

Tesis de Posgrado

Regulación hormonal de la función epididimaria

De Larminat, María Ana

1981

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

De Larminat, María Ana. (1981). Regulación hormonal de la función epididimaria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1686_DeLarminat.pdf

Cita tipo Chicago:

De Larminat, María Ana. "Regulación hormonal de la función epididimaria". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1686_DeLarminat.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

1676

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

REGULACION HORMONAL DE LA FUNCION

EPIDIDIMARIA

Autora: Lic. María Ana de Larminat

Director: Dr. Jorge A.T. Blaquier

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Ciencias Químicas, orientación Biológica

- 1 9 8 1 -

1686
E-2
✓

R E S U M E N

En vista de la importancia de los andrógenos 5α -reducidos para el adecuado funcionamiento de las estructuras epididimarias involucradas en la maduración de los espermatozoides, se estudiaron las características de la enzima 5α -reductasa en el epidídimo de la rata.

Se determinó su localización subcelular, con la ayuda de marcadores específicos, y los parámetros de su actividad *in vitro*.

Se pudo demostrar la disminución de la actividad (específica y total) luego de la castración, o sea al ser removida la fuente de andrógenos endógenos. Dicha disminución fue proporcional al tiempo transcurrido entre la castración y el análisis de la actividad de la 5α -reductasa: 83, 63, 38, y 13% de la actividad específica control a los 2, 4, 8, y 14 días después de la orquidectomía.

Al tratar con testosterona animales castrados 30 días antes, se observó una clara recuperación de la actividad *in vitro* de la 5α -reductasa; 12 días de terapia (200 ug de TP al día) devuelven la actividad nuclear en un 83%, mientras 8 días de terapia bastan para recobrar los niveles control detectados en la enzima microsomal.

Demostrada la andrógeno-dependencia de la enzima 5α -reductasa en el epidídimo adulto, se pasó a estudiar el desarrollo ontogénico de esta actividad en el epidídimo de ratas de 15 a 40 días.

También se determinó el de la enzima 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa, que metaboliza la 5α -dihidrotestosterona a 5α -androstanoles, los cuales podrían también tener actividad biológica.

Mientras no se registraban mayores cambios respecto del órgano adulto en lo que concierne a localización subcelular y parámetros cinéticos, se encontró un pico en la actividad específica de las dos enzimas alrededor de los 25 días de edad. Además, la relación diol/DHT se hallaba aumentada entre 2 y 5 veces durante el período de 20-25 días.

Por último, se midieron en ratas prepúberes de distintas edades algunos parámetros morfológicos y bioquímicos relacionados con la función epididimaria, con el objeto de investigar sobre eventuales correlaciones entre metabolización de testosterona y desarrollo del órgano.

Fueron medidos: los niveles tisulares de andrógenos, la incorporación de ^{14}C Timidina, el contenido en ADN, proteínas totales, humedad, y sustancias específicas como ácido siálico, glicerilfosforilcolina, cinc, y proteínas específicas epididimarias (PEE). También se realizaron cortes histológicos para evaluar en cada edad el desarrollo del conducto epididimario.

Los resultados indican que la edad prepuberal se caracteriza por una muy activa metabolización epididimaria de la testosterona a DHT y dioles, coincidente con una intensa proliferación celular. En tanto, la mayoría de las actividades diferenciativas, tales como la secreción de productos específicos (Andrógeno-dependientes en el adulto), quedan relativamente postergadas en esta etapa.

I N D I C E

| | página |
|---|-----------|
| INTRODUCCION..... | 1-18 |
| A- El testículo, su función y regulación..... | 2 |
| B- Glándulas anexas al aparato reproductor masculino..... | 5 |
| C- Conductos. El Epidídimo..... | 7 |
| Objetivo de la tesis..... | 18 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 19-42 |
| A- <u>Materiales y Reactivos</u> | 19 |
| Animales..... | 20 |
| B- <u>Métodos</u> - Obtención de tejido..... | 21 |
| Procesamiento del tejido..... | 21 |
| Determinación de radiactividad..... | 22 |
| Determinación de ADN y protefnas..... | 23 |
| Incorporación de ¹⁴ C-Timidina..... | 25 |
| Ensayo de enzimas marcadoras de las distintas fracciones subcelulares..... | 26 |
| Ensayo de 5 α -reductasa..... | 27 |
| Extracción de esteroides..... | 27 |
| Cromatografía de esteroides por placa delgada y columnas de celite..... | 28 |
| Determinación de ácido siálico..... | 30 |
| Determinación de glicerilfosforilcolina..... | 33 |
| Determinación de Zn por absorción atómica..... | 34 |
| Radioinmunoensayo de andrógenos..... | 36 |
| Electroforesis analítica de protefnas específicas de epidídimo (PEE)..... | 39 |
| C- Procesamiento de los datos..... | 42 |

| | |
|--|--------|
| RESULTADOS (1 ^{ra} Parte)..... | 43-55 |
| <u>Andrógeno-dependencia de la 5α-reductasa epididimaria de la rata adulta</u> | |
| I- a) Localización de la actividad de 5 α -reductasa en el epidídimo de la rata adulta..... | 44 |
| b) Determinación de la pureza de las fracciones subcelulares..... | 46 |
| II- Efecto de los andrógenos sobre el trofismo de sus órganos efectores..... | 46 |
| III- Efecto de la castración sobre la actividad in vitro de la 5 α -reductasa epididimaria de la rata adulta..... | 47 |
| IV- Efecto del tratamiento con propionato de testosterona sobre la actividad de la 5 α -reductasa epididimaria de animales castrados..... | 50 |
| DISCUSION (1 ^{ra} Parte)..... | 56-64 |
| RESULTADOS (2 ^{da} Parte)..... | 65-120 |
| <u>Desarrollo ontogénico de la actividad de la 5α-reductasa y 3-α-deshidrogenasas en el epidídimo de la rata. Correlación con el trofismo y la función del órgano.</u> | |
| V- Estudios enzimáticos..... | 67- |
| 1) Localización subcelular y actividad de la 5 α -reductasa y de la 3- α -deshidrogenasa en el epidídimo de la rata prepúber y adulta..... | 67 |
| 2) Estudios cinéticos de las actividades enzimáticas..... | 69 |
| 3) Actividad in vitro de la 5 α -reductasa epididimaria durante la maduración sexual..... | 75 |

| | |
|--|---------|
| 4) Actividad in vitro de la 3- α -OH deshidrogenasa epididimaria durante la maduración sexual..... | 77 |
| 5) Actividades comparadas de la 3 α -OH deshidrogenasa y la 3 β -OH deshidrogenasa en animales prepúberes de 25 días y adultos..... | 83 |
| VI-Niveles tisulares de T, DHT, y androstandioles en el epidídimo de la rata a distintas edades..... | 88 |
| VII- Medición de parámetros relacionados con el trofismo y función del órgano, en epidídimos de ratas de distintas edades..... | 92-102 |
| A- Parámetros Tróficos..... | 92 |
| 1) Peso del órgano, contenido tisular en agua y proteínas totales..... | 93 |
| 2) Contenido en ADN e incorporación in vitro de ^{14}C -Timidina al ADN..... | 96 |
| 3) El desarrollo histológico del túbulo y la determinación del número de mitosis..... | 99 |
| B- Parámetros Funcionales..... | 103-120 |
| 4) Acido Siálico..... | 103 |
| 5) Glicerilfosforilcolina..... | 105 |
| 6) Análisis de Cinc (Zn)..... | 109 |
| 8) Proteínas específicas epididimarias (PEE)..... | 115 |
| DISCUSION (2 ^{da} Parte)..... | 116-134 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 135-151 |
| Agradecimientos..... | 152 |

ABREVIATURAS

ABP: Proteína ligadora de andrógenos

DHEAS: Sulfato de dehidroepiandrosterona

T: Testosterona (17 β hidroxí-androst-4-en-3-ona)

DHT: Dihidrotestosterona (17 β -hidroxí-5 α -androstan-3-ona)

diol: 5 α -androstandiol (5 α -androstan-3 α , β 17 β diol)

DHase: 3 hidroxisteroide deshidrogenasa

TCA: ácido tricloroacético

AcOH: ácido acético

AcOEt: acetato de etilo

MeOH: metanol

GPC: glicerilfosforilcolina

PEE: Proteínas específicas de epidídimo

TP: Propionato de Testosterona

NAN: ácido N-acetil neuramínico

C.A.T.: carnitina acil-transferasa

INTRODUCCION

El tracto genital masculino en los mamíferos está formado por una serie de componentes anatómicamente distintos y funcionalmente especializados.

Dentro de éstos podemos distinguir tres grandes grupos:

- a) Las gonadas propiamente dichas, donde tiene lugar la formación de las gametas (espermatogénesis) y de las hormonas sexuales (esteroidogénesis).
- b) Un conjunto de glándulas, ubicadas a distintos niveles del tracto, cuyas secreciones proveen el medio y los factores necesarios para la supervivencia y transporte de los espermatozoides hasta su salida en el eyaculado.
- c) Un sistema de conductos, encargado fundamentalmente de almacenar y/o transportar los espermatozoides.

El epidídimo, comunicando con el testículo por vía de los conductos eferentes y con el sistema de conductos por vía del vas deferens posee, como veremos más adelante, las características del grupo b, y c.

Este conjunto de estructuras necesita para funcionar, adecuada y sincrónicamente, de la acción de varias hormonas. Los andrógenos producidos por el testículo, son los más directamente involucrados en esta acción trófica y estimuladora de la función.

A. El testículo, su función y regulación

El parénquima testicular, rodeado externamente por una cápsula protectora (túnica albugínea), está formado esencialmente por los túbulos seminíferos y el intersticio. En forma esquemática, podemos decir que la formación de gametas, espermatogénesis, es función de los túbulos seminíferos, mientras que el intersticio es el encargado de producir las hormonas sexuales.

Los túbulos forman amplias circunvoluciones, unidas en ambos extremos a una estructura canalicular bastante intrincada llamada rete-testis, que se conecta con el epidídimo por medio de los conductos eferentes. El intersticio ocupa el espacio intertubular.

Espermatogénesis

El epitelio tubular está revestido por dos tipos celulares: las células soporte o de Sertoli, y las células germinales, precursoras de las gametas masculinas (1).

Las formas más inmaduras de estas últimas (espermatogonias) se hallan en la parte basal del epitelio, y se van desplazando hacia la luz tubular conforme van sufriendo una serie de cambios (escalonados según Leblond y Clermont (2) en 19 etapas), transformándose así, sucesivamente, en espermatocitos, espermátides y finalmente espermatozoides,

que serán luego transportados al epidídimo por el fluido rete-testicular.

En cuanto a las células de Sertoli, se les ha asignado funciones nutritivas (3,4,5,6,7), fagocitarias (8,9), y de síntesis, FSH-dependiente, de hormonas esteroideas (10) y de ABP (11).

Incluso, se les asigna un cierto rol de control de la espermatogénesis, a través de alguna secreción específica, no esteroidea (12).

Esteroidogénesis

En el intersticio tiene lugar la otra importante función del testículo: la esteroidogénesis. Esta se produce en células descritas por primera vez en 1850 por Franz Leydig (13), y cuyo rol endocrino fue definitivamente probado por Bouin y Ancel (14) en 1903.

La testosterona se considera el producto formado más importante en el adulto y también la hormona masculina "per se" (15,16) aunque no hay que descartar que otros compuestos, especialmente C^{19} parcialmente reducidos, puedan desempeñar importantes funciones androgénicas, particularmente durante la maduración sexual (17,18,19,118). Aunque parece haber indicios de que otros compartimentos testiculares producen esteroides (18,20,21), sólo en el intersticio se forman andrógenos a partir del colesterol (22), que a su vez es formado a partir de Acetil-Coa proveniente del metabolismo in-

tracelular de ácidos grasos y/o glucosa, captados del plasma. Las transformaciones sucesivas del colesterol se producen por la acción de enzimas y cofactores como NADPH y O_2 , ubicados en distintos compartimentos de las células de Leydig (23) y, entre los intermediarios más importantes, figuran la Pregnenolona, progesterona y androstenediona.

Una vez formada la testosterona, ésta difunde por el tejido intersticial (en el que existen capilares sanguíneos, vasos linfáticos y tejido conectivo laxo), probablemente unida a una proteína transportadora, y deja dicho tejido por tres rutas posibles:

- Capilar sanguíneo (este camino es el más favorecido por el gradiente de difusión y el flujo sanguíneo.
- Vaso linfático
- Penetración a través de la capa de células mioideas que reviste los túbulos seminíferos e incorporación a la circulación luminal de éstos.

Así la testosterona aparece en el fluido de la rete-testis y viaja luego al epidídimo.

Dependencia Hormonal

La producción y secreción de andrógenos es un proceso dependiente de ICSH y/o FSH (24, 25, 26, 27, 28); en el cual dichas gonadotropinas podrían actuar sinérgicamente.

El mecanismo de acción involucra el aumento del AMP_C intracelular, mediado por la activación de la adenilato ciclasa ligada a membranas. El AMP_C actuaría como segundo mensajero, siendo su efecto final la estimulación de la esteroidogénesis (29). Las Prostaglandinas (PGE) (30,31) y catecolaminas (epinefrina (32) y norepinefrina (29)) también actuarían vía AMP_C para estimular la síntesis de esteroides.

La acción estimuladora de las gonadotrofinas podría asimismo traducirse en un incremento en las disponibilidades de NADPH, cofactor requerido para múltiples pasos enzimáticos de la androgenogénesis (24,33).

Por otro lado, es generalmente aceptado que la FSH regula la formación de una proteína ligadora de andrógeno (ABP) en las células de Sertoli, y que ésta favorece el transporte y la integridad del andrógeno intraluminal (34). Otras hormonas peptídicas, como la prolactina y la somatotrofina, podrían, actuando solas o bien sinérgicamente con las gonadotrofinas, reforzar o controlar la acción de estas últimas (35, 36).

B- Glándulas anexas al aparato reproductor masculino

Estas son: la próstata ventral y anterior (glándula coagulante), las vesículas seminales, la ampolla y la glándula bulbouretral o de Cowper.

Anatómicamente, la próstata es una estructura túbulo-

alveolar (37,38) consistente en numerosos lóbulos que vuelcan sus secreciones serosas en el utrículo prostático, luego incorporadas al semen. Típico de un órgano secretor, su epitelio simple columnar tiene el aparato de Golgi muy desarrollado, núcleos basales y vacuolas de secreción.

La secreción, incolora, de pH=6.5 está formada principalmente por enzimas proteolíticas, fosfatasa ácida, un agente liquefiante del semen (la fibrinolisisina), citrato de sodio, Zn, y otras sustancias osmóticamente activas.

Las vesículas seminales, derivadas de la evaginación de un sáculo perteneciente al conducto de Wolff (38,39), tienen caracteres histológicos semejantes al del lobulillo prostático, y también la secreción es de tipo merócrino. Difiere, en cambio, de la próstata en el volumen y tipo de secreción. Esta es voluminosa, constituyendo una buena parte del semen total, y por orden de importancia sus componentes son: azúcares (fructosa, inositol, fucosa) y otras sustancias reductoras como la ergotionefina y el ácido ascórbico; prostaglandinas E₁ y E₂; glicó y flavoproteínas; iones, sobre todo K⁺ y PO₄³⁻ (39).

La ampolla, que es en realidad un ensanchamiento del vas deferens en su parte distal, secreta ergotionefina y material etanol-soluble (ácido siálico, etc.).

Tanto el mantenimiento del epitelio como las distintas

secreciones de estas glándulas son estrechamente dependientes del balance androgénico, involucionando notablemente luego de la castración, y regenerándose parcial o totalmente por una adecuada provisión de andrógenos.

Todos los productos contribuyen de alguna manera a la supervivencia y transporte de los espermatozoides, aunque algunos de los mecanismos involucrados nos son aún desconocidos.

C- Conductos

Estos son los conductos eferentes, el vas deferens y los conductos externos (uretra).

El epitelio del primero posee dos tipos de células: las ciliadas, que gobiernan la dirección del flujo de fluido rete-testicular, y por lo tanto de los espermatozoides, hacia el epidídimo, y las no ciliadas que, en cambio, tendrían funciones absortivas (40) (de fluido, Na^+ , proteínas y glucosa, principalmente). El epitelio del vas deferens es, en su parte terminal, estereo-ciliado como el del epidídimo, aunque la parte más distal tiene microcilias.

Estos canales están rodeados de fibras musculares lisas, que al contraerse provocan desplazamiento céfalo-caudal del plasma contenido.

El epidídimo

Es un órgano que posee características muy especiales, ya que morfológicamente se podría considerar un conducto, y funcionalmente una glándula secretoria; embriológicamente deriva del conducto de Wolff.

Unido estrechamente al testículo mediante una cubierta de tejido adiposo, el epidídimo constituye un largo y único tubo ovillado en forma sumamente compacta dentro de la membrana que lo envuelve.

Tabiques de tejido conectivo intersegmentario también limitan su expansión en sentido longitudinal, y ayudan a demarcar tres grandes segmentos o zonas histológica y funcionalmente distintas: la cabeza, el cuerpo, y la cola del epidídimo (ver esquema). Algunos autores (41) incluyen una cuarta zona, que denominan segmento inicial.

Ya a partir de ese segmento, el epitelio que tapiza el tubo difiere notablemente del de los conductos eferentes: la altura de las células aumenta hasta unos 60u, y su disposición corresponde a la de un epitelio columnar pseudo-estratificado (42).

Varios tipos celulares componen este epitelio:

Células estereociliadas o principales: con un aparato de Golgi muy desarrollado. Su citoplasma contiene numerosos gránulos de secreción, lisosomas y cuerpos multivesiculares (41). Sus microvellosidades se extienden hacia la luz. Los otros

tipos celulares son: las células basales, que interaccionarían con las principales estabilizando el epitelio; las células apicales, que existen sólo en el segmento inicial; las células halo (43) y finalmente las células claras, ubicadas en la parte caudal del epidídimo (44), con gran número de vacuolas y corpúsculos densos conteniendo glicolípidos, lípidos y probablemente glicoproteínas.

La altura de las células principales cambia a lo largo del epidídimo, así como también la distribución de las diferentes poblaciones celulares. El diámetro tubular aumenta a lo largo del órgano, por lo que la parte caudal posee una gran capacidad de almacenamiento de los espermatozoides.

Ahora bien, una morfología celular tan dinámica y variada difícilmente cuadra con un concepto del epidídimo cuya única función sería la de conducto o depósito de los espermatozoides. Como veremos más adelante, hay fuertes evidencias en favor de una activa función epididimaria concerniente, fundamentalmente, a la maduración de los espermatozoides.

Dicho rol se infiere más por los cambios morfológicos y funcionales detectados en espermatozoides que ya han transitado el epidídimo, que por pruebas bioquímicas concluyentes involucrando determinadas secreciones epididimarias (45).

Describiremos sucintamente los cambios que sufre el espermatozoide a lo largo del trayecto por el epidídimo,

cambios a raíz de los cuales se lo considera maduro, es decir, capaz de fertilizar un óvulo y dar lugar a una progenie viable.

Cambios en el espermatozoide a lo largo del epidídimo

El tiempo que emplea un espermatozoide en recorrer la longitud total del epidídimo varía según la especie y la actividad sexual del animal. Como cifra promedio se acepta un tiempo de tránsito de 12-14 días en los animales de laboratorio más comúnmente usados (57).

Durante ese lapso los espermatozoides sufren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos (46,50,57), cuya naturaleza íntima no es bien conocida, y que resultan en un cambio funcional que otorga al espermatozoide la capacidad de fertilizar el óvulo (46). El proceso que resulta en este cambio se denomina "maduración del espermatozoide" y es mediado por factores que produce el epidídimo en respuesta al estímulo androgénico (57).

Como no entendemos aún los mecanismos envueltos en el fenómeno de maduración, nos vemos obligados a describir, en forma aislada, los cambios que han sido posible detectar entre el espermatozoide inmaduro e infértil, que entra al epidídimo, y la célula madura y fértil que encontramos en la porción distal.

El cambio en la motilidad de los espermatozoides durante

su maduración es muy marcado. Los espermatozoides que ingresan al epidídimo presentan movimientos desordenados que los impulsan en una trayectoria circular (46). Por el contrario, los espermatozoides de la cola del epidídimo se mueven en forma rectilínea (46). Esta característica, denominada motilidad progresiva, puede ser debida a la acción de proteínas específicas presentes en el fluido epididimario (45,47), cuyo efecto sería mediado por el AMP_C (47).

Algunos autores (48) hacen hincapié en la formación de puentes disulfuro (S-S) entre las fibras que forman la cola del espermatozoide, lo cual conferiría mayor rigidez al flagelo y modificaría el movimiento translacional.

El cambio morfológico más importante consiste en la migración y eventual pérdida de remanentes citoplasmáticos (52) cuya presencia impediría la fecundación (53).

Se han detectado cambios bioquímicos en los espermatozoides en maduración. En el aspecto metabólico, los espermatozoides inmaduros obtienen la mayoría de su energía de la glucólisis, siendo la glucosa su principal sustrato, mientras que los espermatozoides maduros utilizan en mayor medida la vía aeróbica, para la cual usan al ácido láctico como sustrato preferencial (216).

Además, se han comprobado cambios en la cantidad y composición de los lípidos, fosfolípidos, proteínas y enzimas del espermatozoide (46,49,50,51,56,57).

A nivel de la membrana celular también se producen algunos cambios que se traducen en una mayor permeabilidad y en la adquisición de una carga neta negativa (55), supuestamente, debida a la incorporación de glucoproteínas de origen epididimario (54,56). Estas moléculas serían las responsables de los cambios en las propiedades antigénicas del espermatozoide que pueden producir el fenómeno de autoaglutinación de los espermatozoides maduros (222).

Funciones del epitelio epididimario

Se pueden clasificar en dos tipos: absorptivas y secretorias.

La absorción de agua, iones, y macromoléculas diversas, así como la fagocitosis de restos de espermatozoides, no son patrimonio único del epidídimo, ya que ocurren también en los conductos eferentes, vas deferens, y ampolla (41, 59), pero son muy activas, especialmente en cabeza y cola epididimaria (60)

La función secretoria se traduce en la aparición de la glicerilfosforil colina (de la cual hablaremos más adelante), y diversas glicoproteínas y sialoproteínas (56,58), cuyas propiedades lubricantes y retentoras de agua favorecerían el tránsito y la estabilidad de los espermatozoides.

La carnitina, existe en cantidades apreciables en el epidídimo (1,61), se presume que es producida localmente, aunque podría sólo ser concentrada en el órgano. Este compuesto (62) podría actuar como regulador de la distribución del Acetil-CoA mediante la reacción,

Carnitina

Carnitina + Acetil-CoA $\xrightarrow{\text{acil-transferasa}}$ Acetil-Carnitina + CoA

catalizada por la C.A.T., muy activa en el epidídimo (61). La acetil-carnitina a su vez podría servir de intermediario en el metabolismo de ácidos grasos del espermatozoide.

Distintos grupos de trabajo han detectado la existencia de proteínas epididimarias, capaces de unirse a los espermatozoides (44,45,47), cuya función está siendo investigada en la actualidad.

Andrógenos epididimarios

El epitelio epididimario es capaz de sintetizar andrógenos, como lo demostraron varios investigadores (63,64,65) utilizando precursores como ^{14}C -acetato, colesterol y pregnenolona. En efecto, las células de este órgano poseen las enzimas necesarias para la esteroidogénesis completa, aunque la distribución subcelular de las mismas parece ser algo distinta de la de otros tejidos (como testículo o adrenales) (64). No se sabe si los esteroides sintetizados por el epidídimo son secretados o no a la luz tubular.

Cabe destacar tres hechos importantes:

- 1º- Existen algunas evidencias acerca de interacciones esteroide-espermatozoide en el epidídimo (66,67), posiblemente vía DHEAS y/o compuestos 5α -reducidos.
- 2º- El trofismo y función del órgano son estrictamente andrógeno-dependientes.

3^o- El tejido epididimario metaboliza activamente la testosterona que le llega del testículo a compuestos 5α -reducidos.

Nos detendremos a analizar más en detalle los dos últimos puntos.

Andrógeno-dependencia del epidídimo

Hace ya tiempo, observaciones de Benoit (87) indicaban que la castración provocaba una profunda atrofia del epidídimo, similar a la que ocurría en otros órganos sexuales accesorios como la próstata y las vesículas seminales.

Trabajos más recientes (42, 88, 89, 90) mostraron que no sólo el trofismo, sino también distintas secreciones y actividades enzimáticas epididimarias, se veían afectadas por la falta de andrógenos. Incluso, la función misma del órgano, la maduración de los espermatozoides, es andrógeno-dependiente, al menos en el cobayo, el conejo, la rata y el hamster (45, 57, 91)

Metabolización in situ de la testosterona

La testosterona producida por el testículo llega al epidídimo por dos caminos principales:

a) Por vía sanguínea, a través de la circulación del plexo pampiniforme, y penetración en la célula por difusión simple. A diferencia de lo que sucede en otros tejidos no efectores de andrógeno, el esteroide es en este caso retenido selectivamente dentro de ella.

b) Por vía canalicular, junto al fluido de la rete testis que penetra al epidídimo por los conductos eferentes comunicados con el testículo. Constituye el camino cuantitativamente más importante.

En la rata, la testosterona, unida a una proteína de origen testicular (ABP), llega en grandes cantidades al epidídimo y entra a las células, presumiblemente por mecanismos pasivos, luego de haberse desprendido del ABP. Allí es reducido el doble enlace 4-5 del anillo A esteroideo, mediante la acción catalítica de la enzima NADPH: Δ 4-3 cetosteroide 5 α -reductasa (5 α -Reductasa), ubicada principalmente en las membranas del retículo endoplasmático (68,69,70,71), actuando el NADPH como donante de hidrógenos.

El producto resultante es la 5 α -androstan-17 β -ol-3 - ona (androstanolona, dihidrotestosterona o DHT).

La magnitud de esta transformación es tal, que la relación T/DHT, que era 10 a 1 a la salida del testículo, pasa a ser 1 a 6 en el epidídimo (72). En este órgano actúan además otras enzimas: las 3 α y 3 β -ol deshidrogenasas (3 α y 3 β ol DHasa), que catalizan reversiblemente la reducción de la DHT, utilizando preferentemente NADPH como cofactor, a los respectivos 5 α -androstan 3(α , β) 17 β -dioles (Dioles) (73).

Mecanismo de acción de los andrógenos

Importancia de la 5 α -reducción

Estudios en próstata de rata (74,75,76,77,78,) , mostraron

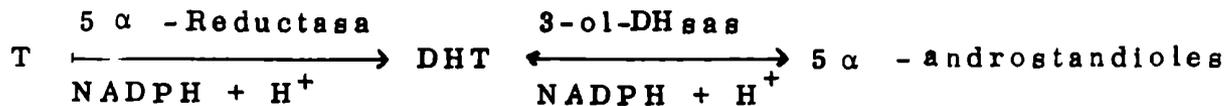
que la transformación de T a DHT era un importante requisito para la acción hormonal. Esta implica, según conceptos clásicos (79), la unión del esteroide a una proteína citoplasmática de alta especificidad, denominada receptor, la migración del complejo hormona-receptor así formado al núcleo celular, y su unión a sitios específicos de la cromatina (aceptores nucleares) (80,81).

A partir de esta interacción se transcribirán ARN específicos (82), que serán traducidas luego en los ribosomas para la síntesis de distintas proteínas.

Al estudiar comparativamente la afinidad del receptor para T, DHT y dioles se encontró, tanto en próstata (81,83) como en epidídimo (84,85), que la DHT era considerablemente más afín que su precursor no 5α -reducido para unirse a dicha macromolécula, por lo cual se concluyó que la dihidrotestosterona era un andrógeno más poderoso que la testosterona (76).

Cabe acotar además, que la DHT es el único andrógeno que se encuentra unido al receptor en el núcleo de la célula blanco (67,76).

Asumiendo que la acción androgénica se efectúa predominantemente a través de la DHT, se infiere que no sólo es importante el suministro total de andrógenos al órgano, sino también el balance de los 5α -reducidos/no reducidos en el tejido. Por lo tanto, al considerar la reacción global:



surge que ambas enzimas pueden ser sitios de regulación para dicho balance y que, en última instancia, de sus actividades dependen la integridad y funcionalidad del epidídimo.

Se ha postulado además que los 5α -androstandioles podrían tener cierto rol biológico, aún en estudio, por lo que la 3-ol-deshidrogenasa no se puede considerar estrictamente una enzima inactivante de la DHT.

La actividad de la 5α -reductasa ha mostrado ser sensible a los andrógenos circulantes, en próstata (92, 93, 98) en hipófisis (94) y también en epidídimo, según recientes estudios de Djoseland (95), Robaire y otros (96) y Pujol y Bayard (97). Estos dos últimos grupos también informaron acerca de una andrógeno-dependencia de la 3α -ol-deshidrogenasa.

OBJETIVO DE LA TESIS

Centrándonos en la importancia de la metabolización de la testosterona en el tejido epididimario, quisimos investigar la incidencia de distintas situaciones hormonales sobre la actividad (in vitro) de la 5α reductasa, y las consecuencias de esta eventual regulación hormonal sobre el tejido efector considerado.

Para ello utilizamos dos tipos de modelo experimental: uno, fisiológico, consistente en ratas macho durante su desarrollo sexual.

Allí se trata de hacer una correlación entre el estado hormonal fisiológico de los animales, a través de toda la edad prepuberal (15 a 50 días), el desarrollo ontogénico de la actividad de las enzimas 5α -reductasa y 3α -deshidrogenasas, y la aparición de diferentes eventos relacionados con el trofismo y la función epididimarios.

