A. En: Physiopatology and Hipophysial disturbances and diseases of Reproduction. pp.251. De Nicola, A.F. y Blaquier, J.A. (editores). Alan R. Liss Inc. N.Y. (1982).
204. O'Malley, B.W.; Means, A.R. Science (1974), 183:610.
205. Palmiter, R.D.; Mulvihill, E.R.; Shephered, J.H.; Mc Knight, E.S. J. Biol. Chem. (1981), 256:7910.
206. O'Malley, B.W.; Spelsberg, T.C.; Schrader, W.T.; Chytil, F.; Steggles, A.W. Nature (1972), 235:141.
207. Spelsberg, T.C.; Steggles, A.W.; Chytil, F.; O'Malley, B.W. J. Biol. Chem. (1972), 247:1368.
208. Anderson, K.M.; Slavick, M.; Evans, A.K.; Couch, R.M. Exp. Cell. Res. (1973), 77:143.
209. Mainwaring, W.I.F.; Symes, E.K. Higgins, S.J. Biochem. J. (1976), 156:129.
210. Hughes, M.R.; Comptom, J.G.; Schrader, W.T.; O'Malley, B.W. Biochemistry (1981), 20:2481.
211. Comptom, J.G.; Schrader, W.T.; O'Malley, B.W.. Bioch. Biophys. Res. Comm., (1982), 105:96.
212. Comptom, J.G.; Schrader, W.T.; O'Malley, B.W. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) (1983), 80:16.

213. Mc Donald, Ch.; Williams, L.; Mc Turk, P.; Fuller, F.; Mc Intosh, E.; Higgins, S. Nucleic Acid Res. (1983), 11:917.
214. Davies, P.; Thomas, P. J. Steroid Biochem (1984), 20:57.
215. Liao, S; Williams-Ashman, H. Proc. Nat. Acad. Sci.(USA) (1962), 48:1956.
216. Mainwaring, W.I.F.; Wilce, P.A. Biochem. J. (1973), 134:795.
217. Liao, S. J. Biol. Chem. (1965), 240:1236.
218. Hancock, R.L.; Zelis, R.G.; Shaw, M.; Williams-Ashman, H.G. Bioch. Biophys. Acta (1962), 55:257.
219. Ville, C.A.; Grigorescu, A.; Reddy, P.R.K. J.Steroid Biochem., (1975), 6:561.
220. Hu, A.L.; Loo, R.M.; Wang, T.Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975), 65:1327.
221. Blaquier, J.A. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1973), 52:1177
222. Blaquier, J.A.; Breger, D. Endocrine Res. Comm. (1974), 3:247.
223. Blaquier, J.A.; Breger, D.; Cameo, M.; Calandra, R. J. Steroid Biochem.(1975), 6: 573.
224. Schimke, R.T.; Pennequin, P.; Robins, D.; Mc Knight, G.S. En: Hormones and Cell regulation. pp 209. Dumont, J. y Nunez, J. (editores) (1977),

225. Parker, M.; Hurst, H.; Page, M. J. Steroid Biochem. (1984), 20:67.
226. Parker, M.G.; Page, M.J. Mol. Cell Endocr. (1984), 34:159.
227. Liang, T.; Liao, S. Proc. Nat. Acad. Sci. (1975), 72:706.
228. Ichii, S.; Iwanaga, Y.; Ideda, A. Endocrinol Jap. (1974), 21:276.
229. Lea, D.A.; Petrusz, P.; French, F.S. J. Biol. Chem. (1979), 254:6196.
230. Higgins, S.J.; Smith, S.E.; Wilson, J. Molec. and Cell Endocrinol (1982), 27:55.
231. Blaquier, J.A. Acta Endocrinologica (1975), 79:403.
232. Allen, J.M.; Slater, J.J. Anat. Rec. (1959), 130:731.
233. Risley, P.L.; Skrepetos, S.N. Anat. Rec. (1964), 150:195.
234. Jones, R.; Glover, T.D. J.Reprod. Fert. (1973), 34:405.
235. GonzalezEcheverria, M.F.; Cuasnicu, P.S.; Blaquier, J.A. J.Reprod. Fert. (1981), 64:1.
236. Koskimies, A.; Kormanio, M. J. Reprod. Fert. (1975), 43:345.

