

Tesis de Posgrado

Mecanismos intracelulares de regulación hormonal en el epididimo

Tezón, Jorge G.

1982

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:

Tezón, Jorge G.. (1982). Mecanismos intracelulares de regulación hormonal en el epididimo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1700_Tezon.pdf

Cita tipo Chicago:

Tezón, Jorge G.. "Mecanismos intracelulares de regulación hormonal en el epididimo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1700_Tezon.pdf

FACULTAD DE CIENCIAS EXÁCTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

MECANISMOS INTRACELULARES DE REGULACION HORMONAL EN EL EPIDIDIMO

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

Autor Lic. JORGE G. TEZON

Director Dr. JORGE A. BLAQUIER

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

BUENOS AIRES

1982

1700
Ej. = 2

POVIA

Al futuro de María Paula y Mariana

"... y dijo también a la multitud: Cuando ven que una nube se levanta en occidente ustedes dicen enseguida que va a llover y así sucede, y cuando sopla viento del sur dicen que hará calor y así sucede.

¡Hipócritas! Ustedes saben discernir el aspecto del cielo y de la tierra; ¿cómo entonces, no saben discernir el tiempo presente?"

Evangelio según San Lucas, Cap. 12, vs. 54-56.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge A. Blaquier por la guía, colaboración y confianza demostrada a lo largo de estos años.

A las Licenciadas Lucrecia Piñeiro, Patricia Cuasnicú y Mónica H. Vázquez por su colaboración en la parte experimental de este trabajo y junto a la Dra. Mónica S. de Cameo y las Licenciadas María Fernanda González Echeverría, María Ana de Larminat y Alejandra Piazza por su amistad, cooperación y paciencia.

A la Licenciada Isabel Lüthy y los Dres. José Lino Barañao y Juan Carlos Garberi por su generoso apoyo y amistad.

Al Dr. Eduardo H. Charreau por su exigencia nunca reñida con la confianza y el respaldo.

A los Dres. Lía Rumi, Alberto Baldi y Ricardo S. Calandra por su asesoramiento y al Dr. Carlos Scorticatti y su equipo de colaboradores por su cooperación en la obtención de las muestras utilizadas.

A las Srtas. María Zulema Rinaldo, María Cristina Vega y al Sr. Norberto Malarini por su eficaz colaboración para la presentación de este trabajo.

A todos los miembros del Instituto de Biología y Medicina Experimental que hicieron posible en un clima de cooperación, cordialidad, libertad y respeto la realización del trabajo diario.

Por último, y no por ello menos importante, quiero agradecer especialmente a las Sras. Elsa Miller de Morra y Patricia Delcourt de Sánchez por la dedicada y eficiente ayuda técnica prestada pero mucho más por la calidad humana demostrada durante las largas horas de trabajo compartidas.

1
2
3
4
5
6
7
8

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
I.1 El epidídimo como órgano efector de andrógenos.	3
I.2 Breve descripción anatómica e histológica del epidídimo.	6
I.3 Mecanismo de acción de andrógenos.	9
I.3.1 Provisión de andrógenos al epidídimo.	12
I.3.2 Captación de hormonas por el tejido efector.	14
I.3.3 Metabolismo de la testosterona por el tejido efector.	15
I.3.4 Retención intracelular de andrógenos. Receptores citoplasmáticos.	18
I.3.5 Retención nuclear de andrógenos.	20
I.3.6 Eventos nucleares provocados por los andrógenos. Aceptores nucleares.	22
II. ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE REGULACION INTRACELULAR DE LA RESPUESTA A ANDROGENOS	
II.1 Introducción.	29
II.2 Animales y tratamiento.	32
II.3 Materiales y métodos.	35

	Página
II.3.1 Drogas y soluciones.	35
II.3.2 Control histológico.	37
II.3.3 Estimulación del grado de proliferación celular.	37
II.3.4 Cuantificación de la radioactividad.	38
II.3.5 Obtención de las fracciones subcelulares.	39
II.3.6 Sedimentación en gradientes de densidad.	40
II.3.7 Marcación " in vitro ".	41
II.3.8 Pretratamiento del carbón.	42
II.3.9 Ensayo de unión de ^3H R1881.	42
II.3.10 Ensayo de actividad proteolítica.	44
II.3.11 Otros métodos.	45
II.4 Resultados.	
II.4.1 Efecto de la castración y terapia androgénica sobre la concentración de receptores libres para andrógenos en el epidídimo de la rata. Receptor <u>ci</u> toplasmático y nuclear.	46
II.4.2 Especificidad de unión a la fracción nuclear.	50
II.4.3 Desarrollo de un método de intercambio para la cuantificación de sitios receptores totales.	51

II.4.3.a	Condiciones óptimas de ensa- yo.	53
II.4.3.b	Especificidad hormonal.	53
II.4.3.c	Validación del método.	55
II.4.4	Efecto de la castración sobre la con- centración de sitios receptores andro- génicos en sus formas citosólica y nuclear.	58
II.4.5	Translocación nuclear del complejo re- ceptor-hormona citoplasmático.	64
II.4.6	Andrógeno dependencia de los recepto- res citoplasmático y nuclear.	69
II.4.7	Parámetros tróficos relacionados con la terapia androgénica.	72
II.4.8	Variaciones en la población celular. Efecto de los andrógenos.	72
II.4.9	Evaluación de la actividad proteolíti- ca.	74
II.5	Discusión.	77
III.	EL EPIDIDIMO HUMANO COMO ORGANO EFECTOR DE ANDROGENOS	
III.1	Introducción.	91
III.2	Materiales y métodos.	
III.2.1	Drogas, soluciones y bufferes.	100
III.2.2	Obtención del tejido.	102

	Página	
III.2.3	Cultivo de órgano.	102
III.2.4	Fluidos intraluminales y extractos protéicos de espermatozoides.	103
III.2.5	Captación y metabolismo de andróge- nos.	104
III.2.6	Caracterización de receptores nu- cleares para andrógenos.	106
III.2.7	Control histológico - Morfometría.	107
III.2.8	Actividad proliferativa.	108
III.2.9	Síntesis protéica.	108
III.2.10	Análisis electroforético de las pro- teínas inducidas.	
	III.2.10.1 Incorporación de marca radioactiva.	109
	III.2.10.2 Tratamiento de las mues- tras.	110
	III.2.10.3 Armado de geles de poli- acrilamida.	111
	III.2.10.4 Electroforesis.	114
	III.2.10.5 Procesamiento post - electroforesis.	115
III.3 Resultados.		
III.3.1	Manutención de túbulos epididimarios en cultivo de órgano. Efecto de los andrógenos sobre la morfología del tejido.	117

	Página
III.3.2 Utilización de andrógenos por el epidídimo humano en cultivo.	122
III.3.3 Características de la retención nuclear de andrógenos en el epidídimo humano.	126
III.3.4 Efecto de los andrógenos sobre la síntesis de proteínas y DNA en túbulos epididimarios en cultivo de órgano.	128
III.3.5 Inducción androgénica de la síntesis de proteínas específicas.	137
III.4 Discusión.	146
IV. ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ACCION DE ANTIANDROGENOS EN EL EPIDIDIMO DE RATA	
IV.1 Introducción.	154
IV.2 Materiales y métodos.	159
IV.3 Resultados.	160
IV.4 Discusión.	164
V. CONCLUSIONES	171

Abreviaturas

ABP	Proteína transportadora de andrógenos
Acetato de Ciproterona	6 α -Cloro-17 α -hidroxi-1 α ,2 α metilen-4,6 pregnadien-3,20 diona- 17-acetato.
Δ^4 Androstenediona	4 Androsteno 3,17 diona
A.E.	Actividad específica
BOMT	6 α Bromo-17 β hidroxi-17 α Metil-4 oxa-5 α - Androstan-3-ona.
BPB	Azul de bromo fenol
CAep	Plasma del CAPUT epididimario
Cep	Plasma del CAUDA epididimario
COep	Plasma del CORPUS epididimario
Cyt	Citosol
^{14}C	Carbono catorce
Ci	Curie
cpm	Cuentas por minuto
5 α DHT	5 α Androstano 17 β ol-3-ona;5 α Dihidrotestosterona
3 α diol	5 α Androstano 3 α ,17 β diol
3 β diol	5 α Androstano 3 β ,17 β diol
DNA	Acido desoxirribonucleico
dpm	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
Estradiol	1,3 (5-10)estratrien-3,17 β -diol
Flutamida	α,α,α -Trifluoro-2-Metil-4'-nitro-m-propionotoluidida
fmol	Femto Mol
^3H	tritio
LH	Hormona luteinizante
M	Molar
mA	miliampere
mCi	milicurie
min	minuto
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato, reducida
ng	nanogramo

nM	nanomolar
PBS	Buffer fosfato salino
PEE	Proteínas específicas epididimarias
pM	picomolar
pmol	picomol
Progesterona	4-pregnen-3,20 diona
prot	proteína
R_A	Mobilidad electroforética relativa a la albúmina
R_f	Mobilidad electroforética relativa al frente
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
R 1881	2 oxa-17 α Metil-17 β hidroxí estra-4-9-11 trien-3-ona; Metil-trienolona
RU 23908	5,5 dimetil-3-(4-nitro-3-(trifluorometil)-fenil)-2,4 imidazolidinediona.
S	Svedverg
SCH 16423	α,α,α -trifluoro-2-Metil-4'-nitro-m-lactotoluidida
SKF 7690	17 α Metil-B-Nortestosterona
T	Testosterona; 4-Androsten 17 β -ol-3 ona
TCA	Acido tricloroacético
ug	Microgramo
ul	Microlitro
U.I.	Unidad internacional
U/L	Unido / Libre.

I N T R O D U C C I O N

El ser vivo en su adaptación al medio ambiente adverso requiere de sus elementos constituyentes una capacidad de respuesta cada vez mayor y diversa dando lugar al proceso de diferenciación con la consiguiente especialización funcional.

Solo aquellos organismos capaces de alimentarse, crecer, defenderse, atacar y procrear sin desbalancear el armónico metabolismo celular podrán sobrevivir.

Surgen los distintos niveles de interrelación siendo la economía de subsistencia la que rige los cambios. Los mecanismos de control aparecen como necesidad imperiosa ante la complejidad evolutiva.

La restricción de las variaciones internas en los organismos más desarrollados se centraliza en sistemas como el neuroendócrino garantizando desde la respuesta a estímulos ambientales hasta la óptima producción y aprovechamiento de la energía metabólica.

La manutención de la especie requiere individuos aptos genéticamente para la procreación y funcionalmente capaces de asegurar la sobrevivencia de la descendencia. Así, la producción de gametas morfológica y funcionalmente maduras, la inducción y regulación del celo y la formación del entorno propicio para el crecimiento del embrión son responsabilidad directa de una parte de este mecanismo de control en el que intervienen con un papel predominante las denominadas hormonas sexuales.

Este mecanismo de interrelación celular es uno de los más evolucionados. No se trata ya del aumento o disminución en el torrente sanguíneo de un determinado metabolito crucial en un camino biosintético, es un mensaje resumido en la estructura molecular espacial de la hormona secretada, traducido y amplificado selectiva y específicamente, a distancia, en el órgano efector.

El papel de las gonadas en diversos parámetros funcionales y aún de conducta era conocido desde la antigüedad. La castración era usada ampliamente en ganadería para aumentar la masa de tejido graso y disminuir la agresividad del animal y durante siglos fueron apreciadas las agudas voces de los castrados en los coros. El nacimiento de la ilustración y del método analítico moderno arrastran a la biología por los caminos de la incipiente endocrinología y la experimentación libre comienza a dar sus frutos.

Así BERTHOLD en 1849 mediante ligaduras de los vasos aferentes a las gonadas del gallo producía un retroceso del grueso del plumaje y del aspecto de la cresta a niveles correspondientes al del animal castrado. La restitución de la circulación periférica restituía los parámetros normales, evidenciándose ya desde un principio, la importancia del torrente sanguíneo como vehículo de ese "mensaje".

El concepto de Hormona formulado por STARLING concilió las contribuciones aisladas; un mensajero químico secretado por glándulas discretas directamente en el torrente sanguíneo para regular el crecimiento y función de otros órganos.

La demostración unívoca de la actividad hormonal de extractos testiculares se debe a PEZARD y puede ser considerado el comienzo de la fisiología moderna de las hormonas sexuales masculinas.

El desarrollo de la química orgánica desde principios de siglo permitió el aislamiento y síntesis de los primeros compuestos con actividad androgénica y recién en 1935 DAVID y col. publican la obtención del principal andrógeno secretado; la testosterona.

I.1 El epidídimo como órgano efector de andrógenos.

Previo al descubrimiento de las hormonas involucradas ya habían comenzado los estudios sobre las consecuencias últimas de su acción en uno de sus órganos efectores; el epidídimo.

YOUNG describe por primera vez en 1931 el fenómeno de maduración en los espermatozoides. Este proceso se define actualmente como la serie de cambios, morfológicos, estructurales y bioquímicos que éstos sufren en su trayecto por el epidídimo y que resultan en un cambio funcional por el cual adquieren la capacidad de fertilizar el óvulo y dar lugar a una cigota viable. En estos trabajos preliminares luego extendidos a otros mamíferos como la rata (BLANDAU y ROMERY - 1964), el conejo (BEDFORD - 1966), el toro (IGBOELLI y FOOTE - 1968) y hamster (HORAN y BEDFORD - 1972) se observa un gradiente de capacidad fertilizante en los espermatozoides del epidídimo con un aumento en la dirección céfalo-caudal del órgano.

Los cambios morfológicos principalmente migración de la gota citoplasmática y funcionales como la adquisición de motilidad progresional que sufría el espermatozoide en el cobayo (CAMEO - 1971), hamster (HORAN - 1972) y conejo (BEDFORD - 1967), se llevaban a cabo independientemente del lugar del epidídimo donde estos pudieran ser retenidos artificialmente. Sin embargo la adquisición de capacidad ferti-

lizante no era inherente al espermatozoide sino que requería la activa participación del epidídimo en sus segmentos más distales. La andrógeno dependencia de este proceso fue demostrada por nuestro laboratorio (CAMEO - 1971; BLAQUIER - 1972) en el cobayo y luego validada en rata (DYSON - 1973), hamster (LUBICZ NAWROCKY - 1976) y conejo (ORGEBIN CRIST - 1974).

Paralelamente a estos estudios fisiológicos se avanzaba en la dilucidación del mecanismo por el cual los andrógenos conducían a tales efectos en el epidídimo, producían hipertrofia e hiperplasia en la próstata, vesícula seminal u otra serie de eventos en otros órganos efectores y hasta el sistema nervioso central.

Las pequeñas cantidades en que los esteroides actúan conformaron un obstáculo para la bioquímica clásica en el esclarecimiento de su mecanismo de acción. Sólo a partir de la década del sesenta con la obtención de hormonas radioactivas de alta actividad específica y el replanteo de los modelos experimentales se pudo aportar claridad sobre el proceso de síntesis, captación por tejidos efectores, localización intracelular, liberación y depuración plasmática de los esteroides.

La caracterización para las hormonas esteroideas de receptores protéicos solubles en el citoplasma celular de los órganos efectores fue demostrada mediante el uso de esos compuestos en combinación con nuevas técnicas de cuantificación.

La concentración de la hormona en los núcleos celulares medida por la translocación del Complejo Hormona-Receptor fue demostrada en 1968 por JENSEN para estrógenos en el útero y posteriormente por MAINWARING, FANG y col. para los andrógenos en la próstata en 1969.

En el epidídimo se encontraron receptores de la misma naturaleza (BLAQUIER - 1971), (DANZO - 1973) y como en la próstata la testosterona radioactiva no es el principal componente unido a estas macromoléculas sino su metabolito 5α reducido, la 5α Dihidrotestosterona (5α DHT), (BLAQUIER y col. - 1971). Así la metabolización previa de la testosterona proveniente del testículo parece ser un requisito para su acción posterior. La reducción se produce dentro de las células del tejido efector por acción de la enzima NADPH 4 - 3 cetoesteroide - 5α - Reductasa (BRUCHOVSKY - 1968), (MONSALVE, A. - 1977).

Con respecto al mecanismo por el cual los andrógenos inducen el proceso de maduración de espermatozoides se descarta la acción "per se" de las hormonas sobre los mismos. Las altas concentraciones intratubulares de andrógenos no inducen la maduración de los espermatozoides cuando estos son retenidos mediante ligaduras en los segmentos proximales al testículo (DYSON - 1973), (LUBICZ NAWROCKY - 1976), (ORGEBIN CRIST - 1974), (WHITE - 1968), sin embargo en castraciones unilaterales este proceso se completa en el epidídimo debido a la provisión plasmática de andrógenos del testículo contralateral remanente que alcanzan al testículo en concentraciones relativamente bajas (ORGEBIN CRIST - 1973). De este modo los productos de secreción del epidídimo en sus segmentos distales inducidos por andrógenos se convirtieron en probables mediadores de la acción hormonal.

La carnitina (MARQUIS - 1965) y la glicerofosforilcolina (DAWSON - 1957) fueron descartadas por no encontrárseles implicancia directa sobre el proceso de maduración y los trabajos se orientaron hacia el estudio de la secreción proteica.

FOURNIER (1966), KOSKISMIES y KORMANO, CAMEO y BLAQUIER (1976) describieron la existencia de proteínas específicas del epidídimo en

la rata. Estos últimos autores ofrecen las primeras existencias sobre la andrógeno dependencia de las mismas y juntamente con GARBERI (1979) y KOHANE (1979) su interacción con espermatozoides constituyendo en estos momentos uno de los más probables mediadores de la acción hormonal en el proceso de maduración de los **mismos**.

I.2 Breve descripción anatómica e histológica del epidídimo.

Los túbulos seminíferos del testículo desembocan en la Rete testis (ROOSEN RUGEN - 1961) una real red colectora de espermatozoides y plasma circundante. Esta red cuyas paredes están tapizadas de un epitelio cúbico simple se resume en unos pocos conductos o sistema eferente formado por: los conductos eferentes, el epidídimo y el conducto deferente. Los primeros en número de seis a ocho presentan un epitelio compuesto de dos tipos de células las Principales, en mayor número y las Ciliadas, que delimita la luz tubular y está apoyado sobre una membrana basal rodeada a su vez de una a tres capas de células musculares lisas. Las células principales presentan un retículo endoplásmico liso y rugoso y un aparato de Golgi desarrollados y orientados hacia la luz, lo que nos habla de una actividad secretoria. Las cilias del segundo grupo celular permiten distinguirlas dado que sobresalen desde el borde apical de las mismas hacia el lumen.

Una vez dentro de la cápsula epididimaria los conductos eferentes se resumen en un único tubo denominado segmento inicial. En éste la luz se hace más regular limitada por un epitelio pseudo estratificado formado por tres tipos de células las basales, apicales y las principales o piramidales que debido a su aumento de tamaño reducen la luz

tubular.

Este tipo de epitelio sufrirá solo leves modificaciones a medida que se lo estudie en los distintos segmentos proximal o CAPUT, medio o CORPUS y distal o CAUDA.

Las células apicales asomadas a la luz tubular son características del segmento inicial hasta desaparecer en los segmentos medios y distales del órgano (HAMILTON - 1975). Las células basales apoyadas sobre la membrana basal son pequeñas y poligonales y morfológicamente no varían a lo largo de todo el órgano. Las células piramidales poseen un núcleo basal con un aparato de Golgi y retículo endoplásmico liso y rugoso apical muy desarrollados; este hecho junto con la presencia de estereocilias e invaginaciones picnocitóticas nos indica una alta actividad secretoria.

La luz tubular es menor en los segmentos proximales al testículo donde la velocidad de absorción de componentes del fluido es elevada aumentando en los segmentos siguientes donde la secreción proteica es importante y la reabsorción de agua disminuye (WONG - 1979).

En el segmento más distal, la luz tubular aumenta y aparece un cuarto grupo celular las llamadas células claras cuya característica principal es la profusión de vacuolas y lisosomas en la zona apical, microvellosidades en el borde y gotas lipídicas en la base celular (HAMILTON - 1975).

El epidídimo se continúa en el conducto deferente que abandona el escroto hacia la uretra. En lo que respecta al epidídimo humano se pueden notar sólo pequeñas diferencias con el de los roedores anteriormente descrito.

Según la detallada descripción de HOLSTEIN en los segmentos proximales no encontramos las células apicales, constituyendo el epitelio pseudo-estratificado, las células basales y piramidales de similares características a las descritas.

Son las células piramidales las que presentan diferencias a lo largo del túbulo. Las células altas con profusión de organelas citoplasmáticas descritas en los segmentos más proximales al testículo se acortan y comprimen en dirección al cauda. En los segmentos más distales el epitelio protrusiona hacia la luz tubular que ha ido aumentando. Las estereocilias se acortan perdiendo aparentemente elasticidad; las capas de tejido muscular liso que circundan los tubulos y producen un movimiento peristáltico para el transporte de los espermatozoides, se engrosan en los segmentos distales.

I.3 Mecanismo de acción de andrógenos.

El esfuerzo de varios laboratorios ha llevado, con las particularidades propias de cada modelo estudiado, a la formulación de una teoría de mecanismo de acción para los andrógenos. Este podría ser resumido en la siguiente secuencia de eventos esquematizados en la Figura 1.

1) La testosterona llega a la célula transportada por proteínas ligadoras en el plasma sanguíneo y en el caso particular del epidídimo también a través de la luz tubular directamente del testículo, transpone la membrana plasmática por libre difusión. Este proceso aunque discutido, es aceptado como el más probable.

2) En órganos efectores del tracto genital como el epidídimo, la próstata, la vesícula seminal y estructuras nerviosas como la hipófisis anterior de varias especies animales de experimentación, la hormona es metabolizada activamente a 5α Dihidrotestosterona (5α -DHT) (5α androstan 17β ol - 3 - ona) por la enzima Δ_4 cetoesteroide 5α reductasa.

3) La 5α DHT se une con alta afinidad y no covalentemente a una proteína citoplasmática denominada Receptor.

4) La unión antedicha resulta en variaciones en la conformación espacial del receptor conduciendo a la " activación " del complejo Receptor-Hormona.

5) Este complejo es translocado al núcleo por mecanismos tampoco esclarecidos totalmente y se une específicamente a sitios " aceptores " en la cromatina permaneciendo retenido por un tiempo finito pero variable.

6) El complejo así retenido desencadena numerosos procesos que conducen en definitiva a la expresión del mensaje hormonal en la transcripción del material genético específico y la activación de toda la maquinaria enzimática necesaria para la misma.

7) La señal de terminación del proceso de estimulación no está del todo dilucidada. El tiempo que el complejo ternario anterior 5α DHT - Receptor - aceptores cromatínicos permanezca como tal puede ser uno de los determinantes para la concreción de los distintos tipos de respuestas: iniciales, tempranas y tardías.

8) El complejo finalmente se disocia de los sitios aceptores y el receptor retorna al compartimento citoplasmático mediante lo que se da en llamar proceso de "reciclado".

9) Existen eventos no transcripcionales, como activación de determinados pasos metabólicos o procesamientos post-transcripcionales que no pueden incorporarse de modo simplista a esta secuencia de eventos pero que no dejan por ello de ser importantes.

Aunque la mayoría de estos eventos han sido demostrados en próstata ventral de rata, los resultados de muchos laboratorios extrapolan sin modificaciones sustanciales este modelo a otros órganos efectores de andrógenos como el epidídimo, la vesícula seminal, etc. Como este mecanismo puede ser susceptible de control y regulación y como en un todo responden al objetivo biológico de producir factores activos en el proceso de maduración de espermatozoides será ampliado posteriormente.

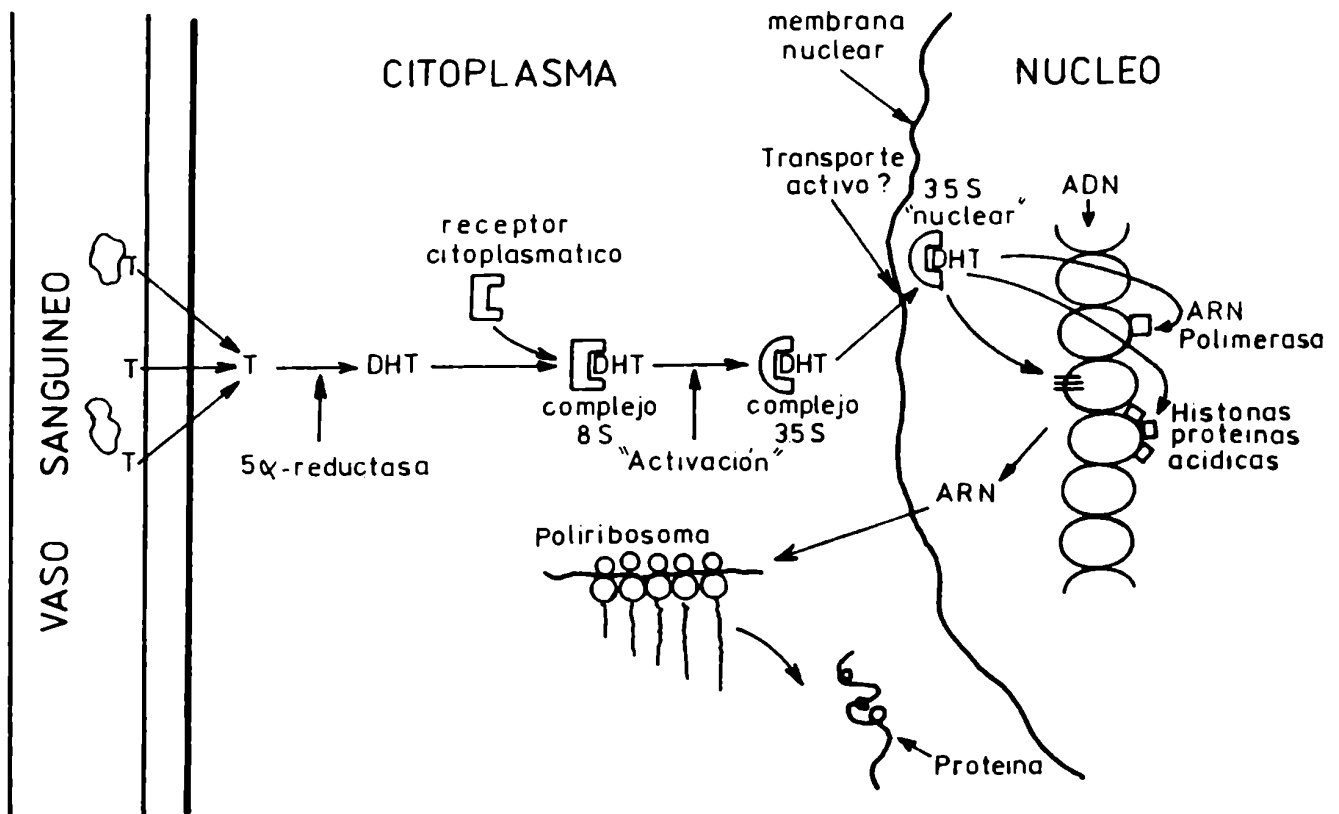


Figura 1 Esquema del mecanismo de acción de los andrógenos

I.3.1 Provisión de andrógenos al epidídimo.

Los andrógenos testiculares sintetizados en las células de Leydig bajo el estímulo de la hormona luteinizante o LH alcanzan el epidídimo por dos vías posibles. La hormona pasa a la vena espermática y a través del Plexo pampiniforme que irriga al epidídimo alcanza el epitelio luminal. Este es el caso de epidídimos que en hemicastraciones captan los andrógenos secretados por el testículo contralateral o el de la captación de hormona inyectada por vía sitemica en animales castrados.

La otra vía de acceso es por el sistema eferente llegando al órgano directamente por la luz tubular. Los andrógenos alcanzan dentro de los túbulos seminíferos concentraciones mucho mayores que las presentes en el plasma (GANJAM - 1973, 1976).

Existen importantes factores que hacen a la actividad biológica de los andrógenos según la vía de acceso al tejido efector y estos se relacionan con la capacidad de regulación de su concentración.

Es bien conocido el fenómeno que el andrógeno biológicamente activo es aquel no unido a proteínas transportadoras al menos en plasma sanguíneo. La albúmina en los roedores, y ésta conjuntamente con una beta globulina, (Globulina ligadora de Hormonas Sexuales o SHBG), que une esteroides hidroxilados en posición 17, en el Hombre (BARDIN y col. - 1969), (RIVAROLA - 1968) juegan un rol importante en la regulación de la concentración de la hormona activa como así también de su tasa de depuración plasmática. En el caso de los andrógenos que llegan al epidídimo vía tubular, debemos hacer varias consideraciones.

Ciertos componentes testiculares parecen tener importancia en el mecanismo de acción posterior de los andrógenos que este órgano produce. Un rol preponderante se le atribuyó desde hace años a una proteína sintetizada por las células de Sertolli en el testículo bajo el estímulo de la Hormona Folículo Estimulante o FSH y los andrógenos mismos; la Proteína ligadora de andrógenos o ABP. Esta proteína es secretada a la luz del túbulo seminífero y se concentra en la luz del epidídimo proximal o CAPUT (HANSSON - 1975) y como su nombre lo indica une andrógenos con alta afinidad.

La provisión tubular de andrógenos al epidídimo es mucho más importante que la plasmática, (para alcanzar las concentraciones fisiológicas dentro del órgano se deben inyectar dosis farmacológicas a un animal castrado (AAFJES - 1972)) y la existencia de parámetros biológicos que respondan sólo a tales concentraciones no ha sido claramente establecida. Salvo la conservación de la ultraestructura del segmento inicial en el epidídimo (FAWCETT) que necesitaría de la totalidad de las secreciones testiculares la mayoría de los parámetros tróficos pueden ser restituidos a niveles normales en el animal castrado por inyecciones de testosterona.

PURVIS y col. (1977) postularon para la ABP un papel de transportador de andrógenos a la vez que de regulador de su concentración intratubular. Sin embargo según otros autores (ROMMERTS - 1976) la concentración de los andrógenos biológicamente activos en los túbulos escaparía al control mediado por esta proteína.

La existencia de la ABP en vertebrados superiores como los primates y entre ellos el hombre es objeto de controversia. Mientras PURVIS y col. (1978) aseguran su detección en epidídimos humanos, VIGERSKY y col. no logran detectarlo en el mono Rhesus. Aunque muchos

aseguran que no es posible diferenciar al ABP de la SHBG, HSU y col. sostiene que ambas proteínas están presentes en el epidídimo humano. La comprobación de su existencia en estos casos arrojaría luz e interés sobre el estudio del pretendido singular papel de los andrógenos tubulares. Aún así la ABP distaría de ser un simple transportador de andrógenos y se confía en encontrar para el complejo proteína - Hormona un rol biológico en sí mismo.

I.3.2 Captación de hormona por el tejido efector.

Es una teoría muy aceptada que las hormonas no unidas a proteínas plasmáticas difunden libremente a través de la membrana plasmática a favor de un gradiente de concentración (GORSKI - 1976). Este mismo mecanismo sin embargo es refutado por quienes sostienen un transporte facilitado para el caso de los estrógenos en células uterinas (ATGER) glucocorticoides en adenocarcinoma de hipófisis (HARRISON - 1975) y andrógenos en próstata de hombre y perro (GIORGI - 1973, 1976). Trabajos de BAULIEU (1975) apoyan esta hipótesis afirmando la activa participación de una proteína de membrana.

Cualquiera de los diseños experimentales descritos para la demostración de un transporte activo o facilitado no puede descartar la participación del receptor hormonal intracelular soluble. La retención de la hormona por proteínas con tan alta afinidad y velocidad de asociación dificulta la visualización del mecanismo de libre difusión.

Aún aceptado este último modelo no deben descartarse los efectos directos de esteroides como la progesterona y testosterona y estradiol sobre membranas plasmáticas del ovocito de *Xenopus Laevis* (GODEAU y col.) y células endometriales (PIETRAS - 1977), (NENCI - 1980) respectivamente que indicarían la presencia de receptores para hormonas esteroideas en las mismas.

I.3.3 Metabolismo de la testosterona.

Los andrógenos a diferencia de los demás esteroides son metabolizados en algunos tejidos blanco como paso previo a su unión al receptor y posterior expresión del mensaje hormonal.

La $\Delta_4 - 3 -$ cetoesteroide - 5α - reductasa - NADPH - dependiente, es la responsable de la reducción irreversible del doble enlace 4 - 5 de la testosterona, introduciendo un átomo de hidrógeno en posición α sobre el carbono 5. El NADPH reduce directamente los dobles enlaces y no interviene como simple donante de hidrógenos como en las hidroxilaciones.

Esta enzima presente, con la excepción del riñón, en los tejidos efectores de andrógenos configura el primer paso de selección en lo que respecta a especificidad tisular y la primera etapa de amplificación en la respuesta hormonal. La 5α reductasa está localizada en la fracción microsomal (MORFIN - 1970) (correspondiente al retículo endoplásmico), y nuclear (BRUCHOVSKY - 1968). Se demostró (NOZU - 1974), (MOORE - 1973) que su actividad en esta última fracción se halla asociada a la membrana nuclear externa. Las propiedades

cinéticas son muy parecidas en ambas fracciones, este hecho es comprensible dado que es en la superficie nuclear donde se sintetizan y procesan las membranas del retículo endoplásmico. Esta distribución y características son comunes a varios tejidos andrógeno-dependientes y en particular al epidídimo en la rata (MONSALVE - 1977), mono Rhesus (de LARMINAT - 1978) y hombre (de LARMINAT - 1980).

En la mayoría de los órganos efectores de andrógenos el sistema se completa con la aparición de al menos dos enzimas importantes en el mecanismo de acción de los mismos. El carbonilo en posición 3 de la 5α DHT es reducido reversiblemente por dos enzimas posibles, la 3α o 3β Hidroxiesteroide dehidrogenasa, a los correspondientes isómeros 5α Androstan 3α , 17β diol (3α diol) o 5α Androstan 3β , 17β diol (3β diol). Estas enzimas muestran a diferencia de la 5α reductasa una actividad concentrada en la fracción soluble del citoplasma (de LARMINAT - 1980) y al igual que ésta usan NADPH como cofactor. La distribución de la actividad en el tejido está bastante circunscrita al epitelio secretor siendo mucho menor en el estroma o parénquima (DJOSELAND).

El rol biológico de cada uno de los metabolitos de la testosterona que será ampliado posteriormente, es variado y no se limita a un solo parámetro biológico.

Como se verá la 5α DHT es el andrógeno que con más afinidad se une al receptor citoplasmático y con el que se transloca al núcleo, para, entre otros eventos, estimular la transcripción del DNA. La medición de andrógenos endógenos (CAMPO) confirma la preeminencia de la DHT sobre sus metabolitos y la testosterona misma como andrógeno nuclear. La DHT es el andrógeno mitogénico por excelencia y es general aceptado como el de mayor actividad biológica de los de la serie.

Aunque no debe descartarse su interconversión a 5α DHT los 3α y β dioles parecen tener efectos " per se " que se resumen en una mejor manutención de la sobrevivencia de los espermatozoides en los epidídimos de ratas castradas (LUBICZ NAWROCKY - 1976). La idea del andrógeno único cede ante la teoría de integración de roles de los distintos metabolitos.

Por último es de particular importancia considerar en el caso del epidídimo la proporción entre la 5α DHT que es producida en el órgano por conversión de la testosterona provista periféricamente y la que entra al tejido directamente ya sea proveniente del testículo por la luz tubular o por vía plasmática.

La relación de concentraciones de testosterona: DHT es de 10:1 en la rete testis de la rata (HARRIS - 1975) invirtiéndose hasta alcanzar el cociente 1:6,5 en el epidídimo (AAFJES). Este mismo proceso es encontrado por PURVIS y col. (1978) en el hombre. Mientras en el testículo la relación T: 5α DHT es de 106 ésta llega a valores de 3,6 en el epidídimo, no solo por disminución del contenido de testosterona, sino por aumento del contenido neto de 5α DHT en este último órgano.

La Dihidrotestosterona proveniente del testículo aunque componente menor es un aporte considerable, que, de existir una contribución desde la luz tubular a la célula, saturaría los sitios de unión, sin embargo la producción tisular de DHT es tan alta que hace aumentar en factores de 65 y 30 según las especies la concentración tisular relativa de esta hormona, el significado de estos hechos será analizado más adelante.

I.3.4 Retención intracelular de andrógenos.

Receptores citoplasmáticos.

La permanencia durante los primeros minutos de la radioactividad asociada a la hormona inyectada, en la fracción soluble del citoplasma o citosol de las células efectoras, condujo a tratar de identificar la o las entidades responsables de dicha captación. El análisis de la radioactividad unida a macromoléculas del citosol mediante el uso de sedimentación en gradientes de sacarosa mostró que la hormona se unía a un componente con un coeficiente de sedimentación de 8 S. Estos primeros resultados de JENSEN en 1968 con los estrógenos para el útero fueron posteriormente confirmados sin diferencias importantes para los andrógenos en sus órganos efectores. Simultáneamente MAINWARING y FANG y col. en 1969 demostraron la presencia del denominado Receptor Citoplasmático para andrógenos en la próstata ventral de rata. En 1971 BLAQUIER con sus resultados extiende este mecanismo de captación al epidídimo.

Si ese coeficiente de sedimentación responde a configuraciones fisiológicas es todavía objeto de estudio. La comparación de resultados de varios autores amplía los rangos de sedimentación y el número de especies encontradas. Se detectan dos tipos de complejos que sedimentan con rangos de 7 S a 12 S y 3 S a 5 S. Las entidades mayores pueden ser transformadas en las menores mediante el agregado de cloruro de potasio (Cl K) hasta alcanzar una concentración salina de 0,4 M en un proceso reversible por diálisis (LIAO - 1976). A concentraciones de sal menores que 0,1 M y pH menores que 7,5 las

formas más comunes 8 S y 3,5 S tienden a agregarse para formar entidades mayores. Esta agregación no ocurre en receptores parcialmente purificados por lo que se cree involucra otros materiales celulares asociados. Este último hecho es particularmente importante en lo que respecta a la determinación de pesos moleculares; según los métodos usados el rango abarca desde los 120.000 a los 270.000 Daltons. En particular para el epidídimo el único dato es de más de 200.000 D, para la especie 8 S (HANSSON - 1975).-

Los receptores citoplasmáticos son proteínas acídicas como lo revela su punto isoeléctrico de 5,8 (TINDALL - 1975) de gran termolabilidad, y sensibles a bloqueantes de grupos sulfhidrilos. Estos últimos probablemente estén involucrados en la manutención de una estructura cuaternaria necesaria para la formación del complejo Receptor-Hormona.

La naturaleza de la unión entre la hormona y el receptor fue estudiada en detalle por LIAO (1973). Este enlace no covalente se produce por interacciones de las cadenas polipeptídicas de la proteína sobre las dos caras α y β del esteroide. El volumen y planaridad de la molécula en los distintos andrógenos sintéticos ensayados juegan un rol más importante que los grupos funcionales adosados al núcleo carbonado, en lo que respecta a la habilidad de unión del receptor y estabilidad del complejo. Sin embargo la presencia del hidroxilo en posición β sobre el carbono 17 y el carbonilo sobre el carbono 3 son requisitos básicos para mantener actividad en los andrógenos fisiológicos. Moléculas muy planas como el 2 oxa - 17 α Metil - 17 β hidroxiestra - 4 - 9 - 11 - trien - 3 - ona Metiltrienolona o R1881 (RAYNAUD - 1977) duplican a la 5 α DHT en su afinidad por el receptor y es un potente andrógeno (VELLUZ - 1963). De todos modos en condicio

nes in vitro, entre los andrógenos fisiológicos la 5 α DHT es la que presenta mayor grado de unión al receptor. Esta propiedad se conserva bajo condiciones fisiológicas en experimentos " in vivo ". La 5 α DHT es el principal andrógeno retenido en el citoplasma y núcleo de las células efectoras como resultado de esta interacción específica.

El papel que juega el receptor en el mecanismo de acción de hormonas ha sido reforzado por la acción de los denominados anti-andrógenos. Estos compuestos en algunos casos de estructura similar a los andrógenos como el Acetato de Cyproterona (NEUMAN - 1970), el BOMT o la Flutamida y sus derivados bloquean por completo la acción de los andrógenos en sus órganos efectores (MAINWARING - 1973) comprobándose que consecuentemente son capaces de interferir con la unión de la hormona a su receptor (BAULIEU y col. - 1970), (FANG - 1969), (MOORE - 1973), (TINDALL - 1974). El mecanismo por el cual este complejo es inactivo en la estimulación será objeto de análisis en la sección IV del presente trabajo.

I.3.5 Retención nuclear de andrógenos.

La retención selectiva de 5 α DHT en núcleos de próstata demostrada por ANDERSON y LIAO y MAINWARING (1969) y confirmada por métodos radioautográficos por TVETER y ATTRAMADAL y por SAR y col. (1970) son extendidas posteriormente al epidídimo (BLAQUIER - 1973), (STUMPF y SAR).

Las características de esta retención en sistemas libres de células como: la especificidad de hormona (MANGAN - 1972) (sólo los andrógenos más potentes inhibían la captación de ^3H -DHT); la capacidad bloqueante de los antiandrógenos conocidos (LIAO - 1973, TINDALL - 1974) y el requerimiento de las condiciones necesarias para la estabilidad del receptor citoplasmático llevaron a postular que éste último jugaba el rol más importante en la concentración nuclear del andrógeno.

Así mediante procedimientos estandarizados (BRUCHOVSKY - 1968), (MAINWARING - 1969) la radioactividad asociada a los componentes nucleares puede ser extraída en la forma de un complejo macromolecular proteína-hormona de características similares a las del receptor descrito en el citoplasma. Sin embargo la diferencia en algunos parámetros físico-químicos como el Peso Molecular (BRUCHOVSKY - 1968), (MAINWARING - 1969); Punto isoeléctrico (MAINWARING - 1974) y coeficientes de sedimentación (LIAO - 1976) evidencian cambios sufridos por el receptor citoplasmático en un proceso genéricamente denominado activación previo a la formación de un complejo capaz de translocarse al compartimento nuclear.

Los estudios de los niveles de receptor citoplasmático y nuclear en distintas condiciones de translocación (BAHKOO), (SUTHERLAND) (CLARK - 1978) dan cuenta de una relación estequiométrica entre ambas especies reforzando la teoría de identidad entre ellas. Por otro lado BRUCHOVSKY (1975) y col. proponen otro mecanismo para la formación del receptor nuclear independiente de la activación y translocación del citoplasmático. Sin embargo la insensibilidad a dosis farmacológicas de andrógenos en ratas de la cepa tfm, atribuible a una agenesia del receptor, se acompaña con una muy reducida retención nuclear de hormona

en sus órganos efectores (BULLOCK y col.), (RITZEN - 1972), reforzando de este modo el primero de los modelos citados.

La simplificación mecanística de este modelo llevó a un enfoque " químico " y parcializado de los compartimentos celulares. El carácter soluble o " citoplasmático " del receptor nativo surge de una metodología para obtenerlo y puede no reflejar la realidad dentro de la célula. A la luz de nuevas técnicas de detección la asociación a estructuras celulares sería una característica de parte de la población " citoplasmática " de los receptores. Su caracterización como precursores de la forma nativa o productos de su activación en vías de translocación es aún objeto de análisis.

I.3.6 Eventos nucleares provocados por los andrógenos.

Aceptores nucleares.

La translocación y retención del complejo receptor-hormona por los componentes nucleares de células efectoras fue analizado en varios modelos experimentales: desde el aislamiento de la radioactividad incorporada en núcleos luego de la captación de la hormona por células enteras, hasta la recombinación de las distintas fracciones celulares involucradas para una translocación " in vitro ". Así se llegó a las siguientes conclusiones:

- El complejo Receptor-Hormona citosólico es retenido fuertemente en los núcleos enteros.
- Este complejo ternario puede ser disociado en medio de alta concen

tracción de ClK 0,4 - 0,6 M obteniéndose el complejo (coeficiente de sedimentación 4 S en gradientes de sacarosa de igual fuerza iónica) soluble conjuntamente con material nuclear.

- Esta asociación entre el receptor citosólico y los aceptores nucleares es saturable y específica para núcleos de células efectoras.
- La magnitud del efecto estimulatorio es función del número de sitios aceptores ocupados y de la duración de esta interacción. Ambos parámetros dependen fundamentalmente de la dosis y modo de administración de la hormona.

La identidad de los sitios aceptores es todavía objeto de controversia. El proceso de expresión del mensaje hormonal requiere DNA como templado tanto para la activación de su transcripción como su replicación (MAINWARING - 1971)(a). La regulación metabólica mediante la interacción de proteínas con el DNA está bien descrito para microorganismos en los que existe un número limitado de sitios específicos de alta afinidad para dicha interacción en medio de ilimitados sitios no específicos de baja especificidad.

Para el caso del complejo hormonas esteroideas y su receptor citoplasmático no ha sido posible encontrar para su interacción en el DNA una especificidad de especie ni una saturación de los sitios de unión (ANDRÉ). Aunque importante y selectiva para el receptor, esta unión sería del tipo de las no específicas. Existen sin embargo dos corrientes de opinión, quienes sostienen que toda la actividad aceptora se concentra en las proteínas asociadas al DNA correspondiendo poca o nula para este último (SPELSBERG - 1971) o los que le asignan al DNA el papel de aceptor mientras las proteínas restringen el número de sitios accesibles (MAINWARING - 1971) (b).

MAINWARING y col. (1976) describen dos tipos de sitios aceptores uno de menor afinidad y gran capacidad probablemente relacionado con el DNA y otro de naturaleza protéica de gran afinidad (K_D $2,5 \times 10^{-9}$ M) y baja capacidad. La caracterización de estos sitios permitió su clasificación como proteínas no histónicas aunque de naturaleza básica (PI 8,6 - 9,3) y un PM de aproximadamente 70.000 D.

Estos sitios aceptores conjuntamente con el complejo receptor-hormona se solubilizan en 0,6 M ClK permaneciendo los sitios de menor afinidad unidos a la matriz nuclear. Una heterogeneidad en el tipo de sitios aceptores ha sido descrita para los estrógenos en el útero (CLARK - 1976). El primer tipo de sitios extraíbles con bajas concentraciones de sal interaccionarían débilmente con la cromatina, son saturados a concentraciones de hormona mayor que las necesarias para un crecimiento sostenido y de no persistir el estímulo hormonal se disocian del complejo receptor-hormona en un lapso de tiempo corto.

Paralelo a la disociación descrita aumenta la unión del complejo receptor-hormona a un segundo tipo de sitios aceptores. Los receptores son retenidos firmemente por estos sitios durante varias horas luego de cesado el estímulo, en un número necesario y suficiente para el crecimiento sostenido del útero.

La saturación secuencial de uno u otro tipo de sitios explica, según los autores, la inducción de eventos tempranos, a cargo de la interacción más transiente y los eventos tardíos correspondientes a la retención prolongada.

Entre los eventos tempranos más importantes inducidos por los andrógenos en el núcleo de sus células blanco se encuentra la activación de la síntesis de RNA en todos sus tipos.

La transcripción del RNA ribosomal y mensajero es estimulada por el agregado de receptor-hormona a núcleos aislados (MAINWARING - 1971) (c) descartándose una activación directa de las RNA Polimerasas endógenas por parte del complejo. Varios laboratorios (DAVIES - 1975, MAINWARING - 1975) aportaron pruebas de que el principal efecto del agregado del complejo en los ensayos de transcripción era un aumento en la capacidad de templado. Este efecto es saturable y específico para templados provenientes de órganos efectores confirmando la participación de los aceptores proteicos descritos.