El otro modelo consiste en ratas macho adultas castradas, o sea deprivadas de su fuente natural de andrógeno, y en las que se investiga el efecto de dicha deprivación sobre la actividad in vitro de la 5α -reductasa epididimaria, paralelamente al trofismo del órgano. Se examina luego la reversión de dichos efectos con terapia de reemplazo por andrógenos en animales castrados.

MATERIALES Y METODOS

A) Materiales y Reactivos

Los compuestos radiactivos se obtuvieron de New England Nuclear Co.: 1,2 ^3H -Testosterona, actividad específica 41 Ci/m mol, 1,2,6,7 ^3H Testosterona, actividad específica 91 Ci/m mol; 4- ^{14}C Testosterona, actividad específica 57.8mCi/m mol; 4- ^{14}C Dihidrotosterona, actividad específica 52mCi/m mol; 1,2- ^3H - Dihidrotosterona, actividad específica 50.6Ci/m mol; 1,2- ^3H 3α -17 β androstandiol, actividad específica 50Ci/m mol; 4- ^{14}C Timidina, actividad específica (42 mCi/mmol)

El ^{14}C -androstandiol (5α androstan-3 α , 17 β diol) se preparó por incubación de DHT ^{14}C con túbulos seminíferos de rata prepúber (aproximadamente 25 días) según técnica de Rivalora y colab. (99).

El NADPH, los esteroides no radiactivos, el Tris-HCl, la sacarosa, el EDTA, el ácido N-acetil neuramínico, el succinato de sodio y la GPC provienen de Sigma Chemical Co.

Los solventes utilizados fueron todos de calidad analítica proviniendo según los casos de Sintorgan, Mallinckrodt o Merck.

La Celite utilizada para la separación de esteroides es de grado analítico Filter-aid, Johns-Mansville. La Silica-gel utilizada para la cromatografía en placa delgada fue Silicar TLC-7GF Mallinckrodt Chemical Works, o Eastman Chromagram Sheet tipo 13181 (N^o 6060) con indicador fluorescente.

La pureza de los esteroides radioactivos fue establecida por cromatografiados en silica gel.

Previo a su uso se verificó que el NADPH recién preparado estuviera en forma reducida, por análisis de su absorción al UV.

Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar, mantenidas a 22°C, 12 horas de luz, alimento balanceado y agua ad libitum.

Las ratas adultas (90-180 días) sometidas a castración, fueron anestesiadas con éter y se le practicó la orquidectomía por vía escrotal, cerrando por separado las incisiones de la capa muscular y dérmica respectivamente.

Los animales sometidos a tratamiento con andrógeno fueron inyectadas diariamente con 200ug de Propionato de Testosterona, disuelto en aceite vegetal estéril, por vía subcutánea, durante el tiempo indicado. Los animales control fueron inyectados por igual lapso con aceite estéril. En todos los casos los animales fueron sacrificados de 24 a 36 horas luego de haberles sido administrada la última dosis.

Los animales prepúberes fueron tomados entre 15 y 50 días de edad. Por razones técnicas puede haber una diferencia de ± 1 día de edad pero nunca mayor.

El destete se operó generalmente a los 21 días, considerado tiempo fisiológico para esta especie. Sin embargo algu-

nas veces se realizó un mismo experimento con ratas de 25 días separadas y no separadas de la madre, no registrándose mayores diferencias en los parámetros estudiados, salvo en el peso total del animal, que era ligeramente superior para los animales no destetados respecto del peso promedio de animales de edad homóloga.

B) Métodos

Obtención de tejido

El día fijado y siempre por la mañana, se sacrificaron las ratas por dislocación cervical extrayéndose de inmediato los epidídimos y otros tejidos que fueran necesarios que se mantuvieran en solución fisiológica en baño de hielo, hasta ser limpiados de grasa y membranas conectivas y pesados en balanza de torsión. Las operaciones subsiguientes se llevaron a cabo en un cuarto frío (4°C).

Procesamiento del tejido

En aquellos casos en que se deseaba incubar cortes de tejido, este fue cortado en trozos de aproximadamente 2mm³ y se determinó el peso de cada alícuota a incubar.

En los casos en que se deseaba incubar fracciones subcelulares se procedió de la siguiente manera: se picó exhaustivamente el tejido con tijeras, y se le agregaron 3 volúmenes de Buffer Tris 50mM pH=7.4, sacarosa 0.32M, 1,5mM EDTA,

0.15mM dithiothreitol; y se homogeneizó en Polytron (3 veces, 10 segundos velocidad 5) en baño de hielo. Se filtró por una malla de monofilamento de nylon Nitex y el filtrado se transfirió a tubos adecuados centrifugándose 15 minutos a 800g en una Centrifuga International B20. Se recogió el sobrenadante para ulterior centrifugación. El taco obtenido se resuspendió en exceso del mismo Buffer y se volvió a centrifugar 15 minutos a 800g, guardándose el precipitado obtenido como fracción Nuclear.

El primer sobrenadante se centrifugó a 12000g (durante 30 minutos) recogiendo el taco como fracción mitocondrial.

El sobrenadante se transfirió a tubos plásticos especiales y se centrifugó 60 minutos a 105000g. en una ultracentrifuga Spinco , con el rotor R-65.

El precipitado correspondió a la fracción microsomal (μ) y el sobrenadante, al citosol.

Todos los tacos se resuspendieron en 1.5ml de buffer por g. de tejido original y se mantuvieron en baño de hielo hasta la realización del ensayo enzimático.

Determinación de Radiactividad:

Las muestras se llevaron a sequedad en un evaporador de aire. Luego se agregó 5 o 10 ml, según los casos, de solución centellante (4g de 2,5-difenil oxazol; 100mg dimetil POPOP= dimetil-1,4-bis-2- (5-Fenil oxazolil), tolueno) disuelto en 1 litro de tolueno , y se determinó la radiactividad del ^3H y ^{14}C

seleccionando adecuadamente el ancho de las ventanas.

En los cálculos se restó el blanco de cada tipo de muestra así como la fracción de radiactividad debida al ^{14}C en la ventana de ^3H . Dicha fracción se calculó con standards de ^{14}C y esta interferencia era aproximadamente el 10% del total de ^{14}C en cada muestra.

Determinación de ADN y proteínas totales

Luego de extraer y pesar el tejido, se lo picó finamente con tijeras, agregando luego 5 volúmenes de buffer.

Se homogeneizó en homogeneizador vidrio-vidrio. Se guardó una alícuota de homogenato para medir proteínas y se centrifugó por 15 minutos a 800g, para obtener los núcleos. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendió el taco en 3ml de buffer, repitiéndose la centrifugación. El precipitado nuclear obtenido fue conservado para la determinación posterior de ADN.

Determinación de ADN

Método de Burton (100)

a) Hidrólisis

El precipitado nuclear se resuspende en agua destilada y se agrega 1 vol TCA 10%. Se espera 30 minutos, se centrifuga y resuspende en TCA 5%, se centrifuga, se agrega 1 ml

PCA 1N y se calienta 15 minutos a 90°C.

Soluciones de concentración conocida de ADN de esperma de salmón fueron hidrolizadas al mismo tiempo que las muestras para servir como patrón.

b) Ensayo de la difenilamina

Solución de difenilamina: (1.5g de difenilamina, 1.5ml H₂SO₄ concentrado y 100ml AcOH glacial). Se adicionaron de 0.5ml % de para-acetaldehído acuoso. En el momento de usar se agregó a cada muestra 0.8ml de esta mezcla. Se agitó e incubó a 37°C durante toda la noche (16hs). Al día siguiente se leyó la absorción a 595 nm.

Ensayo de proteínas

Se basa en el método de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall (101). Para los casos de fracciones subcelulares de tejido se hace el ensayo directamente.

Para las muestras de homogenatos (prepúberes) se agrega previamente a éste 1 volumen de NaOH 1N, se incuba 1 hora a 37°C y se prosigue con el ensayo, previa adición a las muestras standards con las cuales se hará la curva, de la misma cantidad de NaOH que contienen las muestras a medir.

Ensayo

5-10 µl de muestra

Se lleva a 0.200ml con buffer

Se agrega 1ml de solución C (50vol de 2% CO₃Na₂ en NaOH.

1N + 1vol 0.5% CuSO_4 en tartrato de sodio 1%)

Se esperan 10 minutos a temperatura ambiente.

Se agregan 0.1ml de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N.

Se espera 30 minutos y se lee a 700nm. Como patrón se utiliza una solución de albúmina sérica bovina de concentración conocida.

Incorporación de ^{14}C Timidina

Se prepararon cortes de tejido de animales de diferentes edades los que se incubaron por 8 horas a 35°C en medio 199, usando carbógeno como fase gaseosa y en presencia de 300.000cpm de ^{14}C Timidina (0.3uCi).

Transcurrido ese tiempo, el tejido fue lavado y homogeneizado en un homogeneizador vidrio-vidrio con 5 vol de medio 199 y se centrifugó a 800g para recuperar la fracción nuclear. Se agregó al precipitado 100ul de agua destilada, 100ul de TCA 10% y se esperó 30 minutos. Se centrifugó y resuspendió el taco en 1 vol TCA 5%. Se guardaron alícuotas para determinación de ADN.

El resto fue tratado con solubilizer, (Packard Instruments Co.) se agitó en un vortex y se le agregó 10ml de solución de tolueno centellante, contando luego la radioactividad incorporada en el ADN.

Ensayo de enzimas marcadoras de las distintas fracciones subcelulares

En los ensayos de localización subcelular de las enzimas, era necesario establecer el grado en que las distintas fracciones subcelulares estuviesen contaminadas entre sí. Para ello es que se recurrió a ensayos de enzimas específicas de una determinada organela, que se realizaron en todas las fracciones separadas por centrifugación estableciendo entonces el grado de contaminación que existe por ejemplo de microsomas en las mitocondrias, etc..

Como trazador nuclear se utilizó ADN, cuya técnica de determinación ya fue descripta.

Como trazador mitocondrial se recurrió a la Succínico deshidrogenasa para lo cual se utilizó el método adaptado de Pennington (102).

Consiste en agregar:

0.2ml Buffer fosfato de potasio 0.25M (pH7.4)

0.2ml Succinato de Na 0.5M

0.2ml Iodonitratetrazolium 0.5% (Sigma)

0.2ml Solución enzimática

Luego de incubar 30 minutos a 37°C, se detiene la reacción con una solución AcOEt/TCA/Etanol (5:1:5). Aparece un color rojo profundo que se lee a 490nm.

Citocromo-c NADPH oxidorreductasa es la enzima utilizada como trazadora microsomal. La técnica está adaptada de Avruch y Hoelzl (103) y otros (104,105).

5ul $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ (6.6umol/ml)
 1ml Tris 0.1M (pH: 7.4)
 5ul NADPH (13.5mg%.250ml Tris 0.1M)
 5-10ul Solución enzimática

Se lee la desaparición de NADPH a 340nm a los 30 minutos de incubación, respecto del tiempo inicial, y usando blancos adecuados. La reacción se detiene con MeOH y se diluye 5 veces la muestra antes de leer la absorbancia.

ENSAYO DE 5 α REDUCTASA

Para el caso de las fracciones subcelulares, 0.4ml de solución del taco resuspendido o citosol fueron agregadas a 1.6ml de Buffer pH 7.2 conteniendo $5 \cdot 10^{-4}$ M NADPH y aproximadamente 0.2 μ Cl de $^3\text{H-T}$. En el caso de incubarse cortes de tejido (50-150mg) se usa glucosa 1mg/ml en el medio de incubación. En todos los casos se agregó suficiente testosterona para lograr las concentraciones finales deseadas. Las incubaciones fueron a 34°C por 60 minutos con agitación, deteniéndose posteriormente la reacción con 3ml de acetato de etilo y se guardaron en frío.

Se agregaron cantidades conocidas de ^{14}C DHT y ^{14}C diol para seguir la recuperación de los productos de reacción obtenidos.

Extracción

Se hicieron 2 extracciones con 3ml de AcOEt cada una

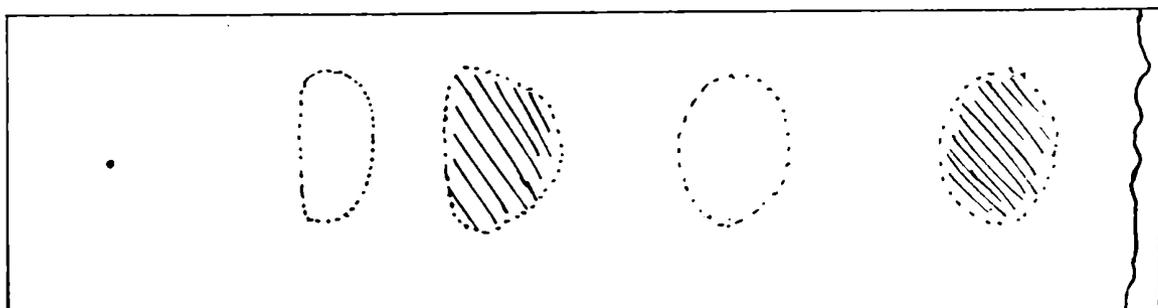
agitando con vortex cada vez. Se decantó o centrifugó separando la fase orgánica conteniendo los esteroides. Esta se evaporó a sequedad, y se resuspendió en el volumen mínimo necesario para la siembra cromatográfica correspondiente.

Separación de esteroides por cromatografía

Se utilizaron dos técnicas:

Para el estudio del efecto de la castración y reinducción de la enzima por andrógenos se utilizó la cromatografía en capa delgada de Silica-gel (113) usando como solvente Cloroformo/ Eter 4:1. A veces se necesitaron 2 corridas para separar nítidamente a los dioles. Al mismo tiempo que la muestra se sembró testosterona y androstenodiona, que se visualizan al UV por la absorción del grupo Δ 4-3 ceto.

En el siguiente esquema se puede visualizar la posición de los distintos esteroides separables por este método.



Siembra

dioles

T

DHT

Δ 4

Frente

La detección de las bandas se completó con un barrido del Scanner registrándose los diferentes picos radiactivos. Finalmente las 3 bandas (DHT, T y dioles) se eluyeron en columnas especiales con 2-3ml Cl_3CH /Metanol 2:1, el filtrado se evaporó a sequedad y se determinó la radiactividad utilizando un contador de centelleo líquido.

En el caso de las ratas prepúberes se separaron los esteroides por cromatografía en Celite.

Se mezcló cuidadosamente la Celite con 1 vol (p:v) de propilenglicol, hasta obtener una pasta homogénea y esponjosa, pasándose luego a llenar y compactar las columnas de 0.6cm de diámetro y 50cm de largo de manera de obtener una altura de llenado de 5cm. En la parte inferior se colocó un pequeño disco de Teflon poroso.

El diagrama de elución de las columnas fue el siguiente:

- 1) 10ml de Isooctano (Lavado)
- 2) 1ml solución muestra (disuelta en Isooctano)
- 3) 4ml Isooctano (lavado)
- 4) 4ml Isooctano (eluye androstenediona), (en nuestro caso esta se descarta.)
- 5) 6ml Isooctano/Tolueno (70:30) (Eluye DHT)
- 6) 2ml Isooctano/Tolueno (60:40) (Descartar)
- 7) 7ml Isooctano/Tolueno (60:40) (Eluye testosterona)
- 8) 8ml Tolueno puro (Eluye androstandiol)

La elución se llevó a cabo con ayuda de Nitrógeno a presión de manera de obtener un goteo de aproximadamente 15-20 go-

gotas por minuto y siempre a una temperatura de 20°C. Las recuperaciones obtenidas por este método oscilan entre 50 y 80%. Se evaporan a sequedad las 3 fracciones obtenidas y luego de agregar solución centellante se determina la radiactividad.

Acido Siálico

El término ácido siálico engloba a todos los derivados del ácido neuramínico, de los cuales el más importante es el ácido N-acetilneuramínico (NAN), aunque también existen en menores cantidad como N-glicolil o N, O, diacetil neuramínico.

El método de dosaje, basado en el de Leonard Warren (106) consiste en acoplar el producto de la oxidación del ácido neuramínico (B formil piruvato) con el ácido 2-tiobarbitúrico, detectándose luego la absorbancia del cromóforo formado.

a) Preparación de la Muestra. Hidrólisis

Porciones de 50mg de tejido epididimario, previamente pesadas en balanza de torsión, fueron homogeneizadas con 0.500ml de agua destilada en homogeneizador vidrio-vidrio.

Luego de guardar alícuotas para la determinación de proteínas totales, se agregó igual volumen de H_2SO_4 0.25N en solución salina, y se calentó a 80°C durante 60 minutos. Estas condiciones son consideradas óptimas para la hidrólisis de los ácidos siálicos.

b) Oxidación

Se dejó enfriar, y se agregó a cada muestra 0.100ml de solución 0.025M de metaperiodato de sodio en 0.125N de H_3PO_4 . Se agitó y luego de esperar 20 minutos se agregó 1ml de solución de AsO_2Na 2% en solución 0.5M a Na_2SO_4 y 0.1N de H_2SO_4 para eliminar el exceso de periodato. Se esperan 5 minutos.

c) Ensayo del Tiobarbitúrate

Se agregan 2 ml de solución de ácido tiobarbitúrico 0.6% en Na_2SO_4 0.5M. Luego de agitar se calienta en baño de agua hirviendo durante 15 minutos, tapándose los tubos con bolitas de vidrio. En ese lapso aparece un color rosa límpido. Se deja enfriar y se agregan 2ml de ciclohexanona, agitándose vigorosamente.

Dicho solvente extrae el compuesto coloreado intensificando su color y aumentando por lo tanto apreciablemente la sensibilidad del método.

d) Determinación de la Absorbancia

Se toma 1 ml de la fase orgánica, en la que se lee la absorbancia a 532nm y 562nm. La curva patrón se prepara en cantidades conocidas de N-acetil-neuramínico.

Como los deoxiazúcares interfieren parcialmente con el ensayo, se hizo también un espectro de absorción de la deoxi-glucosa simultáneamente al del NAN, estableciéndose respectivamente dos picos de absorción: para la deoxiglucosa:

532nm; para el NAN: 562 nm.

Los blancos contra los cuales se leyó cada muestra consistieron en 0.5 ml de agua, a los cuales se agregaron los diferentes reactivos procesándolos como las muestras.

e) Cálculos

Con los datos de las lecturas se calculó la cantidad de NAN correspondiente a cada alícuota según la fórmula

$$\{ \text{NAN} \} = \frac{DO_{562} - DO_{532} B}{(1 - AB) \epsilon_2} \cdot V$$

donde

NAN = nmoles de ácido N-acetil neuramínico

DO_{562} = absorbancia a 562nm

DO_{532} = absorbancia a 532nm

$$A = \frac{\epsilon_1}{\epsilon_2} \quad B = \frac{\epsilon_4}{\epsilon_3}$$

ϵ_1 = coeficiente de extinción molecular de NAN a 532nm

ϵ_2 = coeficiente de extinción molecular de NAN a 562nm

ϵ_3 = coeficiente de extinción molecular de deoxiglucosa 532nm

ϵ_4 = coeficiente de extinción molecular de deoxiglucosa 562nm

Asimismo la cantidad de deoxiglucosa se puede calcular como

$$\{ \text{Deoxiglucosa} \} = \frac{DO_{532} - DO_{562} A}{(1 - AB) \epsilon_4}$$

Todos estos cálculos se hicieron programando adecuadamente una mini-computadora Hewlett-Packard 25.

Determinación de glicerilfosforil Colina

El método utilizado está basado en el descrito por I. G. White (107) y J. F. Ryley (108).

a) Preparación de los tejidos

Los epidídimos de cada lote se pesaron en conjunto, y se homogeneizaron con un Polytron durante 40 segundos, sobre hielo con 3 volúmenes de solución fisiológica. De estos homogenatos se sacaron alícuotas de 200 a 400 μ l guardándose el resto para determinación de proteínas totales. Conjuntamente se tomaron distintas alícuotas de solución patrón de glicerol, de manera que las concentraciones finales estuvieran en el rango de 0.3 a 3 μ g/ml, para establecer la curva patrón.

A todos estos tubos se agregó:

0.5ml $ZnSO_4$ (5%) y 0.5ml $Ba(OH)_2$ 0.3N como agente precipitante de proteínas.

Se centrifugó por 15 minutos a 1000rpm. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 400 μ l

b) Oxidación

Se tratan las muestras con:

- 1) 200 μ l de H_2SO_4 2N
- 2) 50 μ l de sol. $NaIO_4$ 0.1M

Se esperar on 5 minutos

- 3) 200 μ l $AsO_2 Na$ (13.13%) p/v

Se esperaron 10 minutos. Se agregó 1,00ml H_2O .

c) Ensayo con ácido cromotrópico

Se tomaron alícuotas de 200 μ l por duplicado y se les agregó 2 ml de solución de ácido cromotrópico (1.08g disuelto en 100 ml de H₂O más 450 ml de H₂SO₄ (65% v/v)).

Se calentó en baño de agua hirviendo por 30 minutos con lo que aparece un color púrpura intenso cuya absorbancia se lee a 556 nm.

d) Lectura

A diferencia de los datos bibliográficos, el máximo de absorción del cromógeno resultó ser 556 nm y no 580nm Se investigó la interferencia de glucosa en la determinación de GPC pero se llegó a la conclusión que en las condiciones utilizadas dicha interferencia no sobrepasaba el 5% de la absorbancia de la GPC.

Determinación de Zn por absorción atómica

Generalidades:

Es un método sumamente sensible capaz de detectar cantidades del orden de nanogramos del elemento en cuestión.

Se debe obtener el metal en estado de vapor atómico, lo cual se logra vaporizando la solución de muestra sobre una llama oxidante (generalmente de aire-acetileno) y produciendo luego transiciones electrónicas del metal mediante procesos excitatorios propios de una lámpara de cátodo hueco.

a) Preparación de muestras y soluciones standards

Se hizo una solución patrón pesando 0.500g de Zn metálico y disolviéndolo en el mínimo volumen de HCl que luego se diluyó a un litro con HCl 1% (v/v). A partir de esa solución se hicieron diluciones para lograr concentraciones de 0.5ug/ml que se usan como testigo.

Los tejidos a analizar (epidídimos y testículos) se limpiaron y se separaron en porciones de aproximadamente 100mg, que se pesaron cuidadosamente.

Se homogeneizaron en agua bidestilada, se guardaron alícuotas de 0.5ml para determinar proteínas, y los 2ml restantes se sometieron a la técnica "Wet Ashing" para destruir la materia orgánica.

A cada homogenato se le agregó 1ml de mezcla $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (1:1) v/v y se calentó hasta ebullición durante 2-3 horas. Al cabo de este tiempo se verificó que la solución resultante fuera límpida y sin restos de tejido alguno. Se dejó enfriar y se llevó a 10.00ml con agua bidestilada en matraces aforados.

Al mismo tiempo se preparó un blanco consistente en H_2O bidestilada con el agregado de $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$. Este se sometió, al igual que la muestra testigo, al calentamiento y dilución a 10ml con agua bidestilada.

Las muestras así preparadas se sometieron a la determinación de Zn por triplicado en el espectrómetro de absorción

atómica que funciona en el Instituto de Neurobiología (Servicio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Radioinmunoensayo

a) Obtención del Antisuero siguiendo la técnica de Purvis, Calandra y coll. (109)

Se preparó primeramente un conjugado de testosterona-albúmina sérica bovina (BSA) acoplando el derivado carboximetiloxima de la testosterona a la albúmina (224). Este conjugado emulsionado en adyuvante de Freund se administró por vía subcutánea a los conejos con intervalos de dos semanas. El antisuero formado, fue diluido adecuadamente (1:100) y se conservó en frío.

b) Preparación de las muestras

Obtención del tejido

Las muestras de tejido epididimario, de no más de 250mg, se extrajeron rápidamente del animal y se pesaron sumergiéndolas inmediatamente en acetona para evitar la metabolización de los andrógenos, poniéndolas posteriormente a congelar a -70°C hasta su procesamiento.

c) Extracción de los andrógenos

Luego de descongelar los tejidos, se homogeneizaron con 5 ml de acetona, agregando al mismo tiempo 3000cpm de cada esteroide (H^3 , T, DHT, diol) para evaluar las pérdidas durante

el procesamiento. Se esperaron diez minutos y se centrifugó a 2000 rpm durante diez minutos. Todas estas operaciones se llevaron a cabo a 4°C.

Luego se continuó a temperatura ambiente. La acetona fue traspasada a tubos cónicos dividiendo cada muestra en dos partes. Se evaporó a sequedad, se retomó el extracto en 1 ml de agua, se calentó por diez minutos a 50-60°C y se agitó durante un minuto con un agitador "Vortex".

Se agregó luego 10 ml de éter, se agitó durante dos minutos y se congeló en mezcla de hielo seco/acetona. Se extrajo la fase etérea y luego de evaporarla se retomó el extracto con 1.4 ml de metanol; se agitó por un minuto y se agregó 0.6 ml de agua, volviéndose a agitar un minuto.

A esta mezcla se le agregaron 2 ml de hexano para extraer lípidos que pueden interferir. Luego de extraer, se descartó el hexano y se agregó 6 ml de cloruro de metileno, agitándose 2 minutos. Se recogió la fase de Cl_2CH_2 y se evaporó a sequedad.

Finalmente, se retomó el extracto en 1 ml de isooctano, se guardaron 100 μ l para evaluar la recuperación, (que usualmente oscila en un 60-70%), y en el resto se practicó la separación de los esteroides por cromatografía en Celite según el método ya descrito antes.

Los eluidos de las columnas se evaporaron a sequedad y se retomaron en 1 ml de buffer Abraham (Para 11: 10, 8gr

$\text{PO}_4\text{Na}_2 \cdot \text{H}_7\text{H}_2\text{O}$; 4,7g $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NaH}_2\text{O}$; 1% Azida Sódica; 9g ClNa ; 3,72g EDTA; 1g gelatina; llevado a pH_7 con OHNa 10N) calentándose a $50-60^\circ\text{C}$ por quince minutos y agitando cada tubo dos minutos. Los tres esteroides quedaron así listos para ser analizados por el RIE.

d) Radioinmunoanálisis

Curva de titulación del Antisuero. La curva standard se preparó con cantidades de esteroide no marcado en un rango de 12.5 a 400pg. Los resultados se graficaron logarítmicamente, utilizando la recta más probable calculada por el método de cuadrados mínimos (regresión). El r^2 fue 0.97 para la curva de DHT y 0.98 para la curva de T.

Ensayo

Se trabajó en un volumen final de 0.3ml que consiste de:

- a) 100 μl de solución ^3HT (5000 dpm) en buffer.
- b) 100 μl de muestra (o solución standard) en buffer.
- c) 100 μl de antisuero (1:750)

Para el punto correspondiente al "inespecífico": 200 μl buffer, 100 μl ^3HT .

Luego de agitar bien se dejó incubar esta mezcla 16 horas a 4°C , y luego se separó el esteroide no unido al antisuero mediante el agregado de 200 μl de solución de carbón activado/1.25% gelatina en buffer. Se esperó diez minutos, se centrifugó diez minutos a 2000 rpm recuperándose el sobrenadante

(fracción unida). Dicho sobrenadante se recogió en viales conteniendo 10 ml de solución de tolueno centellante. Se taparon bien los tubos y se calentaron 30 minutos a 60°C, agitándose luego con un Vortex 45 segundos cada uno.

De esta manera se obtiene una máxima eficiencia para el conteo, ya que la fracción unida (acuosa) es muy poco miscible en el tolueno.

Cálculos

- 1) Se restó el "inespecífico" a cada punto.
- 2) Se hicieron los promedios de los cuadruplicados.
- 3) Se sacó el porcentaje de unión del punto "0" =
$$\frac{\text{cpm } 0 \times 100}{\text{cpm "0"}}$$
- 4) Se calcularon los demás puntos, tanto de la curva de calibración como de las muestras incógnitas:

$$\% \text{ unión} = \frac{\text{cpm} \times 100}{\text{cpm "0"}}$$

- 5) Se construyeron las curvas y se leyeron los pg de las muestras.

Electroforesis analítica de proteínas específicas de epidídimo

(PEE) (110)

A) Preparación del citosol

El sobrenadante de la centrifugación a 105.000xg se utilizó para el análisis de las proteínas de la fracción soluble de las

células epididimarias.

Se sacaron alícuotas de los citosoles y se determinaron proteínas totales por el método de Lowry y col. (101).

B) Fraccionamiento proteico en geles de poliacrilamida laminares.

La técnica se basó en las de Ornstein (111), y Davies (112), preparándose geles planos de 3 mm de espesor, 100mm de largo y 89mm de ancho, que permitieron analizar hasta 8 muestras en un mismo gel, garantizándose así mayor reproducibilidad. Se utilizó un peine acrílico para formar los depósitos de las muestras.

El buffer de corrida fue Tris 5mM glicina 42mM, los geles se corrieron a voltaje constante (450 voltios) por 23 minutos.

Se tiñeron posteriormente con una mezcla compuesta por Coomassie Blue, al 2% (diluyente: 200ml MeOH, 50 ml AcOH, 750 ml H₂O) durante 18 horas.

Se destiñeron con sucesivos cambios de decolorante (AcOH 50ml MeOH 200ml H₂O 1000) evidenciándose entonces las distintas bandas.

