

## Tesis de Posgrado

# Regulación hormonal del metabolismo de poliaminas en tejidos testicular y epididimario

De Las Heras, Marcelo Antonio

1989

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

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

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

**Cita tipo APA:**

De Las Heras, Marcelo Antonio. (1989). Regulación hormonal del metabolismo de poliaminas en tejidos testicular y epididimario. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2258\\_DeLasHeras.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2258_DeLasHeras.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

De Las Heras, Marcelo Antonio. "Regulación hormonal del metabolismo de poliaminas en tejidos testicular y epididimario". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2258\\_DeLasHeras.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2258_DeLasHeras.pdf)

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS  
EN TEJIDOS TESTICULAR Y EPIDIDIMARIO

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Químicas

Autor: Lic. Marcelo Antonio de las Heras

Director: Dr. Ricardo Saúl Calandra

- 2.258 -  
Ej: 2.

El presente trabajo de Tesis ha sido realizado en el Instituto de Biología y Medicina Experimental, Vuelta de Obligado 2490, Buenos Aires.

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Calandra, por su dirección, su estímulo, y por haberme otorgado la libertad de pensamiento necesaria para iniciar mi formación en la investigación científica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme otorgado las Becas de Iniciación, Perfeccionamiento y Formación Superior que me permitieron realizar esta Tesis.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental, por haberme permitido disponer de todos los elementos que posibilitaron el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Eduardo H. Charreau, por haber despertado en mí el interés y la responsabilidad por la investigación científica. Por su excelente disposición y sus consejos.

A la Dra. Isabel A. Luthy, por su dedicación y su paciencia durante mi iniciación en el trabajo experimental.

A la Dra. Mónica N. Ritta, por su inestimable ayuda en la discusión de planes y resultados, y en la redacción del presente trabajo.

A los Dres. Carlos Levy, Israel Algranati y Angel Cataldi, por su asesoramiento para la determinación de actividad ODC y poliaminas.

A la Dra. María O. Suescun, por su colaboración en la determinación de andrógenos epididimarios.

Al Dr. Pablo Scacchi, por la determinación de hormonas proteicas.

Al Dr. Horacio Romeo y Laboratorios Elea, por su colaboración para la obtención de animales hipofisectomizados.

Al Dr. Ernesto Podestá, por su colaboración en la determinación de la actividad biológica de LH, y a la Dra. Graciela Fernández Alonso, por el examen morfométrico de los tejidos.

A la Sra. Diana Bas, por su excelente apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio, Dra. Monica Ritta, Dra. Isabel Luthy, Dra. Olga Suescun, Lic. Silvia González, Lic. Beatriz Campos, Lic. Laura Altschuler, Lic. Debora Tasat y Sra. Diana Bas, por haber contribuido al placer de la tarea cotidiana.

Al personal del Instituto de Biología y Medicina Experimental, por su eficiente colaboración, y por la cordialidad del trato diario.

A mi familia y a mis amigos, por todo lo que no podría expresar.

### Abreviaturas utilizadas

ABP	proteína ligadora de andrógenos
AC	acetato de ciproterona, 6-cloro-17 $\alpha$ -hidroxi-1,2 $\alpha$ -metilén- 4,6-pregadieno-3,20-diona
ADN	ácido desoxirribonucleico
AE	actividad específica
AMPc	adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
dansilo	p-dimetilamino-naftalenosulfonilo
DAO	diamina oxidasa
DFMO	$\alpha$ -difluormetilornitina
DHT, 5 $\alpha$ -DHT	5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, 5 $\alpha$ -androstano-17 $\beta$ -ol-3-ona
3 $\alpha$ -diol	5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
DS	desviación standard
dSAM	S-adenosil-L-metionina descarboxilada, 5'-deoxi-5'-S-(3-metiltiopropilamino)- sulfoadenosina
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ES	error standard
F	flutamida, 4'-nitro-3'-trifluoroetil- isobutiranilida

FAD	flavina-adenina-dinucleótido
FSH	hormona folículo-estimulante
GABA	ácido gama-aminobutírico
GMPC	guanosina-3',5'-monofosfato cíclico
hCG	gonadotrofina coriónica humana
Km	constante de Michaelis-Menten
LH	hormona luteinizante
LHRH, GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
MAO	monoamina oxidasa
MTA	5'-metiltioadenosina
ODC	ornitina descarboxilasa
PAO	poliamina oxidasa
PRL	prolactina
PRL <sub>o</sub>	prolactina ovina
PT	propionato de testosterona
Pu	putrescina, 2,4-diaminobutano
RIA	radioinmunoensayo
SAM	S-adenosil-L-metionina
SAMDC	S-adenosil-L-metionina descarboxilasa
SAT	acetil CoA:espermidina/espermina-N <sup>1</sup> -acetil transferasa
Sd	espermidina
Sp	espermina
T	testosterona, 4-androsteno-17β-ol-3-ona
TCA	ácido tricloroacético



Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UI	unidades internacionales

## INDICE

CONSIDERACIONES GENERALES.....	1
INTRODUCCION.....	4
I. DESCRIPCION ANATOMICA, HISTOLOGICA Y FUNCIONAL	
DEL TESTICULO Y EL EPIDIDIMO.....	6
El testículo. Su función endócrina y gametogénica.....	6
El epidídimo. Su participación en la maduración de los espermatozoides.....	11
II. BIOQUIMICA DE LAS POLIAMINAS: METABOLISMO, REGULACION Y PARTICIPACION EN LA FUNCION CELULAR.....	20
Síntesis, interconversión y catabolismo de poliaminas....	20
Regulación del metabolismo de poliaminas.....	28
Funciones de las poliaminas.....	34
III. LAS POLIAMINAS EN EL TRACTO GENITAL MASCULINO.....	39
OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.....	45
MATERIALES Y METODOS.....	47
Químicos.....	47
Animales.....	48
Tratamientos.....	48
Preparación de sobrenadantes para las determinaciones enzimáticas.....	49
Tratamiento de los sobrenadantes para la eliminación de los sustratos endógenos.....	50

Aislamiento de túbulos seminíferos y células intersticiales.....	51
Incubación de cortes de epidídimo.....	51
Obtención de espermatozoides epididimarios.....	52
Determinación de la actividad ornitina descarboxilasa....	52
Determinación de la actividad S-adenosil-L-metionina descarboxilasa.....	53
Determinación de putrescina y poliaminas.....	54
Determinación de acetilputrescina y acetilpoliaminas....	56
Determinación de hormonas esteroideas.....	57
Determinación de hormonas proteicas.....	59
Determinación de la bioactividad de LH.....	59
Examen histológico y morfométrico de los tejidos.....	60
Determinación de proteínas.....	60
Análisis estadístico.....	61
I. ACTIVIDAD ORNITINA DESCARBOXILASA COMO MARCADORA	
DE LA ACCION DE LA PROLACTINA EN EL TESTICULO.....	62
INTRODUCCION.....	62
RESULTADOS.....	68
Actividad ornitina descarboxilasa testicular.....	68
Ritmo circadiano de la actividad ODC testicular.....	72
Efecto de la prolactina en ratas intactas.....	72
Efecto de la PRL en ratas hipofisectomizadas.....	80
DISCUSION.....	83

II. REGULACION ANDROGENICA DEL METABOLISMO DE	
POLIAMINAS EN EL EPIDIDIMO.....	90
INTRODUCCION.....	90
RESULTADOS.....	95
1. ACTIVIDAD ORNITINA DESCARBOXILASA.....	95
Descripción de la actividad en el epididimo.....	95
Andrógeno-dependencia.....	98
Efecto de la orquidectomía bilateral.....	98
Efecto de la administración aguda y crónica de	
testosterona en ratas orquidectomizadas.....	102
Efecto del antiandrógeno acetato de ciproterona.....	102
Efecto de la testosterona en diferentes segmentos	
del epidídimo.....	106
Participación del aporte luminal en el mantenimiento	
de la actividad ODC.....	106
Efecto de la testosterona en ratas intactas.....	108
Estimulación de la ODC por testosterona in vitro.....	108
Efecto del antiandrógeno flutamida sobre la actividad	
ODC epididimaria.....	112
Relación entre la actividad ODC epididimaria y el	
trofismo del órgano.....	118
2. ACTIVIDAD S-ADENOSIL-L-METIONINA DESCARBOXILASA.....	126
Descripción de la actividad en el epididimo.....	126
Andrógeno-dependencia.....	130
Efecto de la orquidectomía bilateral.....	130

Efecto de la testosterona en ratas intactas y castradas.....	130
Acción del antiandrógeno flutamida en ratas con reemplazo androgénico.....	135
Actividad SAMDC en ratas hemiorquidectomizadas.....	135
3. CONTENIDO DE PUTRESCINA Y POLIAMINAS.....	138
Validación del método de determinación.....	138
Andrógeno-dependencia.....	140
Efecto de la orquidectomía unilateral.....	140
Efecto de la orquidectomía bilateral y del reemplazo androgénico.....	140
Acción de flutamida.....	145
Contenido de putrescina y poliaminas en espermatozoides epididimarios.....	147
4. CONTENIDO Y CONCENTRACION DE ACETILPUTRESCINA Y ACETILPOLIAMINAS.....	150
Validación del método de determinación.....	150
Presencia de acetilpoliaminas en el epidídimo. Efecto de la castración y del reemplazo androgénico.....	152
DISCUSION.....	153
Actividad ornitina descarboxilasa.....	153
Actividad S-adenosil-L-metionina descarboxilasa.....	165
Niveles de poliaminas.....	168
Acetilación de poliaminas.....	171

Posible rol de las poliaminas epididimarias en la maduración del espermatozoide.....	172
CONCLUSIONES.....	176
REFERENCIAS.....	178

## CONSIDERACIONES GENERALES

Los organismos pluricelulares son sistemas en los cuales las células que los constituyen se disponen según un patrón temporal y espacial esencialmente constante. Esta disposición altamente ordenada de los diferentes tipos celulares, agrupados en tejidos y órganos con funciones especializadas, resulta en un estado que permite, aun a costa de un enorme gasto energético, la supervivencia del individuo en un medio ambiente adverso.

La presión evolutiva ejercida sobre los seres vivos durante millones de años derivó en la formación de una compleja trama de interacciones intercelulares, encargadas de garantizar el funcionamiento de sus elementos en forma coordinada. La existencia de moléculas que actúan como transmisoras de información entre células se comprueba ya a niveles de organización muy primitivos, y ha sido, y sigue siendo, el objeto de estudio de una vasta área de la ciencia experimental.

Ahora bien, dejando de lado los mecanismos moleculares que contribuyen a la estabilidad de un organismo, considerado éste en términos de población celular, es necesario destacar que en los organismos más evolucionados, una parte importante de dicha población se ha diferenciado, no ya para contribuir a la perpetuación del individuo sino a la de la especie.

La existencia de un mecanismo de reproducción sexual no es un requisito para este fin: las formas menos evolucionadas de vida se reproducen por gemación o mitosis, dando origen a una descendencia genéticamente idéntica a la del organismo parental. Pero un progresivo aumento en la complejidad de los organismos, junto a la mayor necesidad de generar individuos genéticamente aptos para la supervivencia, resultó en la aparición de gametas, que permiten a través de su fusión durante el proceso de fertilización, la recombinación del material genómico de dos miembros separados de la especie. Este proceso parece ofrecer enormes ventajas evolutivas, por cuanto ha sido adoptado por la gran mayoría de los organismos. De esta manera, si bien todas las células de un individuo contribuyen, en diferente medida, a su estabilidad, la perpetuación de la especie depende enteramente de la funcionalidad de las llamadas células germinales, y existe una enorme presión selectiva para ajustar la estructura de un organismo como un todo, de manera de proveer a aquéllas la máxima probabilidad de supervivencia.

El estudio de la reproducción sexual ha atraído la atención del hombre aun desde mucho antes de que se establecieran las bases modernas de la investigación científica. En uno de sus más fascinantes ensayos, Rostand (1945) relata la evolución del conocimiento de la fisiología de la reproducción a partir de las teorías de Hipócrates. A esta altura,



sin embargo, es en cierta manera innecesario decir que sólo con el advenimiento de las técnicas desarrolladas en el último siglo fue posible comprender en detalle los eventos celulares involucrados en la formación de gametas funcionales. En el caso particular del tracto genital masculino, se dispone de una extensa información sobre el proceso de espermatogénesis, y sobre las modificaciones posteriores que contribuyen a la formación de espermatozoides viables. No obstante, existen aún numerosos puntos por aclarar, particularmente en relación a los precisos mecanismos de control hormonal de los procesos mencionados.

El propósito del presente trabajo ha sido contribuir al conocimiento de dichos mecanismos.

## INTRODUCCION

El tracto genital masculino de los mamíferos comprende un conjunto de órganos y conductos involucrados en la producción de los espermatozoides y su maduración, transporte y expulsión para la fecundación (Figura 1). Estos órganos pueden clasificarse funcionalmente en 3 grupos:

a) las gonadas, encargadas de la producción de espermatozoides y de la síntesis de una variedad de factores, de los cuales los más importantes son los andrógenos, de naturaleza esteroide.

b) las vías eferentes, formado por los conductos eferentes, el epidídimo, el conducto deferente y la uretra, cuya función consiste en almacenar y transportar los espermatozoides.

c) las glándulas sexuales accesorias (próstata, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales o de Cowper y glándulas uretrales o de Littré), cuyas secreciones facilitan la emisión de semen a través de los conductos y constituyen la principal fracción del líquido seminal.

Todos estos órganos se diferencian en fases tempranas del desarrollo, adquiriendo características anatómicas, histológicas y funcionales propias, esenciales para la óptima producción de los espermatozoides y para el mantenimiento de su viabilidad y funcionalidad. Nos detendremos a describir estos aspectos en los dos órganos objeto de nuestro estudio, el

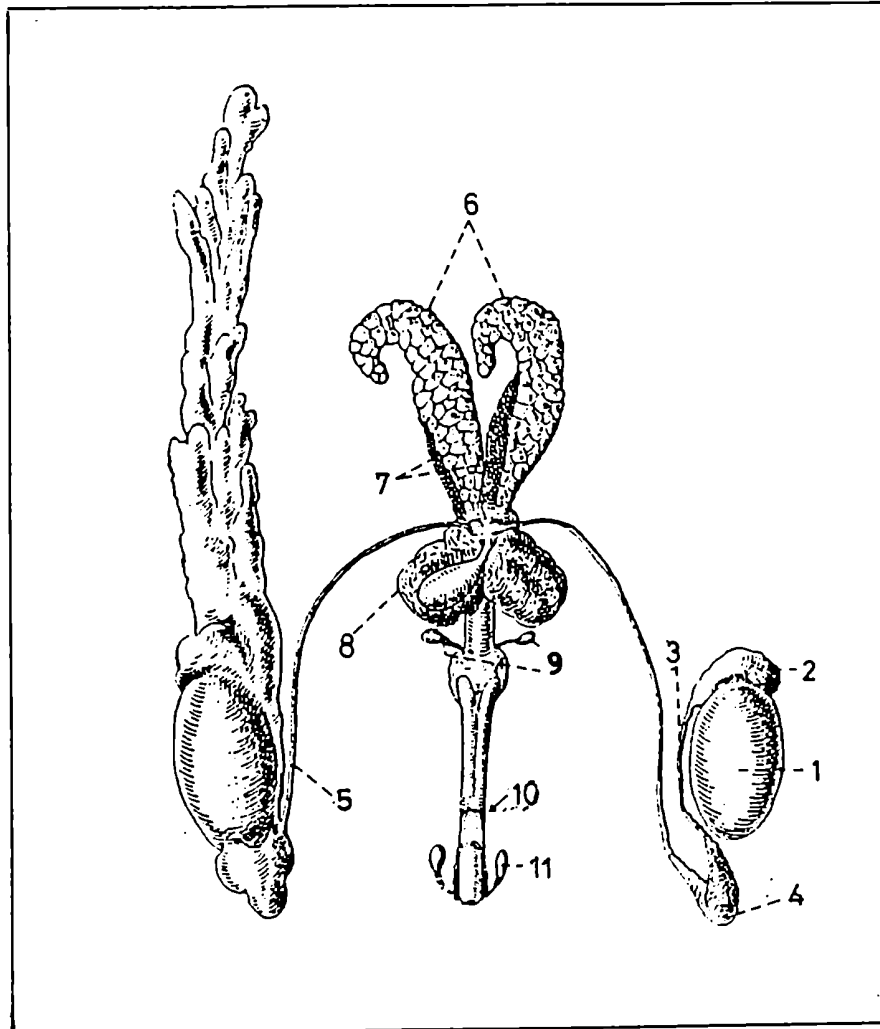


Figura 1. Esquema del tracto genital masculino de la rata. 1: testículo. 2: cabeza de epidídimo. 3: cuerpo de epidídimo. 4: cola de epidídimo. 5: conducto deferente. 6: vesículas seminales. 7: glándulas coagulantes. 8: próstata. 9: glándulas bulbouretrales. 10: pene. 11: glándula prepucial.

testículo y el epidídimo.

## DESCRIPCION ANATOMICA, HISTOLOGICA Y FUNCIONAL DEL TESTICULO Y EL EPIDIDIMO

### El testículo. Su función endócrina y gametogénica.

El testículo es un órgano encapsulado, que en la mayoría de los casos se encuentra ubicado en el saco escrotal. Se halla compuesto por una serie de túbulos, separados por una trama de tejido intersticial. Los túbulos seminíferos poseen un diámetro de 200 a 250  $\mu\text{m}$ , y su número varía desde 30 en la rata hasta más de 1000 en el hombre. Ambos extremos de los túbulos se abren hacia la rete testis, comunicada a su vez con los conductos eferentes que transportan su contenido fuera del órgano.

El análisis histológico del túbulo seminífero revela la existencia de diferentes tipos celulares cuya distribución varía tanto espacial como temporalmente. Entre éstos, las células de Sertoli se extienden desde la membrana basal hacia el lumen, y forman entre sí uniones estrechas. Presentan un núcleo irregular cercano a la membrana basal, y numerosas mitocondrias y cuerpos densos (lisosomas y vacuolas heterogéneas). En íntimo contacto con estas células se distinguen

las células germinales que darán origen, a través de una compleja serie de transformaciones (espermatogénesis), a los espermatozoides capaces de ser transportados hacia las vías eferentes (Fawcett, 1975). Numerosos estudios destacan la alta actividad fagocítica y secretoria de la célula de Sertoli, esencial para el mantenimiento de la espermatogénesis, en amplia concordancia con la definición original de "célula nodriza" propuesta por Sertoli ya en 1865. En efecto, a través de esta interacción nutricional, la célula de Sertoli provee lactato y piruvato para el metabolismo energético de las células germinales. En 1901, Regaud añadió a esta función la capacidad de fagocitar los cuerpos citoplasmáticos residuales que se desprenden de la espermátide. Más recientemente, se han analizado muchos otros aspectos de la biología de la célula de Sertoli, que incluyen la síntesis y secreción de proteínas tales como la proteína ligadora de andrógenos (ABP), ceruloplasmina, transferrina testicular, activador del plasminógeno y una proteína sulfatada SPG<sub>2</sub> (Wilson y Griswold, 1979; Wright y col., 1981; Bardin, 1984). La célula de Sertoli se halla asimismo involucrada en la producción de varios factores tales como inhibina, un polipéptido mitogénico y un factor inhibidor de la meiosis (Bardin, 1984).

La existencia de uniones estrechas entre células de Sertoli establece una separación tanto anatómica como funcional

entre ambos compartimientos del testículo. Así, sólo aquellas sustancias originadas en el sector intersticial o transportadas por vía sanguínea capaces de atravesar la llamada barrera hematotesticular alcanzarán el lumen tubular y viceversa. Por lo tanto, el ambiente en el que las células germinales se diferencian a espermatozoides se encuentra condicionado en forma absoluta por la actividad de las células de Sertoli.

La pared de los túbulos se compone de cuatro capas: la interna, no celular, rodeada por una capa de células mioideas, una tercera capa de fibras de colágeno y finalmente una capa de células endoteliales que delinea los sinusoides linfáticos del tejido intersticial. Esta disposición de células y fibras permite la contracción del túbulo seminífero para la expulsión de los espermatozoides hacia el lumen (Setchell y Brooks, 1988).

El tejido intersticial ocupa el espacio entre túbulos adyacentes, y contiene todos los vasos sanguíneos y linfáticos del parénquima testicular. El tipo celular más importante en este espacio es el formado por las células de Leydig, cuya función principal es la de sintetizar y segregar andrógenos que regulan el desarrollo y el mantenimiento de todo el tracto genital masculino, como también el de las características sexuales externas (Mooradian y col., 1987). La actividad esteroideogénica y secretoria de la célula de Leydig

es revelada por la presencia de un retículo endoplasmático y un aparato de Golgi altamente desarrollados, y numerosas gotas lipídicas y lisosomas (Christensen, 1975). El intersticio presenta además un número apreciable de células precursoras ("mast cells") y macrófagos.

La actividad esteroidogénica de las células de Leydig presenta un perfil bifásico durante el desarrollo. En la vida embrionaria, las células de Leydig aumentan en número y tamaño, y sus secreciones estimulan la diferenciación del tracto genital masculino. Luego de este período, las células involucionan y se mantienen en regresión hasta la pubertad, etapa en la aparecen las células responsables de mantener el trofismo de los órganos sexuales accesorios durante la vida adulta.

Las gonadotrofinas hipofisarias son los principales reguladores de la función testicular, en particular FSH (junto con andrógenos) sobre las células de Sertoli (Means, 1975), y LH sobre las células de Leydig (Eik-Nes, 1975). La acción de FSH es mediada por receptores específicos ubicados en la membrana plasmática de las células de Sertoli. Esta glicoproteína regula una variedad de procesos celulares que conducen a la creación de un medio óptimo para el desarrollo de las células germinales. Entre dichos procesos cabe mencionar:

a) la producción de nutrientes para las células germinales,

tales como lactato y piruvato (Mitta y Hall, 1982).

b) la secreción de líquido tubular (Setchell, 1978).

c) la síntesis de inhibina (Steinberger y Steinberger, 1976).

d) la síntesis de ABP (Hansson y col., 1975).

e) la actividad aromatasas, responsable de la síntesis de estrógenos (Dorrington y col., 1978).

En cuanto a la acción de LH, se han descrito receptores específicos para esta hormona en la membrana plasmática de las células de Leydig, sobre las cuales ejerce un efecto estimulador de la síntesis de andrógenos (Eik-Nes, 1975). Además, esta hormona participa en el mantenimiento del número de células de Leydig y de su actividad metabólica.

Si bien las gonadotropinas hipofisarias son esenciales para el desarrollo y/o mantenimiento de la actividad testicular, un número cada vez mayor de factores demuestran hallarse involucrados en la regulación de diferentes funciones en ambos compartimientos. Además, la descripción de un intenso diálogo químico entre los diferentes tipos celulares del testículo (interacciones Sertoli- germinal, Sertoli- Leydig, Sertoli- mioide y Leydig- mioide) (Skinner, 1987) destaca la enorme importancia de las interacciones parácrinas para el mantenimiento de la función testicular.



## El epidídimo. Su participación en la maduración de los espermatozoides

Una vez producidos en el testículo, los espermatozoides llegan, a través de la rete testis y los conductos eferentes, al epidídimo. Luego del tránsito a través de este órgano, son almacenados en su segmento distal hasta el momento de la eyaculación. En este caso, los espermatozoides serán conducidos por el conducto deferente y se diluirán con las secreciones de las glándulas accesorias, principalmente las provenientes de la próstata y las vesículas seminales.

Entre los procesos suscitadamente descritos hasta aquí, sólo recientemente han merecido atención las transformaciones que ocurren en la estructura y función del espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo. Hasta fines de la década de 1930, se consideraba al epidídimo como un simple órgano de tránsito de los espermatozoides. Los primeros estudios tendientes a estudiar la participación del epidídimo en la maduración de los espermatozoides fueron realizados por Benoit en 1926, y Young entre 1929 y 1931. A pesar de estos antecedentes, el estudio de la fisiología del epidídimo cobró un notable impulso recién a fines de la década de 1960. En esa época, una serie de estudios realizados por Orgebin-Crist (1967,1969) y Bedford (1967) demostró que la función del epidídimo no se limitaba al

transporte y almacenamiento de los espermatozoides, por cuanto éstos sufren, durante el tránsito a su través, una variedad de cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales resultantes de su interacción con productos de secreción del epitelio epididimario.

El epidídimo es un órgano par, adyacente al testículo, que se extiende desde el polo anterior al polo posterior de dicho órgano, y se halla estrechamente unido a él por tejido conectivo y una cubierta de tejido adiposo. Consiste en un único túbulo altamente enrollado, con una longitud que varía de 3 metros en el humano, a 80 metros en el caballo (Maneely, 1959). La disposición espacial de este túbulo, demarcada por tabiques de tejido conectivo, permite dividir a este órgano en 3 segmentos: cabeza (caput o sector proximal), cuerpo (corpus o sector medio) y cola (cauda o sector distal), si bien algunos autores (Hamilton, 1975) consideran la existencia de una zona entre los conductos eferentes y el caput epididimario, denominada segmento inicial, que se encuentra más vascularizado que el resto del órgano y posee características histológicas propias. Los diferentes segmentos del epidídimo presentan diferencias tanto histológicas como bioquímicas y funcionales (Robaire y Hermo, 1988).

A los fines de su estudio, podemos considerar al epidídimo dividido en 2 compartimientos: por un lado, el constituido por el epitelio tubular y la trama de tejido conectivo

intersticial, y por otro el compartimiento luminal, que comprende al líquido proveniente de la secreción testicular, los espermatozoides y otras estructuras de diversa naturaleza. Como veremos más adelante, una profunda interacción entre ambos compartimientos provoca importantes modificaciones tanto del contenido luminal como de la actividad de las células epiteliales.

Histológicamente, se distinguen en el epitelio epididimario varios tipos celulares, distribuidos en forma desigual a lo largo del túbulo.

Las células principales son células altas que se tiñen moderadamente, y presentan estereocilias formando un ribete en cepillo. Presentan un núcleo redondeado pálido con un nucleolo prominente, y un aparato de Golgi muy desarrollado.

Las células apicales son exclusivas del segmento inicial, se identifican por un citoplasma fuertemente teñido, un núcleo elongado en la parte apical, y una base angosta en contacto con la membrana basal. En cabeza, cuerpo y cola, estas células dan origen, hacia el día 28 de edad en la rata, a las células claras.

Las células claras se caracterizan por una región apical densamente vacuolada, y por la presencia de numerosos gránulos densos. La región basal presenta cuerpos pálidos o moderadamente densos.

Las células basales son células planas que residen en la

base del epitelio, en contacto con la membrana basal. Tienen un núcleo elongado o esférico con acúmulos periféricos de cromatina condensada. Presentan numerosas interdigitaciones con las células principales.

Finalmente, las células halo se identifican por un núcleo denso, que muestra acúmulos periféricos de cromatina condensada, rodeado por un citoplasma pálido. Son consideradas linfocitos intraepiteliales.

El epitelio epididimario se halla rodeado por una capa muscular, cuyo espesor aumenta hacia los segmentos distales. El tejido intersticial aparece poblado de fibroblastos, capilares, vasos linfáticos, pequeños nervios, macrófagos, fibras y otros elementos estructurales que contribuyen a mantener el enrollamiento del túbulo.

Se atribuye en la actualidad un vasto número de funciones a este órgano, relacionadas con alteraciones en la estructura del espermatozoide y en la composición química del fluido proveniente del testículo. Entre las funciones más relevantes podemos mencionar:

1) absorción: el epidídimo, en particular el segmento inicial y la cabeza, absorbe grandes volúmenes del fluido segregado a la rete testis por los túbulos seminíferos, como así también material particulado. En algunas especies, este volumen alcanza el 90% del producido por el testículo (Crabo y Gustafsson, 1964). Estudios recientes (Turner y col., 1984)

indican que en la rata, los espermatozoides son concentrados 20 veces entre la rete testis y la cola del epidídimo. La absorción de agua es acompañada por la absorción conjunta de iones tales como cloruro y sodio (Crabo y Gustafsson, 1964; Levine y Marsh, 1971; Wong y Yeung, 1978) y carnitina (Hinton y Hernández, 1985). Por otra parte, se demostró que el epitelio epididimario es capaz de internalizar, por endocitosis, diversos marcadores de alto peso molecular inyectados en el lumen (Friend y Farquhar, 1967; Moore y Bedford, 1979b; Hermo y Morales, 1984; Hermo y De Melo, 1987). La presencia de vesículas recubiertas de clatrina sugiere que la endocitosis mediada por receptor estaría involucrada en la internalización de macromoléculas. Entre las proteínas que son absorbidas del lumen por el epitelio epididimario figuran ABP (Pelliniemi y col., 1981; Attramadal y col., 1981),  $\alpha$ -2-macroglobulina (Djakiew y col., 1984, 1985) y transferrina (Djakiew y col., 1986).

2) secreción: en los últimos años, se ha hecho evidente que el epidídimo segrega hacia el lumen una variedad de especies que son captadas de la circulación o sintetizadas en el epitelio. Entre ellas, resulta importante destacar:

a) iones: la composición iónica del fluido de la rete testis varía considerablemente al entrar al epidídimo, y este fluido sufre posteriores modificaciones durante el tránsito a través de este órgano (Turner y col., 1977; Jenkins y col., 1980).

Así, la concentración de potasio es máxima en el cuerpo, mientras que la concentración de fósforo se incrementa a lo largo del túbulo epididimario. Este incremento se debe a un aumento en la concentración de fosfato, como así también a la incorporación de fósforo en glicerilfosforilcolina y fosforilcolina.

b) compuestos orgánicos de bajo peso molecular: carnitina (Hinton y Setchell, 1980; Brooks, 1980), inositol (Tuck y col., 1970; Lewin y col., 1976; Robinson y Fritz, 1979; Cooper, 1982) y glicerilfosforilcolina (Hammerstedt y Rowan, 1979).

c) proteínas: por técnicas de micropunción, Koskimies y Kormano (1975) y Turner (1979) demostraron que el perfil electroforético de las proteínas del lumen epididimario difiere marcadamente del obtenido del fluido de la rete testis, y aun varía considerablemente en los diferentes segmentos del órgano. Entre las proteínas segregadas al lumen por el epitelio, merecen especial atención las glicoproteínas que se unen al espermatozoide, interviniendo en el proceso de maduración (Cameo y Blaquier, 1976; Lea y col., 1978; Acott y Hoskins, 1978; Garberi y col., 1979; Brooks y Higgins, 1980; Olson y Orgebin-Crist, 1982). Por otra parte, diferentes autores demostraron la presencia en el lumen de proteínas tales como albúmina,  $\alpha$ -2-macroglobulina, transferrina y ABP y numerosas actividades enzimáticas (Hamilton,

1980; Besancon y col., 1985; Hohlbrugger y col., 1982; Mayorga y Bertini, 1985).

3) síntesis y metabolismo de esteroides: según algunos autores, el epidídimo de diversas especies parece poseer la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de andrógenos a partir de acetato, colesterol o esteroides precursores (Hamilton y col., 1969; Hamilton y Fawcett, 1970; Hamilton, 1971; Evans y Johnson, 1975). No obstante este hecho, es evidente que la principal acción metabolizante de esteroides en este órgano consiste en la  $5\alpha$ -reducción de la testosterona proveniente del testículo, resultando en la producción de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona ( $5\alpha$ -DHT), compuesto con una mayor actividad androgénica (Inano y col., 1969; Gloyna y Wilson, 1969). En la actualidad ha sido bien establecido que la  $5\alpha$ -reducción de la testosterona es un requisito para la acción androgénica en el epidídimo. En la mayoría de las especies estudiadas, la actividad  $5\alpha$ -reductasa es máxima en la cabeza del epidídimo (Robaire y col., 1977; Pujol y Bayard, 1978; De Larminat y col., 1980). Con respecto a su perfil ontogénico, la actividad  $5\alpha$ -reductasa epididimaria es indetectable durante las dos primeras semanas de edad en la rata, y aparece en el epidídimo antes del comienzo de la entrada de espermatozoides en el órgano (Scheer y Robaire, 1980).

4) otras vías metabólicas: ha sido descripta en el epidídimo

la existencia de vías de síntesis de prostaglandinas (Bartke y Koerner, 1974; Badr y col., 1975) y del metabolismo del glutatión (Tate y Orlando, 1979) y la vitamina D (Kidroni y col., 1983).

5) espermiofagia: consiste en la resorción y destrucción de los espermatozoides no eyaculados (Amann y Almquist, 1962; Orgebin-Crist, 1962).