La actividad de fosfoquinasas capaces de fosforilar histonas aumenta rápidamente por acción de los andrógenos y progesterona en sus órganos efectores (AHMED - 1971), (WILSON - 1977), (SUTHERLAND - 1977). Al aumento de la movilidad de las histonas que relaja el empaquetamiento del DNA facilitando su copia sería una de las vías de acción iniciales del complejo receptor-hormona.

La existencia de sitios fuertemente retenidos durante varias horas luego de la inyección de hormona concuerda con los resultados de BARRACK y col. (1977, 1980) según los cuales, la estructura subcelular conocida como matriz nuclear, resultado de la remoción de proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos, mantiene una notable capacidad aceptora para receptores de estrógenos y andrógenos. Estas estructuras parecen estar firmemente relacionadas con el mecanismo de replicación del DNA (MAINWARING - 1980 (b), BEREZNEY - 1975) y apoyaría la participación directa del complejo receptor-hormona en el proceso de inducción de esta síntesis para la división celular, considerando como uno de los efectos tardíos de la estimulación hormonal.

La participación del receptor androgénico es un requisito para la estimulación hormonal en la mayoría de las etapas estudiadas y los puntos de regulación más fina y de efectos más amplificados estarán relacionados con el mismo.

Sólo su disponibilidad en altas concentraciones, su efectiva translocación y la prolongada retención nuclear garantizarán una respuesta efectiva.

La capacidad de los andrógenos de regular sus propios sitios de unión nuclear se ofrece como interesante perspectiva para el estudio de la respuesta hormonal en el órgano quiescente y en el estímulo.

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Usando como modelo al epidídimo de la rata castrada se procurará avanzar en el estudio del mecanismo de acción de los andrógenos en este órgano.

La posible regulación de la respuesta a los andrógenos por la testosterona misma será investigada en ratas sometidas a castración y administración de hormona exógena. La variación en la compartimentalización y concentración de los receptores para andrógenos como resultado de este tratamiento será analizada como índice más inmediato de la capacidad de respuesta del órgano.

Se intentará con el mismo modelo experimental esclarecer el mecanismo por el cual los compuestos denominados con el nombre genérico de antiandrógenos ejercen su efecto antagonista con la hormona.

Usando como modelo experimental al epidídimo humano en cultivo de órgano se estudiará la respuesta del mismo a los andrógenos y su mecanismo de acción. Se procurará, así mismo, inducir la síntesis de factores epididimarios que, como se ha probado en la rata, están involucrados en la maduración de los espermatozoides.-

II. ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE REGULACION INTRACELULAR DE LA
RESPUESTA A ANDROGENOS EN EL EPIDIDIMO.

v

II.1 Introducción.

Una franca regresión de los parámetros andrógeno-dependientes en el epidídimo sigue a la castración del animal como resultado de la interrupción del estímulo hormonal (CAMEO - 1976, de LARMINAT - 1978, GONZALEZ E CHEVERRIA - 1981, KOHANE - 1981, BLAQUIER - 1972, MAJUNDER - 1976). Sin embargo la regeneración de la próstata y el epidídimo como respuesta a una terapia restitutiva de andrógenos evidencia una etapa de quiescencia o "lag". La reinducción de la actividad 5α reductasa en epidídimo (de LARMINAT - 1978), y la actividad mitótica en la próstata de animales castrados solo alcanzan diferencias significativas con los controles al cuarto y segundo día de terapia respectivamente. El retraso en la respuesta sugiere la hormono-dependencia de los pasos primeros de la estimulación hormonal.

La inducción y/o modulación de los receptores por sus hormonas ha sido postulado como uno de los primeros sitios de regulación de la respuesta hormonal.

El estudio del receptor citoplasmático de andrógenos en el epidídimo (PODESTA y col.), (CALANDRA y col. - 1975), (PUJOL y BAYARD - 1979) y la próstata (SULLIVAN y STROTT - 1973), (GREENSTEIN - 1979) resalta la importancia de los andrógenos en la manutención del número de sitios en el citoplasma. Sólo luego del desarrollo de técnicas de intercambio este estudio fue extendido a la posible regulación del receptor nuclear, verdadero parámetro de la sensibilidad fisiológica. Así Von DOORN y col. (1976), DAVIES y col. (1979) y BLONDEAU y col. (1975) validan los postulados iniciales de regulación hormonal de los sitios de unión en la próstata y postulan la inducción por andrógenos de la síntesis " in vivo " de sus propios receptores en ese órgano.

Este mecanismo de regulación anteriormente descrito para los estrógenos en útero (JENSEN y col. - 1969), (SARFF y GORSKI - 1971) alcanzó en este último modelo la mayor explicitación. El complejo receptor-hormona luego de su translocación y acción dentro del núcleo puede sufrir varias vías alternativas, una de ellas es la utilización sin disociación previa mediante su reciclado al citoplasma con conservación de actividad. Esto parece ser característico de condiciones de baja disponibilidad de hormona; sin embargo este efecto es de corta duración.

La disociación que parece ser el evento más común lleva a la formación de receptor libre dentro del núcleo pudiendo ser degradado o reciclado al citoplasma para incorporarse a un nuevo ciclo de captación. La síntesis "de novo" de receptor es la respuesta a la estimulación hormonal. La continua utilización y reciclado provocada por una estimulación hormonal sostenida es la condición para una síntesis constante del receptor (MULDOON - 1980).

Aún así no existe un mecanismo único y definido que explique estos cambios en la población de receptores hormonales. Al control positivo antedicho, por el cual estrógenos y andrógenos inducen la síntesis de sus propios receptores, se agrega la regulación de otros receptores, tal es el caso de la síntesis de receptor de progesterona inducida por estrógenos en el oviducto del pollo (TOFT y col.), útero de rata y hamster (MILGROM y col. - 1970).

Así también existen controles negativos como el ejercido por la progesterona sobre el reciclado de receptor estrogénico en útero de rata (MESTER y col.) o la desestabilización del receptor de progesterona luego de la inyección de la hormona correspondiente (MILGROM y col. - 1973). Estos efectos negativos también pueden estar

presentes en la acción de andrógenos y estrógenos ya citada pero ver se enmascarada por la estimulación de la síntesis antes mencionada. El " consumo " de los receptores, tal es el caso de la progesterona en el oviducto de aves, durante la acción hormonal, no se descarta como posible explicación de esta inhibición (SUTHERLAND - 1976).

Múltiples factores pueden influenciar la determinación de receptores en animales sujetos a manipuleo hormonal. Debido a que los métodos de detección de receptores se basan en la unión de hormona, variaciones en los parámetros cinéticos de unión (debido a desestabilización de la molécula proteica) estabilización por agentes químicos de formas inactivas (LEACH), (NISHIGORI), degradación del receptor por proteólisis, enmascaramiento por hormona endógena como así también cambios en la compartimentalización del complejo, pueden conducir a interpretaciones erróneas.

La variación relativa de la población de células sensibles junto con los factores antedichos resultarán en una variación en el número de sitios de unión sin que esto signifique una regulación real del número de receptores por célula.

La cuantificación de receptores citoplasmáticos como parámetro de sensibilidad del tejido se ve complicada con la existencia de proteínas de secreción extracelular con capacidad de unir esteroides. Tal es el caso de la Prostateína prostática o PBP (HEYNS) y el ABP testicular presente en el epidídimo que pueden llegar a oscurecer los resultados de unión de esteroides a los receptores citoplasmáticos. Una naturaleza de este tipo es especulada para los receptores tipo II descritos para los estrógenos en el útero (ERIKSSON), (CLARK - 1979).

La correlación entre la retención nuclear del complejo y la mayoría de los eventos inducidos por la hormona lleva a considerar al receptor nuclear el parámetro más representativo de la sensibilidad hormonal. Aunque los trabajos de BRUCHOVSKY y col. (1975) y BLANDEAU y col. postulan para el receptor de andrógenos en la próstata de la rata un mecanismo de formación independiente del receptor citoplasmático, sin embargo se acepta en general a la activación de este último complejo y su translocación al núcleo como vía de retención nuclear de la hormona.

Aunque el mecanismo de activación " in vitro " está sujeto a muchas interacciones, experimentos " in vivo " parecen demostrar que simplemente se alcanza un equilibrio entre las formas citoplasmáticas y nucleares dependiendo solamente de las concentraciones iniciales de receptor citoplasmático y de la oferta adecuada de hormona (WILLIAMS).

En el siguiente capítulo se analizará el efecto de los andrógenos sobre la concentración de sus sitios receptores y su relación con los parámetros fisiológicos susceptibles de estimulación hormonal.

II.2 Animales y tratamientos.

Los animales usados fueron ratas Wistar machos adultos de 70 a 120 días de edad mantenidas con un régimen de luz de 14 horas alternada con 10 horas de oscuridad y que recibieron comida y bebida " ad libitum ".

A fin de obtener los epidídimos libres de espermatozoides y fluido testicular se llevó a cabo la ligadura de los conductos eferentes por vía escrotal o abdominal cuidando de preservar la irrigación sanguínea. Para la castración de los animales se procedió por las mismas vías y con los mismos recaudos.

Para el uso de la técnica de marcación " in vivo " grupos de 4 ratas controles castradas por 48 hs o por 20 días fueron eviscerados bajo anestesia, funcionalmente hepatectomizados e inyectados en la arteria ilíaca con 50 uCi de (1,2,6,7-³H) testosterona. Los animales fueron sacrificados luego de 2 hs por dislocación cervical y los epidídimos fueron removidos, disecados cuidadosamente y mantenidos en solución salina a 0° C.

Grupos similares de animales fueron castrados por 20 días y recibieron dos dosis diarias de 200 ug de propionato de testosterona en aceite en forma de inyecciones subcutáneas en la región dorsal por espacio de 2, 4, 8 y 12 días o DHT en las mismas condiciones por 12 días. Luego de 48 hs de la última inyección se procedió a la marcación " in vivo " del receptor

Para la técnica de marcación " in vitro " los animales cuyos epidídimos habían sido ligados fueron castrados con excepción de los

controles por espacio de 1, 2, 4, 11 y 20 días. La totalidad de días de castración más ligadura de los ductos fue la misma para todos los lotes. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, directamente el día del experimento eviscerados y los epidídimos fueron cuidadosamente disecados y mantenidos en solución salina a 0° C.

Para otra serie de experimentos en los que se estudió el control sobre la translocación nuclear del receptor, animales cuyos epidídimos habían sido ligados por 7 días y luego castrados por 48 hs, fueron inyectados intraperitonealmente con 0,15 ug; 1,5 ug; 15 ug; 150 ug; 500 ug y 1 mg de 5 α Dihidrotestosterona disuelta en 0,4 ml de etanol: salina (1:1). Los controles fueron inyectados con vehículo, noventa minutos más tarde los animales fueron sacrificados y los epidídimos fueron disecados. Sólo la región proximal al testículo o CAPUT cuyos túbulos estaban visiblemente libres de espermatozoides fueron utilizados.

Para ser usados en otra serie de experimentos animales castrados por 25 días recibieron propionato de testosterona como ya fue descrito durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 11 días. Los controles recibieron solo vehículo. Completado el tratamiento los animales recibieron una última inyección intraperitoneal de 150 ug de 5 α DHT en etanol-salina y fueron sacrificados para el experimento 90 minutos más tarde.

II. 3 Materiales y Métodos.

II.3.1 Drogas y soluciones.

La (1,2,6,7-³H) testosterona (AE 90 Ci/mMol); (1,2,4,5,6,7-³H) Dihidrotestosterona (110 Ci/mMol); trimetil trienolona (R 1881) (AE 87 Ci/mMol) y la Me ³H timidina (AE 20 Ci/mMol) y el R 1881 no radioactivo fueron provistos por New England Nuclear (Boston, M.A.). La estabilidad de estos compuestos fue controlada mediante cromatografía contra patrones no radioactivos.

El propionato de testosterona, el RU 23908 y el acetato de Cyprosterona fueron gentilmente cedidos por los laboratorios Gador S.A. (Bs. As. - Argentina), Roussel Uclaf (Romain Ville - Francia) y Schering (Berlín) respectivamente. Los demás esteroides fueron marca Sigma (St. Louis Mo). El tris (hidroximetil) amino metano (Trizma Base o tris) marca Sigma como todas las demás drogas usadas para la preparación de bufferes fueron de grado analítico y el agua usada en todos los casos fue bidestilada. Los bufferes usados son los que se detallan continuación:

tris : tris 20 mM, Ditiotreitól (DTT) 1 mM, EDTA 1 mM, Cl₂Ca 3 mM
pH 7,4.

tris R : tris 20 mM, Sacarosa 0,25 M, DTT 1 mM, EDTA 1mM, Cl₂Ca 3 mM, glicerol 10 %, pH 7,4.

tris N : tris 20 mM, Sacarosa 0,25 M, DTT 1 mM, Cl_2Ca 3 mM, pH 7,4.
tris S : tris 20 mM, Sacarosa 1,9 M, DTT 1 mM, Cl_2Ca 3 mM, pH 7,4.
tris KCl : tris 20 mM, ClK 0,6 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 8.

En todos los casos la disolución inicial de los componentes se llevó al volumen deseado con agua. En el caso particular del buffer tris S dado el gran volumen ocupado por la sacarosa (aproximadamente la mitad del volumen final deseado) ésta fue disuelta en tris 40 mM, Cl_2Ca 6 mM, DTT 2 mM en agua a fin de obtener las concentraciones finales adecuadas. El pH fue ajustado a una temperatura de 5° C por el agregado de ácido clorhídrico concentrado.

Todos los bufferes fueron congelados hasta su uso para evitar contaminaciones.

El medio 199 (DIFCO) fue esterilizado mediante filtración.

II.3.2 Control histológico.

Se tomaron muestras del CAPUT epididimario de aproximadamente 50 mg y procesadas para análisis histológico y morfométrico. El tejido se fijó en solución de Bouin, fue deshidratado por las técnicas habituales e incluido en parafina para luego obtener cortes de 5 μ de espesor que fueron coloreados con hematoxilina - eosina. Los preparados obtenidos fueron fotografiados en un fotomicroscopio Zeiss obteniéndose copias positivas con un aumento de aproximadamente 1500 veces.

Con ayuda de una grilla cuadrada se procedió al recuento de cada tipo celular calculándose la proporción entre ellas en cada lote experimental. La significación de las diferencias entre ellos se obtuvo aplicando el test de Tukey (LISSON).

II.3.3 Estimación del grado de proliferación celular.

Se tomaron trozos de tejido similares a los descritos anteriormente de los distintos lotes experimentales. Fueron divididos en explantos no mayores de 3 mm³, bajo condiciones de asepsia montados sobre grillas de acero inoxidable y depositados en cápsulas de cultivo de órgano (FALCON 3037) sobre medio de cultivo 199 que contenía 1 μ Ci de ³H Metiltimidina. El tejido fue incubado en condiciones estériles por espacio de 16 hs en un incubador National a 33 °C bajo una atmósfera de aire con un 5 % de dióxido de carbono. Los explant-

tos fueron lavados con solución salina y homogeneizados en 1 ml. de buffer tris N a 0 °C con un homogeneizador Polytron (BRINKMAN) (posición 5) mediante tres pulsos de 15 segundos a intervalos de 30 segundos. La suspensión obtenida fue filtrada a través de malla de nylon y el filtrado fue centrifugado a 2000xg 10 minutos. El precipitado obtenido fue resuspendido en 1 ml de buffer para repetir nuevamente el lavado. La última resuspensión fue mezclada con 1 volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % en agua bidestilada y se dejó precipitar en frío por 15 minutos. El precipitado obtenido fue volcado sobre filtros de fibra de vidrio (WHATMAN FG/C) y lavados con TCA al 5 %. Alícuotas precipitadas en paralelo fueron congeladas para la posterior determinación del contenido de DNA. Una vez secos los filtros fueron transferidos a viales de conteo para la estimación de la radioactividad retenida.

II.3.4 Cuantificación de la radioactividad.

Las muestras sólidas o líquidas fueron transferidas a viales de conteo y se agregaron 7 ml de solución centelleante (4g Omnifluor New England Nuclear por litro de tolueno). En los casos correspondientes los viales fueron dejados en la oscuridad por 24 hs a fin de evitar cuentas espúreas debido a quimioluminiscencia, o para facilitar la extracción de los compuestos radioactivos en la fase orgánica. Se usó un contador de centelleo líquido Beckman LS 100 con una eficiencia del 65 % para el tritio.

II.3.5 Obtención de las fracciones subcelulares.

El tejido obtenido de los distintos lotes experimentales fue pesado y disgregado con tijeras sobre un baño de hielo. Todas las operaciones siguientes fueron llevadas a cabo entre 0 - 4 °C. Resuspendido en 4 volúmenes con respecto al peso de tejido de buffer tris R para el caso de marcación " in vitro " o de tris (5 % sacarosa) para el tejido proveniente de animales " marcados " "in vivo " el tejido fue homogeneizado como ya se describió, filtrado a través de malla de nylon y centrifugado a 2000xg 10 minutos. El sobrenadante fue centrifugado en un rotor Ti 50 (Beckman) a 105.000xg 40.000 rpm por 60 minutos en una ultra centrífuga Beckman LS - 50 obteniéndose un precipitado que se descartó y la fracción soluble celular o citosol en el sobrenadante. Este fue cuidadosamente aspirado mediante pipetas Pasteur evitando tomar la grasa flotante y conservado en hielo para su posterior análisis. El precipitado de 2000xg se resuspendió suavemente en 4 volúmenes de buffer tris N y recentrifugado como antes. El precipitado obtenido fue resuspendido en aproximadamente 7 ml de buffer tris S mediante el uso de un homogeneizador tipo Dounce y centrifugado a 60.000xg durante 80 minutos con los mismos elementos antes usados para obtener el citosol. Los restos celulares flotantes y el líquido sobrenadante fueron descartados y el precipitado disperso y traslúcido fue resuspendido en 5 a 7 ml de buffer tris N para ser centrifugado a 2000xg 10 minutos.

Este último precipitado fue resuspendido en 1 volumen (con respecto al peso original de tejido) de buffer tris KCl y disgregado a 0 °C durante 90 minutos mediante el uso de pipetas Pasteur hasta obte

ner una suspensión gelatinosa. La centrifugación a 60.000xg por 20 minutos permite la obtención de un sobrenadante denominado " extracto nuclear " (que se mantiene a 0 °C hasta su posterior análisis) y un precipitado que se resuspende en agua bidestilada y se congela para la determinación de DNA.

II.3.6 Sedimentación en gradientes de densidad.

Armado de los gradientes de sacarosa.

Se colocaron en sendos recipientes las siguientes soluciones:

Solución A

Buffer tris (20 % sacarosa) 12 ml.

Solución B

Buffer tris 20 ml.

Mediante una bomba peristáltica se agregó la solución B a la A al mismo tiempo que la mezcla resultante (agitada magnéticamente) fue bombeada hacia 4 tubos de centrifuga (4 ml, rotor Beckman SW 56) que fueron llenados sin crear ningún tipo de turbulencias. El flujo de salida de la mezcla de A fue el doble del de entrada del diluyente B obteniéndose en los tubos de centrifuga gradientes lineales de sacarosa del 20 % al 5 %.

Los gradientes descriptos fueron usados para la detección del receptor citoplasmático. Para el caso del receptor nuclear la metodología fue la misma pero el buffer tris KCl fue usado en lugar del tris. Se dejaron equilibrar los gradientes a 5 °C toda la noche. Alf-

cuotas del citosol obtenido de la marcación " in vivo " conteniendo 2 mg de proteínas fueron depositados sobre los gradientes y centrifugados por 12 hs en un rotor Beckman SW 56 a 48.000 rpm 230.000xg(media) en una ultracentrífuga Spinco L 2 - 65 - B. Finalizada la centrifugación los gradientes fueron fraccionados succionando desde el fondo del gradiente con cánulas conectadas a una bomba peristáltica. Se recogieron 30 fracciones por gradiente y la radioactividad en cada una de ellas fue cuantificada como se describió anteriormente. Para el ensayo de receptor nuclear se agregaron 0,4 ml de los respectivos extractos nucleares a los correspondientes gradientes y estos fueron centrifugados a 60.000 rpm por 16 hs 257.000xg(media) en un rotor Beckman SW 65 con la metodología ya descrita.

En todos los casos se utilizó Albúmina sérica bovina y Hemoglobina como patrones de coeficientes de sedimentación conocidos.

II.3.7 Marcación " in vitro ".

Las fracciones citosólica y nuclear se obtuvieron de la forma antes citada de los distintos lotes experimentales para la marcación " in vitro " en condiciones de intercambio.

El citosol conteniendo de 5 a 10 mg de proteína por ml fue pretratado con carbón a fin de adsorber la hormona endógena libre. Se agregó 0,1 volumen de una suspensión de 5 % de carbón activado (Norit " A " - Fischer) y 0,5 % de Dextrano (PM 70.000 D) (Sigma) en tris R durante 10 minutos con eventual agitación, la suspensión fue centrifugada a 10.000xg 15 minutos y el sobrenadante cuidadosamente tomado con pipeta Pasteur y conservado a 4 °C.

II.3.8 Pretratamiento del carbón.

El carbón usado para adsorciones fue lavado según el método de WILSON y FRENCH (1976) con ácido ClH 0,1 N 10 minutos con agitación, la suspensión fue centrifugada y el precipitado resuspendido en OHNa 0,1 N 10 minutos y vuelto a centrifugar. El precipitado fue resuspendido en agua bidestilada, filtrado y lavado hasta neutralidad del líquido de drenaje. Seguido de un lavado con etanol el carbón fue secado bajo calor radiante y guardado para su uso.

II.3.9 Ensayo de unión de ^3H R1881 .

El ligando radioactivo fue usado en concentraciones únicas finales de 10 nM para las pruebas preliminares. Series paralelas de tubos fueron incubadas con ^3H R1881 y concentraciones 500 veces superiores de R 1881 no radioactivo a fin de evaluar la unión no específica.

Para la determinación cuantitativa las fracciones fueron incubadas en un rango de concentraciones 0,5; 1; 2; 4; 8 y 16 nM de ^3H R 1881 con las correspondientes series paralelas para evaluar la unión no específica.

En todos los casos el esteroide fue agregado en su solvente habitual benceno-etanol (9:1) que fue evaporado bajo flujo de aire antes de colocar el extracto celular. El volumen de citosol y/o extracto nuclear usado fue de 0,1 ml y la incubación se llevó a cabo a 15

y 10 °C respectivamente por espacio de 16 hs en las determinaciones habituales. A fin de evaluar la real concentración de ^3H R1881 soluble en las condiciones del ensayo todo el rango de concentraciones de ^3H R1881 usado fue incubado con 0,1 ml de un citosol cualquiera con un rango de contenido de proteínas similar al ensayado. Luego de las 16 hs el contenido total del tubo fue transferido a viales de conteo a fin de evaluar la radioactividad.

Para la fracción citosólica la separación de la hormona libre de la unida al receptor luego de la incubación fue llevada a cabo mediante una adsorción de la primera con carbón. Para ello a los tubos colocados en baño de hielo se les agregó 1 volumen de una suspensión (agitación magnética constante) de 1 % de carbón, 0,5 % de Dextran en buffer tris R a 0 °C, se dejó actuar 10 minutos con eventual agitación mecánica y se centrifugó a 2000xg 10 minutos. Una alícuota de 0,15 ml del sobrenadante fue transferida a viales de conteo para determinación de radioactividad.

Para la cuantificación de la fracción unida al receptor nuclear se usó la técnica de exclusión por gel. Luego de la incubación se agregó a los tubos 1 volumen de 2 - 5 % azul de Dextran $\text{PM } 2 \times 10^6$ en buffer tris KCl y la solución coloreada fue aplicada con pipetas Pasteur sobre mini - columnas de Sephadex G - 25 (Pharmacia, Sweden) (1x8 cm aproximadamente, con 6 ml de lecho) armadas en pipetas de plástico descartables (Falcon 7521).

Se eluyó la banda coloreada mediante el agregado de alícuotas de 0,1 ml de buffer tris ClK con un dosificador automático. El tiempo utilizado para la elución simultánea de 10 columnas nunca fue menor de 3 minutos a fin de garantizar un flujo suficientemente lento. La fracción azul correspondiente al volumen excluido de la

matriz fue recogido en viales de conteo y la radioactividad evaluada como antes.

Todas las operaciones hasta la obtención de la fracción eluida de la columna fueron llevadas a cabo a 0 - 5 °C en cuarto frío o enfriando todo el material en baño de hielo previo a su uso.

Los datos de las curvas de saturación obtenidas fueron analizados de acuerdo con el método de linealización de SCATCHARD y por extrapolación de estos valores se obtuvo el número de sitios y las constantes de disociación. El error en los parámetros de unión resultó del análisis de regresión de las rectas mediante el uso de una computadora Hewllet Packard y la diferencia significativa entre lotes se obtuvo aplicando el test estadístico de TUKEY.

II.3.10 Ensayo de actividad proteolítica.

La actividad proteolítica fue estimada por el método de FELL y DINGLE.

El tejido fue homogeneizado en 10 volúmenes de una solución de sacarosa 0,25 M. Se separó la fracción nuclear por centrifugación y el sobrenadante fue centrifugado a 1000 xg 20 min y lavado dos veces por resuspensión y centrifugación en buffer acetato 0,05 M pH 5,0 sacarosa 0,25 M y finalmente resuspendido en el mismo a razón de 2 ml por epidídimo.

Los lisosomas fueron labilizados por incubación en tubos de polietileno a 37° C 60 oscilaciones/min por 15 minutos y posterior agregado de triton X100 hasta el 0,1 % por 30 minutos a la misma tem-

peratura.

El extracto enzimático libre de partículas se obtuvo en el sobrenadante de la centrifugación a 105000 xg por 60 min.

Para el ensayo de actividad proteolítica se mezclaron las siguientes cantidades:

1 ml de extracto enzimático

1 ml Hemoglobina 2% disuelta en buffer Acetato 0,1 M ph 4,0

y se incubaron a 37° C por 60 min en tubos tapados. Al final de la incubación se agregó 3 ml de TCA 5 % a 0° C y se filtró por discos de fibra de vidrio Wahtman GF/C y en el filtrado analizar la tirosina soluble con el reactivo de Folin.

Los controles se incubaron en presencia de TCA al 5 % y se filtraron de la manera descripta.

La actividad se expresa como ug de tirosina ácido soluble/hr.

II.3.11 Otros métodos.

Las proteínas fueron determinadas por el método de LOWRY usando albúmina sérica bovina como patrón. El DNA fue medido por la técnica de BURTON usando DNA de Salmón como patrón.

II.4 Resultados.

II.4.1 Efecto de la castración y terapia androgénica sobre la concentración de receptores libres para andrógenos en el epidídimo de la rata.

Receptor citoplasmático.

Grupos de 4 ratas castradas por 48 hs (controles) y por 30 días fueron usadas para la marcación " in vivo " del receptor citoplasmático como se describe en materiales y métodos.

Mediante el análisis por sedimentación en gradientes de sacarosa se obtuvieron los resultados que se muestran en la Fig. 2 panel A. El pico de radioactividad asociada al componente 8 S del citoplasma en los animales controles decrece hasta valores no detectables por este método, en el citosol de animales castrados por 30 días. En estos casos la radioactividad no parece estar asociada a macromoléculas permaneciendo como hormona libre en la parte superior del gradiente. No se observan componentes de mayor coeficiente de sedimentación que el 8 S encontrado en los controles.

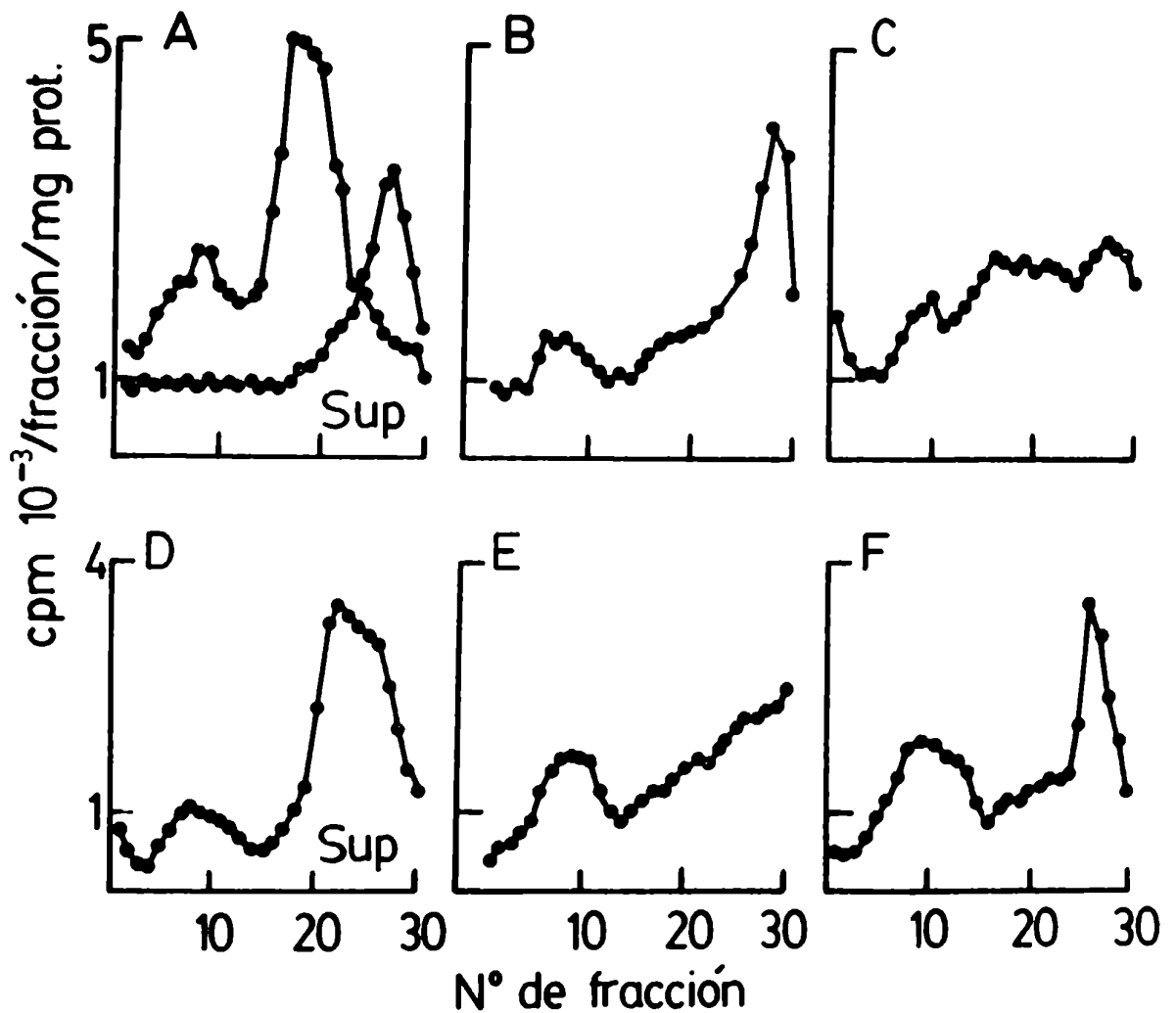


Figura 2 Concentración de sitios receptores libres para andrógenos en citosol de epidídimo como resultado de la marcación "in vivo" mediante la inyección de 50 μCi de $(1,2,6,7\text{-}^3\text{H})$ Testosterona y posterior análisis por sedimentación en gradientes de Sacarosa en lotes de ratas castradas por (A) 2 días (trazo superior) y 30 días (trazo inferior) y castradas por 30 días e inyectadas con Propionato de Testosterona (400 μg) por (B) 2 días, (C) 4 días, (D) 8 días, (E) 12 días, y 5α Dihidrotestosterona (F) por 12 días.

El tratamiento de un grupo de animales castrados por 30 días con 400 ug de propionato de testosterona produce la reaparición del receptor citoplasmático en cantidades comparables a las del control.

Se llevó a cabo un estudio a lo largo del tiempo para esta recuperación de los niveles de receptor. Grupos de 4 animales castrados por 30 días fueron inyectados con propionato de testosterona durante 2, 4, 8 y 12 días y con 5 α DHT por 12 días y la marcación " in vivo " fue hecha 48 hs después de la última inyección.

Los resultados que muestran en la Fig. 2 panel B a F indican que la unión al componente B S ausente en los gradientes correspondientes a los animales castrados aumenta conforme progresa la terapia con andrógenos. La detección inequívoca del receptor B S es posible ya a los 2 días de tratamiento. El resultado en el panel F indica que la DHT es tan efectiva como la testosterona para producir la reinducción del receptor.

Receptor nuclear.

Animales sometidos al mismo esquema experimental anterior fueron sometidos a la marcación " in vivo " con las modificaciones para la detección de receptor nuclear. La sedimentación en gradientes del extracto nuclear como se observa en la Fig.3 muestra el componente 3,5 S en los lotes controles y su disminución con la castración. El tratamiento androgénico no eleva los niveles de receptor nuclear por encima de los del animal castrado.

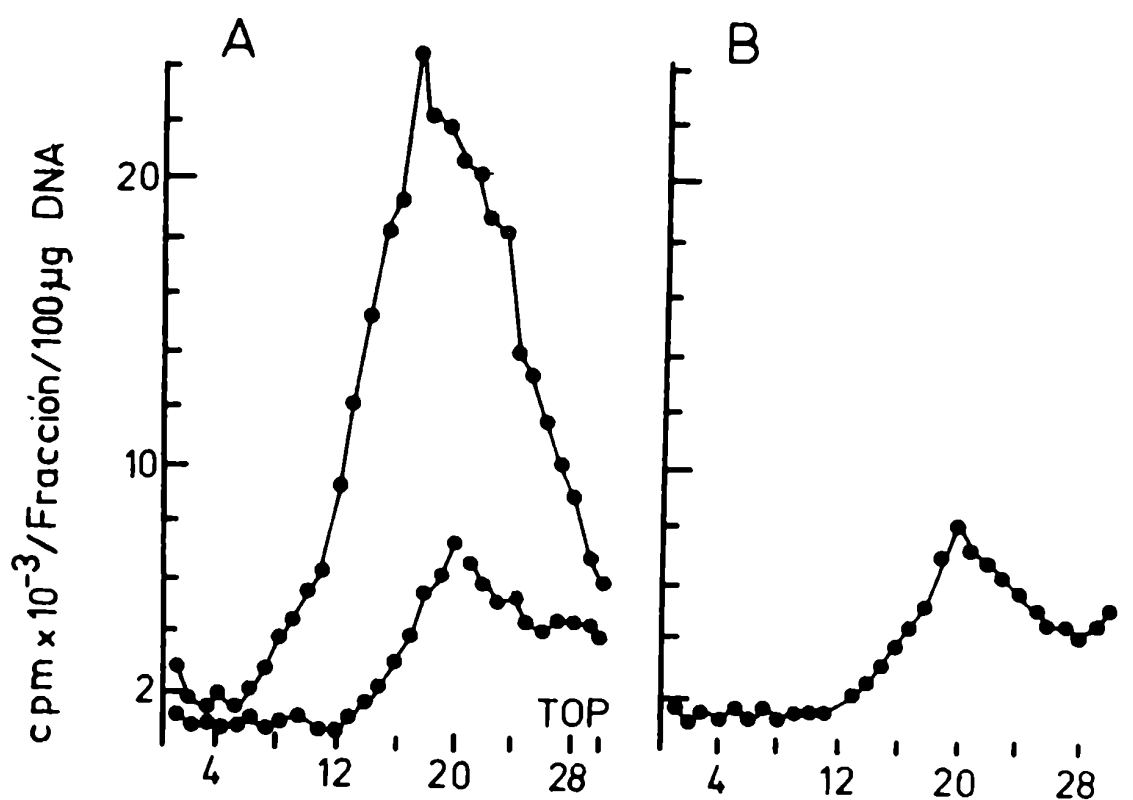


Figura 3 Concentración de sitios receptores nucleares translocables como resultado de la marcación "in vivo" (como se detalla en la figura 2) en ratas castradas por (A) 2 días, (B) 30 días, (C) castradas por 30 días e inyectadas por 12 días con propionato de Testosterona (400 µg/día)

II.4.2 Especificidad de unión a la fracción nuclear.

Una diferencia importante entre los epidídimos del control y los grupos experimentales radica en la presencia de espermatozoides en el primero. Como la técnica usada para purificar núcleos no elimina la contaminación de esta fracción con espermatozoides, se estudió de qué manera estos pudieran interferir en la captación nuclear de andrógenos. La marcación " in vivo " fue llevada a cabo en un grupo control de animales e inmediatamente luego del sacrificio los órganos fueron separados y el líquido luminal extraído por perfusión del segmento distal mediante un catéter introducido en el vas deferens. Se obtuvieron así tres fracciones:

- a) tejido total CAPUT y CORPUS.
- b) contenido intraluminal (espermatozoides y fluido).
- c) tejido sin espermatozoides CAUDA.

Luego de la homogeneización se obtuvo la fracción nuclear correspondiente y cada una fue dividida en dos partes. Una de ellas procesada por el método habitual y la otra purificada y extraída en un medio conteniendo 3×10^{-5} M 5α -DHT a fin de desplazar la radioactividad débilmente unida. La Fig. 4 muestra los perfiles de sedimentación del extracto nuclear del tejido y espermatozoides. La presencia de 5α DHT en exceso desplaza aproximadamente el 30 % de la radioactividad del pico 3,5 S proveniente del tejido entero. Espermatozoides provenientes de estos epidídimos marcados " in vivo " no evidencian una unión de andrógenos en la zona correspondiente al receptor. En el panel B se muestran los resultados obtenidos con la fracción

nuclear del tejido perfundido libre de espermatozoides.

La similitud de estos resultados con aquellos obtenidos con tejido entero refuerzan el concepto de que el complejo receptor-hormona 3,5 S anteriormente detectado proviene del tejido epididimario sin contribución de los espermatozoides. A pesar de la especificidad en la localización nuclear del receptor los experimentos posteriores fueron realizados con animales cuyos epidídimos habían sido ligados en los conductos eferentes para interrumpir la entrada de espermatozoides y fluido testicular y poder de este modo expresar los resultados por mg de DNA o por célula. Este procedimiento quirúrgico no afecta la provisión de andrógenos que a través del plexo pampiniforme llegan desde el testículo. La supresión de los andrógenos intraluminales restantes no parece afectar la concentración de receptores en el tejido (PUJOL).

II.4.3 Desarrollo de un método de intercambio para cuantificación de sitios receptores totales.

Las técnicas descriptas sólo permiten la medición de sitios accesibles luego de la deprivación hormonal del animal ya sea por castración o interrupción de la terapia de reemplazo. Este procedimiento afecta la compartimentalización de los sitios receptores a la vez que resta eficiencia al tratamiento hormonal.

Así, fue necesario el desarrollo de un método que permitiera la cuantificación de sitios en condiciones más fisiológicas. La técnica descrita por BONNE y RAYNAUD para receptores androgénicos en prósta-

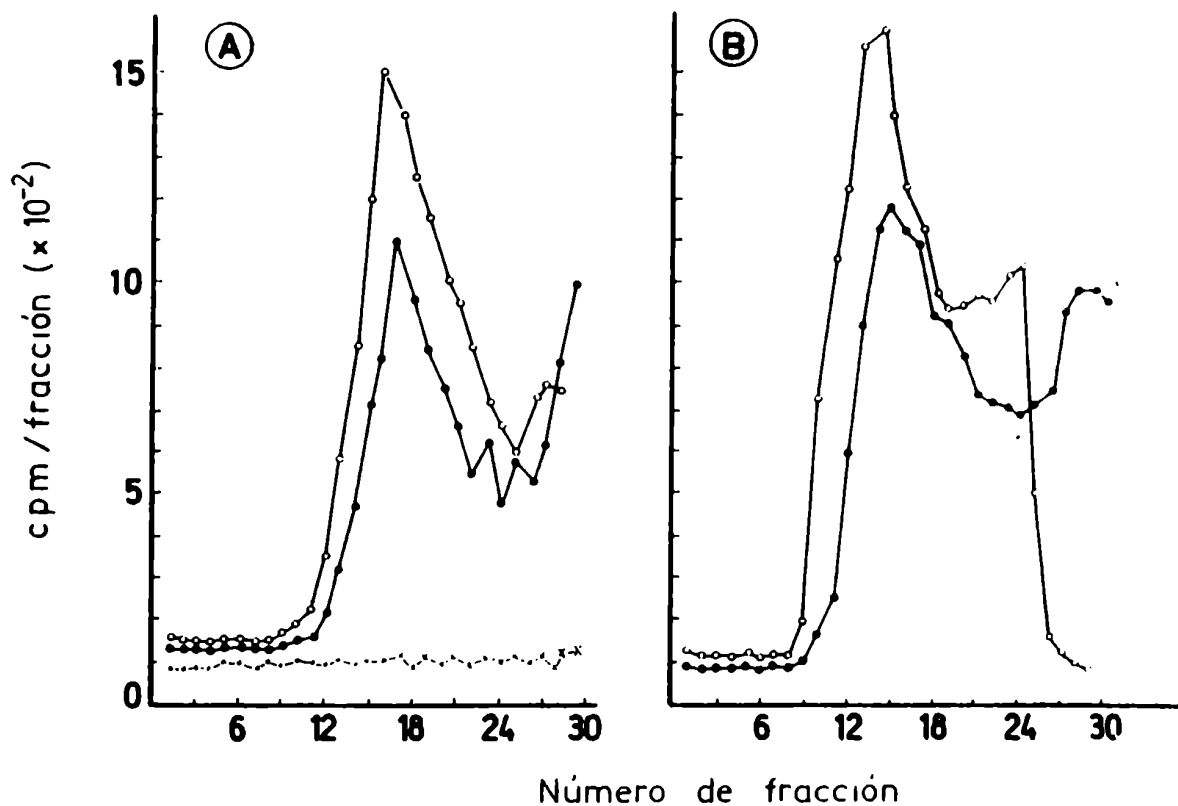


Figura 4 Especificidad del Receptor Nuclear marcado "in vivo".

Ratas controles fueron inyectadas como se explica en la figura 2 y las distintas fracciones obtenidas y analizadas como se detalla en II.2

Panel A : o-o tejido total; ●-● tejido total competido con 5α -DHT
X-X contenido intraluminal (principalmente espermatozoides)

Panel B : o-o CAUDA perfundido, ●-● CAUDA perfundido competido.-

ta fue adaptada para este propósito y se desarrolló una nueva metodología para el ensayo en extractos nucleares.

II.4.3.a Condiciones óptimas de ensayo.

La fracción citosólica y el extracto nuclear de epidídimo ligados por 7 días fueron incubados con una concentración de $10 \text{ nM } ^3\text{H}$ R1881 a varias temperaturas por espacio de 16 hs. La cuantificación de ligando específicamente unido se determinó por desplazamiento con R1881 no radioactivo como se indica en materiales y métodos. La tabla I muestra los resultados obtenidos con ambas fracciones. El porcentaje de unión específica aumenta con la temperatura de ensayo siendo máxima a los $15 \text{ }^\circ\text{C}$ para el citosol y a los $10 \text{ }^\circ\text{C}$ para el extracto nuclear. La disminución a temperaturas mayores puede ser debida a degradación de estos sitios cuya termo-labilidad ha sido ya documentada (HANSSON - 1975).

II.4.3.b Especificidad hormonal.

La especificidad de ligando fue estudiada mediante la incubación de los diferentes extractos con $10 \text{ nM } ^3\text{H}$ R1881 en presencia de los competidores no radioactivos en concentraciones 10, 100, 300 y 1000 veces superior, por espacio de 16 hs a la temperatura de máxima unión. Los resultados de la Fig. 5 muestran que la competición por sitios de unión en el citosol (panel A) sólo es efectiva en caso

TABLA I EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA UNION ESPECIFICA DE (³H) R 1881 EN EPIDIDIMO DE RATA.

Temperatura ° C	CITOSOL fmoles/mg prot	EXTRACTO NUCLEAR fmoles/mg DNA
0	5,2 ± 0,3	100 ± 8
5	8,3 ± 0,5	410 ± 36
10	18,0 ± 1,3	560 ± 51
15	24,9 ± 3	240 ± 32
20	5,9 ± 2	60 ± 20

La metodología usada para la obtención de las distintas fracciones subcelulares y la determinación de la unión específica se describen en II.1-

de ligandos con conocida acción androgénica (5α DHT y T) o antian-
drogénica como el acetato de cyproterona o el RU 23908 (RAYNAUD -
1977). Andrógenos débiles como la 5β DHT o la Δ_4 Androstenediona
no compiten efectivamente. El ligando usado, R1881, a la vez que po-
tente andrógeno es un eficaz progestágeno y como tal se une a los
receptores de progesterona. La falta de inhibición de la progesterona
y la acetona de triemcinolona (efectivo competidor por el recep-
tor de progesterona) descartan esta interacción en el epidídimo de
la rata como responsable de la unión específica del compuesto mencio-
nado. Similares perfiles de competición fueron observados al estu-
diar la especificidad del receptor nuclear (panel B).

II.4.3.c Validación del método de intercambio.

El estudio de los parámetros de la unión de hormona a macromo-
léculas se llevó a cabo sobre citosol de epidídimos cuyos conductos
eferentes habían sido ligados por 7 días. Los animales fueron castra-
dos 48 hs antes del experimento. La unión específica de hormona es
saturable a una concentración aproximada de ligando de 7 a 10 nM (Fig.
6) presentando un único sitio de unión de alta afinidad con una cons-
tante de disociación de $2,8 \times 10^{-9}$ M (ver Fig. 8).