Composición de los geles de poliacrilamida

$$T = \frac{a \cdot b}{m} \cdot 100$$

a = masa de acrilamida (g)
 b = masa de bisacrilamida (g)
 m = volumen total

$$C = \frac{a}{a+b} \cdot 100$$

Buffer Tris (HCl) 5.96g

HCl 1N 48ml

H₂O csp 100ml, pH= 6.7

| Reactivos | Gel Separador T= 7% C=3% | Gel espaciador T=3% C=20% | Gel al 3% T=3% C=3% |
|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------|
| Acrilamida 15% | 2ml | 1.5ml | 0.56ml |
| Bisacrilamida 1% | 0.9ml | 0.4ml | 0.036ml |
| Mercaptoetanol 0.14M | 0.05ml | - | - |
| Persulfato 7.4% | 0.04ml | - | 0.04ml |
| Temed | 0.002ml | 0.002ml | 0.002ml |
| Sacarosa 40% | - | 2ml | - |
| Riboflavina 4%mg | - | 0.5ml | - |
| Buffer dil 1:10 | 0.8ml | 0.5ml | 0.8ml |
| H ₂ O csp | 4ml | 4ml | 4ml |

Procesamiento de los datos:

Los datos obtenidos por duplicado, triplicado o cuadruplicado, según los casos tienen calculado el error standard (SE)

$$= \frac{S}{\sqrt{n-1}} .$$

Cuando fue necesario se utilizó el test de Student para determinar diferencias significativas en base a $p < 0.05$.

Los cálculos de actividad enzimática, ácido siálico, glicerilfosforilcolina, etc., fueron hechos en base a programas en mini-computadora HP 25.

RESULTADOS

1º Parte

Plan

Andrógeno-dependencia de la 5 α -reductasa epididimaria de la rata adulta.

- I) a. Localización de la actividad de 5- α -reductasa en el epidídimo de rata adulta.
b. Determinación de la pureza de las fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial.
- II) Efecto de los andrógenos sobre el trofismo de sus órganos efectores.
- III) Efecto de la castración sobre la actividad in vitro de la 5 α -reductasa epididimaria de rata adulta.
- IV) Efecto del tratamiento con propionato de testosterona (TP) sobre la actividad in vitro de la 5 α reductasa epididimaria de animales castrados.

RESULTADOS

- I) Localización de la actividad de la 5 α -reductasa epididimaria de rata adulta. Determinación de la pureza de las fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial.

En los experimentos iniciales se estudió la distribución subcelular de la actividad de la enzima 5 α reductasa en el epidídimo de la rata. En la Figura 1a se han graficado los resultados de estos experimentos utilizando el gráfico de Van der Vusse (105) en el que en la ordenada se representa el valor de la relación % de la actividad 5 α reductasa total/% de la proteína total que corresponde a cada fracción y en la abcisa se representa el valor acumulativo de proteína de cada fracción. En este tipo de gráfico, la altura de la barra indica la actividad específica de la fracción mientras que el área de la misma representa la actividad total.

La figura 1a indica que la mayor actividad in vitro de la 5 α reductasa se encuentra en las preparaciones microsomales y nucleares, con una actividad específica relativa de 43% y 42% respectivamente, lo que confirma resultados anteriores obtenidos en este laboratorio (113), así como los de Vreeburg y Scholte (114).

Las figuras Ib, c, d ilustran , utilizando el mismo tipo

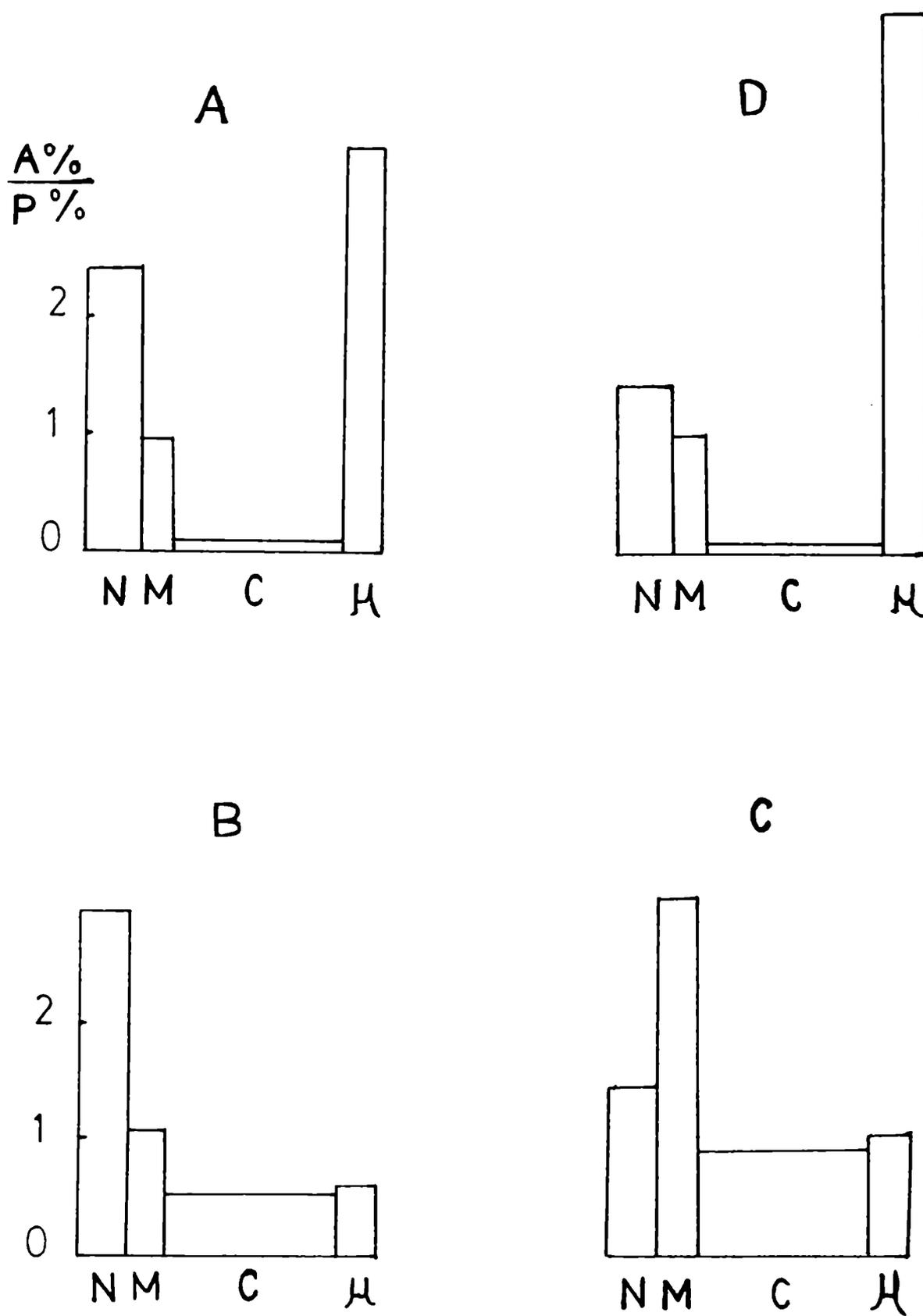
FIGURA I : Determinación de la pureza de las fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación. Localización de la actividad de la 5α -reductasa epididimaria de rata adulta.

- A) Actividad de 5α -reductasa
- B) Contenido en ADN
- C) Actividad de succínico deshidrogenasa
- D) Actividad de NADPH-cit c reductasa

Los resultados están expresados en % de la actividad total (en pmoles o densidades ópticas según cada caso), por % de proteína de cada fracción, en función del % de proteína:

($A\%/P\%$ versus %P)

FIGURA I



de gráfico, la distribución relativa de los trazadores nucleares (contenido en ADN), mitocondriales (actividad de succínico deshidrogenasa), y microsomales (actividad de la NADPH-citocromo-c reductasa).

La actividad de la 5α reductasa exhibida por la fracción mitocondrial (11% del total) y citosoluble (4%), puede adjudicarse, como lo muestran las figuras b, c, d a la contaminación por otros componentes subcelulares (microsomas y membranas nucleares).

En cambio, si bien la fracción nuclear cruda exhibe cierta actividad de marcador microsomal, se verifica actividad de 5α reductasa intrínseca en dicha fracción, lo cual está de acuerdo con trabajos de otros autores (115). De todas maneras, conviene tener en cuenta la probable intervención de partículas del retículo endoplasmático en los pellets de 800g para la 5α reducción de la T, como lo sugirió Yoshizaki, (70).

II) Efecto de los andrógenos sobre el trofismo de sus órganos efectores.

Para corroborar la efectividad de los tratamientos hormonales a los que se sometieron los distintos lotes, se registraron las variaciones de peso de diversos órganos efectores de andrógenos: epidídimo, próstata y vesículas seminales

y, en el caso del epidídimo, también el contenido proteico total y específico.

Los resultados se muestran en la Tabla 1. La castración por 30 días reduce en un 75% el peso del epidídimo y vesículas seminales y en un 82% el de la próstata. El tratamiento con andrógenos por sólo 2 días produce aumentos significativos en este parámetro, que se hace más marcado con tratamientos más prolongados.

De estos datos se deduce que los tratamientos fueron altamente efectivos en las dosis y tiempos utilizados. Cabe señalar que el peso del epidídimo de los animales intactos incluye un 40% del peso húmedo en espermatozoides.

Aún así, la diferencia real entre normales y castrados es: $444 - 184 = 260$ mg, que sigue siendo significativa.

III) Efecto de la castración sobre la actividad de la 5α - reductasa epididimaria de rata adulta.

La castración produjo una disminución progresiva de la actividad in vitro de la 5α -reductasa microsomal (Figura IIa) y nuclear (Figura IIb).

La actividad enzimática alcanzó su nivel mínimo 14 días luego de la castración, donde sólo se detectó el 13% y 14% de la actividad del control para las fracciones microsomas y nucleares respectivamente.

TABLA 1 Efecto de los andrógenos sobre el trofismo de
los órganos efectores.

TABLA 1

| Tratamiento | PESO HUMEDO DE LOS ORGANOS | | | PROTEINAS TOTALES EPIDIDIMARIA | | | | | |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------|------------|--------------------------------|--------------------|------------------------------|------|------|-----|
| | Próstata | V. seminal | Epididimos | mg p/organó | mg10-2/ mg tej. | proteínas nucleares, (ug) | | | |
| RATA INTACTA (90 días) | 220 | 21.8 ^a | 270 | 25.6 | 740 | 14.5 | 10.6 | 2.87 | 353 |
| RATA CASTRADA (30 días) | 39 | 5.0* | 67 | 2.9* | 184 | 8.2* | 1.8 | 1.98 | 33 |
| CASTRADA 30 días + 2 días T | 76 | 8.2** | 129 | 3.9** | 290 | 5.4** | 3.9 | 2.73 | 40 |
| CASTRADA 30 días + 4 días T | 112 | 18.6** | 141 | 17.5** | 373 | 14.5** | -- | -- | 85 |
| CASTRADA 30 días + 8 días T | 147 | 21.7** | 231 | 39.4** | 424 | 32.2** | 7.4 | 3.50 | 194 |
| CASTRADA 30 días + 12 días T | 221 | 11.2** | 291 | 37.4** | 457 | 36.5** | 6.9 | 3.05 | 206 |

a* promedio ES

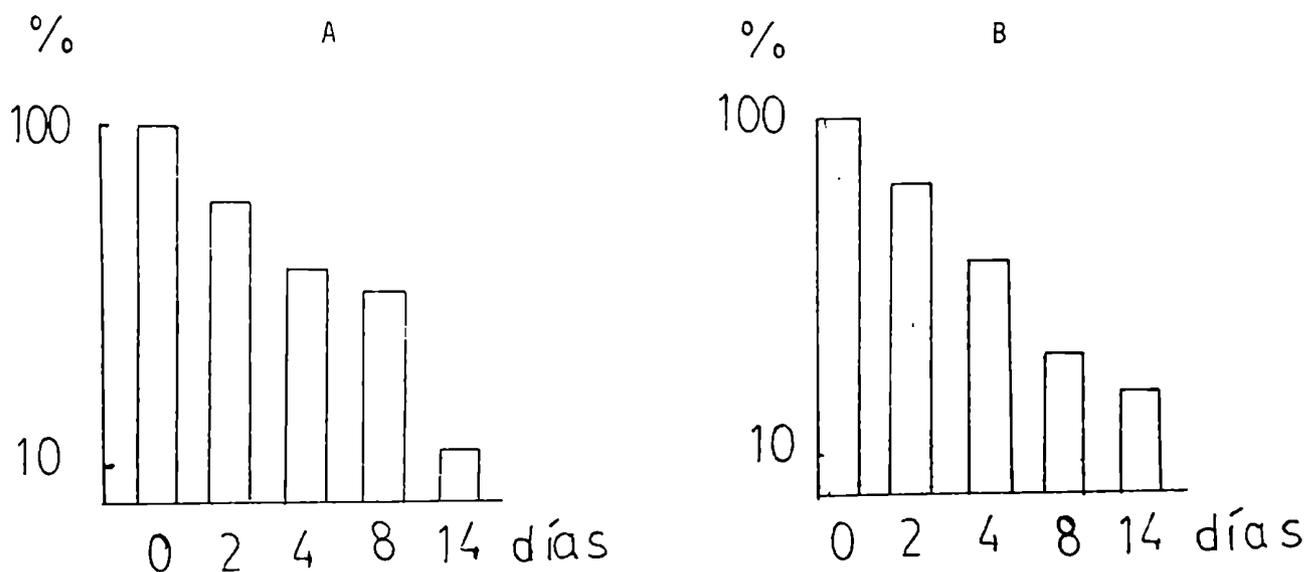
* = p 0.01 respecto de lote ratas intactas

** = p 0.01 respecto de lote castradas 30 días

FIGURA II Efecto de la castración sobre la actividad de la 5α -reductasa epididimaria de la rata adulta:

A) Fracción Microsomal

B) Fracción Nuclear



Los resultados se expresan como porcentaje de actividad (pmoles 5α -reducidos/mg proteína.hora) del control intacto (0) en función del tiempo (en días) a partir de la castración.

Es de hacer notar que períodos más largos de castración (30 días) no traen aparejados descensos proporcionales en la actividad de 5α -reductasa, mientras que tan sólo dos días de castración bastan para disminuir sensiblemente su actividad. ($P < 0.005$)

La Tabla 2 muestra el efecto de la castración sobre el peso del epidídimo, el contenido proteico total de las fracciones nucleares y microsomales, y la actividad enzimática, expresada como nanomoles de productos 5α reducidos/órgano, hora.

Cabe destacar que mientras el decrecimiento en la actividad específica (Figura II) fue un proceso gradual (14%, 38.5%, 62.5% y 83% para la preparación nuclear luego de 2, 4, 8 y 14 días de castración respectivamente), la caída de la actividad total (Tabla 2) fue mucho más abrupta (66%, 83%, 94% y 98% para el citado lote), y que además excedió en cada caso la correspondiente caída en peso del órgano, o la del contenido proteico total de la fracción considerada.

IV) Efecto del tratamiento con propionato de testosterona sobre la actividad de la 5α -reductasa epididimaria de animales castrados.

TABLA 2

| Tiempo luego de la castración (días) | Peso de los Epididimos (mg) | NUCLEOS | | MICROSOMAS | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|----------------|---------------------------------------|----------------|---|-------|-----|
| | | Proteínas (ug) | Actividad total (nmoles/órgano. hora) | Proteínas (ug) | Actividad total (nmoles/órgano. hora) IDS (n=5) | | |
| 0 | 370 | 291 | 116.4 | 12.1 | 375 | 103.9 | 9.5 |
| 2 | 154 | 118 | 39.3 | 7.66 | 100 | 33.7 | 6.1 |
| 4 | 156 | 78 | 19.5 | 4.87 | 53 | 17.3 | 3.5 |
| 8 | 125 | 43 | 6.6 | 1.58 | 26 | 7.2 | 2.1 |
| 14 | 100 | 40 | 2.2 | 0.64 | 24 | 1.82 | 0.9 |
| 30 | 90 | 33 | 1.48 | 0.2 | - | 1.1 | 0.3 |

Efecto de la castración sobre el peso húmedo del epidídimo y contenido proteico de las fracciones nucleares y microsomales. Actividad total (por órgano) de la 5 reductasa.

TRATAMIENTOS

| LOTE | Tiempo de castración (días) | Tratamiento con Andrógeno (días) |
|-----------------|--------------------------------|--|
| Castrado | 30d | — |
| Mantenimiento | 30d | 30d |
| Reinducción 5d | 35d | 5d |
| Reinducción 20d | 50d | 20d |

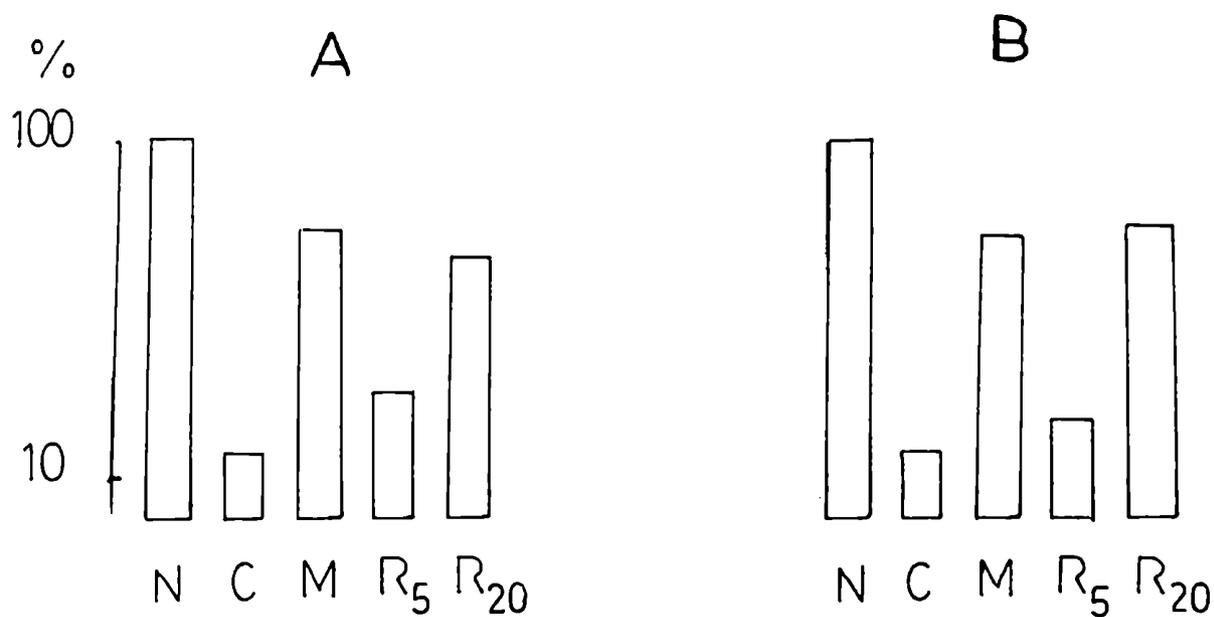
La fuerte caída de la actividad enzimática in vitro causada por la castración (82%, Figura III), fue anulada mediante administración inmediata y continuada de testosterona a los animales orquitectomizados (lote "Mantenimiento").

Sin embargo, el tratamiento por 5 días con andrógeno, iniciado a los 30 días luego de la castración (lote Reinducción 5 días), no logró revertir la caída de la actividad enzimática en grado significativo. En cambio, al extenderse la terapia hasta 20 días (lote Reinducción 20 días), dicha actividad volvió a los niveles detectados en el lote Mantenimiento.

Una vez establecido que la testosterona podía ser efectiva para reinducir la actividad de la 5 α reductasa disminuida por la orquitectomía, se diseñaron experimentos para estudiar la cinética de dicha reinducción.

Para ello, se inyectaron diariamente 200ug de propiona-

FIGURA III Efecto del tratamiento con testosterona sobre la actividad in vitro de la 5 α -reductasa epididimaria de animales castrados. A)Fracción Microsomal,B)Fracción Nuclear



Los resultados están expresados según descripto en Fig II.

to de testosterona (TP) disuelto en aceite vegetal por vía subcutánea, a ratas castradas 30 días antes, por tiempos variables: 2, 4, 8 y 12 días.

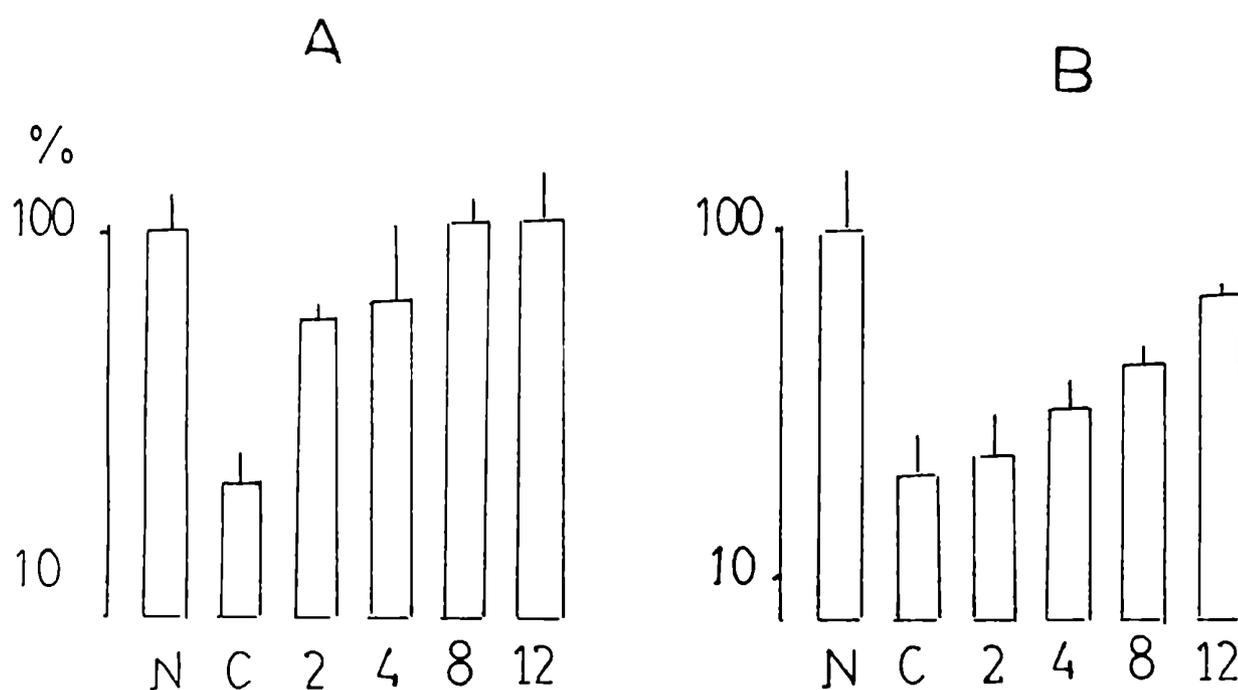
Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo entre 24 y 36 horas luego de la última inyección, con el objeto de permitir la eliminación del esteroide inyectado de los tejidos a estudiar.

La figura IV ilustra el efecto de esta terapia de reemplazo con TP sobre la actividad de la 5α -reductasa. La enzima nuclear (A) muestra un decrecimiento del 63% luego de la castración, que se va revirtiendo conforme se alarga el tiempo de tratamiento, hasta alcanzar un 83% de su valor control a los 12 días de terapia.

La enzima microsomal (Figura IV B) parece reaccionar más rápidamente, ya que sólo 2 días de tratamiento duplican su actividad, que llega a valores control luego de 8 días de suministro de hormona.

Cuando se analizan los efectos de la terapia con andrógenos en términos de actividad total de la fracción nuclear, se encuentra que la castración redujo su valor a sólo 3.5% del control, y que si bien el tratamiento androgénico produce una recuperación visible de este parámetro, 12 días de tratamiento sólo logran restablecer un 49% de la actividad anterior.

FIGURA IV. Cinética de la reinducción de la actividad in vitro de la 5α - reductasa en el epidídimo de ratas castradas: por tratamiento con testosterona. A) Fracción Microsomal, B) Fracción Nuclear.



Los resultados se expresan como descripto en la Figura II.

DISCUSION

1º Parte

(Andrógeno-dependencia de la 5 α -reductasa epididimaria de la rata adulta.)

Hemos destacado anteriormente la fundamental importancia de la 5 α -reducción de T en los tejidos efectores de andrógeno como el epidídimo, ya que se transforma así una pre-hormona en el andrógeno verdaderamente activo (DHT).

Esto ha tornado imprescindible caracterizar las propiedades de la enzima que cataliza dicha metabolización (115, 71, 113), e intentar dilucidar sus posibles mecanismos de control.

Los ensayos para aislar y solubilizar la 5 α -reductasa han sido hasta el presente infructuosos (115), o bien poco confiables, como ocurre para muchas enzimas ligadas a membrana (156, 157).

Esto dificulta o incluso imposibilita encarar ciertos estudios enzimáticos que requieran la constancia de determinados parámetros mientras se varía otro, así como cuantificaciones exactas de la enzima en un tejido dado.

Por consiguiente, los estudios de la 5 α -reductasa se restringieron por ahora a sistemas in vitro relativamente crudos, y a estudios in vivo, que si bien tienen la ventaja de ser más fisiológicos, limitan por otro lado el grado de refinamiento o exactitud de la información alcanzable, especialmente bajo

el punto de vista molecular.

Los experimentos descriptos en la primera parte de este trabajo tienden a ilustrar el efecto estimulatorio de los andrógenos sobre la actividad enzimática medida "in vitro".

A grandes rasgos, se ha visto que la 5α -reductasa epididimaria disminuye paulatinamente su actividad después de la castración, y esta caída es prevenida si se mantiene el animal castrado con inyecciones diarias de andrógeno.

Los efectos de la deprivación de andrógeno son incluso revertibles por una adecuada terapia hormonal.

Existen numerosas evidencias acerca de una regulación fisiológica de la 5α -reductasa de diversos tejidos, mediada por hormonas.

La actividad de la enzima prostática es reducida apreciablemente por la castración (92, 93), siendo este efecto prevenido por la administración de andrógenos (94, 158, 159). La enzima renal no parece afectada por estos tratamientos (162), mientras la hipofisaria aumenta su actividad "in vitro" luego de la castración (94, 159, 160).

Esta regulación no está tampoco limitada a los órganos blanco de andrógenos, ni éstos son los únicos involucrados en la regulación de la 5α -reducción.

La enzima hepática, por ejemplo, que tendría principalmente funciones degradativas al derivar cierta cantidad de esteroides hacia formas biológicamente inactivas, es influenciada

por la hormona tiroidea (98), los corticosteroides y los estrógenos (161).

En cuanto a la reductasa epididimaria, nuestros resultados confirman la andrógeno-dependencia descrita por los autores citados en la introducción (95, 96, 97), si bien discrepan con determinados aspectos de la misma.

Djøseland (95) encontró por ejemplo un decrecimiento del 34% y 45% en la formación de metabolitos 5α -reducidos en el epidídimo de ratas castradas por 1 y 14 días respectivamente.

Nuestros ensayos indicaron en cambio una caída del 17% y 86% para tiempos de castración similares, sugiriendo un efecto más gradual de la ausencia de andrógeno sobre la actividad enzimática, así como de consecuencias más dramáticas a largo plazo.

En cambio, sus resultados coinciden prácticamente con los nuestros en lo que respecta a la recuperación de la actividad 5α -reductora de animales castrados tratados diariamente con 150ug de propionato de testosterona (95).

Al respecto, cabe señalar que Robaire et al (96), trataron a los animales castrados con implantes de testosterona a dos dosis durante 4 semanas, y no lograron mantener la actividad de la 5α -reductasa nuclear epididimaria.

Esta discrepancia con nuestros resultados, así como con los de Djøseland (95) y Moore y Wilson (158), podrían quizás

explicarse en base a las dosis utilizadas por estos autores, mayores que las usadas en este estudio, así como al tipo y duración del tratamiento. Es sabido que la utilización de implantes proporciona una secreción artificial constante de esteroide, y no por pulsos como las producen los tratamientos por inyección subcutánea

Cabe preguntarse, si cambios de este tipo respecto de la producción fisiológica de T por el testículo (que evidenció ritmos circadianos), no provocan respuestas notablemente distintas en los órganos efectores, y también consecuencias a nivel de los mecanismos de secreción de gonadotrofinas, con sus eventuales implicancias en la metabolización de esteroides (167).

Cierta evidencia obtenida recientemente en nuestro laboratorio (C. M. Lubicz-Nawrocki, comunicación personal) indica que la estimulación androgénica de la 5α -reductasa requiere dosis relativamente bajas de andrógenos, 25 a 50 ug de TP/ 100g de peso, que incluso son insuficientes para reponer el peso del órgano, y que el uso de dosis mayores provoca una disminución de los efectos

En nuestros estudios, sin embargo, no fue posible discriminar ambos efectos, ya que la dosis de TP utilizada alcanzó para recuperar ambos parámetros a los dos días de tratamiento para ratas castradas 30 días antes (Tabla 1, Figura IV).

Sería por consiguiente de interés, establecer una curva dosis-respuesta, tanto para la recuperación de la 5α -reductasa como

del trofismo del órgano.

En lo que se refiere al mecanismo por el cual actuaría la testosterona para ejercer este control positivo sobre la actividad de la 5α -reductasa, se sugieren las siguientes posibilidades:

- a) Que la T actúe como efector (modulador positivo) de la enzima.
- b) Que la T estimule la síntesis de un efector.
- c) Que la T induzca la síntesis "de novo" de la enzima.
- d) Que la T modifique la vida de la enzima o la de su efector positivo, actuando a nivel de los mecanismos de degradación.
- e) Que la T garantice determinadas condiciones de las membranas a las cuales se halla asociada la enzima, incidiendo así sobre sus propiedades catalíticas o el acceso del sustrato.