Con la posible excepción del fenómeno de espermiofagia, aún no estudiado en detalle, todas las funciones del epidídimo descritas en párrafos anteriores dependen, en diferente grado, de una correcta provisión de andrógenos. Sin embargo, se han observado numerosas discrepancias con respecto a la sensibilidad a los andrógenos de las funciones estudiadas. Causa de ello, en parte, es la particular situación del epidídimo en relación a los demás órganos andrógeno-dependientes. En primer lugar, el aporte de andrógenos al epidídimo se efectúa al menos por 3 vías: el aporte sanguíneo a través del plexo pampiniforme (Setchell y Brooks, 1988), el aporte luminal a través del fluido testicular (Ganjam y Amann, 1976), junto a la activa metabolización a andrógenos activos, y muy probablemente la síntesis de andrógenos en el propio tejido, como ya comentáramos. De esta manera, la concentración intraepididimaria de andrógenos es inusualmente alta, y resulta a menudo difícil evaluar en qué



medida contribuye cada uno de estos aportes al mantenimiento de una función en particular. Resultados obtenidos por Prasad y col. (1973) sugieren que el umbral de concentración de andrógenos requerido para su acción es mayor en el epidídimo que en los otros órganos andrógeno-dependientes. En segundo lugar, el fluido testicular provee al epidídimo numerosos factores no androgénicos que probablemente afecten en forma parácrina algunas de las funciones del epidídimo, y estos efectos son difícilmente distinguibles de los de los andrógenos. A este respecto, resulta importante señalar que el segmento inicial parece ser dependiente, para su trofismo, de factores testiculares no androgénicos, por cuanto la regresión post-castración observada en este segmento no es prevenida por la administración de andrógenos exógenos, aun en altas dosis, en igual medida que los segmentos más distales (Fawcett y Hoffer, 1979).

De lo dicho anteriormente, es necesario rescatar una conclusión importante, extrapolable a la acción de cualquier hormona sobre un órgano o tejido efector: no es posible considerar la respuesta a una hormona en forma global, sino en referencia a los diferentes parámetros que se determinen individualmente. Por consiguiente, la búsqueda de nuevos parámetros utilizables como marcadores de acción hormonal es un importante recurso para el estudio de la acción hormonal.

Así, la descripción de indicadores de sensibilidad a hormonas y antihormonas constituye un aspecto clave de la endocrinología molecular. En particular, la hormono-dependencia de un determinado proceso metabólico va a ser indicativa de la necesidad del órgano de mantener niveles constantes de ciertos metabolitos, y por consiguiente de la importancia de dicho proceso en su funcionalidad.

Es conveniente analizar cuáles son los procesos celulares que han demostrado ser de mayor utilidad para el estudio de la acción hormonal. Nos referiremos en particular al metabolismo de las poliaminas, que en los últimos años ha suscitado un gran interés en el área de la fisiología y la bioquímica endócrinas.

## BIOQUIMICA DE LAS POLIAMINAS: METABOLISMO, REGULACION Y PARTICIPACION EN LA FUNCION CELULAR.

### Síntesis, interconversión y catabolismo de poliaminas

En el curso de las últimas décadas, las poliaminas han pasado de ser consideradas productos de la putrefacción bacteriana u oscuros constituyentes del semen, a esenciales componentes celulares. Las poliaminas son compuestos iónicos, de bajo peso molecular y naturaleza química sencilla. En la

Figura 2 se detallan las fórmulas estructurales de las poliaminas más abundantes, espermidina y espermina, y de su precursor, putrescina, como así también las de sus principales derivados naturales. La putrescina es simplemente una diamina alifática, el 1,4-diaminobutano. La espermidina y la espermina son formados por unión de uno o dos grupos aminopropilo, respectivamente, a los grupos amino de la putrescina.

La mayoría de las bacterias contienen putrescina y espermidina en alta concentración. La síntesis de espermina comienza durante la evolución junto a la aparición del núcleo, por cuanto se halla presente exclusivamente en organismos eucariontes. Sin embargo, esto no implica que su localización sea exclusivamente nuclear, si bien su concentración es considerablemente mayor en el núcleo que en el citoplasma (Mach y col., 1982).

Todos los tejidos de los organismos vertebrados contienen putrescina, espermidina y espermina en concentraciones en el rango de nmoles a  $\mu$ moles por gramo de peso húmedo, mientras que otras aminas químicamente relacionadas a éstas se encuentran en concentraciones insignificantes. El hecho de que estos compuestos hayan sido seleccionados en etapas muy tempranas de la evolución, y de que hayan persistido en todos los tipos celulares de una amplia variedad de organismos, es el mejor argumento a favor de su gran importancia fisio-

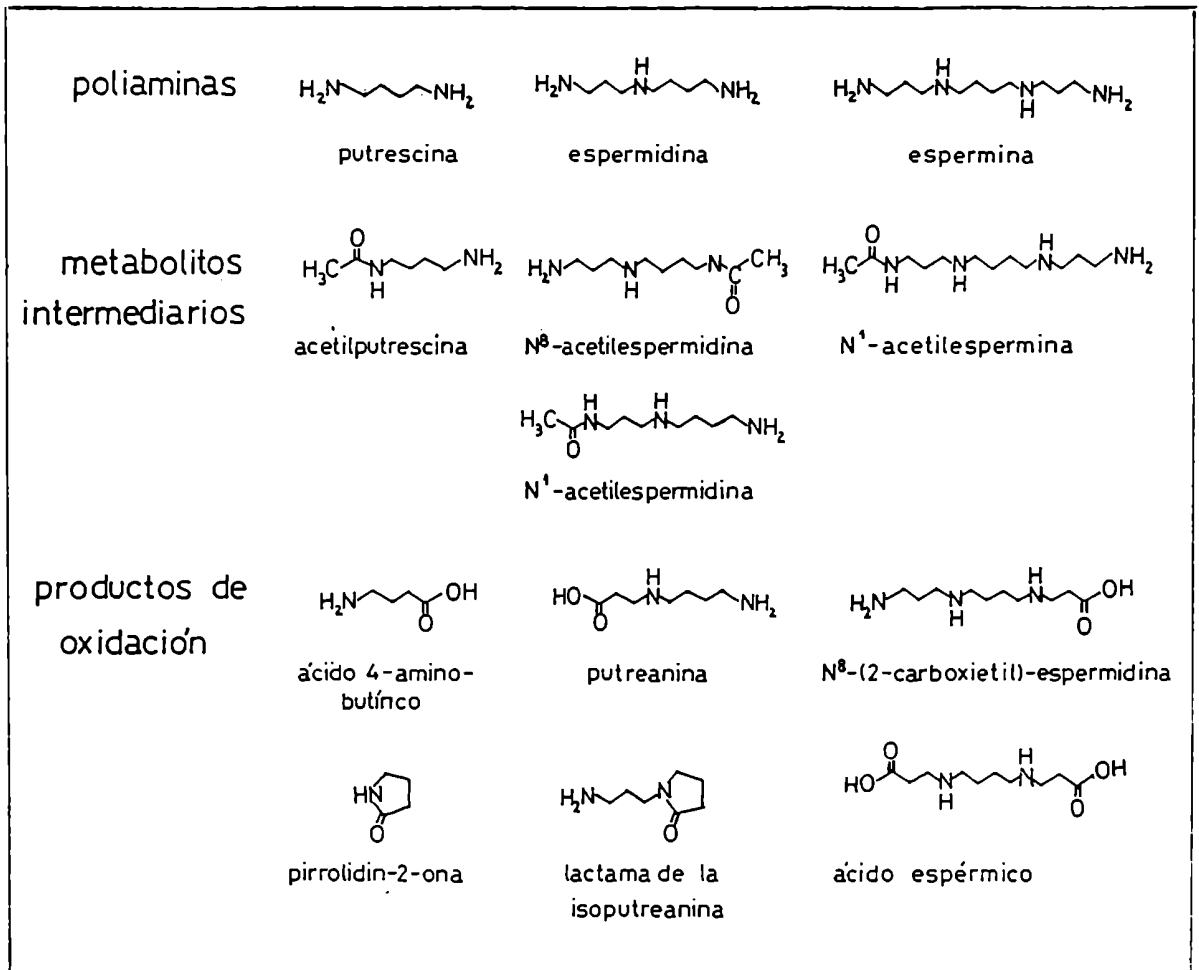
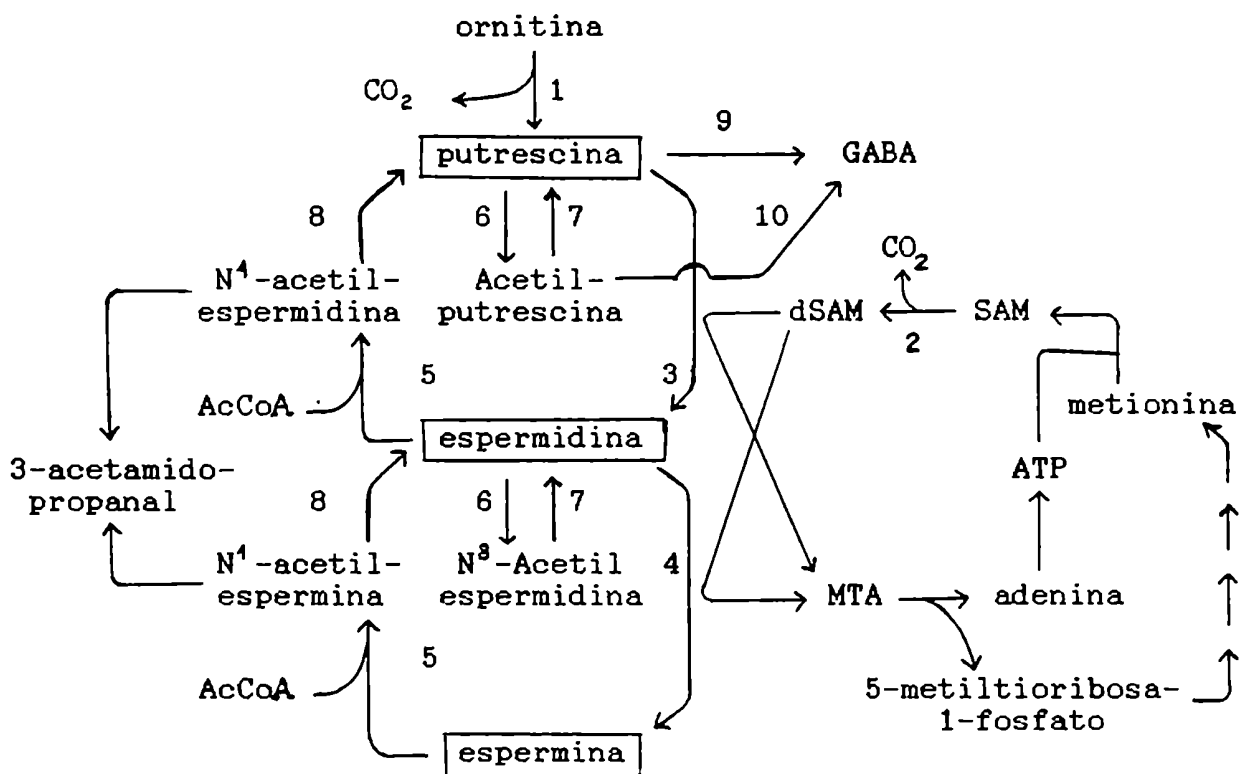


Figura 2. Poliaminas naturales y sus derivados más importantes.

lógica. Dicha importancia es aun remarcada por la existencia de los refinados mecanismos de regulación que la célula utiliza para controlar su síntesis, interconversión y degradación (Seiler y Heby, 1988).

El camino de síntesis, interconversión y catabolismo de las poliaminas se encuentra esquematizado en la Figura 3. En una primera etapa, el aminoácido L-ornitina, que es captado de la circulación o sintetizado a partir de la arginina, es descarboxilado por acción de la enzima L-ornitina descarboxilasa (ODC), dando lugar a la formación de putrescina. La síntesis de espermidina ocurre por aminopropilación de la putrescina, catalizada por la espermidina sintetasa. A su vez, la aminopropilación de la espermidina por la espermina sintetasa resulta en la formación de espermina, que posee el mayor carácter iónico y básico de las poliaminas naturales.

La síntesis de espermidina y espermina por las aminopropiltransferasas mencionadas requiere como sustrato 5'-deoxi-5'-S-(3-metiltiopropilamino)-sulfoadenosina ("S-adenosil-L-metionina descarboxilada", dSAM), formada por acción de la S-adenosil-L-metionina descarboxilasa (SAMDC) sobre la S-adenosil-L-metionina (SAM). Este último compuesto es de gran importancia en el metabolismo celular, al ser sustrato de numerosas reacciones de metilación de proteínas y ácidos nucleicos; así, representa un punto de cruce del camino de síntesis de poliaminas con otras vías metabólicas. El



**Figura 3.** Biosíntesis, interconversión y catabolismo de poliaminas. 1: ornitina descarboxilasa. 2: SAM descarboxilasa. 3: espermidina sintetasa. 4: espermina sintetasa. 5: acetil CoA:espermidina/espermina-N<sup>4</sup>-acetil transferasa. 6: acetil CoA:espermidina/espermina-N<sup>8</sup>-acetil transferasa. 7: N<sup>8</sup>-acetilespermidina desacetilasa. 8: poliamina oxidasa. 9: diamina oxidasa. 10: monoamina oxidasa.

producto descarboxilado no es sustrato de las metiltransferasas (Pegg, 1984), como consecuencia de lo cual se halla comprometido exclusivamente a la síntesis de poliaminas. En condiciones normales, existe un estricto control de la disponibilidad de SAM para la síntesis de poliaminas y para las reacciones de transmetilación; la relación entre estos dos tipos de caminos se encuentra coordinada según las necesidades de poliaminas durante el ciclo celular (Iizasa y Carson, 1985).

La síntesis de espermidina y espermina es acompañada por la producción de cantidades estequiométricas de 5'-metiltioadenosina (MTA). Sin embargo, las concentraciones intracelulares de este producto son normalmente muy bajas, debido a su rápida degradación a 5-metiltioribosa-1-fosfato y adenina. El primer producto es convertido, mediante una serie compleja de reacciones, en L-metionina, mientras que la adenosina es convertida, por acción de la adenina fosforibosiltransferasa, en adenosina-5'-monofosfato. De esta manera, las reservas intracelulares de adenina y L-metionina se conservan eficientemente.

Las reacciones catalizadas por las aminopropiltransferasas son irreversibles. No obstante, el camino de síntesis puede revertirse en forma indirecta, generándose putrescina a partir de espermidina, y ésta a partir de espermina (Figura 3). La interconversión de las poliaminas es mediada

por reacciones de acetilación y oxidación (Seiler, 1987). La acetilación de las poliaminas puede ser catalizada por dos tipos de acetilasas: la histona acetilasa nuclear, que presenta afinidad por histonas y poliaminas, y una acetiltransferasa citosólica específica (acetil CoA:espermidina/espermina-N<sup>4</sup>-acetiltransferasa, SAT). Con respecto a la acetilación nuclear, virtualmente todo el producto generado a partir de la espermidina es la N<sup>8</sup>-acetilespermidina. El único destino conocido de este compuesto es la desacetilación, que ocurre en el citoplasma celular, a partir de lo cual se postuló que la función de este proceso sería la de remover espermidina del espacio nuclear (Seiler, 1987). En cambio, los productos formados por la acetilasa citosólica son excelentes sustratos de la poliamina oxidasa (PAO), una enzima dependiente de FAD. La acción de esta enzima resulta en la producción de putrescina o espermidina, según utilice N<sup>4</sup>-acetilespermidina o acetilespermina, y 3-acetamido-propanal (Figura 3).

La acetilación de las poliaminas vía SAT parece ser el paso limitante en su interconversión y oxidación. Debido a que la actividad PAO se encuentra generalmente en gran exceso con respecto a la actividad SAT, el contenido celular de las poliaminas acetiladas se halla, en condiciones normales, por debajo de los límites de detección (Pegg y McCann, 1982), con la única excepción del epidídimo (Matsuzaki y col., 1982).



Cabe mencionar aquí que, como veremos más adelante, la función de las poliaminas se halla estrechamente relacionada con su naturaleza iónica. Como la acetilación de las poliaminas resulta en la disminución de su carga neta, este proceso conduce a la pérdida de su actividad biológica y, muy probablemente, a alteraciones en la dinámica de su eliminación.

Cada intermediario del ciclo de interconversión puede ser sustrato de una amina oxidasa dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$  (Seiler, 1985). Dado que los productos de las reacciones catalizadas por estas oxidasas no pueden ser reconvertidos en poliaminas, estas reacciones constituyen, en conjunto, el denominado catabolismo terminal. Los aldehídos formados en estas reacciones pueden ser oxidados a los correspondientes ácidos. En el caso de la putrescina, su oxidación por la diamina oxidasa (DAO) origina gama-aminobutiraldehído, que es nuevamente oxidado a ácido gama-aminobutírico (GABA) (Seiler, 1980). La putrescina puede, a su vez, ser acetilada, y la monoacetilputrescina, oxidada por la monoamina oxidasa (MAO). Esta vía conduce también a la formación de GABA (Seiler, 1980). La oxidación extracelular de la putrescina, las poliaminas y sus derivados por oxidasas séricas contribuye también a la aparición, en sangre y orina, de una serie de metabolitos tales como carboxietilpoliaminas, ácido espérmico, putreanina,  $\beta$ -alanina y GABA (Seiler y col., 1985).

Finalmente, en una amplia variedad de células de mamíferos se describió la existencia de un sistema de transporte activo de poliaminas, distinguible del sistema de transporte de aminoácidos, capaz de captar putrescina y poliaminas (Bachrach y Seiler, 1981; Volkow y col., 1983; Rinehart y Chen, 1984). Este sistema es activado por la falta de poliaminas en el medio, y juega un importante papel en el mantenimiento de los niveles intracelulares de poliaminas en condiciones de inhibición de su síntesis (Pegg y McCann, 1982).

#### Regulación de la síntesis de poliaminas

La regulación de la biosíntesis e interconversión de las poliaminas es llevada a cabo por cambios en la actividad de tres enzimas: ODC, SAMDC y SAT. Las otras enzimas (espermidina sintetasa, espermina sintetasa y PAO) parecen ser reguladas fundamentalmente por la disponibilidad de sus sustratos limitantes, dSAM y las poliaminas acetiladas. En cambio, la actividad de las primeras puede variar hasta en varios órdenes de magnitud en diferentes situaciones patológicas y experimentales.

De las enzimas arriba mencionadas, la mejor caracterizada hasta el presente es la ODC. Esta enzima, que utiliza fosfato de piridoxal como cofactor, se localiza principalmente en el

citosol, si bien se ha reportado también su presencia en la fracción nucleolar (Emanuelsson y Heby, 1982), y representa una pequeñísima parte de la proteína celular total. El peso molecular del monómero es, en promedio, de 55 kDa (Russell, 1985). En la mayoría de los tejidos de mamíferos, su actividad basal es la más baja de las involucradas en la biosíntesis de poliaminas (Raina y col, 1976), y por consiguiente puede ser considerada la enzima que controla la velocidad global de esta vía.

La ODC presenta características inusuales en relación al resto de las proteínas. Con la única excepción conocida de la enzima de tripanosoma (Phillips y col., 1987), su vida media oscila entre los 8 y los 15 minutos en condiciones basales, siendo la enzima de mayor velocidad de recambio entre las conocidas (Tabor y Tabor, 1984). Diferentes autores coinciden en señalar que en diversas condiciones experimentales, en las que se observan diferentes valores de actividad ODC, existe una excelente correlación entre la actividad enzimática y la cantidad de enzima presente, determinada ésta última por radioinmunoensayo o por unión de ligandos específicos (Pegg, 1986). De esto se desprende que la cantidad de ODC presente es el principal regulador de su actividad. La alta velocidad de recambio de esta enzima permite que variaciones en su síntesis y/o degradación afecten rápidamente la cantidad de enzima presente. En apoyo a estas observaciones, se ha demos-

trado más recientemente que los aumentos en la actividad ODC en el riñón de ratón obtenidos por estimulación con andrógenos se hallan acompañados por aumentos paralelos en la cantidad de ARN mensajero para dicha enzima (Kontula y col., 1984). Por lo tanto, el principal punto de regulación, al menos en ciertos modelos, parece encontrarse a nivel de recambio (síntesis y/o degradación) del ARN mensajero.

Estudios recientes describen otras formas de regulación de la actividad ODC, además de la ya mencionada. En líneas celulares en cultivo, la incubación en presencia de poliaminas exógenas resulta en una rápida caída de la actividad ODC (Canellakis y col, 1979; Pegg, 1986). En contraste con lo observado en el caso de la estimulación androgénica, las variaciones en el contenido de ARN mensajero de esta enzima no explican totalmente la disminución de la actividad. Estudios detallados al respecto demuestran que las poliaminas disminuyen marcadamente la eficiencia de la traducción in vitro del ARN mensajero de la enzima (Kahana y Nathans, 1985; Holtta y Pohjanpelto, 1986; Persson y col., 1986). Esta forma de regulación traduccional resulta sumamente interesante desde el punto de vista de la economía celular, si se tiene en cuenta que, paradójicamente, altos niveles de poliaminas resultan en una traducción eficiente de la mayoría de los ARN mensajeros conocidos.

Finalmente, en diversos tejidos se han presentado

evidencias de mecanismos de regulación post-traducciona l de la ODC. Estos incluyen la existencia de una proteí na inhibidora ("antizyme") de peso molecular 22 kDa, que se une a la ODC e inhibe su actividad (Canellakis y col, 1979). La síntesis de esta proteí na es inducida por poliaminas, y la formación del complejo con la ODC parece constituir un paso inicial en la degradación de la enzima, probablemente confiriendo especificidad a dicho proceso. A su vez, la acción de la proteí na inhibidora es regulada por otra proteí na ("anti-antizyme"), purificada de hígado de rata, que no modifica la actividad ODC pero presenta una alta afinidad por la antienzima, como resultado de lo cual es capaz de liberar a la ODC de su forma complejada inactiva (Fujita y col., 1982).

Al menos en ciertos tejidos, otras evidencias menos directas sugieren una regulación post-traducciona l de la ODC, por mecanismos de fosforilación (Kuehn y Atmar, 1983) y de conjugación covalente de poliaminas a la molécula de enzima, mediada por transglutaminasas (Russell, 1981).

Tal como se ha señalado anteriormente, una consecuencia directa de la alta velocidad de síntesis y degradación de la ODC es que aquellos factores que induzcan la síntesis proteica van a inducir más rápidamente y en mayor grado la síntesis de ODC, mientras que aquellos que la repriman disminuirán sus niveles más rápida y marcadamente. Esta enzima resulta entonces de gran importancia para evaluar los

posibles efectos de hormonas, antihormonas y fármacos sobre un determinado tipo celular. Prueba de ello puede encontrarse en la extensa revisión de Russell (1985) en la que se citan las modificaciones en la actividad ODC por una gran variedad de hormonas y factores de crecimiento en sus tejidos efectores.

Las situaciones patológicas y experimentales mejor descritas, en las que la actividad ODC se halla estimulada, son la hepatectomía parcial (estimulación de la ODC hepática durante la regeneración), la hipertrofia renal y cardíaca, el crecimiento embrionario y maligno, la exposición al frío (y situaciones de estrés relacionadas), la administración de hormonas y factores de crecimiento, cambios en el contenido iónico del medio, cambios en la composición de aminoácidos del medio, activación de linfocitos, transformación de células en cultivo, adición de suero al medio de cultivo y tratamiento con promotores tumorales como ésteres de forbol (Tabor y Tabor, 1976; Janne y col., 1978; Tabor y Tabor, 1984; Pegg y McCann, 1988).

Por administración de hormonas de acción trófica y factores de crecimiento, la actividad ODC alcanza un pico entre las 4 y las 24 horas, y el grado de estimulación oscila en general entre 10 y 200 veces sobre los niveles basales.

Si bien la ODC constituye la enzima limitante de la síntesis de poliaminas, la formación de estos compuestos

requiere la acción de la SAMDC. Esta enzima también se encuentra en el citosol, y el peso molecular del monómero es de 32 kDa. A diferencia de las demás descarboxilasas de eucariotes conocidas, no utiliza fosfato de piridoxal como cofactor. Es sintetizada como un precursor de 37 kDa, que es luego convertido a la forma activa; en esta etapa, activable por putrescina, se une covalentemente una molécula de piruvato al extremo N-terminal (Pegg, 1986). La actividad SAMDC también es estimulada por muchos de los estímulos de la ODC, si bien la respuesta en general no es tan marcada o rápida. Su vida media también es corta, del orden de 1 hora en mamíferos, y presenta formas de regulación transcripcional y traduccional similares a las de la ODC (Pegg, 1984). Además, la enzima de eucariotes es marcadamente estimulada por putrescina; de esta manera se asegura una eficiente provisión de dSAM para la síntesis de espermidina y espermina, una vez que se detectan altos niveles de putrescina resultantes de la activación de la ODC. La enzima es inhibida por espermidina y dSAM.

La SAT presenta una vida media de 15-45 minutos, lo cual la hace apropiada, junto a las enzimas ya mencionadas, para la regulación del metabolismo de poliaminas. Esta enzima es altamente inducible en respuesta a una variedad de estímulos tóxicos (Persson y Pegg, 1984). La inducción de la SAT es consecuencia del aumento en la velocidad de síntesis y de la

disminución de la degradación. La enzima es también inducida por administración de poliaminas y análogos sintéticos. De esta forma, se sugirió que la inducción de la SAT representa un mecanismo de eliminación de poliaminas, una vez excedido cierto umbral de concentración. Asimismo, se ha reportado la inducción de la SAT por otros estímulos tales como hormonas tróficas (Della Ragione y Pegg, 1984), ésteres de forbol (Matsui-Yuasa y col., 1984) y factores de crecimiento séricos (Wallace y col., 1985).

#### Funciones de las poliaminas

La enorme variedad de trabajos realizados en diferentes tipos celulares, y mediante las más diversas estrategias experimentales, evidencia un activo papel de las poliaminas en el crecimiento y la diferenciación celulares (Tabor y Tabor, 1984; Pegg, 1986; Seiler y Heby, 1988). Las primeras evidencias al respecto señalan un marcado aumento de los niveles intracelulares de poliaminas precediendo la síntesis de ADN (Friedman y col., 1972; Heby y col., 1976), y su acumulación cuando la proliferación es estimulada (Pett y Ginsberg, 1968; Hogan, 1971; Melvin y col., 1972; Heby y col., 1975). A partir de tales evidencias, se describió que las poliaminas afectan, en sistemas in vitro, virtualmente todas las reacciones en que intervienen ácidos nucleicos



(duplicación, transcripción, procesamiento del ARN y traducción). No obstante, resulta difícil evaluar qué sistema bioquímico es directamente afectado por la presencia o ausencia de poliaminas. Causa de ello, en parte, es que la estimulación o inhibición de la síntesis de poliaminas conducen a una serie de profundos cambios tanto en la estructura como en la función celulares, que imposibilitan la definición de una relación directa entre poliaminas y un sistema específico. Mas aún, dada su naturaleza iónica y básica, las interacciones in vitro de las poliaminas con ácidos nucleicos o proteínas podrían resultar de artificios técnicos que no reflejen de ningún modo la situación in vivo. A pesar de ello, la investigación de la función de las poliaminas es un campo de experimentación sumamente fértil, tanto por su interés básico como por sus posibles aplicaciones terapéuticas.

El análisis de los resultados experimentales se ve dificultado por el hecho de que algunos de los efectos producidos por las poliaminas son imitados por el  $Mg^{2+}$  o cationes relacionados, a altas concentraciones. Por consiguiente, es necesario distinguir qué efectos son específicos de las poliaminas. A este respecto, las poliaminas son las únicas estructuras en las cuales las cargas se distribuyen a lo largo de una cadena flexible. Este hecho les permite conectar dos sitios distantes cargados negativamente, lo cual no puede

ser imitado por los cationes inorgánicos.

La interacción in vitro de las poliaminas con los ácidos nucleicos resulta en una protección contra la desnaturalización y la ruptura, y en la formación de complejos que posibilitan su condensación. Estos efectos son atribuidos a la interacción iónica que resulta en la neutralización de las cargas negativas (Kaiser y col., 1963; Wilson y Bloomfield, 1979; Allison y col., 1981; Marx y Ruben, 1983). Se describieron, además, numerosos efectos sobre las reacciones en que intervienen ácidos nucleicos (Leboy, 1971; Young y Srinivasan, 1971; Singh y Sung, 1972; Pegg, 1973; Mandel y Chambon, 1974; Levy y col., 1974; Moruzzi y col., 1975; Frank y col., 1975), si bien es difícil evaluar si el efecto observado resulta de la interacción con las enzimas, los sustratos o los nucleósidos trifosfato.

Diferentes sistemas de síntesis de proteínas in vitro requieren concentraciones óptimas de poliaminas para su unión a ribosomas, estabilizando su estructura (Echandi y Algranati, 1975; Igarashi y col., 1979), facilitando la asociación de sus subunidades (Stevens, 1970; Raina y Janne, 1975), y aumentando la fidelidad de la traducción (Hirashima y col., 1979; Goldemberg y Algranati, 1981). Se ha logrado demostrar que la síntesis proteica es el sistema más rápidamente afectado cuando se inhibe in vivo la síntesis de poliaminas (Pegg, 1986), de manera que es probable que muchos

de los cambios descriptos sean consecuencia directa de este efecto.

Se han dado asimismo numerosas evidencias de la interacción específica de las poliaminas con proteínas. Cochet y col. (1981) y Hara y Endo (1982) demostraron que una quinasa de proteína, denominada caseína quinasa de tipo 2, independiente de AMPc, GMPc, calcio, fosfolípidos y calmodulina, es activada por poliaminas. Es interesante señalar que uno de los mejores sustratos para esta quinasa es la ODC, cuya fosforilación resulta en la pérdida de su actividad (Daniels y col., 1981; Kuehn y Atmar, 1983).

La interacción de las poliaminas con fosfolípidos de membrana explicaría la gran variedad de efectos descriptos a este nivel, tales como la estabilización de mitocondrias aisladas (Tabor, 1960), la regulación de la entrada de calcio a la mitocondria (Nicchitta y Williamson, 1984), la modulación de la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (Thuren y col., 1986), la inhibición de la traslocación de la proteína quinasa C a la membrana plasmática (Moruzzi y col., 1987), la modulación de la unión específica de hormonas proteicas a sus receptores de membrana (Swift y Dias, 1986), el efecto fusógeno sobre liposomas (Meers y col., 1986), y la protección contra la peroxidación de fosfolípidos (Tadolini, 1988).

Finalmente, cabe destacar que las poliaminas podrían ser

importantes reguladores fisiológicos del pH y la fuerza iónica intracelulares. Recordemos que estos compuestos son los cationes más abundantes que la célula es capaz de sintetizar, y su concentración en organelas o espacios específicos de la célula podría resultar en la creación de microambientes de pH o fuerza iónica óptimos para determinados procesos.

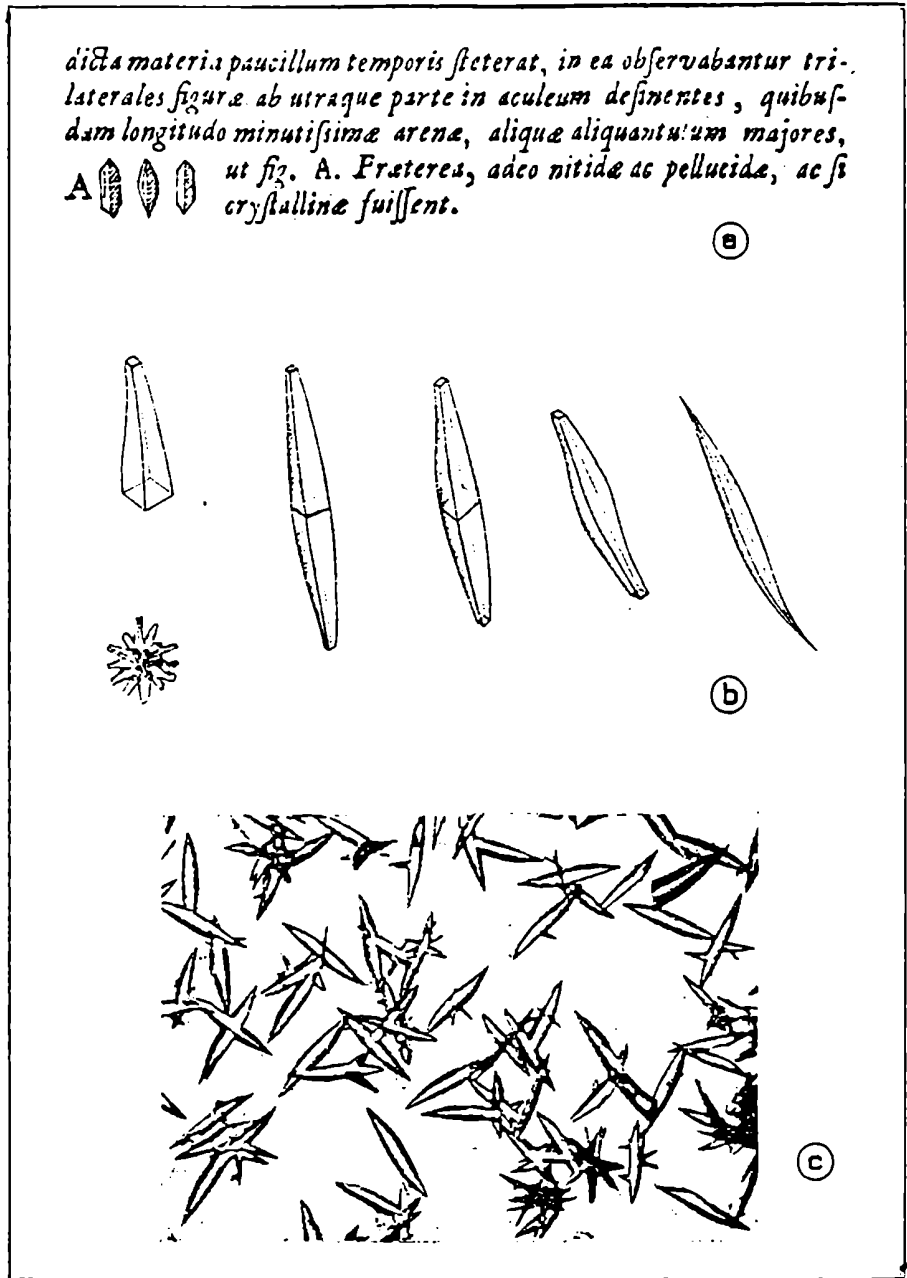
Los efectos a nivel molecular descritos reflejan claramente la importancia de las poliaminas en la replicación celular y el crecimiento. En cambio, el rol de estos compuestos en la diferenciación celular resulta mucho más difícil de elucidar. Una causa de esto es que la división celular y la diferenciación son, en muchos casos, procesos íntimamente asociados. Además, algunos tipos celulares requieren un aumento en los niveles de poliaminas, otros una disminución, mientras que en el caso de los mioblastos es necesario un aumento seguido por una disminución para la inducción de la diferenciación (Heby y col., 1987). Evidentemente, las poliaminas pueden ejercer efectos sobre mecanismos inductores o represores de la diferenciación, según sea el modelo en estudio. En consecuencia, es poco probable que se pueda establecer un mecanismo único para explicar el rol de las poliaminas en este tipo de procesos. No obstante, numerosos estudios en curso intentan aplicar los efectos moleculares conocidos de las poliaminas al proceso de

diferenciación de cada caso en particular.