A fin de corroborar la existencia de un real intercambio entre
la hormona endógena unida al receptor y el ligando radioactivo ofreci-
do se realizó un experimento de doble desplazamiento. Epidídimos de
ratas sometidas a las mismas condiciones anteriores fueron homogeneini-
zados en buffer tris R conteniendo 20 nM 5α DHT. El citosol fue tra-

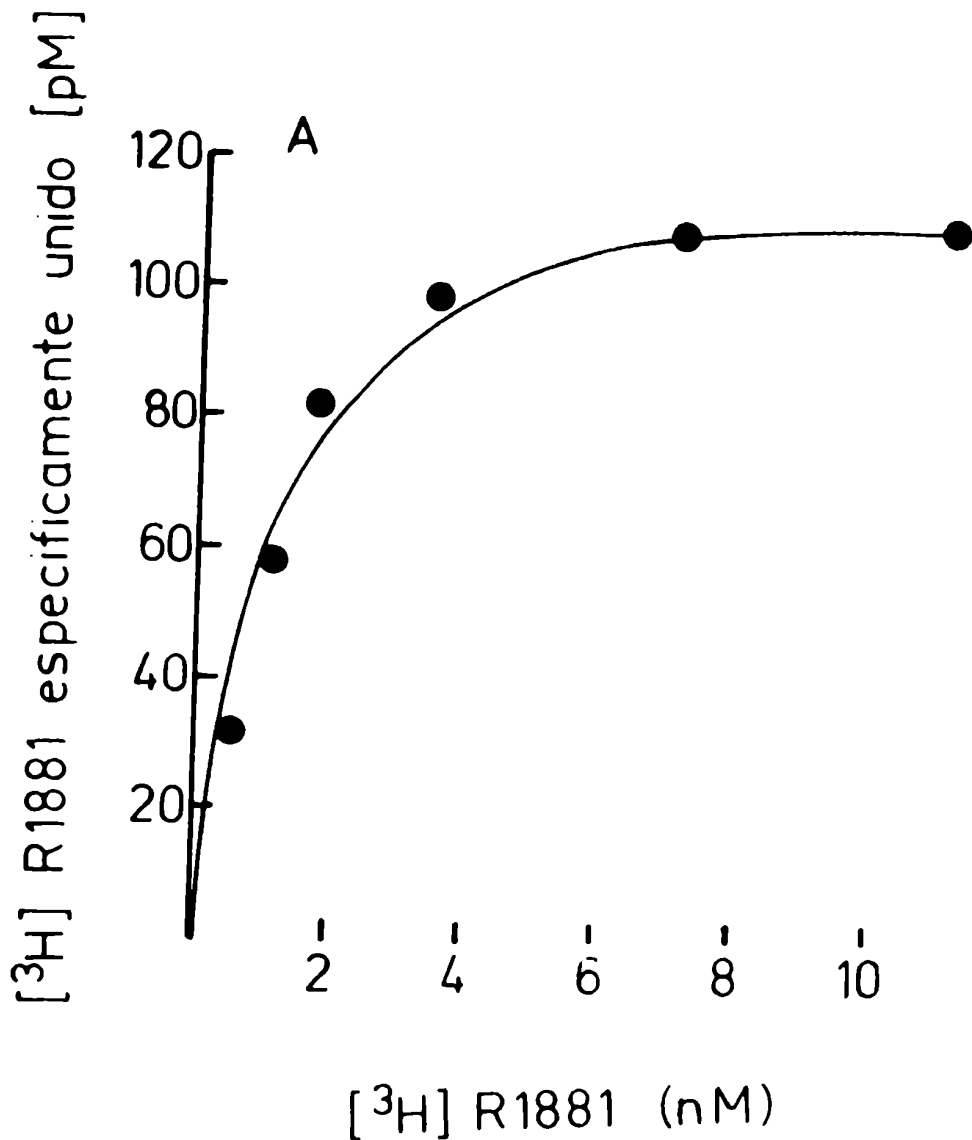


Figura 6 Saturación de los sitios receptores para andrógenos en el citosol epididimario de la rata. La fracción citosólica de epidídimos de ratas normales fue obtenida y pretratada como se detalla para la figura 5 e incubada con concentraciones crecientes de (³H) R 1881 en las mismas condiciones . La unión no específica fue estimada en incubaciones paralelas conteniendo esteroide no radioactivo en concentraciones 500 veces superiores . Los resultados expresan la radioactividad específica por ensayo como resultado de la sustracción del no específico de la unión total.

tado con carbón como se describe en materiales y métodos a fin de quitar la hormona endógena libre no unida al receptor, y la asociación de R1881 radioactivo fue medida a lo largo del tiempo como se muestra en la Fig. 7. La concentración de ^3H R1881 usada (10 nM) es aproximadamente 100 veces superior a la máxima concentración encontrada de hormona unida específicamente al receptor (50 - 100 pM) (Fig. 6). Esta unión crece con el tiempo y alcanza un plateau a las 12 hs permaneciendo constante a tiempos mayores.

A una serie de tubos incubados en paralelo se les agregó a las 7 hs 5 α DHT no radioactiva hasta alcanzar una concentración 100 veces superior (1 μM) a la del ligando radioactivo y se prosiguió el ensayo por 10 hs. Como se observa en la Fig. 7 la interrupción de la incorporación de nueva marca se acompaña de un desplazamiento de la anteriormente unida hecho que confirma la existencia de un proceso de intercambio.

II.4.4 Efecto de la castración sobre la concentración y compartimentalización de los receptores androgénicos en sus formas citosólica y nuclear.

Grupos de 4 a 6 ratas castradas por espacio de 1 a 20 días luego de haberseles ligado los ductos eferentes por espacio de 20 a 1 día respectivamente y grupos controles (sólo ligados) fueron usadas para la cuantificación de sitios receptores mediante la técnica de intercambio descripta.

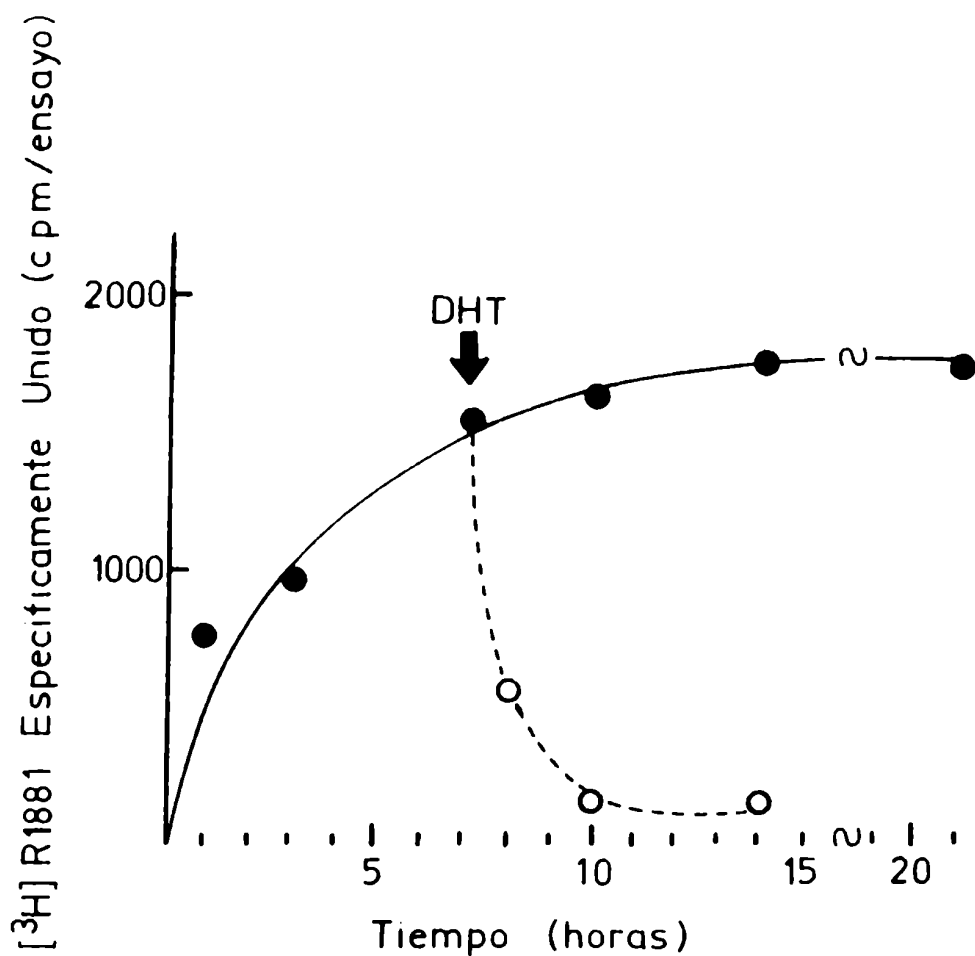


Figura 7 Reversibilidad de la unión del ligando en receptor citoplasmático para andrógenos del epidídimo de la rata. Los epidídimos de ratas castradas por 48 hs fueron homogeneizados en buffer conteniendo 50 nM 5 α DHT y el citosol se obtuvo y pretrató como se indica para la figura 5. La unión específica se determinó a la largo del tiempo de incubación como se detalla en la figura 6

- (—) (³H) R1881 específicamente unido.
- (-----) (³H) R1881 específicamente unido luego del agregado de 5 α DHT no radioactiva(1 μ M).

Mediante la linealización de los datos obtenidos de las curvas de saturación se obtuvieron los valores mostrados en las Figs. 8 y 9 y tabla II para el número de sitios de unión y constantes de disociación.

Considerando 7,4 pg de DNA por núcleo (SHAIN y col. - 1975), en el epidídimo intacto ligado se miden aproximadamente 10.000 receptores por célula, el 66 % de ellos en la fracción nuclear.

La remoción de andrógenos del órgano por castración produce una caída estadísticamente significativa de un 65 % de los sitios nucleares paralelo a un aumento también significativo del 55 % de los receptores citoplasmáticos hasta alcanzar un valor de 5500 de 3700 sitios iniciales en este compartimento celular. Los receptores nucleares llegan a un mínimo de 1000 sitios por núcleo luego de 48 hs de castración y se mantienen por todo el período estudiado.

El nivel en los receptores citoplasmáticos obtenido luego del aumento inicial se mantiene hasta dos días de castración luego de lo cual experimentan una fuerte disminución alcanzando valores mínimos de alrededor de 1000 sitios por célula o 250 fmoles/mg DNA luego del 6° día, perdurables en los días subsiguientes. Estos cambios en la concentración de sitios citoplasmáticos van acompañados de una variación en los parámetros de unión. Una disminución significativa de la constante de disociación (Kd) de la unión revela un aumento en la afinidad.

Los valores de Kd para receptor citosólico de ratas ligadas o castradas por 1 o 2 días es de $2,8 \pm 0,7 \times 10^{-9}$ M contra $0,68 \pm 0,26 \times 10^{-9}$ M ($P < 0,001$ test de STUDENT) en ratas castradas por más de 4 días.

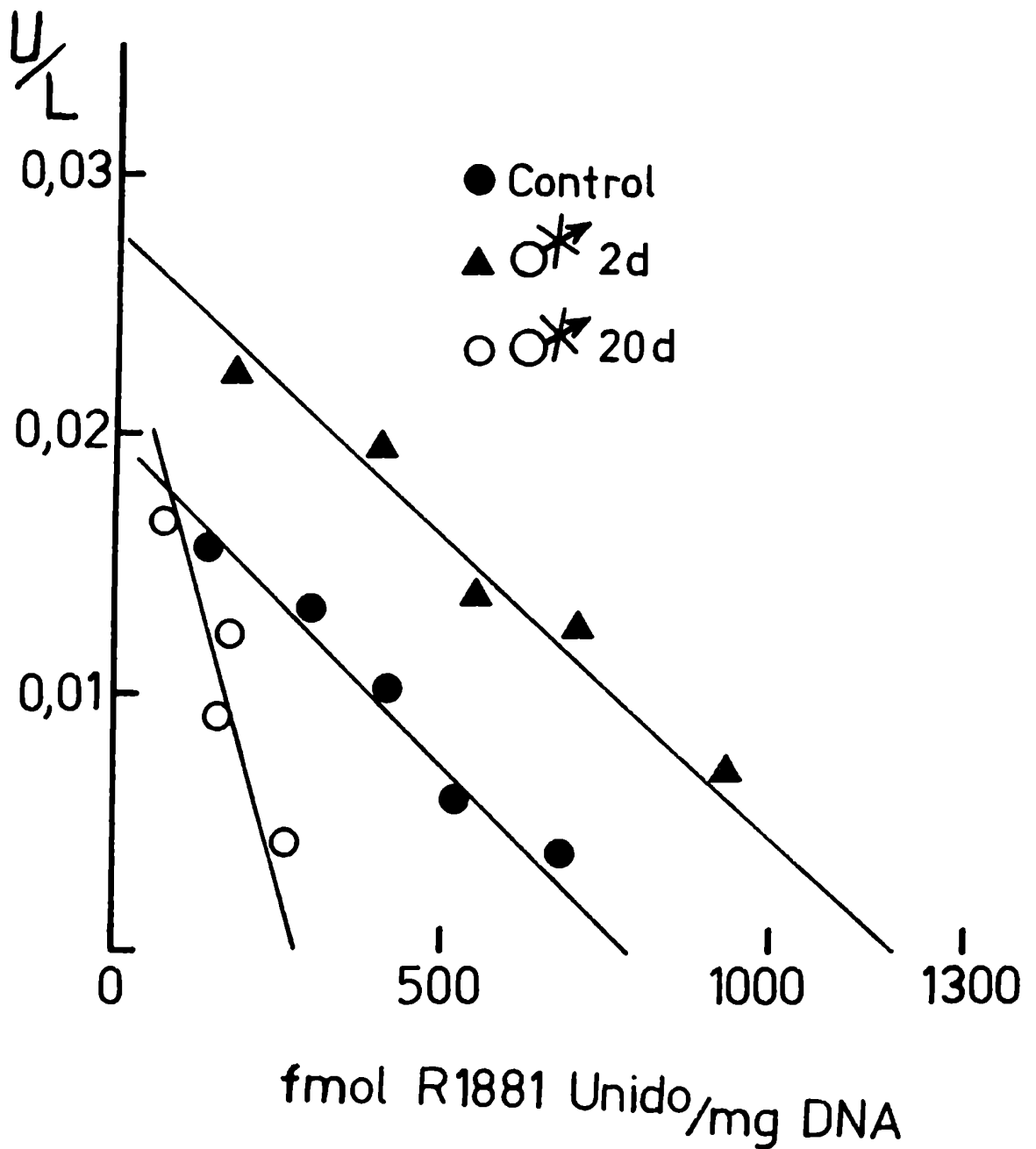


Figura 8 Variación de los parámetros de unión del receptor citoplasmático para andrógenos con la castración. El citosol de epidídimos de ratas controles con ligadura en los ductos eferentes ●, y ligadas y castradas por dos días ▲ y por veinte días ○ fueron obtenidos y procesados según se detalla para la figuras 6 y 7. Las curvas de saturación de la unión específica de (³H) R 1881 fueron linealizadas según la fórmula de Scatchard.

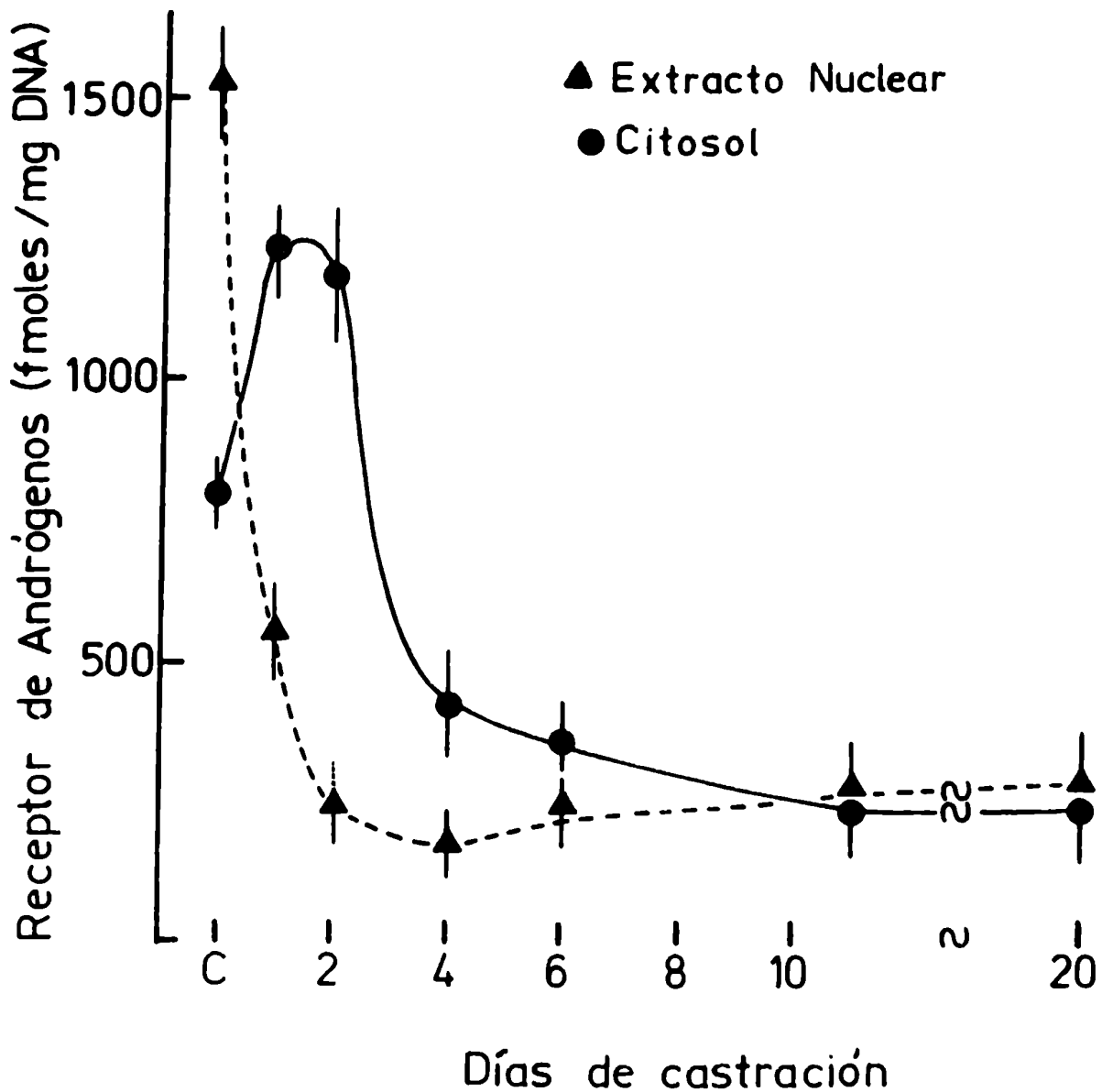


Figura 9 Influencia de la castración sobre la concentración de sitios receptores totales para andrógenos en el citoplasma (●) y extracto nuclear (▲) de epidídimo de rata. Los sitios totales se obtienen por extrapolación de las gráficas de saturación linealizadas según se detalla para la figura 8

TABLA II VARIACION CON LA CASTRACION DEL CONTENIDO EPIDIDIMARIO DE RECEPTORES PARA ANDROGENOS en
Ratas ligadas y/o castradas por espacio de hasta veinte días

LOTE	RECEPTOR CITOPLASMATICO fmoles/mg DNA	RECEPTOR NUCLEAR fmoles/mg DNA	PESO DE ORGANO mg
Ligados	800 (34) #	1537 (74)	319 (26)
Dias de castración			
1	1238 (68) NS	531 (16) *	305 (28) *
2	1185 (134)	260 (9) *	295 (27) *
4	429 (62) #	164 (11) *	250 (25) *
6	368 (48) #	250 (21) *	225 (20) *
11	250 (35) #	290 (10) *	190 (25) *
20	229 (20) #	276 (17) *	140 (30) *

significativamente diferente de lote "2" $P < 0,05$

* significativamente diferente de lote "Ligados" $P < 0,05$

NS diferencia no significativa

II.4.5 Translocación nuclear del complejo receptor-hormona citoplasmático.

A fin de garantizar una efectiva translocación nuclear del complejo citosólico y así controlar la variabilidad que supone la distinta compartimentalización subcelular se estudió el efecto de distintas dosis de hormona sobre este parámetro.

Los animales ligados por 7 días y posteriormente castrados por 48 hs para permitir el reciclado del receptor nuclear fueron inyectados con 5 α DHT en dosis crecientes con un lote control que recibió sólo vehículo (etanol-fisiológica). Sacrificados 90 minutos después, el extracto nuclear y citosol fueron procesados como se describe antes para la medición de receptores androgénicos.

Los resultados en las Figs. 10, 11, 12 y 13 muestran la disminución del receptor citoplasmático con un paralelo aumento del receptor nuclear en un proceso claramente dosis dependiente. La saturación de esta translocación se produce a dosis de 15 ug de 5 α DHT por animal alcanzándose valores constantes hasta con 150 ug. Con dosis mayores, 500 y 1000 ug se observa una disminución del 20 % con respecto a los valores máximos.

Un 30 % de los sitios iniciales permanece en el citosol aún por encima de las dosis suficientes para máxima translocación. La comparación de los parámetros de unión en las distintas condiciones muestra un aumento de la afinidad de los sitios remanentes en el citosol, $0,65 \pm 0,15$ con respecto a la de los sitios originales, $1,33 \pm 0,25$ $P < 0,01$ test de STUDENT. La afinidad del receptor nuclear (K_d 2,5 nM) no experimentó cambio con el número de sitios translocados.

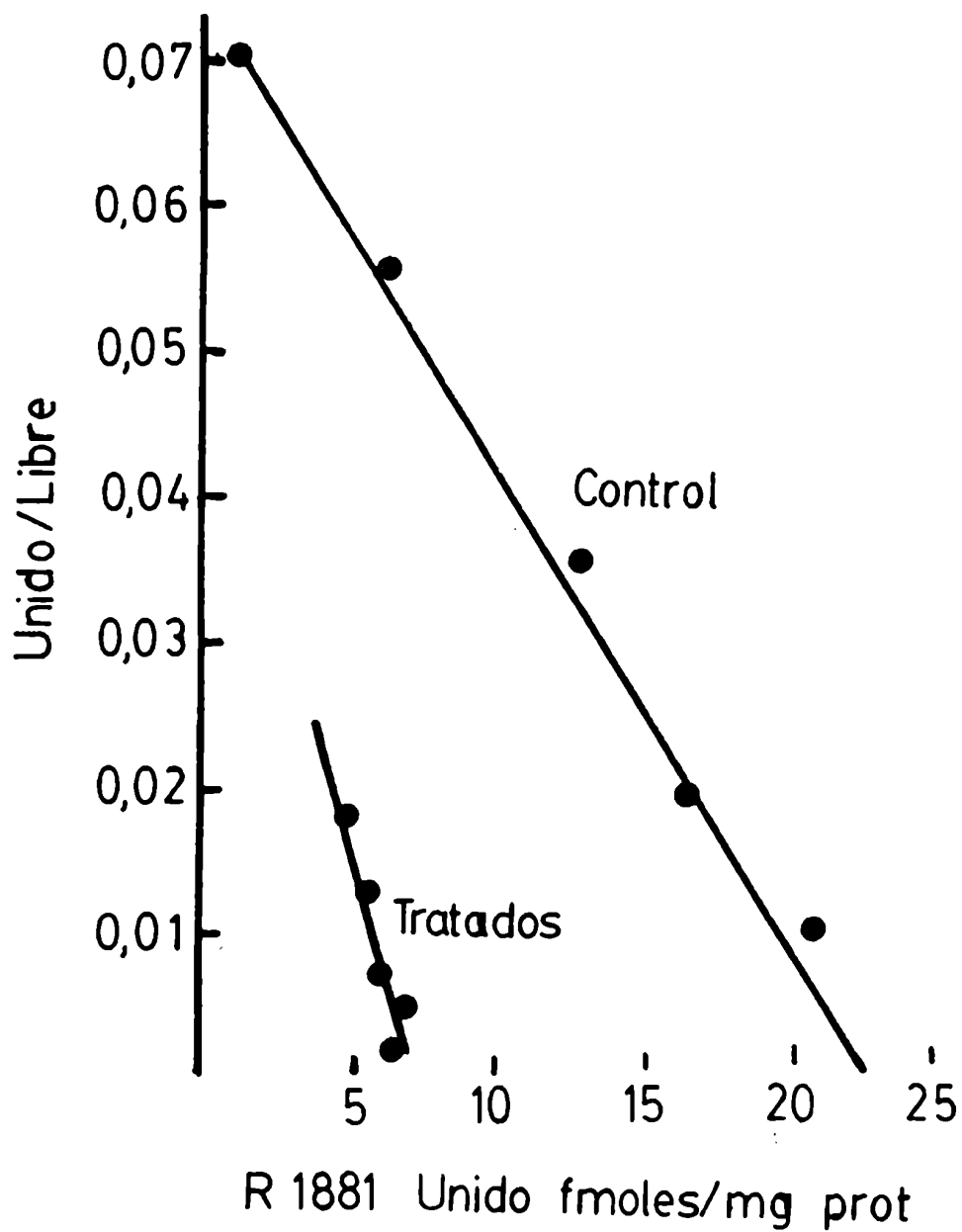


Figura 10 Efecto de la inyección previa de 5α DHT sobre los parámetros de unión del receptor citoplasmático para andrógenos. Ratas ligadas por 10 días y castradas po 2 días fueron inyectadas I.P. con 15 ug de 5α DHT y la concentración de sitios receptores citoplasmáticos fue evaluada como se indica en la figura 6,7 y8.

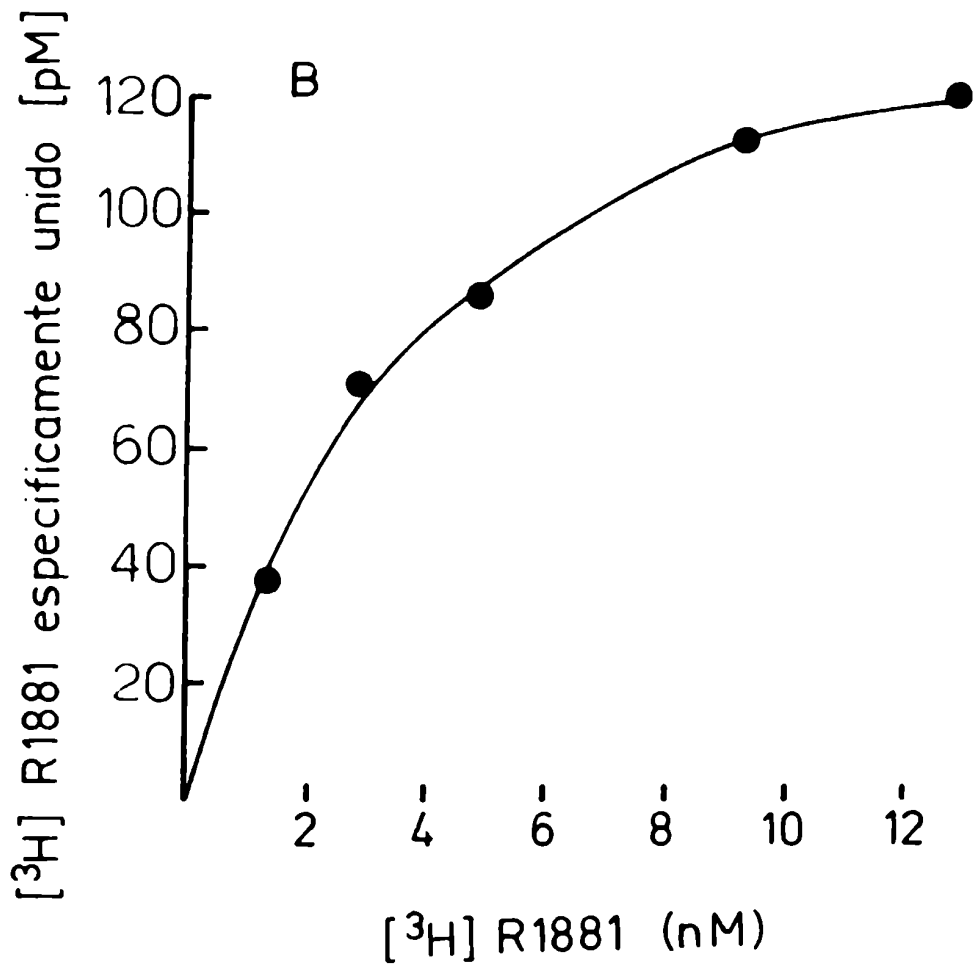


Figura 11 Saturación de sitios receptores para andrógenos en el extracto nuclear epididimario de ratas controles. La unión específica de(³H) R 1881 fue determinada como se explica para las figuras 6 y 7.

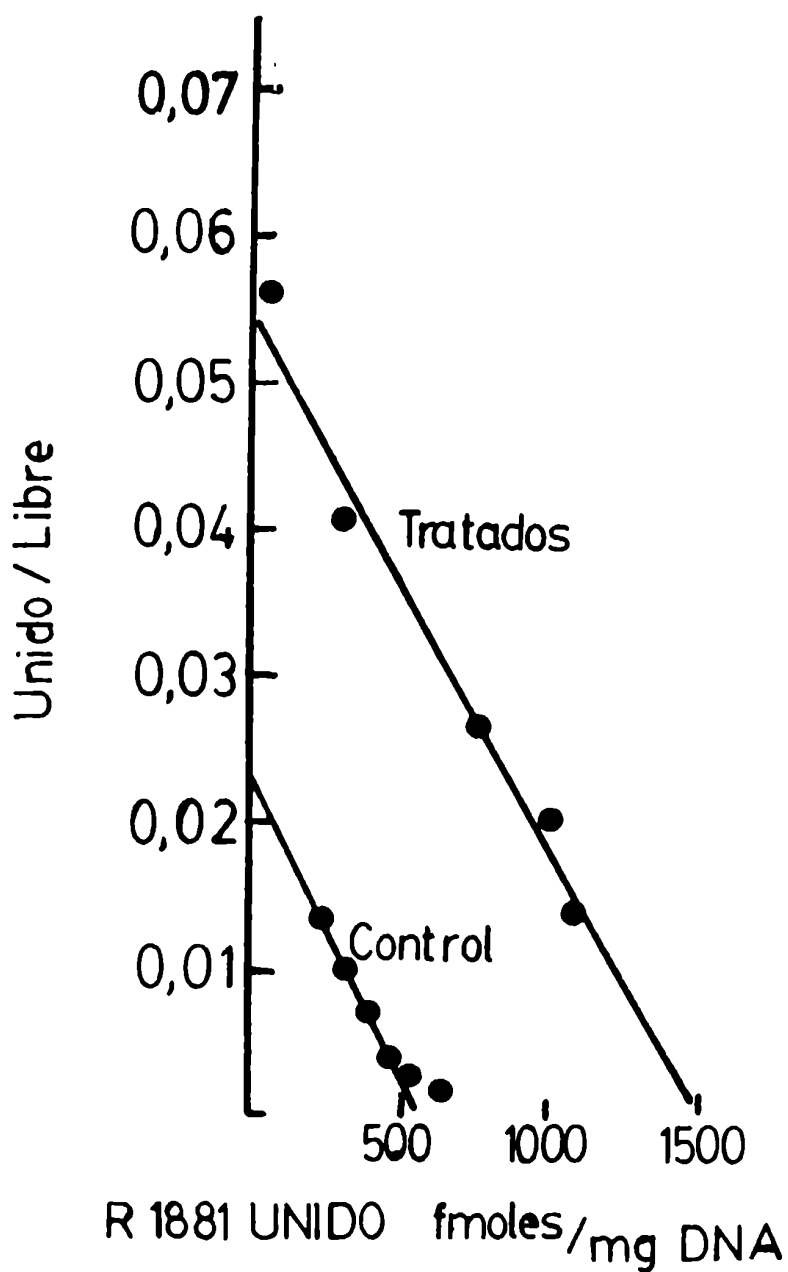


Figura 12 Efecto de la inyección de 5 α DHT (15 ug) sobre los parámetros de unión del receptor para andrógenos en el extracto nuclear epididimario de ratas castradas por 2 días cuyos ductos aferentes habían sido ligados por 10 días. La unión específica de (³H) R 1881 fue determinada como se describe para las figuras 6,7 y 8.

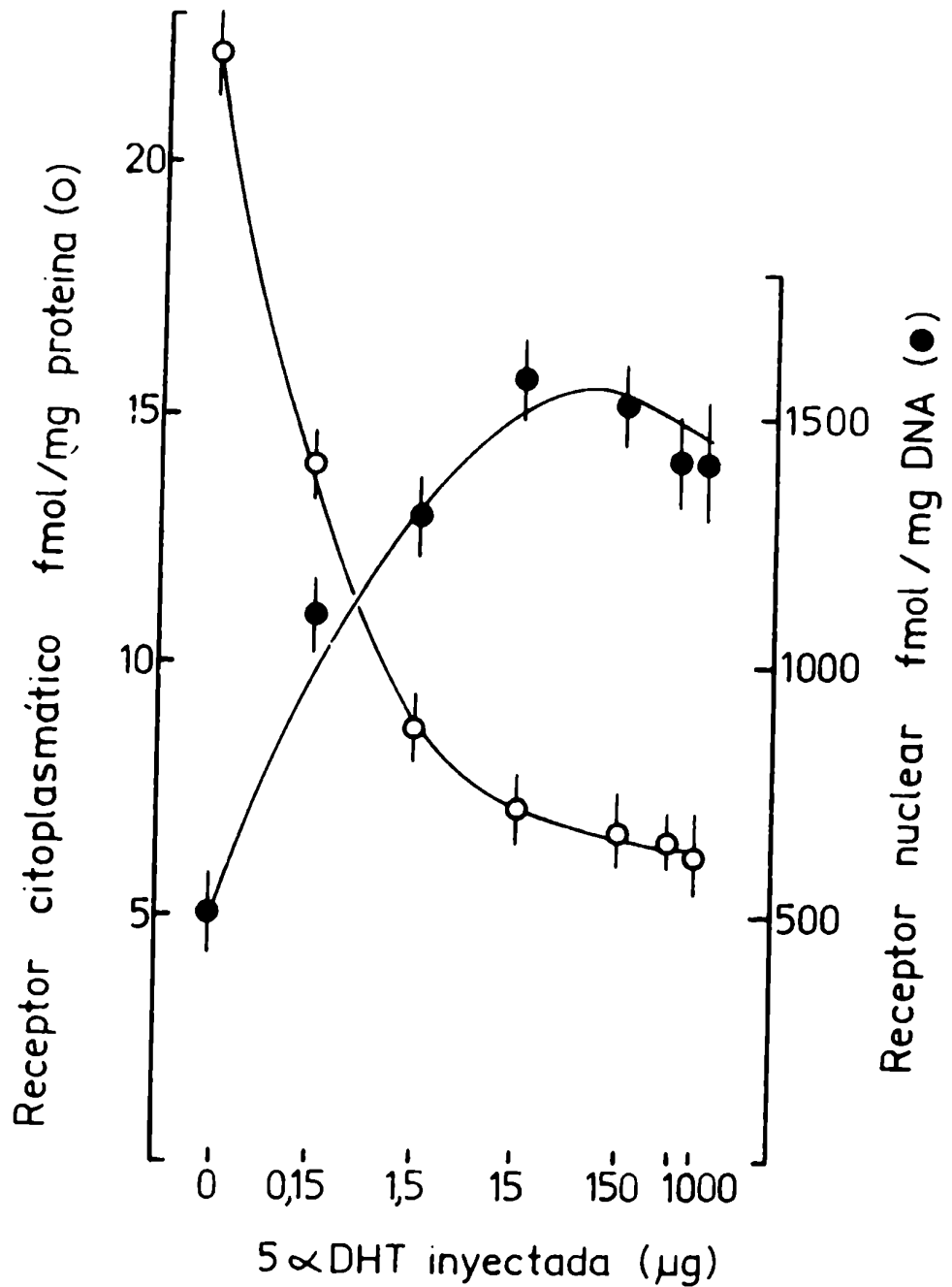


Figura 13 Efecto de la dosis de 5α DHT sobre la concentración de receptores para andrógenos en el citosol y extracto nuclear epididimario de ratas castradas por dos días. Los sitios totales fueron estimados como se describe en la figura 9.

(—○—) Receptor Citoplasmático (—●—) Receptor Nuclear

II.4.6 Andrógeno dependencia de los receptores citoplasmático y nuclear.

Con el objeto de estudiar la hormono-dependencia de la concentración de receptores, grupos de 4 a 6 ratas castradas por 20 días fueron inyectadas con 400 ug de propionato de testosterona por un período de tiempo de 1 a 12 días. Al término del tratamiento la concentración de receptores para andrógenos capaces de ser translocados al núcleo fue medida en los distintos lotes. Para tal fin todos los animales fueron inyectados con 150 ug de 5 α DHT 90 minutos antes de ser sacrificados.

Los resultados expuestos en las Figs. 14, 15 y tabla III muestran un aumento de los sitios receptores nucleares acorde con el progreso del tratamiento con propionato de testosterona. A partir del segundo día de tratamiento la diferencia se hace significativa con respecto a los controles (3000 contra 1700 receptores / núcleo). Luego de un máximo de aproximadamente 6000 receptores por núcleo al cuarto día de andrógenos los niveles descienden hasta valores constantes de 5000 sitios por núcleo.

El nivel de receptores nucleares en los controles castrados inyectados 90 minutos antes es 15 % mayor que los controles sin inyectar (ver Fig. 9). El efecto inverso encontrado en los receptores citoplasmáticos indica un cambio en la compartimentalización sin afectar significativamente el número de sitios totales. Los receptores citoplasmáticos aumentan más gradualmente con el tratamiento que lo que lo hacen los nucleares alcanzando un plateau luego de los 8 días de tratamiento con 2000 sitios citoplasmáticos. Por efecto de la trans-

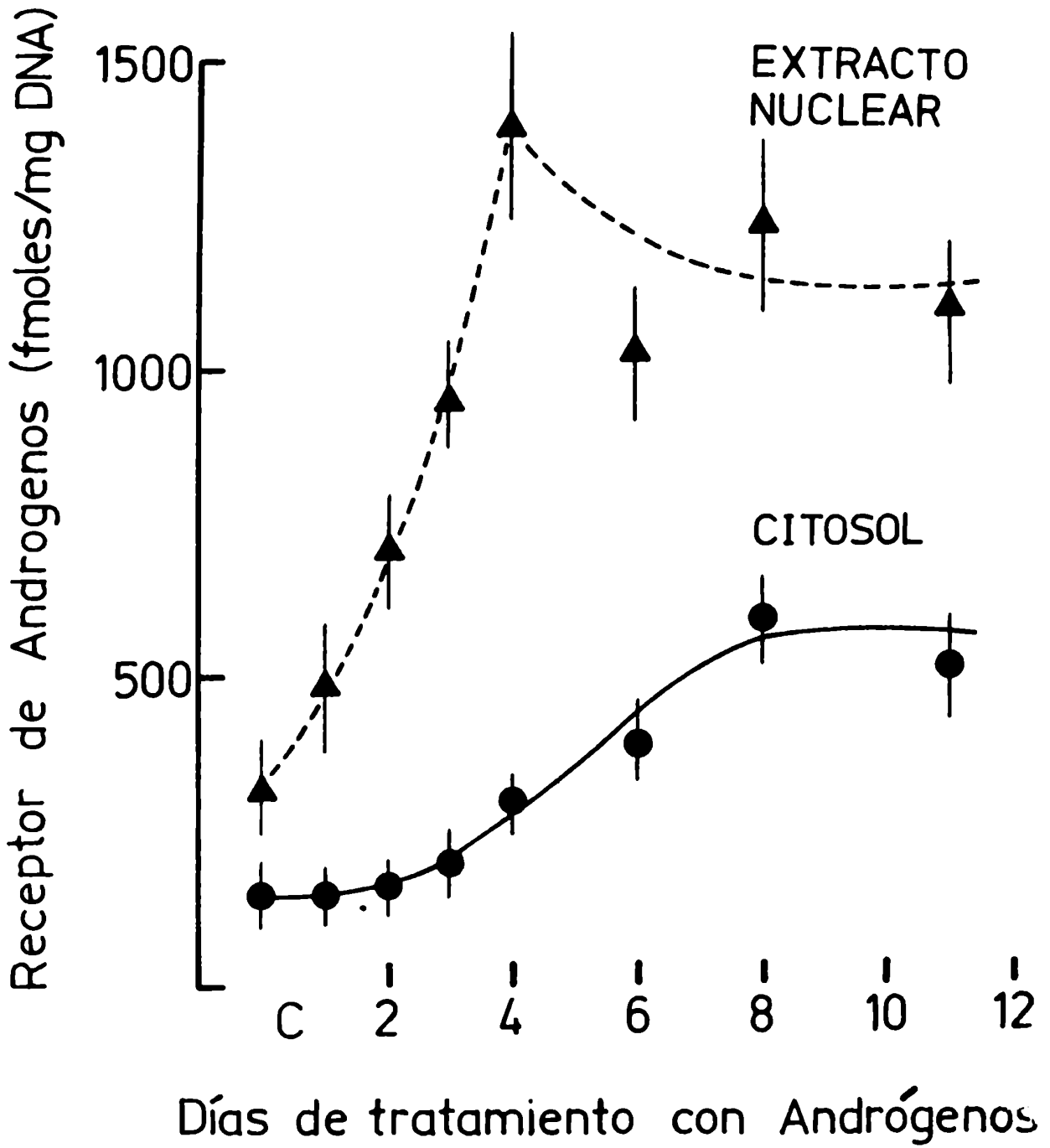


Figura 14 Efecto del tratamiento androgénico (400 ug de Propionato de Testosterona/día) sobre la concentración de receptor para andrógenos en el citosol y extracto nuclear epididimarios de ratas previamente castradas por 25 días.

TABLA III VARIACION DE PARAMETROS TROFICOS EPIDIDIMARIOS DURANTE LA TERAPIA CON ANDROGENOS en

Ratas Wistar ligadas y/o castradas por 25 días y tratadas con dos dosis diarias de Propionato de Testosterona (2x200 ug) por los días indicados e inyectadas con 5α-DHT (150 ug) 2 hs antes del experimento.

LOTE	PESO DE ORGANO mg (n=3)	RECEPTOR CITOSOLICO		RECEPTOR NUCLEAR $\frac{\text{fmoles}}{\text{mg DNA}}$	INCORPORACION DE TIMIDINA $\frac{\text{cpm}}{100 \text{ ug DNA}} (n=3)$	CONTENIDO DE DNA $\frac{\text{ug}}{\text{organo}} (n=3)$	CONTENIDO DE PROTEINA $\frac{\text{mg}}{\text{organo}} (n=3)$
		$\frac{\text{fmoles}}{\text{mg prot}}$	$\frac{\text{fmoles}}{\text{mg DNA}}$				
Ligados	319 (30) *	12 (2) *	778 (72)	1542 (142) *	-	350 (25) *	-
Castrados + T Prop. (días)							
0	135 (22)	5,7(0,7)	150(8)	470(47)	3715(855) NS	206(15)	7,5(1,5)
1	140 (26) NS	7,2(0,7) NS	136(12) NS	495(98) NS	3350(750) NS	195(20) NS	8,5(1,3) NS
2	125 (15) NS	11,8(0,9) *	159,2(9,6)NS	712(46) *	3835(1350)NS	210(15) NS	11,2(1,7) *
3	140 (25) NS	9,0(0,8) *	210,0(15) *	951(70) *	5250(1500)NS	220(16) NS	
4	160 (20) NS	10,0(3,7) NS	298,8(21) *	1435(154)*	11400(6300)*	250(30) NS	15,1(1,8) *
6	193 (25) *	12,7(1,2) *	393,5(21) *	1026(68) *	13670(820) *	296(15) *	18,3(0,9) *
8	200 (15) *	12,8(1,0) *	586,6(59) *	1350(120)*	6500(700) NS	315(25) *	20,2(0,8) *
11	245 (20) *	14,5(1,7) *	512,4(59) *	1098(98) *	2670(620) NS	320(23) *	18,5(2,5) *

(SD)= desviación estandar
 NS diferencia no significativa
 * significativamente diferente del lote "0" P < 0,05 (Test de Tukey)

locación conforman el 12 % de los receptores total en los primeros días de tratamiento hasta llegar luego del octavo día al 35 %, relación encontrada para el animal normal.

II.4.7 Parámetros tróficos relacionados con la terapia androgénica.

La actividad proliferativa del órgano fue medida a lo largo de del tratamiento con andrógenos. La incorporación de timidina al DNA muestra, como se ve en la Fig. 15, una marcada dependencia androgénica. Luego de un período " lag " de 48 hs, la división celular aumenta significativamente recién al cuarto día de tratamiento, alcanza un valor máximo entre el quinto a sexto día para volver a los valores controles a partir del día octavo. El contenido de DNA por órgano como resultado de la onda proliferativa aumenta significativamente luego del día cuarto (tabla III y Fig. 15).

El peso de órgano alcanza un incremento significativamente diferente al sexto día de suministro de andrógenos mientras que el contenido total de proteínas aumenta a partir de las primeras 48 hs.

II.4.8 Variaciones en la población celular. Efecto de los andrógenos.

Los receptores androgénicos se encuentran concentrados en el epitelio secretor (TINDALL y col) y la proporción entre el tipo celular y el tejido conectivo y muscular circundante parecen estar influenciada por el estado hormonal del órgano. Con el objeto de estudiar ta-

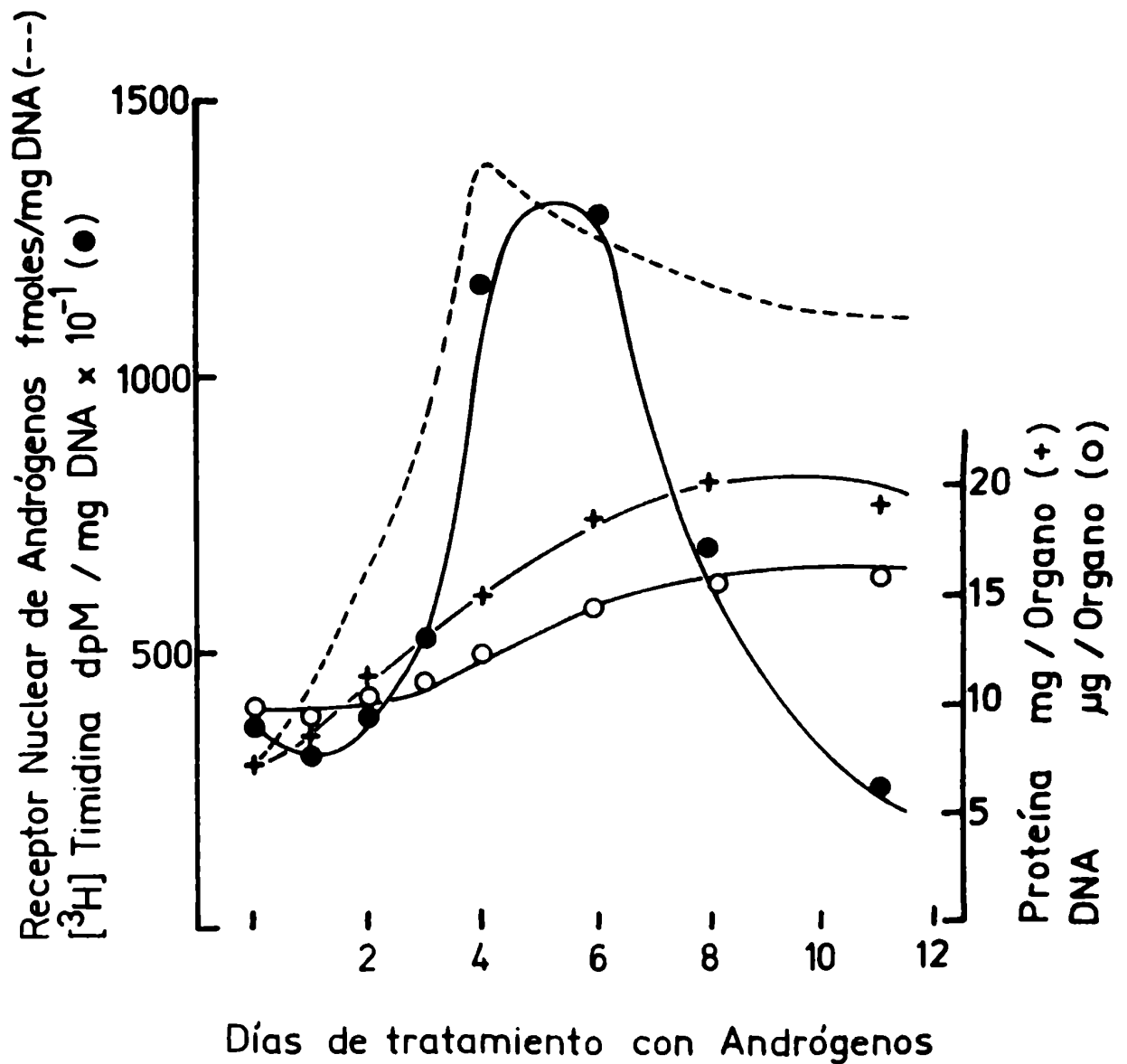


Figura 15 Variaci3n de los par6metros tr6ficos epididimarios con la terapia androg6nica (400 ug de Propionato de testosterona/ /día) en animales castrados por 25 días.