Se puede descartar la posibilidad a) ya que no fue posible revertir la actividad de la enzima en el epidídimo del animal castrado mediante la pre-incubación con T "in vitro", incluso a concentraciones supra-fisiológicas (163).

Tampoco parece existir ningún factor, al menos en el citosol epididimal, que estimule a la 5α -reductasa microsomal, ya que la incorporación de alícuotas de citosol normal o de animal castrado y tratado con andrógeno al ensayo enzimático, no revierte la disminución de actividad observada in vitro en el animal castrado (164).

Quedan por lo tanto las posibilidades c), d), y e). Las dos primeras requieren técnicas de aislamiento y cuantificación de la enzima que, como hemos visto antes, no están todavía a nuestro alcance.

El punto e) no se contrapone en realidad con los demás, y es interesante destacar que Charreau y Salmoral (165) demostraron que tratamientos in vitro de las fracciones subcelulares, conteniendo actividad 5α -reductora, con fosfolipasas A y C inhibían esta actividad. Los autores atribuyen este efecto a la hidrólisis de los fosfolípidos constituyentes de la membrana, a la cual también se encuentra ligada la enzima. Esta, al alterarse la membrana, se inestabilizaría de alguna forma, disminuyendo su capacidad metabolizadora de T.

Esta eventual incidencia de los fosfolípidos está reforzada por el hecho de que existen alteraciones de éstos por desbalance andrógeno (166), lo que explicaría, al menos en parte, la disminuída 5α -reducción evidenciada in vitro en los animales castrados. También pondría de manifiesto el requerimiento de estructuras intactas, en lo que concierne a las membranas, para su adecuado funcionamiento (165).

Respecto a la alteración de otros factores intracelulares relacionados con la 5α -reducción, podemos mencionar la de su cofactor.

En efecto, y al igual que otros pasos metabólicos, el camino de las pentosas (y por lo tanto los niveles de NADPH) ha mostrado ser andrógeno-dependiente en el epidídimo (89) disminuyendo luego de la castración, por ejemplo. Esto podría explicar la menor formación de compuestos reducidos al ser bajo o nulo el aporte de T, pero dicho efecto debería desapa-

recer en los ensayos in vitro en los cuales, según se vio, se adicionó NADPH 5.10^{-4} M a las fracciones subcelulares a incubar.

Por lo tanto, se puede descartar que la actividad de la 5α -reductasa, disminuída por la castración, se deba a la caída de este cofactor, si bien esta disminución in vivo probablemente contribuya a dificultar más aún las 5α y 3α -reducciones.

Hasta ahora, siempre hemos hablado de la testosterona como estimuladora de la actividad 5α -reductora. En realidad, no se sabe si esta estimulación es ejercida directamente por la hormona sustrato, o bien por su(s) producto(s).

El mecanismo clásico de acción hormonal implica, como se vio antes, la conversión de T a DHT, la unión específica de ésta a los receptores y finalmente la translocación al núcleo e interacción del complejo receptor-hormona con la cromatina.

Por lo tanto, es probable que la testosterona inyectada a las ratas castradas se convierta primero en DHT en los órganos blanco, mediante la acción de la 5α -reductasa remanente, y que el producto formado estimule luego la actividad enzimática por alguno de los mecanismos postulados anteriormente, muy posiblemente vía receptor.

En cuanto al sentido último de esta regulación positiva por parte del andrógeno sobre su enzima metabolizadora, lo podemos analizar primeramente por sus efectos a nivel del órgano

donde se produce.

Asumiendo siempre que la DHT es la hormona realmente activa (68,77,78), una buena actividad 5α -reductora resultará de una adecuada provisión de sustrato, y, el producto de esta 5α -reducción será más eficiente que la T en producir respuestas proliferativas, diferenciativas, metabólicas y funcionales en los sistemas celulares interesados.

Se produce aquí por lo tanto un fenómeno de retroalimentación positiva del efecto androgénico a nivel del órgano blanco que contenga 5α -reductasa.

El cese del suministro androgénico (castración) va a producir el efecto inverso: la caída de la actividad enzimática que resulta en una menor cantidad de DHT producida (no sólo debida a menores cantidades de sustrato endógeno accesibles, sino también a la capacidad intrínseca de la enzima para catalizar la reacción). Consecuentemente se produce una regresión "amplificada" del órgano efector, que está aparejada con

la disminución en el número de receptores específicos para DHT, después de la orquidectomía (169,170).

Cabría preguntarse ahora qué pasaría en condiciones en que haya demasiado sustrato para las necesidades momentáneas de DHT del tejido, si tenemos en cuenta que la enzima no parece saturable hasta el límite de solubilidad en agua de la testosterona (10^{-4} M) y siendo el K_m 10^{-6} M.

Cobra sentido entonces la suposición de que existe otro mecanismo de control, esta vez inhibitorio, de la 5α -reductasa.

Si bien no parece haber para esta enzima una retroalimentación negativa por productos (DHT o 5α -androstanoles), se postuló (171,172) que la eventual DHT en exceso, podría derivarse hacia la formación de dioles, presumiendo que estos metabolitos fueran inactivos a nivel de interacción con el genoma. Esto tendría por efecto una menor concentración neta de andrógeno activo (DHT).

Cabe agregar además, que al ser la transformación DHT/diol reversible, se podrían también aumentar los "pools" de DHT mediante la reacción inversa, como se sugirió que ocurría en el tejido renal (98), constituyendo la oxidación del diol una importante fuente de DHT.

Sin descartar la posibilidad de que exista este mecanismo inactivante, se han postulado diversas funciones para los 5α -androstanoles, como veremos más adelante que no concuerdan con las características de un metabolito inactivo.

Por otro lado no se han hallado factores intracelulares posibles de controlar por inhibición la actividad enzimática. Sería quizás interesante, para tal efecto, investigar la existencia de algún factor (proteico) relacionado con el Zn (véase parte VII b), ya que este catión inhibe a la 5α -reductasa in vitro y existe en grandes cantidades en los órganos sexuales accesorios del macho.

RESULTADOS 2º Parte

Plan

Desarrollo ontogénico de la actividad de la 5 α reductasa y 3 α 1-deshidrogenasas en el epidídimo de la rata
Correlación con el trofismo y la función del órgano

V) Estudios Enzimáticos

- 1- Localización subcelular de la 5 α reductasa y 3- α 1-deshidrogenasa en el epidídimo de rata prepúber. y adulta.
- 2- Estudios cinéticos de las actividades enzimáticas.
- 3- Actividad in vitro de la 5 α -reductasa epididimaria durante el desarrollo sexual.
- 4- Actividad in vitro de la 3- α 1-deshidrogenasa epididimaria durante el desarrollo sexual.
- 5- Actividades comparadas de la 3 α - α 1-deshidrogenasa y 3- β - α 1 deshidrogenasa en animales prepúberes de 25 días y adultos.

VI) Niveles tisulares de testosterona, DHT y androstandioles en el epidídimo de la rata a diferentes edades.

VII) A- Medición de parámetros relacionados con el trofismo del órgano, en epidídimos de ratas de distintas edades.

- 1- El peso del órgano, el contenido tisular en agua y proteínas totales
- 2- El contenido en ácido desoxirribonucleico (ADN) y la incorporación in vitro de ^{14}C -Timidina al ADN.
- 3- Análisis histológico de cortes transversales de epidídimo. Determinación del número de figuras mitóticas.

B- Medición de distintos parámetros relacionados con la función del epidídimo, o de alta concentración en este órgano, a lo largo de la maduración sexual de la rata.

- 4- El ácido siálico (NAN)
- 5- La glicerilfosforilcolina (GPC)
- 6- El Zinc (Zn) tisular
- 7- Las proteínas específicas epididimarias (PEE)

RESULTADOS (2º parte)

Desarrollo ontogénico de la actividad de la 5 α -reductasa y 3-ol-deshidrogenasas en el epidídimo de la rata. Correlación con el trofismo y la función del órgano

V) Estudios Enzimáticos

1- Localización subcelular y actividad de la 5 α reductasa y de la 3-ol-deshidrogenasa en el epidídimo de la rata prepúber y adulta.

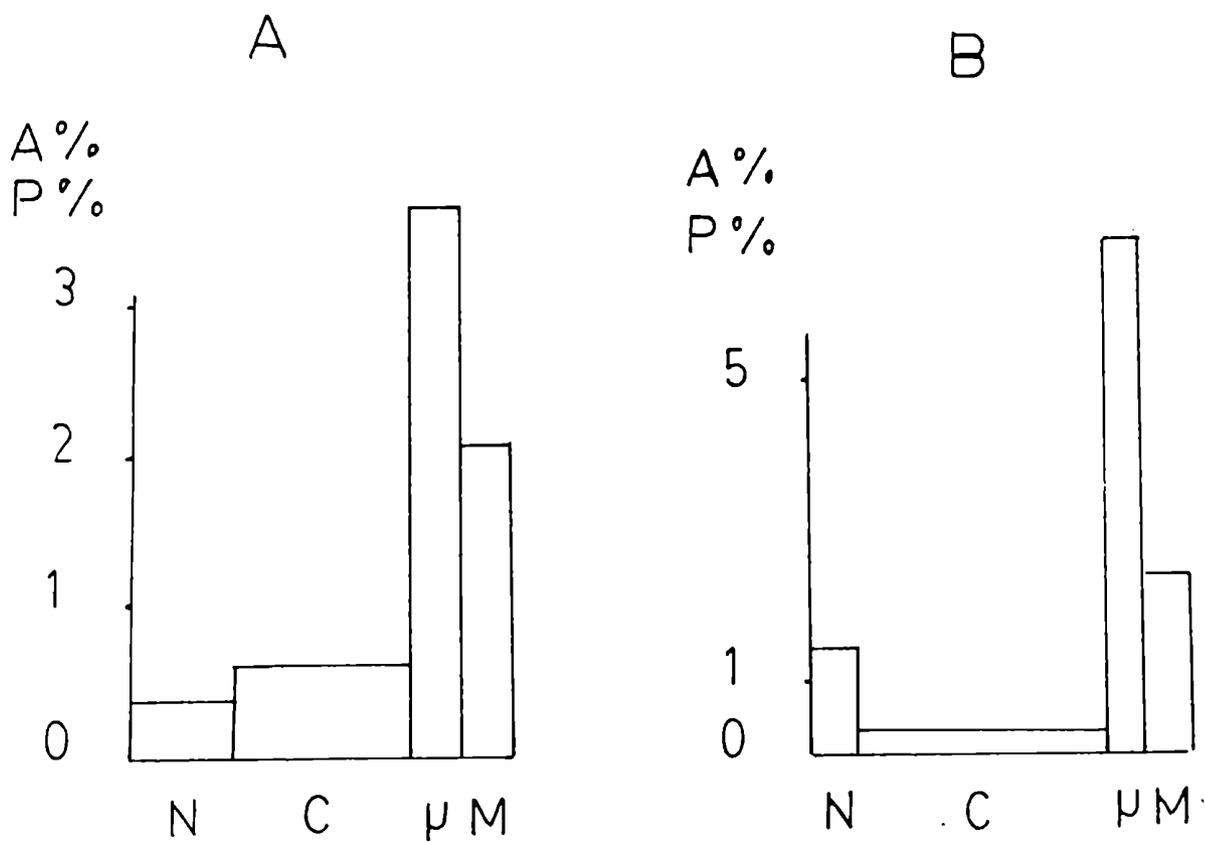
En la Figura Va se graficó la distribución de la actividad 5 α reductasa en el epidídimo de la rata prepúber de 25 días de edad. Para ello utilizamos nuevamente el gráfico propuesto por Van der Vusse en el que la actividad específica relativa se grafica en función del valor porcentual de proteínas.

Se emplearon fracciones subcelulares de epidídimos de ratas de 25 días, las que se incubaron a 34C durante 20 minutos, en presencia de testosterona 10⁻⁶M. La figura Vb muestra el perfil obtenido en las mismas condiciones para el epidídimo de rata adulta.

La 5 α reductasa del epidídimo prepúber no difiere mayormente, en su localización, de la del epidídimo adulto, si bien parece estar más "distribuida" en todas las fracciones, par-

FIGURA V: Localización subcelular comparada de la 5α -reductasa epididimaria de la rata de 25 días (A) y adulta (B)

Los resultados están expresados como señalado en la Figura I



ticularmente en las citosoluble y mitocondrial. Esto podría quizás atribuirse al diferente comportamiento de las partículas celulares durante el proceso de sedimentación de los homogenatos prepuberales respecto de los adultos.

De todas maneras, la actividad registrada es predominantemente microsomal, siendo relativamente baja en la fracción nuclear cruda, lo cual confirma resultados anteriores para la 5α reductasa de rata adulta (71,70).

La figura VIA nos indica la localización de la actividad de la 3β hidroxisteroide deshidrogenasa expresada como pmoles de 5α -androstandioles (3α y 3β ol), en distintas fracciones subcelulares expuestas 20 minutos a una concentración 10^{-6} M en DHT.

La figura VIB corresponde a los resultados obtenidos para la rata adulta.

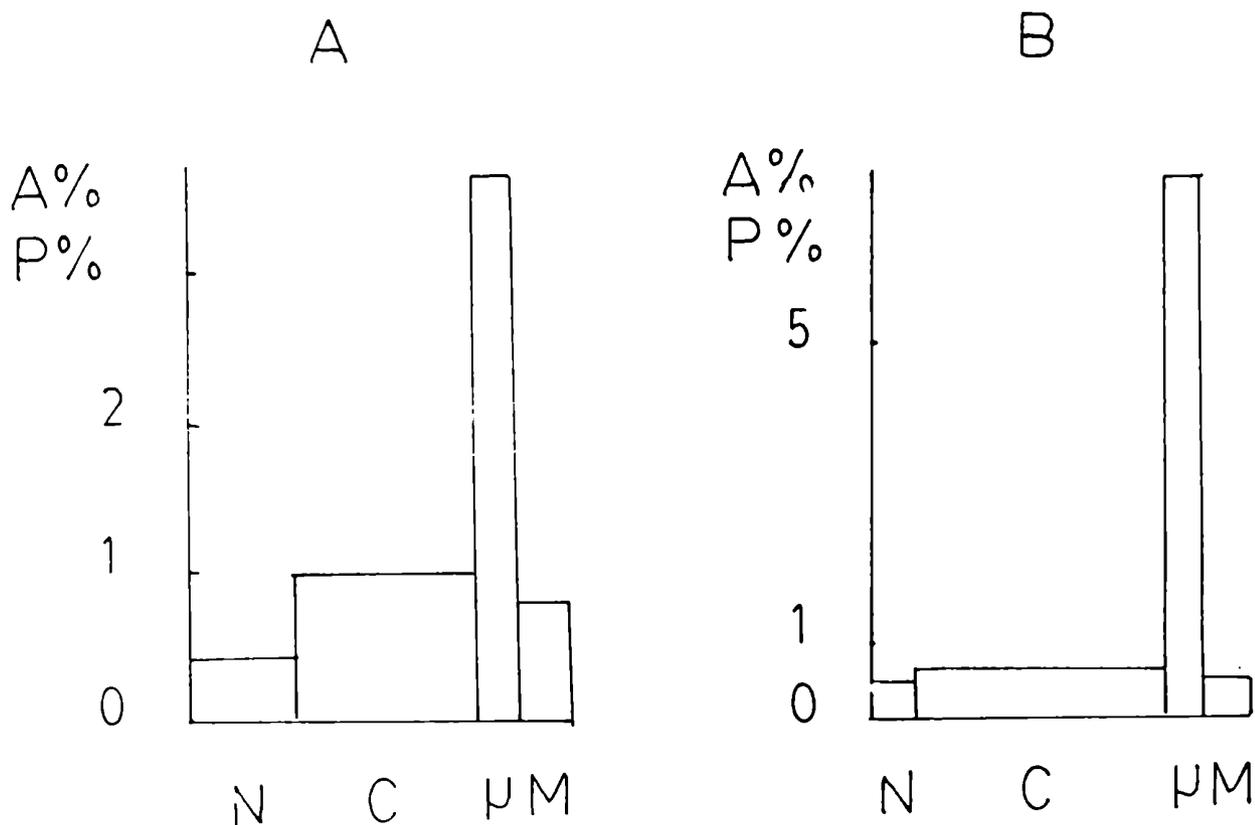
La 3β -ol-deshidrogenasa se distribuye, en el epidídimo de rata prepúber, entre la fracción microsomal y citosólica, mientras en la rata adulta, la mayor parte de su actividad se encuentra en la fracción microsomal.

2- Estudios Cinéticos de las actividades enzimáticas.

Con el objeto de establecer las constantes cinéticas de las enzimas en la etapa prepuberal, se calcularon las velocidades iniciales en base a las tangentes al origen de curvas de pro-

FIGURA VI: Localización subcelular comparada de la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa epididimaria en la rata de 25 días (A), y adulta (B).

Los resultados se expresan como descripto en Figura I.



ducto formado en función del tiempo.

En la figura VIIa se muestra la curva de producto (DHT+ dióles) obtenida al incubar la fracción microsomal con $T = 10^{-6} M$. La velocidad inicial en este caso fue 222 pmoles/mg proteína/h. Se ve que la producción es lineal hasta los 10 minutos de incubación aproximadamente.

En la Figura VIIb se graficó la recta de dobles inversas de Lineweaver-Burk a partir de las velocidades iniciales obtenidas al incubar a distintos tiempos alcuotas de fracción microsomal con $10^{-6} M$, $2 \cdot 10^{-6} M$ y $5 \cdot 10^{-6} M$ de testosterona. Se obtuvo linealidad en ese rango de concentraciones, registrándose un $K_m = 2.8 \cdot 10^{-6} M$ y una $V_M = 340$ pmoles/mg p/h.

En la figura VIIIa₁, a₂ se ilustra la curva de producción de androstandioles en función del tiempo para las fracciones microsomal y citosólica respectivamente, incubadas con $10^{-6} M$ de DHT. En la figura VIII (b₁, b₂) se grafican las rectas de dobles inversas para estas mismas fracciones incubadas con DHT 1, 2 y 5 μM .

Para la 3-ol-deshidrogenasa microsomal se obtuvo un K_m aparente de $3.03 \cdot 10^{-6} M$, y una $V_M = 278$ pmoles/mg p/h. Para la 3-ol-deshidrogenasa del citosol el K_m fue $3.6 \cdot 10^{-6} M$ y la $V_M = 270$ pmoles/mg p/h.

Conviene aclarar que los datos cinéticos obtenidos para la 3-ol-deshidrogenasa reflejan la actividad de dos enzimas ya que, la técnica utilizada en estos ensayos no separa los productos 3α y 3β androstandioles.

FIGURA VII : Parámetros cinéticos de la 5α -reductasa microsomal del epidídimo de ratas prepúberes de 25 días.

A) Curva de producto formado (pmoles 5α -reducidos) vs tiempo, para $T = 10^{-6}M$.

B) Recta de dobles inversas de Lineweaver-Burke, obtenida a partir de las v_0 calculadas de curvas de producto vs tiempo, en función de distintas concentraciones de sustrato.

$T = 1, 2.5$ y $5 \times 10^{-6}M$

$$K_M = 2.8 \times 10^{-6}M$$

$$V_M = 340 \text{ pmoles/mg p.hora}$$

FIGURA VIII : Parámetros cinéticos de la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa microsomal y citosólica del epidídimo de ratas de 25 días.

Curvas de producto vs tiempo para $DHT = 10^{-6}M$, en fracción microsomal (A_1) y citosólica (A_2).

Rectas de dobles inversas obtenidas según descrito en Fig VII, para distintas concentraciones de DHT, en fracción microsomal (B_1) y citosólica (B_2)

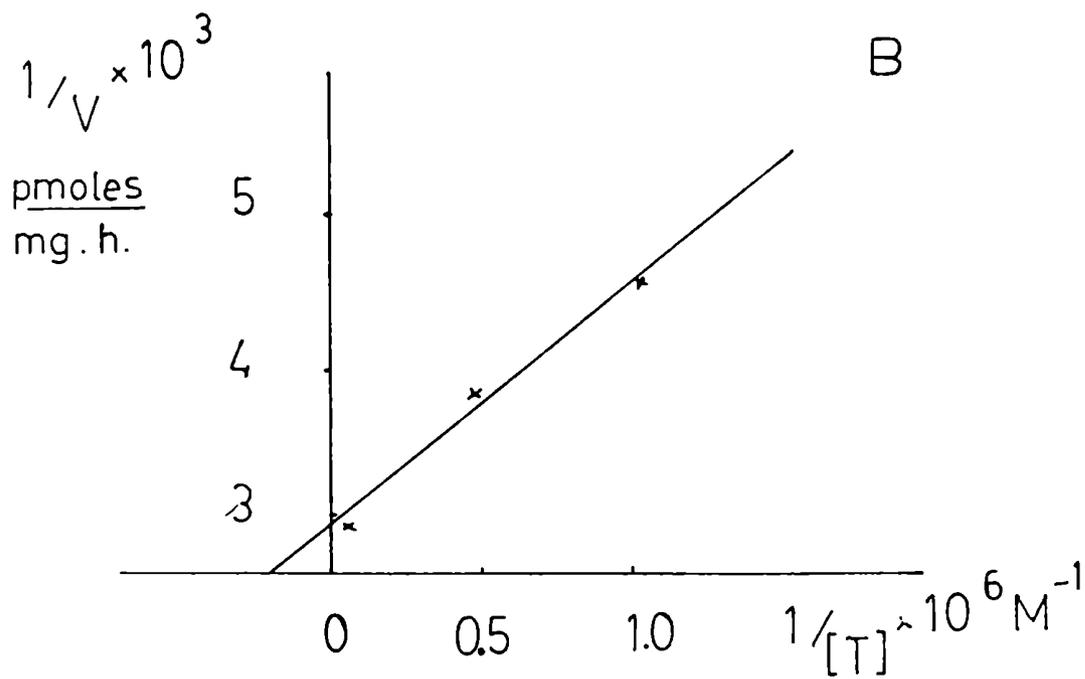
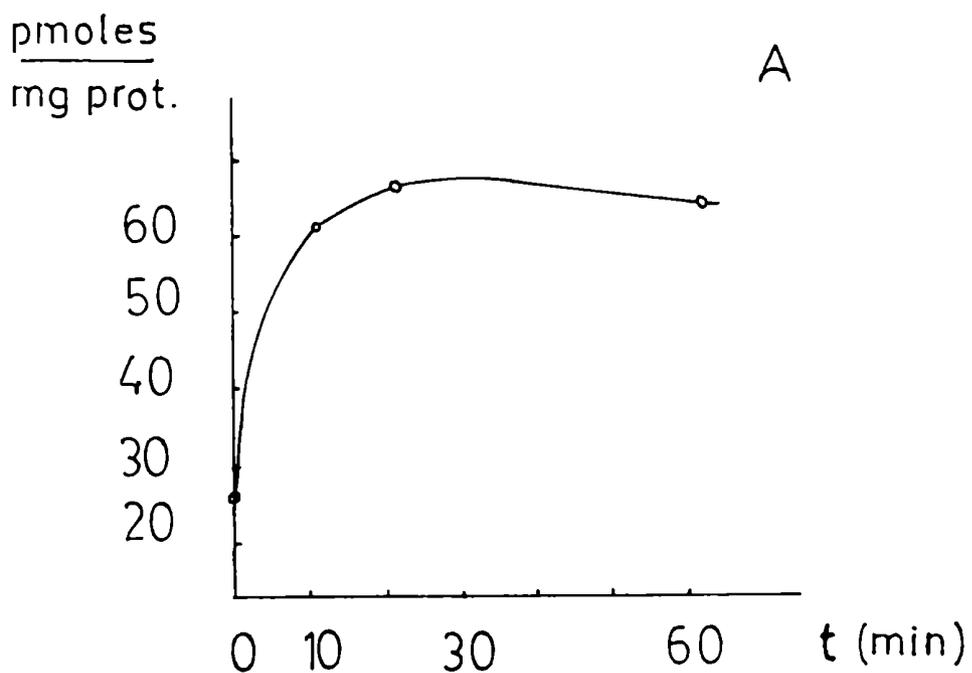
$$K_{M1} = 3 \times 10^{-6}M$$

$$V_{M1} = 278 \text{ pmoles/mg.p.h.}$$

$$K_{M2} = 3.6 \times 10^{-6}M$$

$$V_{M2} = 270 \text{ pmoles/mg.p.h.}$$

FIGURA VII



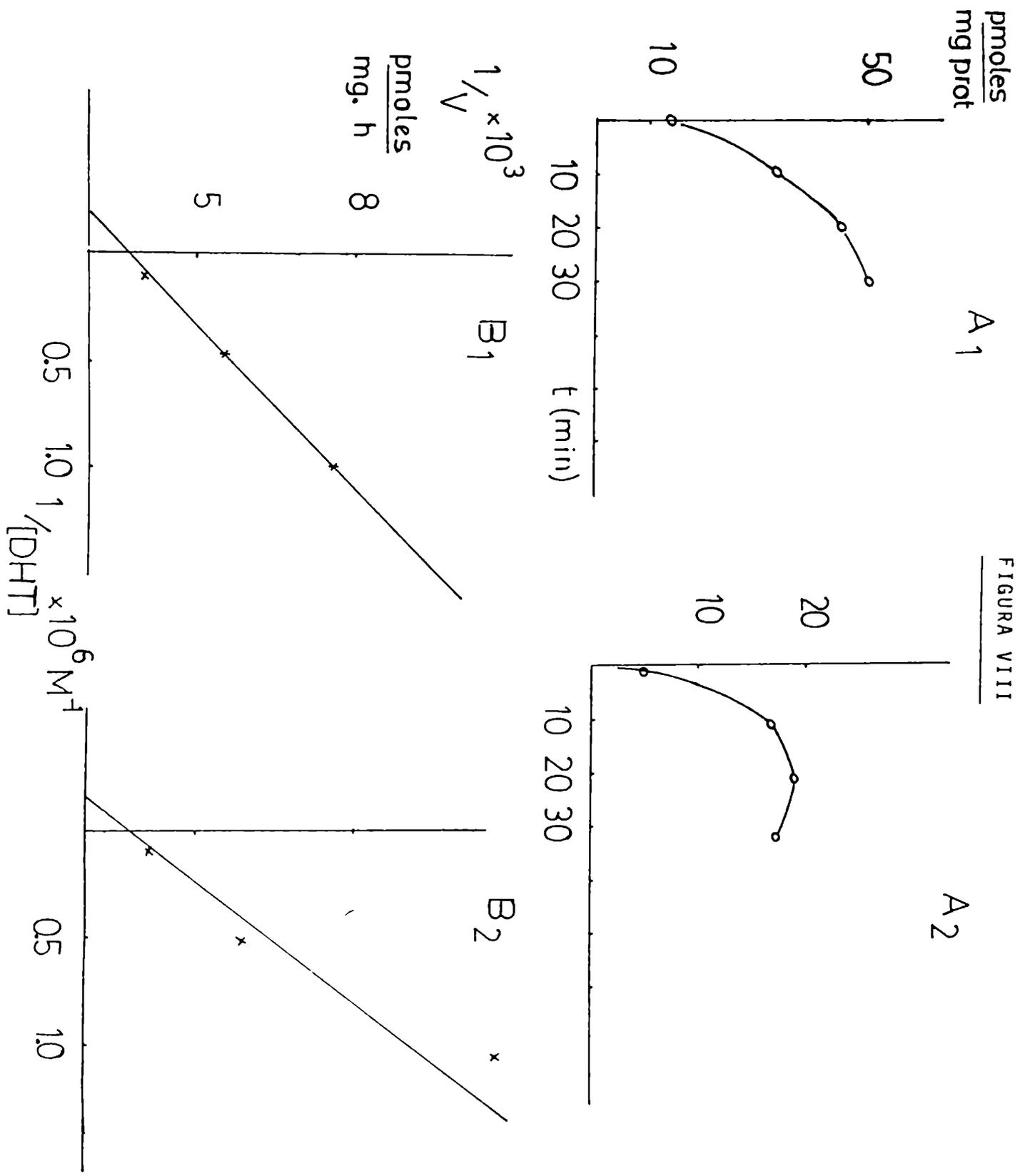


FIGURA VIII

Los valores de Km hallados para la 5α reductasa y 3-ol-deshidrogenasa en el epidídimo de la rata prepúber no muestran diferencias con los de la rata adulta, dentro de la sensibilidad del método, lo que hace suponer que se trata de enzimas de idénticas características funcionales, especialmente en lo que concierne a la afinidad enzima-sustrato.

3- Actividad in vitro de la 5α -Reductasa epididimaria durante la maduración sexual.

La Tabla 3 muestra los valores obtenidos al incubar porciones de tejido epididimario de ratas de 15 a 50 días, en presencia de distintas concentraciones de testosterona.

Vemos que, para prácticamente todas las concentraciones de T utilizadas, la actividad específica de 5α -reductasa, expresada como la suma de DHT y dioles producidas por unidad de peso y tiempo, aumenta a los 25 días de edad y luego descende paulatinamente.