### LAS POLIAMINAS EN EL TRACTO GENITAL MASCULINO

Como podemos deducir de lo expuesto, el estudio de las poliaminas representa un caso bastante particular dentro de la biología celular, ya que ningún otro tipo de compuestos orgánicos naturales ha sido involucrado en tan amplia variedad de procesos. De esto deriva el enorme interés que han suscitado en las últimas cuatro décadas, a pesar de lo cual son relativamente escasas las conclusiones inequívocas que se pueden inferir sobre su función.

Esto resulta aún más significativo, si se tiene en cuenta que las poliaminas figuran entre los primeros compuestos descritos en material biológico por la ciencia moderna. En una carta dirigida a la Royal Society, en la que comunica por primera vez la existencia de los espermatozoides, Antoni van Leeuwenhoek (1677) describe en su propio semen la presencia de "cuerpos de tres lados, que terminan cada extremo en un punto; algunos tienen la longitud del más pequeño grano de arena, y otros son algo mayores, como en la Fig. A. Son además tan brillantes y claros como cristales." (Figura 4). Dado su origen, esta sustancia fue llamada espermina. Desconociendo el descubrimiento de Leewenhoek, la espermina fue



**Figura 4.** Cristales de fosfato de espermina en semen humano, como fueron descritos por (a) Leewenhoek (1677), (b) Fuerbringer (1881) y (c) von Poehl (1898). Tomado de Mann (1964).

"redescubierta" por Vauquelin (1791) y posteriormente descrita en otros tejidos y fluidos corporales. En 1878, Schreiner identificó estos cristales como fosfatos de una base orgánica, y recién en 1924 se describió su fórmula molecular.

El plasma seminal de la mayoría de las especies contiene poliaminas en concentraciones milimolares, siendo el fluido animal más rico en estos compuestos. En contraste, el plasma seminal bovino contiene sólo trazas de poliaminas; esto fue atribuido, ya tempranamente, a la ausencia de una próstata funcional en esta especie. En efecto, la próstata es el principal órgano secretor de poliaminas hacia el semen (Piik y col., 1977), y la actividad ODC es particularmente alta en su lóbulo ventral (Fjosne y col., 1988). Este hecho no descarta la posibilidad de una síntesis y secreción de estos compuestos en otros órganos del tracto genital masculino, en atención al mantenimiento de sus funciones específicas.

La presencia de poliaminas parece ser importante ya a nivel testicular. Las células de Sertoli en cultivo producen poliaminas tanto en condiciones basales como de estimulación con FSH, hormona que produce una marcada activación de la ODC (Francis y col., 1981). Es muy probable que este proceso de síntesis y secreción de poliaminas por la célula de Sertoli sea requerido para el desarrollo normal de la espermatogénesis (Macindoe y Turkington, 1973). En relación a

esto, se sugirió (Oliva y col., 1982) que las poliaminas podrían ejercer una acción estabilizadora del ADN de la espermatide durante la transición nucleohistona-nucleoprotamina. Como ya mencionáramos, se demostró además una acción regulatoria de las poliaminas sobre la unión de FSH a su receptor (Swift y Dias, 1986).

Numerosos factores, actuando tanto en el sector tubular como en el intersticial, son capaces de estimular la ODC testicular, si bien en la mayoría de los casos se desconoce su implicancia fisiológica (Shah y Sheth, 1979; Madhubala y Reddy, 1980a, 1980b, 1981, 1982; Osterman y col., 1983a, 1983b, 1983c; Nakhla y Tam, 1985).

En órganos sexuales accesorios, los andrógenos son los principales reguladores de la síntesis y secreción de poliaminas. Las primeras evidencias al respecto fueron dadas por Pegg y Williams-Ashman (1968), quienes describieron una marcada inhibición de la actividad ODC de la próstata ventral de rata luego de la castración. Dicha inhibición es totalmente revertida por administración de testosterona. Los cambios en la actividad ODC se corresponden con los observados en el contenido glandular de putrescina y poliaminas (Pegg y Williams-Ashman, 1968; Moulton y Leonard, 1969; Pegg y col., 1970). Además, la estimulación de la síntesis de poliaminas por andrógenos se halla en estrecha relación con la unión de  $5\alpha$ -DHT a su receptor (Mangan y col., 1973).



Los efectos de los andrógenos sobre la actividad proliferativa y secretoria de la próstata han sido exhaustivamente estudiados. Entre la variedad de proteínas andrógeno-dependientes específicas de la próstata, merece mención una glicoproteína secretoria, fosforilable por una quinasa dependiente de poliaminas (Goueli y col., 1985), que une espermina con alta afinidad (Hiipakka y col., 1984).

Se considera que el aumento de la síntesis y acumulación de poliaminas en la próstata por estimulación androgénica es indicativo de la estimulación de la actividad secretoria, más que de la proliferación (Fuller y col., 1975; Takyi y col., 1977). Además, resulta difícil comprobar una relación entre acumulación de poliaminas y crecimiento tisular, al ser este órgano un activo secretor de poliaminas (Piik y col., 1977). En este sentido, la vesícula seminal es un mejor modelo para el estudio de la relación entre poliaminas y proliferación, por ser un órgano estrictamente andrógeno-dependiente y no segregar poliaminas. En este tejido se comprobó una relación entre la acumulación de espermidina inducida por andrógenos y la síntesis de ARN (Moulton y Leonard, 1969).

El hecho de que cantidades apreciables de poliaminas son depositadas en el tracto genital femenino durante la fecundación ha llevado a especular posibles efectos sobre la capacitación del espermatozoide y la fertilización. Fleming y

Armstrong (1985), utilizando compuestos relacionados de naturaleza catiónica, describieron un efecto estimulador sobre la reacción acrosomal, y Stanger y Quinn (1982) demostraron que la espermina estimula la fertilización in vitro de ovocitos de ratón. Estos efectos probablemente sean una consecuencia biológica de la interacción de las poliaminas con fosfolípidos de membrana. Más aún, la potente acción inmunosupresora del plasma seminal atribuida a algún producto de oxidación de la espermina (Allen y Roberts, 1987) permite suponer que las poliaminas seminales contribuirían a interferir en el reconocimiento del espermatozoide por el sistema inmune de la hembra.

De la alta concentración seminal de poliaminas producidas por el testículo y las glándulas accesorias de la mayoría de las especies, surge la necesidad de establecer los efectos que estos compuestos ejercerían directamente sobre el espermatozoide. Además de los ya mencionados, diversos estudios atribuyen funciones específicas de las poliaminas a este nivel (Shah y col., 1975; Sheth y col., 1976; Shah y Sheth, 1978; Pulkkinen y col., 1975, 1978; Casillas y col., 1980). Sin embargo, cabe destacar que virtualmente todos ellos fueron realizados sobre espermatozoides eyaculados o extraídos del segmento caudal del epidídimo, y no se ha prestado atención a la relación entre estos efectos y las modificaciones madurativas que suscitadamente hemos reseñado.

## OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

La información expuesta en las secciones anteriores intenta resumir los conocimientos actuales sobre la fisiología del testículo y el epidídimo. Asimismo, destaca la importancia de las poliaminas en la función celular, dando especial énfasis a su relación con el tracto genital masculino. Se desprende de las evidencias presentadas que el metabolismo de estos compuestos constituye un modelo apto para el estudio de la acción de hormonas sobre sus órganos efectores. Se decidió, entonces, aplicar este modelo al estudio de la acción de hormonas claramente involucradas en la función reproductiva del macho, tales como la prolactina y los andrógenos.

A fin de facilitar su análisis, los resultados del presente trabajo se presentan en dos unidades. En la primera de ellas se analizará la acción de la prolactina sobre la actividad ornitina descarboxilasa testicular, basándonos en que hasta el presente no se ha logrado establecer en forma inequívoca una respuesta aguda del testículo a esta hormona.

Los antecedentes existentes en la bibliografía demuestran las numerosas modificaciones que sufre el espermatozoide como resultado de su interacción con el epidídimo. Por otro lado, se han dado pruebas de la acción de las poliaminas sobre ciertas funciones del espermatozoide. En vista de estos

hechos, cabe preguntarse cuál sería la participación de las poliaminas de origen epididimario en las modificaciones funcionales del espermatozoide. La segunda parte de este trabajo comprende el análisis de los niveles de poliaminas y sus derivados acetilados en el epidídimo, la actividad de sus enzimas limitantes y su andrógeno-dependencia.

## MATERIALES Y METODOS

### Químicos

(1-<sup>14</sup>C)-L-ornitina (AE 49-56 mCi/mmol), (carboxil-<sup>14</sup>C)-S-adenosil-L-metionina (AE 60 mCi/mmol), (1,2-<sup>3</sup>H)-testosterona (AE 41,2 Ci/mmol), (1,2-<sup>3</sup>H)-5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (AE 50,6 Ci/mmol), (1,2-<sup>3</sup>H)-5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y <sup>125</sup>INa (AE 17,4 Ci/g) fueron adquiridos a New England Nuclear Co. (Boston, MA, USA). La L-ornitina fue purificada por evaporación y redisolución en HCl 0,1 N, seguido por una segunda evaporación y redisolución en HCl 0,01 N. Los clorhidratos de putrescina, espermidina y espermina y sus derivados acetilados, L-ornitina, fosfato de piridoxal, los esteroides no radiactivos y todos los reactivos empleados para la preparación de medios y soluciones buffer fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA); hidróxido de hyamina de Packard Instruments Co. Inc. (Downers Grove, ILL, USA). Los solventes utilizados provienen de Merck (Darmstadt, Rep. Federal de Alemania) o Sintorgan (Buenos Aires). El propionato de testosterona (PT) fue gentilmente cedido por Laboratorios Gador (Buenos Aires). La flutamida (F) fue cedida por Schering Canada, a través de la cortesía del Dr. Fernand Labrie. El acetato de ciproterona (AC) proviene de Schering, Rep. Federal de Alemania. La gonadotrofina coriónica humana

(hCG) fue cedida por Laboratorios Elea (Buenos Aires). El inhibidor de la ODC  $\alpha$ -difluormetilornitina (DFMO) fue provisto por Merrell Dow Co. (Cincinnati, OH, USA).

### Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, provistos por el criadero del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 22°C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, recibiendo dieta balanceada y agua ad libitum.

### Tratamientos

Las orquidectomías uni y bilaterales se efectuaron por vía escrotal bajo anestesia etérea, evitando el daño a los epidídimos.

Las hipofisectomías se efectuaron por vía auricular bajo anestesia etérea. Luego del sacrificio de los animales, se examinó la silla efectividad de las extracciones, descartándose aquellos animales que presentaron restos de hipófisis.

Los andrógenos (T, PT, DHT y 3 $\alpha$ -diol) y el acetato de ciproterona se administraron por vía subcutánea, en solución en aceite de maíz. La flutamida se administró por vía subcu-

tánea en 2 aplicaciones diarias, en forma de suspensión en solución de NaCl 0,9% conteniendo 1% de gelatina.

La prolactina ovina (PRLo, NIH PS-12) se disolvió en solución de NaCl 0,9%, ajustada a pH 9,0 con NaOH 0,1 N, y se administró por vía subcutánea.

La hCG se disolvió en solución de NaCl 0,9%, pH 7,4, y se administró por vía subcutánea.

La sulpirida (Vipral, Laboratorios Roemmers, Buenos Aires) se administró a la dosis de 10 mg, en un volumen de 200 µl, por vía intraperitoneal.

#### Preparación de sobrenadantes para las determinaciones enzimáticas

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Se disecaron testículos y epidídimos, que se liberaron del tejido graso circundante, y se colocaron inmediatamente en recipientes en baño de agua helada. Todos los pasos siguientes hasta las determinaciones se realizaron entre 0 y 4°C. En el caso de no utilizarse inmediatamente, los órganos fueron congelados a -20°C por un período no mayor de 14 días.

Para la determinación de la actividad ODC, los tejidos frescos o rápidamente descongelados se cortaron finamente y se homogeneizaron en buffer Tris 10 mM, EDTA 1,5 mM, DTT 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, sacarosa 0,25 M, pH 7,4 a 25°C, en la

relación 2 ml/g de tejido en el caso del testículo, y 10 ml/gr para el epidídimo. Para la determinación de la actividad SAMDC, la homogeneización se realizó en buffer fosfato 0,05 M, pH 7,4 a 25°C, conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM (5 ml/gr de tejido). Los homogenatos se centrifugaron a 20.000xg durante 30 minutos. Se separaron los sobrenadantes libres del material graso superficial, los cuales se utilizaron inmediatamente para la determinación de las actividades enzimáticas.

#### Tratamiento de los sobrenadantes para la eliminación de los sustratos endógenos

Para la determinación de los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) de ambas enzimas, y la dependencia de putrescina de la actividad SAMDC, alícuotas de 1 ml de los sobrenadantes fueron filtradas a través de una columna de Sephadex G-25 de 8 ml de lecho. La elución se realizó en fracciones de 0,5 ml utilizando el buffer de homogeneización, y se colectaron las fracciones conteniendo proteína. Las preparaciones fueron concentradas por filtración a través de microconcentradores Centricon-10 (Amicon Division, Danvers, MA, USA) hasta un volumen de 1 ml.



### Aislamiento de túbulos seminíferos y células intersticiales

Se utilizó la técnica descrita por Mendelson y col. (1975) basado en la dispersión por colagenasa. Los testículos descapsulados fueron colocados en tubos de plástico e incubados en Medio 199 conteniendo 0,3 mg/ml de colagenasa tipo I, en la relación 1 ml de medio por gramo de tejido. Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 10-15 minutos, en atmósfera de 95% O<sub>2</sub> -5% CO<sub>2</sub> con agitación constante. Las incubaciones se detuvieron por dilución con 40 ml de Medio 199 frío sin colagenasa. Se dispersaron los túbulos por agitación rotatoria durante 3 minutos, se dejaron decantar y se aspiraron los sobrenadantes conteniendo las células intersticiales, las cuales se colectaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos a 0-4°C. Se efectuó una segunda colagenización sobre los túbulos seminíferos, esta vez descartando los sobrenadantes. Ambas fracciones (células intersticiales y túbulos seminíferos) se lavaron en buffer de homogeneización, se centrifugaron y se conservaron a -20°C.

### Incubación de cortes de epidídimo

Epidídimos de ratas de 45 días, castradas 24 horas antes, fueron cortados en segmentos de aproximadamente 2 mm de espesor, e incubados en Medio 199 conteniendo glutatión redu-

cido 1 mM, en presencia de T 100 nM con o sin 10 µg/ml de cicloheximida. Las incubaciones se realizaron durante 6 horas a 34°C bajo atmósfera de 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub>. Se removió el medio de incubación, se lavaron los segmentos en buffer de homogeneización y se mantuvieron congelados a -20°C hasta la determinación de la actividad ODC.

#### Obtención de espermatozoides epididimarios

Epidídimos de ratas de 90 días de edad se dividieron en segmentos correspondientes a cabeza cuerpo y cola. Se efectuó una incisión en cada uno de ellos, y se incubaron en 2 ml de solución salina (NaCl 0,9%) durante 30 minutos a 37°C con agitación. Los espermatozoides liberados a la solución fueron colectados por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos, resuspendidos en solución salina y contados en cámara de conteo.

#### Determinación de la actividad ornitina descarboxilasa

La determinación de la actividad ODC se realizó por el método descrito por Pegg y col. (1970), con leves modificaciones. Alícuotas de 100 µl de los sobrenadantes fueron agregadas a 100 µl de buffer conteniendo Tris 80 mM, L-ornitina 2 mM, fosfato de piridoxal 0,4 mM, DTT 9 mM,

pH 7,2, al cual se agregaron en el momento de la determinación 2,0  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{14}\text{C}$ -ornitina. Las incubaciones se realizaron en frascos de 10 ml cerrados con tapa de goma, durante 60 minutos a 34°C. Finalizadas las incubaciones, se inyectaron a cada frasco 500  $\mu\text{l}$  de solución de ácido tricloroacético (TCA) 40%, con el objeto de inactivar la enzima y liberar el  $^{14}\text{CO}_2$  retenido en el buffer. Las incubaciones se continuaron durante 30 minutos a 34°C. El  $^{14}\text{CO}_2$  liberado se atrapó en recipientes de plástico suspendidos en el interior de los frascos, conteniendo 150  $\mu\text{l}$  de hidróxido de hyamina 1 M en metanol. Se contó la radiactividad de los recipientes en solución centellante (0,4% PPO y 0,004% POPOP en tolueno) con una eficiencia del 90%. En incubaciones paralelas en las que no se agregó enzima y se agregaron 0,2  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{HNa } ^{14}\text{CO}_3$ , se determinó que el  $\text{CO}_2$  atrapado constituye el 64% del total. Los resultados se expresan en pmoles de  $\text{CO}_2$  liberados/h/mg de proteína o pmoles/h/órgano.

#### Determinación de la actividad S-adenosil-L-metionina descarboxilasa

La actividad SAMDC se determinó por la velocidad de liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de (carboxil- $^{14}\text{C}$ )-SAM, según el método descrito por Pegg y Williams-Ashman (1969) con modificaciones. Alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes se

mezclaron con 200  $\mu$ l de buffer fosfato 50 mM, pH 7,4, conteniendo DTT 2,5 mM, putrescina 6 mM, p-toluensulfonato de SAM 0,4 mM, al cual se agregó en el momento de la determinación 1  $\mu$ Ci/ml de ( $^{14}$ C)-SAM. Las incubaciones se realizaron a 34°C durante 60 minutos, en recipientes iguales a los utilizados para la determinación de la actividad ODC. Las reacciones se detuvieron por el agregado de 500  $\mu$ l de TCA 40%. Se continuaron las incubaciones durante 30 minutos, y se contó la radiactividad de la misma forma que para la determinación de actividad ODC. Los resultados se expresan en pmoles de CO<sub>2</sub> liberados/h/mg de proteína o pmoles/h/órgano.

#### Determinación de putrescina y poliaminas

La determinación del contenido epididimario de putrescina, espermidina y espermina se realizó por el método descrito por Dion y Herbst (1970). Los epidídimos se cortaron y homogeneizaron en ácido perclórico 0,2 N, en la relación 5 ml/g de tejido. Para las determinaciones en espermatozoides, éstos fueron centrifugados y resuspendidos directamente en el ácido. Las suspensiones se incubaron durante 2 horas a 0-4°C. Se centrifugaron las muestras a 20.000xg durante 30 minutos. Alícuotas de 100  $\mu$ l de los sobrenadantes se alcalinizaron con 100  $\mu$ l de solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y se mezclaron con 200  $\mu$ l de solución de cloruro de dansilo

(20 mg/ml) en acetona. Se incubaron las muestras entre 12 y 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. El exceso de cloruro de dansilo se eliminó por el agregado de 50 µl de solución de prolina (100 mg/ml) en agua, continuándose las incubaciones durante 1 hora. Las muestras se evaporaron a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub> a 45-50°C y se resuspendieron en 200 µl de agua. Los derivados dansilados de las poliaminas se extrajeron selectivamente con 200 µl de tolueno. Luego de la separación de las fases por centrifugación y congelamiento, alícuotas de 50 µl de los extractos orgánicos se sembraron en placas de gel de sílice de 250 µm de espesor, activadas por calentamiento a 110°C durante 1 hora. Paralelamente, se dansiló una mezcla de standards de putrescina, espermidina y espermina, conteniendo 10 nmoles de cada compuesto, y se continuó el procedimiento de la misma forma que la descrita para las muestras. Se sembraron sobre las placas volúmenes de los extractos conteniendo cantidades de poliaminas en el rango 0,25-2 nmoles. Las muestras se cromatografiaron en la oscuridad, efectuándose 2 corridas en ciclohexano-acetato de etilo (1:1, vol/vol), seguido por una tercera corrida en ciclohexano-acetato de etilo (3:2, vol/vol). Finalizadas las corridas, se rociaron las placas con una mezcla de trietanolamina-isopropanol (1:4, vol/vol) con el fin de estabilizar la fluorescencia de los derivados dansilados. Se identificaron las bandas correspondientes a

didansilputrescina, tridansilespermidina y tetradansilespermina por irradiación con luz UV de longitud de onda 366 nm. Los derivados se eluyeron de las placas en 1 ml de benceno-trietilamina (95:5, vol/vol) y se determinó la fluorescencia de las soluciones en un espectrofluorómetro por excitación a 350 nm y emisión a 490 nm. Los resultados se expresan en nmoles/g de tejido o nmoles/órgano.

#### Determinación de acetilputrescina y acetilpoliaminas

El análisis de acetilputrescina y acetilpoliaminas se realizó en forma análoga a la descrita para putrescina y poliaminas, con las siguientes modificaciones: 1) los standards para las curvas de calibración fueron acetilputrescina, N<sup>1</sup>-acetilespermidina, N<sup>3</sup>-acetilespermidina y N<sup>1</sup>-acetilespermina, utilizándose 10 nmoles de cada compuesto para la dansilación; 2) los tejidos fueron homogeneizados en la mínima cantidad de ácido perclórico posible (400 µl para epidídimos de ratas intactas y 200 µl para los de ratas castradas); 3) para eliminar la interferencia de la putrescina y las poliaminas, se efectuaron 2 corridas en acetato de etilo, y se separaron los acetilderivados por una tercera corrida en CHCl<sub>3</sub>:CCl<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>OH (14:6:1); 4) las bandas correspondientes a cada compuesto se eluyeron en 500 µl de benceno-trietilamina (95:5).

### Determinación de hormonas esteroides

Para las determinaciones en suero, se colectó sangre truncal, la cual se centrifugó a 2.000 rpm durante 15 minutos luego de un período de 2 horas a temperatura ambiente. Los sueros se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de las evaluaciones. Los tejidos se conservaron en acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

La determinación de la concentración sérica de andrógenos se realizó según el método utilizado corrientemente en el laboratorio (Suescun y col., 1985). Alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de los sueros se extrajeron 2 veces con 2 ml de éter etílico; los extractos etéros se evaporaron a sequedad, y los residuos se resuspendieron en 800  $\mu\text{l}$  de buffer conteniendo  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  40 mM,  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  35 mM, NaCl 0,15 M, gelatina 0,1% y azida sódica 0,1%, pH 7,4. El análisis de las suspensiones se realizó por radioinmunoensayo (RIA). Debido a que el anti-suero utilizado, preparado contra T, presenta reacción cruzada con DHT, los resultados se expresan como la suma T + DHT, en ng/ml. El límite inferior de detección fue de 12,5 pg, y los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron menores del 12%.

La concentración intratisular de andrógenos se determinó por el método validado en nuestro laboratorio (Suescun y

col., 1985). Con el fin de eliminar interferencias del RIA, los tejidos se homogeneizaron en 5 ml de acetona, se centrifugaron las suspensiones resultantes a 2000 rpm durante 10 minutos, y los sobrenadantes se evaporaron a sequedad. Luego de la resuspensión en 1 ml de agua bidestilada, las muestras fueron calentadas a 50°C durante 10 minutos y agitadas vigorosamente. Las suspensiones fueron extraídas con 10 ml de éter etílico, las fracciones etéras evaporadas a sequedad y resuspendidas en 2 ml de CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (7:3, vol/vol). Las suspensiones fueron extraídas con 2 ml de n-hexano, y se descartó la fase superior. Finalmente, se agregó a cada tubo 6 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se agitaron las suspensiones y se descartó nuevamente la fase superior. Se evaporó la fase inferior a sequedad, y los residuos se resuspendieron en buffer de RIA. Para evaluar las pérdidas por el procesamiento, se agregaron a las muestras 6000 dpm de los esteroides radiactivos como standards internos. El contenido de DHT y 3 $\alpha$ -diol en las suspensiones se determinó por RIA con anticuerpos altamente específicos (Immunotech Diagnostic, Montreal, Canada). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron menores del 12% para DHT y del 14% para 3 $\alpha$ -diol. La sensibilidad para ambos esteroides fue de 12,5 pg. La recuperación fue de 70,7  $\pm$  2,4%. Los resultados se expresan en ng/g de tejido.



### Determinación de hormonas proteicas

Las concentraciones séricas de hormona luteinizante (LH) y prolactina (PRL) se determinaron por RIA, utilizando una técnica de doble anticuerpo, sobre 50 y 200µl de suero, respectivamente. Las incubaciones con el primer anticuerpo se realizaron a 4°C durante 24 horas. Se agregó posteriormente la hormona marcada y, luego de 24 horas, el segundo anticuerpo. Se continuaron las incubaciones durante 24 horas a 4°C. La hormona libre se separó por centrifugación y aspiración de los sobrenadantes, y se determinó la radiactividad de los precipitados. Los resultados se expresan en ng/ml con respecto a los standards RP-1 del NIAMDD Rat Pituitary Distribution Program. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron menores del 7% para PRL y 11% para LH. La sensibilidad del ensayo fue de 1,7 ng/ml de suero para PRL y 2 ng/ml de suero para LH.

### Determinación de la bioactividad de LH

La bioactividad de LH en suero se determinó por la estimulación de la producción de T por células intersticiales testiculares (Sardaños y col., 1987). Las determinaciones se realizaron sobre sueros sin congelar, inmediatamente luego de

la decapitación. Se obtuvo una suspensión de células intersticiales por colagenización de testículos de ratas adultas, en un procedimiento análogo al descrito anteriormente. Alícuotas de la suspensión obtenida, conteniendo aproximadamente  $10^6$  células, fueron incubadas en presencia del standard I-5 de LH en el rango 0,18-1,5 ng, o de diferentes alícuotas de suero, durante 3 horas a 34°C. Finalizadas las incubaciones, se centrifugaron las suspensiones y se determinó, por RIA, la concentración de T liberada al medio de incubación. Los resultados se expresan en ng/ml de suero, con respecto al standard LH I-5

#### Examen histológico y morfométrico de los tejidos

Los tejidos fueron embebidos en formol 40%, deshidratados e incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 5  $\mu$ m de espesor y se procedió a su montaje para la coloración con hematoxilina-eosina. Los preparados fueron analizados y fotografiados con un aumento de 400 veces. Las determinaciones morfométricas (altura epitelial y diámetro tubular) se realizaron utilizando una grilla cuadrada.

#### Determinación de proteínas

Se realizó por el método de Lowry (1951), utilizando albú-

mina sérica bovina (BSA) como standard.

### Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se analizaron por el test de Student en el caso de 2 grupos, y por análisis de varianza y test de Duncan en el caso de más de 2 grupos (Li, 1964).

# I. ACTIVIDAD ORNITINA DESCARBOXILASA COMO MARCADORA DE LA ACCION DE LA PROLACTINA EN EL TESTICULO

## INTRODUCCION

Si bien la acción de la PRL se consideró inicialmente restringida al inicio y mantenimiento de la lactancia, se atribuye en la actualidad a esta hormona una variedad de efectos relacionados con el crecimiento, el metabolismo y la función reproductiva.

En los últimos años ha sido inequívocamente demostrada la participación de la PRL en la función reproductiva del macho. Los primeros estudios al respecto fueron realizados en una cepa de ratones genéticamente deficientes en PRL (Bartke, 1965). Estos animales son infértiles a pesar de mantener niveles normales de gonadotrofinas, y su fertilidad es restablecida por tratamiento con PRL.

Una segunda serie de evidencias proviene de estudios realizados en el hamster. En esta especie, la exposición a fotoperíodos cortos provoca la disminución de los niveles circulantes de PRL, LH, FSH y andrógenos, que resulta en una marcada disminución de la fertilidad (Bex y col., 1978). Todas estas alteraciones son revertidas por la restauración de los niveles de PRL, a través de la administración de PRL o bien por el implante de hipófisis bajo la cápsula renal

(Bartke y col., 1980).

La acción de la PRL sobre la esteroidogénesis testicular fue estudiada en diferentes modelos experimentales. En el ratón, la PRL regula el contenido intratesticular de colesterol esterificado (Bartke, 1969) y la actividad 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa testicular (Hafiez y col., 1971). Belanger y col. (1981) demostraron que la administración de esta hormona incrementa los niveles séricos e intratesticulares de andrógenos a las 2 horas post-tratamiento. Otros trabajos, mediante tratamientos in vivo (Purvis y col., 1979) demuestran que la PRL es capaz de estimular la producción de andrógenos in vitro por células intersticiales.

Se ha involucrado además a esta hormona en el inicio de la pubertad, al comprobarse que su síntesis y secreción es incrementada en la etapa prepuberal (Negro-Vilar y col., 1973) y que la hiperprolactinemia resultante del implante de dos hipófisis bajo la cápsula renal va acompañada por una maduración sexual precoz (De Jong y Van der Schoot, 1979).

La interpretación de los estudios in vivo sobre animales intactos merece especial precaución, dado que en estas condiciones una hiperprolactinemia crónica moderada resulta en un aumento de los niveles de LH (Baraño y col., 1982) y del número de receptores de LH en las células de Leydig (Purvis y col., 1979), alterándose de esta manera la sensibilidad a la gonadotrofina. No obstante, la descripción de sitios recep-

tores específicos para PRL en la membrana plasmática de las células intersticiales testiculares (Charreau y col., 1977) sugiere que la PRL también ejerce un efecto directo en el testículo.

Sin embargo, aun en animales hipofisectomizados resulta difícil distinguir una acción per se de la PRL de la acción sinérgica que ejerce con la LH a nivel testicular (Hafiez y col., 1972a, 1972b; Purvis y col., 1979). En este sentido, es interesante destacar que la internalización del receptor de LH provocada por dosis desensibilizantes de esta hormona es acompañada por la internalización conjunta del receptor de PRL (Davies y col., 1980), lo cual sugiere una asociación física entre ambas entidades en la membrana plasmática, en concordancia con la función de la PRL como moduladora de la acción de la LH.

Cabe señalar que si bien la PRL, actuando a través de diversos mecanismos, parece ser esencial para el mantenimiento de la función testicular, la elevación de los niveles séricos de PRL muy por encima de los hallados en condiciones fisiológicas provoca un efecto claramente anti-gonadal. Así, la hiperprolactinemia inducida por implantación de un tumor productor de PRL provoca una marcada involución testicular (Fang y col., 1974), fenómeno atribuible, al menos en parte, al descenso en los niveles de gonadotrofinas (Celotti y col., 1978). Este efecto bifásico de la

PRL evidencia la necesidad de mantener determinados niveles de la hormona para una función testicular normal, pero por debajo de cierto umbral.

Los experimentos inversos, es decir los basados en el descenso de los niveles séricos de PRL, conducen a resultados contradictorios, por cuanto algunos autores describen que el tratamiento crónico con el agonista dopaminérgico bromocriptina provoca una caída de los niveles séricos de testosterona (Baraño y col., 1981) y una disminución de la concentración intratesticular y de la producción in vitro de andrógenos (Suescun y col., 1985), mientras que otros encuentran sólo cambios insignificantes en los niveles de testosterona (Huhtaniemi y Catt, 1981; Waeber y col., 1983). Esta disparidad de efectos podría atribuirse a diferencias en sensibilidad a la PRL en función del estadio de maduración sexual (Kovacevic y col., 1982) y al efecto bifásico, dosis-dependiente, de la PRL recientemente descrito en testículo perfundido (Fung y col., 1989).