237. Barker, L.D.S.; Aman, R.P. J. Reprod. Fert. (1970), 22:441.
238. Amman, R.F.; Killiam, G.J.; Benton, A.W.; J.Reprod. Fert. (173), 35: 321.
239. Huang, H.F.S.; Johnson, A.D. Comp. Biochem. Physiol. (1975), 51B:337.
240. Garberi, J.C.; Kohane, A.C.; Cameo, M.; Blaquier, J.A. Mol. Cell Endocr. (1979), 13:73.
241. Lea, D.A.; Petrusz, P.; French, F.S. Int. J. Androl.(1978), (Suppl. 2):592.
242. Jones, R.; Brown, C.R.; Von Glos, K.I.; Parker, M.G. Biochem. J. (1980), 188: 667.
243. Bayard, F.; Duguet, L.; Mazzuca, M.; Faye, J.C. En: Reproductive Processes and Contraception. pp. 399. Mc. Kerns, K.W. (editor). (1981).
244. Brooks, D.E. Mol. and Cell Endocrinol. (183), 29:255.
245. Brooks, D.E. Biol. Reprod. (1981), 25:1099.
246. Lavon, V.;Volcani, R.; Danon, D. J. Reprod. Fert. (1971), 24:219.
247. Voglmayr, J.K.; Fairbanks, G.; Jackowitz, M.; Colella, J.R. Biol. Reprod. (1980), 22:655.
248. Fawcet, D.W. Dev. Biol. (1975), 44:436.

249. Moore, G.F.M. *Exp. Cell. Res.* (1971), 68:462.
250. Orgebin Crist, M.C.; Jahad, N. *Endocrinology* (1978), 103:46.
251. Orgebin Crist, M.C.; Jahad, N. *Biol. Reprod.* (1979), 21:511.
252. Olson, G.; Hamilton, D.W. *Biol. Reprod.* (1978), 19:26.
253. Kohane, A.C.; Garberi, J.C.; Cameo, M.S.; Blaquier, J.A. *J. Biol. Chem.* (1979), 11:671.
254. Kohane, A.C.; Cameo, M.S.; Piñeiro, L.; Garberi, J.C.; Blaquier, J.A. *Biol. Reprod.* (1980), 23:181.
255. Kohane, A.C.; Piñeiro, L.; Blaquier, J.A. *Endocrinology* (1983), 112:1590.
256. Pholpramool, C.; Lea, D.A.; Burrow, P.V.; Dott, H.; Setchell, B.F. *Inter. J. Androl.* (1983), 6:240.
257. Anuma, S.; Mayumi, T.; Suzuki, K.; Noguchi, T.; Iwai, M. Okabe, M. *J. Reprod. Fert.* (1973), 35:425.
258. Eng, L.A.; Olliphant, G. *Biol. Reprod.* (1978), 19:1083.
259. Kohane, A.C.; Gonzalez Echeverria, F.; Piñeiro, L.; Blaquier, J.A. *Biol. Reprod.* (1980), 23:737.
260. Cameo, M.S.; Quasnicu, P.S.; Garberi, J.C.; Gonzalez Echeverria, M.; Kohane, A.; Piazza, A.; Piñeiro, L.; Blaquier, J.A. En: *Recent Advances en Male Reproduction. Molecular basis and Implications.* Cap. 3. pp. 27. D'Aqata, R. ; Lipsen M.B.; Van der