Es de notar que hasta los 25 días, el metabolito que determina las variaciones en la actividad específica in vitro es el diol y no la DHT. En efecto, la relación $\frac{\text{diol}}{\text{DHT}}$ está corre-

lacionada directamente con el aumento de la actividad de la 3-ol-deshidrogenasa de los 15 a los 25 días y su posterior descenso a partir de los 30 días, donde la DHT pasa a ser el metabolito más importante, tal como ocurre para la rata adulta. En la figura IX a se puede apreciar la re-

TABLA 3

Actividad in vitro de la 5 α reductasa, hallada al incubar trozos de tejido epididimario de ratas de distintas edades

| EDAD (días) | Actividad 5 α red. T= 10 ⁻⁷ M | diol DHT | Actividad 5 α red. T= 5. 10 ⁻⁷ M | diol DHT | Actividad 5 α red. T= 10 ⁻⁶ M | diol DHT | Actividad 5 α red. T = 5. 10 ⁻⁶ M | diol DHT |
|-------------|---|-------------|--|-------------|---|-------------|---|-------------|
| 15 | 0.9 | 0.5 | 2.8 | 0.55 | 8 | 1.66 | 34 | 2 |
| 20 | 0.53 | 0.32 | 4 | 1 | 8 | 1.66 | 28 | 3 |
| 25 | 2.21 | 2.9 | 11.9 | 2.6 | 21.4 | 1.9 | 77.6 | 1.35 |
| 30 | 2.09 | 0.97 | 7.2 | 0.9 | 15.5 | 1 | 82 | 2.4 |
| 40 | 1.60 | 1.3 | 5.7 | 0.8 | 12.5 | 0.89 | 56 | 1.36 |
| 50 | 0.64 | 0.68 | 2.9 | 0.70 | 2.6 | 0.89 | 24 | 0.68 |
| 90 | | | | | 4.82 | 0.48 | | |

$$\text{Actividad} = \frac{\text{pmoles DHT} + \text{diol}}{\text{mg tejido. hora.}}$$

Los resultados corresponden al promedio de dos determinaciones por duplicado, y el error no superaba el 15%

lación entre actividad específica de la 5α -reductasa a lo largo de la edad, con el cociente diol/DHT correspondiente, al incubarse trozos de tejido en presencia de $5 \cdot 10^{-7}$ M de testosterona.

También se graficó (Figura IXb) la actividad de la 5α -reductasa expresada por órgano, junto con el peso húmedo correspondiente de los epidídimos. En este caso no se ve el pico de la figura IXa, sino que la actividad aumenta continuamente, si bien con una pendiente más acentuada a partir de los 30 días de edad.

La actividad total a los 50 días es 20 veces superior a la registrada a los 15 días, y aproximadamente cuatro veces la de 25 días.

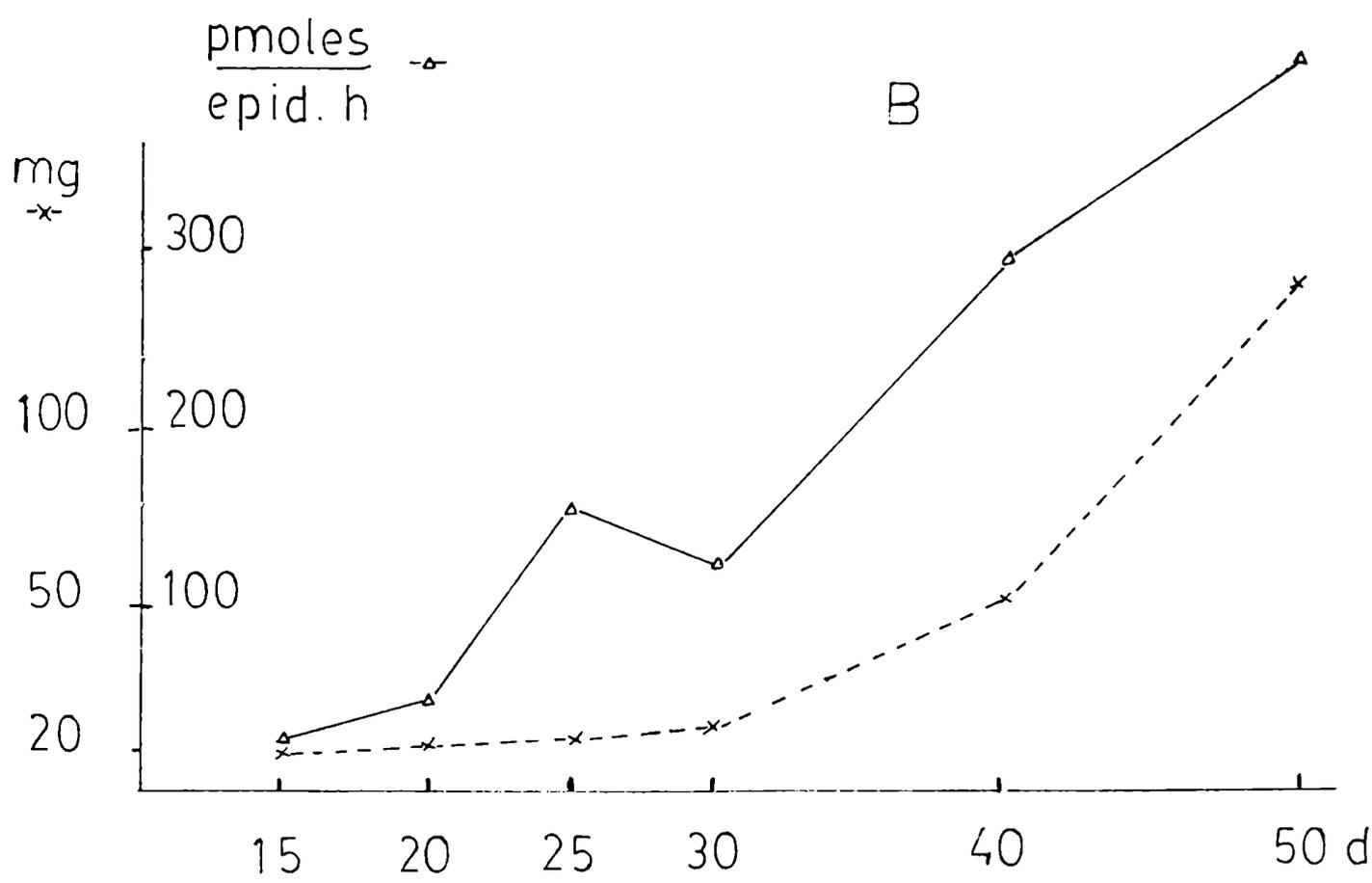
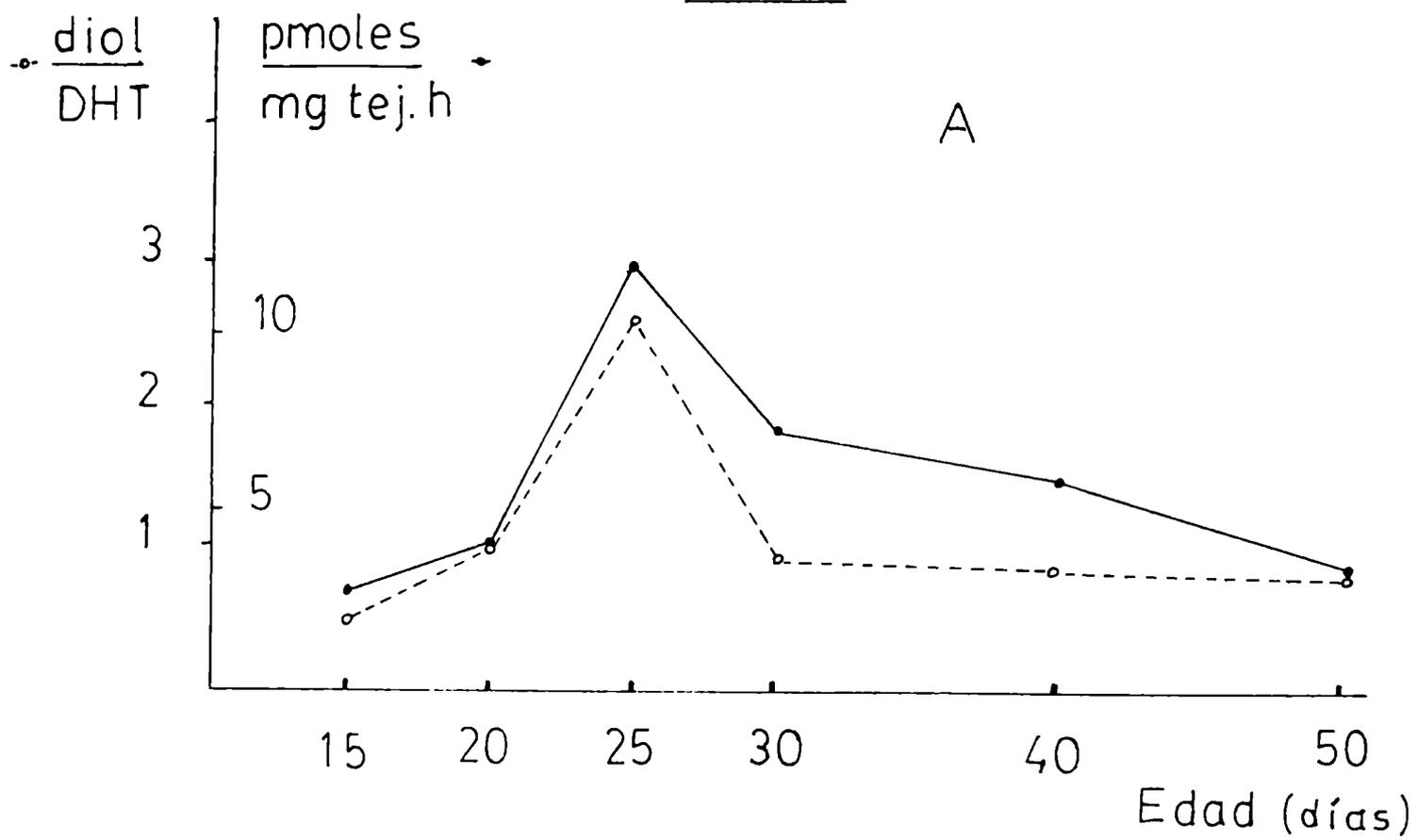
4- Actividad in vitro de la 3-ol-deshidrogenasa epididimaria durante la maduración sexual.

A partir de los resultados anteriores se consideró importante determinar, si el pico de actividad 5α reductasa observado a los 25 días, que se acompañaba de un aumento en la relación diol/DHT (figura IXa), reflejaba un aumento de actividad específica de las 3-ol-deshidrogenasas (que catalizan la reducción de la 5α -dihidrotestosterona a 5α -androstan $3\alpha, \beta$ -17 β dioles).

FIGURA IX : Actividad in vitro de la 5 α -reductasa a lo largo de la edad prepuberal, expresada por mg de tejido (trazo lleno), y relación diol/DHT correspondiente (trazos punteados) (A).

La misma actividad, expresada por órgano (trazos llenos), y el peso húmedo de los epidídimos (trazos punteados) correspondiente a cada edad. (B).

FIGURA IX



La figura X muestra los datos correspondientes a la incubación de epidídimos de ratas de distintas edades en presencia de diversas concentraciones de DHT.

Los resultados indican una tendencia hacia el aumento de la actividad específica de la 3-ol-deshidrogenasa a los 25 días, que se ve con mayor claridad en la curva correspondiente a 10^{-6} M de DHT. Es de destacar que en estos experimentos los epidídimos de las ratas de 20 días de edad superaron en peso a los epidídimos de ratas de 25 días.

Trozos de tejido de los mismos animales fueron incubados con testosterona $5 \cdot 10^{-7}$ M detectándose, como anteriormente, altos niveles de actividad 5α reductasa a los 20 y 25 días de edad, confirmando así hallazgos anteriores (Tabla 3).

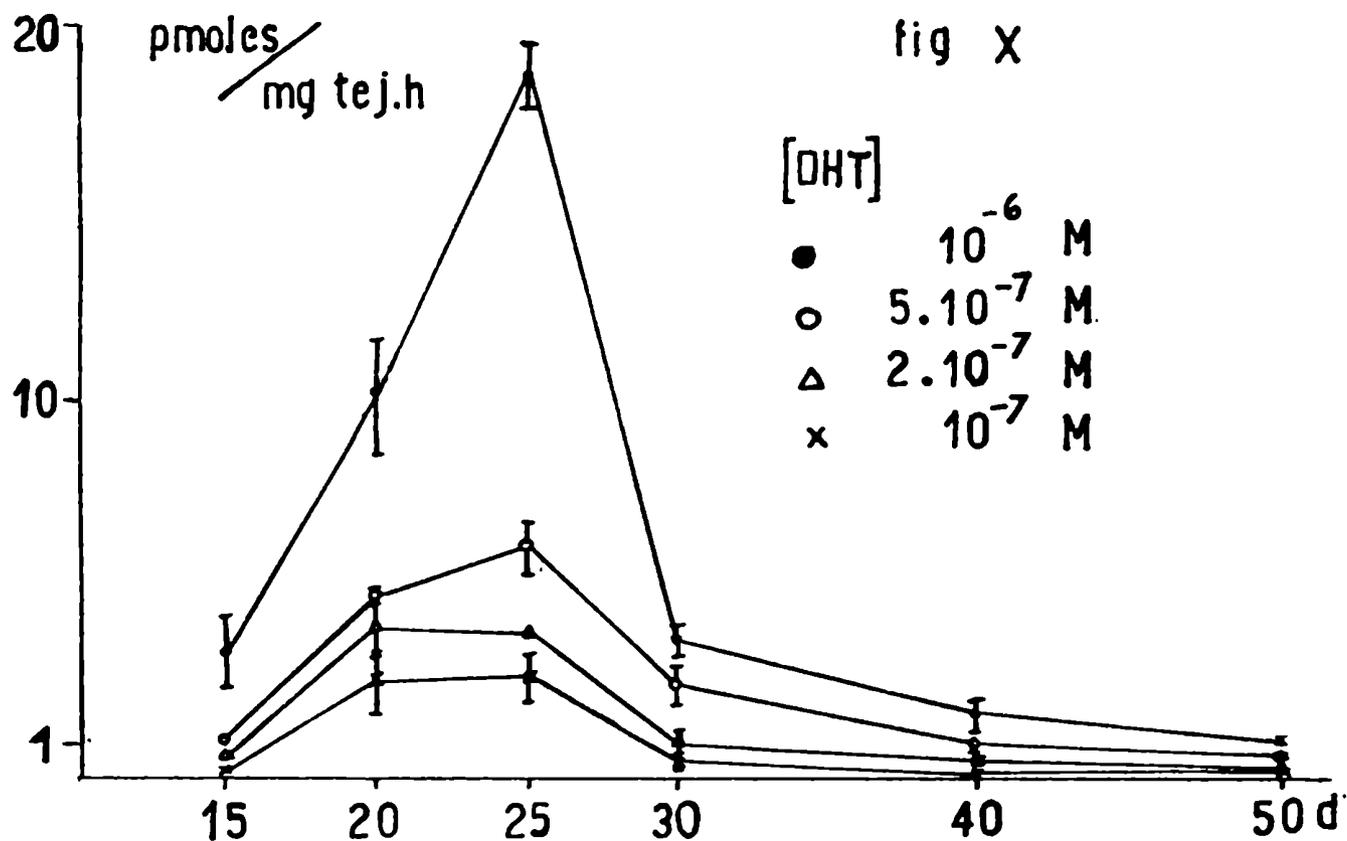
En la Tabla 4 se tabulan los datos correspondientes a la actividad de ambas enzimas expresadas por unidad de órgano, así como el peso de los epidídimos correspondientes

A diferencia de la 5α -reductasa, la actividad total de la 3-ol-deshidrogenasa aumenta hasta los 25 días, donde tiene un máximo (177.6 pmoles/epid.h.) y luego desciende conforme el animal va madurando.

De esta forma se demuestra que el aumento de metabolización in vitro de la testosterona a productos 5α -reducidos, especialmente 5α -androstanoles, se debe tanto a una acti-

FIGURA X : Actividad in vitro de la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa, en epidídimos de ratas prepúberes a lo largo de la edad.

Los resultados se expresan como pmoles de dioles formados por mg de tejido, al usarse distintas concentraciones de sustrato (DHT)



Actividad in vitro de la 3-ol deshidrogenasa y 5 α -reductasa, expresadas por unidad de órgano. Peso de los animales y de sus epididimos obtenida en el ensayo de 5-α reductasa. *

| EDAD (días) | N (ratas) | Peso rata (gr ± SE) | Peso epididimos (mg SE) | Actividad | |
|-------------|-----------|---------------------|-------------------------|------------|---------------|
| | | | | 5α Red. ** | 3ol- DHasa ** |
| 15 | 34 | 25.98 ± 0.84 | 17.85 ± 0.64 | 173.86 | 13.81 |
| 20 | 15 | 31.27 ± 1.48 | 22.15 ± 1.09 | 307.44 | 132.7 |
| 25 | 15 | 30.27 ± 2.37 | 22.09 ± 1.60 | 303.07 | 177.6 |
| 30 | 15 | 57.47 ± 3.96 | 55.47 ± 4.99 | 204 | 142.0 |
| 40 | 14 | 103.29 ± 3.28 | 109.07 ± 4.38 | 412.3 | 120.7 |
| 50 | 12 | 133.08 ± 6.23 | 153.6 ± 10.3 | 497.7 | 69.1 |

* Concentración del sustrato: 5 x 10⁻⁷ M. Tiempo de incubación: 1 hora, temperatura: 34°C

** Expresada en pmoles de producto/epididimo/hora.

vidad incrementada de la 5α reductasa como de la 3-ol-deshidrogenasa.

5- Actividades comparadas de la 3α -ol deshidrogenasa y 3β -ol deshidrogenasa en animales prepúberes de 25 días y adultos.

Teniendo en cuenta la importante metabolización in vitro de la testosterona a 5α -androstanoles, detectada durante la edad prepuberal, se trató de discriminar cual de los dos isómeros (3α y/o 3β) predominaba en el epidídimo, tanto para el animal prepúber como para el adulto. Para obtener la separación de los isómeros se empleó la cromatografía sobre papel Whatman 3 utilizando el sistema hexano:metanol: agua 500:450:50.

Como edad representativa prepuberal se eligió la de 25 días que coincide, como hemos visto, con una mayor formación de androstanoles in vitro.

En la Tabla 5 se muestra la actividad comparada entre ambas enzimas, expresada como picomoles de cada isómero producido por órgano, y también por mg de proteína, obtenida al incubar homogenato con DHT 1 μ M durante 60 minutos, en presencia del cofactor NADPH en concentración 10 mM.

los 25 días, aunque dentro de la producción total de diol, la formación del isómero 3α está levemente favorecida ya que representa el 59% del total.

TABLA 5

Actividad comparada de la 3 α y 3 β 01-deshidrogenasas en el epidí-
dimo de la rata prepúber (25 días), y adulta (90 días).

| Actividad | pmoles / 2 epid.hora ± SD (n=4) | % Actividad total | pmoles/mg.h. n=4 | %Actividad específica |
|-----------|------------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| <hr/> | | | | |
| PREPUBER | | | | |
| 3- α 01 | 1180 ± 82 | 59 | 321.4 ± 45 | 44 |
| 3- β 01 | 840 ± 171 | 41 | 406.6 ± 140 | 56 |
| <hr/> | | | | |
| ADULTA | | | | |
| 3- α 01 | 2083 ± 60 | 80 | 475 ± 85 | 74 |
| 3- β 01 | 523 ± 6.6 | 20 | 165.6 ± 60 | 26 |

En lo que respecta a la rata adulta, la Tabla 5 muestra los resultados obtenidos luego de incubar homogenatos epididimarios con ^3H -DHT 1 μM . En este caso, la formación del isómero 3α predomina ampliamente (80%) sobre la del 3β .

También se investigó la formación de cada isómero en las distintas fracciones subcelulares, mostrándose los resultados en las Figuras XI A y B, para ratas prepúberes y adultas respectivamente.

De las mismas se desprende que en el citosol predomina la actividad de la enzima $3\alpha\text{ol}$ -deshidrogenasa, ya que este metabolito representa el 90% del total de androstandioles en dicha fracción.

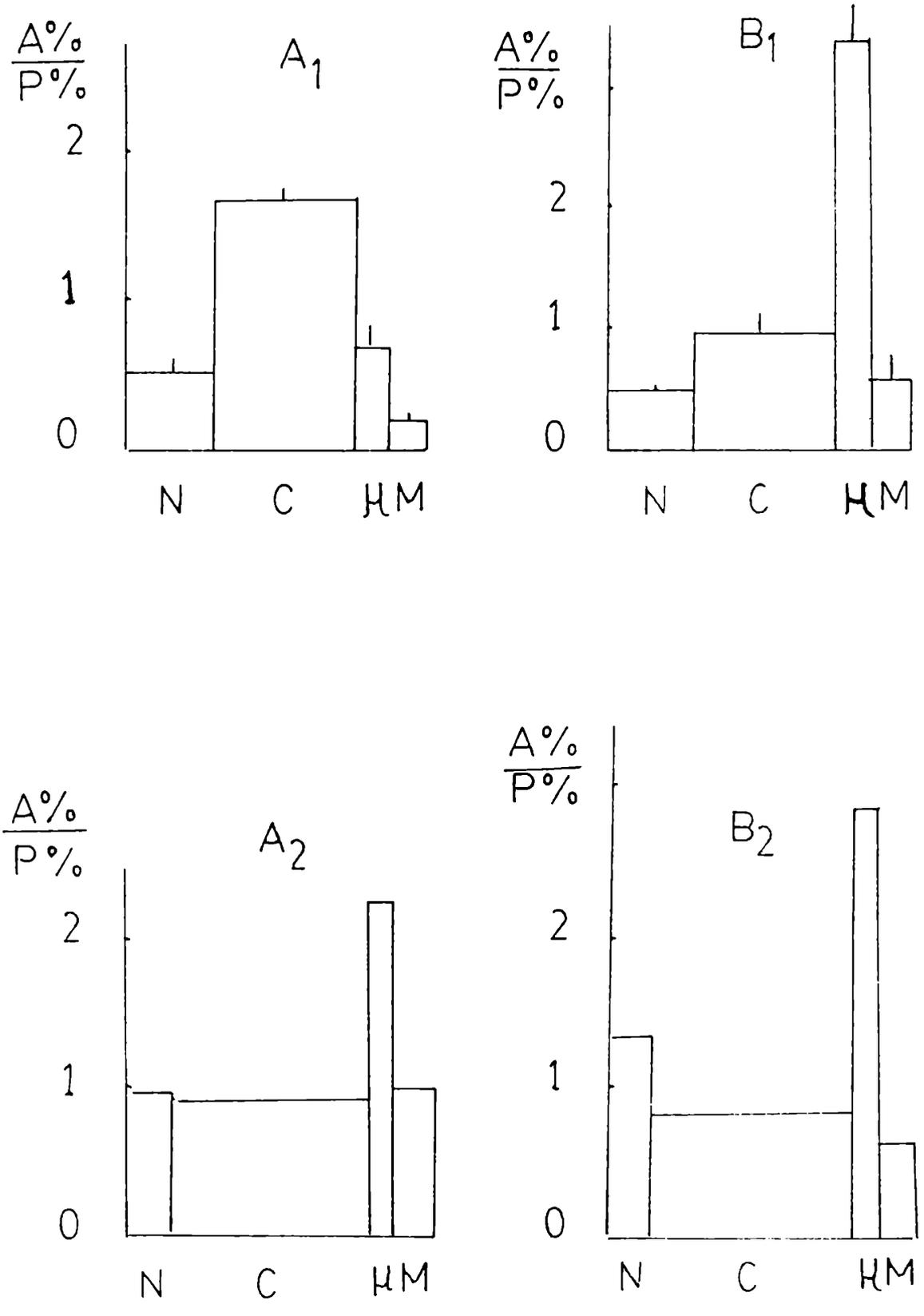
Por el contrario, en las fracciones microsomal y mitocondrial es mayor la actividad de la $3\beta\text{ol}$ deshidrogenasa, representando su producto el 60% y 62%, respectivamente, del total de androstandioles de las fracciones citadas.

Estos resultados sugieren la diferente localización de ambas enzimas, ya que la responsable de la formación del isómero 3α sería soluble mientras que aquella que forma el isómero 3β estaría asociada a fracciones particuladas.

FIGURA XI : Distribución subcelular relativa de las actividades 3α -ol (A), y 3β -ol (B) deshidrogenasas en el epidídimo de la rata prepuber (A_1, B_1), y adulta (A_2, B_2)

Los resultados están expresados según visto en Figura I

FIGURA XI



VI) Niveles tisulares de testosterona DHT, y androstandioles en el epidídimo de la rata a diferentes edades.

La Tabla 6 muestra los contenidos endógenos de T, DHT y Dioles en los epidídimos de ratas de distintas edades prepuberales determinados por radioinmunoensayo, y expresados en nanogramos (ng) de esteroide por gramo (g) de tejido húmedo.

Los andrógenos 5α -reducidos son cuantitativamente importantes, siendo la relación 5α reducidos/testosterona entre 10 a 1 y 20 a 1 según la edad (Tabla 6).

En el tejido epididimario, y a diferencia del plasma (17, 18,19,117), el andrógeno más abundante es la DHT, tanto en la edad adulta (217,71) como en la prepuberal, como lo indican nuestras mediciones.

Sin embargo, durante la maduración sexual se detectan además importantes cantidades de androstandiol, cuya concentración va disminuyendo a medida que el animal va madurando sexualmente, hasta alcanzar los bajos niveles registrados en la adultez para este metabolito.

Esta alta concentración de dioles ha sido detectada también en tejido testicular (18,116), plasma (19) y tejido cerebral (117) durante la prepubertad de la rata, y también en el plasma de ratas macho seniles (213).

TABLA 6

Contenido endógeno de testosterona, dihidrotestosterona y androstandioles en el epidídimo de ratas prepúberes, determinado por radioinmuno ensayo. (Los resultados se expresan en nanogramos por gramo de tejido húmedo (ng/g \pm SE(n)).

| EDAD (días) | T | DHT | DIOLES | Andrógeno total (T+D+d) | $\frac{\text{diol}}{\text{DHT}}$ | diol + DHT | % α reducidos |
|-------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------|----------------------|
| 15 | 7.00 \pm 2 (2) | 31.91 (1) | 42.4 \pm 10 (2) | 81.3 | 1.34 | 74.3 | 91.4 |
| 20 | 5.60 \pm 2.5 (2) | 30.99 \pm 3.53 (4) | 24.3 \pm 3.04 (3) | 60.9 | 0.78 | 55.3 | 90.8 |
| 25 | 3.57 \pm 3.6 (3) | 17.58 \pm 5.0* (5) | 16.94 \pm 2.35* (3) | 38.1 | 0.96 | 34.5 | 90.5 |
| 30 | 2.21 \pm 0.02 (2) | 24.29 \pm 14.7 (4) | 10.07 \pm 6.1 (3) | 36.6 | 0.42 | 34.4 | 94 |
| 40 | 1.80 (1) | 37.00 \pm 1.27 (2) | 9.3 \pm 3.1 (2) | 48.1 | 0.25 | 46.3 | 96.2 |
| 50 | 1.97 (1) | 39.64 \pm 6.3 (4) | 10.07 \pm 4.0 (5) | 51.7 | 0.25 | 49.7 | 96.1 |

* significativamente diferente del lote 20 días (P 005)

**P 0.05 entre 20 y 25 días.

Nuestros resultados indican también que la relación diol/DHT se ve aumentada entre los 15 y 25 días (Tabla 6), donde es, en promedio, igual a la unidad, y desciende a partir de los 30 días hasta llegar a un valor aproximadamente constante de 0.25. Sin embargo, no se llega a superar la unidad para dicho cociente, como ocurría en los ensayos de metabolización "in vitro" (Tabla 3).

El valor relativamente alto de diol/DHT registrado a los 25 días, se debe en realidad a una disminución transitoria, y significativa ($0.02 < p < 0.05$) de la concentración tisular de DHT, y no a un aumento de diol, mientras su posterior descenso se debe tanto a un aumento de DHT como a un descenso paulatino del diol.

Este último desciende a la cuarta parte de su valor entre los 15 y 30 días $42 \frac{10 \text{ ng}}{\text{g}}$ y luego (40-50 días) no registra variaciones.

Si se considera la suma de los andrógenos $T + \text{DHT} + d$ se comprueba que a temprana edad el epidídimo tiene una alta concentración hormonal por peso de tejido, incluso superior a la del órgano adulto.

Luego ésta desciende entre los 25 y 30 días, tanto por la disminución temporaria de DHT, como por el constante descenso de los androstandioles y la testosterona tisulares en este intervalo.

El resultado neto es una depleción de andrógenos totales entre los 25-30 días (Tabla 6) para este tejido efector, depleción que será posteriormente revertida por mayores aportes testiculares de testosterona y mayor formación neta de DHT, llegándose a los 50 días a una concentración tisular total de andrógenos similar a la de 15-20 días y también a la adulta (90 días: \simeq 40ng/g) (217) aunque la composición de los mismos sea diferente en cada caso.

VII- Medición de parámetros relacionados con el trofismo y función del órgano, en epidídimos de distintas edades.

Se intentó dilucidar si el pico de actividad in vitro de la 5α -reductasa y de la 3-ol-deshidrogenasa en el epidídimo de la rata prepúber guardaba alguna relación con eventos celulares propios de un órgano en desarrollo.

Más específicamente, se investigó si dicho pico se relacionaba con la aparición de cambios en algún parámetro conectado con la función epididimaria, que es la de madurar y mantener la supervivencia del espermatozoide.