De los antecedentes presentados se desprende que existen numerosas controversias acerca de la acción de la PRL sobre el testículo. En particular son escasos los datos referentes a la respuesta aguda del testículo a esta hormona, es decir en el término de horas luego de su administración. En esta sección describiremos la acción de la PRL sobre la actividad ODC testicular. Como se ha mencionado en párrafos ante-

riores, numerosas hormonas o factores como LH, FSH y AMPc (Reddy y Vिलlee, 1975), prostaglandinas (Madhubala y Reddy, 1980a, 1980b), catecolaminas (Madhubala y Reddy, 1981), LHRH (Madhubala y Reddy, 1982), factor de crecimiento epidérmico (Stastny y Cohen, 1972), factor de crecimiento transformante (Nakhla y Tam, 1985) y arginina vasopresina. (Reddy y col., 1986) son potentes estimuladores de la ODC testicular, cuando son administrados in vivo. La actividad ODC también fue utilizada como marcadora del proceso de desensibilización testicular provocado por norepinefrina, gonadotrofinas, prostaglandina E y arginina vasopresina (Madhubala y Reddy, 1984a, 1984b, 1985; Reddy y col., 1987). Curiosamente, el efecto activador de las gonadotrofinas es bloqueado por inhibidores  $\alpha$ -adrenérgicos (Madhubala y Reddy, 1983), desconociéndose la implicancia fisiológica de este fenómeno. En esquemas in vitro, ha podido demostrarse el efecto estimulatorio de las gonadotrofinas y el AMPc sobre la ODC de testículo total (Osterman y col., 1983a), LH sobre células de Leydig purificadas (Osterman y col., 1983a) y FSH sobre células de Sertoli en cultivo (Francis y col., 1981). En células intersticiales aisladas de rata, la estimulación de la ODC por LH aparentemente no guarda una relación directa con la estimulación de la producción de testosterona (Osterman y col., 1983b, 1983c), en concordancia con los resultados obtenidos en conejo (Young Lai, 1982).



Por otra parte, es reconocida la capacidad de la PRL de estimular la actividad ODC de diferentes órganos efectores. En explantes de glándula mamaria, se comprobó una acción conjunta de la insulina y la PRL para la estimulación de la ODC (Oka y Perry, 1976), efecto aparentemente mediado por la activación de la proteína quinasa C (Rillema, 1985). El tratamiento con PRL también incrementa marcadamente la ODC de hígado, riñón, glándula adrenal y timo (Richards, 1975). Entre las glándulas sexuales anexas, la próstata presenta una actividad ODC estimulable por PRL, si bien su acción se encuentra restringida al lóbulo lateral (Rui y Purvis, 1987). Resulta interesante destacar que en una variedad de tejidos efectores, el efecto estimulador de la PRL sobre la actividad ODC es bloqueado por ciclosporina, un antibiótico que interactúa con fosfolípidos de membrana y que podría utilizarse como bloqueante específico del receptor de PRL (Russell y col., 1984).

Para el desarrollo de los experimentos de esta sección se utilizaron ratas de 40 días, basándonos en que a dicha edad la PRL parece ejercer una importante acción sobre la función reproductiva, y en que la sensibilidad a esta hormona es menor en etapas más avanzadas del desarrollo sexual (Negro-Vilar y col., 1977).

## RESULTADOS

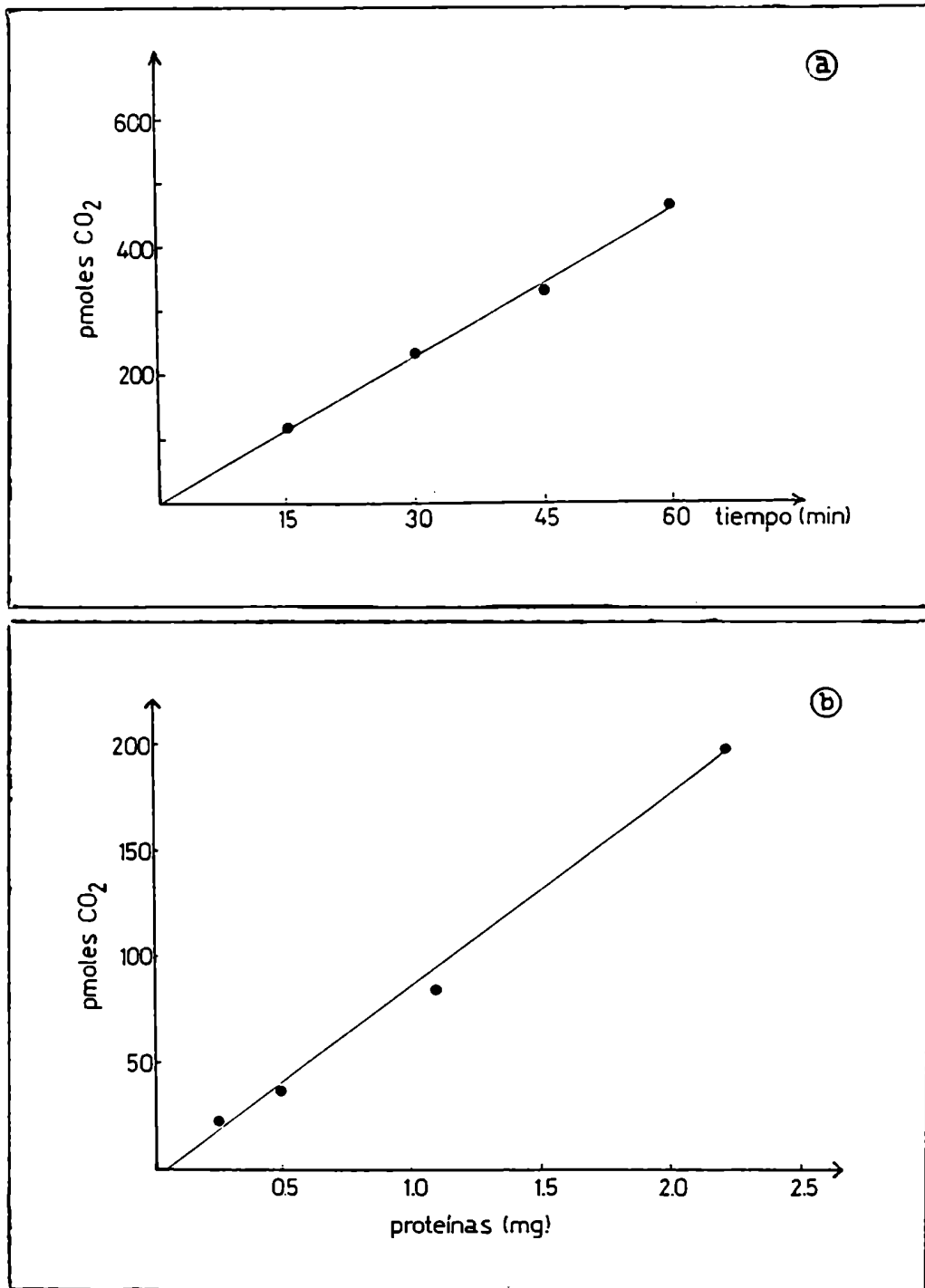
### Actividad ornitina descarboxilasa testicular

En nuestras condiciones de ensayo, la liberación de CO<sub>2</sub> a partir de ornitina por extractos de testículo resultó ser lineal con el tiempo de incubación hasta los 60 minutos (Figura 5a) y con la cantidad de proteína hasta los 2 mg (Figura 5b).

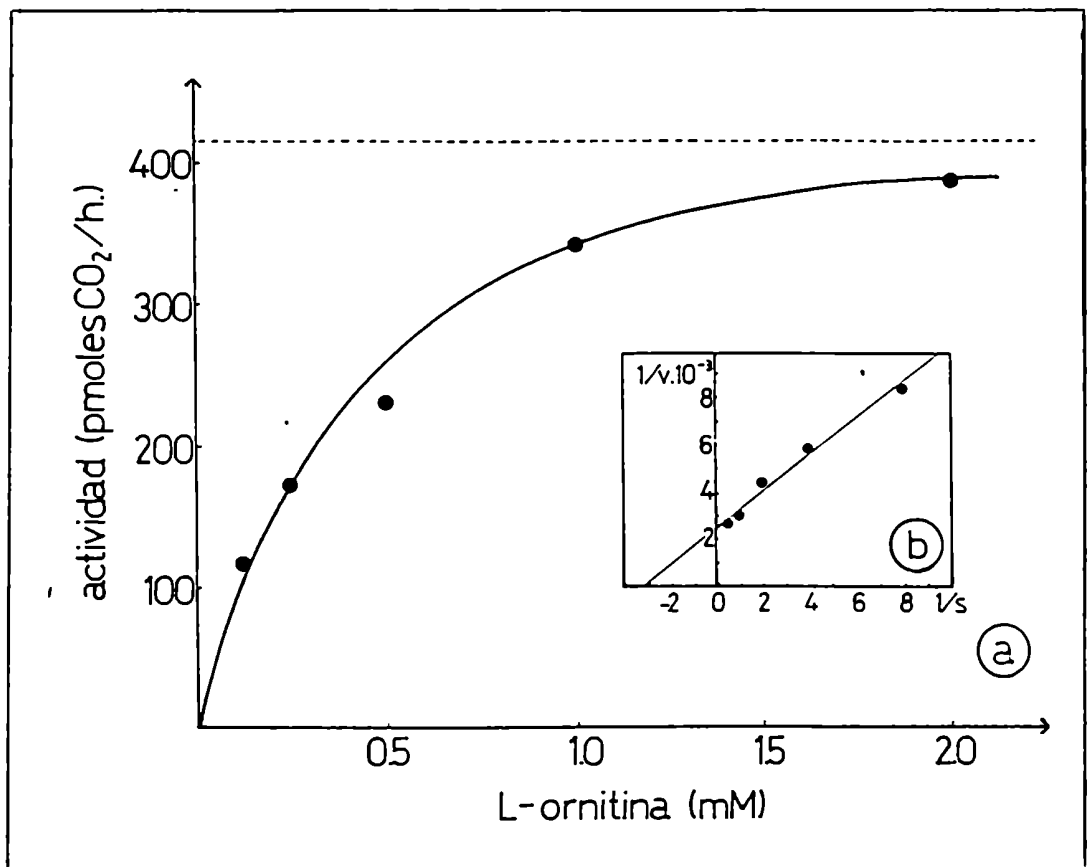
El análisis de Lineweaver-Burk se realizó en presencia de una cantidad constante (0,2  $\mu$ Ci) de <sup>14</sup>C-ornitina, y cantidades crecientes de ornitina, en concentraciones finales hasta 2 mM. La velocidad de reacción se determinó calculando la actividad específica de la ornitina en cada punto. Se obtuvo un valor de Km de 0,32 mM (Figura 6). Para las determinaciones subsiguientes, se trabajó a una concentración final de ornitina 1 mM.

La actividad ODC fue completamente inhibida en presencia de DFMO 1 mM, obteniéndose valores de radiactividad iguales a los blancos de reacción. Tampoco se detectó actividad en ausencia de fosfato de piridoxal.

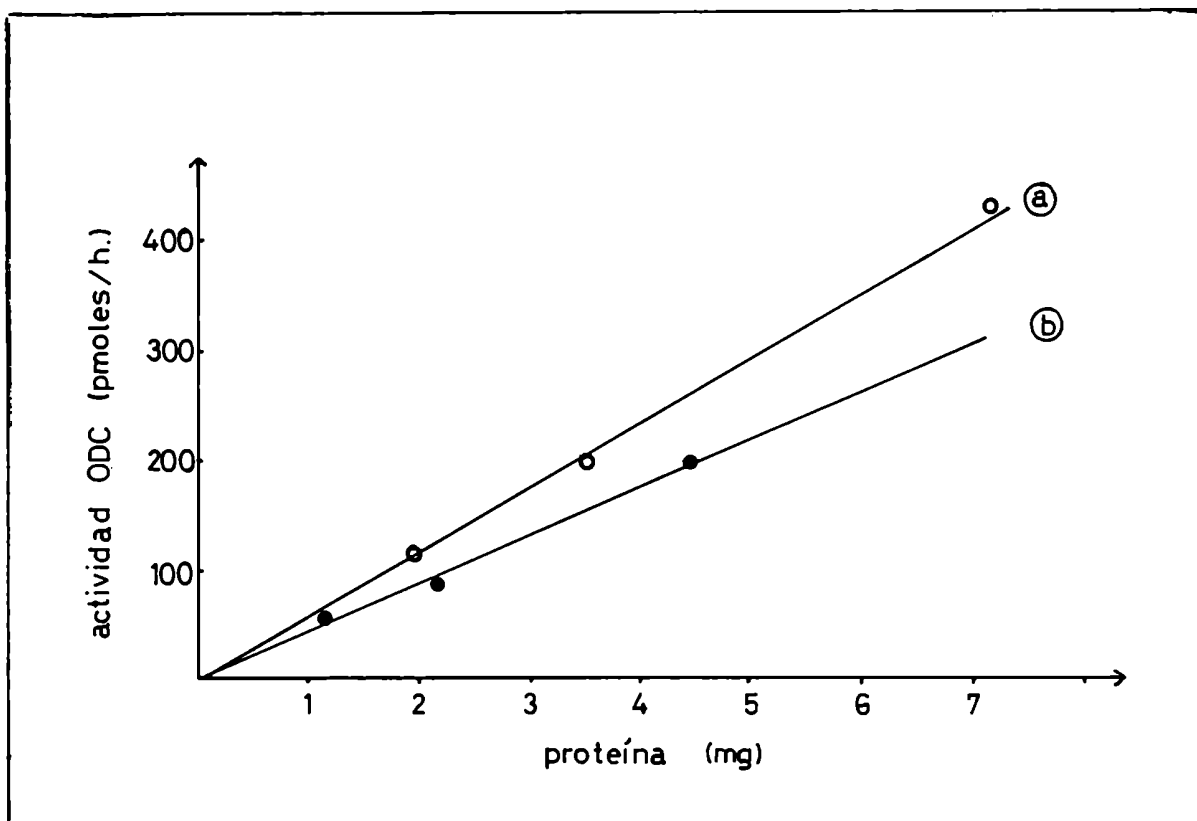
La determinación de la actividad ODC en preparaciones de túbulos seminíferos y células intersticiales reveló valores comparables en ambos compartimientos, cuando se expresan por mg de proteína (Figura 7). En base a estos valores, y a la



**Figura 5.** Actividad ODC testicular. a: linealidad con el tiempo de incubación. b: linealidad con la cantidad de proteína. Los valores corresponden a la actividad proveniente de testículos de 5 animales homogeneizados conjuntamente.



**Figura 6.** Actividad ODC testicular. a: curva de saturación. b: transformación de los datos por el método de Lineweaver-Burk.  $K_m = 0,32 \text{ mM}$ .  $r = 0,992$ .



**Figura 7.** Actividad ODC en preparaciones de túbulos seminíferos (a) y células intersticiales aisladas (b). Los valores corresponden a la actividad proveniente de testículos de 5 animales homogeneizados conjuntamente. Túbulos seminíferos: 57,4 pmoles/h/mg de proteína. Células intersticiales: 42,9 pmoles/h/mg de proteína.

cantidad de proteína por testículo en cada sector calculada en el mismo experimento, se calculó el aporte de los túbulos seminíferos y las células intersticiales a la actividad ODC total del testículo. Los valores hallados fueron 5800 pmoles/h/testículo para el sector tubular y 256 pmoles/h/testículo para el sector intersticial.

#### Ritmo circadiano de la actividad ODC testicular

Se sacrificaron grupos de 4 animales cada 2 horas, utilizando luz roja en el período de oscuridad. Se congelaron los testículos y se analizó la actividad ODC de todas las muestras en la misma determinación. Como se observa en la Figura 8, se inicia un aumento de la actividad al final del período de oscuridad, con un pico a las 11:00 h, un descenso progresivo hasta las 15:00 h y un nadir hacia las 23:00 h.

En base al perfil obtenido, y con el objeto de evitar el enmascaramiento de los efectos por el pico de la mañana, los experimentos siguientes se iniciaron a las 15:00 h.

#### Efecto de la prolactina en ratas intactas

La administración de una única inyección de PRL ovina resultó en la activación de la ODC determinada en testículo total. Según se observa en la Figura 9a, la activación es

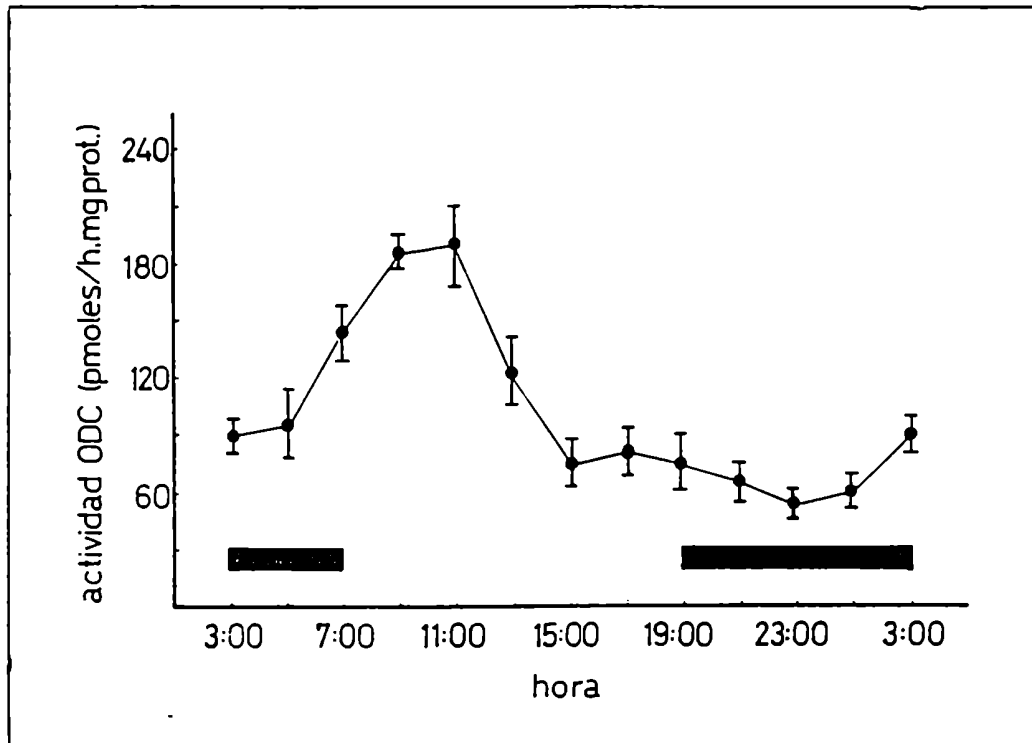
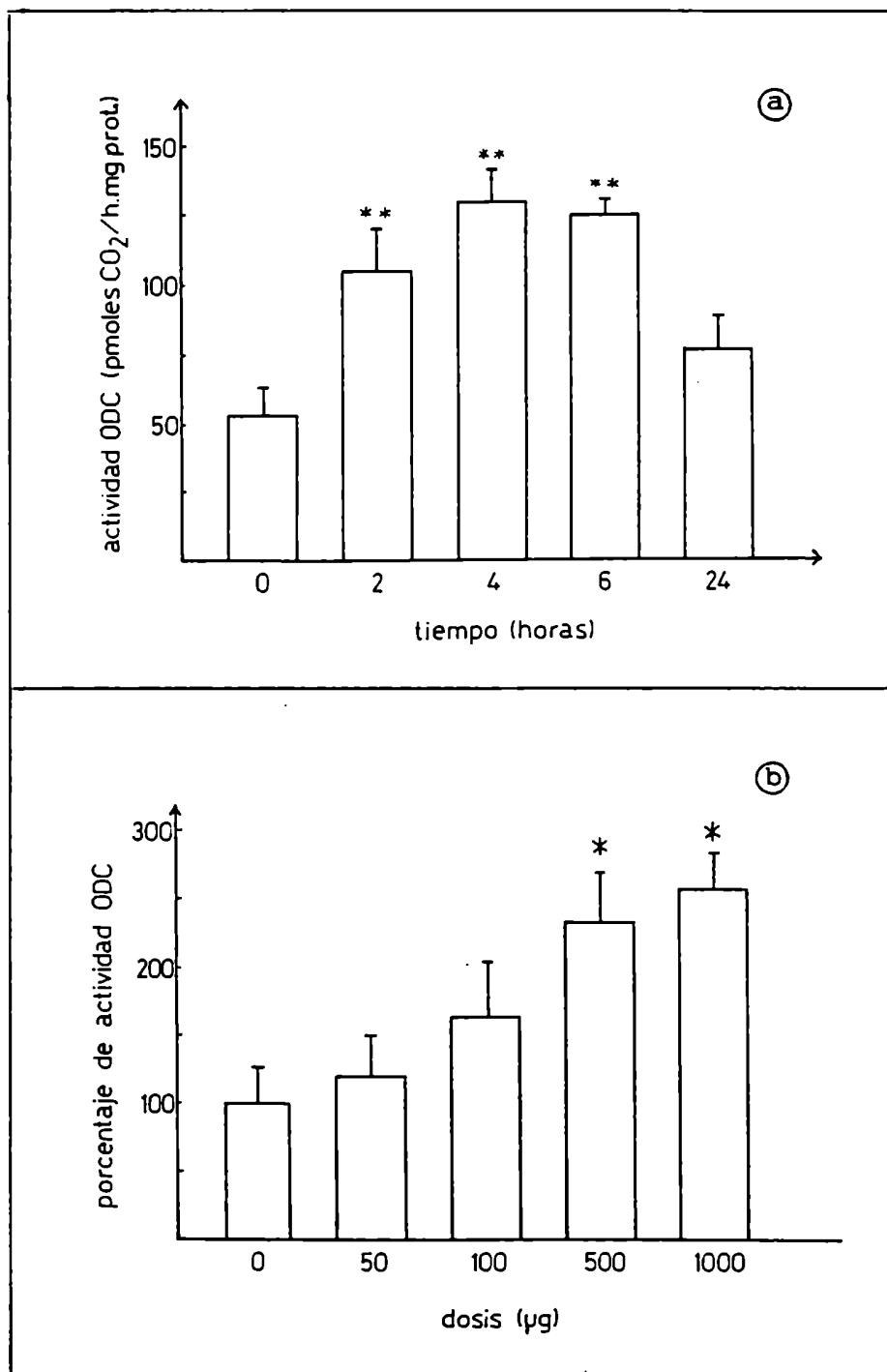


Figura 8. Ritmo circadiano de la actividad ODC testicular. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 4 determinaciones individuales. ████████ , período de oscuridad.



**Figura 9.** Efecto de una única dosis de PRL ovina sobre la actividad ODC testicular. a: actividad en función del tiempo post-tratamiento (dosis administrada: 1000 µg). b: actividad en función de la dosis administrada (tiempo: 4 horas) . Los valores representan promedios ± ES de 4 determinaciones individuales. \* P < 0,05. \*\* P < 0,01.



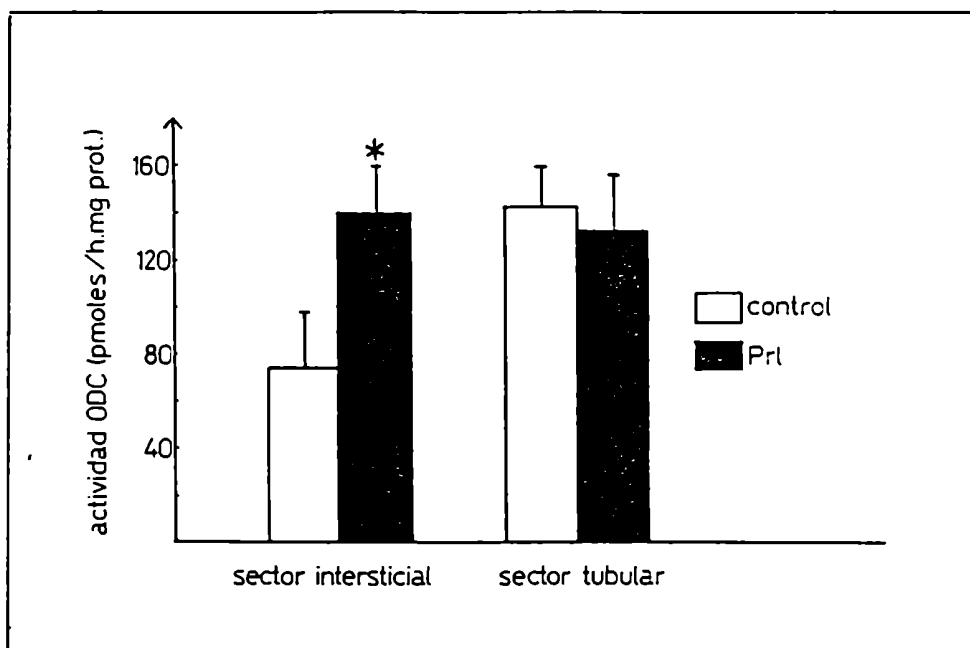
máxima a las 4 horas luego de la inyección, llegando nuevamente a valores cercanos a los basales luego de 24 horas.

El efecto observado es dosis-dependiente y estadísticamente significativo a partir de 500  $\mu\text{g}$  (Figura 9b).

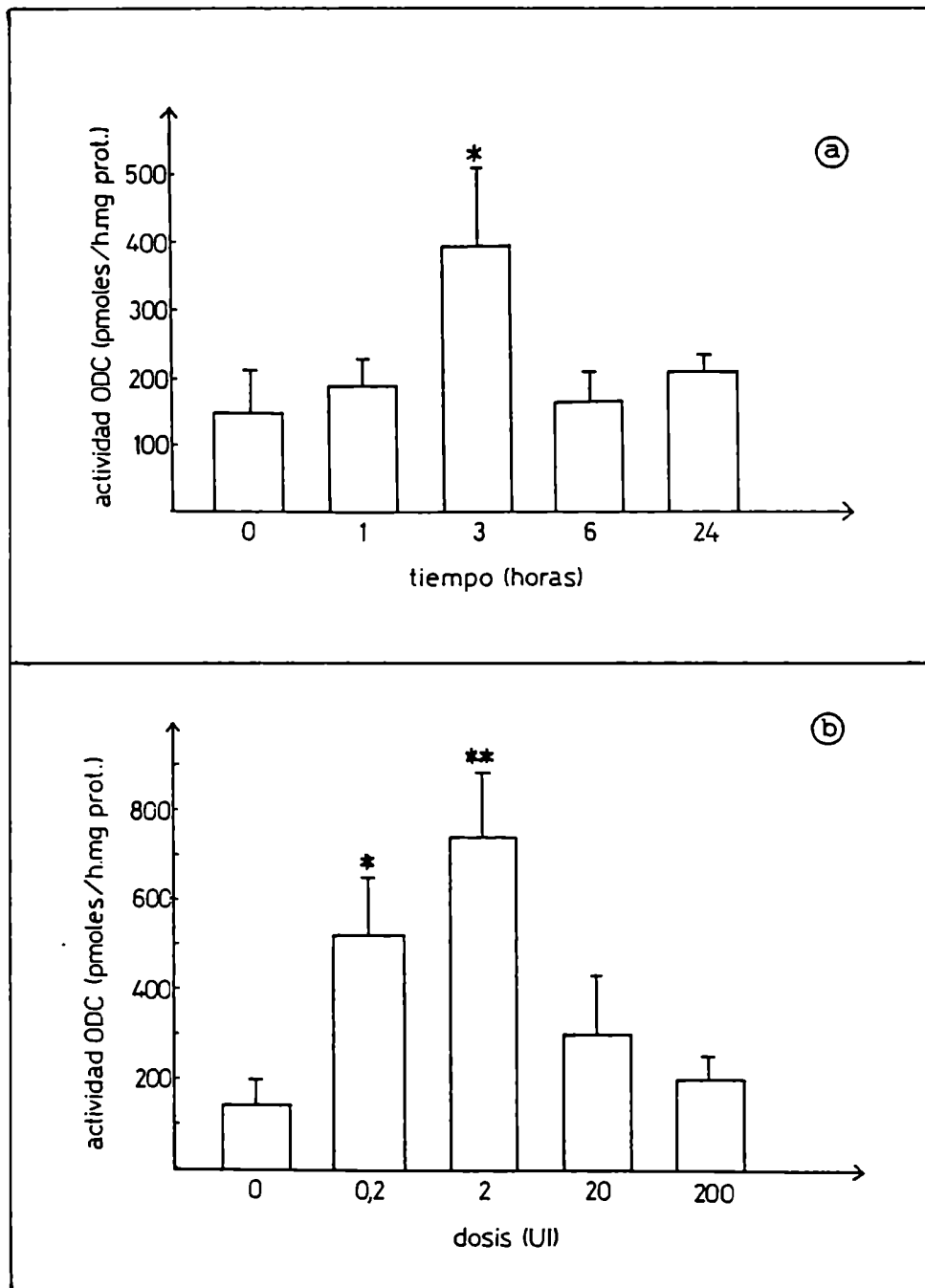
La determinación de la actividad en células intersticiales y túbulos seminíferos aislados demostró que el efecto de la PRL observado en testículo total se limita al sector intersticial, sin efecto sobre el sector tubular (Figura 10).

Se investigó posteriormente la capacidad de la PRL de estimular la actividad ODC en condiciones de estimulación máxima con hCG. Para ello, primeramente se determinaron tales condiciones. Como se muestra en la Figura 11, la inyección de hCG incrementó la actividad luego de 3 horas, y el efecto máximo se observó a la dosis de 2 UI. La administración conjunta de 500  $\mu\text{g}$  de PRL y 2 UI de hCG no incrementó los valores de ODC por encima de los obtenidos con hCG solamente (Tabla I).

Con el fin de corroborar la participación de la PRL en la regulación de la ODC testicular, se trataron ratas con el antagonista dopaminérgico sulpirida. Como se observa en la Figura 12, la administración de 10 mg de este compuesto provocó un aumento de los niveles séricos de PRL, que alcanzó, luego de 2 horas, valores de aproximadamente 9 veces los basales. El aumento de la PRL sérica fue acompañado por la estimulación de la ODC testicular a las 4 horas luego de la inyección (Figura 12).



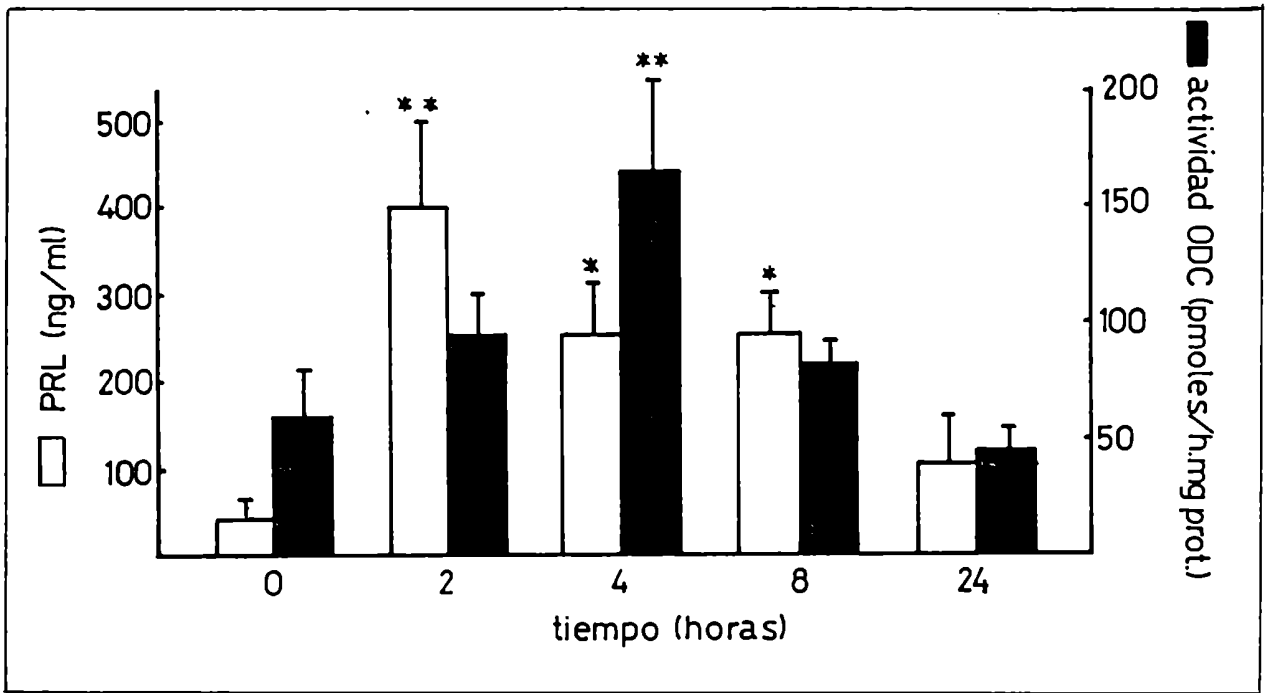
**Figura 10.** Efecto de una única dosis (500 µg) de PRL sobre la actividad ODC de túbulos seminíferos y células intersticiales aisladas. Los valores representan promedios ± ES de 4 determinaciones individuales. \* P < 0,05.