- Molen, H.J. (editores). Raven Press, N.Y. (1983).
261. Moore, H.D.M. *J. Exper. Zool.* (1981), 2:77.
262. Cuasnicu, P.S.; Gonzalez Echeverria, M.F.; Piazza, A.; Cameo, M.; Blaquier, J.A. *J. Reprod. Fert.* (1984), 72:467.
263. Cuasnicu, P.S.; Gonzalez Echeverria, M.F.; Piazza, A.; Blaquier, J.A. *J. Reprod. Fert.* (1984), 70:541.
264. Gonzalez Echeverria, M.F.; Cuasnicu, P.S.; Piazza, A.; Piñeiro, L.; Blaquier, J.A. *J. Reprod. Fert.* (1984), 71:433.
265. D'agostino, A.; Jones, R.; White, R.; Parker, M.G. *Biochem. J.* (1980), 190:505.
266. Jones, R.; Brown, C.R.; Von Glos, K.I.; Parker, M.G. *Biochem. J.* (1980), 188:667.
267. Jones, R.; Brown, C.R. *Biochem. J.* (1982), 206:161.
268. Shur, B.D.; Hall, N.G. *J. Cell Biol.* (1982), 95:567.
269. Lopez, L.C.; Bayna, E.M.; Litoff, D.; Sharper, N.L.; Sharper, J.H.; Shur, B.D. *J. Cell Biol.* (1985), 101:1501.
270. Bleil, J.D.; Wassarman, P.M. *Cell* (1980), 20:873.
271. Florman, H.M.; Bechtol, K.B.; Wassarman, P.M. *Dev. Biol.* (1984), 106:243.



272. Florman, H.M.; Wassarman, P.M. *Cell* (1985), 41:313.
273. Wilson, E.M.; French, F. J. *Biol. Chem.* (1976), 251:5620.
274. Gurrpide, E. En: *Methods in Enzimology*. V. XXXVI, Part A. pp. 75. O'Malley, B.W.; Hardman, J.G. (editores) (1975).
275. Hausknecht, V.; Lopez de la Osa, E; Gurrpide, E. *J. Steroid Biochem.* (1982), 17:621.
276. Bradford, M.M. *Anal. Biochem.* (1976), 72:248.
277. Wilkin, P.R.; Bruchovsky, N.; Shnitka; T.K.; Rennie, P.S.; Comeau, T. *Acta Endocrinologica* (1980), 94:284.
278. Burton, K. *Biochem. J.* (1956), 62:315.
279. O'Farrel, P.H. *J. Biol. Chem.* (1975), 250:4007.
280. King, J.; Laemmli, U.K. *J. Molec. Biol.* (1971), 62:465.
281. Kugel, G.; Dans, H.; Mauch, H. *J. of Chrom.* (1979), 172:221.
282. Duchtorny, O.; Nilsson, L.A. En: *Handbook of Experimental Immunology*. V. 1; pp.19.1. Weir, D (editor). Blackwell Scient. Publ. Oxford (1973).
283. Fahey, J.L.; Terry, E.W. En: *Handbook of Experimetal Immunology*. V. 1; pp. 8.1. Weir, D. (editor). Blackwell Scient. Publ. Oxford (1973).

284. Bonavida, B. *Immunochemistry* (1971), 8:829.
285. Tezon, J.G.; Blaquier, J.A. *Molec. Cell Endocrinol.* (1981), 21:233.
286. Coty, W.A. *J. Biol. Chem.* (1980), 255: 8035.
287. Traish, A.M.; Muller, R.E.; Wotiz, H.H. *J. Biol. Chem.* (1981), 256: 12028.
288. Larminat, M.A.; Scorticati, C.; Rennie, F.; Bruchofsky, P. En: *Progress in Clinical and Biological Research. Hormones and Cancer.V.142*, pp.247. Gurrpide, E.; Calandra, R.S.; Levy, C.; y Soto, R.J. (editores). Alan R. Liss Inc. N.Y. (1984).
289. Kinshita, Y.; Hosaka, M.; Nishimura, R.; Takai, S. *Endocrinol. Japon* (1980), 27:277.
290. Boujard, D.; Thomas, D.; Garnier, D.H.; *Reprod. Nutr. Develop.* (1982), 22: 931.
291. Leinonen, F.; Hammond, G.R.; Vihko, R. *J. Clin. Endocr. Metab.* (1980), 51:423.
292. Tezon, J.G.; Vazquez, M.H.; Piñeiro, L; de Larminat, M.A.; Blaquier, J.A. En: *Theraphy in andrology.* pp. 53. Menchini Fabris G.F.; Pasini, W. Martini, L. (editores). *Excerpta Medical International Congress Series, Amsterdam* (1982).
293. Jenkins, J.S.; Mc Caffery, V.M. *J. Endocr.* (1974), 63:517.