Con tal objeto, se utilizaron animales prepúberes del mismo rango de edades usado anteriormente, (V, VI) y en cuyos epidídimos se estudió:

A) Parámetros tróficos

- 1) El peso del órgano, el contenido tisular en agua y proteínas totales
- 2) El contenido en ácido desoxirribonucleico (ADN) y la incorporación in vitro de ^{14}C -Timidina al ADN.
- 3) El desarrollo histológico del túbulo y la determinación del número de mitosis.

B) Parámetros funcionales

- 4) El contenido en ácido siálico (NAN).
- 5) El contenido en glicerilfosforilcolina (GPC)
- 6) El contenido de Cinc (Zn).
- 7) La aparición de proteínas epididimarias específicas (PEE)

VII- A- Parámetros tróficos

1) Peso del órgano, contenido tisular en agua y proteínas totales

En la Tabla 7 se muestran los datos obtenidos para el peso de los epidídimos durante el desarrollo sexual.

El incremento de peso ya sea húmedo o seco, es moderado durante los 30 primeros días de vida, acelerándose posteriormente.

El contenido en agua, expresado como $(\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco} / \text{Peso húmedo}) \times 100$, luego de permanecer invariable entre los 15 y 20 días, crece consistentemente, no registrándose grandes cambios de incremento durante el intervalo de 20 a 50 días de edad.

En cambio, el contenido en proteínas totales, también presentado en la misma Tabla 7 y expresado en mg por mg de peso seco, muestra un máximo a los 25 días, decreciendo luego.

En la figura X''' se grafican los valores de proteínas totales por mg de tejido epididimario y muscular.

La concentración relativa de proteínas del epidídimo sube abruptamente a los 20 días de edad (220% respecto del valor de los 15 días, $p < 0.005$) y luego baja lentamente, encontrándose a los 50 días un valor de 68 ug/mg tejido, o sea un poco más del doble del valor inicial, que, por otra parte, constituye aún más del doble del valor obtenido a los 90 días (28,7 ug/mg de tejido, $p < 0.005$). Los valores de proteínas prostáticas mostraron un perfil en todo semejante al del epidídimo (datos no presentados aquí). Las proteínas musculares (tejido inespecífico) no muestran cambios apreciables durante ese lapso.

TABLA 7

Peso del Órgano, contenido tisular en agua, y contenido en proteínas del epidídimo de la rata en la etapa prepuberal y adulta.

| EDAD (días) | PESO EPIDIDIMARIO ^a (mg) | | % H ₂ O | PROTEINAS (mg /mg tejido) seco |
|----------------|--|--------------|--------------------|--------------------------------------|
| | Húmedo | seco | | |
| 15 | 8.87 ± 0.6 | 3.55 ± 0.17 | 60.0 | 187.04 ± 17.92 |
| 20 | 9.33 ± 1.07 | 3.65 ± 0.22 | 60.1 | 168.28 ± 23.83 |
| 25 | 12.41 ± 0.98 | 4.09 ± 0.82 | 67.0 | 210.72 ± 38.60 |
| 30 | 26.40 ± 2.83 | 7.77 ± 0.86 | 70.6 | 144.44 ± 22.45 |
| 40 | 55.15 ± 5.40 | 14.37 ± 0.85 | 73.9 | 181.50 ± 22.65 |
| 50 | 139.00 ± 4.38 | 31.97 ± 1.12 | 77.0 | 112.61 ± 7.08 |
| 90 | 410.0 ± 10.0 | 77.90 ± 3.65 | 81.00 | 136.05 ± 9.30 |

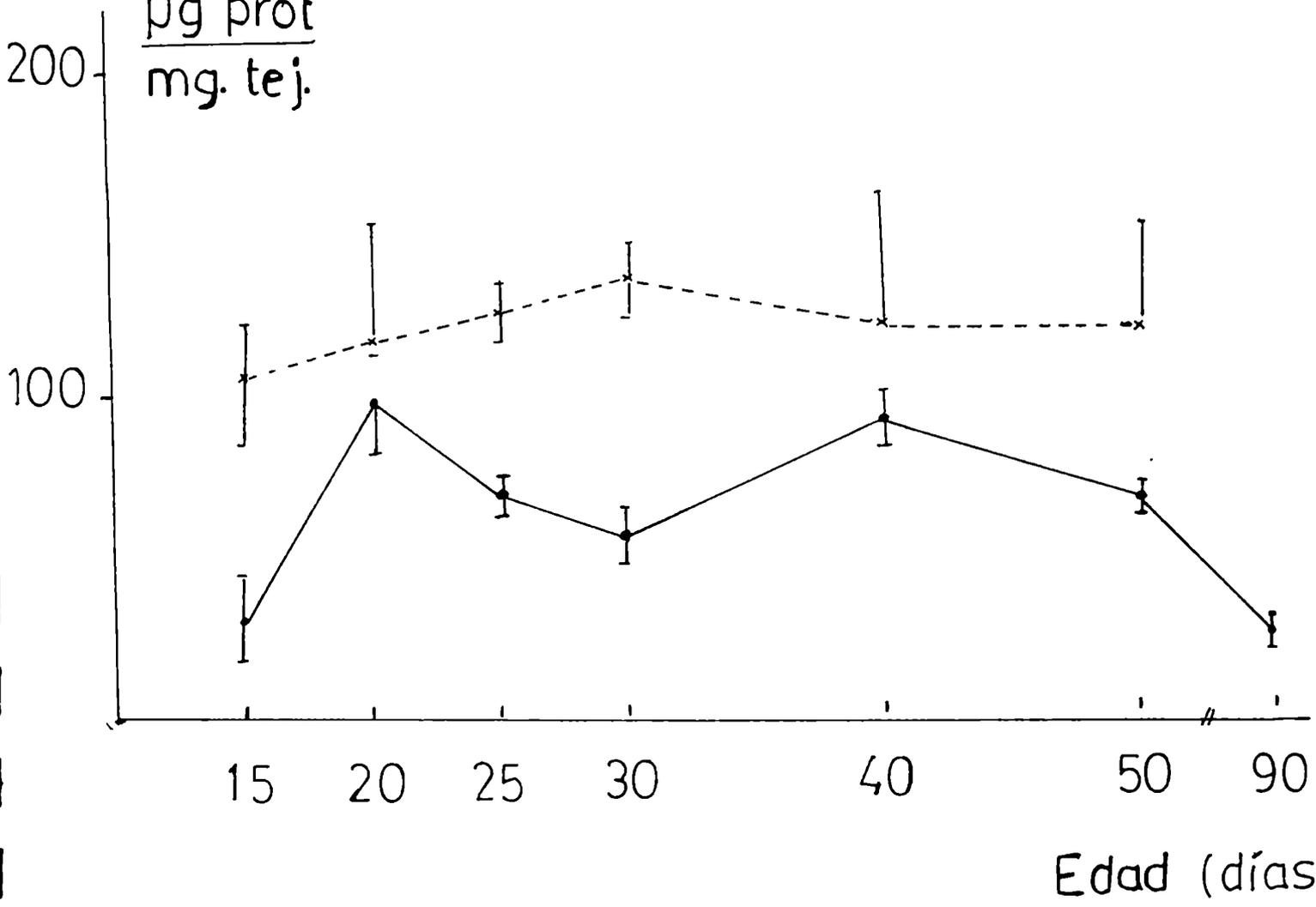
Los resultados corresponden al promedio de 4 determinaciones ± SE.

a) un epidídimo

Se utilizó el siguiente número de animales para cada grupo: 15d.:9, 20d.:6, 25d.:6, 30 y 40d.:4, 50 y 90d.:3. Las muestras se midieron por triplicado.

FIGURA XII

$\mu\text{g prot}$
 mg. tej.



Contenido en proteínas totales del epidídimo y tejido muscular esque-
lético en ratas prepúberes.
Los resultados se expresan en ug por mg de tejido húmedo, y fueron
obtenidos por triplicado.

2) Contenido en ADN e incorporación in vitro de ^{14}C -Timidina en trozos de epidídimo de diferentes edades.

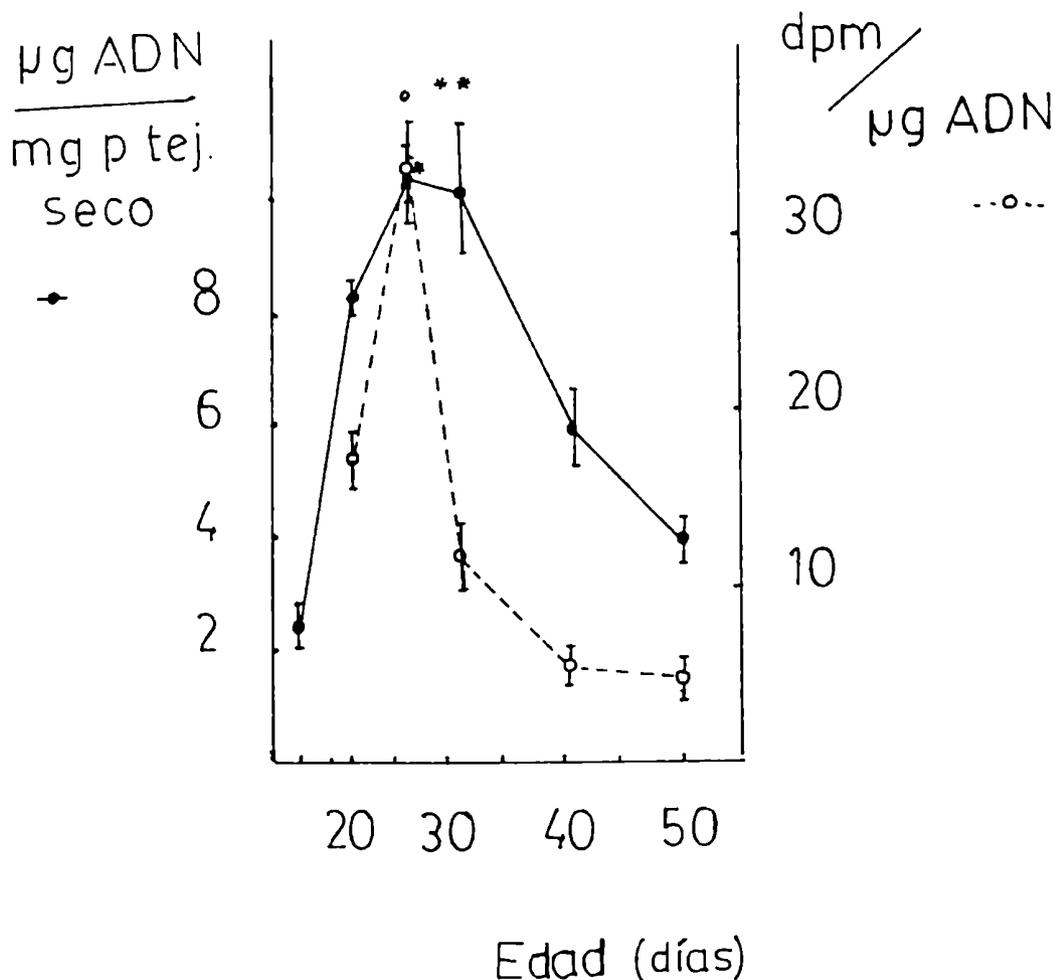
La figura XIII presenta los valores hallados para la concentración de ADN en ug de ácido desoxirribonucleico, medido por mg de tejido seco. Se nota un importante incremento del ácido nucleico entre los 15 y 25 días, seguido por una disminución casi simétrica.

Contrastando con lo evidenciado en el epidídimo, el ADN medido en músculo esquelético o próstata no registró fluctuaciones al expresarse los datos en mg de ADN por mg de tejido húmedo correspondiente, (Tabla 8). También se verificó que el contenido total epididimario en ADN (ug por órgano) crecía más velozmente entre los 15 y 25 días que en edades posteriores. (véase Tabla 8).

Finalmente, para ampliar el estudio de la actividad proliferativa en el epidídimo prepuberal, se midió la incorporación in vitro de ^{14}C -Timidina al ADN. La figura XII (trazos punteados) ilustra los resultados obtenidos. También vemos aquí un máximo de actividad de incorporación a los 25 días de edad. Cabe señalar el descenso pronunciado en la incorporación del nucleótido marcado a partir de los 30 días, (0.001 p 0.005 para los valores de 25 y 30 días), edad que coincide, como hemos visto, con un mínimo de andrógenos totales en el epidídimo.

Estos datos proveen evidencia adicional acerca de la existencia de una onda proliferativa en el epidídimo de la rata alrededor de los 25 días de edad.

FIGURA XIII



Contenido en ADN (trazos llenos), e incorporación in vitro de ¹⁴C-Timidina en el epidídimo de ratas prepúberes.

Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones por separado ± SE. Se utilizó el siguiente número de animales para cada grupo: 15d.:15 ratas, 20d.:12, 25d.:10, 30d.:8, 40d.:5, 50d.:4 ratas

- * p 0.05 vs 15 días
- ** p 0.05 vs 40 días
- o p 0.05 vs 20 y 30 días.

TABLA 8

Contenido en ADN en los núcleos de epidídimos, próstata y músculo esquelético de ratas prepuberes.

| EDAD (días) | EPIDÍDIMO (ug ADN/mg tejido húmedo | PRÓSTATA ± SE , n=4 | MÚSCULO) |
|----------------|---------------------------------------|------------------------|--------------|
| 15 | 0.99 ± 0.10 | 1.66 ± 0.13 | 0.76 ± 0.15 |
| 20 | 3.12 ± 0.32 | 1.58 ± 0.41 | 0.55 ± 0.05 |
| 25 | 2.95 ± 0.72 | 1.70 ± 0.12 | 0.45 ± 0.04 |
| 30 | 1.40 ± 0.10 | 1.04 ± 0.35 | 0.51 ± 0.13 |
| 40 | 1.24 ± 0.16 | 1.43 ± 0.20 | 0.23 ± 0.02 |
| 50 | 0.93 ± 0.07 | 1.23 ± 0.24 | 0.30 ± 0.07 |

Se utilizó el mismo número de animales que los datos presentados en la Figura XIII

3) Histología de epidídimos de diferentes edades prepuberales

En la figura XIV se muestran fotografías de cortes histológicos transversales de cuerpo de epidídimo. En la Tabla 9 están los datos correspondientes a la medición de los diámetros del túbulo y lumen epididimario, así como el número de figuras mitóticas correspondiente a cada edad.

Los datos muestran un crecimiento uniforme y progresivo de los túbulos y de la altura celular a lo largo de las edades analizadas y contrastan de alguna manera con el brusco ensanchamiento del lumen evidenciado a los 15-20 días y luego a los 40-50 días.

La diferenciación progresiva del sector apical del epitelio epididimario se puede observar en las fotomicrografías: Algunas esterocilias aparecen ya entre los 20 y 25 días (A y B), aunque son más abundantes en las células del órgano de 30 días (C).

A los 40 días de edad (D), el epitelio ha adquirido un grado de desarrollo comparable al del animal de 90 días (E). Vacuolas situadas en la región supranuclear del citoplasma, presumiblemente el aparato de Golgi, ya eran visibles a los 25 días, multiplicándose posteriormente conforme el epitelio iba desarrollándose.

Los núcleos ovoidales, que presentaban pliegues y zonas de cromatina dispersa, no mostraron variaciones importantes durante el período examinado.

En lo que se refiere a actividades mitóticas, conviene hacer notar que las figuras observadas en el animal de 25 días duplicaron en número a las de todas las demás edades analizadas

F I G U R A X I V

Cortes histológicos transversales de cuerpo epididimario
de ratas de distintas edades.

A) Rata de 20 días

B) Rata de 25 días

C) Rata de 30 días

D) Rata de 40 días

E) Rata adulta (90 días)

F) Espermátides en la luz
tubular en ratas de 25 días.

FIGURA XIV - 1



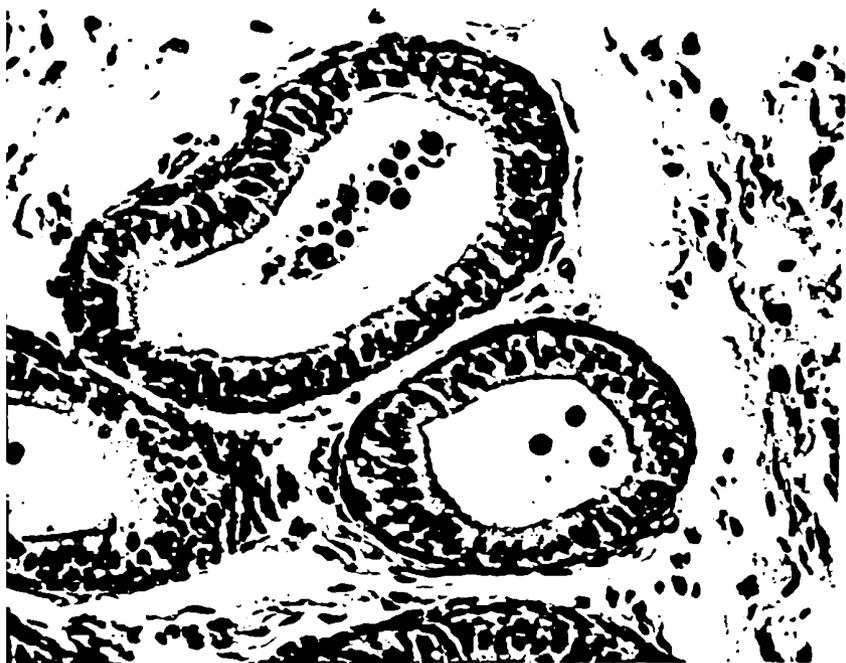
A



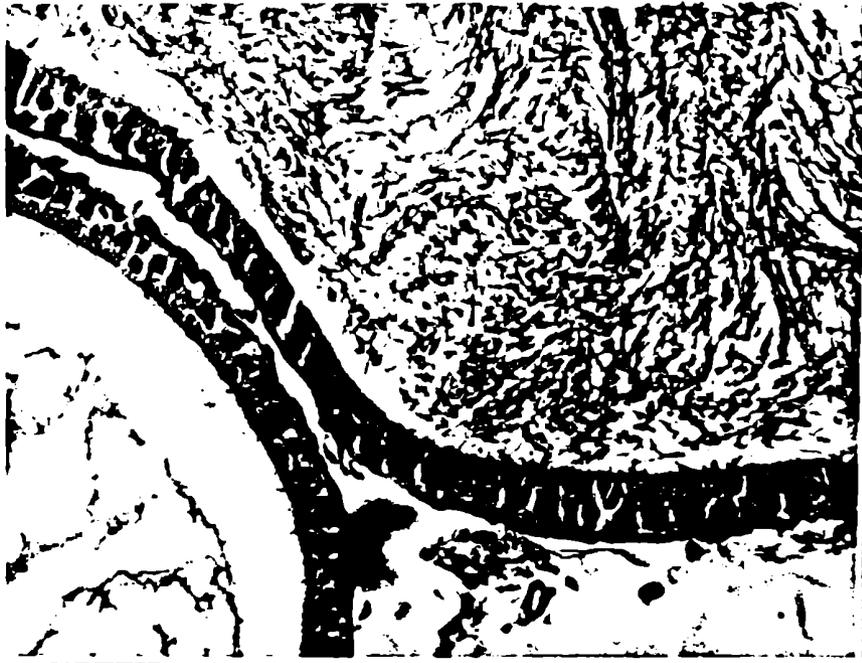
B



C



D



E



F

TABLA 9

Diámetros tubulares y lumbales del cuerpo epididimario en las distintas edades de la rata. Número de mitosis

| EDAD (días) | DIAMETRO (μm) ^a | | MITOSIS ^b |
|----------------|--|--------------------|----------------------|
| | Túbulo | Lumen | |
| 15 | 44.01 \pm 8.29 | 13.68 \pm 7.20 | 5 |
| 20 | 58.1 \pm 4.82 | 24.09 \pm 6.40 | 7 |
| 25 | 62.03 \pm 9.25 | 31.20 \pm 13.71 | 14 |
| 30 | 76.77 \pm 10.33 | 40.75 \pm 9.17 | 7 |
| 40 | 100.7 \pm 11.72 | 55.90 \pm 9.30 | 5 |
| 50 | 130.7 \pm 10.71 | 109.20 \pm 19.81 | 6 |
| 90 | 295.2 \pm 16.40 | 240.0 \pm 5.00 | - |

a: Promedio de 20 mediciones \pm SE. Los cortes se obtuvieron de tres animales distintos de cada grupo.

b: Corresponde al número de células en proceso de división mitótica detectado en cortes no contiguos de epitelio de cuerpo epididimario.

Por otra parte, a partir de los 25 días aparecen células germinales en la luz tubular^F) A esta edad se observa la presencia de espermato-citos meióticos, mientras que a los 40 días ya estaban presentes algunas espermátides esféricas.

VII - B Parámetros Funcionales.

4) Acido Siálico

Es conocido (120) , que el ácido N-acetil neuramínico o ácido siálico se encuentra en concentraciones apreciables en el epidídimo ya que es secretado por las células epididimarias, y probablemente está unido a proteínas en el fluido seminal y en el acrosoma del espermatozoide (56,121).

La concentración de sialoproteínas en el plasma epididimario a lo largo del conducto va creciendo a expensas de la del espermatozoide. Este se encuentra así, en la parte caudal, empobrecido de sialoproteínas, y como es en esta parte distal del epidídimo donde se los encuentra maduros y aptos para fertilizar el huevo, se ha postulado (56), que esta pérdida de sialoproteína por el acrosoma podría estar relacionada con la maduración.

De allí la importancia de estudiar la existencia o aparición de ácido siálico en el órgano prepuberal que se está preparando, estimulado por los andrógenos, a recibir los primeros espermatozoides.

Cabe señalar, por otra parte, que la andrógeno-dependencia del ácido siálico está controvertida: algunos investigadores (122, 123, 124) mostraron que los niveles de glicoproteína son sensibles a fluctuaciones de los andrógenos, y que la castración provoca una reducción apreciable en el contenido de ácido siálico de los órganos sexuales accesorios de la rata macho. Este es parcialmente restaurado por la administración de propionato de testosterona (124). Sin embargo, otros grupos (125, 126, 119) no pudieron detectar cambios en los niveles de ácido siálico en animales castrados, especialmente en primates.

En base a estos antecedentes, se midieron los niveles de NAN total en hidrolizados de tejido epididimario, con el objeto de determinar si la mayor producción de metabolitos 5α y/o 3-ol -reducidos, evidenciada anteriormente (sección V), en la edad prepuberal trae aparejado algún cambio en dichos niveles.

En la Tabla 10 se presentan los datos correspondientes al NAN/100mg protefna a las distintas edades. Los valores encontrados son relativamente altos desde temprana edad, 71 μ mol/100mg protefna para los 15 días, al comparárseles con los de la rata adulta (90 μ mol/100 g). Este último valor coincide por otra parte con el encontrado por Rajalakshmi y Prasad (127), que fue 99 μ mol/100g tej.

De todas manera, el contenido en NAN /protefna está ligeramente aumentado a los 25 días ($P < 0.05$ entre 20 y 25 días), mientras el contenido por órgano crece sin discontinuidad, detectándose 30 veces más μ moles para la rata de 90 días que para la de 15 días.

5) Glicerilfosforilcolina (GPC)

Hace ya bastante tiempo se describió a la glicerilfosforilcolina (GPC) como un importante constituyente del fluido epididimario (128).

Incluso se demostró que el epidídimo, y no el testículo, ((129) provefa dicha GPC al semen, ya sea formándola a partir de precursores como lecitina o plasmalógeno de colina, o bien por síntesis de novo (130). Se plantea la posibilidad de que la GPC tenga un efecto estabilizador sobre los espermatozoides, y/o contribuya a mantener el equilibrio osmótico luminal, ya que durante el trayecto del fluido seminal a lo largo del conducto

TABLA 10

Contenido en ácido-N-acetil neuramínico (NAN, ácido siálico) a lo largo de la edad. Promedio de 3 experimentos medidos por duplicado. Expresado como μ moles NAN/%mg prot.

| <u>EDAD</u> | <u>μmoles NAN/100mg prot. \pm SE (n=6)</u> |
|-------------|--|
| 15 | 0.71 \pm 0.053 |
| 20 | 0.66 \pm 0.063 |
| 25 | 0.99 \pm 0.14 |
| 30 | 0.86 \pm 0.41 |
| 40 | 0.82 \pm 0.076 |
| 50 | 0.70 \pm 0.27 |
| 90 | 2.40 |

epididimario se va absorbiendo NaCl (129, 131).

También se demostró (132, 131) que los niveles de GPC están bajo influencia androgénica, ya que su formación es detenida por la castración y restaurada luego por administración de testosterona.

Tomando en cuenta estos hechos, se investigaron los niveles de GPC en el tejido epididimario de ratas prepúberes, para ver si existía alguna relación entre el estado hormonal correspondiente a dicha etapa, y la secreción de aquella sustancia.

La Tabla 11 muestra los niveles de GPC (en nmoles por peso de tejido y por órgano), junto con los pesos de los epidídimos utilizados.

Observamos una concentración de GPC más alta para las ratas de 15 días que para las de 20 y 30 días, período en que se mantiene aproximadamente constante, para luego aumentar decididamente a partir de los 40 días.

Este aumento con la edad se evidencia más nítidamente si se analiza el contenido de GPC por órgano para cada lote (Tabla 1), y está corroborado por datos de Brooks et al (136) quien informó una relación de 1 a 5 entre la GPC por miligramo de tejido epididimario de ratas de 19 y 60 días respectivamente.

La concentración de GPC por mg de proteína sigue el perfil de GPC por unidad de peso tisular, si bien de manera más atenuada. Los niveles más bajos se observan en este ca-

TABLA 1

Contenido en GPC por unidad de órgano en epididimos de ratas de distintas edades. Número y peso de los órganos. Contenido en GPC por miligramo de proteína.

| EDAD | $\frac{\text{nmoles GPC} \pm \text{SE}}{\text{mg tejido}} \quad (n=2)$ | $\frac{\text{nmoles GPC}}{2 \text{ epid.}}$ | N | peso epid. | $\frac{\text{GPC}}{\text{nmoles/\%mg p.}}$ |
|------|--|---|---|------------|--|
| 15 | 1.50 \pm 0.01 | 22.5 | 7 | 7.50 | 1.69 |
| 20 | 0.57 \pm 0.01 | 14.31 | 5 | 12.70 | 0.73 |
| 25 | 0.92 \pm 0.05 | 28.04 | 5 | 15.40 | 1.52 |
| 30 | 1.13 \pm 0.02 | 51.83 | 4 | 23.0 | 2.00 |
| 40 | 1.86 \pm 0.06 | 223.34 | 3 | 60.0 | 3.81 |
| 50 | 2.52 \pm 0.10 | 500.95 | 3 | 99.5 | 6.96 |
| 90 | 20.1 \pm 0.15 (n=4) | 13670 | 4 | 340.0 | 64.0 |

so a los 30 días de edad, y no a los 20 días como al expresar la concentración por unidad de peso.

Se infiere de estos datos que la secreción de GPC se halla en estado más bien latente durante la edad prepuberal, notándose incluso una cierta depleción entre los 20 y 30 días de edad.

Una importante provisión de andrógeno (DHT?) o algún otro factor inexistente hasta la adultez parece ser necesario para una síntesis de GPC más acentuada, ya que a los 50 días el epidídimo de la rata sólo llega a producir la cuarta parte de los valores registrados en la cabeza del epidídimo adulto (51 vs. 192 n moles/mg proteína) (132).

6) Análisis de Zinc en tejido epididimario prepuberal.

Se sabe desde hace mucho (133) que el Zn está presente en el tracto genital masculino en altísimas concentraciones, especialmente en el próstata dorso-lateral (134) en donde se localizó por métodos histoquímicos (135) en la parte apical del citoplasma, aparentemente asociado a una organela no relacionada con el aparato de Golgi (136).

Tanto la captación de ⁶⁵Zn como el contenido endógeno de este catión en el tejido prostático, parecen estar sujetos a regulación hormonal (137, 138, 139), existiendo generalmente una relación inversa entre la respuesta de dichos parámetros ante un

dado tratamiento hormonal.

La castración provoca en todos los casos una caída en los niveles de Zn. La testosterona administrada a ratas adultas intactas disminuye la captación ^{65}Zn en el tejido (probablemente esto se deba a saturación de sitios de unión del catión a ciertas proteínas)(140), mientras la restituye en animales castrados y no produce ningún efecto en ratas inmaduras intactas.

Sin embargo, la testosterona administrada a ratas macho castradas inmaduras previene la caída en la captación de ^{65}Zn provocada por la orquidectomía, y el 17β -estradiol la aumenta a niveles de rata adulta intacta, sin restituirse el trofismo de los órganos.

Cabe señalar que el 17β -estradiol provoca una caída en los niveles de Zn en los animales maduros intactos.

También el Zn testicular parece ser sensible a ciertas hormonas peptídicas como la prolactina, LH, HCG y FSH (138,139), postulándose que el aumento de captación de ^{65}Zn testicular provocado por LH en animales hipofisectomizados, se debe a un incremento en la relación androstenediona/testosterona, mientras la depleción de la captación por FSH se debe a producción incrementada de estrógenos en las células de Sertoli, con el consiguiente efecto inhibitorio.

La prolactina, actuando sinérgicamente con LH, parece tener también importantes efectos estimulatorios sobre la captación de ^{65}Zn en la próstata dorso-lateral (138).

Pese a todos estos estudios, recopilados por D. Byar (141), la función del Zn en el tracto masculino no está bien esclarecida.