- Receptor Nuclear para andr6genos.
- (●) Incorporaci3n de (³H) Timidina al DNA.
- (+) Contenido de proteína total por 6rgano.
- (o) Contenido de DNA por 6rgano.

les variaciones a lo largo del tratamiento, se estudió la distribución proporcional de los principales tipos celulares como se describe en materiales y métodos. Los resultados expuestos en la tabla IV muestran que en un proceso aparentemente influenciado por andrógenos el porcentaje de células epiteliales se incrementa significativamente luego de 8 días de tratamiento.

II.4.9 Evaluación de la actividad proteolítica.

Con el objeto de descartar la proteólisis generalizada como factor determinante de la concentración de receptores, la actividad proteolítica total fue medida según se indica en materiales y métodos en los distintos lotes experimentales.

Como se detalla en la tabla V la actividad en el citosol aumenta con la castración prolongada y es aún mayor durante los cuatro primeros días de regeneración por andrógenos retornando a los valores controles al fin del tratamiento donde no se detecta actividad alguna.

La influencia de esta actividad proteolítica sobre el receptor o la existencia de proteasas específicas para el mismo, que pudieran destruir la actividad de unir andrógenos fue evaluada mediante experimentos de recombinación. La concentración de receptor fue medida en una mezcla de fracciones de citosol de animales castrados por 48 hs y por 20 días que presentaban la máxima diferencia de valores individuales (ver tabla II).

La concentración de sitios hallada (Fig. 16) fue significativamente menor en un 20 % a la esperada de sumar las actividades independientes, con una constante de disociación similar a la encontrada en el lote de animales castrados por 48 hs.

TABLA IV EFECTO DE LOS ANDRÓGENOS SOBRE LAS DISTINTAS POBLACIONES
CELULARES DEL EPIDIDIMO DE LA RATA.

DÍAS DE TRATAMIENTO CON ANDRÓGENOS	Porcentaje de células epiteliales
0	53,2
1	53,6 NS
4	55,6 NS
6	54,0 NS
8	58,8 *
11	61,0 *

* $P < 0,05$ con respecto al lote "0"

NS diferencia no significativa

Los epididimos de ratas controles castradas por 25 días y tratadas con 400 ug de testosterona por los días indicados fueron usados para el estudio de la población de células constituyentes. La relación entre las células epiteliales respecto de musculares y fibroblastos fue analizada mediante el análisis de varianza de dos vías y la diferencia estadística entre grupos estudiada mediante el test de Tukey.

TABLA V ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN EPIDIDIMOS DE DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES.

GRUPO	TRATAMIENTO ANDROGENICO compuesto y días	ACTIVIDAD PROTEOLITICA ug/mg*
Castrado 2 días		0
Castrado 30 días		1,2
Castrado 30 días	Prop. Testosterona 2 días	2,9
Castrado 30 días	4 días	1,6
Castrado 30 días	8 días	0,5
Castrado 30 días	12 días	0
castrado 30 días	5 α Dihidrotestos- terona 12 días	0

* los resultados estan expresados como ug de tirosina hidrolizada de la hemoglobina por mg de proteina durante 30 min a 25 $^{\circ}$ C

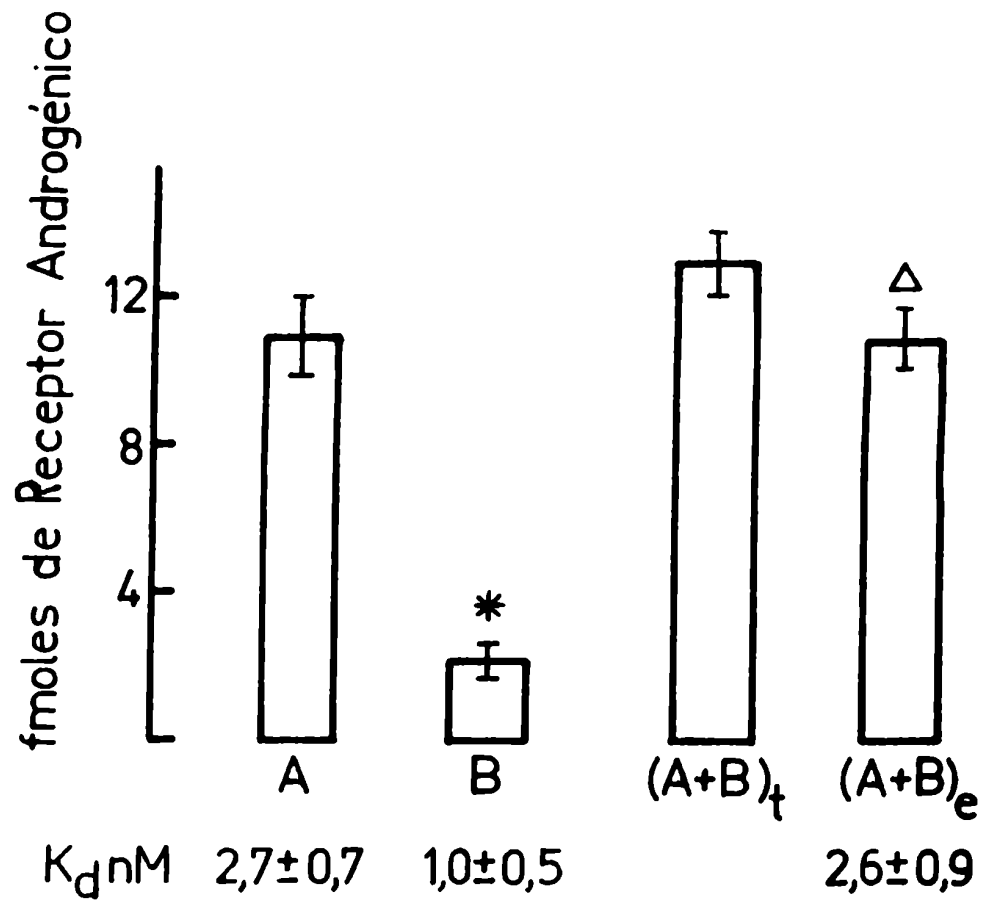


Figura 16 Estimación del grado de proteólisis específica para la actividad de receptores androgénicos en el citosol de epidídimo de rata.

- A Número de sitios en animales castrados por dos días.
- B Número de sitios en animales castrados por veinte días.
- $(A+B)_t$ Número de sitios resultante de la suma teórica.
- $(A+B)_e$ Número de sitios encontrado como resultado de la valoración conjunta de A y B.
- * $P < 0,01$ con respecto a A.
- Δ $P < 0,05$ con respecto a $(A+B)_t$.

II.5 Discusión.

La regulación de la concentración de sitios receptores para andrógenos es difícil de establecer cuando el agente regulador usado exógenamente y el indicador que interviene en el método de cuantificación compiten por el mismo sitio de unión presente en la proteína. Este hecho, unido al efecto que la hormona tiene sobre la distribución intracelular del receptor, obliga a una serie de modificaciones experimentales. La suspensión de la terapia androgénica en animales castrados o la castración de animales normales es necesaria para la determinación semicuantitativa de los receptores mediante la técnica de marcación "in vivo", al mismo tiempo las masas de hormona radioactiva de alta actividad específica disponible distan en mucho de las necesarias para obtener una respuesta funcional del órgano.

El consiguiente cuestionamiento al carácter fisiológico de algunos experimentos sólo puede ser salvado mediante el desarrollo de una técnica que permitiera la cuantificación de sitios receptores en las condiciones más representativas del estado hormonal del animal a lo largo del experimento.

La técnica de intercambio desarrollada independiza la medición de los receptores citoplasmático y nuclear de las condiciones de deprivación y/o estimulación hormonal.

El método de intercambio es específico para el receptor de andrógenos. Como se desprende de los estudios de competición sólo los andrógenos activos y los antiandrógenos más potentes compiten con el R1881 por el sitio de unión al receptor.

Aunque se ha descrito cierta actividad progestacional para este andrógeno sintético, no existen en el epidídimo de la rata receptores de progesterona que pudieran interferir en el ensayo (PUJOL). Esto ha sido confirmado por el hecho que ligandos específicos para este receptor, como la acetónida de triemcienolona y la progesterona misma no desplazan la unión de R1881. La reversibilidad de la unión destaca la capacidad de intercambio de ligando en la molécula de receptor.

La concentración de hormona endógena, unida al mismo, luego del pretratamiento del citosol con carbón o de los lavados de la fracción nuclear en animales controles, no debe ser mayor que la correspondiente a la capacidad de unión encontrada (50 - 100 pM) en epidídimo de animales castrados por 48 hs donde la deprivación hormonal hace accesible la totalidad de los sitios. Los sitios ocupados por la hormona presente en el medio de homogeneización (ver texto fig. 7) intercambian su ligando ante concentraciones 30 a 500 veces superior a la anteriormente citada, de ^3H R1881 (10 nM). Cuando esta misma relación de masas entre el ^3H R1881 (10 nM) y la que resulta de agregar 5 α DHT (1 μM) se obtiene luego de permitir la asociación del primero al receptor, un desplazamiento casi total de la radioactividad específica unida se alcanza en el lapso de unas pocas horas.

Estos hechos permiten afirmar que cerca de la totalidad de los sitios intercambian la hormona endógena por el ^3H R1881 agregado en los ensayos de rutina luego desarrollados.

Los datos obtenidos sobre la caracterización del ensayo, nos permiten afirmar que el mismo cumple con los requerimientos de un test de intercambio (BONNE y RAYNAUD - 1976) y que son:

- 1) Estabilidad del complejo R-ligando durante el experimento.
- 2) Rápida disociación del complejo receptor-hormona y receptor-radio-ligando.
- 3) Rápida asociación del radioligando al receptor.
- 4) Ausencia de transformaciones metabólicas del radioligando.

Mediante la utilización de este método se pudo estudiar el efecto de la administración de hormona sobre la compartimentalización celular del receptor. Los resultados muestran que la caída en la concentración del receptor citoplasmático se acompaña con un aumento paralelo del receptor nuclear, resaltando sino la absoluta identidad, al menos una estrecha interrelación entre las dos entidades. Esta translocación mediada por la hormona es un fenómeno claramente dosis dependiente y aproximadamente con la inyección de 15 ug de 5 α DHT la captación nuclear del complejo receptor-hormona se satura.

La depleción del receptor citoplasmático sigue el mismo perfil que el aumento del receptor nuclear, pero a diferencia de este último, los receptores citoplasmáticos muestran un cambio en la afinidad por la hormona.

El 30 % de los sitios que no son translocados y permanecen en el citoplasma poseen una afinidad que duplica a la de aquellos translocados (Fig. 10). La saturación de sitios nucleares ha sido atribuida en varios órganos sensibles a hormonas esteroideas, exclusivamente a la presencia de un limitado número de aceptores nucleares (MAINWARING - 1976), (SPELSBERG 1971), (CHARREAU Y BALDI - 1976). Sin embargo estos estudios

fueron realizados " in vitro " con concentraciones saturantes de complejo receptor-hormona y bien podría corresponder a la concentración limitante de receptores " activados " en el citosol el rol regulador del proceso. La presencia de un número sobrante de receptores no translocados si bien respalda la teoría de saturación de aceptores nucleares no descarta la segunda hipótesis. La heterogeneidad de sitios podría indicar la presencia de una población de receptores resis tentes a la activación y translocación.

Estudios similares a los mostrados en este trabajo en útero de rata y oviducto de pollo (CLARK -1976), (SUTHERLAND) muestran que la utilización de los receptores citoplasmáticos es casi total en el pro ceso de saturación de los sitios aceptores revelando que la responsabilidad en la "saturación" sería compartida por la limitación de am bas poblaciones: receptores citoplasmáticos y aceptores nucleares.

Por años se atribuyó a las altas concentraciones intratubulares de andrógenos en el epidídimo un rol definido en la fisiología del órgano y en el proceso de maduración de espermatozoides que en él tiene lugar. Sin embargo la concentración plasmática de andrógenos en conejos hemicastrados (O. CRIST - 1975) e incluso bajas dosis de meta bolitos 5α reducidos de la testosterona en hamsters y ratas castradas son capaces de mantener los espermatozoides vivos (LUBICZ MAWROCKY - 1973) y de inducir la síntesis de proteínas específicas (KOHANE - 1981). Estas dosis suficientes para el mantenimiento de los pará metros funcionales y para su estimulación en el órgano en " reposo " es tán dentro del rango aquí descrito para la obtención de máxima trans locación del receptor androgénico.

Según los trabajos de AAFJES las dosis de andrógeno que es necesario inyectar para alcanzar, en el animal castrado, las concentra-

ciones intratubulares fisiológicas exceden en mucho las dosis para máxima translocación antes mencionada. Los trabajos de W.E. STUMPF y col. y COOPER demuestran que la hormona radioactiva inyectada sistémicamente a animales normales es concentrada contragradiante en la luz tubular del epidídimo, en un proceso claramente dependiente de la presencia de ABP u otras proteínas " ligadoras ".

Según estos resultados la gran concentración de andrógenos tubulares no afectaría el estado hormonal del epitelio epididimario que alcanzaría los niveles máximos de andrógeno intracelular con el proveniente del plasma sanguíneo. De existir una utilización total de los andrógenos tubulares por el epitelio, sólo una pequeña fracción de los mismos serían suficientes para una respuesta máxima inmediata, saturando y translocando los sitios citoplasmáticos. El número de sitios receptores cobra en este caso particular importancia como regulador de la respuesta máxima a una concentración intracelular eventualmente en exceso de hormona.

El estudio, mediante la técnica descrita, del efecto de los andrógenos sobre la concentración de receptores permite establecer una interdependencia entre ambos factores. En el epidídimo ligado, un 66 % de los receptores totales están translocados en un número aproximado de 6.500 moléculas por núcleo. La disminución del contenido nuclear de receptor con la castración, acompañada de un aumento en el receptor citoplasmático, refleja el proceso de reciclado del mismo. Los niveles de receptor nuclear siguen disminuyendo en un 20 % adicional al segundo día de castración hasta alcanzar valores de aproximadamente 1.000 sitios por núcleos que se mantendrán por espacio de 20 días.

El aumento del receptor citoplasmático es menor que el esperable por el reciclado completo del receptor nuclear. La disminución de los receptores totales es detectable desde el primer día de castración. Entre el cuarto y sexto día se alcanzan los niveles mínimos, tanto para los valores totales (25 % del valor control) como para los citoplasmáticos (16 % del control). Si bien no es claro si este proceso de caída en los niveles de receptor se debe a una desestabilización de la molécula no ocupada por andrógenos o a su degradación programada, es evidente su dependencia hormonal. La actividad proteolítica no parece ser un factor determinante de este fenómeno aunque se observa una contribución parcial.

El propionato de testosterona fue inyectado en ratas castradas, para estudiar la regulación del receptor por andrógenos, en dosis (400 ug) que excedían aquellas suficientes para máxima translocación nuclear, teniendo en cuenta la influencia de la dosis en el tiempo de retención nuclear del receptor (ICHII - 1980) y la importancia de esta variable para la obtención de un estímulo constante (CLARK - 1978). Por la misma razón los distintos lotes experimentales fueron inyectados con 150 ug de 5 α DHT a fin de garantizar una total translocación independiente del número de receptores presentes en el citoplasma.

La hormono-dependencia de los receptores se ve reforzada por la inducción de los mismos por los andrógenos. La terapia androgénica provoca sus efectos más notorios en la concentración de receptor nuclear. La recuperación de los niveles originales en cuatro días de andrógenos evidenciaría su activa síntesis inducida por los mismos. El receptor citoplasmático incrementa su concentración siguiendo a la reinducción máxima del receptor nuclear.

Los receptores marcados en condiciones fisiológicas (marcación " in vivo ") son los involucrados en las variaciones antes descritas. Así la normal provisión de andrógenos es necesaria para la manutención del receptor citoplasmático 8 S. La no detección del pico luego de tiempos prolongados de castración y la reinducción del mismo por andrógenos refuerza la participación de la especie 8 S en la hormono-dependencia mostrada para los sitios totales.

Recientemente CALANDRA y col. (1977) especularon con la posibilidad de formación de agregados de mayor coeficiente de sedimentación que pudieran interferir con una adecuada visualización de los picos. Este no parece ser el caso en nuestros experimentos dado que en los correspondientes a animales castrados la radioactividad sólo aparece en la parte superior del gradiente probablemente no asociada a proteínas.

Estas técnicas (BLAQUIER - 1971, CALANDRA - 1977) que permiten una caracterización físico-química de los receptores, sólo son aplicables a los sitios accesibles o sea aquellos no ocupados por hormona y por lo tanto sólo se detectan luego de 24 - 48 hs de castración. El método de intercambio revela que en los primeros días de castración los cambios en la compartimentalización se acompañan de una caída en el número de receptores totales. Estos mismos efectos son esperables luego de la suspensión de la terapia androgénica para la posterior marcación " in vivo ". Así los niveles de receptor inducidos por andrógenos pueden verse subestimados por esta técnica al no considerar esta disminución previa. Aún así, el receptor 8 S crece con el tratamiento hasta llegar a los valores controles.

La falla en la reinducción del receptor nuclear analizado mediante la marcación " in vivo " podría explicarse por una mayor utilización del receptor nuclear en el órgano en regeneración produciendo poco reciclado del mismo luego de la suspensión del andrógeno. La masa de andrógeno tritiado inyectado (150 ng) no garantizaría una eficiente translocación del mismo (ver Fig. 13).

La inyección de 5α DHT en cantidades suficientes para asegurar una efectiva translocación en todas las condiciones permite, mediante la técnica de intercambio, detectar una efectiva reinducción del receptor nuclear.

El aumento en los niveles de receptor nuclear total antecede al pico proliferativo celular y al incremento significativo de la cantidad de células por órgano. La mayor concentración de receptores en las células epiteliales del túbulo secretor ha sido demostrado por los trabajos de STUMPF y SAR y una variación en la proporción de las distintas poblaciones celulares con la castración podría ser responsable, según CALANDRA y col. (1977) de la diferencia en el número de sitios receptores encontrada en trabajos previos (CALANDRA y col. - 1975). Esta no parece ser la razón de los resultados obtenidos en el presente estudio, pues, aunque influenciada por los andrógenos, la variación en la proporción de células epiteliales a conectivas y musculares no se correlaciona, ni en tiempo ni en magnitud, con la reinducción del número de receptores por célula.

Es el contenido real de receptor por célula el que aumenta, debido a una síntesis " de novo " del mismo y no es el reflejo del aumento de células por órgano. El paralelismo entre la síntesis del receptor nuclear y del DNA refuerza la hipótesis de interdependencia de los dos procesos. La actividad de un variado número de enzimas

como la proteína desenrolladora del DNA, DNA polimerasa, timidina quinasa y la timidilato sintetasa involucradas en el proceso de síntesis del DNA aumenta en la fase S o previa a la inducción de la mitosis por andrógenos en la próstata en regeneración (MAINWARING - 1980) (b). La inducción de la síntesis "de novo" de las mismas por activación de los genes modificantes y/o modulación de su actividad por interacción directa pueden ser los mecanismos por los cuales el complejo receptor hormona activa la síntesis del DNA.

La retención de andrógenos en la matriz nuclear apoya la interdependencia entre estimulación hormonal e inducción de la mitosis, dado que esta estructura está fuertemente relacionada con los sitios de iniciación de la síntesis del DNA (MAINWARING - 1980 (b), BEREZNEY - 1975). La síntesis de receptor nuclear progresa hasta un máximo en el momento que la velocidad de síntesis de DNA comienza a disminuir pudiendo jugar el primero un rol retroalimentador en el proceso de mitosis.

Una vez obtenidos los valores máximos del receptor nuclear progresa el aumento del receptor citoplasmático. El hecho que el receptor nuclear anteceda al citoplasmático en el tiempo de reinducción no conduce al establecimiento de la primera especie como precursora de la segunda.

Este parece ser el caso del receptor estrogénico en mama de ratón (HUNT y MULDOON - 1977) y en oviducto de pollo (SUTHERLAND - 1975) Pero bien puede darse el caso que el receptor, siendo sintetizado en las membranas asociadas al retículo endoplásmico se libere en forma soluble y luego de unirse a la hormona inyectada se active y transloque al interior del núcleo.

La aparición de sitios citoplasmáticos " extra " o no translocados está asociada a un aumento en su afinidad. Este hecho merece el análisis dentro de un contexto mayor. La castración conduce junto con la reducción en el número de sitios citoplasmáticos a un aumento en la afinidad. Esto sería explicable bajo dos alternativas: por un lado la aparición, luego de la castración, de moduladores de la molécula receptora en el citosol y por otro la existencia de dos poblaciones de sitios receptores. La mantención de los valores de K_D correspondientes al lote de animales castrados por 48 hs en el experimento de recombinación de fracciones citosólicas (Fig. 16) refuerza la segunda posibilidad. Variaciones de este tipo han sido demostradas para receptores androgénicos en otro órganos. GREENSTEIN encuentra en la próstata de rata que la castración provoca un aumento del doble en la afinidad del sitio de unión, al mismo tiempo que una reducción en el número de los mismos. Por el contrario en la hipófisis del carnero THIEULANT y col. encuentran una disminución en ambos parámetros con la castración.

La heterogeneidad de sitios encontrada en las distintas condiciones experimentales (Figs. 8 y 10) permiten postular la existencia de dos poblaciones de sitios de unión. La única proteína ligadora de andrógenos extracelular o ABP presente en el epidídimo es de origen testicular y está ausente en los epidídimos ligados o castrados por más de 7 días, de este modo los sitios de unión deben representar dos poblaciones de receptores intracelulares:

- 1) Un grupo de receptores de menor afinidad es activamente translocado al núcleo en un proceso dependiente de la dosis de hormona y su concentración intracelular depende del normal aporte de andrógenos.

2) Una segunda población de sitios de relativa mayor afinidad permanece en el citoplasma luego de la administración de hormona y la regulación hormonal de su concentración depende de la obtención previa de niveles óptimos para los sitios translocables.

La aparición de este segundo tipo de sitios en el citoplasma luego de obtenerse la saturación de los aceptores nucleares podría interpretarse como la síntesis y almacenamiento de un precursor del receptor biológicamente activo. Pre-receptores de este tipo han sido postulados para los estrógenos por CIDLOWSKI y col. y juegan un rol predominante en la respuesta del animal privado de hormona por largo tiempo.

La plena reutilización de los receptores reinducidos es la característica de la etapa de regeneración más activa. El receptor nuclear es activamente retenido durante este período que alcanza al día cuarto de reinducción, en este momento se cuantificaron 6.000 sitios por núcleo representando el 83 % de los sitios totales.

Con la regeneración bajo estimulación hormonal se alcanza cierto grado de sincronización del ciclo celular (Fig. 15) (Van DOORN) y en el pico proliferativo el porcentaje de células en fase S se hace máximo. Este fenómeno coincide con la máxima captación de receptor nuclear. Experiencias "in vitro" (KLIJCEJKO - STEFANOWICZ y col.) demuestran que la remoción de buena parte de las proteínas cromosómicas en la próstata de rata resultaba en un marcado desenmascaramiento de aceptores cromatínicos para el receptor androgénico. Esta situación podría ser comparada con el relajamiento de estructuras cromosómicas detectadas durante la duplicación del DNA "in vivo" (FILIPENKO y col.). Este configuraría el único caso en que la concentración de aceptores accesibles excedería al número de receptores disponible. El

posterior reempaquetamiento y condensación de la cromatina reduciría el número de aceptores y esto justificaría la disminución del receptor nuclear luego del día quinto.

La respuesta máxima aún con la variación de los sitios aceptores se dará con la saturación de los mismos y esto dependerá de la concentración inicial de receptores translocables, parámetro éste como se ha demostrado sujeto a regulación hormonal.

III. EL EPIDIDIMO HUMANO COMO ORGANO EFECTOR DE ANDROGENOS.

III.1 Introducción.

En los mamíferos el espermatozoide que deja el testículo en el momento de espermiación si bien morfológicamente maduro, no es aún fértil. El proceso por el cual los espermatozoides adquieren la capacidad de fertilizar al ovocito y formar una cigota viable se denomina maduración y tiene lugar en el epidídimo (HORAN, BLANDAU, BEDFORD - 1966, ORGEBIN CRIST - 1967). La motilidad progresional, la capacidad de reconocer y penetrar el Cumulus Oophorus y Zona Pelúcida y la habilidad de fusionarse con el ovocito, son entre otras, tres características funcionales que los espermatozoides adquieren a medida que transcurre su pasaje por el epidídimo. Aunque la regulación global de este proceso por andrógenos está ampliamente documentada en rata (DYSON y col.), conejo (O. CRIST - 1973) y hamster (LUBICZ NAWROCKY - 1973, 1976) entre otras especies, los factores inducidos por la hormona directamente responsable de su desencadenamiento son motivo de numerosas líneas de investigación.

El epidídimo responde al estímulo androgénico con cambios en un sinnúmero de parámetros y, la responsabilidad de cada uno de ellos en la inducción de la capacidad fertilizante del espermatozoide es difícil de establecer dentro de la respuesta global del órgano.

Desde el punto de vista morfológico, el epitelio epididimario regresa en tamaño, altura y complejidad de sus estructuras con la castración (CAVAZOS, ORTIZ). La disminución en el contenido de retículo endoplásmico liso y el aumento de vacuolas lisosómicas siguen a la deprivación hormonal. La administración de andrógenos exógenos produce la recuperación de esas estructuras relacionadas con la actividad

secretoria y de absorción del epitelio, como retículo endoplásmico liso y rugoso, estereocilias del borde apical, etc.

La actividad enzimática se ve alterada del mismo modo por el estado hormonal. La fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, hidrolasas, deshidrogenasas, colinesterasa y glicosidasas (ALLEN), (CONDRIE), (RISLEY) y una enzima estrechamente ligada al mecanismo de respuesta hormonal como la 5 α reductasa (de LARMINAT - 1978) se hallan bajo control androgénico. La capacidad de absorción y secreción de material intratubular se ve fuertemente inhibida por los antiandrógenos. Evidenciando un control hormonal del proceso. La absorción de agua, sodio, cloruros y la secreción de potasio y proteínas son bloqueadas prácticamente con la inyección de acetato de cyproterona (WONG) aunque también se ha comprobado un efecto de la spiro lactona, inhibidor competitivo de la acción de la aldosterona, lo que hace suponer que una acción análoga a la desarrollada por esta hormona en el túbulo renal ocurre también en el epidídimo.

Varios son los componentes del plasma seminal cuya concentración y secreción por el epidídimo es regulado por los andrógenos. Entre los más importantes se encontraría la glicerofosforilcolina cuya función abarcaría la mantención de la presión osmótica del lumen hasta la de servir en parte como metabolito fosfolipídico de los espermatozoides (BROOKS - 1979). Entre otros compuestos cuyas concentraciones activas en el plasma epididimario están reguladas por andrógenos (FOURNIER), (MARQUIS), (RAJALAKSHMI) se pueden citar a la carnitina, ligada con el metabolismo energético del espermatozoide (HARTREE) y el ácido siálico, probablemente involucrado en la glicosilación final de las proteínas secretadas (NICOLSON - 1979)

Muchos de los parámetros citados pueden influir sobre numerosos cambios sufridos por el espermatozoide durante su trayecto por el epidídimo y su interrelación y hormono-dependencia del proceso pueden esclarecer los mecanismos de maduración. El cambio de un tipo de movimiento circular hacia otro de tipo progresional constante es una de las diferencias entre espermatozoides del caput y cauda epididimario en la rata (BLANDAU), el cobayo (GADDUM) y el hombre (BEDFORD - 1975). Este proceso parece estar ligado a procesos bioquímicos más que a modificaciones morfológicas del flagelo. La formación de enlaces disulfuro (CALVIN) y fosforilación de microtúbulos (TONGKAO) influyen sobre varias estructuras celulares como la Pieza Intermedia, fibras externas, membranas mitocondriales y la cubierta fibrosa de la Pieza Principal (CALVIN) relacionadas con la energía y orientación del movimiento flagelar. HOSKINS en cambio destaca la acumulación de AMP cíclico por el espermatozoide y la síntesis de un factor proteico por el epidídimo como principales responsables de la adquisición de motilidad progresional.

Los cambios en el perfil metabólico parecen estar, según HARRISON (1977), fuertemente vinculados a los cambios en la motilidad. Con la maduración el espermatozoide aumenta su velocidad de respiración y glucólisis paralelamente a una disminución de la actividad de síntesis. La glucosa derivada en el espermatozoide testicular hacia la formación de amino-ácidos, glicerol, fosfolípidos y otros intermediarios de síntesis aparece en el espermatozoide epididimario subordinada a la producción de energía para la motilidad. Los espermatozoides alcanzan motilidad máxima al ser retenidos artificialmente por varios días en los segmentos proximales del epidídimo, y son incapaces de fertilizar al ovocito con la efectividad que lo hacen los de segmentos

más distales (BEDFORD - 1967). Así, aunque importante en el proceso de fertilización, la adquisición de motilidad progresional no es un criterio absoluto de maduración.

Los cambios morfológicos más marcados en el espermatozoide durante la maduración epididimaria se observan en la región acrosomal y post-acrosomal. La reducción de tamaño y corrimiento de la denominada "gota citoplasmática" se lleva a cabo en zonas específicas del epidídimo en el jabalí (HANCOCK) y carnero (ORTAVANT) y gradualmente a lo largo de todo el proceso de maduración en el hamster. Este reservorio de enzimas lisosómicas es un remanente del citoplasma de la espermátide original; y aunque no se conoce claramente su función, su presencia en un elevado porcentaje de espermatozoides se acompaña de una disminuída capacidad fertilizante de los mismos. La reducción de tamaño en el acrosoma debido a una atenuación o redondeamiento de su borde, fue descrito en los primeros segmentos del epidídimo del conejo, mono, jabalí y cobayo (BEDFORD - 1975), Sin embargo la variación cualitativa de las enzimas por él contenidas es todavía objeto de investigaciones.

Las modificaciones bioquímico-estructurales de la membrana plasmática durante la maduración del espermatozoide condicionarían la eficiencia de un paso posterior en el proceso de fertilización como es la CAPACITACION que culmina en la REACCION ACROSOMAL.

Fenómenos como la modificación de la carga eléctrica neta de la célula en el conejo (BEDFORD - 1963) que aumenta su potencial negativo a medida que el espermatozoide transita por el epidídimo o la adherencia cabeza-cabeza en el espermatozoide de cobayo (BLAQUIER - 1972) es atribuida a cambios estructurales de membrana más marcados en la zona acrosomal y post-acrosomal. Relacionado con estos cambios

se describe durante el pasaje por el epidídimo la pérdida de colesterol, lípidos y fosfolípidos especialmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina que resultarían en un aumento de la fluidez de membrana (POULOS).

La atención se centró sin embargo en el estudio de componentes de mayor complejidad dentro de la membrana. La aparición de antígenos de cubierta durante el proceso de maduración (EDWARDS), (HUNTER), (KILLIAN) señalan cambios en la membrana probablemente orientados hacia una eficiente interacción del espermatozoide con el ovocito desde su reconocimiento hasta la fusión. Medidos como receptores de lectinas vegetales que se unen a residuos hidrocarbonados, se caracteriza a estos antígenos como glicoproteínas cuya variación cuali-cuantitativa y de distribución acompañan al proceso de maduración del espermatozoide (GORDON), (NICOLSON - 1977, 1979), (FLECHON - 1979 I, II), (KOEHLER - 1981), (OLSON - 1981). Estos cambios en los receptores de lectinas pueden deberse a :

- Desenmascaramiento de antígenos testiculares internalizados u oclusión de los mismos por adsorción de componentes del lumen epididimario.
- Degradación de restos polisacáridos o agregado de nuevos azúcares a los mismos por acción de glicosidasas o glicosil transferasas respectivamente, presentes en el fluido epididimario (SHUR).
- Unión de glicoproteínas secretadas por el epitelio epididimario.

Muchos de los factores anteriormente citados son descartados como factores determinantes en la maduración de espermatozoides (HAMILTON - 1975) y sólo en la última década numerosos grupos orientaron su

trabajo hacia el estudio de la interrelación entre la estimulación androgénica, la síntesis de proteínas resultante y el proceso de adquisición de capacidad fertilizante.

La síntesis epididimaria y secreción al lumen tubular de proteínas específicas de órgano ha sido demostrada en varias especies como el carnero (ALUMOT), el toro (AMMAN - 1973) y rata (KOSKISMIES), (NEUTRA), (FAIN-MAUREL) pero la identificación de especies andrógeno-dependientes fue publicada por primera vez en la rata por CAMEO y BLAQUIER (1976).

La importancia de las proteínas epididimarias andrógeno-dependientes en la maduración del espermatozoide fue establecido en los trabajos de ORGEBIN CRIST y col. (1978, 1979) en túbulos epididimarios de conejo mantenidos en cultivo de órgano. El efecto de los andrógenos sobre la mantención y estimulación del proceso de maduración en estas condiciones es bloqueado por inhibidores de la traducción y transcripción lo que implica la necesidad de una activa síntesis proteica. El agregado de un extracto proteico epididimario imita el efecto de la hormona manteniendo la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

La purificación de estas especies en la rata (GARBERI - 1979, 1980), (LEA) permitió su caracterización como glicoproteínas de bajo peso molecular de 23.000 a 37.000 D y naturaleza acídica (PI 5,6). El desarrollo de una técnica inmuno-histoquímica permitió el estudio de su síntesis como de las características de la interacción con espermatozoides.

Su síntesis es inducida por los andrógenos en las células principales del caput epididimario siendo menos activa en segmentos más distales (KOHANE - 1980). Secretadas al lumen las glicoproteínas se

unen a la membrana plasmática del espermatozoide en la región acrosomal y post-acrosomal (KOHANE - 1980, CAMEO - 1981).

La unión de estos andrógenos aumenta a medida que los espermatozoides transcurren su paso por el epidídimo y disminuyen marcadamente en condiciones de capacitación " in vitro " o " in vivo " de los mismos.

El aumento de estas glicoproteínas sobre la superficie del espermatozoide con la maduración epididimaria confirmaría para el epidídimo el rol activo en la adquisición de sitios receptores para lectinas antes descripto.

Durante el proceso de capacitación ocurren importantes modificaciones en la membrana plasmática en dos zonas bien delimitadas: en la superficie del acrosoma y por detrás del segmento ecuatorial o región post-acrosomal (BRACKETT), (ENG), (KOEHLER). La pérdida de antígenos y receptores a lectinas se produce en forma de máculas restringidas a zonas delimitadas en la primera de estas regiones. La desestabilización de zonas discretas de las membranas plasmática y acrosomal externa sería un prerrequisito para la fusión de las mismas en la reacción acrosomal. La remoción de proteínas de cubierta favorecería la movilidad de los componentes de membrana facilitando los agrupamientos necesarios (O'RAND). La zona del segmento ecuatorial donde tiene lugar la fusión con el huevo parece del mismo modo desprenderse de proteínas de cubierta que estabilizarían los componentes de los receptores de reconocimiento celular (KOEHLER). Con, aparentemente similares, mecanismos de acción fueron descriptas en el plasma epididimario del conejo (ORGBIN CRIST - 1975) y cobayo (ADNUMA) sustancias capaces de inhibir la capacidad fertilizante y a los cuales se denominó " factores decapacitantes ".

La similitud en la interacción con los espermatozoides permitiría especular para la glicoproteínas andrógeno-dependientes, un rol estabilizador de membrana semejante al descrito antes, sin embargo sólo con el uso de técnicas más precisas que permitan su exacta localización se podrá asegurar su mecanismo de acción.

La detección en el hamster de proteínas que inducidas por andrógenos se unen a los espermatozoides durante su trayecto por el epidídimo (GONZALEZ ECHEVERRIA) permite la extensión del mecanismo postulado en la rata para la hormono-dependencia del proceso de maduración de espermatozoides demostrado en esta especie (LUBICZ-NAWROCKY - 1976) y la extrapolación como posible mecanismo común a todos los mamíferos.

Dificultades éticas y técnicas impiden la realización de experimentos para determinar si un fenómeno similar existe en el hombre. Los informes de YOUNG (1970) que demuestran la capacidad fertilizante de espermatozoides del caput epididimario humano en pacientes con epidídimo-anastomosis parecerían descartar la existencia del proceso de maduración antes descrito. Sin embargo es bien conocido que los espermatozoides inmaduros, al menos en el conejo (ORGEBIN CRIST - 1977) tienen una baja aunque no nula capacidad fertilizante y que en condiciones de experimentación no comparativas con espermatozoides maduros alcanzan porcentajes considerables de huevos fecundados.

La capacidad de fertilizar de ovocitos heterólogos desprovistos de membrana pelúcida de espermatozoides provenientes de los distintos segmentos del epidídimo humano fue comparada por HINRICHSEN y BLAQUIER bajo condiciones restringidas " in vitro " llegando a establecer la existencia de un proceso de maduración similar al descrito en otros mamíferos.

El estudio de los factores involucrados directamente en este proceso pasa nuevamente por el establecimiento de una maduración en la motilidad durante el paso por el epidídimo (BELONOSCHKIN, BEDFORD - 1973), pero estos cambios al menos en especies experimentales puede disociarse de la adquisición de capacidad fertilizante (BEDFORD - 1967). Limitándonos al modelo propuesto para distintos roedores es poco lo que se ha extendido al hombre. El aumento de la carga neta negativa en la superficie de los espermatozoides durante su maduración epididimaria (BEDFORD - 1973) habla de una reestructuración de sus componentes externos como sucede en el conejo.

Por otro lado los resultados acerca del origen de los antígenos unidos al espermatozoide no son claros. Muchos de ellos también presentes en el plasma seminal parecen tener un origen no epididimario (BUENO), (LI), (YOUNG - 1960).

Sólo trabajos preliminares de MANCINI y col. muestran evidencias inmunohistoquímicas de la presencia de antígenos en el espermatozoide epididimario que no se detectan en el testículo.

La andrógeno dependencia de la secreción de proteínas u otro factor relacionado con la maduración del espermatozoide en el epidídimo necesita de la caracterización previa del tipo de respuesta hormonal de este órgano. Por otro lado la especificidad de especie que muestran estos factores epididimarios identificados hasta ahora, exigen la identificación de proteínas activamente secretadas por el epidídimo a fin de identificar específicamente en el hombre la o las entidades involucradas en el proceso de maduración de espermatozoides.

III.2 Materiales y métodos.

III.2.1 Drogas, soluciones y bufferes.

Las soluciones salinas balanceadas según HANK y EARLE cuya composición se detalla luego fueron marca DIFCO (Detroit.Mich. USA) como así también el medio de cultivo 199 preparado en base a los dos tipos de soluciones salinas. La Penicilina fue cedida gentilmente por los laboratorios Squib y la Estreptomicina fue marca Abbot.

Las mezclas de veinte amino ácidos tritiados (NET - 250) y carbono catorce (NEC - 445) fueron adquiridas a New England Nuclear (Boston MA.).

Los bufferes usados además de los detallados previamente en la sección II.3 fueron :

		Moles/l.	
PBS:	ClNa	0,14	
	$PO_4 HNa_2 \cdot 7 H_2O$	0,0043	
	$PO_4 H_2K$	0,01	
	N_3Na	(0,02 %)	
		Moles/l.	
tris - ClNa	tris	0,02	pH 7,4
	ClNa	0,6	
tris Glicina	tris	0,025	pH 8,3
	glicina	0,192	

Soluciones Salinas

	Solución de HANK (gr/1)	Solución de EARLE (gr/1)
Cl Na	6,8	6,8
Cl K	0,4	0,4
Cl ₂ Ca	0,2	0,2
SO ₄ Mg	0,2	0,2
PO ₄ H ₂ K	0,125	0,125
Bacto Dextrosa	1.0	1.0
CO ₃ H Na	0,66	2.2
Rojo fenol	0,02	0,02

Los demás compuestos utilizados son los ya descritos en II.3

El suero fetal bovino (estéril) usado para suplementar los medios de cultivo fue marca GIBCO. Con el objeto de remover los esteroides endógenos, el suero fue adsorbido con carbón activado (lavado previamente según se indica en II.3 y esterilizado al vapor) al 0,5 % (peso/volumen) con agitación magnética y bajo condiciones estériles, a 0 °C durante 30 minutos. La suspensión fue centrifugada a 1.500xg 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante filtrado a través de membranas Millipore (BEDFORD, Massachusetts) de 0,4 u de diámetro de poro usando portafiltros Swinnex - 25 (Millipore) y jeringas.

Distribuido en alícuotas de 3 ml el suero así tratado fue congelado a -20 °C para su conservación.

Todas las operaciones " a frasco abierto " antes descritas

como así también las que se especifiquen posteriormente como " estériles ", fueron realizadas con material y bajo atmósfera estéril (Flujo laminar Edgegard, BAKER, Co, Inc Sanford, Maine USA.)

III.2.2 Obtención del tejido.

Los epidídimos fueron obtenidos de 15 pacientes (edad 26 - 67 años promedio 55 años) que fueron sometidos a orquidectomía bilateral (10) o epididimectomía (5) como tratamiento médico debido a carcinomas prostáticos o quistes epididimarios respectivamente. Ninguno de los pacientes había recibido previamente terapia radiante o administración de estrógenos. El tejido fue recibido en solución salina estéril y transportado al laboratorio a temperatura ambiente.

III.2.3 Cultivo de órgano.

El epidídimo fue cuidadosamente disecado bajo condiciones estériles y la porción distal o CAUDA, unida al DUCTUS DEFERENS, fue separado para la obtención de fluido intraluminal como se detalla en el siguiente ítem.

Habiendo decapsulado el órgano, los túbulos fueron separados quirúrgicamente bajo lupa y mantenidos en cápsulas de Petri con Medio 199 (Hank) conteniendo penicilina 100 IU/ml y estreptomycin 100 ug/ml. Este medio de lavado suplementado con antibióticos fue usado durante todas las manipulaciones del tejido previas al cultivo. Luego de dos

lavados con medio fresco los túbulos (aproximadamente 2 cm de longitud o 70 mg de peso) fueron transferidos a grillas de acero inoxidable (FALCON) que fueron depositadas sobre cápsulas para cultivo de órgano (60 x 15 mm n° 3037 FALCON. Dickinson and Co, Cockeysville, MD, USA). La cámara interna bajo la grilla fue llenada con medio 199 (EARLE), conteniendo 10 % suero fetal bovino, penicilina 100 IU/ml y estreptomicina 100 ug/ml hasta tomar contacto con el tejido. En la cámara externa se colocó 1 ml de agua bidestilada estéril.

Las cápsulas fueron incubadas a 33 °C bajo atmósfera de aire; dióxido de carbono (95:5) por 3 días con dos cambios de medio para disminuir el contenido endógeno de andrógenos.

Los esteroides exógenos fueron preparados en soluciones stock en base a etanol y agregadas directamente al medio de cultivo con una dilución final de 1:200. Los túbulos fueron cultivados por espacio de hasta 5 días más con un cambio de medio. Los medios de cultivos controles recibieron sólo vehículo.

III.2.4. Fluidos intraluminales y extractos proteicos de espermatozoides.

El contenido intraluminal del cauda epididimario fue obtenido por perfusión desde el VAS DEFERNIS con 1 ml de buffer tris - glicina (pH 8,3) mediante el uso de una jeringa.

Una vez comprobada la presencia de espermatozoides al microscopio, la suspensión fue inmediatamente centrifugada a 1000xg por 10 minutos guardando el sobrenadante a 0 °C. El precipitado fue resuspendido en buffer fosfato (PBS) (pH 7,4) y recentrifugado como antes.

Esta operación fue repetida una vez más, los sobrenadantes descartados, y el precipitado resuspendido en 1 ml de buffer tris CLNa a 0 °C por 30 minutos con agitación. Esta suspensión fue centrifugada a 2000xg 10 minutos y el sobrenadante fue congelado a -70 °C para su posterior análisis. El precipitado fue descartado.

El primer sobrenadante de 1000xg fue centrifugado a 10.000xg por 20 minutos y el sobrenadante denominado PLASMA del CAUDA EPIDIDIMARIO (cep) fue congelado a -70 °C.

Los sectores CAPUT y CORPUS epididimario fueron cortados con tijeras en secciones de no más de 3 mm. de espesor evitando presionar el tejido. Los trozos fueron mantenidos en medio 199 (HANK) a temperatura ambiente por 30 minutos con eventual agitación suave. El medio fue removido cuidadosamente y centrifugado a 1000xg 10 minutos. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se procesó como antes. Denominados PLASMA del CAPUT y CORPUS EPIDIDIMARIO (caep) y (coep) respectivamente fueron mantenidos a -70 °C hasta su posterior procesamiento.

III.2.5 Captación y metabolismo de andrógenos.

Luego de tres días de iniciado el cultivo, con dos cambios de medio, el tejido montado sobre las grillas fue lavado con el goteo de 10 ml de solución de Hank a fin de evitar interferencia del suero. Luego de agregar medio 199 conteniendo 24 nM 1,2,6,7 ³H testosterona, el cultivo fue continuado por espacio de 1 a 6 horas.

Series paralelas de incubaciones recibieron la misma cantidad de ³H testosterona con el agregado de Acetato de Cyproterona hasta

una concentración final de 12 μM (500x) a fin de evaluar la unión no específica de hormona en las distintas fracciones. Finalizada la incubación el medio fue retirado y extraído 3 veces con 1 ml de Acetato de Etilo. La radioactividad retenida en la fase orgánica fue analizada como se detallará luego.

El tejido fue lavado con buffer tris R (ver II.3) a 0 °C, pesado y homogenizado con 5 volúmenes del mismo buffer en un homogenizador Potter-Elvehjem teflón - vidrio de 1ml de capacidad. Alícuotas de homogenato fueron tomadas para cuantificación de radioactividad total captada y determinación de proteínas. Luego se procedió a la obtención de las fracciones subcelulares.

En la obtención de la fracción nuclear detallada en II.3 la ultracentrifugación en buffer tris S fue reemplazada por 2 lavados en buffer tris N. El último precipitado fue extraído cuatro veces con Acetato de Etilo a temperatura ambiente, la fase orgánica derivada para el análisis cromatográfico de la radioactividad extraída y el resto seco de material nuclear fue hidrolizado en 1 N OHNa para la determinación de proteínas insolubles según el método de Lowry.

La fracción citosólica fue obtenida como se detalla en II.3.

La fracción de radioactividad unida a macromoléculas fue separada mediante filtración en mini-columnas de Sephadex G-25 como ha sido detallado en II.3.9 y extraída con Acetato de Etilo para su posterior cromatografía.