294. Hoister, F.A. Acta endocrinol. (1975), 80:188.
295. Bend, R.; Lasnitzki, I. J. Endocr. (1977), 74:1.
296. Yochim, J.M.; Mallonee, R.C. Biol. Reprod. (1980), 23:588.
297. Yochim, J.M.; Mallonee, R.C. Biol. Reprod. (1980), 23:594.
298. Brooks, D.E. Biol. Reprod. (1978), 18:629.
299. Fencel, M.M.; Vिलlee, C.A. Steroids (1973), 21:537.
300. Djoseland, O. Steroids (1976), 27:47.
301. Pujol, A.; Bayard, Steroids (1978), 31:485.
302. Nguyen, C.T.; Duval, J.; Samterez, S.; Jouna, F. Biochemie (1974), 55:899.
303. Kniewald, Z.; Milkovic, S. Endocrinology (1973):172.
304. Robaire, B.; Ewing, L.L.; Zirkin, B.R.; Irby, D.C. Endocrinology (1977), 101:1379.
305. Lieskovsky, G.; Bruchhovsky, N. J. Urol. (1979), 121:54.
306. Djoseland, O.; Hoglo, S.; Abyholm, T. IRCS. Medical Science (1980), 8:502.
307. Verhoevens, G.; de Moor, P. Endocrinology (1973), 91:54.

308. Deneff, C.; Magnus, G.; Mc Ewen, B.S. *Endocrinology* (1974), 94:1265 .
309. Gustafsson, J.A.; Fosette, A. *Biochem. J.* (1974), 142:273.
310. Schriefers, H. *Vitam. Horm.* (1967), 25:271.
311. Pierrepoint, C.G.; Davies, P. J. *Steroid Biochem.* (1984), 20:1105.
312. Bonne, C.; Raynaud, J.P. *Steroids* (1976), 27:497.
313. Menon, M.; Tananis, Ch.; Hicks, L.; Hawkins, E.; Mc Loughlin, M.; Walsh, P. J. *Clin. Invest.* (1978), 61:150.
314. Zava, D.T.; Landrum, B.; Hotwitz, K.B.; Mc Guire, W.L. *Endocrinology* (1979), 104:107.
315. Noma, K.; Nakao, K.; Sato, B.; Nishisawa, Y.; Matsumoto, K.; Yamamura, Y. *Endocrinology* (1980), 107:1205.
316. Chen, T.J.; Mc Donald, R.G.; Leavitt, W.W. *Biochemistry* (1981), 20:3405.
317. Gaubert, C.M.; Tremblay, R.R.; Dube, J.Y. J. *Steroid Biochem.* (1980), 13:931.
318. Leach, K.L.; Dahmer, M.K.; Pratt, W.B. J. *Steroid Biochem.* (1983), 18:105.
319. Lee, H.J.; Bradlow, H.L.; Moran, M.C.; Sherman, M.R. J. *Steroid Biochem.* (1981), 14:1325.