**Figura 11.** Efecto de la hCG sobre la actividad ODC testicular. a: actividad en función del tiempo (dosis: 0,2 UI). b: actividad en función de la dosis administrada (tiempo: 3 horas). Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 5 determinaciones individuales. \*  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ .

Tratamiento	Actividad ODC (pmoles/h.mg de proteína)
Vehículo	51,6 ± 8,2
hCG	107,8 ± 10,4 *
PRL	115,2 ± 10,6 *
hCG + PRL	137,2 ± 23,0 *

Tabla I. Efecto de la administración conjunta de 500 µg de PRL y 2 UI de hCG sobre la actividad ODC testicular. Los valores representan promedios ± ES de 5 determinaciones individuales, luego de 3 horas post-tratamiento. \* P < 0,05 con respecto a los controles tratados con vehículo.

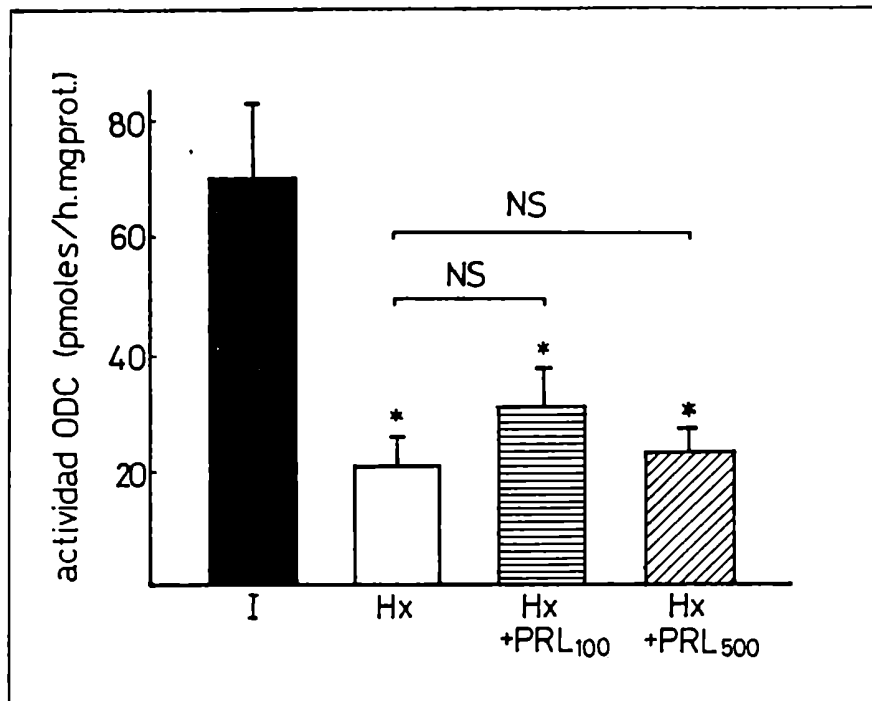


**Figura 12.** Efecto de la administración de sulpirida sobre los niveles séricos de PRL y la actividad ODC testicular. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 5 determinaciones individuales. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  con respecto a los valores a tiempo 0.

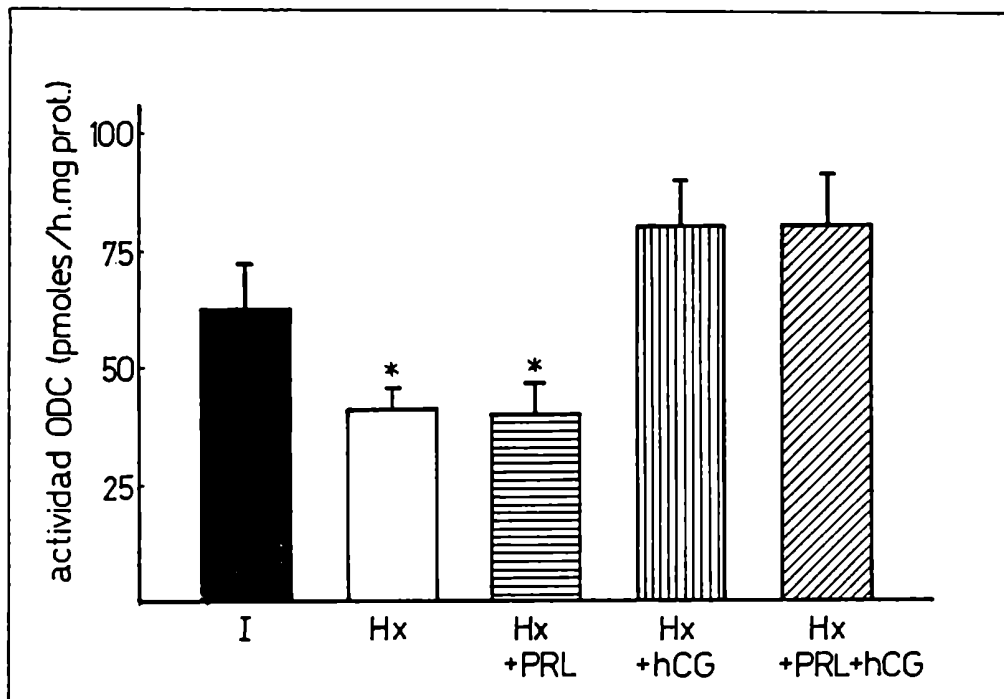
### Efecto de la PRL en ratas hipofisectomizadas

En una primera serie de experimentos, ratas hipofisectomizadas fueron inyectadas con 100 o 500  $\mu\text{g}$  de PRL, 2 veces por día durante 2 días, y sacrificadas 4 horas luego de la última inyección. En estas condiciones, se observó (Figura 13) que la hipofisectomía provoca una importante caída de la actividad ODC testicular. La administración de 100 o 500  $\mu\text{g}$  de PRL no estimuló la actividad ODC en estos animales.

En un segundo modelo, ratas hipofisectomizadas fueron inyectadas con 200  $\mu\text{g}$  de PRL y 2 UI de hCG, 2 veces por día durante 2 días. Al tercer día, los animales recibieron 500  $\mu\text{g}$  de PRL, 2 UI de hCG, o una combinación de ambas. Los resultados se observan en la Figura 14. La hipofisectomía provocó nuevamente la caída de la actividad ODC, si bien en menor grado que en el esquema anterior. La hCG estimuló la actividad por encima de los valores de los controles intactos. Nuevamente, una dosis de 500  $\mu\text{g}$  de PRL no estimuló la ODC en el testículo de estos animales, ni modificó la respuesta a la gonadotropina.



**Figura 13.** Actividad ODC testicular en ratas intactas (I) e hipofisectomizadas (Hx) tratadas con 100 o 500µg de PRL. Los valores representan promedios ± ES de 5 determinaciones individuales. \* P < 0,01 con respecto a los controles intactos. NS, no significativo (P > 0,05).



**Figura 14.** Actividad ODC testicular en ratas hipofisectomizadas tratadas con 2 UI de hCG, 500 µg de PRL o una combinación de ambas. Los valores representan promedios ± ES de 6 determinaciones individuales. \* P < 0,05 con respecto a los controles intactos.



## DISCUSION

En esta sección se han descripto algunos aspectos de la ornitina descarboxilasa testicular, que incluyen la existencia de un ritmo circadiano de su actividad y la acción estimuladora de la PRL sobre esta enzima.

La actividad ODC testicular, determinada en nuestras condiciones, presentó propiedades comparables a las halladas en la enzima de otros tejidos. Su Km para ornitina fue del orden del obtenido en próstata ventral de rata (Janne y Williams-Ashman, 1971) e hígado (Ono y col., 1972). La dependencia de fosfato de piridoxal para su actividad concuerda con los requerimientos de este compuesto para la mayoría de las descarboxilasas.

Debido a que la velocidad de reacción fue determinada en un extracto crudo, existía la posibilidad de que la ornitina se metabolizara durante la incubación a otro compuesto capaz de ser descarboxilado por la misma preparación. En particular, se describió (Grillo y Fossa, 1983) que en núcleos de hepatocitos de rata la velocidad de liberación de CO<sub>2</sub> a partir de ornitina no guarda una relación estequiométrica con la de producción de putrescina, y que esta actividad no es inhibida por DFMO, inhibidor irreversible y altamente específico de la ODC, indicando la existencia de un proceso indirecto en la descarboxilación de la ornitina. Para evaluar esta posibi-

lidad, se determinó la actividad ODC en presencia de DFMO. En este caso, la liberación de CO<sub>2</sub> fue totalmente bloqueada, por lo que se descarta esta interferencia.

Los resultados referentes a la distribución de la actividad ODC en ambos compartimientos del testículo se hallan en concordancia con los hallados por Macindoe y Turkington (1973), quienes observaron que la mayor parte de la ODC testicular se encuentra asociada a una fracción enriquecida en células de Sertoli, pero no con los descritos por Qian y col. (1985), quienes atribuyen una actividad ODC, expresada por mg de proteína, mucho mayor a las células intersticiales en comparación con la de células de Sertoli, células germinales y espermatozoides epididimarios. Estudios recientes (Shubhada y col., 1989a, 1989b) indican que la actividad ODC es mayor en células germinales que en células intersticiales, y que las actividades ODC y SAMDC en los diferentes tipos celulares testiculares, como así también el contenido intracelular de poliaminas, guardan una estrecha relación con la actividad proliferativa del testículo durante la maduración sexual.

El estudio del ritmo circadiano de la actividad ODC testicular obedeció a 2 fines:

- 1) Los principales factores hipofisarios que controlan la función testicular (LH, FSH y PRL) exhiben un perfil cíclico de secreción (Dohler y Wuttke, 1976; Hostetter y Piacsek,

1977)). Además, en el macho la liberación de LH es pulsátil y regulada por esteroides gonadales y neurotransmisores (Kalra y Kalra, 1983). Así, resultó de interés estudiar de qué manera el conjunto de estos factores afectan el ritmo de actividad testicular, utilizando la ODC como marcador.

2) Fue necesario determinar un período de tiempo en el que la actividad ODC se encuentra en sus valores mínimos, para evaluar el posible efecto estimulador de la PRL.

Los presentes resultados evidencian un ritmo circadiano de la ODC testicular, con un marcado aumento al finalizar la fase oscura. Si bien no se determinó el perfil diario del contenido de poliaminas, es dable suponer que la activación de la ODC conduciría a un aumento de los niveles de estos compuestos en el testículo, en forma análoga al perfil circadiano de la actividad ODC y del contenido de putrescina observado en hígado (Hayashi y col., 1972). Así, suponiendo que la ODC es la enzima limitante de la síntesis de poliaminas en el testículo, podemos especular que el requerimiento de poliaminas para la función testicular varía a través de un período de 24 horas, lo cual a su vez reflejaría fluctuaciones en la velocidad de síntesis de ADN, ARN y/o proteínas. Estos procesos son particularmente activos en el epitelio seminífero. Recordemos, además, que según nuestros resultados el sector tubular aporta más del 90% de la actividad determinada en testículo total. Por consi-

guiente, existe una mayor probabilidad de que las variaciones diarias observadas en testículo total tengan lugar en los túbulos seminíferos. El conjunto de estos datos es consistente con la hipótesis de un ritmo circadiano de la actividad ODC de los túbulos seminíferos. Se intentó comprobar esta hipótesis mediante la determinación de la actividad ODC en túbulos seminíferos y células intersticiales a diferentes horas del día. Sin embargo, a pesar de las claras diferencias observadas en testículo total, no se pudo comprobar la existencia del ritmo circadiano en los compartimientos aislados. Una posible explicación de ello sería la pérdida de actividad durante el proceso de colagenización. Esto podría ser consecuencia de una mayor labilidad de la enzima inducida, con respecto a la basal.

Dada la regulación múltiple de la ODC testicular, resulta poco probable poder relacionar las fluctuaciones de la actividad ODC con las de las hormonas circulantes. No obstante, teniendo en cuenta la hipótesis enunciada, y el efecto estimulador de la FSH sobre las células de Sertoli (Francis y col., 1981) es lógico suponer la participación de la FSH en el ritmo circadiano de la ODC testicular. Esto se encuentra en amplia concordancia con los resultados de Hostetter y Piacsek (1977), quienes describieron un pico de FSH en la rata macho al finalizar la etapa de oscuridad. El intervalo entre este pico y la activación de la ODC testicular

concuenda con el tiempo requerido para la inducción de la ODC en la mayoría de los tejidos (Russell, 1985). A pesar de ello, no se puede descartar la posibilidad de la participación de la LH y la PRL a nivel intersticial, y de los andrógenos a nivel tubular. De cualquier modo, nuestros resultados sugieren indirectamente la posibilidad de un ritmo circadiano de la actividad proliferativa del epitelio seminífero.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la determinación de la ODC testicular, se examinó el efecto de la PRL sobre dicha actividad. Los resultados presentados demuestran que la PRL es capaz de estimular la actividad ODC en testículo de rata, a tiempos comparables a los requeridos para la inducción de la ODC en diferentes órganos y tejidos por una gran variedad de estímulos (Russell, 1985). El efecto de la PRL se encuentra limitado al espacio intersticial, donde se localizan los receptores de esta hormona (Charreau y col., 1977). En condiciones de estimulación máxima con hCG, la PRL no aumenta aún más la actividad.

Cabe destacar que los efectos mencionados podrían atribuirse a una posible contaminación de la PRL utilizada con LH, por cuanto esta hormona también estimula la ODC del sector intersticial. No obstante, experimentos posteriores aportan dos tipos de evidencia diferentes que intentan descartar esta posibilidad. Por una parte, la administración

del antagonista dopaminérgico sulpirida provoca, tanto en la rata como en el hombre, una rápida liberación de PRL, observable ya a los 30 minutos luego de su administración (Debeljuk y col., 1975; Mancini y col., 1976). Este efecto no es acompañado por un aumento de la liberación de LH, ya sea en forma aguda (Debeljuk y col., 1975) o crónica (Baraño y col., 1981). En estas condiciones, se observó una estimulación de la ODC testicular atribuible a la PRL endógena, si bien no puede descartarse la posibilidad de un efecto directo de la droga sobre la actividad enzimática.

Por otra parte, la PRL, a la misma dosis que la efectiva en ratas intactas, fue incapaz de estimular la actividad ODC de testículos de animales hipofisectomizados. En vista de la importancia de la LH y de la PRL en el mantenimiento de los receptores para esta última hormona en el testículo (Morris y Saxena, 1980; Huhtaniemi y Catt, 1981), se decidió mantener a los animales hipofisectomizados bajo un régimen de PRL y hCG en dosis que son efectivas para el mantenimiento de la respuesta testicular en ratas hipofisectomizadas (Hafiez y col., 1972a, 1972b). Estos animales mantuvieron la respuesta a la hCG (por cuanto los valores de actividad obtenidos por administración de esta hormona superaron a los de los controles intactos) pero perdieron la sensibilidad a la PRL. Estos resultados proveen dos importantes evidencias. Primero, el hecho de que la respuesta a la gonadotropina se encuentra

conservada apoya la idea de que el efecto de la preparación de PRL utilizada no se debe a su contenido de LH. Segundo, si bien el esquema de tratamiento mantendría los receptores de PRL, en base a los datos de la bibliografía, la respuesta de la ODC no se mantiene, indicando que la hipofisectomía provocaría un daño en su mecanismo de acción posterior a la unión de la hormona. Este hecho sugiere al menos 2 posibilidades: 1) para la inducción de la actividad ODC, ambas hormonas actuarían por mecanismos diferentes; o 2) la hipofisectomía alteraría la capacidad de la PRL de modular la acción de la LH, afectando, por ejemplo, el acoplamiento entre ambos receptores a nivel de membrana. Si bien es evidente la necesidad de numerosos estudios para evaluar estas posibilidades, los presentes resultados sugieren que la estimulación de la actividad ODC constituye una respuesta trófica del testículo a la PRL, no relacionada con la estimulación de la esteroidogénesis, que podría aplicarse al estudio de la interacción entre PRL y LH a nivel testicular.

## II. REGULACION ANDROGENICA DEL METABOLISMO DE POLIAMINAS EN EL EPIDIDIMO

### INTRODUCCION

Aun antes de la identificación de la testosterona como el principal andrógeno producido por el testículo, se estableció que el trofismo del epidídimo depende de la presencia de un factor testicular (Benoit, 1926). En las últimas tres décadas, ha sido publicado un vasto número de trabajos relacionados con el efecto de la castración y del reemplazo con andrógenos sobre numerosos indicadores del trofismo y la función epididimarios.

A los fines de una mejor comprensión de este tema, es conveniente que nos detengamos brevemente a analizar cuáles son los eventos moleculares que ocurren en un tejido efector de andrógenos bajo la acción de la hormona. A partir de las primeras evidencias experimentales, obtenidas por Jensen (1962) sobre la acción de los estrógenos en el útero, la gran cantidad de estudios realizados posteriormente ha llevado a postular una teoría unificada del mecanismo de acción de los esteroides, que mantiene su vigencia a pesar de las sustanciales modificaciones propuestas en los últimos años. Brevemente, esta teoría propone las siguientes etapas:

1) El esteroide llega a la célula en forma libre o trans-



portado por proteínas plasmáticas.

2) En el caso particular de la testosterona, la hormona es metabolizada a un compuesto reducido,  $5\alpha$ -dihidrotestosterona ( $5\alpha$ -DHT), que posee mayor actividad biológica que el precursor.

3) La hormona se une con alta afinidad a un receptor de naturaleza proteica denominado receptor.

4) La unión de la hormona al receptor provoca un cambio conformacional (transformación), proceso que resulta en un aumento de la afinidad por componentes nucleares.

5) El complejo hormona-receptor se une con alta afinidad a sitios específicos del genoma (sitios aceptores).

6) La unión a los sitios aceptores provoca alteraciones en la actividad transcripcional de genes específicos, por una serie de mecanismos aún no del todo dilucidados. Esta acción a nivel nuclear determina la aparición de la respuesta biológica.

7) Luego de cierto tiempo, dependiente de la concentración de hormona alcanzada, de la afinidad del esteroide por el receptor y del tejido en cuestión, se desencadena la señal para la reversión del proceso, es decir la disociación de los complejos nucleares y la cesación de la acción hormonal.

8) El destino final del complejo hormona-receptor depende del tejido estudiado, habiéndose observado degradación de la proteína, reciclado del receptor intacto, o ambos procesos

simultáneamente. La hormona libre es metabolizada a compuestos inactivos y excretada.

Observaciones realizadas por numerosos laboratorios en diferentes tejidos han aportado un número de variantes a este esquema, sumamente simplificado. Entre las más importantes, cabe mencionar la entrada de los esteroides a la célula por pinocitosis, en forma de complejos con proteínas transportadoras (Pelliniemi y col., 1981; Attramadal y col., 1981), la existencia de mecanismos de transporte de esteroides en la membrana plasmática (Giorgi, 1976) y la presencia de receptores libres, es decir sin hormona unida, en el núcleo (Walters, 1985). No obstante, la validez de los pasos fundamentales ha sido inequívocamente demostrada.

Asimismo, diversos grupos han estudiado los complejos mecanismos de regulación de estos procesos, que modifican la capacidad del receptor para unir el esteroide, asociarse a la cromatina y desencadenar una respuesta biológica, determinando en definitiva la sensibilidad del tejido efector a la hormona.

Del análisis de la acción de las hormonas esteroides se deduce que la existencia de receptores para andrógenos funcionales, es decir capaces de unir la hormona y desencadenar la aparición de una respuesta biológica, debe ser considerada un requisito fundamental para la acción androgénica. En el epidídimo, Blaquier (1971) describió por primera vez que la

testosterona administrada exógenamente es metabolizada a 5 $\alpha$ -DHT, capaz de unirse con alta afinidad a un receptor citosólico. La presencia de receptores citoplasmáticos de andrógenos en el epidídimo fue posteriormente confirmada en la rata (Hansson y col., 1973), conejo (Danzo y col., 1973), perro (Younes y col., 1979) y carnero (Carreau y col., 1984). Blaquier y Calandra (1973) extendieron estos resultados al demostrar la localización nuclear de receptores de andrógenos en el epidídimo de rata.

La variedad de estudios histológicos, fisiológicos y bioquímicos relacionados con las acciones que los andrógenos ejercen sobre el epidídimo impide una reseña completa de ellas en esta sección. Como ya comentáramos en párrafos anteriores, la particular situación del epidídimo en su relación con el testículo lo hace un órgano bajo el constante estímulo de muy altas concentraciones de andrógenos provistos por diferentes vías. Rescataremos, en conjunto, que: 1) las células principales del epitelio epididimario parecen ser las más sensibles a la acción de los andrógenos; 2) dicha sensibilidad varía a lo largo del túbulo; 3) el trofismo general del órgano no es completamente restablecido en ratas castradas por administración de andrógenos, sugiriendo la importancia de otros factores testiculares; 4) no todos los parámetros marcadores de respuesta coinciden plenamente en las diferentes condiciones experimentales; y 5) al menos

teniendo en cuenta ciertos marcadores, el umbral de concentración de andrógenos para el mantenimiento del trofismo del órgano es aparentemente mayor que el de otros órganos andrógeno-dependientes tales como la próstata y la vesícula seminal.

En esta sección analizaremos el metabolismo de poliaminas en el epidídimo y su andrógeno-dependencia mediante diferentes esquemas experimentales.

## RESULTADOS

### 1. ACTIVIDAD ORNITINA DESCARBOXILASA

#### Descripción de la actividad en el epidídimo

Se aplicó el método desarrollado en el laboratorio, para la determinación de la actividad ODC en epidídimo de rata. En nuestras condiciones, la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  liberado resultó ser proporcional a la concentración de proteína de la muestra hasta 2 mg, y al tiempo de incubación hasta 60 minutos (Figura 15).

La determinación de la actividad ODC en epidídimos de ratas en diferentes estadios de maduración sexual indicó que esta actividad es indetectable a los 10, 15 y 20 días de edad, observándose una marcada activación de la enzima hacia el día 25 (Figura 16). En adelante, se decidió realizar los experimentos en ratas de 45 días, cuyos epidídimos presentan alta actividad ODC y en los cuales no se comprueba aún una entrada significativa de espermatozoides (Robaire y Hermo, 1988).

Para calcular el valor de  $K_m$  de la reacción, se incubaron sobrenadantes libres de sustrato endógeno por filtración a través de Sephadex G-25 con concentraciones crecientes de L-ornitina (0,25-2 mM) y una concentración constante

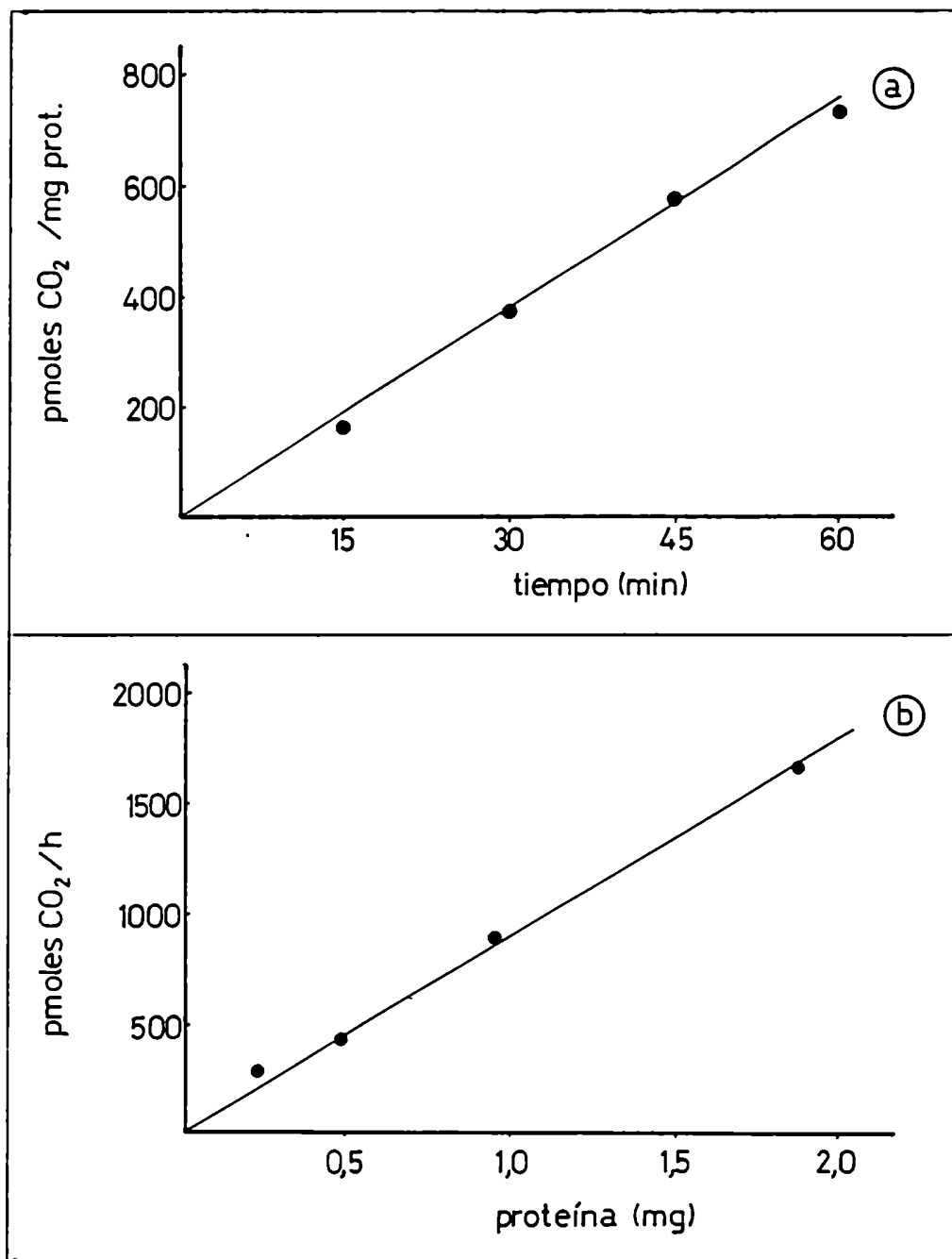
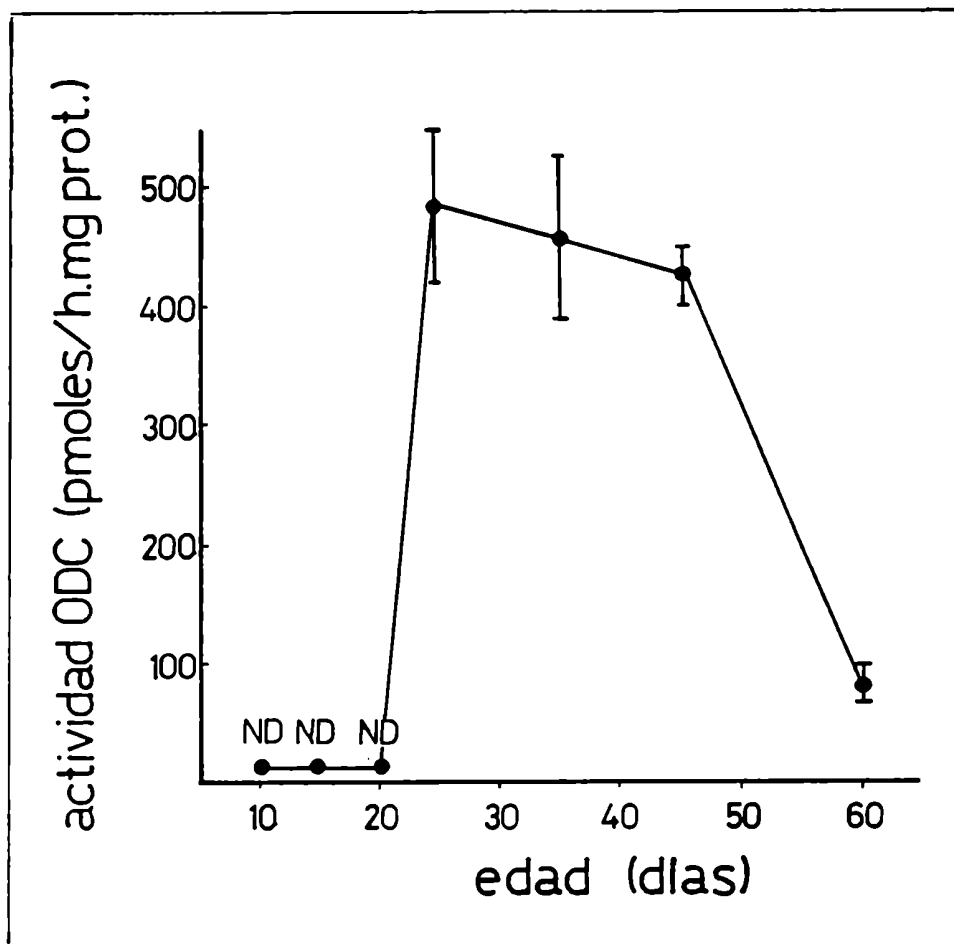


Figura 15. Actividad ODC epididimaria. a: linealidad con el tiempo de incubación. b: linealidad con la cantidad de proteína. Los valores corresponden a la actividad proveniente de epidídimos de 5 animales, homogeneizados conjuntamente.



**Figura 16.** Ontogenia de la actividad ODC epididimaria. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 5 muestras. Para cada muestra se homogeneizaron conjuntamente epidídimos de 20, 15, 10 y 3 animales de 10, 15, 20 y 25 días, respectivamente. Las muestras restantes provienen cada una de un único animal.

(0,2  $\mu$ Ci) de  $^{14}$ C-ornitina. Los resultados se analizaron por el método de Lineweaver-Burk y regresión lineal. Como se observa en la Figura 17, el epidídimo de rata de 45 días presenta una actividad ODC máxima de aproximadamente 1200 pmoles/h/mg de proteína y un valor de Km de 0,20 mM.

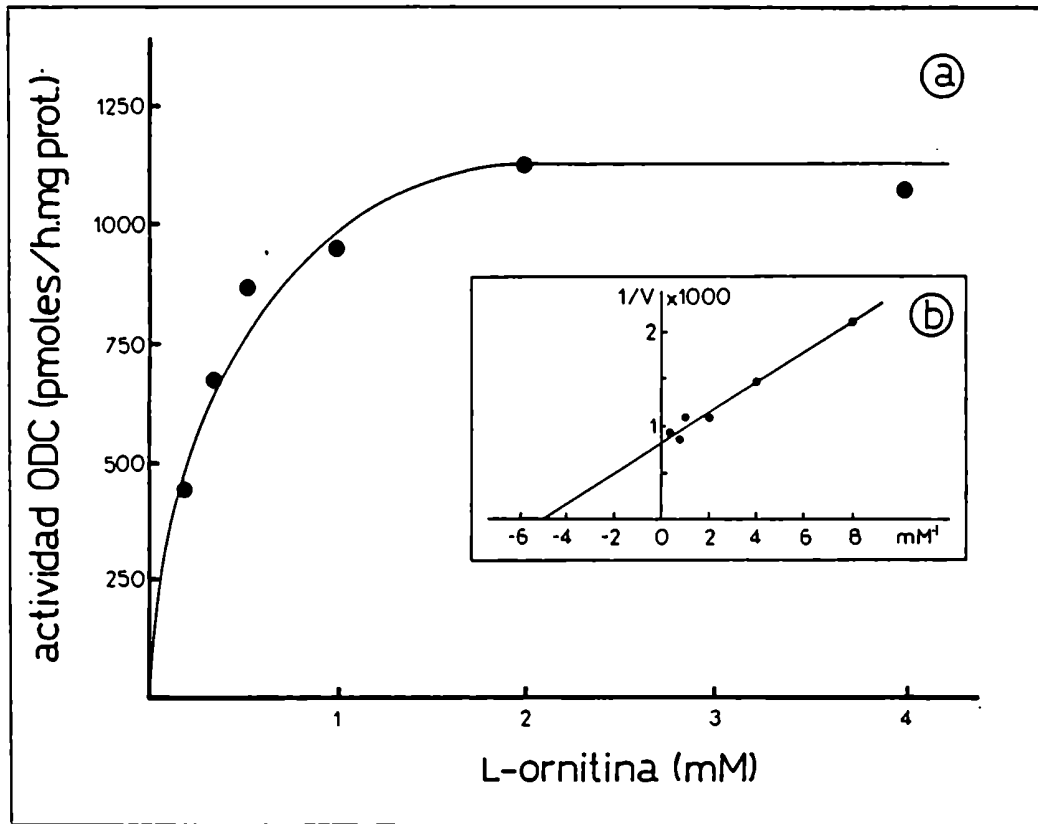
El estudio de la distribución de la enzima en los diferentes segmentos del epidídimo demostró que, al menos a los 45 días de edad, su actividad es mayor hacia los segmentos distales del órgano (cuerpo y cola, Figura 18).