Todos los extractos orgánicos fueron concentrados a sequedad bajo flujo de aire y el residuo fue resuspendido en aproximadamente 50 μl de Cloroformo:Eter etílico (1:1). Luego del agregado de 10 μg de testosterona y Δ_4 Androstenediona como indicadores internos, las soluciones fueron sembradas con capilares sobre placas de Silica Gel

(Merck de 0,2 mm de espesor 60 - F 254 Cat 5539 EM Laboratories Inc Elmsford NY USA) bajo flujo de aire caliente. Las placas fueron cromatografiadas en el sistema Cloroformo;Etanol (98:2) y la posición de los indicadores fue revelada bajo irradiación de luz ultravioleta. Las zonas correspondientes a la testosterona y sus metabolitos 5α reducidos 5α DHT y $5\alpha, 3\alpha-\beta$ dioles fueron separadas por su Rf según se detalla en la Fig. 17 y su radioactividad fue cuantificada según se detalla en II.3.4 .

Para evaluación de la hormona total específicamente unida a la fracción nuclear y citosólica se tomaron alícuotas de los extractos de Acetato de Etilo correspondientes, previo a las cromatografías y evaporando el solvente la radioactividad se determinó como antes.

La especificidad de la unión se determinó en cada caso mediante la sustracción a la radioactividad total de la correspondiente a los extractos de incubaciones con Acetato de Cyproterona.

III.2.6 Caracterización de Receptores nucleares para andrógenos.

Con el propósito de caracterizar el receptor nuclear se usó la misma metodología que para el epidídimo de rata. La purificación de núcleos, obtención de extractos proteicos y técnica de evaluación de la hormona específicamente unida son las descritas en II.3.9 . Para estos experimentos el epidídimo fue transportado desde el quirófano al laboratorio a 0 °C.

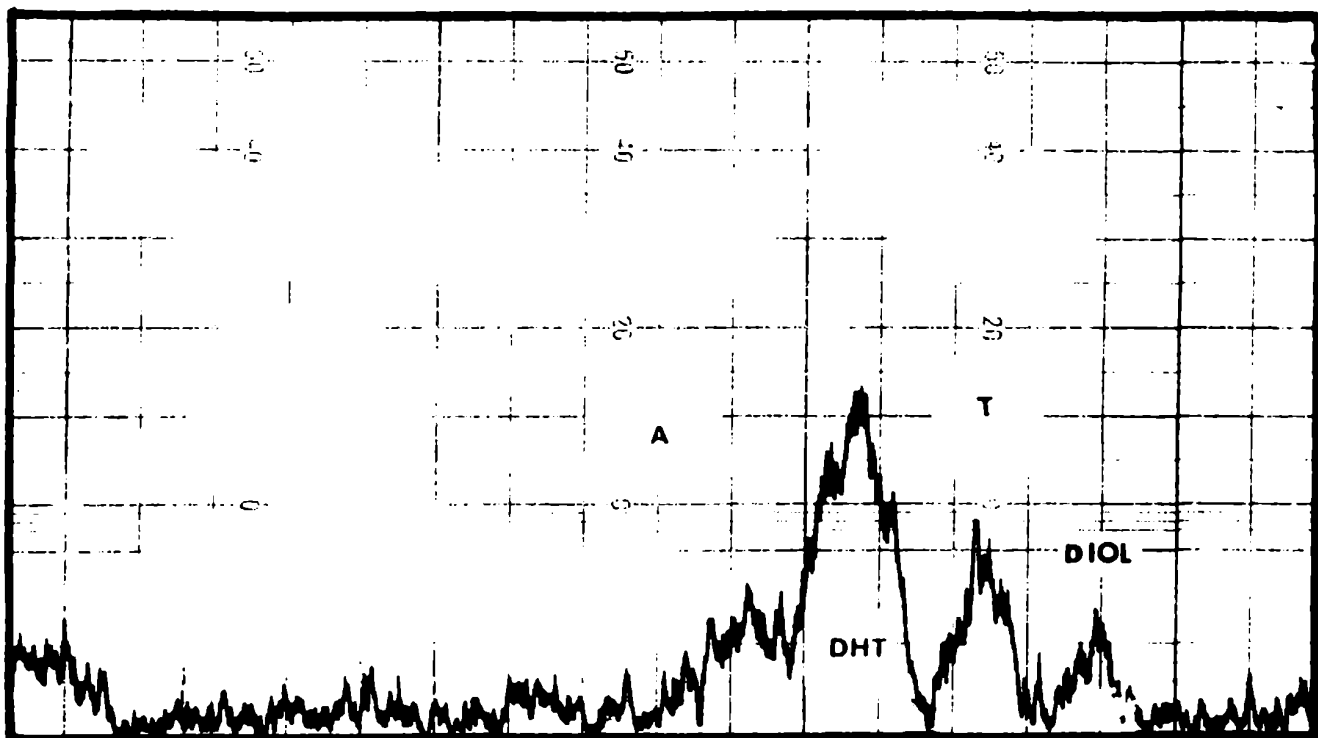


Figura 17 Separación cromatográfica de los productos del metabolismo de la Testosterona mediante el uso de placas de sílica gel en el sistema Cloroformo:Etanol 98:2.

Parte superior: ubicación de los marcadores Testosterona y Δ_4 Androstenediona bajo irradiación con luz ultravioleta.

Parte inferior: Registro del radiocromatograma.

III.2.7 Control histológico - Morfometría.

El procesamiento del tejido para su análisis morfológico mediante histología es el descrito en II.3.2 . El análisis morfométrico se realizó sobre los cortes fijados y teñidos mediante observación directa a través de un ocular graduado (Wild) en un microscopio Zeiss con un aumento de 400 veces. La altura del epitelio fue medida no menos de 7 veces en cada túbulo con un mínimo de 4 de éstos por corte. Esta medición fue hecha en cortes pertenecientes a dos explantos por lote y el análisis de la varianza fue aplicado para el tratamiento estadístico de los datos.

III.2.8 Actividad proliferativa.

La síntesis de DNA fue evaluada mediante la incorporación de precursores a material nuclear precipitable según la técnica detallada en II.3.3.

III.2.9 Síntesis proteica.

Los túbulos lavados con solución salina de Hank y cortados con tijera en trozos de aproximadamente 4 mm de longitud. Una cantidad entre 50 - 100 mg de tejido fue incubada en 0,5 ml de solución salina de Earle conteniendo 0,7 uCi de una mezcla de los veinte aminoácidos

tritiados por 3 hs a 33 °C bajo una atmósfera de aire con 5 % de dióxido de carbono.

El tejido fue luego lavado con solución salina de Hank y homogeneizado en 3 volúmenes de buffer tris R con un homogeneizador Potter Elvehjem (vidrio - vidrio). La fracción citosólica fue preparada como se indica en II.3.5 y alícuotas de la misma fueron precipitadas en TCA 10 % según la técnica de MANS y NOVELLI:

Alícuotas de 100 ul de citosol fueron depositados sobre cuadrados (2 x 2 cm) de papel de filtro Whatman 1 M rotulados y estos fueron sumergidos en TCA al 10 % (100 ml) a 0 °C durante 15 minutos. La solución fue descartada y los filtros se lavaron con TCA 5 % (100 ml). Un segundo lavado con TCA al 5 % fue llevado a cabo en un baño de agua a 90 °C por 10 minutos, para luego proseguir a temperatura ambiente. Un tercer lavado con TCA (5 %) (50 ml) fue seguido del agregado de 100 ml de Etanol:Eter etílico (1:1). Los trozos de papel fueron tomados con alfileres, secados bajo lámpara, y transferidos a viales de conteo para evaluación de la radioactividad.

III.2.10 Análisis electroforético de la proteínas sintetizadas.

III.2.10.1 Incorporación de marca radioactiva.

Los títulos fueron lavados exhaustivamente con solución salina de Hank y cortados con tijera en trozos pequeños. El tejido de cada serie de cultivos fue transferido a nuevas cápsulas (una cápsula por cada 2 grillas originales) cortado con tijeras e incubado con la

siguiente mezcla:

- + 0,4 ml de solución salina de Earle.
- + L-Metionina (concentración final 1 mM).
- + Penicilina-Estreptomicina (concentración final 100 IU/ml, 100 ug/ml).
- + 10 uCi mezcla de ^3H amino-ácidos para la serie de cultivos con andrógenos.
o 7 uCi mezcla de ^{14}C amino-ácidos para las series controles.
- + OHNa 0,2 N hasta viraje alcalino estable del rojo fenol.

La incubación se llevó a cabo a 33 °C bajo atmósfera de aire: CO_2 (95:5) con agitación ocasional durante 3 hs. Luego el medio fue reemplazado por medio 199 (Earle) y la incubación proseguida por 1 hora. Terminada la incubación el medio fue retirado, centrifugado a 1000xg 10 minutos y congelado a -70 °C, y el tejido lavado varias veces con solución salina secado sobre papel de filtro y congelado a -70 °C. De procesarse en el día el tejido era homogeneizado en 0,5 ml de buffer tris glicina (pH 8,3) en homogeneizador Potter vidrio - vidrio y se obtenía la fracción citosólica como fuera ya descripto.

III.2.10.2 Tratamiento de las muestras.

Las extracciones salinas de espermatozoides, el medio de cultivo con el que se termina la incubación anterior y el citosol obtenido, fueron dializados a fin de eliminar el Cl Na en un caso y la radioactividad no asociada a proteínas en el otro.

Para tal propósito los tubos de diálisis fueron pretratados mediante la siguiente secuencia de lavados: Etanol : agua (1:1); Bicarb

nato de sodio 1 N, EDTA 1 mM; agua destilada.

La diálisis se efectuó contra 100 volúmenes de buffer tris - glicina (pH 8,3) (2 cambios) durante 16 horas a 5 °C.

El método de LOWRY para determinación de proteínas precipitando con TCA fue usado para eliminar interferencias del medio de cultivo y/o la glicina del buffer.

Alícuotas de citosol de lotes estimulados y controles conteniendo igual cantidad de proteínas fueron mezcladas (máximo 100 ug proteínas total, 100 ul) para su análisis electroforético. Estos valores máximos están dados por la capacidad del gel a usar y valen para cualquier extracto proteico complejo. En el caso de proteínas puras usadas como patrones de movilidad sólo 5 ug fueron sembradas. Se agregaron 10 ul de glicerol para aumentar la densidad de la mezcla y 5 ul de solución G (ver ítem siguiente) como indicador de movilidad electroforética. Las mezclas fueron congeladas a -70 °C hasta su uso.

III.2.10.3 Armado de los geles de Poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida en gradientes fueron preparados en base a la técnica descrita por O'FARRELL omitiendo el agregado de agentes desnaturalizantes como dodecil sulfato de sodio (SDS), urea o mercaptoetanol.

Soluciones y reactivos.

- A Buffer tris 1,5 M pH 8,8 (\pm 5 °C)

Este buffer debe ser preparado completando con agua hasta el volumen final deseado.

- | | | | |
|-----|------------------------------------|------|----------------------------|
| - B | Acrilamida (BIO.RAD) | 21,5 | % Peso/Volumen final |
| | N,N Metil bis acrilamida (BIO.RAD) | 0,56 | % Peso/Volumen final |
| | Buffer A | 47,2 | % Vol./Volumen final |
| | Agua bidestilada | | hasta completar Vol. final |

Esta solución se preparó con ese orden de agregado de reactivos y se agitó hasta la completa disolución de los mismos, una vez filtrada se la conservó en frío.

- | | | | |
|-----|----------------------|----|--|
| - C | Persulfato de amonio | 10 | % Peso en volumen en
agua bidestilada |
|-----|----------------------|----|--|

Esta solución fue preparada siempre el día de su uso.

- D N,N,N',N' tetrametilen diamina (TEMED) (BIO.RAD)

- | | | | |
|-----|----------------------------|--------|-------------------|
| - E | Acrilamida | 4 | % Peso en volumen |
| | N,N Metilen bis acrilamida | 0,12 | % Peso en volumen |
| | Rivoflavina | 0,0004 | % Peso en volumen |
| | Tris base | 0,6 | % Peso en volumen |
| | Cl H hasta pH 6,7 | 0,05 | % Peso en volumen |

Esta solución fue guardada en frío a resguardo de la luz.

- F	Tris Base	pH 8,3 (5 °C)	0,6	% Peso/Volumen
	Glicina		2,8	% Peso/Volumen
- G	Azul de bromofenol en agua destilada		0,1	% Peso/Volumen
- H	Metanol		40	% Vol./Vol. en agua
	Acido Acético		10	% Vol./Vol. en agua
- I	Azul Coomasie		2	% Vol./Vol. en agua
- J	Metanol		16	% Vol./Vol. en agua
	Acido Acético		4	% Vol./Vol. en agua

Para el armado de los geles en gradientes se procedió del mismo modo que para los gradientes de sacarosa (II.3)

Recipiente I	Solución B	4,23 ml
	Glicerol	4,0 ml
	Barra agitadora magnética	
Recipiente II	Solución B	2,12 ml
	Glicerol	0,7 ml
	Buffer A	1,0 ml
	Agua bidestilada	4,4 ml

El gas disuelto en ambas mezclas fue disminuído manteniéndolas al vacío por 2 minutos en baño de hielo y se les agregó 20 ul de C y 5 ul de D a cada una de ellas.

La solución II fue agregada al recipiente I mediante la bomba peristáltica tratando de mantener baja su temperatura. La mezcla resultante de una buena agitación fue bombeada al exterior con un flujo del doble del de entrada de II. Con ayuda de cánulas metálicas la mez

cla resultante fue depositada en las cámaras soporte del gel (medidas internas 8,0 cm (largo) x 7,6 cm (ancho) x 0,24 cm (espesor)). Las cánulas acompañaron el ascenso del líquido a fin de evitar turbulencias por la caída de gotas. De esta forma se obtuvieron gradientes lineales de concentración de acrilamida (T) del 12 % al 6 % con una concentración relativa constante de bis - acrilamida (C) del 3 %. Una vez llena la cámara se depositó suavemente agua bidestilada hasta formar una capa de 0,5 cm.

Aunque la polimerización parecía completarse a los 90 minutos a temperatura ambiente, los geles se armaron generalmente el día anterior a su uso y se permitía completar el proceso durante toda la noche. Alcanzada la polimerización del extremo superior el agua se reemplazaba por 2 a 4 ml de solución E por sobre la que se insertaba un molde de polimerización que permitiera la formación de " dientes " de separación para la aplicación posterior de muestra. La irradiación de esta mezcla con luz fluorescente desencadenaba la polimerización del gel espaciador en aproximadamente 1 hora.

III.2.10.4 Electroforesis.

La electroforesis fue llevada a cabo en un aparato Pharmacia Fine Chemicals GE - 4 a una temperatura de 8 - 10 °C con una fuente de poder de corriente continua Buchler. Una diferencia de potencial de 100 volts fue aplicada a los geles durante 15 minutos a modo de " precorrida ". Una vez aplicadas las muestras la electroforesis se llevó a cabo a 100 volts hasta obtener la salida del indicador del gel espaciador o

" stacking " y luego proseguida a 35 mA/gel manteniendo la corriente constante. Desde un voltaje inicial de 150 volts se obtenía al cabo de 3 horas de electroforesis un voltaje final de aproximadamente 300 volts.

Luego de medido el Rf las cámaras se desarmaron y los geles fueron teñidos o cortados en fracciones para su posterior procesamiento.

Para la primera de estas operaciones se sumergió el gel en una solución de colorante I en mezcla de fijación H (1:20) durante toda la noche a temperatura ambiente y la decoloración se llevó a cabo mediante lavados con igual volumen de solución J (2 o 3 cambios) durante varias horas.

III.2.10.5 Procesamiento post-electroforesis.

La inducción de síntesis de determinadas proteínas se determinó midiendo la radioactividad asociada a las distintas fracciones. Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron divididos en las bandas longitudinales y por separado envueltos en papel de aluminio y congeladas a -70°C hasta su posterior procesamiento. Soplando fuertemente sobre las mismas se lograba un rápido descongelamiento evitando la condensación de humedad. Secándolos con papel de filtro se procedía a su fraccionamiento.

El gel fue cortado en 70 - 75 fracciones de 1 mm que fueron transferidas a viales de conteo conteniendo 0,1 ml de agua oxigenada al 30 %. Estos fueron tapados herméticamente y mantenidos a 20°C de temperatura por 16 - 20 horas.

Luego de agregar 7 ml de solución al 4 % de Protosol (New England Nuclear, Boston MA) en solución de tolueno centelleante los viales fueron tapados y agitados vigorosamente hasta obtener una emulsión, esta operación fue repetida 2 a 3 veces por día hasta obtener la disolución del precipitado formado inicialmente.

La fotoluminiscencia de la mezcla usada fue minimizada guardando los viales en oscuridad por 24 horas antes del " conteo ". La radioactividad correspondiente a los dos isótopos en cada fracción fue cuantificada como en II.3 con una eficiencia del 30 % para el tritio (error de medición 5 %) y del 90 % para el carbono catorce (error

7 %). Una penetración de la actividad de este último en el rango correspondiente al tritio fue evaluada con estándares en las mismas condiciones, siendo del 15 %. La inversa es decir radioactividad en el rango del carbono provenientes de la desintegración del tritio fue despreciable. Con estas correcciones, el índice $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ fue calculado para cada fracción.

III.3 Resultados.

III.3.1 Mantenimiento de túbulos epididimarios en cultivo de órgano. Efecto de los andrógenos sobre la morfología del tejido.

Los túbulos epididimarios mantuvieron una morfología normal al microscopio óptico al menos luego de 8 días en cultivo (Fig. 18). Cuando el contenido endógeno de andrógenos en el tejido disminuyó por efecto de los dos cambios de medio durante los tres primeros días de cultivo, el agregado de cantidades controladas de los mismos produjo una respuesta en el tejido secretor.

La testosterona agregada al medio en una concentración final de 10^{-7} M produjo, como se observa en las figuras 18 - 21, un aumento en la altura celular del epitelio secretor. La variación cuantitativa de este parámetro se detalla en la tabla VI. El aumento significativo ($p < 0,01$) con respecto a los controles parece indicar una mayor estimulación en el CAPUT (40 %) que en el CORPUS epididimario (70 %). Estos datos reflejan así mismo la variación en altura celular entre muestras por lo que éste y todos los experimentos siguientes fueron comparados con cultivos controles provenientes del mismo órgano. En todos los casos analizados no se observó ningún efecto de los andrógenos sobre el tejido conectivo o muscular circundante, limitándose el estímulo al epitelio que limita la luz tubular. El aumento de altura del citoplasma celular se acompañó con la mantención de microvellosidades en el borde apical (Figs. 20 y 21).

Con el objeto de estudiar la especificidad hormonal de la estimulación, el estudio de estos parámetros se llevó a cabo en túbulos que fueron cultivados con testosterona 10^{-7} M conjuntamente con concentraciones cien veces superior de Acetato de Cyproterona. En la tabla VI se observa que el antiandrógeno bloquea el aumento inducido por los andrógenos ($p < 0,05$) con diferencias no significativas con respecto a los controles.

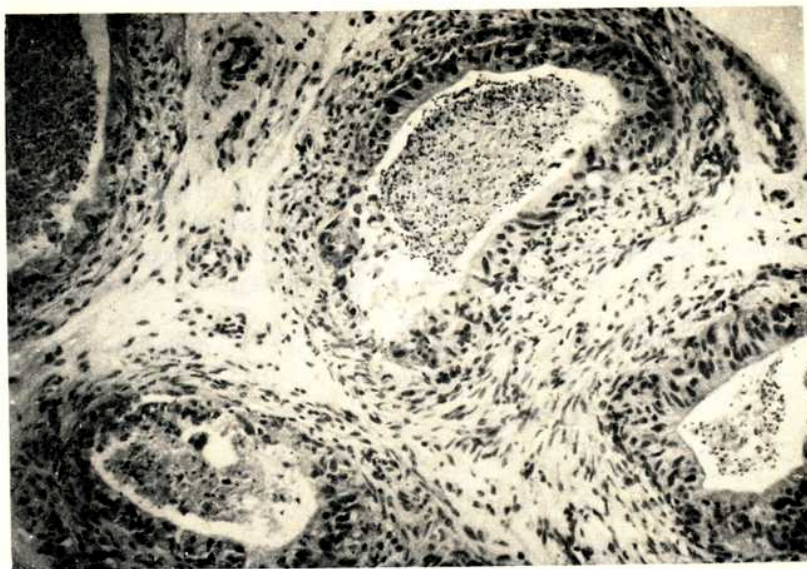


Figura 18 Aspecto histológico de túbulos epididimarios humanos mantenidos en cultivo de órgano por siete días. Aumento X 330.

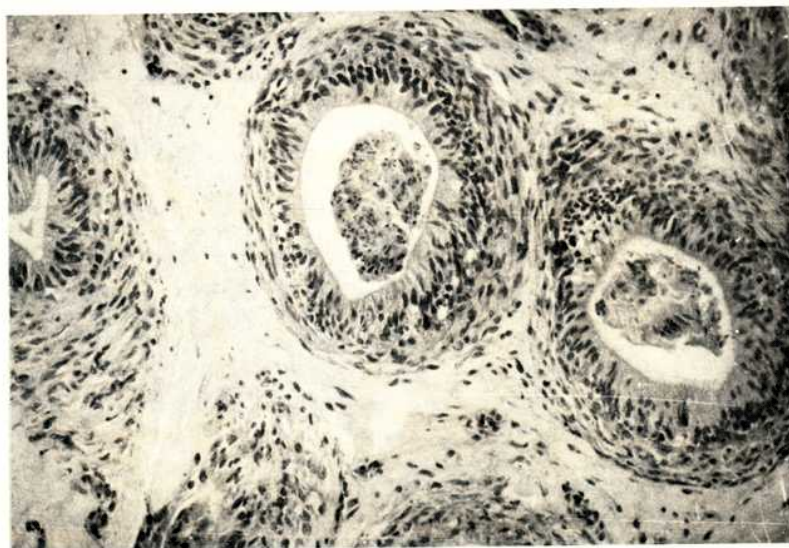


Figura 19 Aspecto histológico de túbulos epididimarios humanos mantenidos en cultivo de órgano por siete días . El medio contenía 0,1 uM Testosterona durante los últimos cuatro días. Aumento X 330.

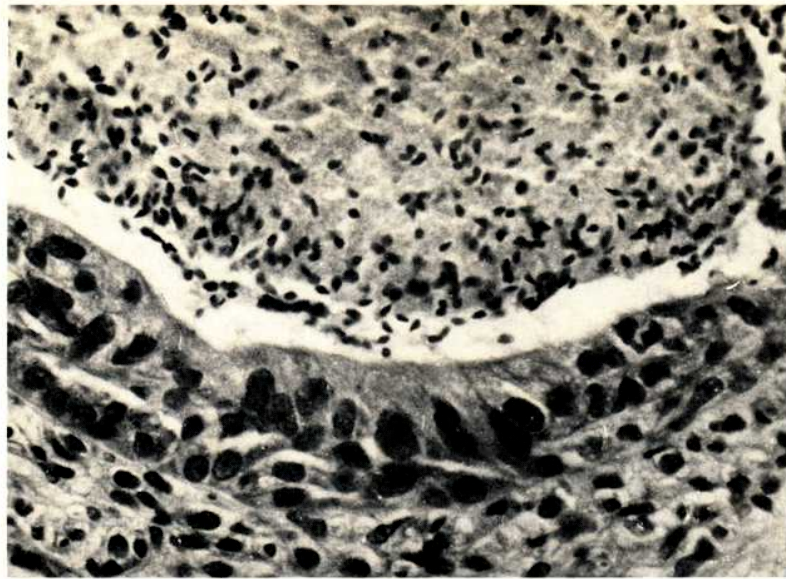


Figura 20 Aspecto histológico de túbulos epididimarios humanos mantenidos en cultivo de órgano por espacio de siete días. Controles. Aumento X 1300

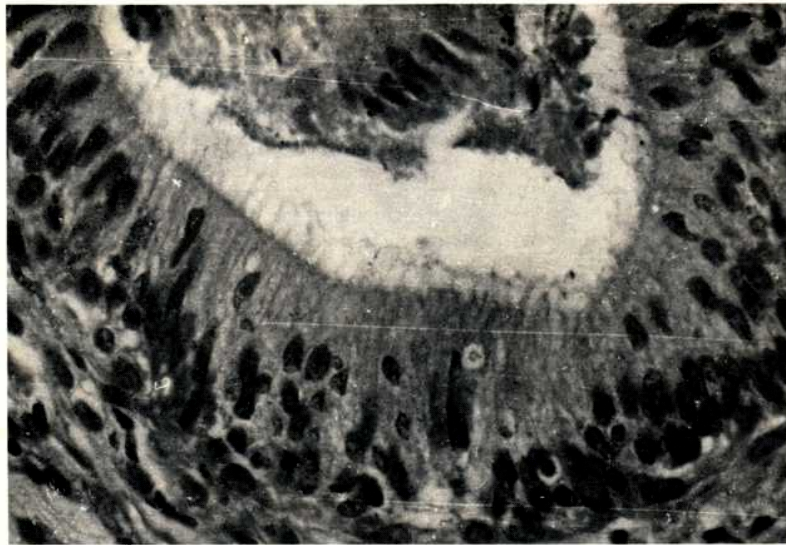


Figura 21 Aspecto histológico de túbulos epididimarios humanos mantenidos en cultivo de órgano por siete días y conteniendo 0,1 μ M Testosterona en el medio de cultivo durante los últimos cuatro. Aumento X 1300.

TABLA VI EFECTO DE LA TESTOSTERONA EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA ALTURA DEL EPITELIO EN TUBULOS EPIDIDIMARIOS HUMANOS

Tejido y Tratamientos	Altura celular ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$)	n*
Pacientes 1 y 2		
CAPUT Control	9,62 \pm 0,9	9
CAPUT Testosterona 0,1 μM	20,28 \pm 0,9 a)	13
COROUS Control		
COROUS Control	14,7 \pm 1	11
CORPUS Testosterona 0,1 μM	24,2 \pm 2,6 a)	7
Pacientes 3 y 4		
CORPUS Control	24,8 \pm 1,8	6
CORPUS Testosterona 0,1 μM	32,8 \pm 2,2	7
CORPUS Testosterona 0,1 μM + Acetato de Ciproterona 10 μM	24,7 \pm 4 b)	4

El tejido fue cultivado sin andrógenos por tres días antes del gregado de los distintos esteroides. Los cultivos fueron continuados por 4 días

a) $P < 0,001$ vs control

b) $P < 0,05$ vs estimulado con Testosterona

n* número de túbulos medidos. 7 mediciones individuales fueron tomados por túbulo

III.3.2 Utilización de andrógenos por el epidídimo humano en cultivo.

Con el objeto de caracterizar el mecanismo por el cual los andrógenos ejercían los efectos descritos sobre el epidídimo, la capacidad de captación, metabolismo y unión de la hormona fue estudiada en túbulos aislados. Con este propósito, testosterona tritiada fue agregada al medio luego del período de depleción de andrógenos con o sin el agregado de una concentración 500 veces superior de Acetato de Cyproterona.

El sustrato, ^3H -testosterona presente en el medio fue activamente metabolizado. Mientras luego de 15 minutos de cultivo un 85 % del sustrato permanecía como tal, sólo el 45 % de la radioactividad co-cromatografió con testosterona estandar luego de 6 horas. El análisis de los metabolitos activos ^3H - 5α DHT y ^3H - 5α -androstanoles mostró una importante producción de los mismos correspondiéndoles valores desde el 6 % y 9 % respectivamente a los 15 minutos hasta el 33 % y 22 % al final de las 6 horas de cultivo.

La captación de radioactividad por el tejido, según se observa en la Fig. 22, aumentó sostenidamente durante las primeras 3 horas de cultivo alcanzando una saturación luego de este período.

El estudio a lo largo del tiempo de la unión específica a macromoléculas en la fracción soluble citoplasmática, resultado de restar la radioactividad no específica unida, muestra un rápido incremento hasta un máximo de 4,12 fmol/mgprot a los 90 minutos (Fig. 23) seguido de una disminución a lo largo de las siguientes 5 horas.

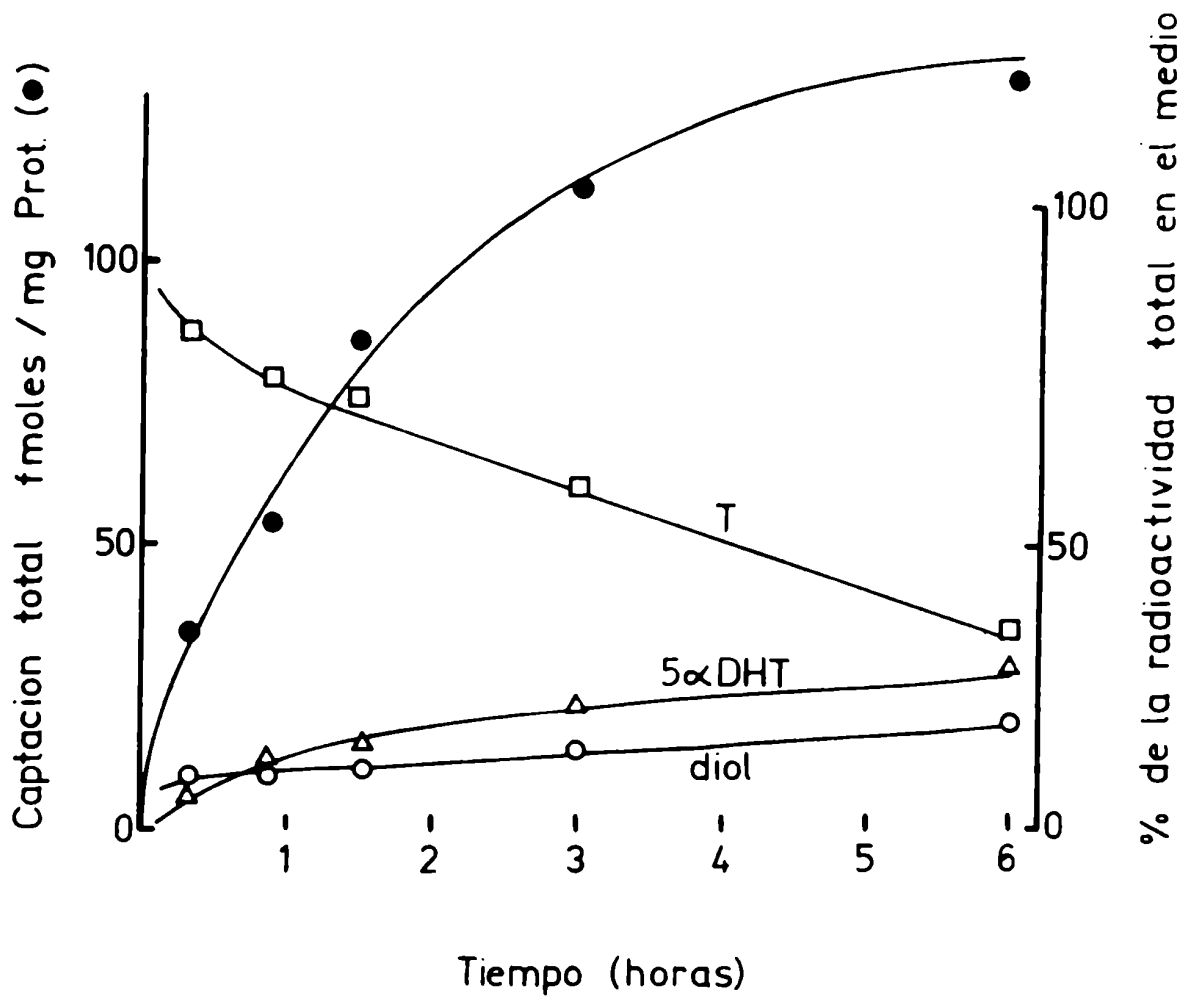


Figura 22 Captación y metabolismo de andrógenos por túbulos epididimarios humanos mantenidos en cultivo de órgano. En el cuarto día de cultivo se agregó (^3H) Testosterona a una concentración de 24 nM y la presencia de los distintos metabolitos en el tejido fue analizada juntamente con la captación total por el mismo a lo largo del tiempo. Los resultados están expresados como porcentaje de la radioactividad para cada esteroide. T= Testosterona, 5 α DHT= 5 α Dihidrotestosterona, diol= 5 α ,3 α/β Androstandioles.

La fracción de radioactividad total del citosol específicamente unida fue máxima a los 15 minutos (10,6 %), se mantuvo aproximadamente en los mismos niveles a los 45 y 90 minutos (9,6 % y 9,7 % respectivamente) y disminuyó a tiempos mayores (7,7 % y 4,7 % a las 3 y 6 horas respectivamente).

El esteroide unido específicamente en el citosol fue principalmente 5α DHT a lo largo de todo el tiempo (53 % a los 15 minutos y 66 % a las 6 horas) (Fig. 23). La testosterona disminuyó con el tiempo (de 23 % a los 15 minutos a 12 % a las 6 horas) mientras que los androstandioles se mantuvieron constantes en aproximadamente un 20 %.

Examinando la radioactividad libre en el citosol se encontró que la testosterona, el esteroide principal a los 15 minutos (62 %) disminuyó con el tiempo mientras la 5α DHT aumentaba. A las 3 horas la testosterona representaba un 35 % y la 5α DHT un 38 %, proporción que permaneció constante a lo largo del período de incubación siguiente. El balance correspondió al metabolito de esta última los 5α androstandioles con niveles en aumento constante (18 % a los 15 minutos hasta 33 % a las 6 horas).

La captación nuclear específica aumentó marcadamente hasta un máximo de 27 fmoles/mg prot entre los 90 minutos y 3 horas y se mantuvo en esos niveles por las siguientes 3 horas (Fig. 24). La proporción de la radioactividad nuclear total específicamente unida aumentó del 21 % a los 15 minutos hasta un máximo de 48 % a los 90 minutos permaneciendo en aproximadamente el 40 % a las 3 y 6 horas.

Con el objeto de determinar la duración de la retención específica del esteroide dentro del núcleo, los cultivos fueron mantenidos por 3 horas en contacto con la hormona radioactiva y luego el medio

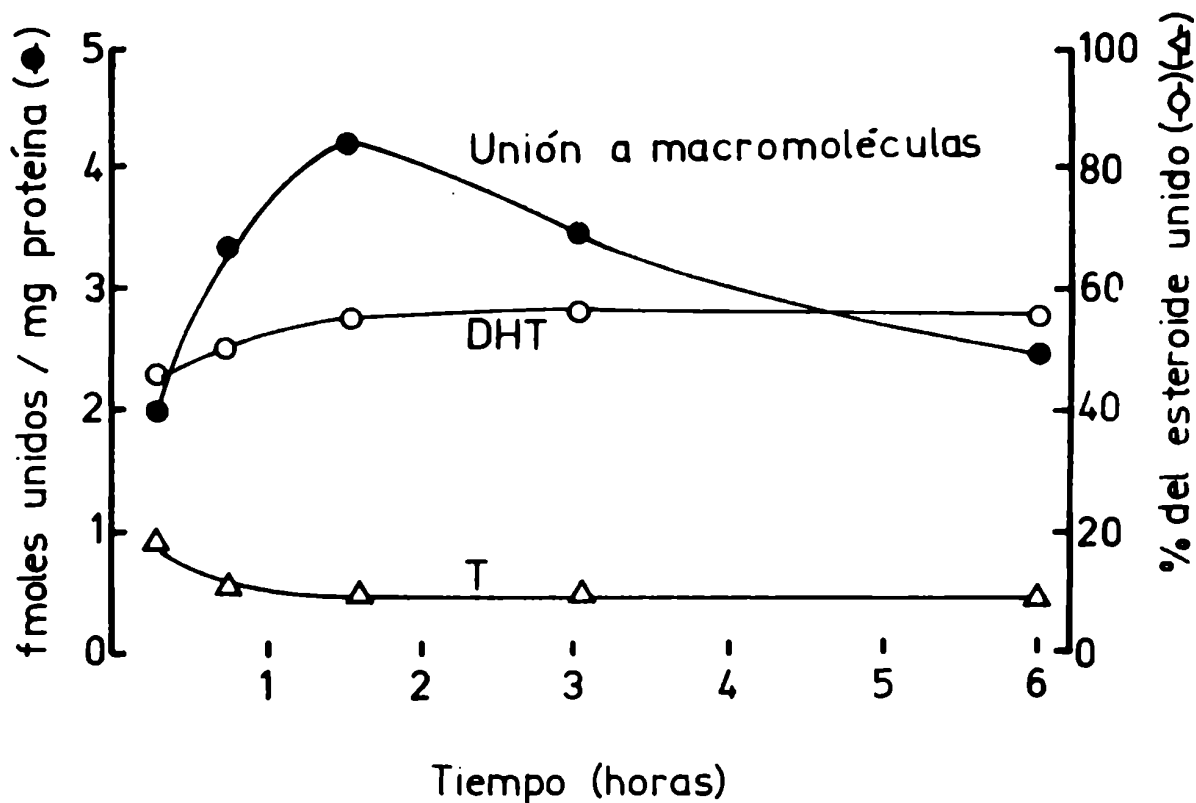


Figura 23 Metabolismo y unión específica de (^3H) Testosterona en el citosol de túbulos epididimarios humanos mantenidos en cultivo de órgano. El tejido fue cultivado como se describe en la figura 22 e incubado con (^3H) Testosterona (24nM) por espacio de varias horas. Otra serie paralela de cultivos fue incubada con (^3H) Testosterona (24 nM) con el agregado de Acetato de Cyproterona (12 μM). Luego de la homogeneización el esteroide unido a macromoléculas del citosol fue separado por elución a través de columnas de Sephadex G 25. La unión específica fue calculada restando la unión no específica (Cultivos con Cyp.Ac.) y expresada como fmoles específicamente unida por mg de proteína. La radioactividad unida a macromoléculas fue extraída y analizada por cromatografía en capa delgada como se describe para la figura 22 y el porcentaje de la radioactividad total se calculó para cada esteroide.

fue reemplazado por otro conteniendo la misma concentración de hormona no radioactiva. Los resultados (Fig. 24) muestran que la radioactividad específicamente unida decrece en un 50 % luego de 9 horas en cultivo. Sólo trazas de radioactividad específica fueron encontradas luego de 19 horas.

La 5 α DHT representó el 50 % de la radioactividad específicamente unida a los 15 minutos alcanzando un máximo de 82 % a los 90 minutos, nivel que se mantuvo a lo largo de todo el período de incubación. La testosterona en cambio disminuyó su participación en la unión a lo largo de las 6 horas (29 %, 10 % y 7 % a los 15, 45 y 90 minutos respectivamente) mientras que los androstandioles representaron una fracción constante (12 - 15 %) durante toda la incubación.

Es interesante hacer notar que mientras el Acetato de Cyproterona fue un inhibidor efectivo de la unión de andrógenos a macromoléculas en el citosol y del proceso de captación nuclear no alteró el metabolismo de la testosterona en ninguno de los dos compartimentos celulares.

III.3.3 Características de la retención nuclear de andrógenos en el epidídimo humano.

Con el objeto de caracterizar mejor la o las entidades responsables de la retención nuclear de los andrógenos, se estudió mediante la técnica de intercambio descrita para el epidídimo de la rata (II. 3) la presencia de receptores para andrógenos en núcleos de epidídimo humano. A fin de reunir una cantidad apreciable de tejido esta carac-

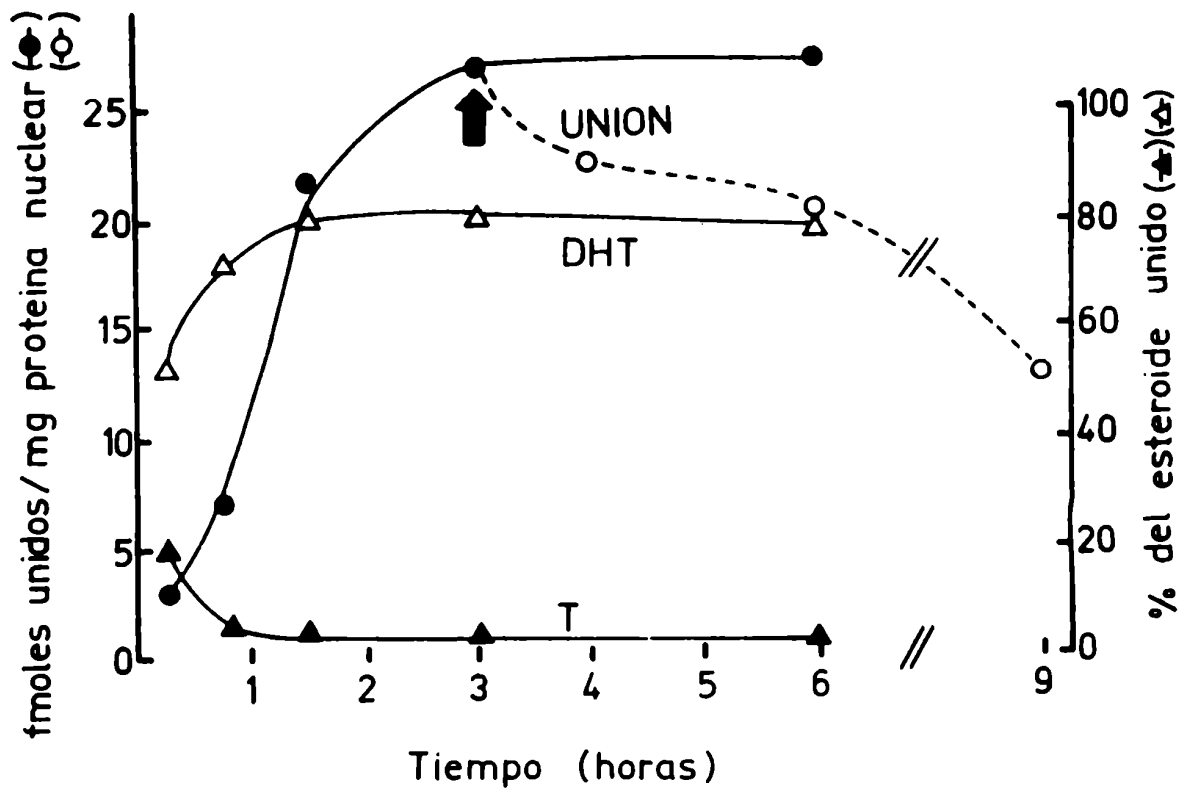


Figura 24 Metabolismo y unión específica de (^3H) Testosterona en la fracción nuclear de túbulos epididimarios mantenidos en cultivo de órgano. El tejido fue cultivado e incubado como se describe en la figura 23. La fracción nuclear fue aislada, lavada 5 veces con buffer y extraída con acetato de etilo. La unión no específica fue calculada como en la figura 23 en cultivos paralelos con acetato de cyproterona 12 μM , y la radioactividad específicamente unida, obtenida como antes, es expresada como fmols unidos por mg de proteína nuclear. La línea de guiones muestra los resultados obtenidos luego de cambiar el medio conteniendo (^3H) Testosterona por medio fresco conteniendo 24 nM Testosterona en el punto señalado por la flecha. El extracto orgánico de la radioactividad nuclear fue analizado por cromatografía en capa delgada. Los resultados se expresan como el porcentaje de la radioactividad total representado por cada esteroide.

terización se llevó a cabo sobre extractos nucleares de tejido fresco no cultivado, provenientes de las orquidectomías quirúrgicas.

El extracto nuclear preparado según se detalla en II.3 fue incubado con concentraciones saturantes de ^3H R1881 y el ligando específicamente unido a componentes macromoleculares fue cuantificado según la misma técnica que para el epidídimo de rata.

La máxima unión específica fue obtenida cuando el extracto se incubó por espacio de 16 horas a 10 °C como se observa en la Fig. 25 (panel A).

Usando estas condiciones fue posible determinar para el complejo una constante de disociación de $1,5 \times 10^{-10}$ M Fig. 25 B y un número de sitios correspondientes a 310 fmoles/mg DNA en el experimento de la figura. Sin embargo la variabilidad en el contenido de DNA debido a la contaminación con espermatozoides causó dispersión en la cuantificación del número de receptores entre las muestras. El rango de valores obtenidos fue de 110 a 410 fmoles/mg DNA.

III.3.4 Efecto de los andrógenos sobre la síntesis de proteínas y DNA en túbulos epididimarios en cultivo de órgano.

Los túbulos epididimarios luego de 3 días de cultivo en un medio libre de andrógenos para reducir los niveles de hormona endógena fueron cultivados en presencia de testosterona 10^{-7} M o vehículo por espacio de hasta 5 días. La actividad de síntesis proteica fue medida en función del tiempo de agregado de andrógenos como se detalla en Materiales y Métodos (III.2.9)

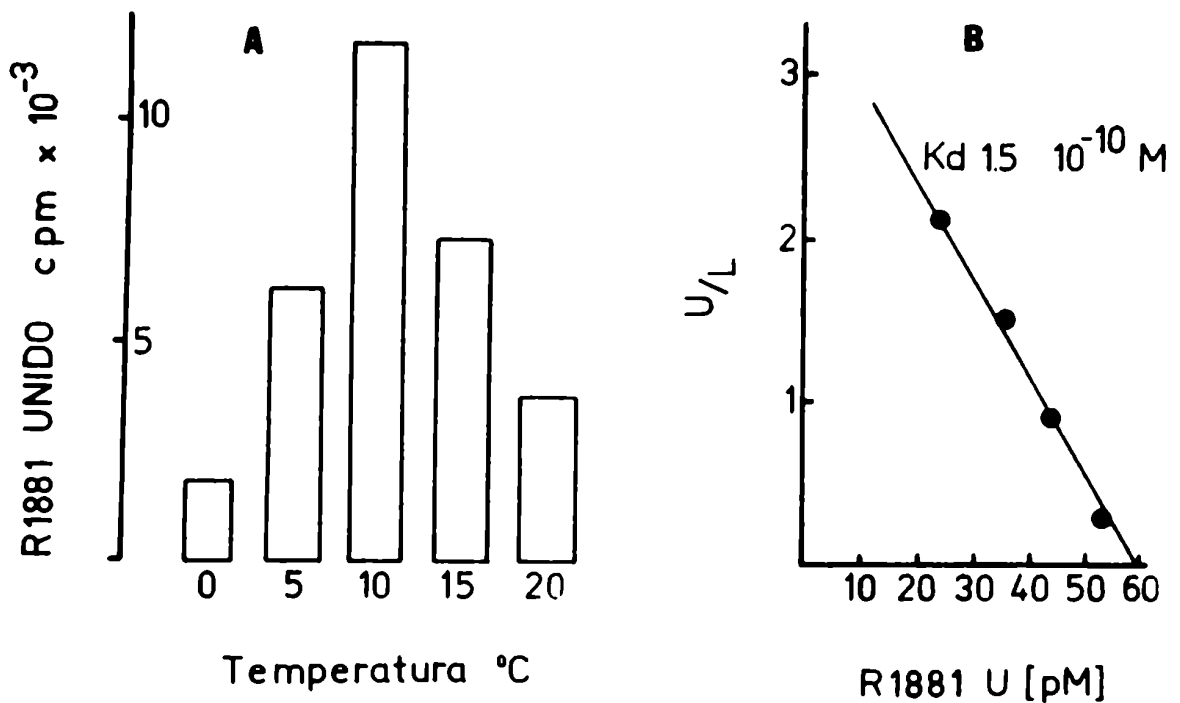


Figura 25 Determinación de sitios de unión nuclear en el epidídimo humano por la técnica de intercambio.