Por un lado, la prostatectomía dorso-lateral, con la consiguiente disminución de la concentración Zn en el eyaculado, no altera la fertilidad ni la fecundidad (142), hecho que llevó a postular que las altas concentraciones de Zn en el tracto genital masculino sólo representan un remanente evolutivo arcaico, ya carente de importancia funcional. (142)

Sin embargo, Bertrand y Vladesco (133) detectaron niveles aumentados de Zn en el testículo de los conejos durante la época de apareamiento, mientras Timm y Schulz (143) encuentran que el EDTA, complejante del catión, produce deficiencias testiculares.

Otros autores (144), demuestran los requerimientos de Zn para un eficaz desarrollo de la espermatogénesis y supervivencia del epitelio germinativo, y Quinn (145) logró inhibir fuertemente a la DNAsa I de espermatozoide de carnero con $Zn\ 10^{-4}M$.

Como el contenido en DNA del espermatozoide parece estar relacionado directamente con la fertilidad, la degradación de dicho ácido nucleico podría estar controlada fisiológicamente con adecuados niveles de Zn en la célula.

Por último se demostró en nuestro laboratorio (113) que el Zn^{++} era un inhibidor "in vitro" de la $5\ \alpha$ -reductasa epididimaria, como lo era para su homóloga prostática (115, 211),

sugiriéndose así que el Zn, eventualmente unido a factores proteicos (146, 148), polipeptídicos (147) o a polisacáridos ácidos (140), constituya uno de los mecanismos de regulación de esta enzima.

Esto tendría importantes consecuencias al controlarse así la producción de metabolitos 5α -reducidos. A este respecto es interesante remarcar que Habib y coll. (149) demostraron que en las hipertrofias y carcinomas de próstata humanas, donde posiblemente estén fallando los mecanismos de control fisiológicos, la acumulación de Zn está directamente relacionada con la concentración de DHT y no de Testosterona, en el tejido.

Todos estos hechos justifican el medir Zn endógeno en ratas prepúberes, tanto del punto de vista regulatorio de enzimas, como el de la preparación del epidídimo a recibir los espermatozoides del testículo, y también como reflejo de la situación hormonal de ese período, al ser la concentración de Zn tisular regulable por hormonas esteroideas y peptídicas.

Los resultados de las mediciones de Zn endógeno en tejidos epididimarios a las distintas edades prepuberales se muestran en la Tabla 12 y en la Figura XV

Corresponden al promedio de dos experimentos diferentes, realizados por triplicado.

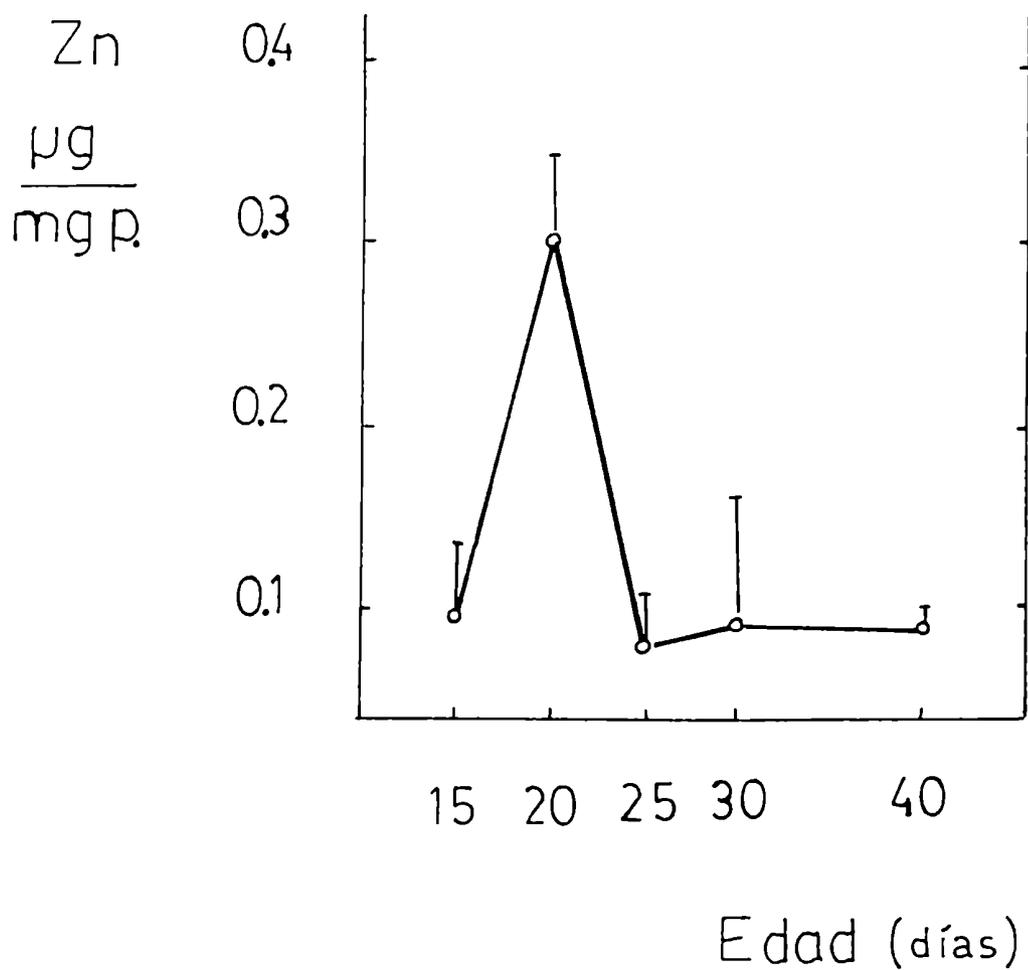
TABLA 12

Contenido de Zn en los tejidos epididimarios de distintas edades, expresados por peso húmedo y por órgano.

| EDAD | $\mu\text{g Zn/g tej.} \pm \text{SD}$ | $\mu\text{g Zn/2 epid.}$ |
|------|---------------------------------------|--------------------------|
| 15 | 10.65 | 0.113 |
| 20 | 36.10 \pm 7.56 | 0.859 |
| 25 | 12.58 \pm 4.84 | 0.537 |
| 30 | 11.65 \pm 11.67 | 0.704 |
| 40 | 12.48 \pm 1.87 | 1.544 |
| 90 | 40.0 \pm 3.0 | 28.00 |

FIGURA XV

Concentración endógena de Zn en tejido epididimario a lo largo de la edad prepuberal, medida por absorción atómica.



Aparece un alto valor en el contenido de Zn por 100mg de protefna a los 20 días de edad, el cual casi triplica los valores anteriores y posteriores (30 μ g/100mg protefnas contra 8 μ g/100mg protefnas aproximadamente).

Sin embargo, fuera de ese pico, el contenido de Zn en el epidídimo de ratas prepuberales es aproximadamente la cuarta parte de los niveles encontrados en la rata adulta (40 μ g/g. tejido, Tabla 12).

Cabe señalar que Parížek y coll. (221), utilizando análisis de radioactivación, midió el contenido de cinc en testículos de ratas de distintas edades y encontró valores más bien constantes entre los 7 y 18 días de edad. Recién a los 35 días la concentración (\cong 20 μ g/g) se duplicaba (46 μ g/g).

Si bien no posee datos entre 20 y 30 días, el perfil de cinc testicular, dependiente del contenido de este catión en los espermatozoides maduros, parece ser algo distinto del del epidídimo, aunque las concentraciones son del mismo orden.

Las evidencias histológicas permiten descartar por otra parte cualquier intervención de espermatozoides, aún inmaduros en el contenido de Zn epididimario antes de los 40 días de edad.

7) Análisis de Protefnas Epididimarias Específicas (PEE).

Diferentes grupos de trabajo han informado acerca de la existencia de protefnas epididimarias específicas en varias espe-

cies animales (150,110,151,44,).

En nuestro laboratorio (110), utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida, se pudo detectar la presencia de tres bandas proteicas específicas de epidídimo de rata (PEE). Estas presentan movilidad de pre-albúminas, y se denominaron arbitrariamente C, D y E.

En estudios más recientes (152), se caracterizaron las proteínas que presentan bajo peso molecular ($C \simeq 23000$, D y E 35000), son acídicas, (PI: 5.56, 5.12, y 4.95 para C,D y E respectivamente) y reaccionan como glicoproteicas (tinción de PAS positiva).

El análisis electroforético de citosol de epidídimo de ratas castradas y castradas con tratamiento androgénico indican que la síntesis de C,D y E es andrógeno-dependiente (110). A idénticas conclusiones se llegó utilizando la técnica de fijación de complemento con antisueros específicos contra las PEE (155).

Según Dyson y col. (153) y Lubicz-Nawrocki (154) los andrógenos circulantes son importantes para el desarrollo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, y para el mantenimiento del epitelio epididimario secretor.

Es más, una reciente comunicación de M.C. Orgebin-Crist y Jahad informan (223) acerca de la estricta dependencia de la maduración de la secreción de ciertas proteínas al lumen epididimario.

La suposición de que las PEE puedan estar involucradas en el proceso de maduración de los espermatozoides tomó aún más consistencia cuando técnicas de inmunofluorescencia (155) evidenciaron una asociación de las PEE a los espermatozoides.

Prosiguiendo con nuestro estudio del epidídimo prepuberal en relación a su estado hormonal, se decidió incluir el desarrollo ontogénico de las PEE como parámetro de la actividad secretoria andrógeno-dependiente por parte del epitelio epididimario.

Para ello se prepararon citosoles de epidídimos de distintas edades, y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida conjuntamente con un citosol de rata adulta. En todos los casos, la cantidad de proteínas citosólicas totales aplicadas a cada gel (60ug/gel), fue igual, obteniéndose así un perfil comparativo.

El resultado se observa en la figura XVI .

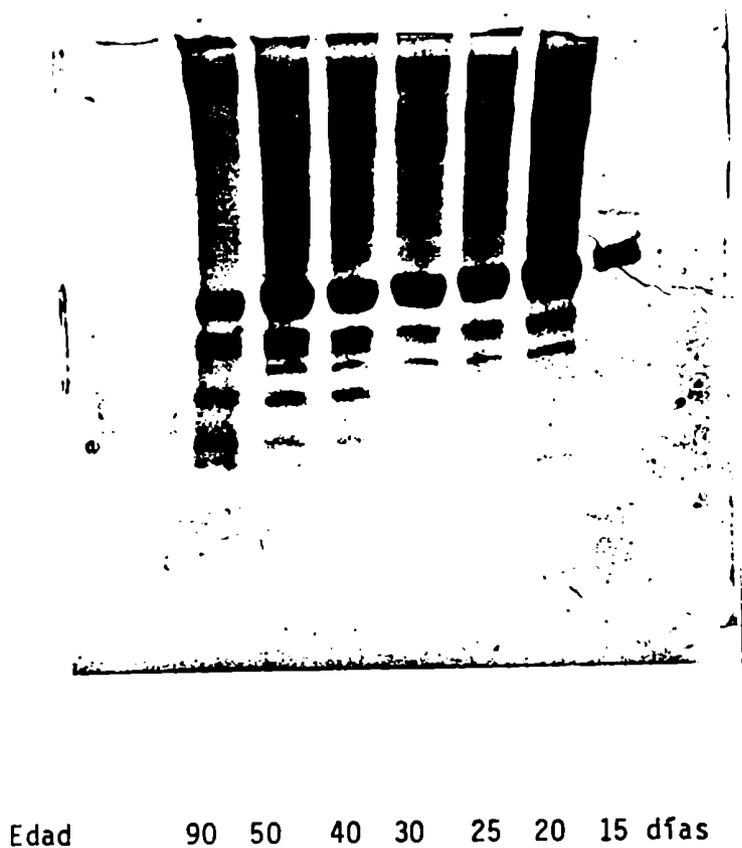
A los 15 días de edad, no se detecta en absoluto la banda C, siendo apenas visible la D-E (no separables por esta técnica).

A los 20 días de edad ya aparece la C, y la DE es bastante intensa. A partir de esa edad, la intensidad de las bandas va aumentando gradualmente e incluso a los 40 y 50 días se discriminan bien D y E. Sin embargo éstas últimas no llegan a tener la importancia observable en el gel correspondiente a la rata adulta.

Se puede concluir que las PEE existen desde temprana edad, evidenciando por lo tanto una cierta actividad secretoria en el e-

FIGURA XVI

Perfil electroforético de las proteínas específicas epididimarias (PEE), de citosoles de ratas de distintas edades.



pidídimo, estimulada quizá por los andrógenos prepuberales.

En la Tabla 13 se muestran los niveles de PEE determinados según la técnica de fijación de complemento, puesta a punto en nuestro laboratorio según descrito por Kohane et al (229).

Los datos corroboran los resultados obtenidos cualitativamente a partir de la intensidad de bandas en geles de poliacrilamida:

Las proteínas específicas epididimarias ya están presentes en el citosol de rata a los 20 días de edad, y su concentración aumenta sin sobresaltos hasta los niveles adultos(5,40 Unidades $\times 10^{-5}$ /mg de proteína) .

TABLA 13

Contenido en proteínas específicas epididimarias medidas por la técnica de fijación de complemento.

| EDAD (días) | P E E $U^a \times 10^{-5} / \text{mg prot.}$ |
|----------------|---|
|----------------|---|

| | |
|----|-----------------|
| 15 | no detectable |
| 20 | 0.20 \pm 0.08 |
| 25 | 0.43 \pm 0.1 |
| 30 | 0.80 \pm 0.13 |
| 40 | 1.88 \pm 0.18 |
| 50 | 1.79 \pm 0.14 |
| 90 | 5.40 \pm 0.55 |

a: Los resultados se expresan en unidades (U) $\times 10^{-5}$ por mg de proteína, definiéndose una unidad como la cantidad de PEE contenida en 1.4ng de proteína epididimaria soluble.(152)

DISCUSION 2º Parte

(Desarrollo ontogénico de la actividad de la 5α -reductasa y 3-ol-deshidrogenasas en el epidídimo de la rata. Correlación con el trofismo y la función del órgano)

De estos estudios surge, primeramente, que existe en el epidídimo de la rata prepúber una actividad metabolizante de la testosterona bastante intensa, al expresarse ésta por peso húmedo de tejido. Más aún, se nota un claro aumento de las actividades in vitro de la 5α -reductasa y 3-ol-deshidrogenasas entre los 20 y 30 días, con un máximo a los 25 días, lo cual resulta en una importante producción neta de 5α -androstanoles. Parece haber una síntesis enzimática selectivamente estimulada respecto del total de proteínas, pues, si bien éstas están en proporción relativamente alta respecto del total de componentes del peso húmedo (Fig XII), la actividad específica de las enzimas sigue siendo máxima (Figuras IX A y X). En tanto, la actividad 5α -reductora total (por órgano) crece continuamente (Fig IXB) con la edad, la actividad de la 3-ol-deshidrogenasa presenta una curva bifásica. (Tabla 4).

Todo indica que el órgano prepúber está capacitado para responder a estímulos hormonales (43,119), y si asumimos la andrógeno-dependencia de las 5α -reductasa (1ª parte,

95) y 3- α -deshidrogenasa (96,97,173), se puede suponer que su estimulación temprana se deba a efectos androgénicos.

Sin embargo, los aportes testiculares de testosterona no son importantes en el momento en que se registra la máxima actividad enzimática *in vitro* (25 días). Tanto nuestros datos de radioinmunoensayo (Tabla 6), como trabajos de otros grupos (17,18,117,174, 218) muestran precisamente en esa etapa del crecimiento un mínimo de T, y en nuestro caso,

de andrógenos totales en el tejido estudiado, si bien la cantidad relativa de 5 α androstandiol está aumentada (17,18,175).

Por lo tanto, podemos deducir que, o bien la estimulación androgénica de las enzimas se produce más tempranamente (10-20 días), cuando la secreción de T es importante (18,174,218), y que a los 25 días sólo se aprecia el fenómeno estimulador con retardo, o bien que intervienen otros factores regulatorios. Tampoco se puede descartar la ocurrencia simultánea de ambas posibilidades, ni un efecto particular de los compuestos 5 α reducidos testiculares sobre las actividades enzimáticas.

La menor relación diol/DHT encontrada al medir los niveles androgénicos endógenos respecto de los ensayos de metabolización *in vitro* podrían quizá explicarse en base a una distinta velocidad de eliminación o degradación del diol comparada con la DHT. Así, el diol podría formarse en cantidades

relativamente importantes, como se evidenció in vitro, ejercer eventualmente sus acciones y desaparecer bastante rápidamente. Mientras tanto la DHT podría quedar retenida más selectivamente en la célula blanco, incluso permaneciendo en el núcleo de la misma.

De todas maneras, aunque la situación hormonal endógena no refleje enteramente la situación que sugieren los ensayos de metabolización de T in vitro, los androstandioles están aumentados respecto de los niveles adultos durante la pubertad de la rata, tanto a nivel epididimario como testicular (18)

y plasmático (19,117), por lo cual se puede hablar de actividad 3-ol-deshidrogenasa aumentada. Los compuestos C¹⁹ 5 α -reducidos forman en el tejido epididimario más del 90% del andrógeno total entre los 15 y 25 días, sin contar la androsterona que también parece levemente aumentada (17, 73). Estos compuestos podrían considerarse responsables de las diversas estimulaciones tróficas y metabólicas sobre su órgano blanco durante la etapa prepuberal.

En cuanto a efectos no directamente androgénicos que puedan mediar esta producción incrementada de dioles durante la pubertad, podemos pensar en las hormonas peptídicas hipofisarias, sujetas a grandes cambios durante ese período.

Se ha descrito por ejemplo, que la FSH podría actuar

directamente sobre la 5α -reductasa de tejido cerebral (168), además de su papel inductor (36) de receptores testiculares para LH. A este respecto, se informó (36) acerca de un pico en la concentración de receptores testiculares para FSH entre los 10 y 20 días, correlacionado con el asentamiento de una nueva población de células de Leydig (176), conteniendo receptores para LH de alta afinidad (174).

Esto trae aparejado una definida estimulación de la esteroidogénesis a partir de los 20-25 días de edad, con las consiguientes consecuencias regulatorias a nivel de tejidos blanco de andrógenos como el epidídimo.

La prolactina es otra hormona hipofisaria cuyos efectos estimulatorios directos, o bien sinérgicos, con los de otras hormonas se estudian con cada vez más interés. Actúa sobre el tracto reproductivo masculino estimulando el trofismo (177, 178, 179) y la esteroidogénesis (179, 180, 181), comunicándose incluso efectos más específicos sobre enzimas como la 3β -OH-deshidrogenasa testicular (179, 182) o la 5α reductasa periférica (183, 184). Si tenemos en cuenta que Negro-Villar (185) detectó un pico en los niveles de prolactina sérica de rata a los 25 días, que esta hormona provoca un incremento en la captación de andrógeno en núcleos epididimarios (224), existiendo además receptores para dicha hormona en el órgano prepúbico (186), no es exagerado suponer alguna intervención de prolactina en el pico de androstandiol registrado a los 25 días.

Sean cuales fueran las causas de la actividad in vitro incrementada de la 5α -reductasa y 3- α -deshidrogenasas en el epidídimo prepuberal, tiene dos importantes consecuencias: primero, garantiza una metabolización intensiva de los bajos aportes testiculares de T a productos 5α -reducidos y 5α -3- α reducidos, eventualmente más activos en el órgano efector en desarrollo, segundo, si aceptamos la hipótesis de la difusión simple como mecanismo de acceso del esteroide a la célula, al ser consumida activamente la T que entra mediante la reacción mencionada, se vería favorecido el gradiente de concentración extra/intracelular, y por consiguiente se mejora el acceso del andrógeno, todavía escaso, a la célula blanco.

El análisis de los distintos parámetros tróficos y funcionales del epidídimo prepuberal puede indicar pautas en lo que se refiere a su andrógeno-dependencia. Y esto, tanto bajo el punto de vista cuantitativo (qué niveles de andrógeno son necesarios para producir tal acción), como cualitativos (qué andrógeno es más efectivo en lograr dicha acción).

Ya está bastante bien establecido que la DHT es un andrógeno más potente que la testosterona, principalmente porque se une con mayor afinidad que ésta al receptor específico (76). Se la considera responsable de todos los eventos genómicos relacionados con el mecanismo clásico de acción de hormonas esteroideas (188), que tienen por consecuencia efectos hiperplásicos, hipertróficos y biosíntesis específica

de proteínas en el tejido efector.

La testosterona, además de lograr estos efectos con menor eficiencia, podría tener funciones más específicas relacionadas con la expresión de caracteres sexuales secundarios (188).

En cuanto a los 5α -androstano 17β -3 (α, β)-dioles, se los consideró primeramente metabolitos inactivos de la DHT (68,219), con la única función de controlar los niveles de andrógeno activo (DHT), mediante la transformación reversible de ésta a productos 3-ol-reducidos.

Para el caso del animal prepúber, según éste enfoque, supondríamos lo siguiente: tanto la 5α -reductasa como la 3-ol-deshidrogenasa son dependientes de T, pero la 3-ol-deshidrogenasa sería más sensible a esta estimulación durante esa etapa (vía Prl? (187) yaumentaría transitoriamente su actividad, para eliminar así andrógeno innecesario.

Esta hipótesis se vería reforzada por el hecho de que los dioles están aumentados en la etapa senil de la rata, coincidentemente con una actividad sexual declinante (213).

Sin embargo la literatura reciente informando sobre acciones biológicas de los androstandioles es bastante considerable. Se asignan a los 3α ó 3β dioles, según los casos, acciones estimuladoras tróficas, proliferativas o secretorias (189, 190, 191, 192, 193, 194). Incluso el 3α diol parece estimular específicamente, in vitro, a la

ARN polimerasa prostática de la rata (195), garantizar la supervivencia del espermatozoide de hamster (al cual se le habfa practicado una ligadura a nivel del conducto deferente) (196), mantener la espermatogénesis y el trofismo testicular de animales hipofisectomizados (189). El isómero 3β parece controlar, junto con la DHT, la actividad de la fosfatasa ácida en la próstata de rata (214). Otros autores asignan a los dioles, particularmente al 3β diol (para el cual se ha aislado recientemente un receptor específico en hipófisis (86),) roles de retroalimentación o regulación de la pubertad a nivel de estructuras superiores (117,197,198).

Los mecanismos por los cuales los dioles ejercerían estos efectos posiblemente excluyan la unión a los receptores citoplasmáticos y nucleares de andrógenos, para los cuales presentan poca afinidad (199,201), postulándose en cambio acciones a nivel citoplasmático (188), no bloqueables por Actinomicina D (194), involucrando quizás la activación de la adenilatociclasa (194,200,201). S. Ohno (203) ha sugerido que el diol, podría unirse a ciertos mARN, con una eficiencia mayor o igual que la de la T, lo que permitiría así la traducción de éstos a nivel ribosomal (188,202,203). Otros autores están más inclinados a pensar que el diol actuaría luego de su transformación a DHT (214,171),y aunque no siempre se encontró una relación dosis-respuesta de diol y DHT compatible con tal

posibilidad (193,196,220), las evidencias hasta la fecha la señalan como la hipótesis más plausible.

En nuestro estudio del epidídimo prepuberal, la mayor producción in vitro de 5α -androstanoles parece coincidir con fenómenos proliferativos en ese tejido: a los 25 días se triplicó el contenido en ADN por peso húmedo y la incorporación de ^{14}C -Timidina es tres veces mayor que a los 30 días de edad. Nuestros resultados confirman los de Majumder y Turkington (1975)(227), en el sentido en que observamos el mismo brusco incremento en la incorporación de timidina radiactiva en el ADN de epidídimos de 25 días. Sin embargo, no hemos detectado como estos autores un segundo pulso en la síntesis de ADN luego de los 40 días, ni tampoco hemos observado a esa edad un aumento en el índice mitótico.

El efecto androgénico sobre la síntesis de ADN está bastante estudiado, sobre todo en tejido prostático (204,205,206,207,208,209). Se ha visto por ejemplo, que tarda de 48 hs a 72 hs en expresarse y que es bloqueable por acetato de ciproterona (sugiriendo este último hecho un mecanismo involucrando receptores, del cual estaría por lo tanto excluido el diol). Sin embargo se han descrito (192,193) efectos estimulatorios de la proliferación en órganos blanco de andrógeno por parte del 3α -diol. Quizá sea entonces razonable relacionar la presencia de este compuesto con el aumento de ADN a temprana edad, no pudiéndose concluir sin embargo de estos experimentos, si la acción se ejerce exclusivamente por intermedio de la DHT.

Los datos histológicos también tienden a mostrar que las actividades proliferativas ocurren a temprana edad (15-20-25 días), cuando la metabolización in situ de la T es más activa, y notoriamente, en presencia de grandes cantidades de díoles en el tejido.

En cambio, las actividades diferenciativas, (adecuada disposición espacial de las células epiteliales, desarrollo de vacuolas secretorias, esterocilias y nuevos tipos celulares), cobran importancia más adelante, cuando el perfil hormonal se acerca, al menos cualitativamente, al de la edad adulta.

Si bien el contenido relativo de las proteínas es más alto en la prepubertad que en la rata de 90 días (Tabla 7), así como la relación porcentual de peso seco del tejido, el nivel proteico por órgano no aumenta decididamente hasta después de los 30 días. Es a partir de esta etapa que se hacen importantes los niveles de receptores epididimarios específicos para DHT (210), así como los aportes testiculares de T (18,19,174), no sólo por mayor actividad de las células de Leydig, sino también por mayor síntesis de ABP por las células de Sertoli (34), con la consiguiente mejora en el suministro de andrógeno al epidídimo por vía luminal.

Se podría entonces deducir que la biosíntesis general de proteínas está regida por mecanismos que recién funcionan en la adultez, mientras la proliferación celular epididimaria ocurre en una etapa más temprana.

A conclusiones similares se puede llegar analizando las concentraciones de GPC y PEE (Tablas 11 y 13). Estas son bajas a los 15-20 días de edad yaumentan del mismo modo en que lo hacen los andrógenos. La concentración de proteínas específicas epididimarias

(PEE), cuya interacción con los espermatozoides sugiere una función en la maduración de los mismos (229), no mostró ningún cambio particular durante la etapa considerada.

Tampoco lo hizo la glicerilfosforilcolina (GPC), la cual fue aumentando lentamente, coincidiendo nuestros resultados con los de Brooks Hamilton y Mallek (126). Sin embargo, datos presentados por Setty y Jehan (226) mostraban un mínimo de GPC a los 35 días.

Existe cierta discrepancia en los datos de la literatura sobre ácido siálico en el epidídimo en desarrollo: Mientras Brooks (89) encontró un continuo aumento durante esa etapa, Setty y Jehan (226) no detectaron mayores variaciones, y Prasad y Rajalakshmi (124) describen un pico entre los 30 y 40 días de edad. Nuestras mediciones, realizadas en tres experimentos diferentes por duplicado muestran niveles relativamente apreciables de ácido N-acetil-neuramínico durante la edad prepuberal, con un moderado aumento a partir de los 25 días. El hecho que la concentración de ácido siálico sea alta en la etapa prepuberal tiende a sugerir que, o bien el nivel y la composición de andrógenos son adecuados desde los 15 días para la secreción de ácido siálico, o bien ésta no es andrógeno-dependiente, mientras que posteriores eventos relacionados con su función (unión a proteínas luminales (56) y al espermatozoide) sí lo sean, quedando de todas maneras postergados hasta la adultez.

No se explica hasta el presente el alto nivel de Cinc endógeno a los 20 días, pero hay claras evidencias de que las concentraciones de Zn y la metabolización de T en un tejido están correlacionados (212). Además del hecho de que las concentraciones de $10^{-6}M$ o

mayores ($10^{-3}M$) inhiben la actividad in vitro de la 5α -reductasa epididimaria (113), estudios en próstata humana (211,212,215) parecen indicar un efecto difásico del catión sobre la(s) enzima(s). Altas concentraciones ($10^{-3}M$), así como muy bajas concentraciones ($10^{-9}M$), la inhiben, mientras $10^{-7}M$ parece estimularla.

Por otro lado, hay evidencias que el Cinc está presente en los espermatozoides, siendo agregado a los flagelos durante la espermatogénesis y localizándose preferentemente en una proteína del tipo de las queratínas hallada en las fibras densas y pieza conectora de dicha estructura (Calvin, 1975 (119)). La inmadurez de las células germinales a los 20 días hace improbable la intervención directa de las gametas en el pico endógeno de cinc epididimario.

También el hecho que dicho pico coincide con muy altas actividades in vitro de 5α -reductasa sugiere que la acción inhibitoria descripta in vitro no se ejercería in vivo, o que al menos la enzima y el catión se encuentran en distintos compartimentos celulares, sin interacción mutua.

Se requieren de todas maneras estudios más detallados concernientes a la posible función de este catión sobre el epidídimo, por ejemplo su unión a macromoléculas específicas y su posible rol regulatorio.

En conclusión, el epidídimo de la rata prepúber es un órgano metabólicamente activo, visiblemente sensible a determinadas hormonas. Los 25 días de edad parecen ser un período crítico para el desarrollo del sistema reproductivo, tanto a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal como al de órganos blanco de andrógenos.

En el epidídimo, un incremento transitorio en la producción de andrógenos 5α -reducidos (a través de una mayor actividad de las enzimas metabolizadoras, 5α -reductasa y 3-ol-deshidrogenasas) coincide con una fase de proliferación celular y con un punto de inflexión en la curva de crecimiento.

Parámetros de importancia aún no bien esclarecida en el epidídimo tienen variaciones en esta etapa (Zn,NAN), mientras otros, más relacionados con la función epididimaria (GPC,PEE,diámetro tubular), no registran cambios bruscos.