#### Andrógeno-dependencia

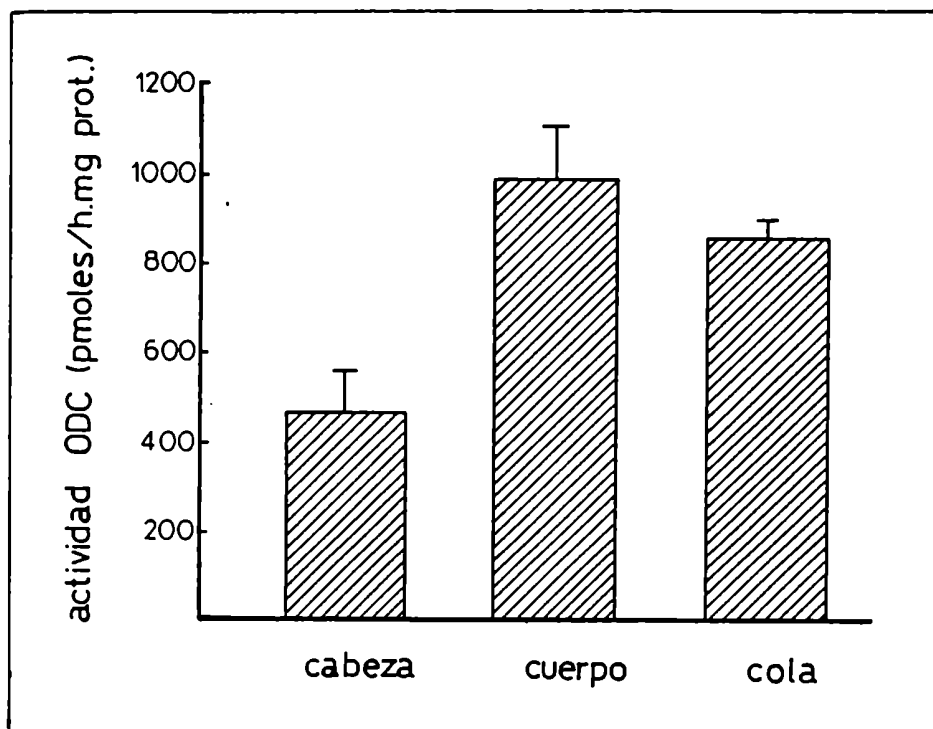
#### Efecto de la orquidectomía bilateral

La orquidectomía bilateral resultó en una rápida caída de los andrógenos circulantes (83% de disminución luego de 6 horas). Esta caída fue seguida por una abrupta inhibición de la actividad ODC epididimaria; dicha inhibición fue del 71% a las 12 horas post-orquidectomía. A las 72 horas, la actividad ODC se encontró en el límite de detección del ensayo (Figura 19).

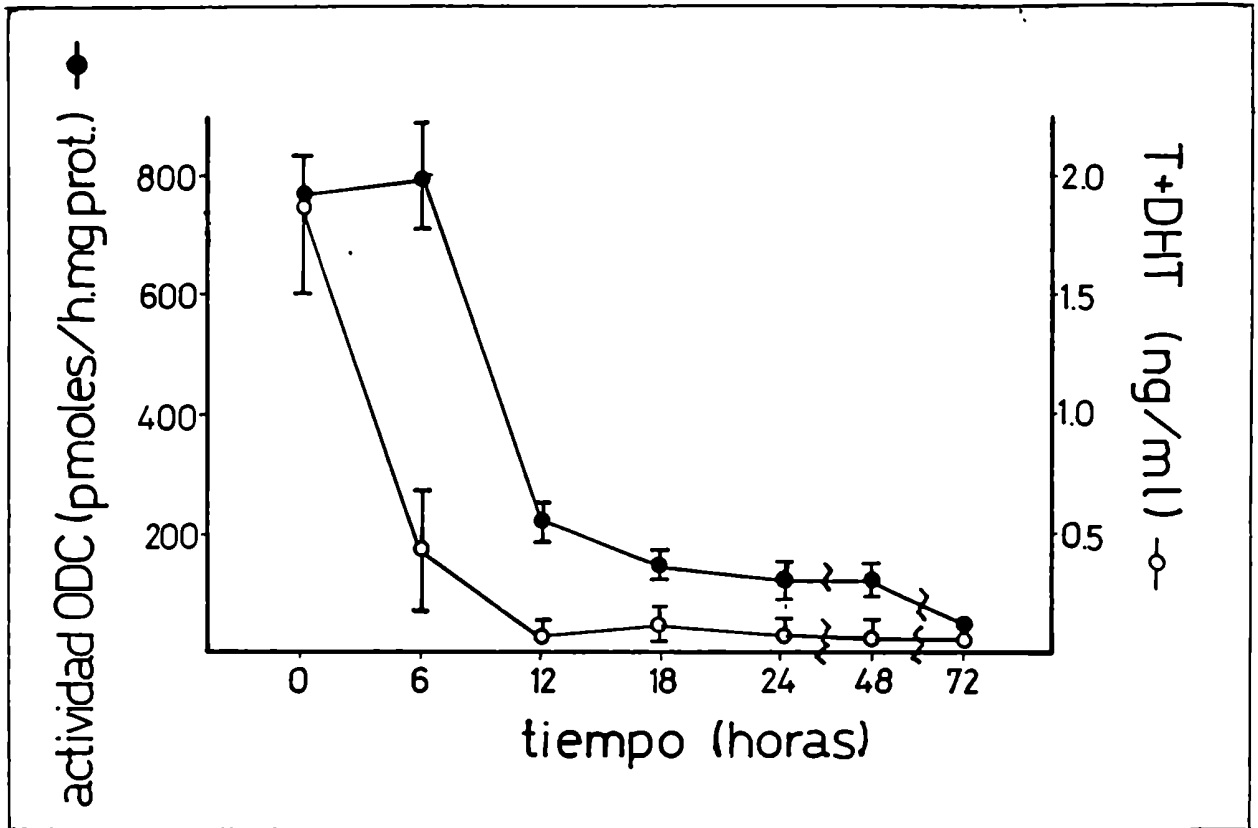




**Figura 17.** Actividad ODC epididimaria. a: curva de saturación. b: transformación de los datos por el método de Lineweaver-Burk.  $K_m = 0,201 \text{ mM}$ .  $r = 0,991$ .



**Figura 18.** Distribución de la actividad ODC en segmentos correspondientes a cabeza, cuerpo y cola de epidídimo. Los valores representan promedios  $\pm$  DS de 5 determinaciones individuales.



**Figura 19.** Efecto de la orquidectomía bilateral sobre los niveles séricos de T + DHT (○) y la actividad ODC epididimaria (●). Los niveles de T + DHT disminuyeron significativamente a partir de las 6 horas ( $P < 0,01$ ). La actividad ODC disminuyó a partir de las 12 horas ( $P < 0,01$ ). Los valores representan promedios  $\pm$  DS de 5 determinaciones individuales.

### Efecto de la administración aguda y crónica de testosterona en ratas orquidectomizadas

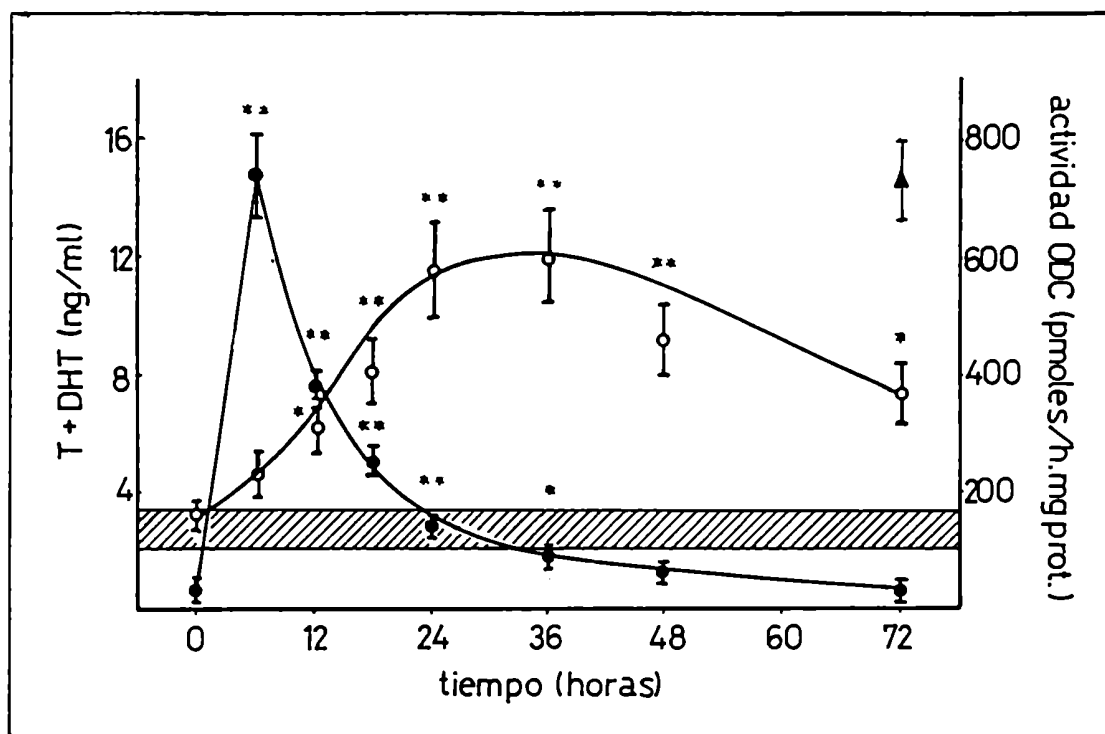
En ratas orquidectomizadas 24 horas antes, la inyección de una única dosis de 500  $\mu\text{g}$  de PT produjo un pico de los niveles séricos de este andrógeno luego de 6 horas, manteniéndose niveles suprafisiológicos hasta las 18 horas. La actividad ODC epididimaria resultó significativamente incrementada luego de 12 horas, y mantuvo valores por encima de los controles por lo menos durante 72 horas (Figura 20).

Luego de 7 días post-orquidectomía, la actividad ODC disminuyó a valores indetectables; la administración de PT a estos animales, cada 2 días durante 7 días comenzando el tratamiento al cabo de 7 días post-orquidectomía, restauró dicha actividad. A la dosis de 0,02 mg se obtuvieron valores de actividad comparables a los de epidídimos de ratas intactas, duplicándose este valor a partir de 0,2 mg (Figura 21).

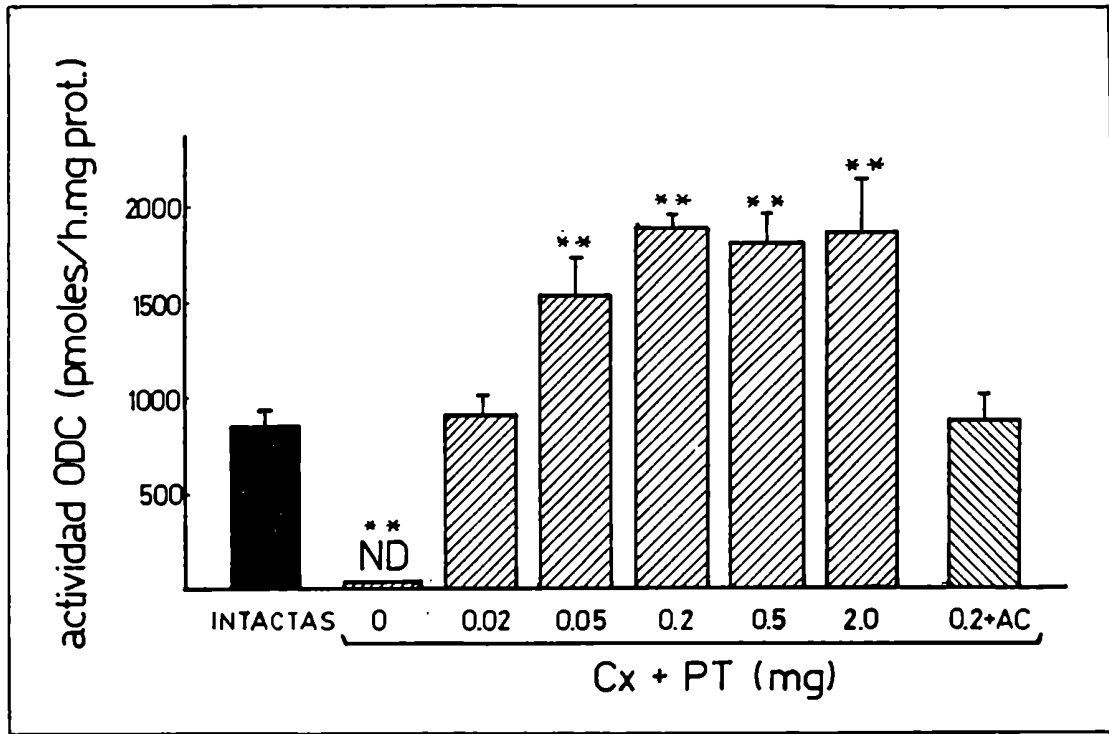
La administración crónica de andrógenos reducidos tales como 5 $\alpha$ -DHT y 5 $\alpha$ -androstandio-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (3 $\alpha$ -diol) también resultó en la estimulación de la actividad ODC (Figura 22).

### Efecto del antiandrógeno acetato de ciproterona

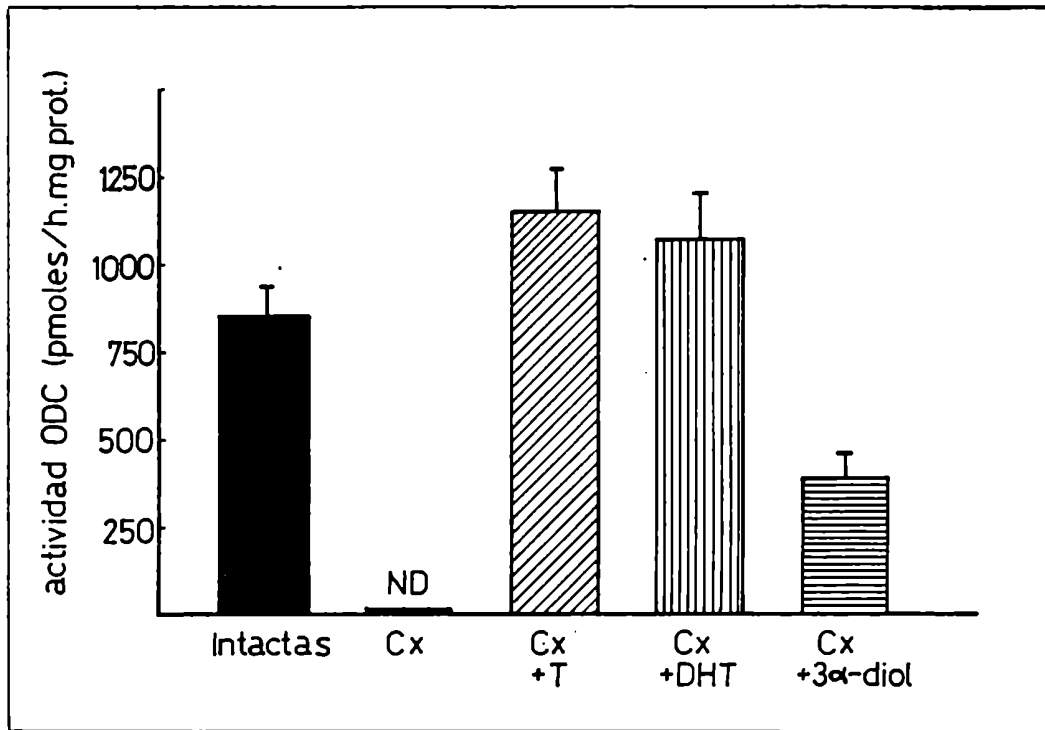
El efecto de la testosterona sobre la actividad ODC fue bloqueado por la administración conjunta del antiandrógeno



**Figura 20.** Efecto de una única dosis de 500 µg de propionato de testosterona a ratas orquidectomizadas, sobre los niveles séricos de T + DHT (●) y la actividad ODC epididimaria (○). Los valores representan promedios ± ES de 5 determinaciones individuales. El valor ▲ y la franja rayada representan la actividad ODC epididimaria y los niveles de T + DHT de los controles intactos (promedios ± ES). \* P < 0,05. \*\* P < 0,01 con respecto a los valores a tiempo 0.



**Figura 21.** Efecto de la orquidectomía y de la administración de propionato de testosterona y acetato de ciproterona a ratas orquidectomizadas, sobre la actividad ODC epididimaria. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 5 determinaciones individuales. ND, no detectable. Cx, orquidectomía bilateral. PT, propionato de testosterona. AC, acetato de ciproterona. \*\*  $P < 0,01$  con respecto a los valores de animales intactos.



**Figura 22.** Comparación del efecto de la administración crónica de testosterona, 5 $\alpha$ -DHT y 3 $\alpha$ -diol (200  $\mu$ g/2 días) a ratas castradas sobre la actividad ODC epididimaria. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 4 determinaciones individuales.

acetato de ciproterona. Cuando se administraron 10 mg de este compuesto junto con 0,2 mg de PT, los niveles de ODC se redujeron a valores comparables a los obtenidos por administración de 0,02 mg de PT, es decir que el antiandrógeno fue capaz de revertir el efecto del andrógeno en un 90% (Figura 21).

#### Efecto de la testosterona en diferentes segmentos del epidídimo

Cuando se estudió el efecto de la castración y el reemplazo androgénico en los 3 segmentos del epidídimo, se observó (Tabla II) una caída post-castración de la actividad a valores no detectables en los 3 segmentos. Sin embargo, el PT indujo un aumento de 5 veces en el segmento proximal, en comparación con los valores normales, mientras que su efecto fue considerablemente menor en los segmentos distales.

#### Participación del aporte luminal en el mantenimiento de la actividad ODC

Para investigar la importancia de los aportes luminal y sanguíneo en el mantenimiento de la actividad ODC, se realizó la orquidectomía unilateral, que previene la entrada de andrógenos por vía luminal, sin efecto sobre el aporte san-



Segmento	actividad ODC		
	Intactas	Castradas	Castradas + TP
Cabeza	100 ± 18	ND	509 ± 102 *
Cuerpo	100 ± 25	ND	128 ± 12
Cola	100 ± 8	ND	339 ± 31 *

**Tabla II.** Efecto de la castración y del reemplazo androgénico con propionato de testosterona sobre la actividad ODC en segmentos del epidídimo. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a los controles intactos, y representan promedios ± ES de 5 determinaciones individuales. ND, no detectable. \* P < 0,05 con respecto a los valores obtenidos de los animales intactos.

guíneo de los andrógenos producidos por el testículo remanente. Como se observa en la Figura 23, no existen diferencias significativas entre las actividades en los epidídimos de ambos lados ("normal" y "castrado") a los 4, 8 y 15 días luego de la hemiorquidectomía. La remoción del testículo remanente a ratas hemicastradas provocó nuevamente la caída de la actividad ODC a valores indetectables en ambos lados.

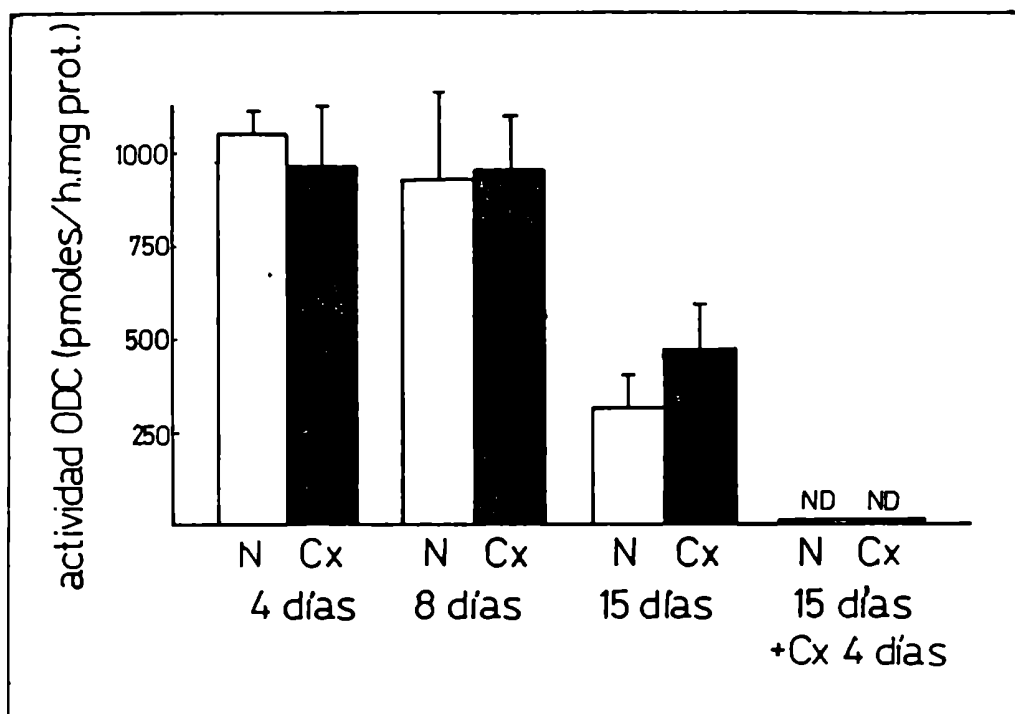
La ligadura de los conductos eferentes no afectó, luego de 7 días, la actividad ODC en comparación con el epidídimo del lado intacto (Figura 24).

#### Efecto de la testosterona en ratas intactas

Se comparó la respuesta al PT en ratas castradas 24 horas antes de iniciarse el tratamiento, y en ratas intactas de la misma edad. Los resultados se observan en la Figura 25. En ratas castradas, una baja dosis del andrógeno (0,05 mg cada 2 días) restauró la actividad ODC a valores normales; sin embargo, no se obtuvo efecto significativo sobre la actividad en ratas intactas aun a una dosis de 2 mg.

#### Estimulación de la ODC por testosterona in vitro

La incubación de cortes de epidídimo de ratas castradas en



**Figura 23.** Actividad ODC en epidídimos de ratas hemiorquiectomizadas, luego de 4, 8 y 15 días. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 5 animales. ND, no detectable. N, epidídimo del lado control (contralateral). Cx, epidídimo del lado castrado (ipsilateral).

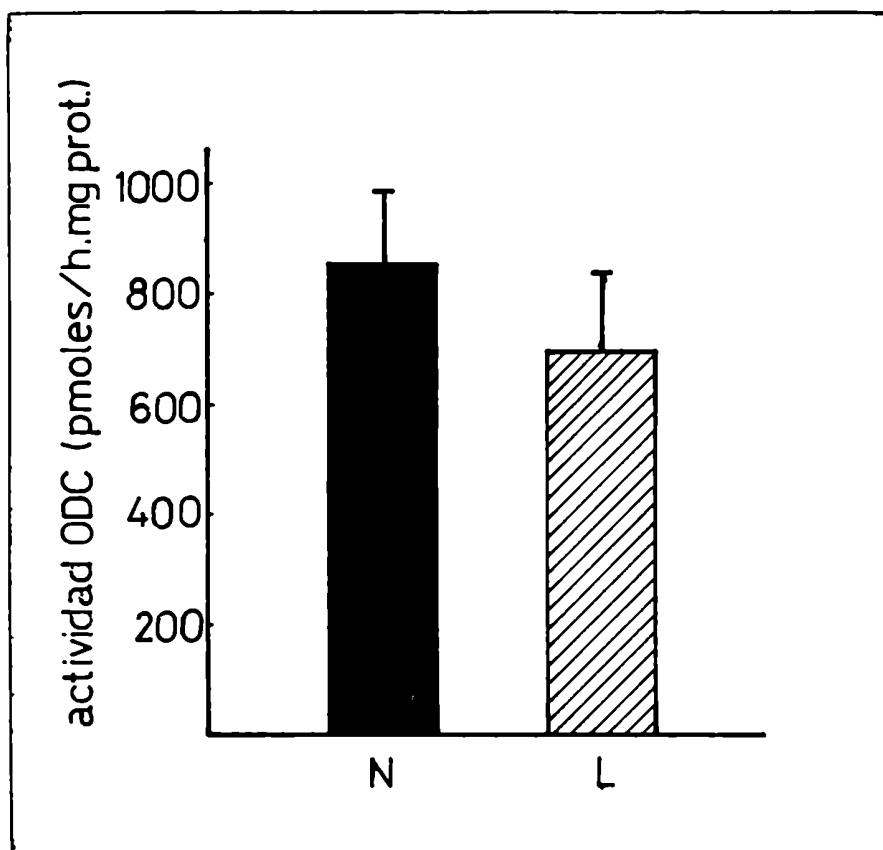
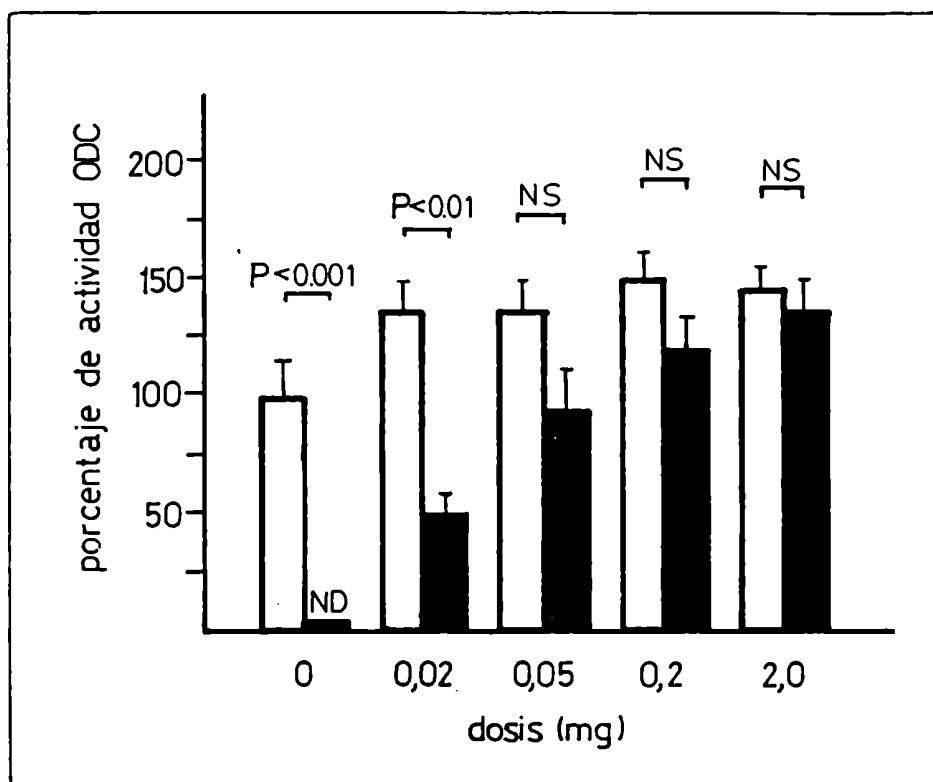


Figura 24. Actividad ODC en epidídimos de ratas con ligadura de los conductos eferentes, luego de 7 días. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 5 animales. N, lado control (contralateral). L, lado ligado (ipsilateral).



**Figura 25.** Respuesta de la actividad ODC epididimaria al propionato de testosterona en ratas intactas (□) y ratas castradas 24 horas antes del inicio del tratamiento (■). Los animales recibieron las dosis indicadas de PT cada 2 días. Los valores se expresan como porcentajes de los controles intactos respectivos y representan promedios ± DS para 5 determinaciones individuales. NS, no significativo. ND, no detectable.

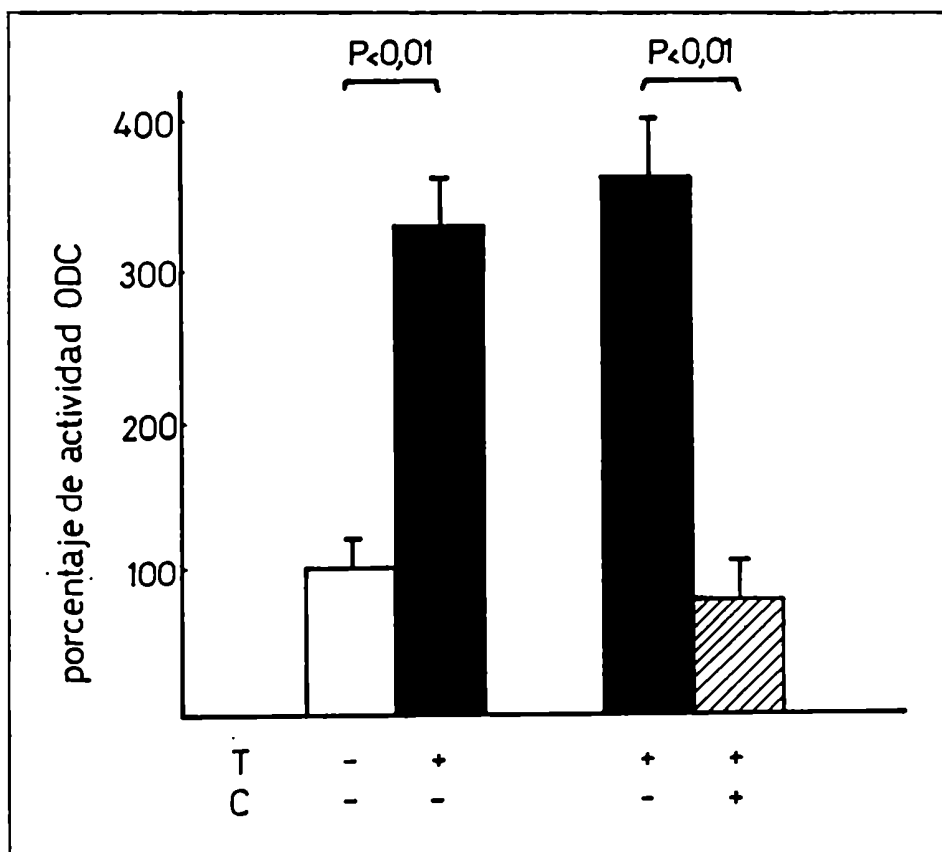
presencia de testosterona 100 nM resultó en una estimulación significativa de la actividad ODC luego de 6 horas. Dicha estimulación fue bloqueada por incubación en presencia de cicloheximida (Figura 26).

#### Efecto del antiandrógeno flutamida sobre la actividad ODC epididimaria

La administración de flutamida a ratas intactas resultó en una disminución significativa, si bien moderada, del peso del epidídimo (Tabla III). No se detectaron diferencias significativas a las dosis de 0,5 y 1 mg/día. A la dosis máxima (10 mg/día), el porcentaje de disminución de peso fue del 34%.

El efecto de la flutamida sobre la actividad ODC en epidídimos de ratas intactas se observa en la Tabla III. A las dosis de 0,5 y 1 mg/día, no se hallaron diferencias significativas en dicha actividad, mientras que a la dosis de 10 mg, sólo se observó una inhibición del 39%.

Para evaluar un posible efecto indirecto de la flutamida, actuando a nivel hipotalámico-hipofisario, se determinaron los niveles séricos de LH y andrógenos, y la concentración de andrógenos en el epidídimo. El tratamiento con flutamida aumentó los niveles de LH, determinada por radioinmunoensayo (Figura 27). El aumento de la concentración de

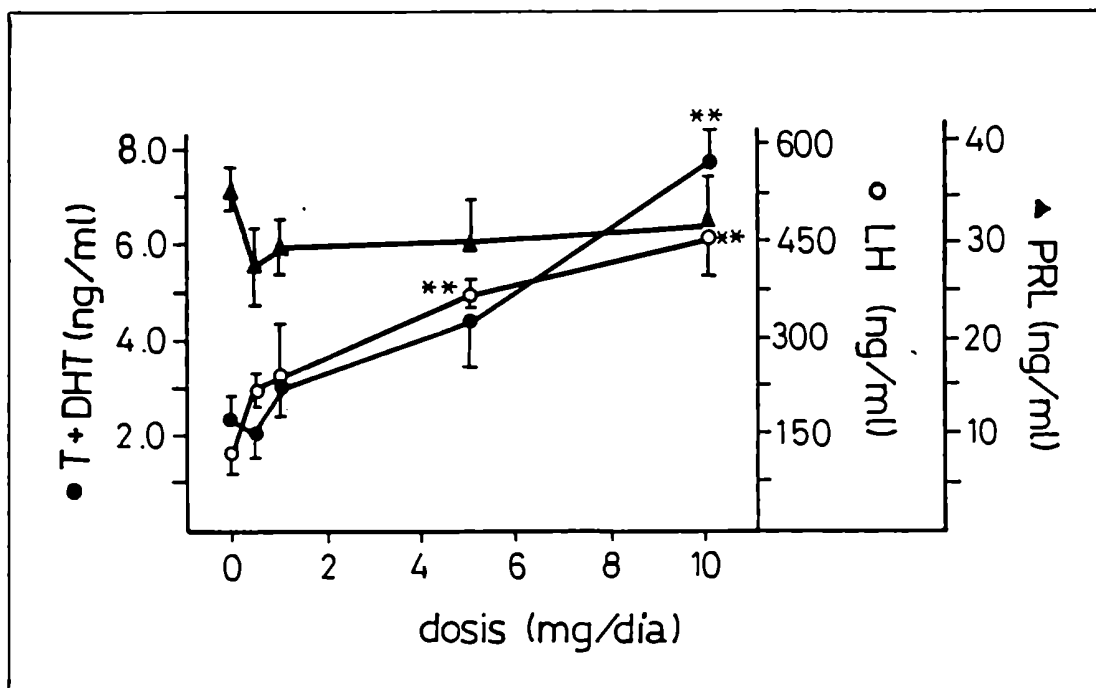


**Figura 26.** Efecto in vitro de la testosterona sobre la actividad ODC de epidídimos de ratas castradas. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a los controles castrados incubados sin testosterona, y representan promedios  $\pm$  ES de 5 determinaciones individuales. T, testosterona (100 nM). C, cicloheximida (10  $\mu$ g/ml).