Núcleos purificados fueron extraídos con buffer conteniendo 0,6 M ClK y alícuotas de este extracto fueron incubadas con (³H) R 1881 por 16 hs a diferentes temperaturas como se indica en el panel A. La unión no específica fue estimada mediante incubaciones en paralelo conteniendo 7,5 μM R 1881. El esteroide unido a macromoléculas fue separado por elución a través de columnas de Sephadex G 25 y los resultados expresados como radioactividad específicamente unida por ensayo.

Panel B: Gráfica de Scatchard de los datos obtenidos luego de incubar el extracto nuclear con (³H) R1881 2 a 20 nM por 16 hs. a 10°C

El agregado de 10^{-7} M testosterona en el medio de cultivo tuvo un efecto estimulador sobre la incorporación de ^3H aminoácidos en material precipitable por TCA. El estudio de este efecto a lo largo del tiempo (Fig. 26) muestra que el incremento en la incorporación, aunque observable luego de 24 horas de estimulación, es significativamente diferente de los controles ($P < 0,05$) recién luego de 48 horas y fue máximo luego de 72 horas ($P < 0,005$). Mayores períodos de estimulación no produjeron mayores diferencias con los controles.

La capacidad para estimular la síntesis proteica fue estudiada para distintos andrógenos luego de 72 horas de administrados a los cultivos. Los resultados (tabla VII y Fig. 27) muestran que la mínima concentración a la que la testosterona es efectiva es 10^{-8} M con un 52 % de aumento en la incorporación de marca y que su efecto es máximo a una concentración de 10^{-7} M (115 %). La 5α DHT y el $5\alpha,3\alpha$ diol fueron igualmente efectivos con la testosterona a la dosis de 10^{-7} M.

El antiandrógeno Acetato de Cyproterona agregado a una concentración de 10^{-5} M no tuvo ningún efecto sobre la incorporación de ^3H aminoácidos pero redujo significativamente la estimulación causada por 10^{-7} M testosterona cuando era agregado simultáneamente a los cultivos.

Del mismo modo que para el estudio de la síntesis proteica fue estudiado el efecto del agregado de andrógenos sobre la incorporación de precursores específicos del DNA a material ácido precipitable. La testosterona fue agregada a túbulos luego de 3 días de cultivo, en concentraciones que habían estimulado el crecimiento del epitelio (10^{-7} M) con o sin la presencia del antiandrógeno Acetato de Cyproterona en concentraciones 100 veces superior. La incorporación de ^3H -timidina muestra, como se observa en la Fig. 28, un aumento luego de 48 horas del agregado de la hormona alcanzando un máximo a las 72 horas con un

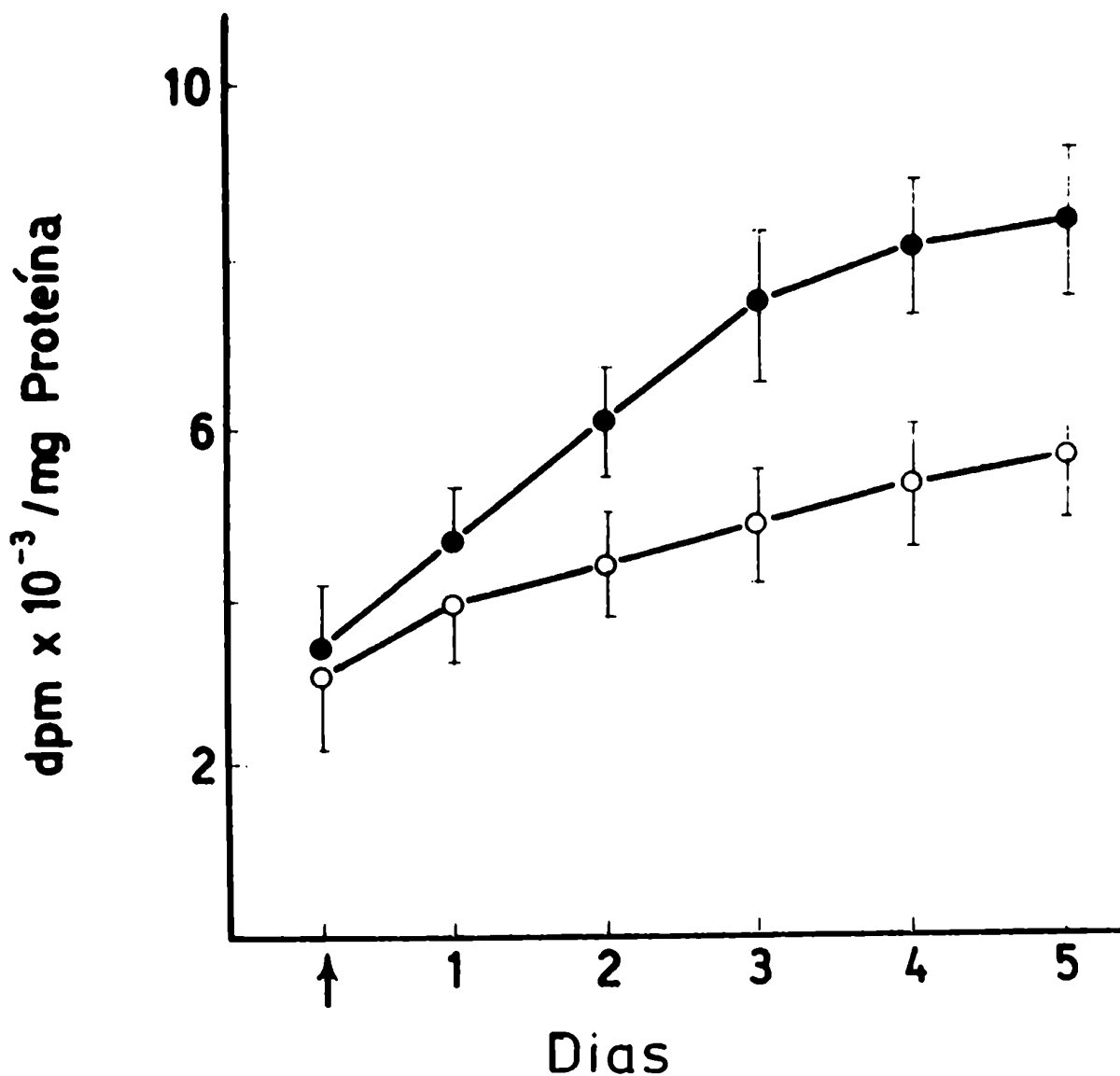


Figura 26 Efecto de los andrógenos sobre la incorporación de amino-ácidos por túbulos epididimarios mantenidos en cultivo de órgano. El tejido fue cultivado por tres días con dos cambios de medio y dentro de los cinco días subsiguientes los distintos cultivos recibieron medio fresco conteniendo 0,1 uM Testosterona por uno a cinco días (flecha). Al cabo de este período el tejido fue incubado con mezcla de amino ácidos (³H) por 3 hs. a 32°C y la radioactividad incorporada en la fracción citosólica fue estimada por el método de Mans y Novelli.

(—●—) T 0,1 uM (—○—) Control, solo vehículo

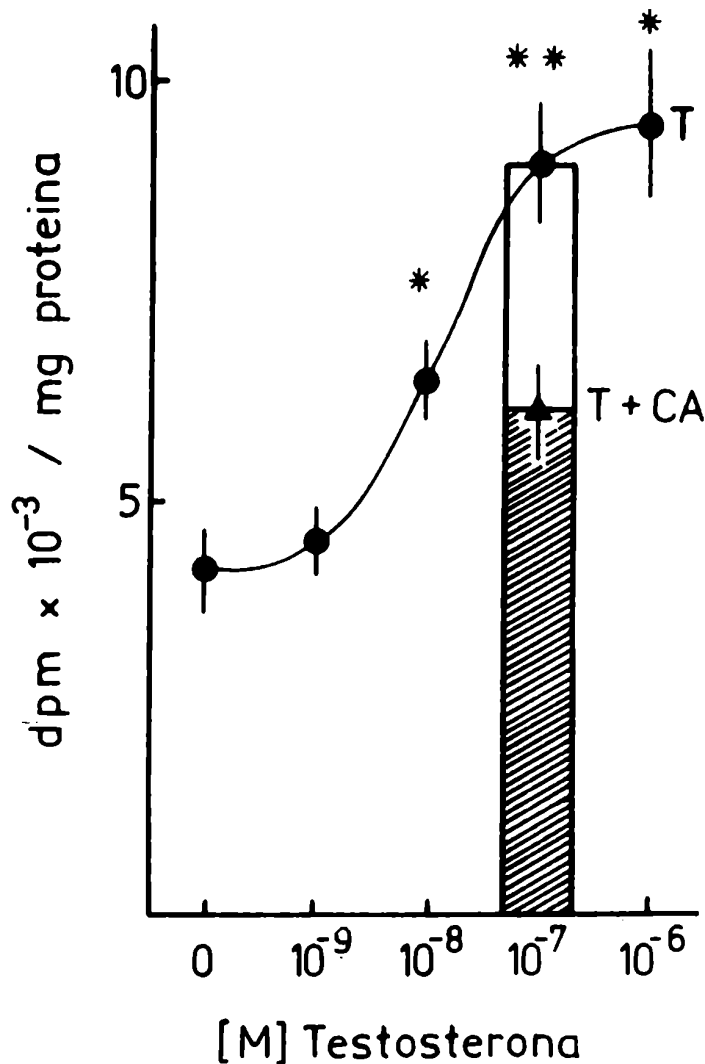


Figura 27 Efecto de la concentración de andrógenos en el medio de cultivo sobre la incorporación de aminoácidos por túbulos epididimarios en cultivo de órgano. El tejido fue cultivado como se indica en la figura 26 recibiendo durante los últimos cuatro días de cultivo Testosterona a las concentraciones indicadas en el medio y la incorporación de aminoácidos fue ensayada como se describe antes. Los resultados se expresan como dpm incorporadas por mg de proteína \pm SD. n=6. La barra rayada representa la incorporación cuando el tejido fue cultivado en presencia de Testosterona 0,1 uM mas Acetato de Cyproterona 5 uM

* $P < 0,05$ vs control

** $P < 0,05$ vs la menor concentración de T.

TABLA VII Efecto de distintos andrógenos presentes en el medio de cultivo por tres días a diferentes concentraciones, sobre la incorporación de (^3H) amino ácidos a material ácido-precipitable en túbulos epididimarios humanos.

Tratamiento	Incorporación de (^3H) amino-ácidos. dpm/mg proteína	
	Media \pm ES n=6	
Control	4266	\pm 380
Testosterona 10^{-9} M	4483	\pm 225
Testosterona 10^{-8} M	6470 *a)	\pm 289
Testosterona 10^{-7} M	9160 *a)	\pm 742
Testosterona 10^{-6} M	9500 *	\pm 787
5 α Dihidrotestosterona 10^{-7} M	8533 *	\pm 780
5 α Androstan-3 α ,17 β diol 10^{-6} M	7566 *	\pm 389
Acetato de Ciproterona 10^{-5} M	4900	\pm 300
Acetato de Ciproterona 10^{-5} M + Testosterona 10^{-7} M	6233 *b)	\pm 405

El tejido proveniente de dos pacientes fue cultivado en medio sin andrógenos por tres días antes del agregado de los distintos compuestos. La incorporación de (^3H) amino ácidos fue evaluada 72h despues como se describe en materiales y métodos.

* $P < 0,05$ con respecto a los valores controles

a)* $P < 0,05$ con respecto a la concentración menor de testosterona

b)* $P < 0,005$ con respecto a testosterona 10^{-7} M

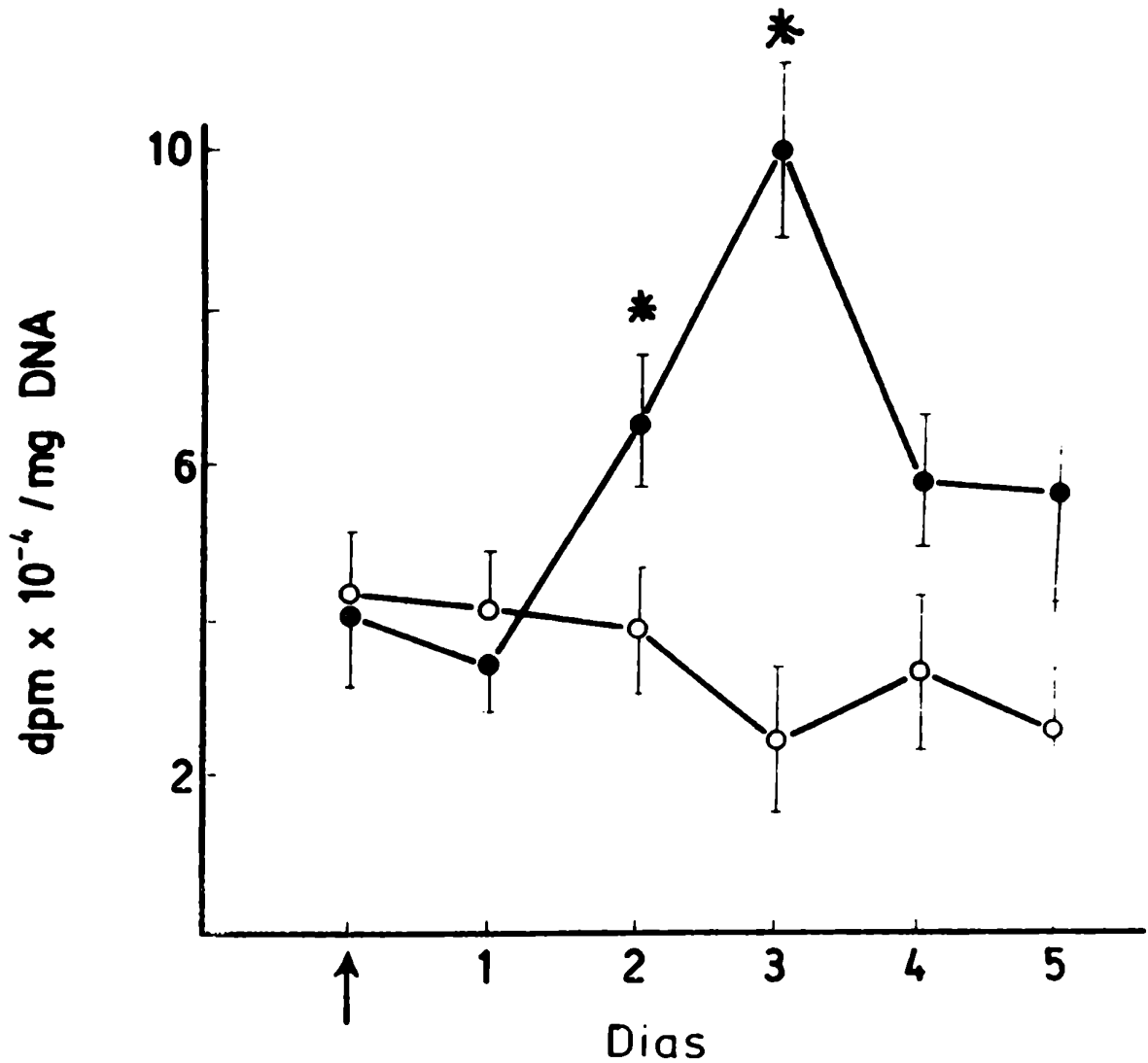


Figura 28 Efecto de los andrógenos sobre la incorporación de (³H) Metil-Timidina el DNA de túbulos epididimarios mantenidos en cultivo de órgano. El tejido fue cultivado con el mismo esquema descrito en la figura 26. La incorporación de marca radioactiva en el DNA se obtuvo incubando los cultivos con 1 μ Ci de (³H) Metil Timidina por 16 hs. a 32°C cuantificandose sobre la fracción nuclear precipitada con TCA 10%. Los Resultados se expresan como d.p.m. de precursor incorporado por mg. de DNA y representa el promedio de dos determinaciones independientes por triplicado \pm DE. La flecha señala el agregado al medio de cultivo de:

(—●—) 0,1 μ M Testosterona

(—○—) 0,1 μ M Testosterona + 50 μ M Acetato de Cyproterona

* $P < 0,05$ con respecto al control

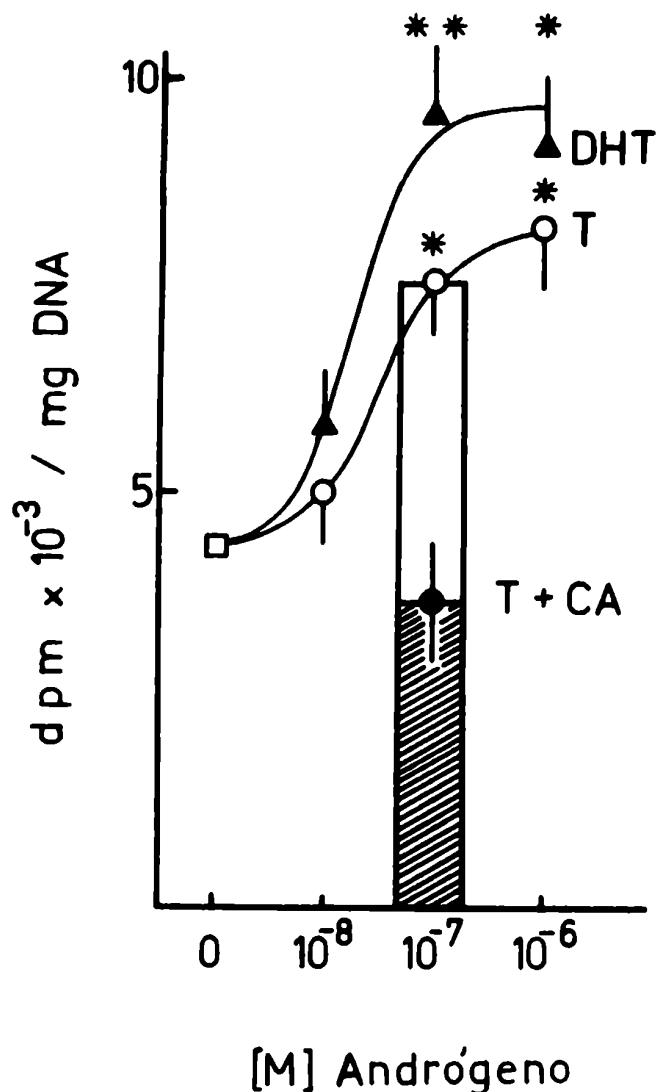


Figura 29 Efecto de la concentración de andrógenos en el medio de cultivo sobre la incorporación de ³H) Metil Timidina al DNA de túbulos epididimarios humanos en cultivo de órgano. El tejido fue cultivado como se indica en la figura 26 recibiendo durante los últimos cuatro días Testosterona (T) (—○—) y Dihidrotestosterona (DHT) (—▲—) a las concentraciones indicadas. Los resultados se expresan como d.p.m. de precursor incorporado por mg DNA ± DE. La barra rayada representa los resultados obtenidos cuando el tejido fue cultivado en presencia de Testosterona 0,1 uM + Acetato de Cyproterona 50 uM (—●—) (T+CA).

* P < 0,05 con respecto al control
 ** P < 0,05 con respecto a la menor concentración de andrógeno

TABLA VIII Efecto de varios andrógenos presentes en medio de cultivo por tres días a diferentes concentraciones sobre la incorporación de (Me ³H) Timidina a material ácido precipitable de túbulos epididimarios humanos.

Tratamiento	Incorporación de (Me ³ H) Timidina dpm/mg DNA Media ± ES
Control	4460 ±389
Testosterona 10 ⁻⁸ M	5133 ±396
Testosterona 10 ⁻⁷ M	7656*a) ±396
Testosterona 10 ⁻⁶ M	8300* ±730
5αDihidrotestosterona 10 ⁻⁸ M	5900 ±463
5αDihidrotestosterona 10 ⁻⁷ M	9666*ab) ±755
5αDihidrotestosterona 10 ⁻⁶ M	9234* ±719
5α Androstan 3α,17β-diol, 10 ⁻⁶	7376* ±438

El tejido proveniente de un paciente fue cultivado en medio sin andrógenos por tres días antes del agregado de los distintos compuestos. La incorporación de (Me ³H) Timidina se llevó a cabo 72 hs después según se describe en métodos usando tres cultivos para cada punto.-

- * P < 0,05 con respecto a los valores controles
- a)* P < 0,05 con respecto a la concentración menor de testosterona
- b)* P < 0,05 con respecto a Testosterona 10⁻⁷ M.

incremento del 180 % con respecto a los valores iniciales para luego disminuir a un 60 % de los valores máximos. El agregado simultáneo del Acetato de Cyproterona bloqueó por completo el efecto estimulatorio del andrógeno.

En condiciones de estimulación máxima (72 horas) fueron estudiados los efectos de varios de los metabolitos activos de la testosterona y los resultados se observan en la tabla VIII y la Fig. 29. La testosterona mostró máxima estimulación a concentraciones de 10^{-7} M con un 72 % de aumento en la incorporación de la marca. La 5α DHT también alcanzó máxima actividad a esa concentración con una estimulación del 117 % por sobre los valores controles que fue significativamente mayor ($P < 0,02$) que la inducida por la misma concentración de testosterona. El $5\alpha,3\alpha$ diol fue usado a concentraciones de 10^{-6} M y produjo un aumento en la incorporación de marca no diferente de la causada por la misma cantidad de testosterona pero menor que la producida por la concentración equivalente de 5α DHT.

III.3.5 Inducción androgénica de la síntesis de proteínas específicas.

El establecimiento de las condiciones óptimas de estimulación por andrógenos de la síntesis proteica permitió el estudio de la inducción preferencial de determinadas proteínas. Con tal fin túbulos epididimarios cultivados por tres días con andrógenos y túbulos controles fueron incubados con mezcla de aminoácidos (^3H) y (^{14}C) respectivamente como se indica en Materiales y Métodos y la radioactividad asociada a las proteínas sintetizadas fue analizada mediante electro-

foresis en gel de poliacrilamida.

En la Fig. 30 se observa que la incorporación se distribuye en picos discretos y resueltos a todo lo largo del gel. La co-electroforesis de citosol control (^{14}C) es usada como patrón interno y el cociente entre las dpm de cada isótopo permite evaluar el grado de estimulación de una determinada proteína con respecto al resto. El cálculo de un índice $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ promedio (10 Línea horizontal) permite distinguir al menos doce picos cuyos valores exceden ese valor con movilidades electroforéticas respecto de la albúmina (R_A) de 1,7; 1,57; 1,39; 0,98; 0,88; 0,82; 0,68; 0,5; 0,42; 0,3; 0,2 y 0,1.

La presencia del antiandrógeno Acetato de Cyproterona en concentraciones 100 veces (10^{-5} M) superior a la de la testosterona usada (10^{-7} M) redujo la estimulación hormonal general como se deduce del nuevo valor promedio de 8 para el índice $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ (Fig. 31).

Una inhibición superior a la diferencia entre las medias fue tomada en cuenta para la selección de seis picos especialmente sensibles al antiandrógeno. En la Fig. 31 se individualizan aquellas proteínas cuya síntesis estimulan los andrógenos e inhiben los antiandrógenos.

El cálculo descrito para la Fig. 30 fue repetido en seis cultivos diferentes centrándose la atención sobre las seis proteínas descritas y se obtuvieron los siguientes valores de R_A : $1,39 \pm 0,03$ (detectable en 3 cultivos sobre 6); $0,98 \pm 0,02$ (3/6); $0,82 \pm 0,02$ (4/6); $0,68 \pm 0,01$ (6/6); $0,42 \pm 0,01$ (5/6) y $0,30 \pm 0,02$ (3/6).

Con el mismo esquema experimental se estudió la zona del órgano donde esta inducción fuera más activa mediante el parámetro comparativo:

Figura 30 Inducción de la síntesis de proteínas en epidídimo humano en cultivo de órgano. Efecto de los andrógenos.

Túbulos epididimarios cultivados por tres días con 0,1 uM Testosterona o controles fueron incubados con 12 y 8 uCi de mezcla de amino ácidos (^3H) y (^{14}C) respectivamente por 3 hs. a 32°C.

El citosol de ambos explantos fue dializado y sometido a co-electroforesis en gel de poliacrilamida en gradientes lineales del 6 al 12% y la radioactividad correspondiente a cada isótopo fue determinada en cada fracción .

Panel superior: perfil de radioactividad de (^3H) correspondiente a cultivos con Testosterona.

Panel medio: Perfil de radioactividad de (^{14}C) correspondiente a los cultivos controles.

panel inferior: Cociente de radioactividad $^3\text{H}/^{14}\text{C}$

Las proteínas migraron hacia el cátodo de izquierda a derecha correspondiendo la marca de BPB al frente.

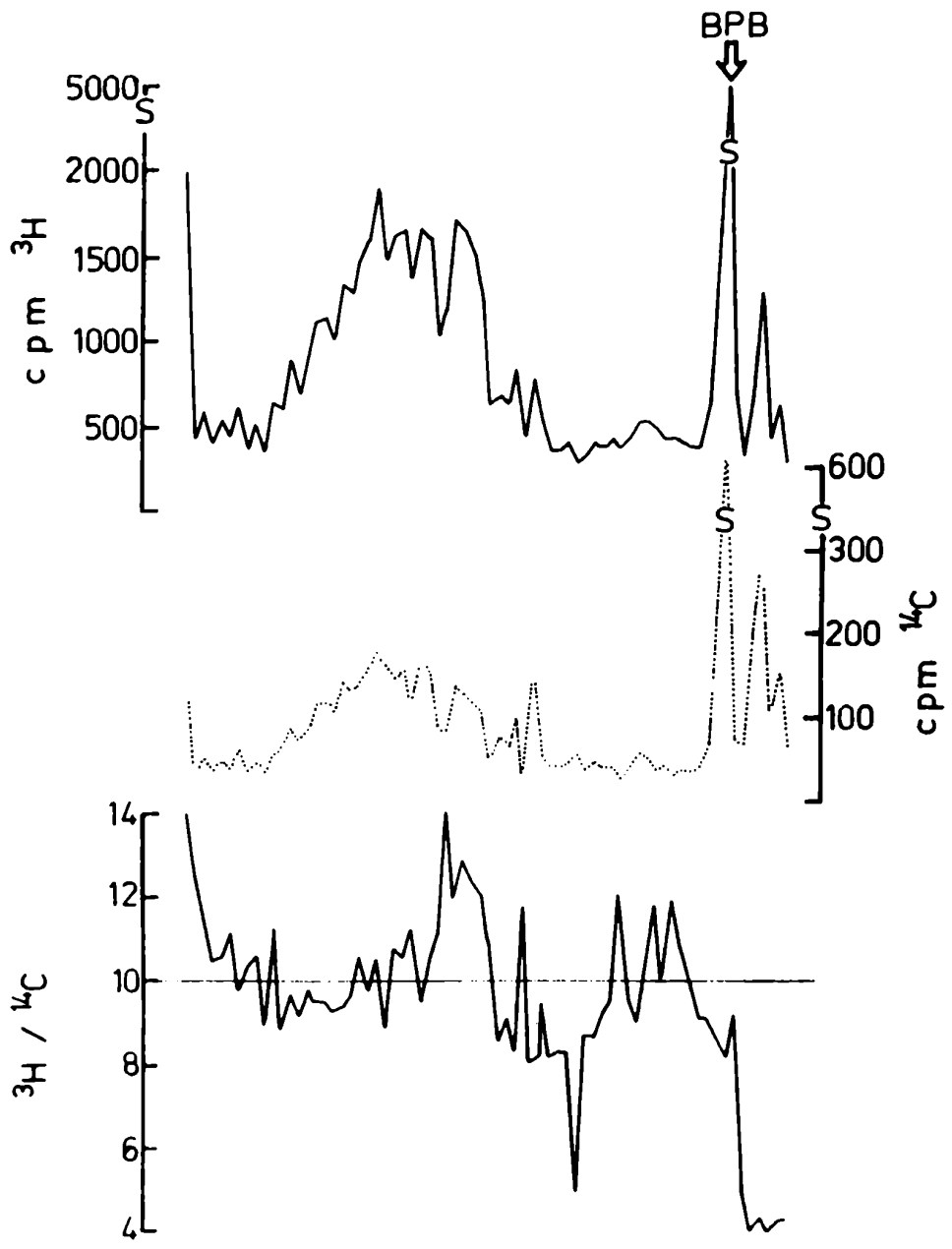


Figura 30

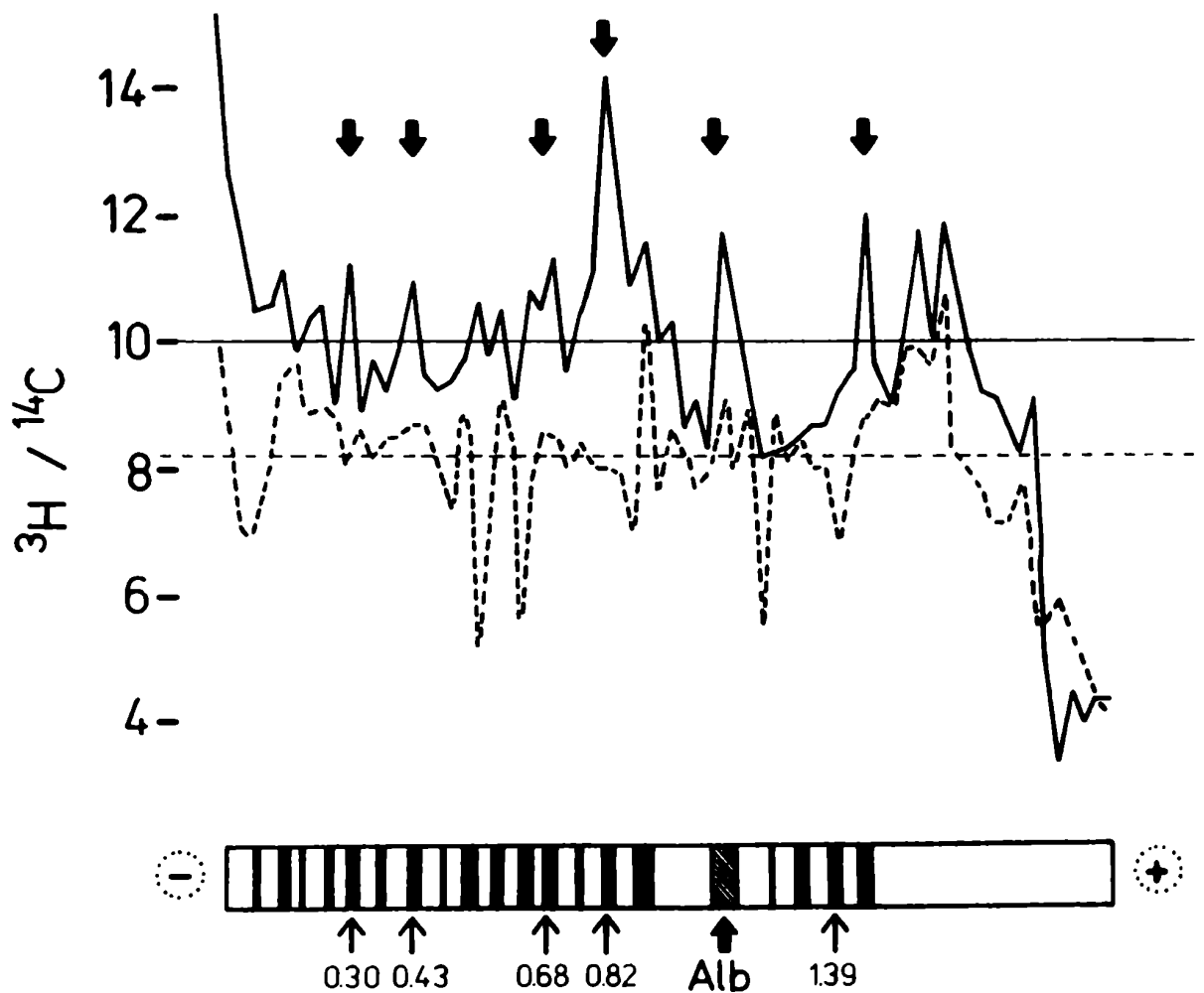


Figura 31 Especificidad de la inducción de proteínas por andrógenos en epidídimo humano en cultivo de órgano. Túbulos cultivados en presencia de 0,1 μ M Testosterona (—) o Testosterona 0,1 μ M con el agregado de 5 μ M Acetato de Cyproterona fueron incubados y procesados para la detección proteínas sintetizadas como se detalla en la figura 30. Las líneas horizontales representan el índice medio $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ para el correspondiente cultivo y las flechas señalan aquellos picos con una inhibición mayor que la diferencia de las medias. El esquema inferior muestra la representación gráfica de la tinción del gel con azul Coomassine y las movilidades relativas a la Albúmina sérica humana (R_A)

ESTIMULACION RELATIVA

$$S = \frac{i - \bar{i}}{\bar{i}} \times 100$$

donde i es el índice $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ para una determinada proteína en una de las zonas estudiadas.

\bar{i} es el índice $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ promedio del mismo gel.

Los resultados expuestos en la Fig. 32 muestran que salvo para las proteínas de R_A 0,98 y en menor medida para la de R_A 0,3 la síntesis de las demás es estimulada preferentemente en los segmentos más proximales al testículo o CAPUT siendo menos intensa en los segmentos distales o CORPUS distal.

Con el objeto de estudiar la vida media de las proteínas antes mencionadas, los túbulos fueron incubados con mezcla de aminoácidos radioactivos en las condiciones habituales. Luego de tres lavados con solución salina los túbulos fueron cultivados con medio completo por espacio de 1 a 9 horas. Tras la electroforesis de los respectivos citosoles la radioactividad asociada a las proteínas estudiadas fue grficada en función del tiempo de recambio de aminoácidos como se observa en la Fig. 33.

En cuanto a los casos de radioactividad decrece rápidamente en las primeras horas hasta alcanzar una marca constante. Considerando que la electroforesis en una sola dimensión puede reunir más de una proteína con el mismo R_f la persistencia de marca por encima de cierto tiempo luego del marcado descenso inicial puede representar la presencia simultánea de proteínas de distinta vida media. Aún así, considerando solamente la caída inicial fueron estimados los siguientes valores para este parámetro,

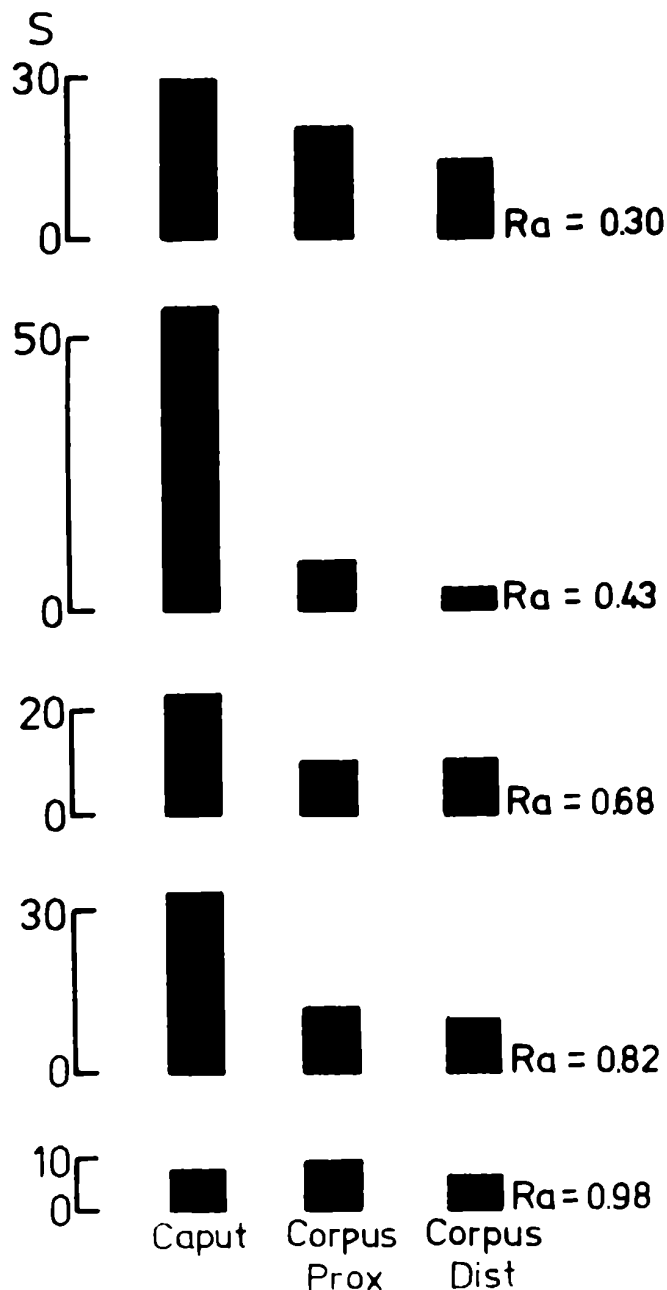


Figura 32 Inducción de proteínas por andrógenos en los distintos segmentos del epidídimo humano en cultivo de órgano.

La estimulación de la síntesis de las proteínas detectadas según la técnica detallada en las figuras 30 y 31 fue estudiada en el Caput epididimario y los segmentos proximales y distales del Corpus.

$$S = \frac{(\overline{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}})_i - (\overline{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}})}{(\overline{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}})} \times 100$$

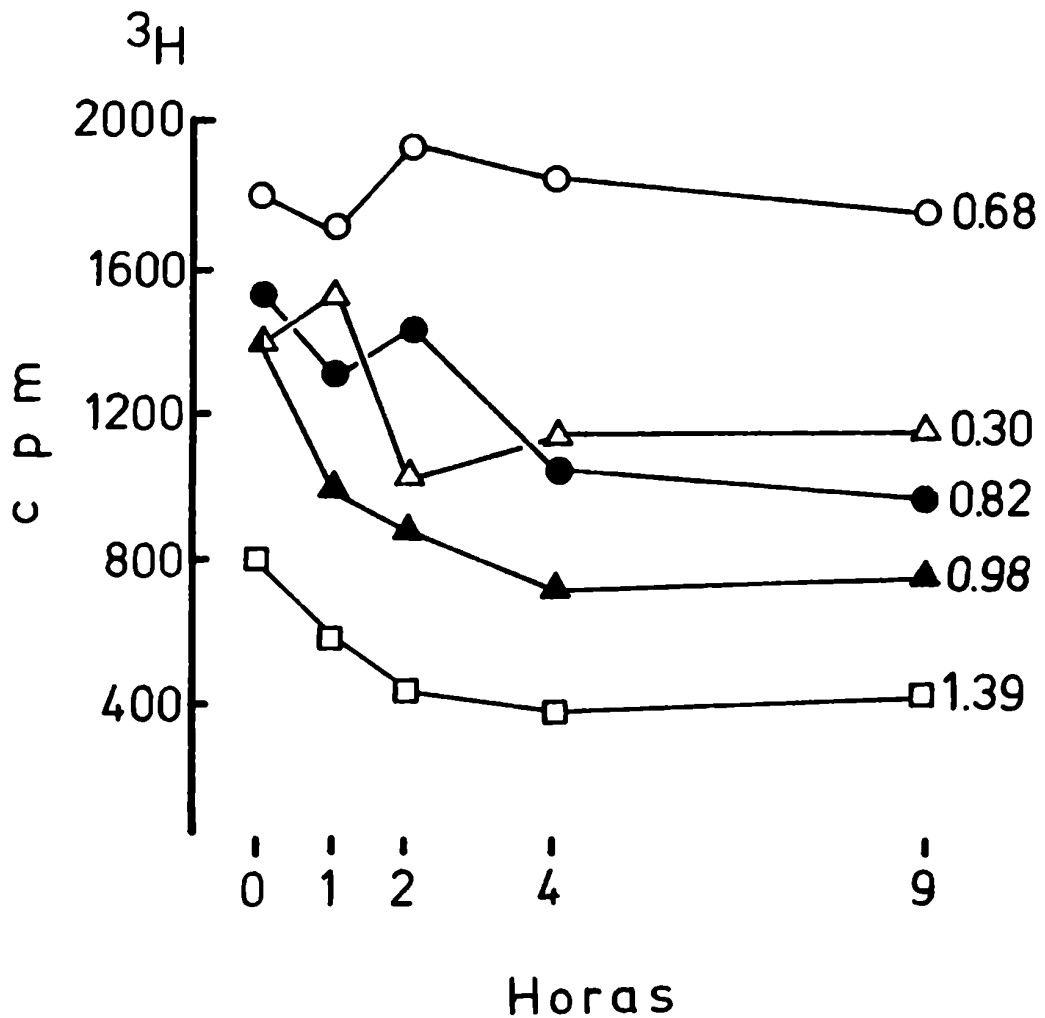


Figura 33 Estimación de la vida media intracelular de las proteínas inducidas por andrógenos en cultivo de órgano de epidídimo humano. Túbulos cultivados con 0,1 μ M Testosterona por tres días fueron incubados con amino ácidos (3 H) como se detalla en la figura 30., prosiguiéndose el cultivo en un medio completo en amino ácidos no radioactivos por espacio de hasta 9 hs. La radioactividad correspondiente a las proteínas detectadas cuyo R_A se detalla, fue cuantificada y se la grafica en función del tiempo de recambio del medio

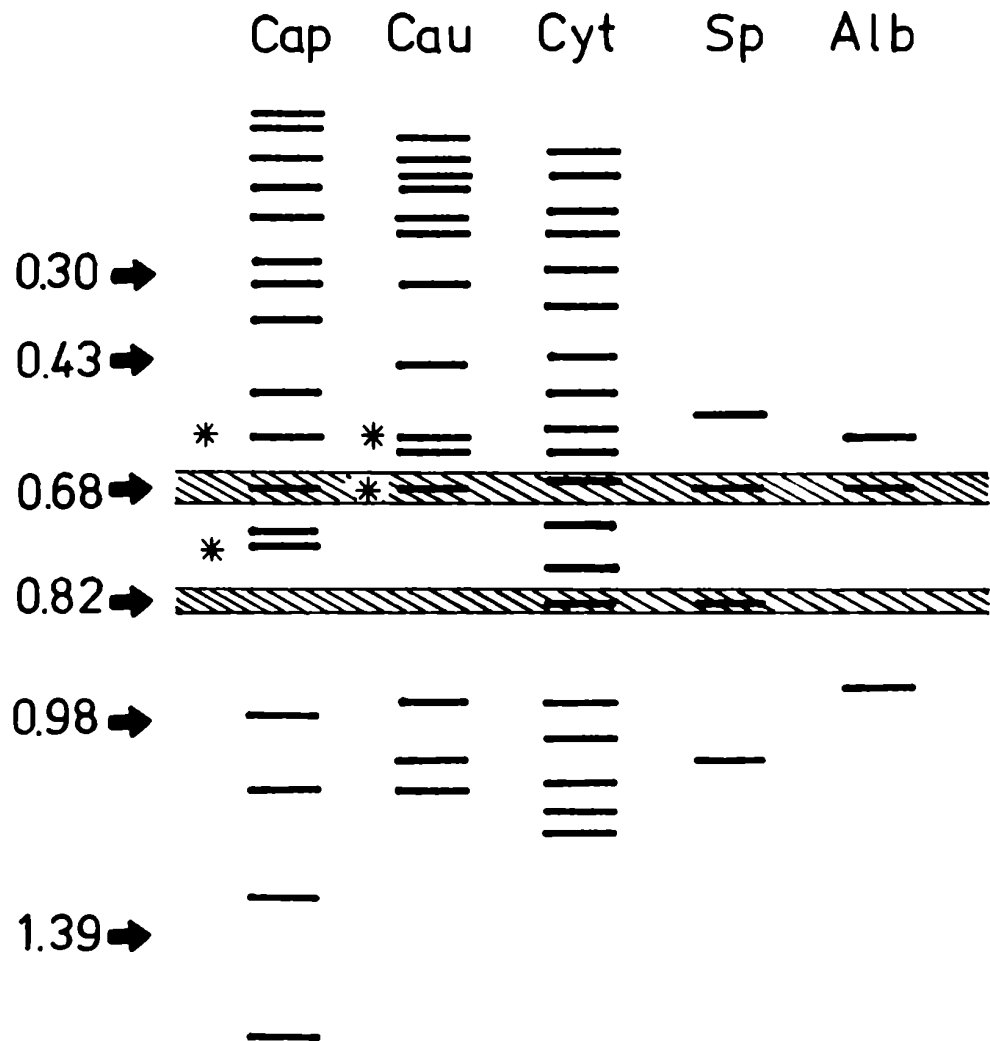


Figura 34 Perfil electroforético de fluidos tisulares y proteínas asociadas a espermatozoides. Esquema de tinción con azul Coomassine de las proteínas presentes en el fluido tubular del Caput (CAP),Cauda (CAU) y citosol (CYT) (de todas las zonas) epididimario. Las proteínas asociadas a la cubierta del espermatozoide (Sp) del Cauda epididimario fueron obtenidos por tratamiento de los mismos con Cl Na 0,6 M. Los asteriscos corresponden a las bandas mayoritarias. La zona rayada correlaciona aquellas proteínas presentes en el espermatozoide y en alguno de los fluidos estudiados Las flechas indican las zonas donde se ubican las proteínas inducidas en cultivo.

R_A 1,39 vida media aproximada : 1 hora; R_A 0,98 : 1 hora; R_A 0,82 : 2 horas; R_A 0,68 : 5 horas; R_A 0,30 : 2 horas.

Cuando se somete a electroforesis al citosol de túbulo cultivados se puede detectar en este extracto celular la presencia de proteínas (por tinción) cuyos R_f coinciden con las que el tejido sintetiza activamente en cultivo. Aunque minimizadas por la existencia de un alto número de proteínas constituyentes en el citosol, alguna de las primeras se convierten en constituyentes importantes de los fluidos secretados.

El análisis de los fluidos tubulares del CAUDA y CAPUT epididimario presentan como se observa en la Fig. 34 la presencia de proteínas que coinciden en parte con las inducidas por andrógenos en el túbulo (R_A 0,32; 0,68 y 1,0). Algunas de éstas pueden ser extraídas del espermatozoide mediante lavados con altas concentraciones de sal (R_A 0,54; 0,67; 0,82 y 1,0).

III.4 Discusión.

La aproximación al esclarecimiento del mecanismo de acción de los andrógenos en el epidídimo humano fue hecha mediante la caracterización de su metabolismo y captación "in vitro" (de LARMINAT - 1980) y la postulación de receptores específicos (MENON).

Los resultados aquí expuestos revelan que ese proceso de captación y metabolismo es mantenido en condiciones que podrían asemejarse a las fisiológicas. Esta conversión de la testosterona tiene como objetivo en los animales de experimentación la obtención del compuesto

capaz de estimular más eficientemente al órgano, la 5α DHT.

La existencia de un mecanismo de efectiva retención de compuestos 5α reducidos de la testosterona se evidencia al estudiar la proporción entre ambos, producto y sustrato, dentro y fuera de la célula. Mientras la testosterona representa el 60 % de la radioactividad del medio a las 3 horas de incubación sus metabolitos activos 5α DHT y la mezcla $5\alpha 3\alpha$ y 3β dióles conforman el 30 % de los compuestos analizados. Esta relación se invierte totalmente dentro del tejido y aún más cuando analizamos los compuestos unidos a macromoléculas solubles.