320. Niu, E.M.; Neal, R.M.; Pierce, V.K.; Sherman, M.R. J. Steroid Biochem. (1981), 15:1.
321. Wright, W.W.; Chan, K.C.; Bardin, C.W. Endocrinology (1981), 108:2210.
322. Tsai, Y.H.; Steinberger, A. J. Steroid Biochem. (1982), 17:131.
323. Jensen, E.V.; Hurst, D.J.; De Sombre, E.R.; Jungblut, P.W. Science (1967), 158:385.
324. Little, M.; Rosenfeld, G.C.; Jungblut, P.W. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. (1972), 353:231.
325. Kan, J.; Dofwku, R.; Ohno, S. (comunicación personal, en referencia 326).
326. Robel, P.; Blondeau, J.P.; Baulieu, E.E. Biochem. Biophys. Acta (1974), 373:1.
327. Sherman, M.R.; Moran, M.C.; Tuazón, F.B.; Stevens, Y.W. J. Biol. Chem. (1983), 258:10366.
328. Blondeau, J.P.; Corpechot, C.; Le Goascogne, C.; Baulieu, E.E.; Robel, P. Vitams Horm. (1975), 33:319.
329. Moore, H.D.M. J. Reprod. Fert. (1981), 61:347.
330. Brooks, D.E.; Higgins, S.J. J. Reprod. Fert. (1980), 59:363.
331. Kopecný, V.; Pech, V. Biol. Reprod. (1977), 16:421.

332. Flickinger, C.J. *Bio. Reprod.* (1981), 25:871.
333. Lea, D.A.; French, F.S. *Biochim. Biophys. Acta* (1981), 668:370.
334. Garberi, J.C.; Fontana, J.D.; Blaquier, J. A. *Inter. J. Androl.* (1982):5:619.
335. Weil, A.J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1965), 124:267.
336. Weil, A.J.; Kotsevalov, O. Wilson, H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1956), 92:606.
337. Lipiello, L.A.; El-Rubaje, F.; Weil, A.J. *Fertil. Steril.* (1968), 19:991.
338. Boetcher, G. En: *Immunology and Reproduction.* pp.148. Edwards, R.G. (editor). *Inter. Planned Parenthood Feder.* N.Y.(1969)
339. Tezon, J.G.; Ramella, E.; Cameo, M.S.; Vazquez, M.H.; Blaquier, J.A. *Biol. Reprod.* (1985), 32:591.
340. Vernon, B.R.; Muller, Ch. H.; Herr, J.C.; Feuchter, F. A.; Eddy, E.M. *Biol. Reprod.* (1982), 26:523.
341. Friend, D.S. *J. Cell Biol.* (1969), 41: 269.
342. Friend, D.S.; Farquhar, M.G. *J. Cell Biol.*, (1967), 35:357.
343. Nicander, L.; Paulsson, S.; Selander, U. *Scand. Congr. Cell. Res.*; 4th.; pp.51 (1965).

344. Bennet, G.; Leblond, C.P. Haddad, A. J.Cell. Biol. (174), 60:258.
345. Mancini, R.E.; Gutierrez, O.; Fernandez Collazo, E. Fertil. Steril. (1971), 22:475.
346. Sailing, P.M. Biol. Reprod. (1982), 26:429.
347. Fournier-Delpech, S.; Courtens, J.L.; Pisselet, C.L. Delaleu, B.; Cournot, M. Gamete Res. (1982), 5:403.
348. Hekman, A. Rumke, P. Fertil. Steril. (1969), 20:312.
349. Roberts, T.K.; Boetcher, B. J. Reprod. Fert. (1969), 18:347.
350. Wolf, D.P.; Sokoloski, J.E.; Dandekar, P. Bechtol, K.B. Biol. Reprod. (1983), 29:713.
351. Manuibova, I.A.; Diagnóstico de la infecundidad en la mujer. Symp. WHO sobre Reproducción humana y la regulación de la fertilidad. La Habana, Cuba (1978).
352. Cooke, I.D. The natural history and major causes of infertility regulation. Symp. WHO sobre: Advances in Fertility Regulation. Moscú URRS (1976).
353. Blaquier, J.A.; Cameo, M.S.; Stephany, D.; Piazza, A.; Tezon, J.; Sherins, R.J. (enviado a publicación).