La notoria falta de estimulación de determinadas actividades biosintéticas y/o secretorias, hormono-dependientes en el adulto, contrasta con la intensa actividad replicativa (aumento del contenido en ADN, pico en la incorporación de timidina marcada, duplicación de las figuras mitóticas a los 25 días). Esto da consistencia a la idea, ya sugerida por algunos autores (209), de que las hormonas esteroideas regulan los distintos aspectos de la vida celular de manera relativamente independiente. Los factores involucrados en cada uno de ellos presentarían así distinta sensibilidad y especificidad ante una estimulación hormonal. Es decir, una cierta hormona podría en un momento dado producir una buena respuesta proliferativa y ninguna de tipo diferenciativo, mientras otro tratamiento puede afectar la biosíntesis de una dada enzima y no alterar la población celular.

La estimulación diferencial de sólo algunos de los parámetros andrógeno-dependientes epididimarios durante el período de mayor producción de compuestos 5α -reducidos, podría explicarse en base a un "ciclo programado de proliferación celular", según fue postulado por Majumder y Turkington (1976) (227). Alternativamente, se podría deber a las limitaciones intrínsecas de la actividad biológica del 5α -androstandiol, el cual como se vio anteriormente, constituye el principal andrógeno producido tanto por el testículo como por el epidídimo en ese momento. La relativa falta de afinidad del diol por los receptores (comparada con la de la DHT), sería bajo esta perspectiva, particularmente significativa.

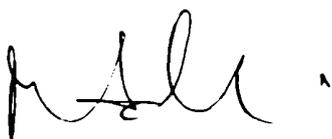
Nuestros estudios tienden a mostrar que no todas las estructuras existentes en una célula blanco maduran simultáneamente bajo el punto de vista hormonal; por el contrario, se pueden registrar desfasajes o incluso incompatibilidades (por ejemplo entre la ocurrencia simultánea de proliferación y diferenciación según visto por Bruchovsky y colaboradores (209)) entre los distintos parámetros: Algunos responderán tempranamente (proliferación celular, actividades enzimáticas, etc), otros, (proteínas, secreciones específicas) no pueden todavía expresarse ante el mismo estímulo hasta que el órgano, y quizás incluso el animal mismo, no estén en condiciones de utilizarlos.

De un punto de vista mecanístico, se puede concebir que el sistema de receptores androgénicos del epidídimo en desarrollo carece aún de aptitud para estimular uniformemente al conjunto de genes regulados por los andrógenos. La existencia de distintas poblaciones de sitios receptores (de diversa afinidad y capacidad, y por tanto

de distinta sensibilidad ante el estímulo), postulada en otros sistemas blanco de hormonas esteroideas (22g), podrían explicar la dualidad en las respuestas evidenciada aquí.

En cuanto a la importancia ontogénica de esta sensibilidad diferencial ante el estímulo androgénico, aparece como probable que las células epiteliales epididimarias no empiezan a secretar sus productos específicos hasta que el órgano no haya llegado, mediante duplicaciones sucesivas, al número conveniente de células, y a su vez, que el testículo haya iniciado su producción de espermatozoides (espermiación).

Lo que queda aún por investigar es cómo se logra, a nivel molecular, esa compleja sincronización de eventos, la cual incluye probablemente mecanismos regulatorios centrales, capaces de integrar armoniosamente los múltiples cambios involucrados en la maduración sexual de un mamífero.

A handwritten signature in cursive script, appearing to be 'P. H. L.' followed by a small mark.A handwritten signature in cursive script, appearing to be 'I. J. Blazynski'.

BIBLIOGRAFIA

1. Steinberger E. y Steinberger A. en Handbook of Physiology, Section 7, Vol V, p. 1-19; D. Hamilton y R. O. Greep (editores); American Physiological Society, Washington, (1975).
2. Leblond C.P. y Clermont Y.; Ann. N.Y. Acad. Sci. 55: 548-573, (1952).
3. Sertoli E., Il Morgagni 7:31-39 (1865).
4. Von Ebner V.; en A.Kölliker's Handbuch der Gewebelehre der Menschen (6th ed.) vol 3, Leipzig (1902).
5. Roshoven E., Z.Zellforsch. Mikroskop. Anat. Abt. Histochem. 33: 439-460 (1945).
6. Vilar O., Perez del Cerro M.I. y Mancini R.E., Exptl. Cell. Res. 27:158-161 (1962).
7. Fawcett D.W., en Handbook of Physiology section 7, vol V, p. 21-55, D. Hamilton y R. Greep, (editores) American Physiological Society, Washington (1975).
8. Maximow A., Beitr. Pathol. Anat. Allgem. Pathol. 26: 230-319 (1899).
9. Clegg E.J. y Macmillan E.W.; J. Anat. (London) 99:219-229 (1965).
10. Lacy D. y Pettit A.J.; Brit. Med. Bull. 26:87-91 (1970)
11. Hasson V., Ritzén E.M., French F. y Nayfeh S., en Handbook of Physiology, Section 7, Vol V, p.173-201. D. Hamilton y R. O. Greep, (editores) American Physiological Society, Washington (1975).

12. Flickinger C.J., Z.Zellforsch Mikroskop. Anat. 78:92-113 (1967).
13. Leydig F., Z.Wiss. Zool. 2:1 (1.850)
14. Bouin P. y Ancel P. Arch. Zool. Exptl. gen. 1:437-523 (1903).
15. Frasier S.C. y Horton R. Steroids 8:777-784 (1966).
16. Lindner H.R. y Mann T. J. Endocr. 21:341-360 (1960).
17. Nayfeh S.N., Barefoot Jr. S.W. y Baggett B. Endocrinology 78:1041-1048 (1966).
18. Podestá E.J. y Rivarola M.A., Endocrinology 95:455-461 (1974).
19. Moger W.H., Endocrinology 100:1027-1032 (1977).
20. Bell J.B.G., Vinson G.P. y Lacy D., Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B. 176:433-443 (1971).
21. Lacy D. y Pettit A.J., Micron. 1:15-33 (1969).
22. Hall P.F., Irby D.C. y de Kretser D.M. Endocrinology 84:488-496 (1969).
23. Christensen A.K.; en Handbook of Physiology Section 7, vol V, p. 57-94. D.Hamilton y R.O.Greep (editores). American Physiological Society, Washington (1975).
24. Eik-Nes K.B. en Handbook of Physiology Section 7, Vol.V p. 95-115. D. Hamilton y R.O.Greep (editores) American Physiological Society, Washington (1975).
25. Johnson B.H. y Ewing L.; Science 173: 635-637 (1971).

26. Lostroh A.J., *Endocrinology* 85:438-445 (1969).
27. Greep R.O., Fevold H.C. y Hisaw F.L., *Anat. Record* 65: 261-271 (1936).
28. Smith P.E.; *Amer. J. Anat.* 45:205-273 (1930).
29. Eik-Nes K.B. *Recent Progr. Hormone Res.* 27:517-535 (1971).
30. Eik-Nes K.B., *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* 2:87-100 (1969).
31. Speroff L. y Ramwell P.W. *J. Clin. Endocr. Metab.* 30: 345-350 (1970).
32. Murad F., Stranch B.S. y Vaughan M. *Biochem. Biophys. Acta* 177:591-598 (1969).
33. Marsh J.M., *Advan. Exptl. Med. Biol.* 2:213-227 (1968).
34. Hansson V., Reusch E., Trygstad O., Torgensen O., Ritzén E.M. y French F.S.; *Nature (New Biology)* 246: 56-58 (1973).
35. Gupta D., Rager K., Pfister G. y Voigt W. *Steroids* 21: 17-23 (1973).
36. Odell W.D. y Swerdloff R.S. *Recent Prog. Hormone Res.* 32:245-288.
37. Price D. y Williams-Ashman H.G.; en *Sex and Internal Secretions* (3a ed.) P. 366-488 W.C.Young (editor) Williams & Wilkins, Baltimore (1961).
38. L.F. Cavazos; en "Handbook of Physiology" Sec. 7, vol.V, D.Hamilton y R.O.Greep (editores) American Physiologi-

- cal Society, Washington p. 353-381., (1975).
39. Burgos M.H.; en *Male Accessory Sex Organs. Structure and Function in Mammals.* p.151-160; D. Brandes (editor) Acad. Press, Nueva York (1974).
 40. Montorzi N.M. y Burgos M.H., *Z.Zellforsch Mikrosk. Anat.* 83:58-69 (1967).
 41. Hamilton, W., en *Handbook of Physiology Section 7, vol.V,* p. 259-301. D.Hamilton y R.O.Greep (editores) American Physiological Society, Washington (1975).
 42. Martan J., *Biol. Reprod., Suppl* 1:134-154 (1969).
 43. Reid B.L. y Cleland K.W. *Australian J.Zool.* 5:223- 246 (1957).
 44. Lea O.A., Petrusz P. y French F.S. *Internat. Androl. Suppl.* 2:592-607 (1978).
 45. Blaquier J.A., Cameo M.S. y Burgos M.H., *Endocrinology* 90: 839-842 (1972).
 46. Bedford J.M.; en *Handbook of Physiology section 7, vol. V,* p.303-338; D.Hamilton y R.O.Greep (editores), American Physiological Society, Washington (1975).
 47. Brandt H., Acott T.S., Johnson D.J. y Hoskins D.D., *Biol. Reprod.* 19:830-835 (1978)
 48. Calvin H. y Bedford J.M., *J.Reprod. Fertil. Suppl.* 13: 65-75 (1971).
 49. Scott T.W. y Dawson R.M., *Biochem. J.* 108:457-463 (1968).

50. Setchell B. P. Scott T. W., Voglmayr J. K. y Waites G. M. Biol. Reprod. Suppl. 1:40-66 (1969).
51. Gledhill B. L.; J. Reprod. Fertil., Suppl. 13:77-88 (1971).
52. Glover T. D.; Nature 190:185 186 (1961).
53. Fawcett D. W., Internat. Rev. Cytol. 7: 195-235 (1958).
54. Nicander L., Acta Morphol. Neerl-Scand. 1:99 118 (1957).
55. Cooper G. W. y Bedford J. M.; Anat. Record 169:300 (1971).
56. Arora R., Dinakar N. y Prasad M. R. N.; Contraception, 11:689-700 (1975).
57. Orgebin-Crist M. C., Danzo B. J. y Davies J.; en Handbook of Physiology, Section 7, vol. V, p.319-337. D. Hamilton y R. O. Greep (editores) American Physiological Society, Washington (1975).
58. Johnson W. C. y Hunter A. G., Proc. Soc. Study Reprod. (USA) 3:8 (1970).
59. Friend D. S., J. Cell. Biol. 41:269-279 (1969).
60. Nicander L., Z. Zellforsch Mikroskop. Anat. 66:829-847 (1965).
61. Marquis N. R. y Fritz I. B., J. Biol. Chem. 240:2197-2200 (1965).
62. Pearson O. J. y Tubbs P. K., Biochem, J. 105:953-963 (1967).
63. Hamilton D. W. y Fawcett D. W.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133:693 (1970).

64. Frankel A.I. y Eik-Nes K.B., J. Reprod. Fertil 23:
441 (1970).
65. Inano H., Machino A. y Tamaoki B.I.; Endocrinology 84:
997 (1969).
66. Scemark R.F. y White I.; J. Endocr. 30:307 (1964).
67. Blaquier J.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:1076
(1971).
68. Bruchovsky N. y Wilson J.D.; J. Biol. Chem. 243:2012
(1968).
69. Mc. Guire J.S. y Tomkins G.M.; J. Biol. Chem. 234:791
(1959).
70. Yoshizaki K., Matsumoto K. y Samuels L.; Endocrino-
logy 102:918-925 (1978).
71. de Larminat M.A. y Blaquier J.A.; Steroids, 31: 129-
138 (1978).
72. Harris M.E. y Bartke A; Endocrinology 96:1396 (1975).
73. Djoseland O., Hansson V. y Haugen H.; Steroids, 4: 773
(1973).
74. Huggins C. y Mainzer K.; J. Exp. Med. 105:485 (1957).
75. Dorfman R.I. y Shipley R.A.; en Androgens, Biochemis-
try, Physiology and Clinical significance, p.118, John
Wiley and Sons Inc., New York (1956).
76. Bruchovsky N. y Wilson J.D.; J. Biol. Chem. 243:5953-
5960 (1968).

77. Anderson K.M. y Liao S.; Nature (London) 219:277 (1968).
78. Gloyna R.E. y Wilson J.D.; J. Clin. Endocr. Metab. 29:970 (1969).
79. Jensen E.V. y Jacobson H.I.; Rec. Progr. Hormone Res. 18:387 (1962).
80. Mainwaring W.I.P. y Peterken B.M., Biochem. J. 125: 285-295 (1971).
81. Fang S. y Liao S.; J. Biol. Chem. 246:16-24 (1971).
82. Parker M.G. y Scrace G.T.; Eur. J. Biochem. 85: 399-406 (1978).
83. Bruchovsky N. y Craven S.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 62:837 (1975).
84. Blaquier J.A. y Calandra R.S.; Endocrinology 93:51 (1973).
85. Hansson V. y Tveter K.J.; Acta Endocrinol. 6:745 (1971).
86. Thieulant M.L., Sampérez S. y Jouna P.; C.R. Acad. Sci. (Paris) Série D 284:1725 (1977).
87. Benoit J., Arch. Anat. Histol. Embryol. 5:173 (1926).
88. Cavazos L.F., Anat. Rec. 132:209 (1958).
89. Brooks D. E.; Biol. Reprod. 18:629-638 (1978).
90. Lubicz-Nawrocki C.M. y Chang M.C.; Biol. Reprod. 9: 295 (1973).
91. Orgebin-Crist M.C., Davies J. y Tichenor P.; en "The regulation of mammalian reproduction" p.189. Charles Thomas, Springfield, (1973).

92. Moore R.J. y Wilson J.D.; J. Biol. Chem. 247:958 (1972).
93. Lee D.K., Bird C.E. y Clark A.F.; J. Steroid Biochem. 5:
609-617 (1974).
94. Nguyen C.T., Duval J.; Sampérez, S. y Jouna, P.; Bio-
chimie 56:899-906 (1974).
95. Djoseland O.; Steroids 27:47-64 (1976).
96. Robaire B., Ewing L.L., Zirkin B.R. y Irby D.C.; Endo-
crinology 101:1379-1390 (1977).
97. Pujol A. y Bayard F.; Steroids 31:485 (1978).
98. Gustafsson J.A. y Pousette A.; Biochem. J. 142:273-277
(1974).
99. Rivarola M.A., Podestá E.J. y Chemes H.E.; Endocrinol-
ogy 91:537 (1972).
100. Burton K., Biochem. J. 62:315 (1956).
101. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J.;
J. Biol. Chem. 193:265 (1951).
102. Pennington R.J., Biochem. J. 80:649 (1961).
103. Avruch J. y Hoelzl D., Biochem. Biophys. Acta 233:334-
347 (1971).
104. Sottocasa G.L., Kuylenstierna B. Ernster L. y Berstrand A.;
J. Cell. Biol 32:415-438 (1967).
105. Van der Vusse G.J., Kalkman M.L. y Van der Molen H.J.;
Biochim. Biophys. Acta 297: 179-185 (1973).
106. Warren L., J. Biol. Chem. 234:1971 (1959).
107. White I.G.; Australian J. Expl Biol. 37:441-450 (1959).

108. Ryley J. F.; *Biochem. J.* 59:353 (1955).
109. Purvis K., Calandra R.S., Haug E. y Hansson V.;
Molec. Cell. Endocr. 7:203 (1977).
110. Cameo M. y Blaquier J.A.; *J. Endocr.* 69:47-55 (1976).
111. Ornstein L.; *Ann., N.Y. Acad. Sci.* 121:321 (1964).
112. Davies B.J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121:404 (1964).
113. Monsalve A. y Blaquier J.A., *Steroids* 30 41-50 (1977).
114. Vreeburg J.T. y Scholte H.R., *Acta Endocrinologica*
Suppl. 177:67 (1973).
115. Frederiksen D.W. y Wilson J. D.; *J. Biol. Chem.*
246:2584-2593 (1971).
116. Gupta D., Rager K., Zarzycki J. y Eichner M.; *J.*
Endocr. 66:183-193 (1975).
117. Rezek D. L. y Whalen R.E.; *Biol. Reprod.* 18:886-891
(1978).
118. Wiebe J. *Endocrinology* 102:775-783 (1978).
119. Calvin HI, Hwang, FHF, Wohlrab, H: *Biol. Reprod.* 13:228-239 (1975)
120. Bosc A.R. y Kar A.B., *Curr. Sci.* 35:336-337 (1966).
121. Hartree E.F. y Srivastava P.N.; *J. Reprod. Fertl.*
9:47-60 (1965).
122. Fournier S.; *Soc. Biol.* 160:1087-1090 (1966).
123. Peyre A. y Laporte P.; *Soc. Biol.* 160:2178-2180 (1966).
124. Prasad M.R.N., Rajalakshmi M. y Reddy P.R.K., *Gynec.*

- Investigation 2:202-212 (1971-1972).
125. Shandilya L.N., Ramaswani L.S. y Shandilya N.; J. Endocr. 73:207-213 (1977).
126. Brooks D. E., Hamilton D.W. y Mallek A.H.; J. Reprod. Fertil. 36:141-160 (1974).
127. Rajalakshmi M. y Prasad M.R.N.; J. Endocr. 41: 471-476 (1968).
128. Dawson R.M., Mann T. y White I.G.; Biochem. J. 65:627-634 (1957).
129. Scott T.W., Wales R.G., Wallace J.C. y White I.G.; J. Reprod. Fertil. 6:49-59 (1963).
130. Wallace J.C., Wales R.G. y White I.G.; Australian J. Biol. Sci. 19:849-856 (1966).
131. Jones R. y Glover T.D.; J. Reprod. Fertil. 34:405-414 (1973).
132. Dawson R.M.C. y Rowland I.W., Quart. J. Exp. Physiol. Med. Sci. 44:26-34 (1959).
133. Bertrand G. y Vladesco R.; C.R. Acad. Sci. 173: 176 (1921).
134. Mawson C.A. y Fischer M.I.; Nature, (London) 167: 859 (1951).
135. Mager M., Mc. Nary W.F. y Lionetti F.; J. Histochem. Cytochem. 1:493 (1953).
136. Rixon R.H. y Whitfield J.F.; J. Histochem. Cytochem. 7:262 (1959).
137. Gunn S.A. y Gould T.C.; Endocrinology 58:443 (1956).

138. Gunn S.A., Gould T.C. y Anderson W.A.D.; J. Endocr. 32:205 (1965).
139. Rosoff B. y Martin C.R., Gen. Comp. Endocrinol. 10:75 (1968).
140. Sato C.S. y Gyorkey F.; Cancer Res. 29:399 (1969).
141. Byar D.P.; en "Male accessory organs. Structure and Function in Mammals", p. 161-171, D. Brandes (editor); Academic Press, Inc. Nueva York, (1974).
142. Gunn S.A. y Gould T.C.; Ameri. J. Physiol. 193:505 (1958).
143. Timm P. y Schulz N.; Histochemie, 7:15 (1966).
144. Millar M.J., Elcoate P.V., Fischer M.I. y Mawson C.A.; Can. J. Biochem. Physiol. 38:1457 (1960).
145. Quinn P.J.; J.Reprod. Fertil. 17:35 (1968).
146. Gunn S.A., Gould T.C. and Anderson W.A.D.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110:32 (1962).
147. Johnson L., Wikstrom S. y Nycander G.; Scand. J. Urol. Nephrol. 3:9 (1969).
148. Reed M.J. y Stitch S.R.; J. Endocr. 58:405-419 (1973).
149. Habib F.K., Hammond G.L., Stitch S.R. y Dawson J.B. J. Endocr. 65:34 (1975).
150. Fournier-Delpech S., Bayard F. y Boulard C.; Soc. Biol. 167:1989 (1973).
151. Koskimies A. y Kormano M.; J. Reprod. Fertil. 34:345 (1975).

152. Garberi J.C., Kohane A.C., Cameo M.S. y Blaquier J.A.; *Mollec. Cell. Endocr.* 13:73-82 (1979).
153. Dyson A.L.M.B. y Orgebin-Crist M.C.; *Endocrinol.* 93:391 (1973).
154. Lubicz-Nawrocki C.M. y Glover T.D.; *J. Reprod. Fertil.* 34:315-329 (1973).
155. Cameo M. y Blaquier J.A.; *J. Endocr.* 69:47-55 (1976).
156. Tomkins G.M.; *J. Biol. Chem.* 225:13 (1957).
157. Shriefers H.; *Advan. Biosci.* 2:69 (1969).
158. Moore R.J. y Wilson J.D.; *Endocrinol.* 93:581-592 (1973).
159. Kniewald Z. y Milkovic S.; *Endocrinol.* 92:1172-1175 (1973).
160. Denef C., Magnus C. y McEwen B.S.; *Endocrinology* 94:1265-1274 (1974).
161. Schriefers H.; *Vitam. Horm.* 25:271-314 (1967).
162. Verhoevens G. y de Moor P.; *Endocrinology* 91:54 (1973).
163. Blaquier J.A.; Trabajo presentado en el 4^o Congreso Argentino de Endocrinología y Metabolismo, Paraná, Entre Ríos, Septiembre 1975, Resúmen N^o 49.
164. de Larminat M.A., Monsalve A., Charreau E.H., Calandra R.S. y Blaquier J.A.; *J' Endocr.* 79:157-165, (1978).
165. Charreau E.H. y Salmoral E.M.; *Endocrine Res. Commun.* 4:311 (1977).

166. Mainwaring W.I.P. y Wilce P.A.; *Biochem. J.*, 130: 189-197 (1972).
167. Cigorruga S.B., Dufau M.L. y Catt K.J.; *J. Biol. Chem.* 253:4297-4304 (1978).
168. Deneff C. y Hautekeete E.; *J. Endocr.* 77:279-286 (1978).
169. Bruchovsky N. y Craven S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62:837-843 (1975).
170. Calandra R.S., Blaquier J.A., del Castillo E. y Rivarola M.A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 97-101 (1975).
171. Milgrom E., en "Hormones, aspects fondamentaux et physiopathologiques", p. 241; E.E. Baulieu (editor), Hermann Editeurs des Sciences et des Arts, Paris (1978).
172. Bruchovsky N.; *Endocrinology* 89:1212 (1971).
173. Ghraf S.; *Acta Endocrinologica* 87:39 (1978).
174. Ketelslegers J.M., Hetzel W.D., Shering R.J. y Catt K.J.; *Endocrinology* 103:212-222 (1978).
175. Ficher M. y Steinberger E.; *Acta Endocrinol.* 68: 285 (1971).
176. Loring D.W. y de Kretser D.M.; *J. Reprod. Fertil.* 29:261 (1972).
177. Yamanaka H., Kirdani R.Y., Saroff J., Murphy G.P. y Sandberg A.A.; *Ann. J. of Physiol.* 229-234 (1975).

193. Schmidt O., Giba-Txiampiri, Rotteck G.V. y Voigt K.D.;
Acta Endocrinologica 73:599-611 (1973).
194. Ritter C.; Molec. Pharmac. 2:125 (1966).
195. Davies P., Fahmy A.R., Pierrepoint C.G. y Griffiths K.;
Biochem. J. 129:1167-1169 (1972).
196. Lubicz-Nawrocki C.M.; J. Endocr. 58:193-198 (1973).
197. Zanisi M., Motta M. y Martini L.; J. Endocr. 56: 315-
316 (1973).
198. Springer C. y Eckstein B.; J. Endocr. 50:431 (1971).
199. Calandra R.S. y Blaquier J.A.; J. Steroid. Biochem.
4:525-531 (1973).
200. Singhal R.L. y Sutherland D.J.B. En "Advances in Sex
Hormone Research", Vol I p.231. J.A.Thomas and R.L.
Singhal (editores). University Park Press, Baltimore (1975).
201. Djoseland O., Hastings C.D. y Hansson V. Steroids 8 : 585-596
(1976).
202. Ohno S., Tofuku R. y Tettenborn N.; Clin. Genet. 2:1
(1971).
203. Ohno S., Nature (London) 234:134-138 (1971).
204. Williams-Ashman H.G. y Reddi A.H. En "Biochemical
Actions of Hormones", vol 2, p.257. G.Litwack (editor).
Academic Press, Nueva York (1972).
205. Epifanova O.I., en "The Cell cycle and Cancer" p.145
R.Baserga (editor) Marcel Dekker, Nueva York (1971).
206. Burckhart E.Z. J. Exp. Zool. 89:135 (1942).

207. Coffey D.S., en "Male accessory organs. Structure and function in mammals" p.307-328. D.Brandes (editor), Academic Press Inc., Nueva York, (1974).
208. Tuohimaa P. y Niemi M. en "Male accessory organs. Structure and function in mammals" p. 329-343, D.Brandes (editor) Academic Press Inc. , Nueva York (1974).
209. Bruchovsky N. y Lesser B., en Cellular Mechanisms modulating Gonadal Action; "Advances in Sex Hormones Research, vol 11, p. 1-55. R.L.Singhal y J.A.Thomas (editores), Univ. Park Press (1976).
210. Calandra R.S., Podestá E.J., Rivarola M.A. y Blaquier J.A. Steroids 24 (4) 507-518 (1974).
211. Wallace A.M. and Grant J.K.; Biochem. Soc. Trans. 3: 540-542 (1975).
212. Habib F.K. J. Steroid. Bioch. 9: 403-407 (1978).
213. Ghanadian R. Lewis JG, y Chisholm GD; Steroids 25:753-762 (1975)
214. Rennie PS, Bruchovsky N. y Hook S.L. J. Steroid Biochem.9: 585-593 (1978).
215. Grant J.K., Minguell J., Taylor P. y Weiss M.; Biochem. J. 125:21 (1971).
216. Vorglomayr J.K., en Handbook of Phisiology, section 7, vol. 5 p.437-451 ; D.Hamilton y R.O.Greep (editores), American Physiological Society, Washington, (1975).
217. Aafjes J.A. y Vreeburg J.T.; J.Endocr. 53: 85 (1972).

218. Miyachi Y., Nieschlag E. y Lipsett M.B., *Endocrinology* 92: 1-5 (1973).
219. Dorfman R.I. y Shipley R.A.; en "Androgens", J.Wiley Inc. Nueva York p.116-128 (1956).
220. Kincl F. A.; en "Methods in Hormone Research". Dorfman R.I. Ed., Academic Press. Nueva York p.21 (1965).
221. Parizek J., Bournsnell J.C., Hay M.F., Babicky A. y Taylor D.M.; *J.Reprod. Fertil.* 12:501-509 (1966).
222. Bedford J.M.; *Exptl. Cell. Res.* 38: 654-659 (1965).
223. Orgebin-Crist M.C. y Jahad N.; *Endocrinology* 103: 46-53 (1978).
224. Lieberman S., Erlanger B., Beiser S. y Agate S. jr.; *Recent Progress in Hormone Research* 15:165 (1959).
225. Baker HWG, Worgne TJ, Santen RJ, Jefferson LS y Bardin CW
En *The Testis in normal and infertile man*, P.Troen y HR Nankin Editores. Raven Press, New York (1977) pp379-385.
226. Setty BS y Jehan Q. *J. Reprod. Fertil.*, 49:317-322 (1977)
227. Majumder G. y Turkington RW. *J. Endocr.* 70:105-115 (1976)
228. Ericsson H., Upchurch S., Hardin J.W., Peck C.K., y Clark J.H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81:1-7 (1978).
229. Kohane Adriana. Tesis Doctoral, FCEN, U.B.A. (1980)

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr Jorge A. Blaquier, quien con sus ideas, dinamismo y accesibilidad dirigió y estimuló constantemente la realización de estos estudios.
- Al Prof. Dr. Eduardo H Charreau, y al Lic. Alberto Monsalve por orientar eficazmente mis primeros pasos en bioquímica experimental.
- Al Dr. Carlos Lantos, por su constante y dedicada supervisión durante toda mi carrera de doctorado.
- Muy especialmente, a la Lic. Patricia Cuasnicú, quien no sólo colaboró con entusiasmo en parte de los trabajos presentados aquí, sino que invirtió considerable tiempo y esfuerzo en la organización del manuscrito durante mi ausencia.
- Al Lic. Tomás Santa Coloma, por asistirme con criterio y capacidad en la parte experimental y estadística.
- Al equipo encabezado por el Dr. Marco Rivarola y la Bioq. Stella Campo, por poner a disposición su experiencia y las facilidades del Hospital de Niños para los experimentos de RIA;
A la Sra Patricia Delcourt de Sanchez, por la realización de los mismos.
- A Héctor Araya , por estar siempre dispuesto a ayudarme en el manejo de los animales del bioterio.
- A mis compañeros de actividades, Dres Juan Carlos Garberi, Jorge Tezón, Audrey Kohane, Christopher Lubicz-Nawrocki, Mónica S. de Cameo, Miguel Hinrichsen, Marta Tesone, Lino Baraño, Juan Carlos Calvo; a las Lic. Fernanda López Echeverría, Lydia Galagovsky y Lucrecia Piñeiro; a las Señoras Elsa M. de Morra, Patricia D. de Sánchez y Ana Rosa C. de Charreau; y a tantos otros, a quiénes debo muchísimo a todo punto de vista.
- Al director, Prof. Virgilio Foglia, y a cada uno de los integrantes del Instituto de Biología y Medicina Experimental, quienes colaboraron en hacer esto posible mediante sus consejos, ayuda, o facilidades.
- Finalmente, a los miembros de mi familia, quienes con su comprensión y generosidad, permitieron la realización de esta Tesis.