En el mecanismo por el cual los andrógenos estimulan los diversos parámetros estudiados en el epidídimo humano participan activamente receptores hormonales solubles (TEZON y col. - 1981) con características similares a los descritos en la rata (BLAQUIER - 1971). Esto se ve confirmado en estos resultados por varias líneas de evidencias:

- Unión específica por parte de macromoléculas del citosol del metabolito considerado como de mayor actividad biológica la 5α DHT. El complejo y aún no esclarecido proceso de " activación " del receptor " citoplasmático " depende de la unión de ligandos de estructura espacial bien definida (LIAO - 1973) y entre los fisiológicamente activos es la 5α DHT la que más efectivamente induce la transformación del complejo.
- La translocación al núcleo como producto de la activación es también observable en este modelo. La concentración nuclear de la hormona específicamente unida se produce simultáneamente con la disminución de del complejo en el citosol.

- La alta afinidad en la interacción con ligandos específicos y la prolongada retención con probables sitios aceptores nucleares, aquí observada, son características constantes de los receptores para muchas hormonas esteroideas.
- La inhibición por antiandrógenos de la captación citoplasmática y nuclear de la hormona revela la participación de receptores en ambos procesos.

El bloqueo del efecto estimulador de los andrógenos por el Acetato de Cyproterona muestra que la interferencia en la unión de hormona por su receptor conduce a la formación de un complejo inactivo.

El nivel en el cual el complejo receptor-antiandrógeno se desconecta del proceso normal de estimulación no puede inferirse de estos resultados y será aclarado en el capítulo IV de este trabajo.

Las respuestas a los andrógenos en los diversos parámetros estudiados son similares a las demostradas en túbulos epididimarios de rata estudiados bajo las mismas condiciones (BLAQUIER - 1973, 1974, 1975). Así, el mecanismo de acción de la hormona en animales de experimentación puede ser extrapolado hacia el hombre con pocas diferencias.

Del mismo modo que en la rata la síntesis proteica en los túbulos presenta una fase " lag " de 48 horas antes de una estimulación franca como respuesta a los andrógenos. La activación por parte de los andrógenos de parte de la maquinaria biosintética involucrada, como la formación de polirribosomas funcionales (BLAQUIER - 1975) puede explicar en parte estos hechos.

Es importante destacar que la concentración mínima de testosterona y 5α DHT a la cual se obtiene máxima estimulación es de 0,1 μ M.

La determinación de andrógenos tisulares en el epidídimo humano por PURVIS y col. (1978) revela un contenido de 46 ng/g y 12,7 ng/g de los mismos andrógenos resultando en una concentración muy aproximada de 0,25 uM para la suma de ambos lo que hablaría de una respuesta " in vitro " dentro de los patrones fisiológicos de estimulación.

Salvo en el caso de la reducción irreversible de la testosterona sus metabolitos son interconvertibles entre sí. Este hecho no permite la adjudicación de roles específicos para cada uno de los andrógenos de la serie. La comparación de la testosterona, la 5 α DHT, y el 5 α , 3 α , diol no muestra la existencia de diferencias en la estimulación de la síntesis proteica. Sin embargo la capacidad de la 5 α DHT es significativamente diferente de los demás en su capacidad de estimular la síntesis del DNA. Esta capacidad mitogénica por excelencia de la DHT ya había sido resaltada en varios modelos experimentales (GORDON), (MAINWARING - 1977) y explica entre otros efectos por ejemplo: la agenesia de los genitales externos en el síndrome de testículo feminizante con ausencia de 5 α reductasa y niveles normales de testosterona.

Las características bifásicas en el tiempo de la inducción de la síntesis de DNA por andrógenos refleja los resultados expuestos para el epidídimo en regeneración en la rata (II.4.7). Aunque los resultados sobre regulación del número de sitios receptores no son extrapolables a la luz de estos resultados si se observa, como en el modelo " in vivo ", que la inducción de la mitosis tiene un límite o mecanismo de retroalimentación intrínseco del órgano. Como en el animal vivo ven para este modelo " in vitro " las mismas consideraciones para explicar la presencia de una fase " lag ".

La concentración activa por parte del receptor de la 5α DHT en los núcleos del tejido efector y la actividad mitogénica de la misma habla de una relación entre los dos procesos. Del mismo modo la variación del contenido de receptor nuclear con el aumento de proliferación celular confirman la estrecha dependencia encontrada en el animal de experimentación " in vivo ".

El bloqueo de la estimulación androgénica de la síntesis del DNA por antiandrógenos en el epidídimo humano en cultivo confirma la participación activa del complejo receptor-hormona en este proceso. El efecto de los antiandrógenos no se limita al proceso de división celular, muy probablemente la disminución en la síntesis proteica involucre un bloqueo en los mecanismos de transcripción del DNA o interferencias en el procesamiento posterior de las proteínas sintetizadas (MAINWARING - 1980) (a). Así también la reabsorción activa de agua que debe jugar un rol importante en la mantención del volumen celular es sensible a los antiandrógenos en experiencias " in vivo " (WONG).

Estos hechos demuestran una participación directa del complejo receptor-hormona a distintos niveles en un proceso integrado de estimulación de la célula efectora. El establecimiento de las condiciones de óptima respuesta a los andrógenos de este sistema abrió las posibilidades de estudio sobre los factores inducidos por los mismos que pudieran actuar específicamente en la maduración de espermatozoides.

La inducción por andrógenos de proteínas específicas epididimarias parece jugar un rol preponderante en el proceso de maduración del espermatozoide. Aunque no ha sido posible encontrar reacción inmunológica cruzada entre las especies ya caracterizadas en animales de experimentación y el espermatozoide humano, el modelo propuesto puede ser extrapolado de las mismas al hombre. En este trabajo se muestran

las primeras evidencias para la validación de esta hipótesis.

La inducción de la síntesis de determinadas proteínas por andrógenos en magnitudes superiores a la estimulación generalizada ha sido demostrada en un sistema de variables controladas. El bloqueo de esta estimulación específica por el agregado simultáneo de antiandrógenos confirma por un lado la especificidad hormonal y la participación del receptor citosoluble ya descrito en el mecanismo de respuesta.

Aún considerando la variabilidad entre experimentos la constante aparición de estas proteínas estimuladas refuerza su importancia como parámetro de la respuesta hormonal. La corta vida media de algunas de estas proteínas en el tejido puede ser el resultado de la degradación, juntamente con una activa secreción al medio (no analizado), la presencia de bandas constituyentes importantes en los fluidos con los mismos R_A reforzaría la segunda opción.

La inducción se produce preferencialmente en los segmentos proximales al testículo para las más activamente sintetizadas (R_A 0,82; 0,67 y 0,30). Esta característica, común a las Proteínas Epididimarias Específicas de la rata (KOHANE - 1980) establece zonas de síntesis y secreción distantes de aquellas donde la transición hacia el estado maduro del espermatozoide se hace evidente (HINRICHSEN). Sin embargo no parece ser sólo la secreción de estos componentes por parte del epitelio sino su unión al acrosoma del espermatozoide lo que favorecería la adquisición de capacidad fertilizante en la rata (GONZALEZ ECHEVERRIA y CUASNICU - 1981 comunicación personal). La extracción de estas proteínas del espermatozoide por técnicas no destructivas permiten inferir como en el caso de la rata (KOHANE - 1980, CAMEO - 1981) su asociación con las membranas externas de esta célula. Entre las post-albúminas

del epididímo humano con R_A de 0,68 y 0,82 extraídas de los espermatozoides, la primera coincide con la movilidad electroforética de la proteína andrógeno-dependiente de mayor síntesis, que, presente en el citosol del órgano es uno de los componentes mayoritarios del fluido del CAUDA epididimario. Esta suma de características la convierten en un intermediario con promisorias posibilidades de estar involucrado en el proceso de maduración epididimaria del espermatozoide.

Aunque sin duda parte de un complejo sistema (y hasta incluso sólo una fracción del total de proteínas epididimarias involucradas) esta proteína o grupo de proteínas cumplirían con los postulados del mecanismo propuesto en la rata (KOHANE - 1980) y conejo (ORGEBIN CRIST - 1975) para la maduración del espermatozoide.

IV. ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ACCION DE ANTIANDROGENOS EN EL
EPIDIDIMO DE RATA.

IV.1 Introducción.

La capacidad de ciertos compuestos de inhibir la estimulación hormonal de andrógenos y estrógenos fue establecida antes del total esclarecimiento del mecanismo de acción de estos últimos.

En el caso particular que nos ocupa los antagonistas aunque denominados con el término genérico de antiandrógenos pueden dividirse en dos grupos: los de estructura esteroidea como el Acetato de Cyproterona, el BOMT, y el SKF 7690 o los derivados de la FLUTAMIDA como el SCH 16423 o el RU 23908 (ver Fig. 35).

Considerándolos exclusivamente desde el punto de vista de antagonistas estos compuestos actúan a distintos niveles. Ya sea las estructuras nerviosas relacionadas con el control gonadotrófico (NEUMANN), (RAYNAUD - 1979) o los órganos efectores de andrógenos (RAYNAUD - 1977, 1979; ORGEBIN CRIST - 1975 (b), 1977) todos los tejidos sensibles a su administración presentan el mismo mecanismo de respuesta hormonal ya descrito y es justamente sobre éste donde se pone de manifiesto el efecto antagónico de los antiandrógenos.

Experimentos " in vivo " muestran que la retención (FANG y LIAO - 1969) de hormona radioactiva en núcleos de próstata y epidídimo (TINDALL - 1974) es bloqueada por la administración simultánea de antiandrógenos. La capacidad de estos compuestos de competir con la hormona por los sitios de unión en el receptor citoplasmático explicaría en parte su mecanismo de acción. El complejo ligando-receptor citoplasmático sufre una serie de modificaciones que conducen a la " activación " del mismo para su posterior translocación. Este proceso estudiado desde varios puntos de vista presenta variables que deben ser ajustadas en experiencias " in vitro ".

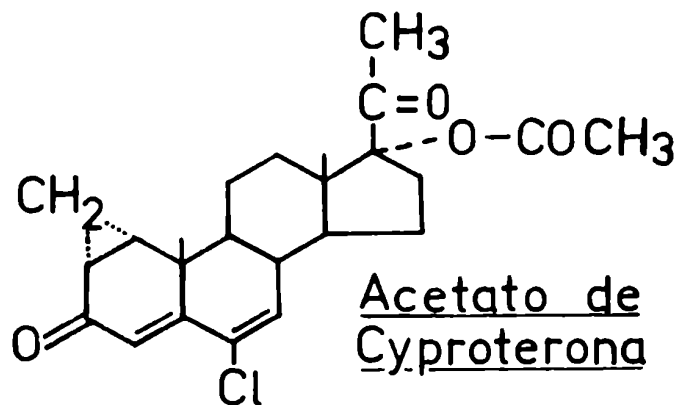
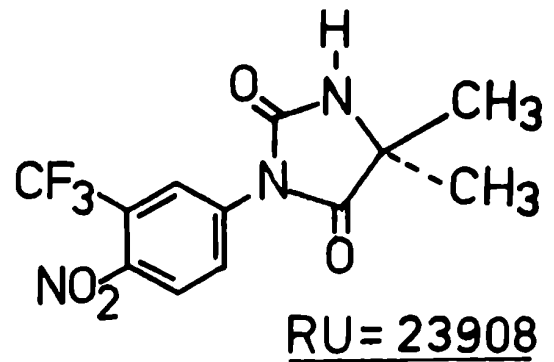
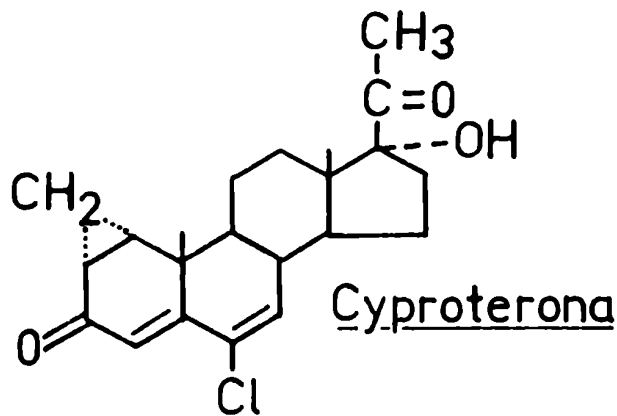
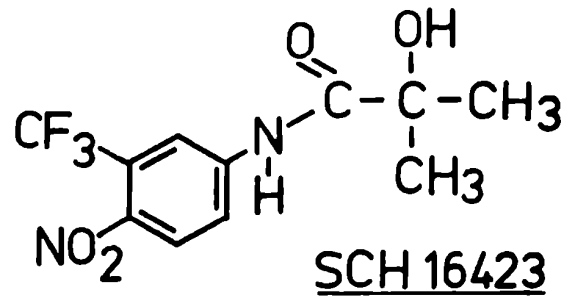
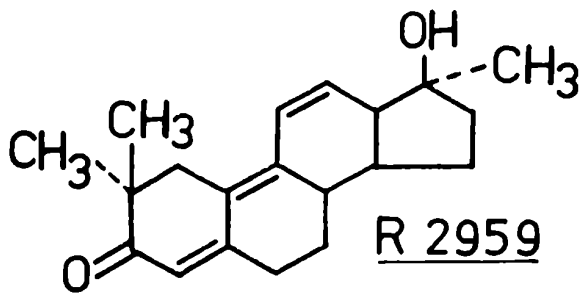
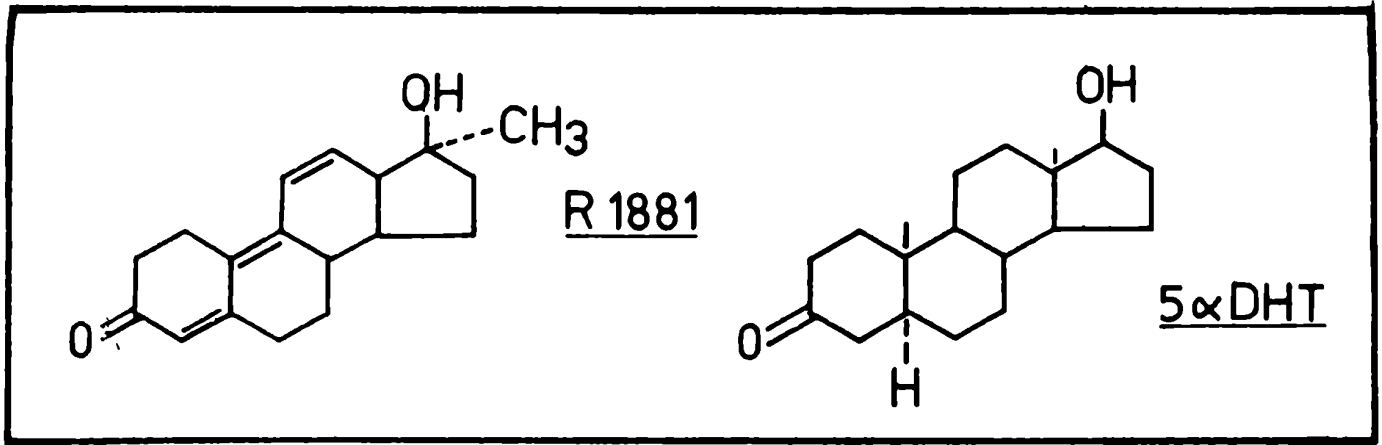


Figura 35 Estructura química de los andrógenos (recuadro) y familia de antiandrógenos más comúnmente usados.

El tipo de LIGANDO que une el receptor parece condicionar la eficiencia de las subsiguientes etapas y de la totalidad del proceso.

La mayoría de los receptores para esteroides requiere de la unión de la hormona para su activación. Sólo una unión estable a lo largo de todo el proceso garantiza la efectiva transformación del complejo (FANG - 1971), (LIAO - 1973), (BAILLY - 1977). La sustitución de grupos funcionales en la estructura básica de la hormona altera la interacción de ésta con el sitio activo del receptor obteniéndose complejos de variada vida media. La potencia androgénica de los esteroides fisiológicos está en relación directa a la estabilidad del complejo formado con el receptor. El complejo así formado está sujeto a una serie de transformaciones no del todo esclarecidas.

Si bien la TEMPERATURA es destacada por todos los autores como un factor general de activación, diversos autores (BAILLY - 1980), (NOTIDES - 1978) sólo le asignan un efecto catalítico.

La intervención de INHIBIDORES de bajo peso molecular ha sido postulada por varios autores (NOTIDES - 1975), (BAILLY - 1978) pero su naturaleza y mecanismo de acción aún no han sido esclarecidos.

Es conocido por otro lado la capacidad activadora de soluciones de alta FUERZA IÓNICA postulándose que de este modo la disociación del receptor de los posibles inhibidores, ya citados, acelera el proceso de transformación.

La existencia de PROTEOLISIS específica del receptor conduciendo a una estructura modificada ha sido postulada por PUCA y col. (1972) como un mecanismo posible de activación. Según estos autores la forma " nativa " 8 S del receptor para estradiol sólo encontrado a baja fuerza iónica representaría un agregado de la forma fisiológica de 5 a 3 S, disociada a mayores concentraciones de sal. Los factores

transformantes poseerán mayor afinidad por esta última forma y el producto de su activación es indistinguible del receptor extraído del núcleo (CHAMMES - 1972), (GREENE - 1977).

El resultado de todas estas interacciones es un cambio en la interacción del complejo hormona-receptor con distintas matrices artificiales, efecto que podría relacionarse con variaciones en la afinidad por distintas estructuras celulares. La disminución con la activación de la retención de receptor "nativo" para estradiol por Heparina inmovilizada (MOLINARI - 1977) va acompañada de una mayor adsorción o matrices aniónicas (MUNCK - 1979) hecho que podría relacionarse con una asociación más estable a componentes nucleares.

Los trabajos de MUNCK y FOLEY prueban que las mismas entidades, "nativas" y "activadas", con distinta actividad nucleofílica pueden ser extraídas en condiciones fisiológicas no pareciendo ser el resultado de un artefacto de técnica.

Como ha sido demostrado para los andrógenos en la próstata y los estrógenos en el útero la formación del receptor nuclear como producto de la translocación del citoplasmático es específico y dosis dependiente para cada hormona (VAN DOORN - 1976, CLARK - 1976, SUTHERLAND - 1977) y la efectividad de la respuesta hormonal es, como ha sido explicado anteriormente (I.3.6) proporcional su tiempo de retención dentro del núcleo.

Los experimentos de CLARK y col. (1973, 1974) en útero de rata y SUTHERLAND y col. (1977) en oviducto de pollo muestran que los anti-estrógenos se unen al receptor de estrógenos formando un complejo estable que es translocado al núcleo donde es retenido por los aceptores nucleares. Estos autores postulan que el reciclado del receptor juega un rol clave en la regulación de una respuesta constante. Este paso

está específicamente influenciado por los antiandrógenos que unidos al receptor previenen su disociación del material aceptor nuclear bloqueando su reciclado (ver Fig. 3B A).

Aunque mucho se conoce sobre los efectos biológicos de los antiandrógenos es poco y no del todo claro lo que se conoce acerca de su mecanismo de acción (ICHII - 1980), (BRUCHOVSKY - 1980), (NERI - 1977), (MAINWARING - 1977 (b)). Del mismo modo que ciertos esteroides sintéticos pueden emular y hasta superar la potencia androgénica de la 5 α DHT debido a la formación de un complejo mucho más estable, la interacción de los sitios de unión con moléculas de antiandrógenos parecerían conducir a la formación de complejos inactivos. La cantidad de antiandrógenos que es necesario inyectar para bloquear la estimulación hormonal semeja la relación de concentraciones usada en los ensayos " in vitro " de competición por la unión al receptor (RAYNAUD y col. 1977, 1979) reforzando los postulados de LIAO (1973) en el sentido de que una unión de alta afinidad es necesaria para la estimulación mediada por el receptor.

Dado que no existen antiandrógenos radioactivos de alta actividad específica no ha sido posible hasta el momento dilucidar cual de los pasos posteriores a la formación del complejo es la específicamente bloqueada por estos antagonistas.

El objeto de la parte final de este trabajo fue estudiar el efecto de los antiandrógenos sobre la distribución subcelular del receptor para andrógenos como método para explicar el mecanismo de la acción antagonista de los primeros.

IV.2 Materiales y Métodos.

Ratas Wistar machos adultos fueron ligadas en sus conductos eferentes al epidídimo y luego de siete días castradas bilateralmente. Transcurridas 48 horas los animales fueron divididos en diez grupos de cinco e inyectados intraperitonealmente con 0,015 mg DHT sola o en combinación con 0,150; 1,5 o 15 mg de Acetato de Cyproterona o RU 23908 disueltos en 0,4 ml de Etanol : Salina (1:1). Dos grupos controles recibieron los antiandrógenos en cantidades de 15 mg por animal y un tercer grupo solo vehículo. Transcurridos 90 minutos los animales fueron sacrificados y el sector del CAPUT epididimario visiblemente libre de espermatozoides fue usado para la preparación de las fracciones citosólica y nuclear como se detalla en II.3.5.

La cuantificación de sitios receptores por el método de intercambio se llevó a cabo según se indica en II.3.9 y los resultados analizados estadísticamente mediante el método de TUKEY.

IV.3 Resultados.

Como fue demostrado anteriormente (II.4.5) el proceso de translocación nuclear del complejo citoplasmático es saturable luego de una dosis de 15 ug de 5α DHT. Con el objeto de estudiar el efecto de los antiandrógenos sobre este proceso esta dosis mínima, efectiva para máxima translocación, fue inyectada con cantidades crecientes (10 x, 100 x y 1000 x) de Acetato de Cyproterona o RU 23908.

La medición de los niveles de receptor citoplasmático (Fig. 36) muestran un significativo descenso luego de la inyección de la hormona efecto que es revertido con la administración simultánea de Acetato de Cyproterona. Esta tendencia se manifiesta aún a las dosis más bajas de antiandrógeno. El efecto aumenta con la relación Acetato de Cyproterona - 5α DHT hasta obtener diferencias no significativas con los controles a partir de la dosis media usada de 1,5 mg. El Acetato de Cyproterona no parece por sí solo alterar los niveles de receptor citoplasmático a las dosis en que bloquea el efecto de la hormona. Del mismo modo la inyección simultánea del antiandrógeno no esteroideo RU 23908 inhibe la disminución en los niveles de receptor provocado por la DHT en un proceso dosis dependiente no alterando los niveles cuando se lo inyecta solo (Fig. 36).

Existen diferencias significativas en los efectos citados entre los dos antiandrógenos a las dosis comparables siendo el Acetato de Cyproterona más potente antagonista que el antiandrógeno no esteroideo. Este menor efecto del RU 23908 permite encontrar un antagonismo dependiente de la dosis para las cantidades inyectadas.

El análisis del contenido de receptor nuclear en aquellos lotes donde la retención citoplasmática del receptor por efecto de los antiandrógenos era máxima reveló una correspondencia estrecha entre las dos especies (ver Fig. 37).

El aumento del 120 % en el número de receptores nucleares luego de la inyección de la hormona fue no detectable en aquellos animales que recibieron cualquiera de los antiandrógenos conjuntamente con la 5 α DHT.

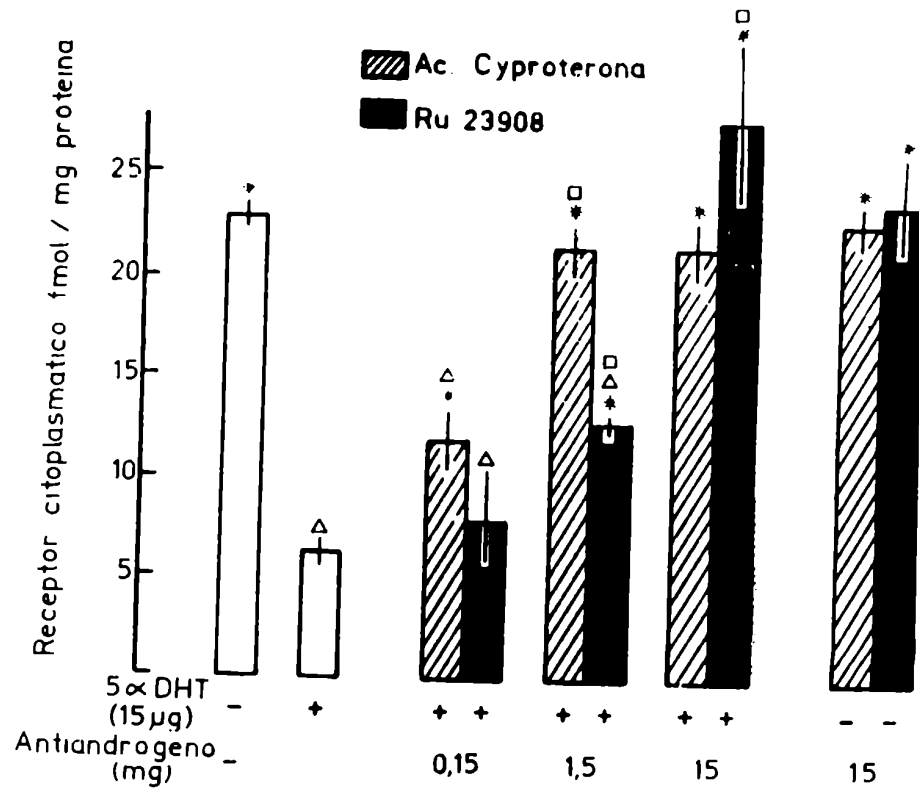


Figura 36 Influencia de los antiandrógenos sobre la depleción de receptor citoplasmático luego de la administración de 5α DHT

Ratas castradas por 2 días fueron inyectadas con vehículo (-) o con 15 ug de 5α DHT (+) 90 min. antes de ser sacrificadas. Los antiandrógenos Acetato de Cyproterona o RU 23908 fueron administrados simultáneamente a dosis entre 0,15 y 15 mg. Los sitios de unión fueron estimados como se detalla en la fig 9. Los resultados corresponden al promedio \pm ES de tres determinaciones independientes .

- * P < 0,01 con respecto al lote inyectado con 5α DHT
- Δ P < 0,01 con respecto al lote control
- P < 0,01 con respecto al lote inyectado con la dosis menor del mismo antiandrógeno.

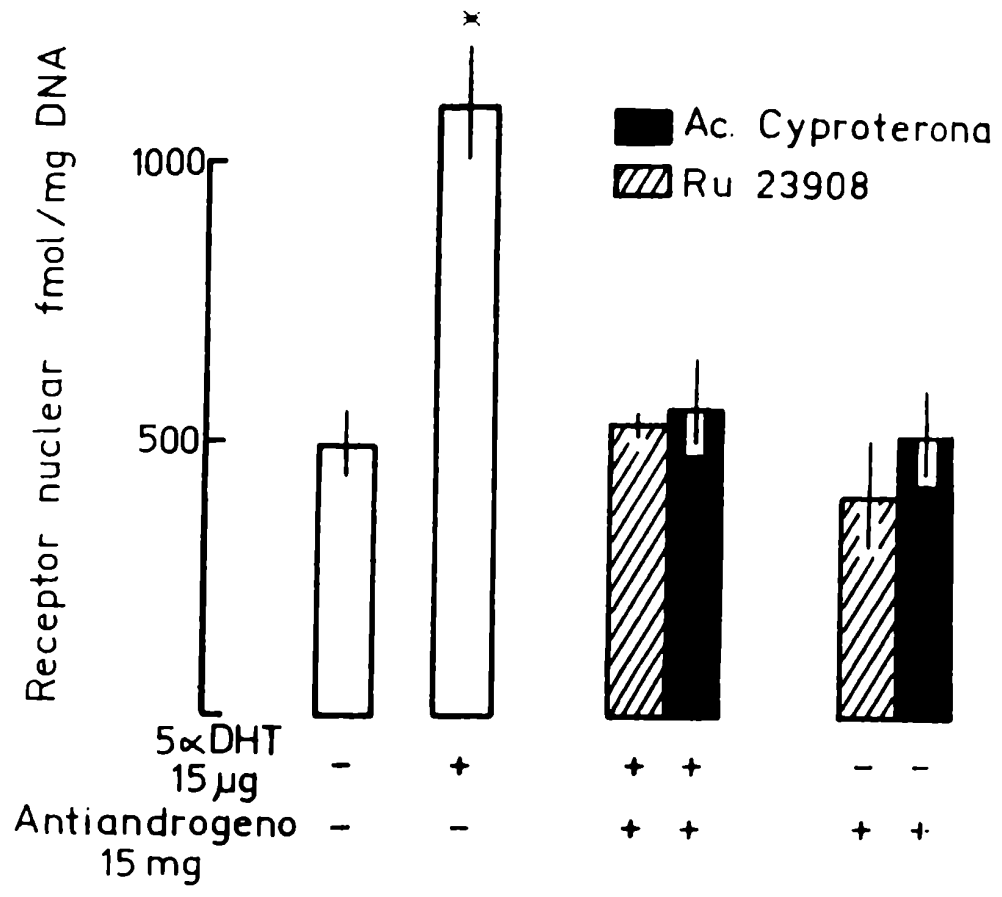


Figura 37 Efecto de los antiandrógenos sobre el aumento de receptor nuclear producido por la inyección de 5α DHT. La concentración intranuclear de receptor de andrógenos fue determinada mediante la técnica detallada en las figuras 5 y 9 en los lotes de animales descritos en la figura 36.

* P < 0,01 con respecto al lote control.

IV.4 Discusión.

La unión de la hormona por el receptor lleva a la formación de complejos de prolongada vida media. Esta fuente de interacción es ternice - receptor surge de un " englobamiento " de la molécula de la hormona por la proteína quedando el sitio de unión encerrado muy dentro del complejo (LIAO - 1976). A diferencia de las enzimas que metabolizan andrógenos o las proteínas transportadoras del plasma cu yos sitios activos o de unión reconocen uno solo de los planos de la molécula de la hormona, el receptor como lo demuestran los elegantes trabajos de CASTAÑEDA y LIAO, rodearía de tal modo al ligando que este no podría interaccionar con el medio. Esta internalización de la hormona dentro de la molécula receptora daría cuenta de las altas constantes de afinidad de estos últimos por sus ligandos (del orden 1 a 0,1 nM) y las bajas velocidades de disociación ($T_{\frac{1}{2}}$ DHT 0 °C = 36 horas) encontradas por WILSON y FRENCH. Estos mismos autores mediante estudios de equilibrio de disociación muestran un cambio positivo de entropía resultante de la interacción entre la 5 α DHT y su receptor en epidídimo. Este aumento en el grado de libertad del complejo podría ser debido a la pérdida de interacciones con moléculas del solvente al cerrarse sobre el sitio de unión o a relajaciones locales de la estructura cuaternaria de la proteína.

La hormona " encerrada " " modela " desde dentro mismo de la proteína su estructura cuaternaria, modulando la capacidad de información del receptor, propiedad inherente al mismo.

Los antiandrógenos compiten efectivamente con los andrógenos por su sitio de unión del receptor en sus formas citosólica y nuclear " in vitro ". Las extrapolaciones de estas a las condiciones " in vivo " no son simples, sin embargo como ha sido citado las cantidades de antiandrógeno que es necesario inyectar para bloquear la estimulación hormonal y las concentraciones necesarias para inhibir la unión de hormona a sus receptores "in vitro" (RAYNAUD - 1977 - 1979) refuerzan la hipótesis que los antiandrógenos producen complejos inactivos con el receptor en los experimentos " in vivo ".

La necesidad de ligandos específicos para la activación " in vitro " del receptor para su siguiente translocación al núcleo fue claramente demostrado por LIAO (1973). Aunque los antiandrógenos muestran una franca inhibición de la captación nuclear de hormona radioactiva en núcleos de próstata y epidídimo (LIAO - 1973, TINDALL - 1974), la presencia de complejos receptor-antiandrógenos dentro del núcleo no puede ser descartada y la interferencia con el mecanismo de translocación normal del mismo no pudo ser esclarecida.

Los resultados del presente trabajo muestran claramente que la interacción del receptor con la molécula de antiandrógeno causa su retención en el compartimento citoplasmático y por lo tanto la disminución en la captación nuclear de hormona antes citadas se debe a un bloqueo del mecanismo de translocación del complejo formado.

Es importante recalcar que la potencia de los antiandrógenos inyectados para inhibir las respuestas biológicas inducidas por andrógenos superan su eficacia como inhibidores competitivos de la unión de la hormona a sus receptores " in vitro ". En los experimentos aquí mostrados un exceso de 100 veces de Acetato de Cyproterona inhiben el 45 % de la unión de andrógenos " in vitro " (Fig. 5) mientras que inyectado

inhiben el 90 % de la translocación nuclear de receptor mediada por andrógenos (Fig. 36). Para el RU 23908 las proporciones fueron del 23 % de inhibición " in vitro " y 69 % " in vivo ". Estos hechos demuestran que un entorno fisiológico refuerza los mecanismos postulados para la interacción Hormona-Receptor en experimentos " in vitro " y validan las consideraciones iniciales hechas por LIAO sobre el mecanismo de acción de antiandrógenos " in vivo ".

Los requerimientos estructurales para una interacción con el sitio activo son cumplidos por los antiandrógenos usados. La separación entre los grupos funcionales en posición 3 y 17 de los andrógenos potentes es similar a la distancia entre grupos de similar polaridad en la molécula de los derivados de la Flutamida, el SCH 16423 y el RU 23908 (ver Fig. 35). Estos compuestos comprometerían en su interacción con el receptor los péptidos de reconocimiento de esos grupos funcionales pero la posibilidad de torsión de la molécula de ligando conduciría a la formación de un complejo inactivo.

Por otro lado la adición de grupos voluminosos en posiciones claves de la molécula de estructura esteroidea transforma compuestos de actividad androgénica como el R1881 en antiandrógenos como el R2959. Esta sustitución sobre los carbonos 1 y 2 explicaría en parte la actividad antiandrogénica del Acetato de Cyproterona. El plegamiento de las cadenas polipeptídicas sobre las moléculas de antiandrógeno conducirían a una conformación espacial del complejo con diferente afinidad por ciertas estructuras subcelulares o insensible a la transformación enzimática y por lo tanto resistente a la activación.

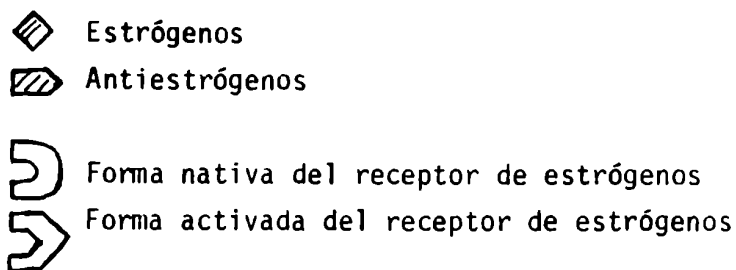
Como fue demostrado en útero de rata (CLARK y col. - 1973, 1974) y oviducto de pollo (SUTHERLAND y col. - 1977) los antiestró-

genos unidos al receptor de estrógenos son retenidos por los sitios aceptores nucleares. El complejo permanece " anclado " a los componentes nucleares deteniendo el reciclado a la forma citosólica y síntesis de nuevas moléculas de receptor (Fig. 38 A). De acuerdo con este mecanismo los antiestrógenos se comportan como fuertes agonistas al comienzo de su efecto y su antagonismo podría caracterizarse como " hiperbólico ".

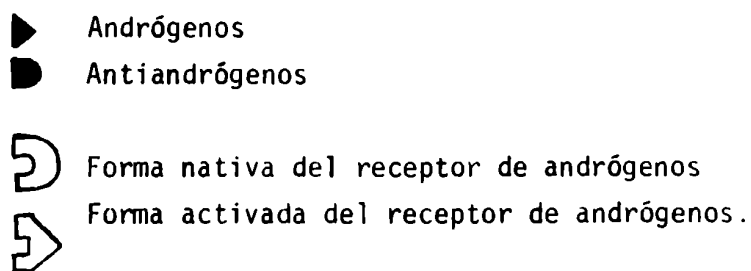
Con la única excepción del riñón de ratón (BULLOCK - 1979) no fue descrita actividad androgénica alguna del Acetato de Cyproterona. Este y otros compuestos relacionados muestran sólo un comportamiento antagonista para con los andrógenos en un amplio rango de concentraciones y diferentes períodos de tiempo de tratamiento (COFFEY - 1969, MAINWARING - 1977, 1980) (a). Estas características están de acuerdo con el mecanismo de acción propuesto en el presente trabajo. Ningún efecto androgénico temprano podría esperarse dado que la translocación y/o retención nuclear es bloqueada desde el comienzo (ver Fig. 38 B).

La regulación hormonal (de LARMINAT y col. - 1978) y la modulación farmacológica (ROBAIRE - 1977, de LARMINAT - 1980) han sido descritas para la 5 α Reductasa epididimaria y la andrógeno-dependencia de la actividad del receptor hormonal surge de las conclusiones del presente trabajo, a la luz de estos últimos resultados la translocación del receptor podrían conformar el tercer paso dentro del mecanismo de acción de andrógenos sujeto a regulación en el epidídimo.

Figura 38 Panel A Esquema del mecanismo de acción generalmente aceptado para los antiestrógenos.



Panel B Mecanismo propuesto en base a los resultados experimentales del presente trabajo para el mecanismo de acción de antiandrógenos.



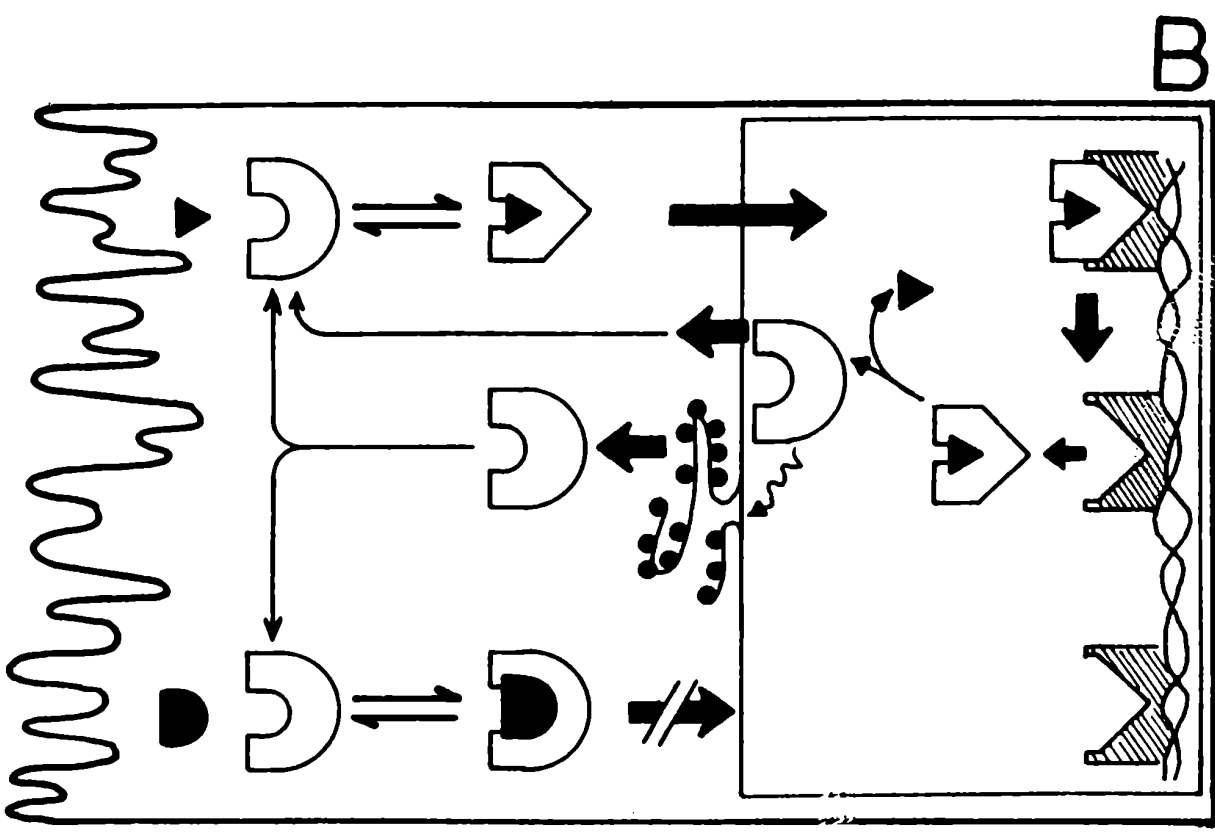
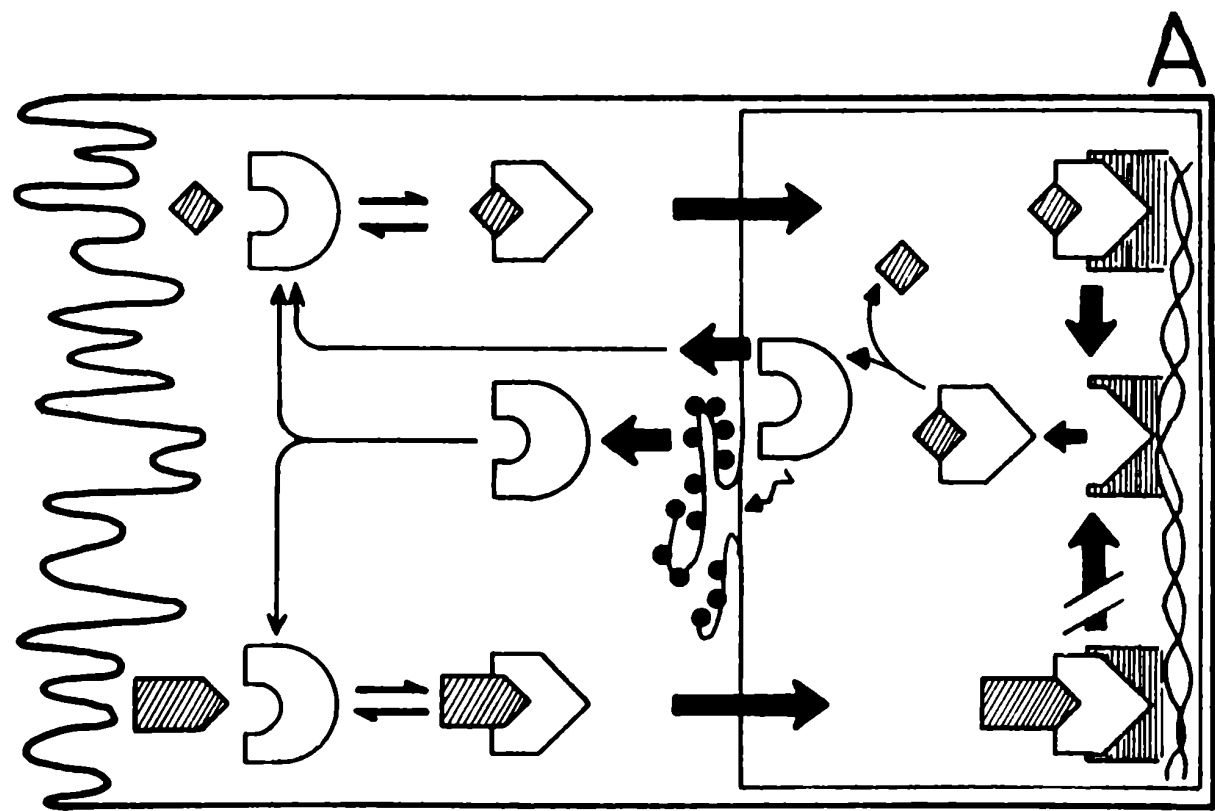


FIGURA 38

V. CONCLUSIONES.

Los receptores androgénicos en el epidídimo de la rata son claramente andrógeno-dependientes. Su compartimentalización dentro de la célula es afectada por períodos de castración cortos. La prolongación de este tratamiento disminuye significativamente la cantidad de sitios totales (técnica de intercambio " in vitro ") en el citosol y núcleos lleva a la no detección de las formas nativas 8S y nuclear 4S (técnica de marcación " in vivo "). Una variación en los parámetros de unión se observa así mismo, en el primer caso.

La provisión de andrógenos afecta del mismo modo ambos aspectos: la distribución subcelular y concentración neta de receptores.

La translocación nuclear del receptor citoplasmático es un proceso dosis dependiente saturable luego de una inyección de 0,015 mg de 5 α DHT evidenciándose un solo tipo de sitios nucleares extraíbles. La disminución correspondiente de sitios receptores citoplasmáticos no es total y pone en evidencia la presencia de dos poblaciones de sitios en este compartimento, con distintas afinidades por el ligando y capacidad de translocación.

La terapia con andrógenos restablece totalmente los niveles de Receptor nuclear y parcialmente los del citoplasmático. El aumento antecede al pico de proliferación celular, por lo que es el contenido neto por célula a Receptor el que aumenta debido a una síntesis neta.

El Receptor citoplasmático translocable, de configuración 8S y de $K_D = 2,8 \times 10^{-9}$ M es el más susceptible de regulación hormonal, mientras que el sitio de unión no translocable de $K_D = 0,68 \times 10^{-9}$ M

responde a los andrógenos sólo luego de una reinducción segura del anterior.

El epidídimo humano en cultivo de órgano es capaz de responder al agregado de andrógenos en el medio en las siguientes formas:

- Capta y metaboliza activamente la testosterona a compuestos 5α DHT y la mezcla de 5α $3\alpha, \beta$ androstandioles.
- La 5α DHT se une a un receptor macromolecular de alta afinidad en el citoplasma celular y el complejo se transloca al núcleo donde es retenido por espacio de varias horas. Este proceso es inhibido por antagonistas como el Acetato de Cyproterona.
- Los andrógenos activan la síntesis proteica en un proceso gradual y dependiente de la dosis.
- La síntesis de DNA y por consiguiente la replicación celular son estimulados por el agregado de hormona, especialmente por la 5α DHT en un proceso aparentemente autorregulado en el tiempo.
- Ambos procesos conjuntamente con la hipertrofia celular provocada por la testosterona son bloqueados por el agregado simultáneo de Acetato de Cyproterona evidenciando la participación del Receptor androgénico en esta serie de estimulaciones.

El epidídimo humano sintetiza en respuesta a los andrógenos agregados doce proteínas inducción que es bloqueada por el Acetato de Cyproterona para seis de las mismas.

Estas proteínas son sintetizadas más activamente por los segmentos proximales al testículo siendo secretadas al lumen.

La interacción de al menos dos de ellas con los espermatozoides permite considerarlas como involucradas en el proceso de maduración que los mismos sufren dentro del epidídimo.

En experiencias llevadas a cabo en ratas castradas se estableció el mecanismo de acción de los antiandrógenos de naturaleza esteroidea y no esteroidea. El Acetato de Cyproterona y los derivados de la Flutamida compiten con la hormona por la unión al sitio receptor formando un complejo incapaz de sufrir los procesos de activación para su posterior translocación nuclear.

El antagonismo estudiado sobre este último parámetro, es más efectivo que sobre la inhibición de la unión de hormona hecho que evidencia la necesidad de un entorno químico fisiológico para la adecuada modulación farmacológica del Receptor.