ABREVIATURAS

A	4 androstano 3,17 diona
ABP	proteína transportadora de andrógenos
Acetato de Ciproterona	6 $\alpha$ Cl-17 $\alpha$ hodoxi 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ metilen-4,6 pregnadien 3,20 diona, 17 acetato.
ADN	ácido desoxirribonucleico
AEG	glicoproteína ácida epididimaria
ARN	ácido ribonucleico
14C	carbono 14
5 $\alpha$ A	5 $\alpha$ androstano 3,17 diona
Ci	Curie
cpm	cuentas por minuto
DES	dietilestilbestrol
DHT	5 $\alpha$ androstano, 17 $\beta$ ol, 3 ona
Dioles	5 $\alpha$ androstano, 3 ( $\alpha$ , $\beta$ )diol 17 $\beta$ ol,
dpm	descomposiciones por minuto
fmol	femto mol (10 <sup>-15</sup> mol)
FCaE	fluido de CAPUT Epididimario
FCauE	fluido de CAUDA Epididimario
FMP	proteína de motilidad progresional
FSH	hormona folículo estimulante
GFC	glicerilfosforilcolina



h	hora
3H	tritio
LH	hormona luteinizante
M	Molar
mA	miliampere
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida
PBP	proteína ligadora prostática
pmol	pico mol ( $10^{-12}$ M)
progesterona	4 pregnen- 3,20 diona
Ra	movilidad electroforética relativa a la albúmina
R <sub>v</sub>	movilidad relativa al frente
R1881	2 oxa-17 $\alpha$ metil- 17 $\beta$ hidroxí estra 4-9 11 trien 3 ona; Metiltrienolona
rpm	revoluciones por minuto
SH	grupo sulfhidrilo
SHBG	proteína ligadora de esteroides sexuales (TeBG)
S-S	grupo disulfuro
T	4 androsten 17 $\beta$ ol 3 ona
tARN	ARN de transferencia
UI	unidades internacionales
ul	microlitro ( $10^{-6}$ litro)

metro)

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Blaquier, quien puso toda su confianza en mí desde el primer momento, guiando y respaldando la realización de mis trabajos.

A los Dres. Mariana de Larminat y Jorge Tezón, no solo por haberme enseñado las bases científicas de los trabajos aquí presentados, sino por haberme transmitido su esfuerzo y tenacidad, y por brindarme su amistad.

A los miembros del Servicio de Urología del Instituto de Oncología "Angel Roffo", Dres. C. Scorticati, O. Bellora, L. Pasik, J. Arturi, por su colaboración en la obtención de los tejidos utilizados en los estudios realizados.

A los Dras. Patricia Quasnicú y Mónica Cameo, a la bioquímica Adriana Dawidovski y a las Lic. M. Fernanda González Echeverría, Alejandra Piazza y Lucrecia Piñeiro, por su apoyo y cooperación constantes.

Al Dr. Esteban Ramella, por la colaboración en el desarrollo del antisuero utilizado en el Capítulo 3, y por su compañerismo.

A las Sras. Elsa M. de Morra y Stella D. de Pimentel por su asistencia técnica en todo momento eficiente y dedicada.

A la Sra. Patricia D. de Sanchez, por la eficiencia en la colaboración técnica y por su amistad incondicional.

A los Dres. Juan Pablo Radicella, Lino Barañao, Tomás Santa Coloma y Juan Carlos Calvo, así como al Sr. Norberto Malarini y al Sr. Marcelo Lamami por su colaboración técnica en la preparación de esta Tesis.

A todos los integrantes del Instituto de Biología y Medicina Experimental, por haberme brindado un ambiente cordial, en el cual he realizado estos estudios.

Finalmente a los miembros de mi familia, quienes con su generosidad, comprensión, y estímulo contantes, me dieron las fuerzas para concretar este trabajo.