Dosis (mg/día)	Peso de epidídimo (mg/100 g de peso)	actividad ODC epididimaria	
		pmol/h/mg.prot.	pmol/h/órgano
0	69,6 ± 4,9	618 ± 28,0	2185 ± 258
0,5	64,4 ± 3,0	648 ± 55,4	2126 ± 138
1	59,2 ± 3,8	526 ± 60,6	1984 ± 248
5	53,9 ± 3,9 *	460 ± 18,9 *	1438 ± 52 *
10	46,1 ± 4,8 **	400 ± 48,2 **	1012 ± 151 **

**Tabla III.** Efecto de la flutamida sobre el peso y la actividad ODC epididimarios en ratas intactas. Los valores representan promedios ± ES para 5 determinaciones individuales. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01 con respecto a los controles tratados con vehículo.





**Figura 27.** Niveles séricos de LH, T + DHT y PRL en ratas intactas tratadas con flutamida. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 5 determinaciones individuales. \*\* P < 0,01 con respecto a los controles tratados con vehículo.

LH resultó además en un aumento de su bioactividad, por cuanto los sueros de los animales tratados con flutamida estimulan in vitro la producción de testosterona por células intersticiales testiculares, en mayor grado que los sueros de ratas tratadas con vehículo (Tabla IV). Este aumento de la actividad de LH en suero resultó en un aumento de los niveles séricos de andrógenos (Figura 27).

Con el objeto de evaluar la posible participación de la PRL en la acción de la flutamida, se determinaron los niveles séricos de PRL en animales control y tratados con el anti-andrógeno. No se observaron diferencias significativas aun a la dosis máxima. (Figura 27).

Los niveles intraepididimarios de 5 $\alpha$ -DHT y 3 $\alpha$ -diol también se encontraron significativamente aumentados por tratamiento con flutamida (Figura 28), en forma paralela al aumento en los niveles séricos de andrógenos. Como consecuencia de ello, una forma más real de expresar la dosis efectiva de flutamida en el animal intacto tendría la forma

$$F' = F \times (DHT)_o / (DHT)$$

donde:

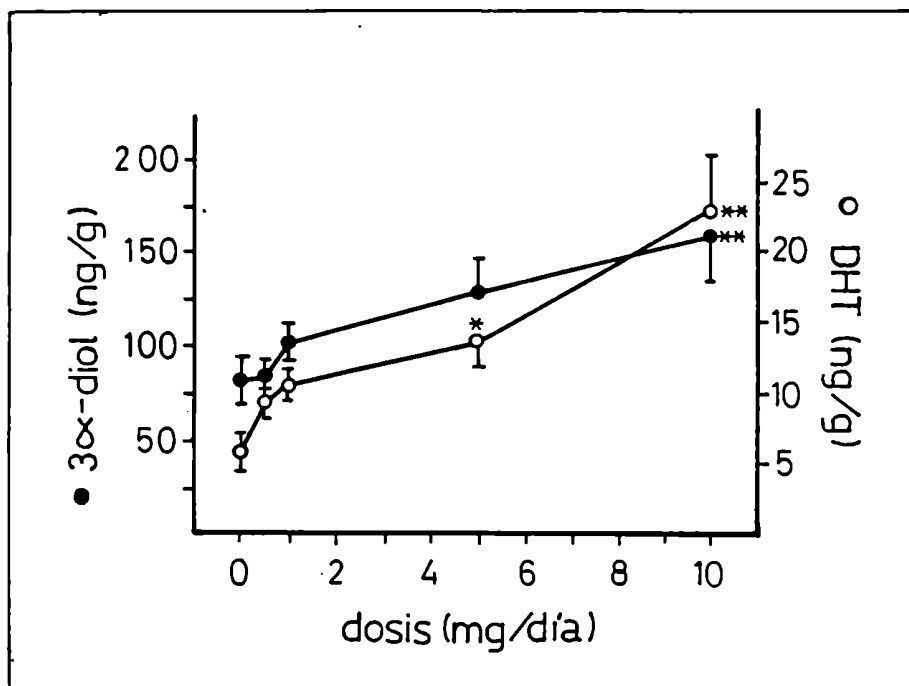
F: dosis de flutamida administrada

(DHT): concentración epididimaria de DHT del grupo tratado.

(DHT)<sub>o</sub>: concentración epididimaria de DHT del grupo control.

Tratamiento	I-LH	B-LH
Intactos:		
Vehículo	100 ± 33	100 ± 14
F, 0,5 mg	667 ± 150 *	111 ± 18
F, 1,0 mg	717 ± 167 *	96 ± 14
F 5,0 mg	884 ± 283 *	211 ± 11 *
F 10,0 mg	1116 ± 133 *	321 ± 75 *
Castrados:		
Vehículo	1184 ± 217	296 ± 50
50 µg PT	1334 ± 100	929 ± 271 *
50 µg PT + 1,0 mg F	1383 ± 117	793 ± 189 *

Tabla IV. Efecto de la flutamida sobre la inmunoreactividad y bioactividad de LH en sueros de ratas intactas y castradas suplementadas con propionato de testosterona. I-LH, inmunoreactividad. B-LH, bioactividad. Los valores se expresan como porcentajes de los controles intactos tratados con vehículo. \* P < 0,05.



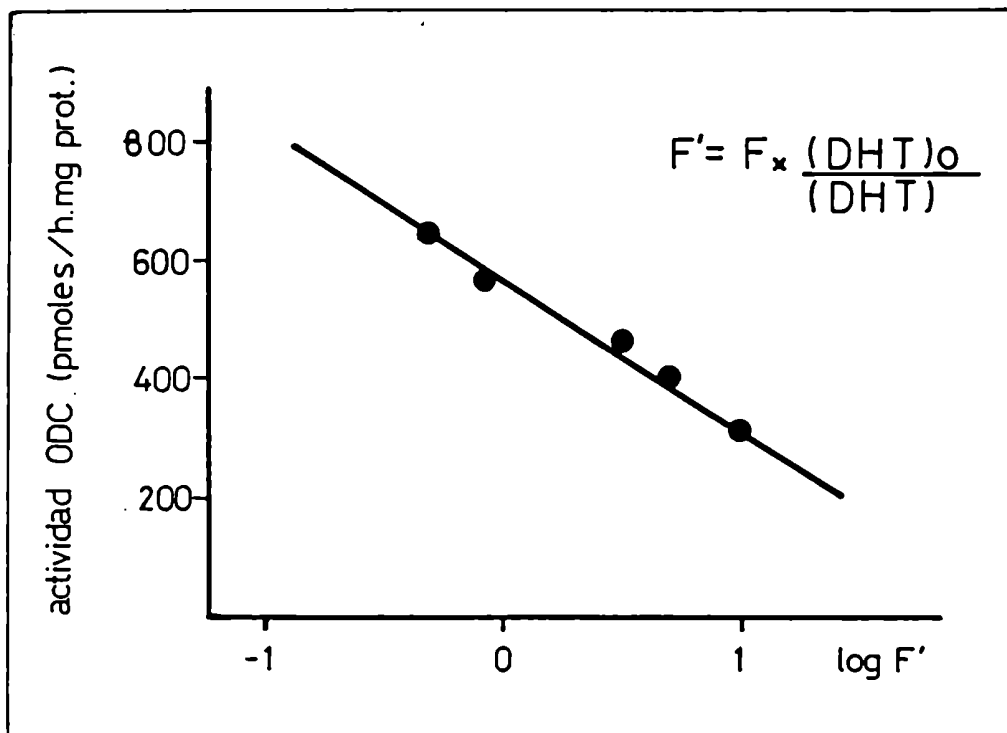
**Figura 28.** Concentraciones intraepididimarias de andrógenos (DHT y 3α-diol) en ratas intactas tratadas con flutamida. Los valores representan promedios ± ES de 5 determinaciones individuales. \* P < 0,05. \*\* P < 0,01 con respecto a los controles tratados con vehículo.

Cuando se grafica la actividad ODC en función del logaritmo de la dosis efectiva  $F'$ , se obtiene una recta con un alto coeficiente de correlación (Figura 29).

En contraste con los resultados obtenidos en ratas intactas, en ratas castradas mantenidas con 50  $\mu\text{g}/\text{día}$  de PT se observó una rápida caída del peso del epidídimo ya a la menor dosis de flutamida (Tabla V). La dosis de PT administrada fue efectiva en mantener niveles normales de actividad ODC. Además, la flutamida provocó una marcada inhibición de la actividad aun a las dosis más bajas. A la dosis de 5 mg, la actividad alcanzó valores no detectables (Tabla V).

#### Relación entre la actividad ODC epididimaria y el trofismo del órgano

Se procedió al examen histológico de los epidídimos bajo los diferentes tratamientos. Los resultados se muestran en las Figuras 30 a 32, junto a los valores de actividad ODC en cada caso. Como se puede observar (Figuras 30a y 31a), los epidídimos del animal intacto presentan un epitelio pseudo-estratificado. Las células evidencian un núcleo basal, con pequeñas vacuolas y abundantes estereocilias, y se observa secreción endoluminal. La castración provocó una marcada disminución de la altura del epitelio y del diámetro de la luz tubular, con desaparición de las estereocilias y de la



**Figura 29.** Correlación entre la dosis efectiva de flutamida  $F'$  y la actividad ODC epididimaria. Ratas intactas fueron tratadas con flutamida (0,5-10 mg/día). Los valores de  $F'$  se calcularon a partir de las concentraciones de DHT en el epidídimo obtenidas a cada dosis del antiandrógeno.  $r = 0,997$ .

Dosis (mg/día)	Peso de epidídimo (mg/100 g de peso)	actividad ODC epididimaria	
		pmol/h/mg.prot.	pmol/h/órgano
0	65,1 ± 6,5	839 ± 89,4	2533 ± 118
0,5	42,4 ± 4,6 *	331 ± 27,4 *	752 ± 74 *
1	34,6 ± 4,2 *	138 ± 10,9 *	257 ± 27 *
5	32,2 ± 1,7 *	ND	ND
10	27,3 ± 1,6 *	ND	ND

Tabla V. Efecto de la flutamida sobre el peso y la actividad ODC epididimarios en ratas castradas tratadas con andrógeno. Los animales fueron tratados con 0,05 mg de propionato de testosterona/día junto con flutamida a las dosis indicadas. Los valores representan promedios ± ES para 5 determinaciones individuales. ND, no detectable. \* P < 0,01 con respecto a los controles tratados con vehículo.

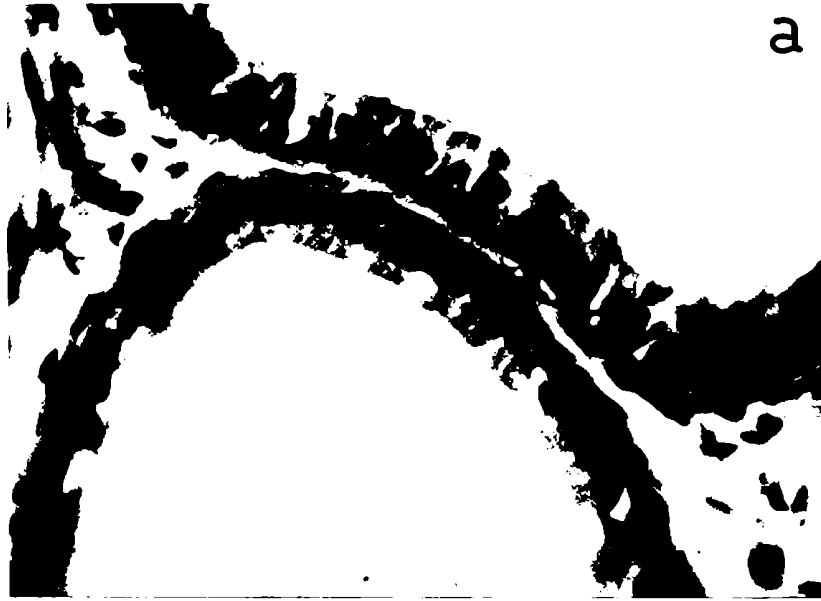


Figura 30. Cortes transversales de cola de epidídimo de rata intacta (a) y a los 7 días post-orquidectomía (b). Actividad ODC: (a) 618 pmoles/h.mg de proteína. (b) no detectable. Aumento X100.



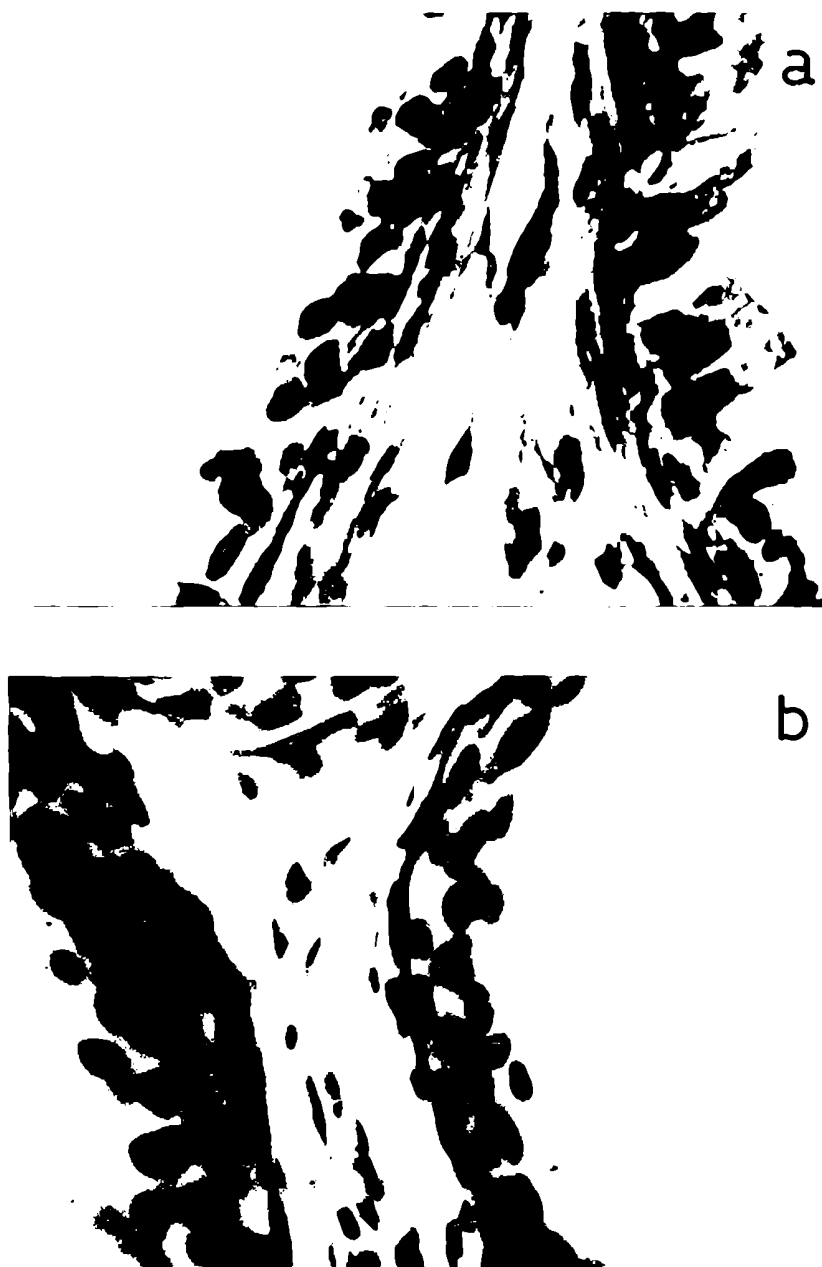


Figura 31. Cortes transversales de cola de epidídimo de rata intacta tratada con vehículo (a) o 5 mg/día de flutamida (b). Actividad ODC: (a) 618 pmoles/h.mg de proteína. (b) 400 pmoles/h.mg de proteína. Aumento X400.

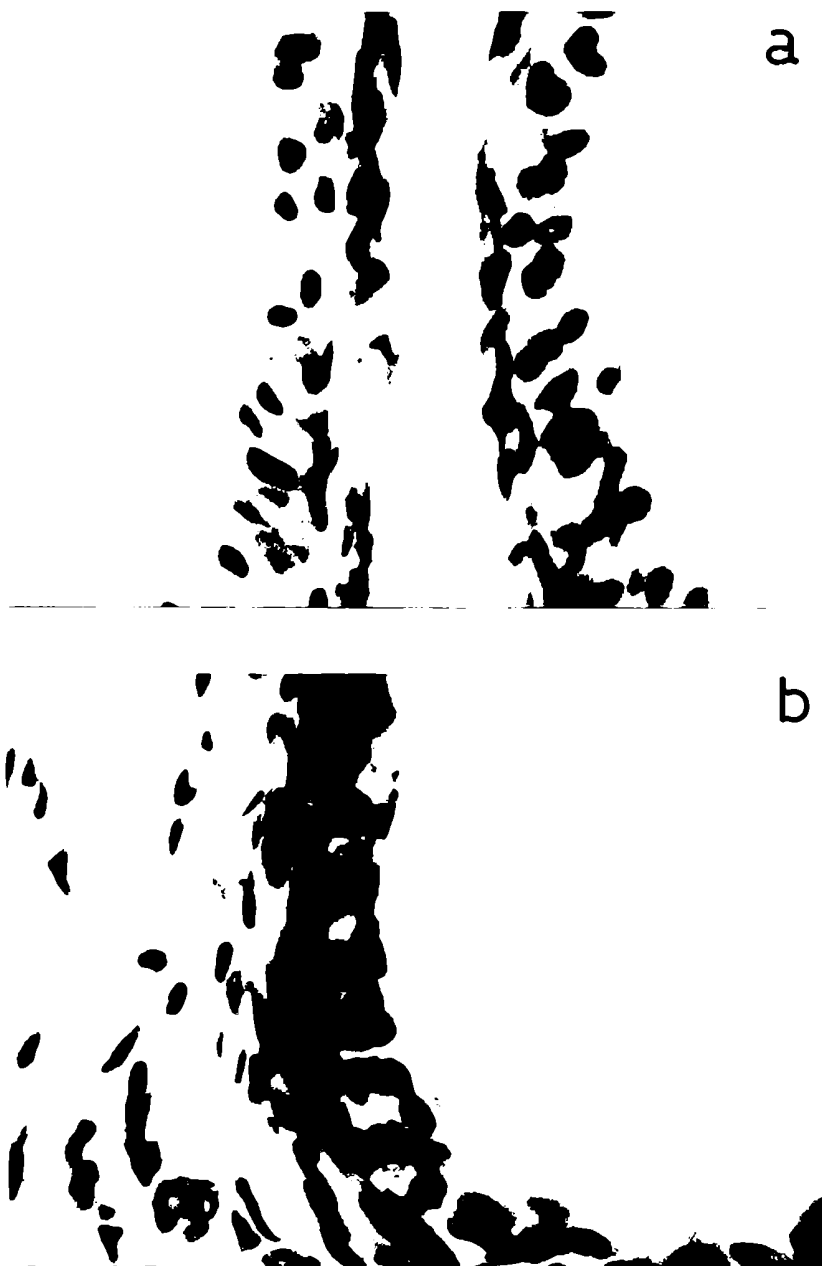


Figura 32. Cortes transversales de cola de epidídimo de rata castrada tratada con 50 µg/día de PT (a) o 50 µg/día de PT y 5 mg/día de flutamida (b). Actividad ODC: 839 pmoles/h.mg de proteína. (b) no detectable. Aumento X400.

secreción luminal (Figura 30b). Los epidídimos de animales intactos tratados con flutamida presentaron una disminución de la altura epitelial y ausencia de vacuolas y estereocilias, con un aspecto intermedio entre el de los intactos y los castrados (Figura 31b). Luego del tratamiento con 50  $\mu\text{g}/\text{día}$  de PT a ratas castradas, se observó un restablecimiento parcial de las características histológicas del epitelio (Figura 32a). Este efecto fue revertido por administración conjunta de flutamida (Figura 32b).

Los valores morfométricos de la Tabla VI representan en forma numérica lo observado en los cortes histológicos, en particular la influencia de los diferentes tratamientos sobre la altura epitelial y el diámetro tubular. Como se puede observar, existe una estrecha correlación entre dichos parámetros (especialmente el diámetro tubular) y la actividad ODC en las diferentes condiciones.

Tratamiento	Altura epitelial ( $\mu\text{m}$ )		Diámetro tubular ( $\mu\text{m}$ )	
	promedio $\pm$ ES	rango	promedio $\pm$ ES	rango
Intactos:				
Vehículo	28,5 $\pm$ 2,48	20-40	231 $\pm$ 8,24	200-260
F	18,5 $\pm$ 1,07	15-25	142 $\pm$ 5,21	120-160
Castrados:				
Vehículo	17,8 $\pm$ 0,87	15-20	93 $\pm$ 6,56	60-125
PT	28,9 $\pm$ 2,86	25-40	133 $\pm$ 3,83	120-150
PT + F	20,0 $\pm$ 0,83	15-25	103 $\pm$ 6,72	80-125

Tabla VI. Altura epitelial y diámetro tubular de epidídimos de ratas intactas y castradas tratadas con flutamida (5 mg/día) y/o propionato de testosterona (0,05 mg/día). Se analizaron 6 secciones no consecutivas de cada segmento, y se realizaron 10 mediciones de cada parámetro por sección.

## 2. ACTIVIDAD S-ADENOSIL-L-METIONINA DESCARBOXILASA

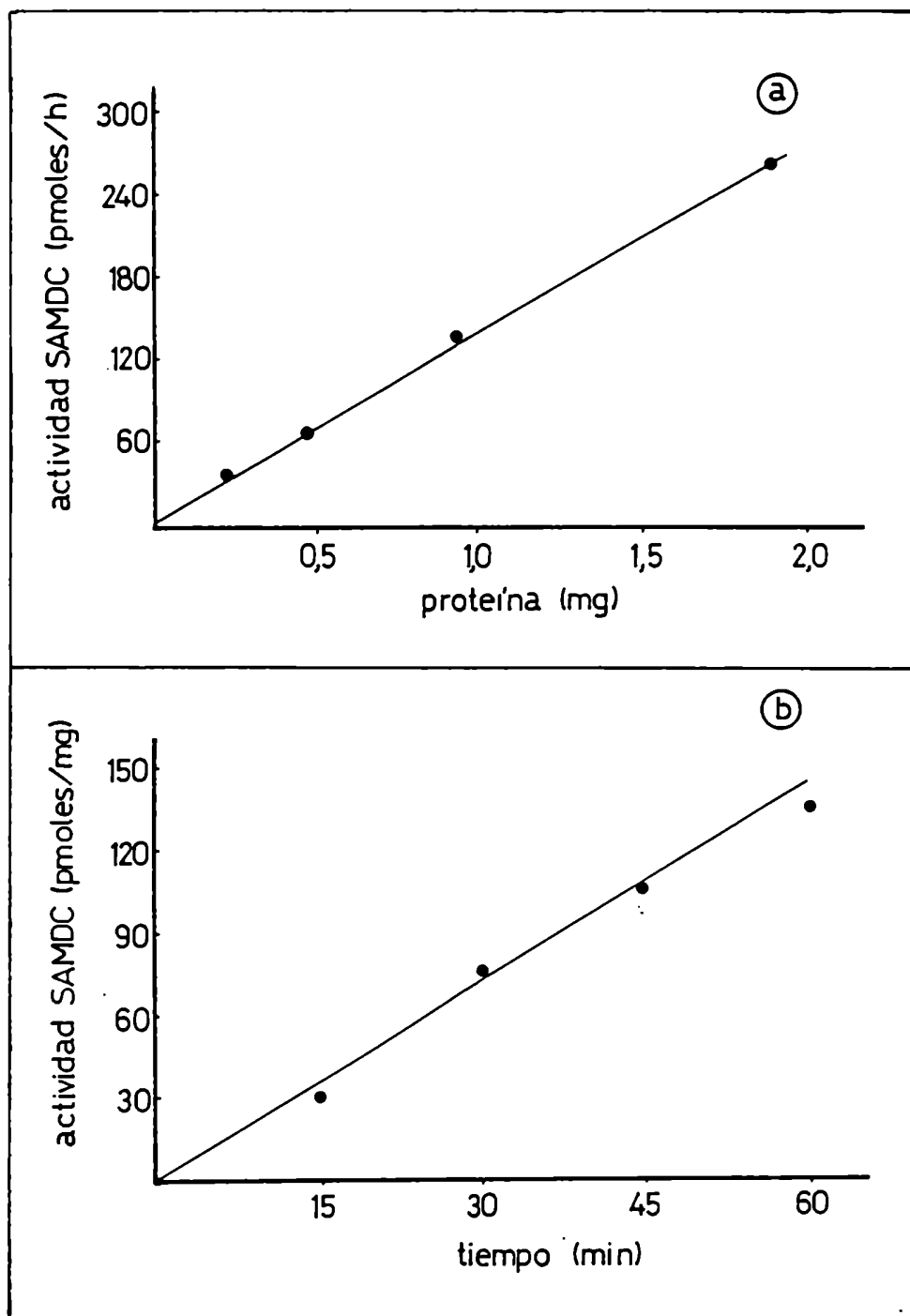
### Descripción de la actividad en el epidídimo

La liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de SAM por extractos de epidídimo fue lineal con la concentración de proteínas hasta 2 mg, y con el tiempo de incubación hasta los 60 minutos (Figura 33).

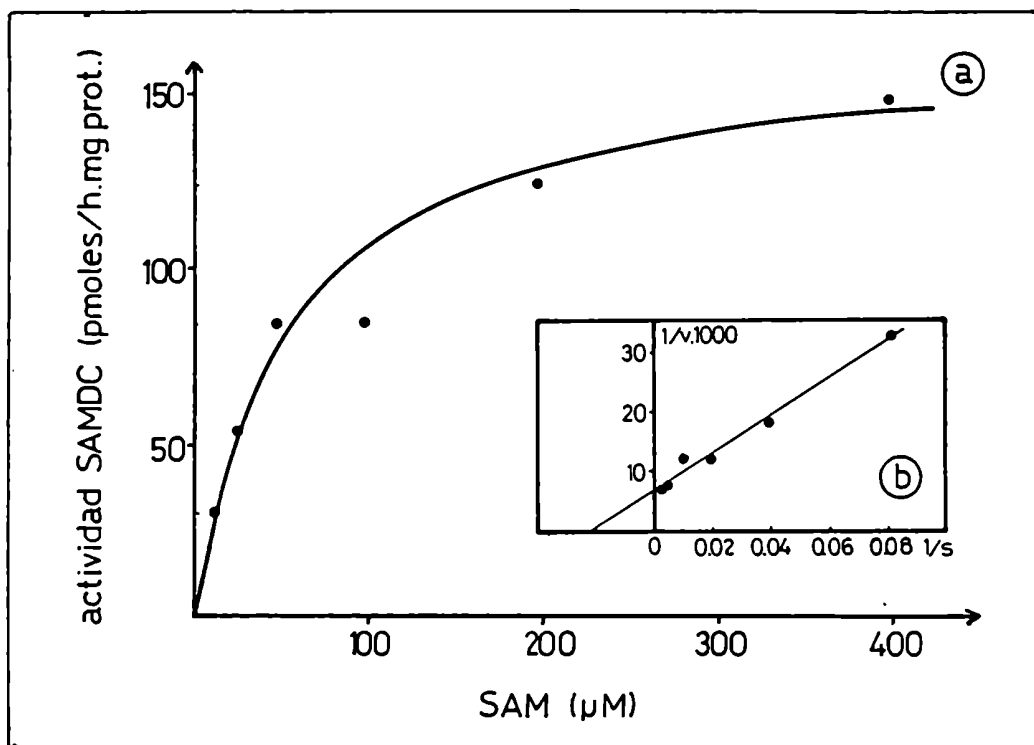
Para el análisis de Lineweaver-Burk de la actividad SAMDC epididimaria, se utilizó un buffer conteniendo 0,1  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -SAM y concentraciones crecientes de SAM, y un sobrenadante de epidídimo libre de SAM, obtenido por filtración a través de Sephadex G-25. Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  hallados fueron 50  $\mu\text{M}$  y 150 pmoles/h.mg de proteína, respectivamente (Figura 34).

En sobrenadantes no filtrados por Sephadex G-25, se detectó actividad SAMDC sin el agregado de putrescina exógena. En cambio, en preparaciones filtradas, que presentaron niveles de putrescina no detectables por el método cromatográfico (pág. 54), se observó que los valores de actividad son cercanos a los blancos de reacción, y que se produce una marcada activación por el agregado de putrescina exógena (Figura 35).

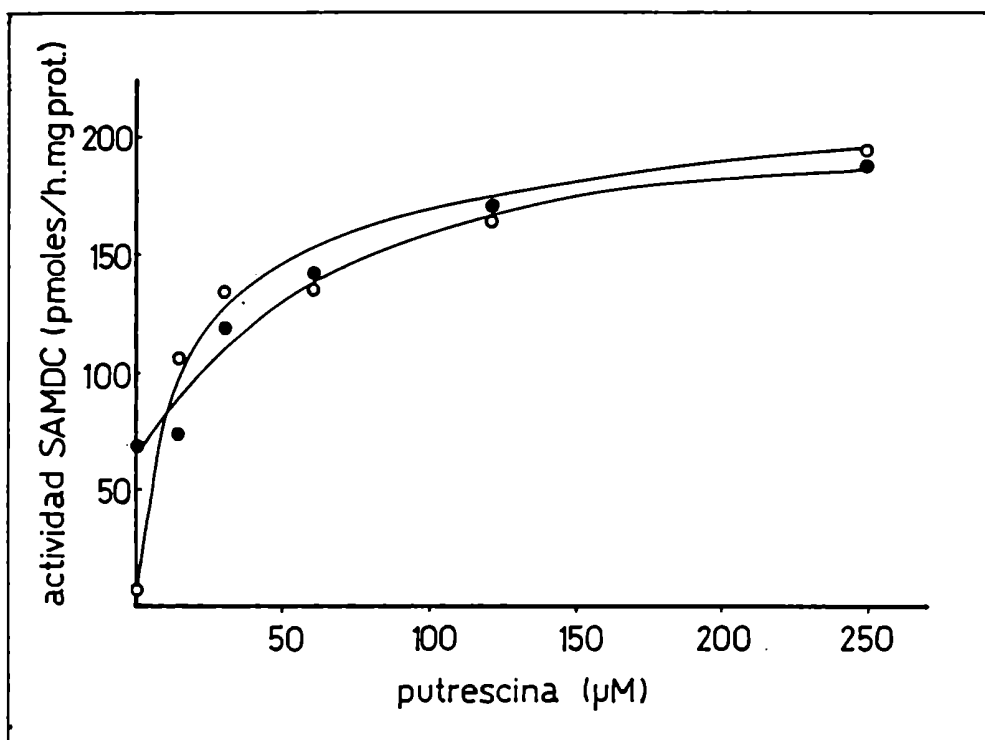
En forma análoga a la actividad ODC, al menos en animales de 45 días la actividad SAMDC presentó mayores valores en los



**Figura 33.** Actividad SAMDC epididimaria. a: linealidad con la cantidad de proteína. b: linealidad con el tiempo de incubación. Los valores corresponden a la actividad proveniente de epidídimos de 5 animales homogeneizados conjuntamente.



**Figura 34.** Actividad SAMDC epididimaria. a: curva de saturación. b: transformación de los datos por el método de Lineweaver-Burk.  $K_m = 49,7 \mu M$ .  $r = 0,99$ .



**Figura 35.** Actividad SAMDC en sobrenadante de epidídimo no filtrado (●) y filtrado a través de Sephadex G-25 (○). En ambos casos se utilizó la misma preparación, proveniente de epidídimos de 5 animales homogeneizados conjuntamente, incubada en presencia de las concentraciones de putrescina indicadas.



segmentos distales del órgano (Figura 36).

El estudio ontogénico de la actividad demostró que ésta ya es detectable antes del inicio de la pubertad, y presenta un máximo hacia el día 25, al expresar los valores por mg de proteína (Figura 37).

Los experimentos descriptos a continuación fueron realizados utilizando ratas de 45 días de edad, por las mismas razones que las expuestas en el caso de la actividad ODC.