REFERENCIAS

- 1.- Aafjes, J.H.; Vreeburg, J.Th.M.: Distribution of 5 α -dihidrotestosterone in the epididymis of bull and boar, and its concentration in rat epididymis after ligation of eferent testicular ducts, castration and unilateral gonadectomy. J.Endocr., 1972, 53, 85.-
- 2.- Ahmed, J.: Studies on nuclear phospho proteins of rat ventral prostate. Incorporation of ³²P from (γ ³²P) ATP. Biochim.Biophys.Acta, 1971, 38, 243.-
- 3.- Alumot, E.; Lensky, Y.; Schlinder, H.: Separation of protein in the epididymal fluid of the ram. J.Reprod.Fertil., 1971, 25, 349.-
- 4.- Allen, J.M.; Slater, J.J.: A chemical and histochemical study of acid phosphatase in the epididymis of normal castrate and hormone replaced castrated mice. Anat.Rec., 1959, 130, 731.-
- 5.- Amman, R.P.; Killian, G.Y.; Benton, A.: Differences in the electrophoretic characteristics of bovine rete testis fluid and plasma from the cauda epididymis. J.Reprod.Fertil., 1973, 35, 321.-
- 6.- Andre, J.; Rochefort, H.: Specific effect of oestrogens on an interaction between the uterine estradiol-receptor and DNA. FEBS Lett., 1973, 29, 135.-
- 7.- Aonuma, S.; Moyumi, T.; Noguchi, T.; Iwai, M.; Okabe, M.: Studies on sperm capacitation the relationship between a guinea pig coating antigen and a sperm capacitation phenomenon. J.Reprod.Fertil., 1973, 35, 425.-
- 8.- Atger, M.: Studies on the entry of oestrogens into uterine cells. J.Steroid Biochem., 1974, 5, 342.-
- 9.- Bahkoo, H.S.; Katzenellenbogen, B.S.: Progesterone modulation of estrogen-stimulated uterine biosynthetic events and estrogen receptors levels. Moll.Cell.Endocr., 1977, 8, 121.-

- 10.- Bailly, A.; Atger, M.; Lefèvre, B., Savouret, J.F.; Milgrom, E.: Activation of steroid-receptor complexes. In: Pharmacological modulation of steroid action. Ed. by E.Genazzani, F.Di Carlo and W.Ian. P.Mainwaring, Raven Press, 1980, pág. 181.-
- 11.- Bailly, A.; Sallas, N.; Milgrom, E.: A low molecular inhibitor of steroid receptor activation. J.biol.Chem., 1977, 252, 858.-
- 12.- Bailly, A., Savouret, J.F.; Sallas, N.; Milgrom, E.: Factors modifying the equilibrium between activated and non activated forms of steroid receptor complexes. Eur.J.Biochem., 1978, 88, 623.-
- 13.- Bardin C.W.; Allison, J.E.; Stanley, A.J.; Brumbreck, L.G.: Secretion of testosterone by pseudohermaphrodite rat. Endocrinology, 1969, 84, 435.-
- 14.- Barrack, E.R.; Coffey, D.S.: The specific binding of estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissue. J.biol.Chem., 1980, 255, 7265.-
- 15.- Barrack, E.R.; Hawkins, E.F.; Allen, S.L., Hicks, L.L.; Coffey, D. S.: Concepts related to salt resistant estradiol receptors in rat uterine nuclei: nuclear matrix. Biochem.Biophys.Res.Comm., 1977, 79, 829.-
- 16.- Baulieu, E.E., Atger, M.; Best-Belpomme, M.; Corvol, P., Courvalin, J.C., Mester, J.; Milgrom, E., Robel, P.; Rochefort, H.; de Câte-logne, D.: Steroid Hormone Receptors. Vit.Horm., 1975, 33, 649.-
- 17.- Baulieu, E.E.; Jung, I.: A prostatic cytosol receptor.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 1970, 38, 549.
- 18.- Bedford, J.M.: Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. Nature (Lond.), 1963, 200, 1178.-
- 19.- Bedford, J.M.: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. J.exp.Zool., 1966, 163, 319.-

- 20.- Bedford, J.M.: Effects of the ducts ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. J.exp.Zool., 1967, 166, 271.-
- 21.- Bedford, J.M.: Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. In: Handbook of Physiology (American Physiological Society), Section 7: Endocrinology, 1975, Vol. V, pág. 303.-
- 22.- Bedford, J.M.; Calvin, H.; Cooper, G.W.: The maturation of spermatozoa in the human epididymis. J.Reprod.Fertil., 1973, Suppl. 18, 199.-
- 23.- Belonoschkin, B.: Biologie der spermatozoen in menschlichen Hoden und Nebenhoden. Arch.Gynaek., 1942, 174, 357.-
- 24.- Berezney, R.; Coffey, D.S.: Nuclear protein matrix: Association with newly synthesized DNA. Science (N.Y.), 1975, 189, 291.-
- 25.- Berthold, A.A.:
Arch.Anat.Physiol.Wiss.Med., 1849, 16, 42.-
- 26.- Blandau, R.J.; Rumery, E.: The relationship between swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity. Fertil.Steril., 1964, 15, 571.-
- 27.- Blaquier, J.: Selective uptake and metabolism of androgens by rat epididymis the presence of a cytoplasmic receptor. Biochem. Biophys.Res.Comm., 1971, 45, 1076.-
- 28.- Blaquier, J.: An in vitro action of androgens on protein synthesis by epididymal tubules maintained in organ culture. Biochem. Biophys.Res.Comm., 1973, 52, 1177.-
- 29.- Blaquier, J.A.; Breger, D.: The in vitro effects of androgens on RNA synthesis by cultured rat epididymal tubules. Endocr.Res. Comm., 1974, 1, 247.-

- 30.- Blaquier, J.A.; Breger, D.; Cameo, M.; Calandra, R.: The activation of cultured epididymal tubules by androgens. *J.Steroid. Biochem.*, 1975, 6, 573.-
- 31.- Blaquier, J.A.; Calandra, R.S.: Intranuclear receptor for androgens in rat epididymis. *Endocrinology*, 1973, 93, 41.-
- 32.- Blaquier, J.A., Cameo, M.S.; Burgos, M.H.: The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea pig. *Endocrinology*, 1972, 90, 839.-
- 33.- Blondeau, J.P.; Corpéchet, C., Le Goascogne, C., Baulieu, E.E.; Robel, P.: Androgen Receptors in the rat ventral prostate and their hormonal control. *Vit.Horm.*, 1975, 33 319.-
- 34.- Bonne, C.; Raynaud, J.P.: Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R 1881). *Steroids*, 1976, 27, 497.-
- 35.- Brachett, B.G.; Aliphant, G.: Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol.Reprod.*, 1975, 12, 260.-
- 36.- Brooks, D.E.: Biochemical environment of sperm maturation. In: 'The spermatozoon. Ed. by D.N.Fawcett and M.Bedford. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 1979, pág. 23.-
- 37.- Bruchovsky, N.: Molecular action of androgens and antiandrogens. In: Androgenization in women. Lecture and discussions of a Symposium. Ed. by J.Hammerstein, U.Sachnit-Fixson, F.Neuman; G. Plewing. Excerpta Medica, Amsterdam, 1980, pág. 7.-
- 38.- Bruchovsky, N.; Rennie, P.; Vanson, A.: Studies on the regulation of the concentration of androgens and androgen receptor in nuclei of prostatic cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1975, 394, 248.-
- 39.- Bruchovsky, N.; Wilson, J.D.: The conversion of testosterone to 5 -androstane-17 -ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *J.biol.Chem.*, 1968, 243, 2012.-

- 40.- Bueno M.P.; Scacciati, J.M.; Mancini, R.E.; Vilar, O.: Immunohistochemical localization of four seminal plasma glycopeptide antigens in human spermatozoa. *Int.J.Fertil.*, 1979, 24, 164.-
- 41.- Bullock, L.P.; Bardin, C.W.: Factors regulating the androgenic action of progestins in mouse kidney. In: *Symposium on Steroid receptor systems*. Ed. by W.W.Seairt. Plenum Press, New York, 1979, pág. 281.-
- 42.- Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deosiribonucleic acid. *Biochem.J.*, 1956, 62, 315.-
- 43.- Calandra, R.S.; Blaquier, J.A.; del Castillo, E.J.; Riverola, M.A.: Androgen dependency of the androgen receptor in rat epididymis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1975, 67, 97.-
- 44.- Calandra, R.S.; Purvis, K.; Attramedal, A.; Hansson, V.: Androgen receptors in the rat epididymis do not disappear after castration. *J.Steroid Biochem.*, 1977, 8, 1205.-
- 45.- Calvin, H.; Bedford, J.M.: Formation of disulphide bonds in the nucleus and accesory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J.Reprod.Fertil.*, 1971, Suppl. 13, 65.-
- 46.- Cameo, M.S.; Blaquier, J.A.; Burgos, M.H.: The androgen dependence of the process of sperm maturation in the guinea pig. *Acta physiol. latinoam.*, 1971, 21, 254.-
- 47.- Cameo, M.S.; Blaquier, J.A.: Androgen controlled specific proteins in rat epididymis. *J.Endocr.*, 1976, 69, 47.-
- 48.- Cameo, M.S.; González Echeverría, M.F.; Blaquier, J.A.: Localización ultraestructural de proteínas específicas epididimarias (PEE) sobre los espermatozoides de la rata. *Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Comunicaciones presentadas a la XXVI Reunión Científica, Mar del Plata, 7-10 de Noviembre de 1981, Abstr. 135.-*

- 49.- Castañeda, M.; Liao, S.: Assay of cellular steroid receptors using steroids antibodies. *Meth.Enzymol.*, 1974, 36, 52.-
- 50.- Cavazos, L.F.: Effects of testosterone propionate on histochemical reaction of epithelium of rat ductus epididymidis. *Anat.Rec.*, 1958, 132, 209.-
- 51.- Cidlowski, J.A.; Mildoon, T.G.: The dynamics of intracellular estrogen receptor regulation as influenced by 17β -estradiol. *Biol. Reprod.*, 1978, 18, 234.-
- 52.- Clark, J.H.; Anderson, J.N.; Peck, E.J.(Jr.): Estrogen receptor anti-estrogen complex: Atypical binding by uterine nuclei and effects on uterine growth. *Steroids*, 1973, 22, 707.-
- 53.- Clark, J.H.; Anderson, J.N.; Peck, E.J.(Jr.): Oestrogen receptors and antagonism of steroid hormone action. *Nature (Lond.)*, 1974, 251, 446.-
- 54.- Clark, J.H.; Hardin, J.W.; Eriksson, H.; Upchurch, S.; Peck, E.J.: Heterogeneity of oestrogen binding site in the rat uterus. In: *Ontogeny of receptors and reproductive hormone action*. Ed. by T.H.Hamilton, J.Clark and W.A.Sadeer, Raven Press, New York, 1979, pág. 65.-
- 55.- Clark, J.H.; Peck, E.J.(Jr.): Nuclear retention of receptor-oestrogen complex and nuclear acceptor sites. *Nature (Lond.)*, 1976, 260, 635.-
- 56.- Clark, J.H.; Peck, E.J.(Jr.); Hardin, J.; Eriksson, H.: The biology and pharmacology of estrogen receptor binding relation to uterine growth. In: *Receptors and hormone action*. Ed. by B. O'Malley and L.Birnbaumer. Academic Press Inc., New York, 1978, pág. 1.-

- 57.- Coffey, D.S.; Shimazaki, J.; Williams Aahman, H.G.: Polymerization of deoxiribonucleotides in relation to androgen-induced prostatic growth. Arch.Biochem.Biophys., 1968, 124, 184.-
- 58.- Condeelis, J.; Findlay, J.: Influence of gonadectomy, sex hormones and other factors on the activities of certain glycosidases in the rat and mouse. J.Endocr., 1959, 18, 132.-
- 59.- Cooper, T.G.; Waites, G.M.H.: Factors affecting the entry of testosterone into the lumen of the cauda epididymis of the anesthetized rat. J.Reprod.Fertil., 1979, 56, 165.-
- 60.- Chamnes, G.C.; Mc Guire, W.L.: Estrogen receptor in the rat uterus: physiological forms and artifacts. Biochemistry, 1972, 11, 2466.-
- 61.- Charreau, E.H.; Baldi, A.: Binding of estradiol-receptor complexes to isolated. Breast Chromatine. Moll. Cell Biochem., 1976, 26, 37.-
- 62.- Danzo, B.J.; Orgebin Crist, M.C.; Toft, D.O.: Characterization of a cytoplasmic receptor for 5 α -dihydrotestosterone in the caput epididymis of intact rabbits. Endocrinology, 1975, 92, 310.-
- 63.- David, K.; Dingemause, E.; Freund, J.; Laqueur, E.: Uber Krystallinisches mannliches hormon aus hoden (testosteron) wirksamer auf aus harn oder aus cholesterin bereitetes androsteron. Hoppe-Seylers.Z.physiol.Chem., 1935, 233, 281.-
- 64.- Davies, P.; Thomas, P.; Gils, M.G.; Boonjawat, J.; Griffiths, K.: Regulation of transcription of the prostate genome by androgens. J.Steroid Biochem., 1979, 11, 351.-
- 65.- Dawson, R.M.; Mann, T.; White, I.G.: Glicerophosphonylcholine in semen and its relation to choline. Biochem.J., 1957, 65, 627.-
- 66.- Djøseland, O.; Høglo, S.; Abyholm, T.: Androgen metabolism in rat epididymis. IRCS Med.Sci., 1980, 8, 502.-

- 67.- Dyson, A.L.M.B.; Orgebin-Crist, M.-C.: Effect of Hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology*, 1973, 93, 391.-
- 68.- Edwards, R.G.; Ferguson, L.C.; Combs, R.R.A.: Blood groups antigens on human spermatozoa. *J.Reprod.Fertil.*, 1964, 7, 153.-
- 69.- Eng, L.A., Oliphant, G.: Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol.Reprod.*, 1978, 19, 1083.-
- 70.- Eriksson, H.; Upchurch, S.; Hardin, J.W.; Peck, E.J.; Clark, J.H.: Heterogenicity of estrogen receptors in the cytosol and nuclear fraction of the rat uterus. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1978, 81, 1-7.-
- 71.- Fain-Maurel, M.A.; Dadoune, J.P.; Alfonsi, M.F.: High resolution autoradiography of newly formed proteins in the epididymis after incorporation of tritiated aminoacids. *Arch.Andrology*, 1981, 6, 249.-
- 72.- Fang, S.; Anderson, K.M.; Liao, S.: Receptor proteins for androgens on the role of specific proteins in the retention of 17 β hydroxy, 5 α androstane-3-one by the rat ventral prostate in vivo and in vitro. *J.biol.Chem.*, 1969, 244, 6584.-
- 73.- Fang, S.; Liao, S.: Androgen receptors-steroid and tissue-specific retention of 17 β hydroxy-5 α -androstane-3-one protein complex by the cell nuclei of ventral prostate. *J.biol.Chem.*, 1971, 246, 16.-
- 74.- Faucett, D.W.; Hoffer, A.D.: Failure of exogenous androgen to prevent regression of the initial segments of the rat epididymis after efferent duct ligation or castration. *Biol.Reprod.*, 1979, 20, 162.-
- 75.- Fell, H.G.; Dingle, J.T.: Studies on the mode of action of excess of vitamin A lysosomal protease and the degradation of cartilage matrix. *Biochem.J.*, 1963, 87, 403.-

- 76.- Filipenko, J.D.; Rennie, P.S.; Bruchovsky, N.: The androgenic regulation of superhelical-DNA-nicking closing enzyme in rat ventral prostate. *Biochem.J.*, 1981, 196, 195.-
- 77.- Flechon, J.E.: Sperm glycoproteins of the boar, bull rabbit and Ram I acrosomal glycoproteins. *Gamete Res.*, 1979, 2, 43.-
- 78.- Flechon, J.E.: Sperm glycoproteins of the boar bull rabbit and Ram II Surface glycoproteins and their acidic groups. *Gamete Res.*, 1979, 2, 53.-
- 79.- Fournier, S.: Répartition de l'acide sialique dans l'appareil genital du rat Wistar adult normal castré. *C.R.Soc.Biol.*, Paris, 1966, 160, 1087.-
- 80.- Fournier, D.A.; Bayard, F.; Boulard, C.: Contribution à l'étude de la maturation du sperme. Etude d'une protéine acide de l'épididyme chez le rat. Dépendance androgène relation avec l'acide sialique. *C.R.Soc.Biol.*, Paris, 1973, 167, 1989.-
- 81.- Garberi, J.C.; Kohane, A.C.; Cameo, M.S.; Blaquier, J.A.: Isolation and characterization of specific rat epididymal protein. *Moll. Cell.Endocr.*, 1979, 13, 73.-
- 82.- Ganjam, V.K.; Amann, R.P.: Testosterone and dihydrotestosterone concentration in the fluid milieu of spermatozoa in the reproductive tract of the bull. *Acta Endocr.*, 1973, 74, 186.-
- 83.- Ganjan, V.K.; Amann, R.P.: Steroids in fluids and sperm entering and leaving bovine epidymis epididymal tissue and accessory sex gland secretions. *Endocrinology*, 1976, 99, 1618.-
- 84.- Giorgi, E.P.: Studies on androgen transport into canine prostate in vitro. *J.Endocr.*, 1976, 68, 109.-
- 85.- Giorgi, E.P.; Shirley, I.M.; Grant, J.K.; Stewart, J.C.: Androgens dynamics in vitro in the human prostate gland. Effect of cyproterone and cyproterone acetate. *Biochem.J.*, 1973, 132, 465.-

- 86.- Godeau, F.; Schorderet-Slatkine, S.; Hubert, P.; Baulieu, E.E.: Induction of maturation of Xenopus laevis oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A.*, 1978, 75, 2353.-
- 87.- González Echeverría, M.F.; Cuasnicú, P.; Blaquier, J.A.: Identification of androgen dependent glycoproteins in the Hamster epididymis and their association with spermatozoa. *J.Reprod.Fertil.*, 1981(en prensa).-
- 88.- Gordon, J.; Smith, J.A.; King, R.J.B.: Metabolism and binding of androgens by Mouse mammary tumor cells in culture. *Moll.Cell. Endocr.*, 1974, 1, 259.-
- 89.- Gorski, J.; Gannon, F.: Current models of steroid action a critique. *A.Rev.Physiol.*, 1976, 38, 425.-
- 90.- Greene, G.L.; Closs, L.E.; Fleming, H.; De Sombre, E.R.; Jensen, E.V.: Antibodies of oestrogen receptor. Immunochemical similarity of estrophilin form various mammalian species. *Proc.natn. Acad.Sci.U.S.A.*, 1977, 74, 3481.-
- 91.- Greenstein, B.J.: Androgen receptors in the rat brain, anterior pituitary gland and ventral prostate. Effects of orchidectomy and ageing. *J.Endocr.*, 1979, 81, 75.-
- 92.- Gurpide, E.; Teeng, L.: Estrogens in normal human endometriun. In: Receptors and mechanism of action of steroid hormones. Ed.by J.Pasqualini. M.Deker Inc., New York, 1976, pág. 135.-
- 93.- Hamilton, D.: Structure and function of the epithelium lining the ductuli eferentes, ductus epididymis and ductus deferens. In: Handbook of Physiology (American Pheyiological Society), Section 7: Endocrinology, 1975, Vol. V, pág. 259.-
- 94.- Hanson, V.; Ritzen, E.M.; French, F.S.; Nayfeh, S.: Androgen transport and receptor mechanisms in testes and epididymis. In: Handbook of Physiology (American Physiological Society), Section 7: Endocrinology, 1975, Vol. V, pág. 173.-

- 95.- Harris, M.E.; Barke, A.: Maintenance of rete testis fluid testosterone and dihydrotestosterone levels by pregnenolone and other C21 steroids in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 1975, 96, 1396.-
- 96.- Harrison, R.A.P.: The metabolism of Mammalian spermatozoa. In: *Frontiers in reproduction and fertility control*. Ed. by R.O. Greep and M.Koblinsky, Mit Press, Cambridge, England, 1977, Part 2, pág. 379.-
- 97.- Harrison, R.W.; Failfield, S.; Orth, D.N.: Evidence for glucocorticoid transport into ACT-20/DI cells. *Biochemistry*, 1975, 14, 1304.-
- 98.- Hartree, E.F.; Mann, T.: Plasmalogen in rat semen and its role in sperm metabolism. *Biochem.J.*, 1959, 71, 423.-
- 99.- Heyns, W.; De Moor, P.: Prostate binding protein. A steroid binding protein secreted by rat prostate. *Eur.J.Biochem.*, 1977, 78, 221.-
- 100.- Hinrichsen, M.J.; Blaquier, J.A.: Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J.Reprod.Fertil.*, 1980, 60, 291.-
- 101.- Holstein, A.F.: Morphologische studien am nebenhoden des Menschen. In: *Zeanglose Abhandlung aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatomie*. Ed. by W.Barrmann and W.Doerr. Gorg Thieme Verlag, Stuttgart, 1969, pág. 125.-
- 102.- Horan, A.H.; Bedford, J.M.: Development of fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian Hamster. *J. Reprod. Fertil.*, 1972, 30, 417.-
- 103.- Hoskins, D.; Johnson, H.; Brandt, H.; Scott, T.S.: Evidence for a role for a forward motility protein in the epididymal development of sperm motility. In: *The Spermatozoon*. Ed. by D.W.Fawcett and M.Bedford. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 1979, pág. 43.-

- 104.- Hsu, A.F.; Nankin, A.R.; Troen, P.: Androgen binding protein in human testis effect of age. In: The Testis in Normal and Infertile Man. Ed.by P.Troen and H.R.Nankin. Raven Press, New York, 1977, pág. 421.-
- 105.- Hunt, M.E.; Muldoon, T.G.: Factors controlling estrogen receptor levels in normal mouse mammary tissue. J.steroid Biochem., 1977, 8, 181.-
- 106.- Hunter, A.G.; Hafs, H.G.: Antigenicity and Cross-reactions of bovine spermatozoa. J.Reprod.Fertil., 1964, 7, 357.-
- 107.- Ichii, S.: Changes in the cytoplasmic androgen receptor in the rat ventral prostate after administration of androgens, anti-androgens and anabolic steroids. Endocr.Japon., 1980, 27, 483.-
- 108.- Igboelli, G.; Foote, R.H.: Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. J.Dairy Sci., 1968, 51, 1703.-
- 109.- Jensen, E.V.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stumpf, W.E.; Jungblut, P.W.; De Sombre, E.R.: A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc. natn.Acad.Sci.U.S.A., 1968, 59, 632.-
- 110.- Jensen, E.V., Suzuki, T.; Numata, M.; Smith, S., De Sombre, E.R.: Estrogen-binding substances of target tissues. Steroids, 1969, 13, 417.-
- 111.- Killian, G.J.; Amann, R.P.: Immunophoretic characterization of fluid and sperm entering and leaving the bovine epididymis. Biol.Reprod., 1973, 9, 489.-
- 112.- Klisejco-Stefanowicz, J.; Chin, J.F.; Tsei, Y.; Hnilica, L.S.: Acceptor proteins in rat androgenic tissue chromatin. Proc. nat.Acad.Sci.U.S.A., 1976, 73, 1954.-

- 113.- Koheler, J.K.: Lectins as probes of the spermatozoa surface. Arch. Androl., 1981, 3, 197.-
- 114.- Kohane, A.C.; Cameo, M.S.; Piñeiro, L.; Garberi, J.C.; Blaquier, J.A.: Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. Biol.Reprod., 1970, 23, 181.-
- 115.- Kohane, A.C.; Garberi, J.C.; Cameo, M.S.; Blaquier, J.A.: Quantitative determination of specific proteins in rat epididymis. J. Steroid.Biochem., 1979, 11, 671.-
- 116.- Kohane, A.C.; González Echeverría, M.F.; Piñeiro, L.; Blaquier, J.A.: Interaction of protein of epididymal origin with spermatozoa. Biol.Reprod., 1980, 23, 737.-
- 117.- Kohane, A.C.; Piñeiro, L.; Blaquier, J.A.: Androgen controlled Synthesis of specific proteins in the rat epididymis. 1981. Enviado para su publicación.-
- 118.- Koskismies, A.; Kormanio, M.: Proteins in fluids from different segments of the rat epididymis. J.Reprod.Fertil., 1975, 43, 345.-
- 119.- Larminat, M.de; Blaquier, J.A.: Androgen concentration and partial characterization of 5 α reductase in the epididymis of the Rhesus Monkey. Steroids, 1978, 31, 129.-
- 120.- Larminat, M.de; Cuasnicú, P.; Blaquier, J.A.: The in vitro metabolism of androgens in rat epididymis during sexual development. J.Steroid Biochem., 1980, 13, 1207.-
- 121.- Larminat, M.de; Hinrichsen, M.J.; Scorticatti, C.; Ghirlanda, J.M.; Blaquier, J.A.: Uptake and metabolism of androgens by the human epididymis in vitro. J.Reprod.Fertil., 1980, 59, 397.-
- 122.- Larminat, M.de; Monsalve, A.; Charreau, E.H.; Calandra, R.S.; Blaquier, J.A.: Hormonal regulation of 5 α reductase activity in rat epididymis. J.Endocr., 1978, 79, 157.-

- 123.- Lea, O.; Petruz, P.; French, F.: Purification and iodination of acidic epididymal glycoprotein (AEG): a sperm coating protein secreted by the rat epididymis. *Int.J.Androl.*, 1978, Suppl. 2, 1.-
- 124.- Leach, K.L.; Dhamer, M.K.; Hammond, N.D.; Sando, J.J.; Pratt, W.B.: Molybdate inhibition of glucocorticoid inactivation and transformation. *J.biol.Chem.*, 1979, 254, 11884.-
- 125.- Li, T.S.; Macajoux, C.E.; Devanesan, M.; Pelosi, M.; Caterini, H.; Kaminetzky, H.: Purification and characterization of a sperm coating antigen from human seminal plasma. *Fertil.Steril.*, 1976, 27, 702.-
- 126.- Liao, S.; Liang, T.; Fang, S.; Castañeda, E.; Shao, T.C.: Steroid structure in androgenic activity specificities involved in the receptor binding and nuclear retention of various androgens. *J. biol.Chem.*, 1973, 248, 6154.-
- 127.- Liao, S.: Receptors and the mechanism of action of androgens. In: Receptors and mechanism of action of steroid hormones. Ed. by J. Pasqualini, M.Dekker Inc., New York, 1976, pág. 159.-
- 128.- Lison, L.: Estadística aplicada a la biología experimental. EUDEBA, Buenos Aires, 1976.-
- 129.- Lubicz Nawrocky, C.; Glover, T.: The influence of the testis on the survival of spermatozoa in the epididymis of the Golden hamster. *J.Reprod.Fertil.*, 1973, 34, 315.-
- 130.- Lubicz Nawrocky, C.M.: The effect of metabolites of testosterone on the development of fertilizing ability by spermatozoa in the epididymis of castrated Hamster. *J.exp.Zool.*, 1976, 197, 89.-
- 131.- Lowry, O.H.; Clamens, J.A.; Rombrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.: Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. biol.Chem.*, 1951, 193, 265.-

- 132.- Mainwaring, W.I.P.: A soluble androgen receptor in the citoplasm of rat prostate. J.Endocr., 1969, 45, 531.-
- 133.- Mainwaring, W.I.P.: The binding of [1,2-³H] testosterone within nuclei of rat prostate. J.Endocr., 1969, 44, 323.-
- 134.- Mainwaring, W.I.P.: The mechanism of action of androgens. Monographs on Endocrinology. Springer Verlag, New York, 1977, Vol. 10.-
- 135.- Mainwaring, W.I.P.: Modes of action of antiandrogens: A Survey. In: Androgens and antiandrogens. Ed. by L.Martini and M.Motta. Raven Press, New York, 1977, pág. 151.-
- 136.- Mainwaring, W.I.P.: Hormones, growth and DNA replication. In: Progress in clinical and biological research, physio-pathology of endocrine disease and mechanism of hormone action. Ed. by R.J.Soto, A.F.de Nicola and J.A.Blaquier. Alan Liss, New York, 1981.
- 137.- Mainwaring, W.I.P.; Irving, R.A.: The use of DNA cellulose chromatography and isoelectric focusing for the characterization and purification of steroid receptor complexes. Biochem. J., 1974, 144, 413.-
- 138.- Mainwaring, W.I.P.; Irving, R.A.: Different means of hormonal control in cells responsive to metabolites of testosterone. In: Pharmacological Modulation of Steroid Action. Ed. by E. Genezzani et al., Raven Press, New York, 1980, pág. 131.-
- 139.- Mainwaring, W.I.P.; Jones, D.A.: Influence of receptor complexes on the properties of prostate chromatin including its transcription by RNA polymerase. J.Steroid Biochem., 1975, 6, 475.-
- 140.- Mainwaring, W.I.P.; Mangan, F.R.; Peterken, B.M.: Studies on the solubilized ribonucleic acid polymerase from rat ventral prostate gland. Biochem.N., 1971, 123, 619.-

- 141.- Mainwaring, W.I.P.; Mangan, F.R.: The specific binding of steroid receptor complexes to DNA: Evidence from androgen receptors in rat prostate. *Adv.Biosci.*, 1971, 7, 165.-
- 142.- Mainwaring, W.I.P.; Mangan, F.R.: A study of the androgen receptors in a variety of androgen-sensitive tissues. *J.Endocr.*, 1973, 59, 121.-
- 143.- Mainwaring, W.I.P.; Peterken, B.M.: A reconstituted cell free system for the specific transfer of steroid receptors complexes into nuclear chromatin isolated from rat ventral prostate gland. *Biochem.J.*, 1971, 125, 285.-
- 144.- Mainwaring, W.I.P.; Symes, E.K.; Higgins, S.J.: Nuclear components responsible for the retention of steroid receptor complexes especially from the standpoint of specificity of hormonal responses. *Biochem.J.*, 1976, 156, 129.-
- 145.- Majumder, G.C.; Turkington, R.W.: Regulation by testosterone and serum protein of DNA synthesis in the developing epididymis of the rat. *J.Endocr.*, 1976, 70, 105.-
- 146.- Mancini, R.E., Gutiérrez, O.; Fernández Collazo, E.: Immunohistochemical localization of antigens in human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 1971, 22, 475.-
- 147.- Mans, R.J.; Novelli, G.D.: Measurement of the incorporation of radioactive amino-acids into protein by a filter-paper disk method. *Arch.Biochem.Biophys.*, 1961, 94, 48.-
- 148.- Marquiz, N.R.; Firtz, J.B.: Effects of testosterone on the distribution of carnitine acetylcarnitine and carnitine acetyl transferase in tissues of the reproductive system of the male rat. *J.biol.Chem.*, 1965, 240, 2197.-
- 149.- Menon, M.; Tananis, C.E.; Hicks, L.L.; Hawkins, E.F., McLoughlin, M.G.; Walsh, P.C.: Characterization of the binding of a potent synthetic androgen, methyltrienolone, to human tissues. *J.clin. Invest.*, 1978, 61, 150.-

- 150.- Meester, J.; Martell, D.; Psychoyos, A.; Baulieu, E.E.: Hormonal control of oestrogen receptor in uterus and receptivity for ovoimplantation in the rat. *Nature (Lond.)*, 1974, 250, 776.-
- 151.- Milgrom, E.; Atger, M.; Baulieu, E.E.: Progesterone in uterus and plasma. IV. Progesterone receptor(s) in Guinea Pig uterus cytosol. *Steroids*, 1970, 16, 741.-
- 152.- Milgrom, E.; Atger, M.; Baulieu, E.E.: L'entré des dans les cellules uterines: dépende-elle d'une proteine? *C.R.Acad.Sci., Paris*, 1972, 274, 2771.-
- 153.- Milgrom, E.; Thi, L.; Atger, M.; Baulieu, E.E.: Mechanism regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *J.biol.Chem.*, 1973, 248, 6366.-
- 154.- Molinari, A.M.; Medici, N.; Moncharmont, B.; Puca, G.A.: Estradiol receptor of colf uterus interaction with heparimagarose and purification. *Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A.*, 1977, 74, 4886.-
- 155.- Monealve, A.; Balquier, J.A.: Partial characterization of epididymal 5 α reductase in the rat. *Steroids*, 1977, 30, 41.-
- 156.- Moore, R.J.; Wilson, J.D.: Localization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -oxidoreductase in the nuclear membrane of the rat ventral prostate. *J.biol.Chem.*, 1973, 247, 958.-
- 157.- Moore, R.J.; Wilson, J.D.: The effect of androgenic hormones on the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: Δ^4 -3-ketosteroid 5 α -oxidoreductase of rat ventral prostate. *Endocrinology*, 1973, 93, 581.-
- 158.- Morfin, R.F.; Aliapoulios, M.A.; Chamberlain, J.; Ofner, P.: Metabolism of testosterone-4-¹⁴C by the canine prostate and urinary bladder in vivo. *Endocrinology*, 1970, 87, 394.-

- 159.- Muldoon, T.G.: Regulation of steroid hormone receptor activity. *Endocrine Rev.*, 1980, 1, 339.-
- 160.- Munck, A.; Foley, R.: Activation of steroid hormone receptor complexes in intact target cells in physiological conditions. *Nature (Lond.)*, 1979, 278, 753.-
- 161.- Nenci, I., Fabris, G., Marzole, A., Marchetti, E.: Steroids cells interactions revealed by immunological probes and electron microscopy. In: *Pharmacological modulation of steroid action*. Ed. by E.Genazzani, F.Di Carlo and W.I.P.Mainwaring. Raven Press, N.Y., 1980, pág. 99.-
- 162.- Neri, R.O.: Studies on the biology and mechanism of action of monosteroidal antiandrogens. In: *Androgens and Antiandrogens*. Ed. by L.Martini and M.Motte. Raven Press, New York, 1977, pág. 179.-
- 163.- Neutre, M.; Leblond, C.P.: Radio antographic comparison of the uptake of galactose ^3H and glucose ^3H in the Golgi region of various cells secreting proteins or mucopolisacarides. *J. Cell Biol.*, 1966, 30, 137.-
- 164.- Newman, F.; von Berswordt-Walbrabe, R.; Elger, W.; Steinbeck, H.; Malm, J.D.; Kramer, M.: Aspects of androgen-dependent events as studied by anti-androgens. *Recent Prog.Horm.Res.*, 1970, 26, 337.-
- 165.- Nicolson, G.L.; Usui, N.; Yamagimachi, R.; Yamagimachi, H.; Smith, J.R.: Lectin binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa changes in surface receptors during epididymal maturation and after ejaculation. *J.Cell Biol.*, 1977, 74, 950.-
- 166.- Nicolson, G.L.; Yamagimachi, R.: Cell surface changes associated with epididymal maturation of mammalian spermatozoa. In: *The Spermatozoon*. Ed. by D.W.Fawcett and J.Bedford, Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 1979, pág. 187.-

- 167.- Nishigori, H.; Toft, D.: Inhibition of progesterone receptor activation by sodium molybdate. *Biochemistry*, 1980, 19, 77.-
- 168.- Notides, A.: Conformational forms of the estrogen receptors. In: *Receptors and Hormone action*. Ed. by B.O'Malley and L.Birnbaumer, Academic Press, New York, 1978, pág. 33.-
- 169.- Notides, A.C.; Nielsen, S.: A molecular and kinetic analysis of estrogen receptor transformation. *J.Steroid Biochem.*, 1975, 6, 483.-
- 170.- Nozu, K.; Tamaoki, B.: Intranuclear and intermicrosomal distribution of 3-oxo-5 α -steroid NADP Δ^4 oxidoreductase in rat ventral prostate. *Biochem.Biophys.Acta*, 1974, 348, 321.-
- 171.- O'Farrell, P.: High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J.biol.Chem.*, 1975, 10, 4007.-
- 172.- Olson, G.E.; Dauzo, B.J.: Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol.Reprod.*, 1981, 24, 431.-
- 173.- Olson, G.E.; Hamilton, D.W.: Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol.Reprod.*, 1978, 19, 26.-
- 174.- O'Rand, M.G.: Changes in sperm surface properties correlated with capacitation. In: *The Spermatozoon*. Ed. by D.W.Fawcett and J. Bedford. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 1979, pág. 195.-
- 175.- Orgebin-Crist, M.C.: Sperm maturation in the rabbit epididymis. *Nature (Lond.)*, 1967, 216, 816.-
- 176.- Orgebin-Crist, M.C.: Maturation of spermatozoa in the rabbit epididymis effect of castration and testosterone replacement. *J.exp.Zool.*, 1973, 185, 301.-

- 177.- Orgebin-Crist, M.C.; Danzo, B.J.; Davies, J.: Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Handbook of Physiology (American Physiological Society), Section 7: Endocrinology, 1975, Vol. V, pág. 319.-
- 178.- Orgebin-Crist, M.C.; Davies, J.: Functional and morphological effects of hypophysectomy and androgen replacement in the rabbit epididymis. Cell and Tissue Res., 1974, 148, 183.-
- 179.- Orgebin-Crist, M.C.; Jahad, N.; Hoffman, L.H.: Effects of antiandrogens on 5 dihidrotestosterone-induced maturation of epididymal spermatozoa in organ culture. In: Androgens and antiandrogens. Ed. by L.Martini and M.Matta. Raven Press, New York, 1977, p. 105.-
- 180.- Orgebin-Crist, M.C.; Jahad, N.: Delayed cleavage of rabbit ova after fertilization by Young epididymal Spermatozoa. Biol.Reprod., 1977, 16, 358.-
- 181.- Orgebin-Crist, M.C.; Jahad, N.: The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: Inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. Endocrinology, 1978, 103, 46.-
- 182.- Orgebin-Crist, M.C.; Jahad, N.: The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: Stimulation by epididymal cytoplasmic extracts. Biol.Reprod., 1979, 21, 511.-
- 183.- Orgebin-Crist, M.C.; Tichenor, P.: A technique for studying sperm maturation in vitro. Nature (Lond.), 1972, 239, 227.-
- 184.- Ortavant, R.: Existence d'une phases critique dans la maturation epididymaire des spermatozoides des béliet et de Taureau. C.R. Soc.Biol., Paris, 1953, 147, 1552.-
- 185.- Ortiz, E.: The effects of castration on the reproductive system of the golden Hamster. Anat.Rec., 1953, 117, 65.-

- 186.- Pezard, A.: Biologie générale sur la détermination des caractères sexuels secondaires chez les gallinacés. C.R.Acad.Sci., Paris, 1911, 153, 1027.-
- 187.- Pietras, R.J.; Szego, C.M.: Specific binding sites of oestrogens at outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature (Lond.), 1977, 265, 69.-
- 188.- Podestá, E.J.; Calandra, R.S.; Rivarola, M.A.; Blaquier, J.^A: The effect of castration and testosterone replacement on specific proteins and androgen levels of the Rat epididymis. Endocrinology, 1975, 97, 399.-
- 189.- Poulos, A.; Voglmayr, J.K.; White, I.G.: Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. Biochim.Biophys.Acta, 1973, 306, 194.-
- 190.- Puca, G.A.; Nole, E.; Sica, V.; Bregciani, F.: Estrogen binding proteins of calf uterus interrelationship between various forms and identification of a receptor transforming factor. Biochemistry, 1972, 11, 4157.-
- 191.- Pujol, A.; Bayard, F.: Androgen receptors in the rat epididymis and their hormonal control. J.Reprod.Fertil., 1979, 56, 217.-
- 192.- Purvis, K.; Calandra, R.S.; Hansson, V.: Intratesticular transport of androgens. In: Androgens and antiandrogens. Ed. by L.Martini and M.Motta. Raven Press, New York, 1977, pág. 37.-
- 193.- Purvis, K.; Calandra, R.S.; Sander, S. and Hansson, V.: Androgen binding protein and androgen levels in the human testis and epididymis. Int.J.Androl., 1978, 1, 531.-
- 194.- Raynaud, J.P., Azadian-Boulanger, G.; Bonne, C.; Perronnet, J.; Sakiz, E.: Present trends in antiandrogens research. In: Androgens and antiandrogens. Ed. by L.Martini and M.Motta. Raven Press, New York, 1977, 281.-

- 195.- Raynaud, J.B.; Bonne, C.; Bouton, M.M.: Action of a non-steroid antiandrogen RU 23908 in peripheral and central tissues. J. Steroid Biochem., 1979, 11, 99.-
- 196.- Rennie, P.S.: Binding of androgen receptor to prostate chromatin requires intact linker DNA. J.biol.Chem., 1970, 245, 3947.-
- 197.-Risley, P.L.; Skrepetos, S.N.: Cholinesterase distribution in the rat epididymis and vas deferens after castration and sex hormone treatment. Anat.Rec., 1964, 150, 195.-
- 198.- Rivarola, M.^A.; Forest, M.G.; Migeon, C.J.: Testosterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone in plasma during pregnancy and at delivery: Concentration and protein binding. J.clin. Endocr.Metab., 1968, 28, 34.-
- 199.- Robaire, B.; Covey, D.F.; Robinson, C.H.; Ewing, L.L.: Selective inhibition of rat epididymal steroid Δ^4 -5 α -reductase by conjugated allevic 3-oxo-5,10 secosteroids. J.Steroid Biochem., 1977, 8, 307.-
- 200.- Rommerts, F.F.G.; Grootegoed, J.A.; van der Molen, H.T.: Physiological role for androgen binding protein-steroid complex in testis? Steroids, 1976, 28, 43.-
- 201.- Roosen-Rugen, E.C.: The rete testis in the albino rat its structure development and morphological significance. Acta Anat., 1961, 45, 1.-
- 202.- Sar, M.; Liao, S.; Stumpf, W.E.: Nuclear concentrations of androgens in rat seminal vesicles and ventral prostate demonstrated by dry-mount autoradiography. Endocrinology, 1970, 86, 1008.-
- 203.- Sarff, M.; Gorski, J.: Control of estrogen binding protein concentration under basal conditions and after estrogen administration. Biochemistry, 1971, 10, 2557.-

- 204.- Scatchard, G.: The traction of protein for small molecules and ions. Ann.N.Y.Acad.Sci., 1949, 51, 660.-
- 205.- Shain, S.A.; Boesel, R.W.; Axelrod, L.R.: Aging in the rat prostate reduction in detectable ventral prostate androgen receptor content. Arch.Biochem.Biophys., 1975, 167, 247.-
- 206.- Shur, B.J.; Roth, S.: Cell surface glycosyltransferases. Biochem. Biophys.Acta, 1975, 415, 473.-
- 207.- Spelsberg, T.C.; Steggles, A.W.; O'Malley, B.W.: Progesterone binding components in chick oviduct. III. Chromatin acceptor sites. J.biol.Chem., 1971, 246, 4188.-
- 208.- Starling, E.H.: The chemical correlation of the functions of the body. Lancet, 1905, II, 339.-
- 209.- Stumpf, W.; Sar, M.: Autoradiographic localization of estrogen, androgen, progestin and glucocorticosteroid in "target tissues" and "nontarget tissues". In: Receptors and mechanism of action of steroid hormone. Ed. by J.Pasqualini. Dekker, New York, 1976, pág. 41.-
- 210.- Sullivan, J.N.; Strott, C.A.: Evidence for an androgen-independent mechanism regulating the levels of receptors in target tissue. J.biol.Chem., 1973, 248, 3203.-
- 211.- Sutherland, R.; Mester, J.; Baulieu, E.E.: Hormonal regulation of sex steroid receptor concentration and subcellular regulation. INSEER Proceedings, Sept. 1976, Vol. 1. Ed. by J.Dumont and J. Núñez, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1977, pág. 831.-
- 212.- Tezon, J.G.; Cuasnicú, P.S.; Scorticatti, C.; Blaquier, J.A.: Development and characterization of a model system for the study of epididymal physiology in man. In: Physiopathology of hypophysial disturbances and diseases of reproduction. Ed. by A.F.de Nicola, and J.A.Blaquier, Alan Liss Inc., New York, 1982.

- 213.- Thieulant, M.L.; Pelletier, J.: Evidence for androgen and estrogen receptors in castrated ram pituitary cytosol influence of time after castration. *J.Steroid Biochem.*, 1979, 10, 677.-
- 214.- Tindall, D.J.; Hansson, V.; Mc Lean, W.S.; Ritzén, E.M.; Nayfeh, S.J.; French, F.S.: Androgen binding protein in rat epididymis: properties of a cytoplasmic receptor for androgens similar to the receptor in the rat prostate and different from androgen binding protein (ABP). *Moll.Cell Endocr.*, 1975, 3, 83.-
- 215.- Tindall, D.J.; Hansson, V.; Stumpf, W.E.; Sar, M.; Nayfeh, S.N.; French, F.S.: Further studies on the accumulation and binding of androgen in rat epididymis. *Endocrinology*, 1974, 95, 1119.-
- 216.- Toft, D.O.; O'Malley, B.W.: Target tissue receptors for progesterone: the influence of estrogen treatment. *Endocrinology*, 1972, 90, 1041.-
- 217.- Tongkao, D.; Chubavatnatol., M.: Phosphorylation of microtubules of rat spermatozoa during epididymal maturation. In: *The spermatozoon*. Ed. by D.W.Fawcett and M.Bedford. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 1979, pág. 129.-
- 218.- Treter, K.J.; Attramadal, A.: Selective uptake of radioactivity in rat ventral prostate following administration of testosterone 1,2-³H. *Acta Endocr.*, 1968, 59, 218.-
- 219.- Van Doorn, E.; Craven, S.; Bruchovsky, N.: The relationship between androgen receptors and the hormonally controlled responses of rat ventral prostate. *Biochem.J.*, 1976, 160, 11.-
- 220.- Velluz, L.; Nomine, G.; Bucourt, R.; Mathieu, J.:
C.R.Acad.Sci., Paris, 1963, 257, 569.-

- 221.- Vigersky, R.A., Loriaux, D.L., Howards, S.S.; Hodgen, G.B.; Lipssett, M.B.; Chrambach, A.: Androgen binding proteins of testis, epididymis, and plasma in man and monkey. J.clin.Invest., 1976, 58, 1061.-
- 222.- White, I.G.; Hudson, B.: The testosterone and dehidro epiandrosterone concentration in fluids of the mammalian male reproductive tract. J.Endocr., 1968, 41, 291.-
- 223.- Wilson, N.J.; Ahmed, K.: Enzymic characteristics and effects of testosterone treatment on nucleolar an chromatin associated histone phosphokinase activity of rat ventral prostate. Exp. Cell Res., 1977, 106, 157.-
- 224.- Wilson, E.M.; French, F.: Binding properties of androgens receptors. J.biol.Chem., 1976, 251, 5620.-
- 225.- Williams, D.; Gorski, J.: Kinetic and equilibrium analysis of estradiol in uterus a model of binding-site distribution in uterine cells. Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A., 1972, 69, 3469.-
- 226.- Williams, D., Gorski, J.: Equilibrium binding of uterine cell suspensions and shole uteri in vitro. Biochemistry, 1974, 13, 5537.-
- 227.- Wong, P.Y.D.; Au, C.L.; Ngai, H.K.: Some characteristics of salt and water transport in the rat epididymis. In: The spermatozoon. Ed. by D.N.Fawcett and M.Bedford. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, 1979, pág. 57.-
- 228.- Young, D.H.: Surgical tratment of male infertility. J.Reprod. Fertil., 1970, 23, 541.-
- 229.- Young, W.C.: A study of the function of the epididymis. III. Functional changes undergone by spermatozoe during their passage through the epididymis and was deferens in the guinea pig. J. exp.Biol., 1931, 8, 151.-

230.- Young, L.; Goodman, S.A.: Characterization of human sperm cell surface components. *Biol.Reprod.*, 1980, 23, 826.-