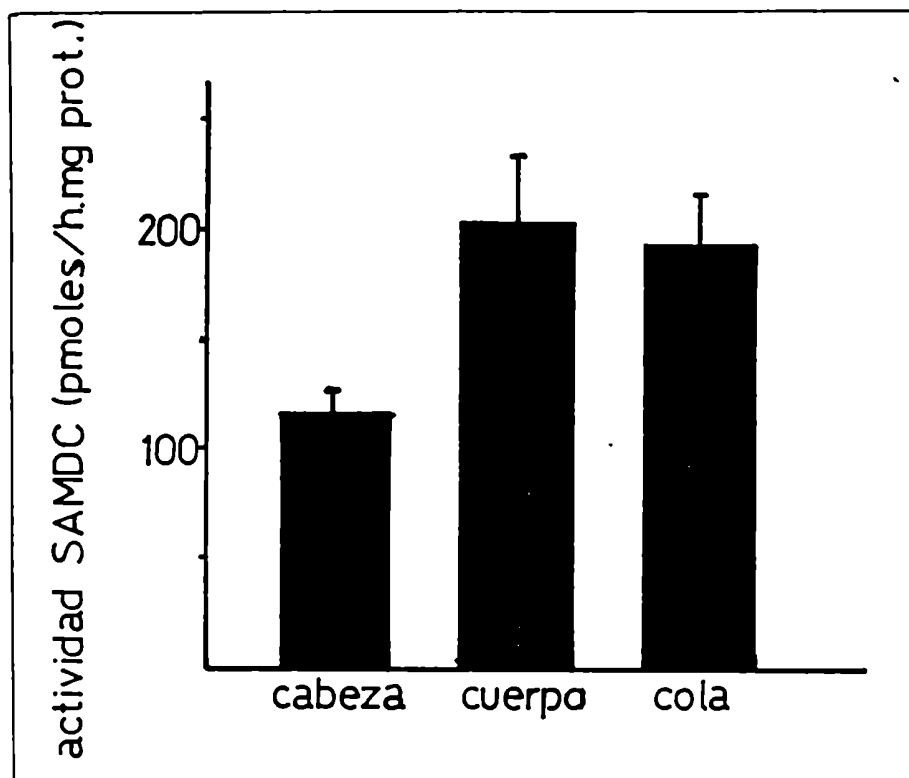
#### Andrógeno-dependencia

#### Efecto de la orquidectomía bilateral

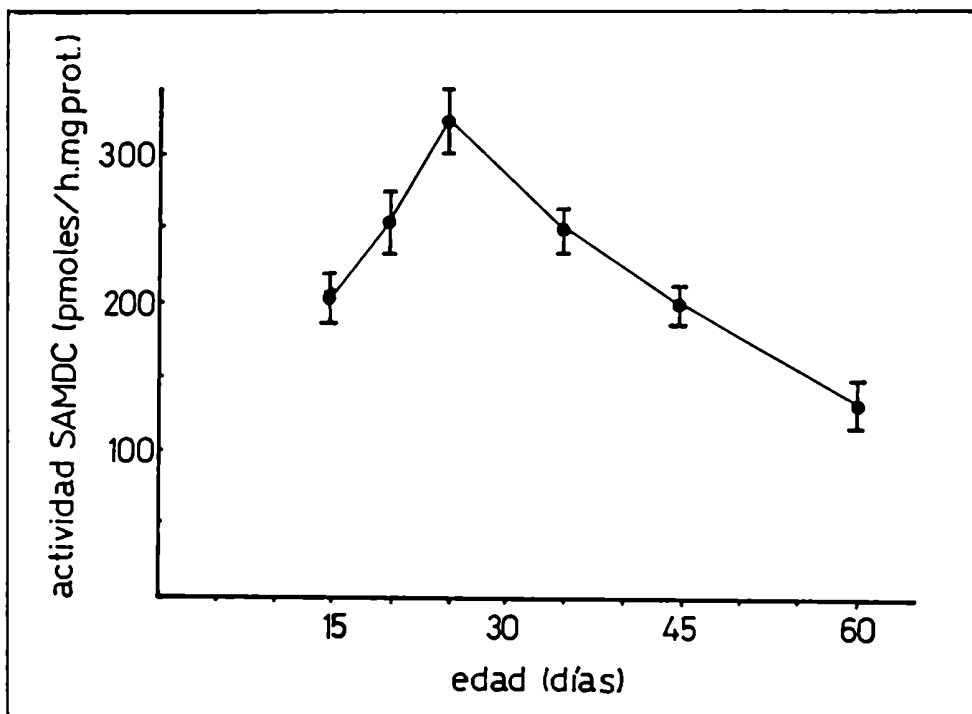
La orquidectomía bilateral resultó en la disminución de la actividad SAMDC, si bien a una velocidad mucho menor que la observada para la ODC (Figura 38). Dicha disminución fue significativa a las 72 horas post-castración.

#### Efecto de la testosterona en ratas intactas y castradas

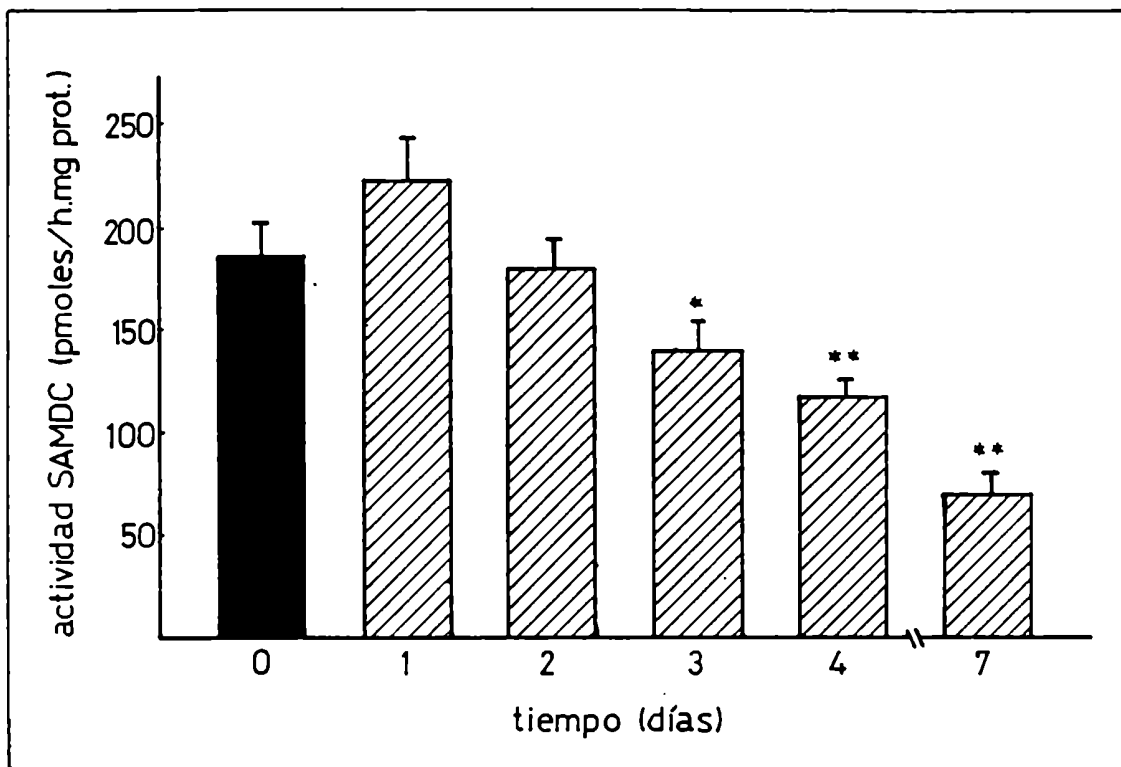
A los 7 días luego de la orquidectomía, la inhibición de la actividad SAMDC fue del 66% . La administración de PT durante el mismo tiempo, comenzando el tratamiento a las 24 horas post-orquidectomía, restauró dicha actividad en forma dosis-dependiente (Figura 39). La actividad se normalizó a la



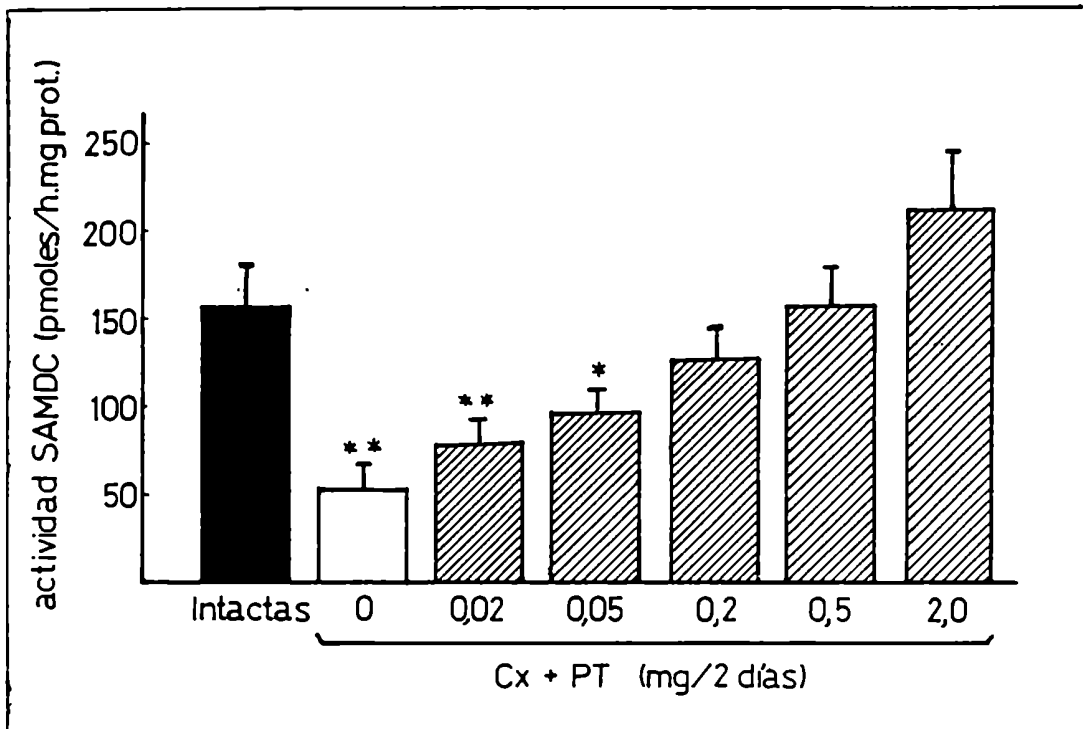
**Figura 36.** Distribución de la actividad SAMDC en segmentos correspondientes a cabeza, cuerpo y cola de epidídimo. Los valores representan promedios  $\pm$  DS de 4 determinaciones individuales.



**Figura 37.** Ontogenia de la actividad SAMDC epididimaria. Los valores representan promedios  $\pm$  ES de 5 muestras. Para cada muestra se homogeneizaron conjuntamente epidídimos de 2 animales de 15, 20 y 25 días. Las muestras restantes provienen cada una de un único animal.



**Figura 38.** Actividad SAMDC epididimaria en función del tiempo post-castración. Los valores representan promedios  $\pm$  DS de 4 determinaciones individuales. \*  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$  con respecto a los valores a tiempo 0.



**Figura 39.** Efecto de la orquidectomía y del tratamiento con PT a ratas orquidectomizadas, sobre la actividad SAMDC epididimaria. El tratamiento con PT se realizó durante 7 días, comenzando a las 24 horas post-orquidectomía. Los valores representan promedios  $\pm$  DS para 4 determinaciones individuales. \*  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$  con respecto a los valores de los animales intactos.

dosis de 200  $\mu\text{g}$  cada 2 días, obteniéndose valores por encima de los controles intactos a la dosis de 2000  $\mu\text{g}$ .

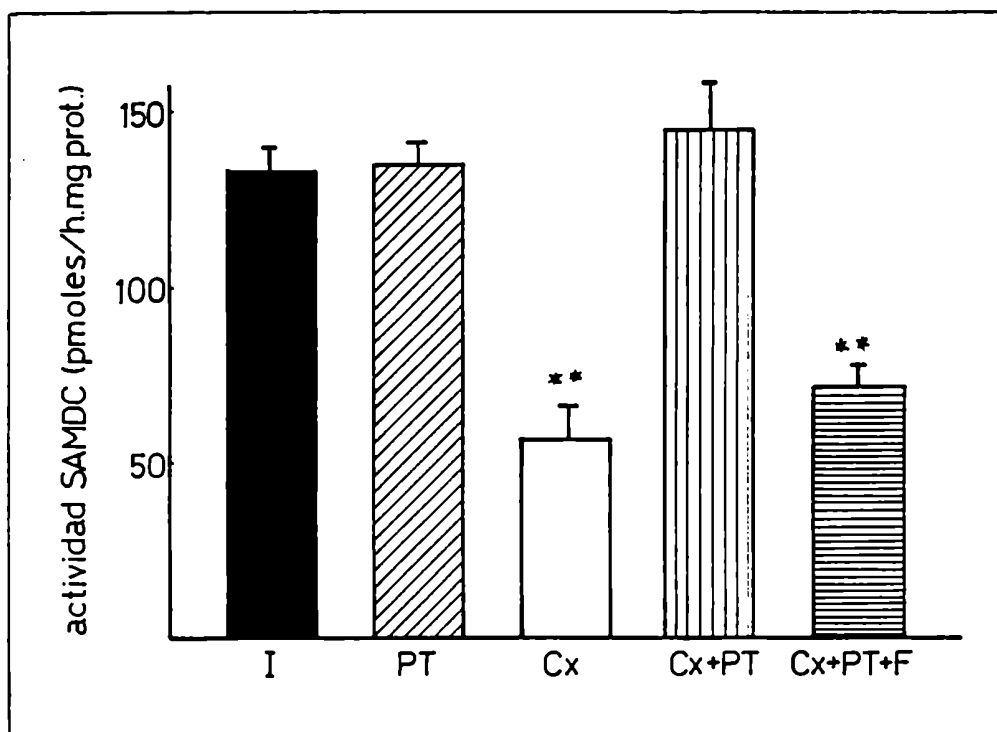
En ratas intactas, el tratamiento con PT (500  $\mu\text{g}$  cada 2 días) durante 7 días no tuvo efecto significativo sobre la actividad SAMDC (Figura 40).

#### Acción del antiandrógeno flutamida en ratas con reemplazo androgénico

El efecto del PT sobre la actividad SAMDC en epidídimos de ratas castradas fue completamente revertido por la administración conjunta de flutamida, obteniéndose valores de actividad iguales a los de los animales castrados. (Figura 40).

#### Actividad SAMDC en ratas hemiorquidectomizadas

Para evaluar el aporte de los andrógenos luminales y circulantes en el mantenimiento de la actividad SAMDC epididimaria, los animales fueron hemiorquidectomizados, y se determinó la actividad luego de 7 días. Como se observa en la Figura 41, no existen diferencias significativas en actividad en ambos epidídimos, indicando así que los andrógenos circulantes son suficientes para el mantenimiento de niveles normales de actividad SAMDC.



**Figura 40.** Actividad SAMDC en epidídimos de ratas intactas (I), intactas tratadas con 500 µg/2 días de PT, castradas (Cx), castradas tratadas con PT, o con PT y 5 mg/día de flutamida (F). Los tratamientos se realizaron durante 7 días, comenzando a las 24 horas post-castración. Los valores representan promedios ± DS para 4 determinaciones individuales. \*\* P < 0,01 con respecto a los valores de los animales intactos.

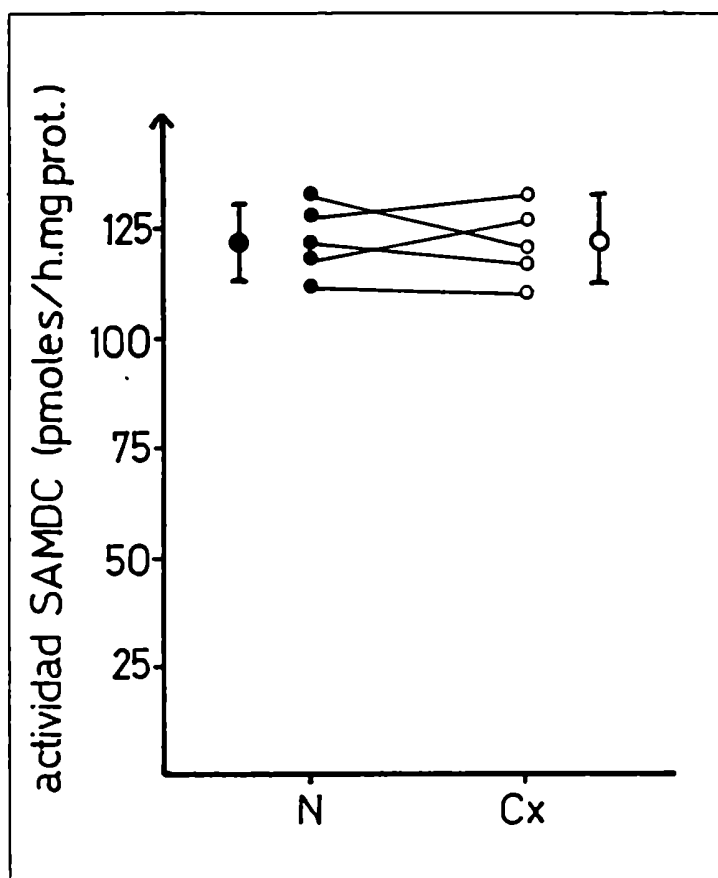


Figura 41. Actividad SAMDC en epidídimos de ratas hemiorquidectomizadas. Se representan los valores individuales de los pares de epidídimos, junto a los promedios  $\pm$  DS. N: lado intacto. Cx: lado castrado.

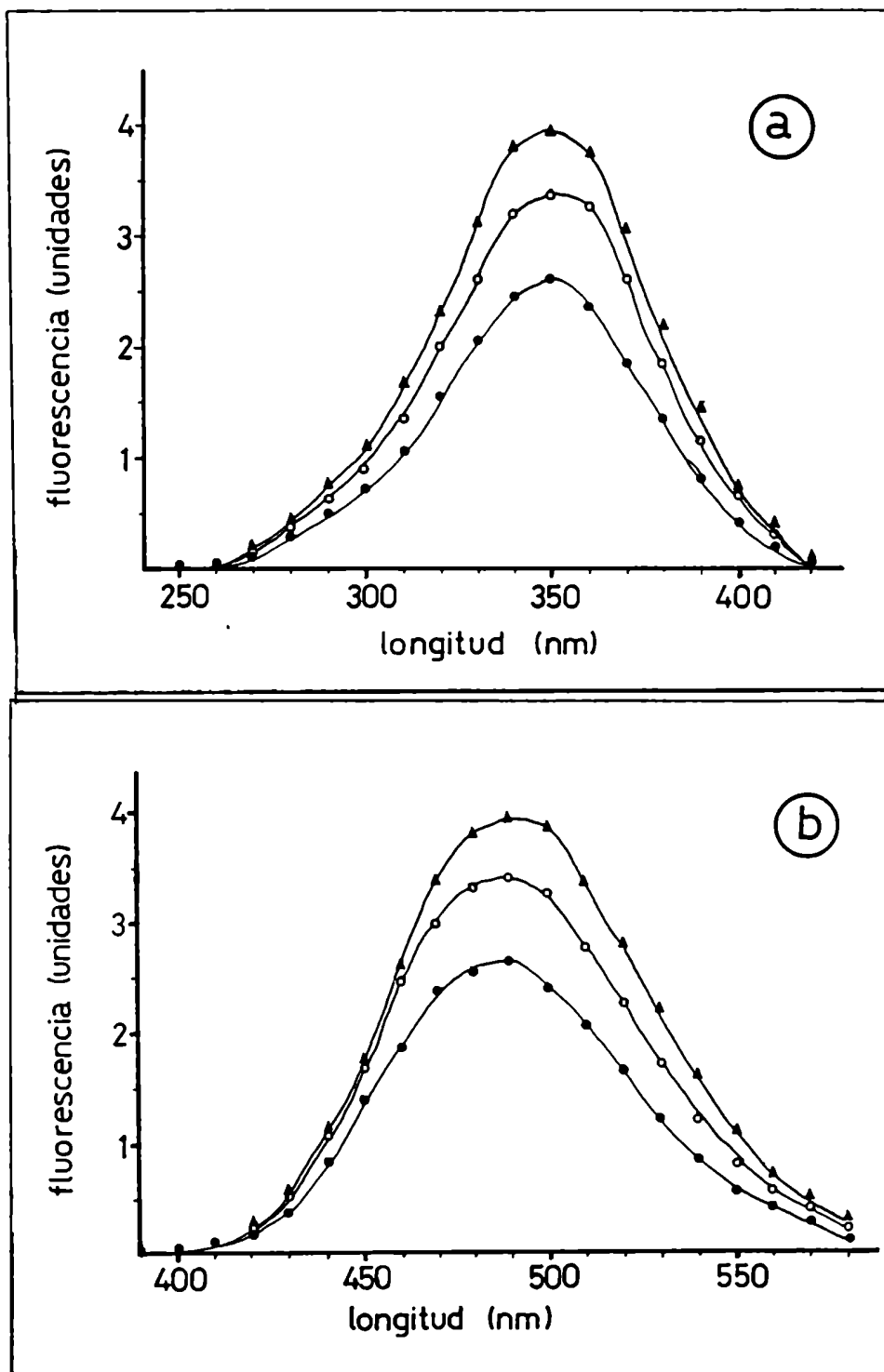


### 3. CONTENIDO Y CONCENTRACION DE PUTRESCINA Y POLIAMINAS

#### Validación del método de determinación

El método utilizado para la determinación de putrescina y poliaminas, basado en la medición fluorométrica de sus derivados dansilados separados por cromatografía en capa delgada, resultó adecuado para su aplicación al tejido epididimario. La fluorescencia de los derivados de putrescina, espermidina y espermina resultó proporcional al volumen de muestra analizada y al volumen de extracto sembrado. Los espectros de excitación y emisión de los derivados obtenidos con putrescina, espermidina y espermina puras presentaron máximos a 350 nm para la excitación y 490 nm para la emisión (Figura 42). La fluorescencia molar (medida en unidades arbitrarias) guardó la relación 2,59:3,38:3,96 para putrescina, espermidina y espermina, respectivamente. Los valores de  $r_f$  fueron 0,62, 0,53 y 0,45 para putrescina, espermidina y espermina, respectivamente.

En todos los casos se utilizaron animales de 45 días de edad.



**Figura 42.** Espectros de excitación y emisión de los derivados dansilados de putrescina (●), espermidina (○) y espermina (▲). a: excitación (emisión: 490 nm). b: emisión (excitación: 350 nm).

## Andrógeno-dependencia

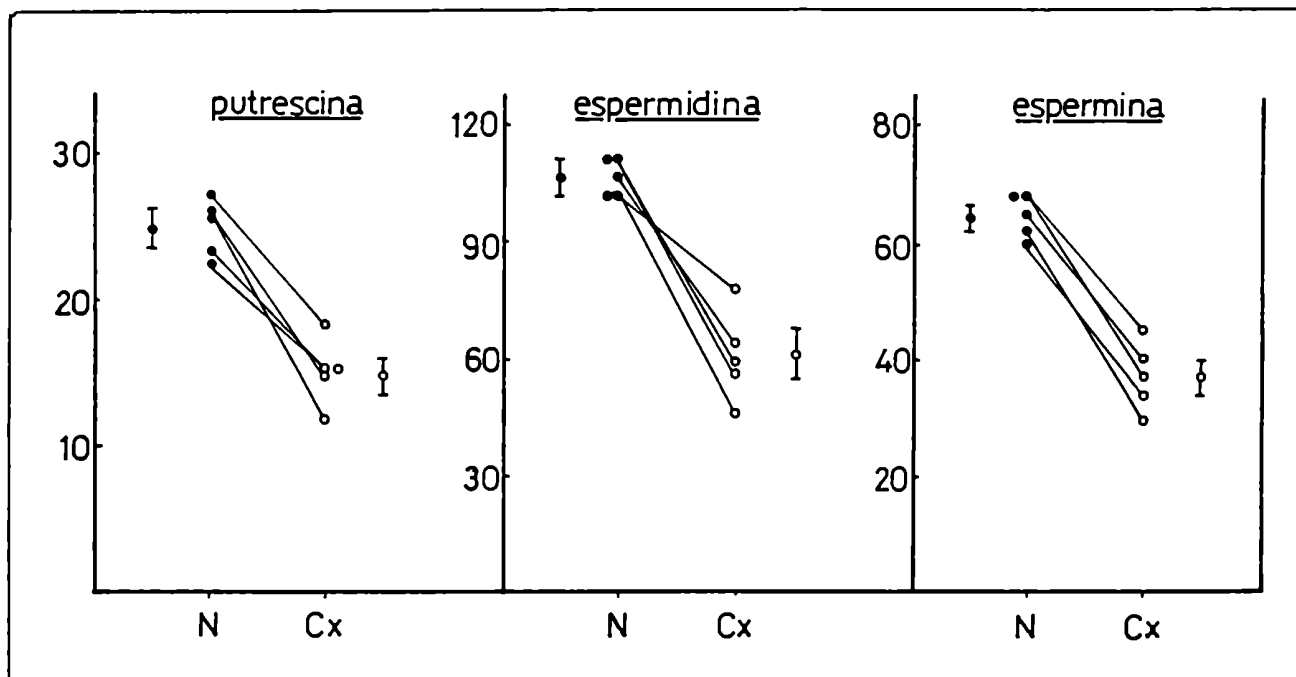
### Efecto de la orquidectomía unilateral

La orquidectomía unilateral resultó, luego de 7 días, en una disminución significativa del contenido (expresado en nmoles/órgano) de putrescina, espermidina y espermina (Figura 43). Sin embargo, al expresar los resultados en términos de concentración tisular (nmoles/g de tejido) no se observaron diferencias significativas en ningún caso (Figura 44).

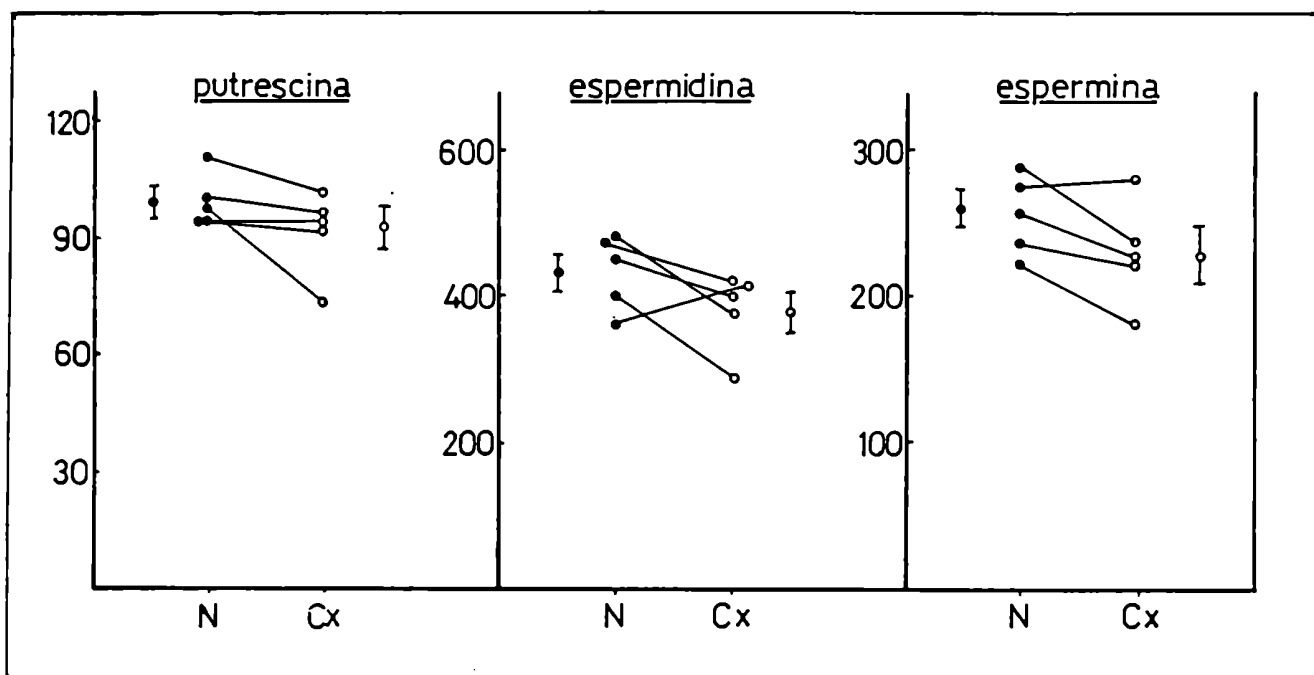
### Efecto de la orquidectomía bilateral y del reemplazo androgénico

En una primera serie de experimentos, se estudió el efecto de la orquidectomía a tiempos cortos, para evitar la atrofia del órgano que se produce a largo plazo. A las 24 y 48 horas post-castración, no se observó una diferencia significativa del peso del epidídimo. En estas condiciones se verificó una caída del contenido de putrescina epididimaria, sin cambios detectables en espermidina y espermina (Figura 45).

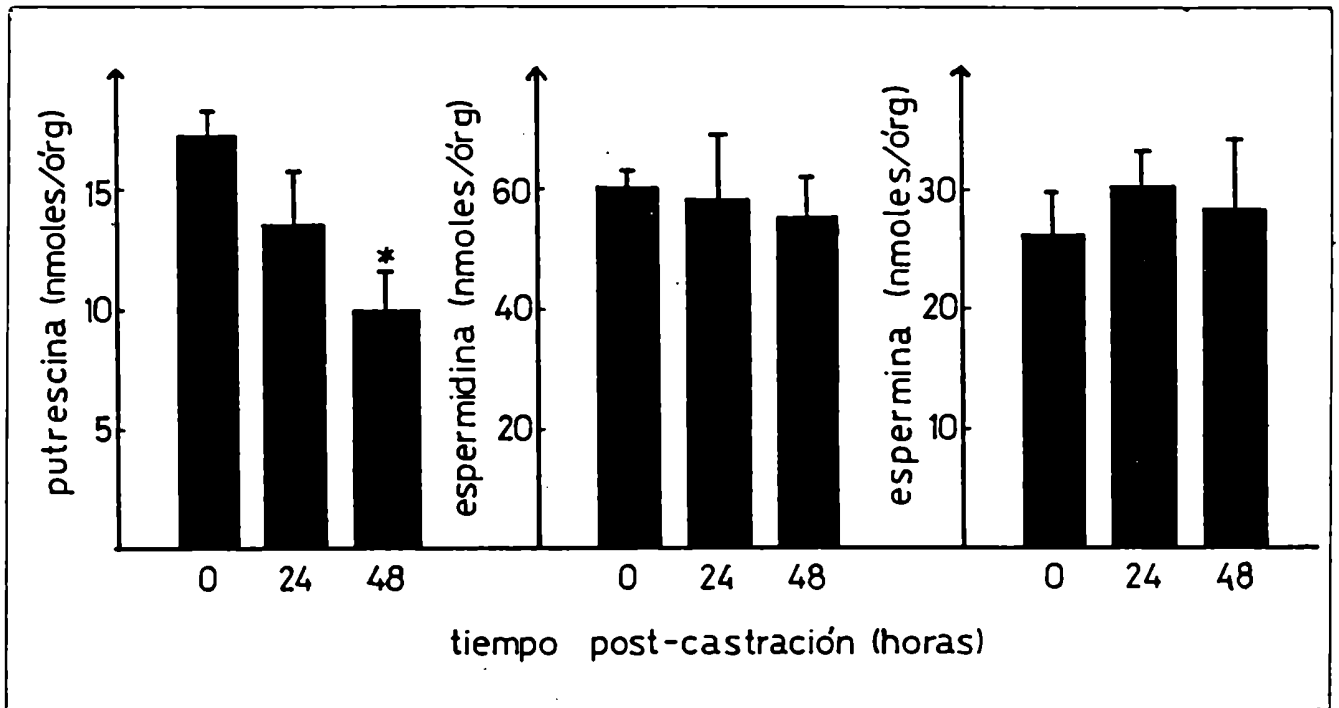
La caída en putrescina observada a las 48 horas fue prevenida por tratamiento con PT, el cual no tuvo efecto sobre los niveles de espermidina y espermina (Figura 46).



**Figura 43.** Contenido de putrescina, espermidina y espermina en epidídimos de ratas hemiorquidectomizadas. Los resultados se expresan en nmoles/órgano. Se representan los valores individuales de cada par de epidídimos, junto a los promedios  $\pm$  DS. N: lado intacto. Cx: lado castrado. Las diferencias son significativas ( $P < 0,01$ ) en los tres casos.



**Figura 44.** Concentración tisular de putrescina, espermidina y espermina en epidídimos de ratas hemiorquidectomizadas. Los resultados se expresan en nmoles/g de tejido. Se representan los valores individuales de cada par de epidídimos, junto a los promedios  $\pm$  DS. N: lado intacto. Cx: lado castrado.



**Figura 45.** Contenido de putrescina, espermidina y espermina en epidídimos de ratas intactas y a las 24 y 48 horas luego de la castración. Los valores representan promedios  $\pm$  DS para 5 determinaciones individuales. \*  $P < 0,05$  con respecto a los valores a tiempo 0 (intactas).

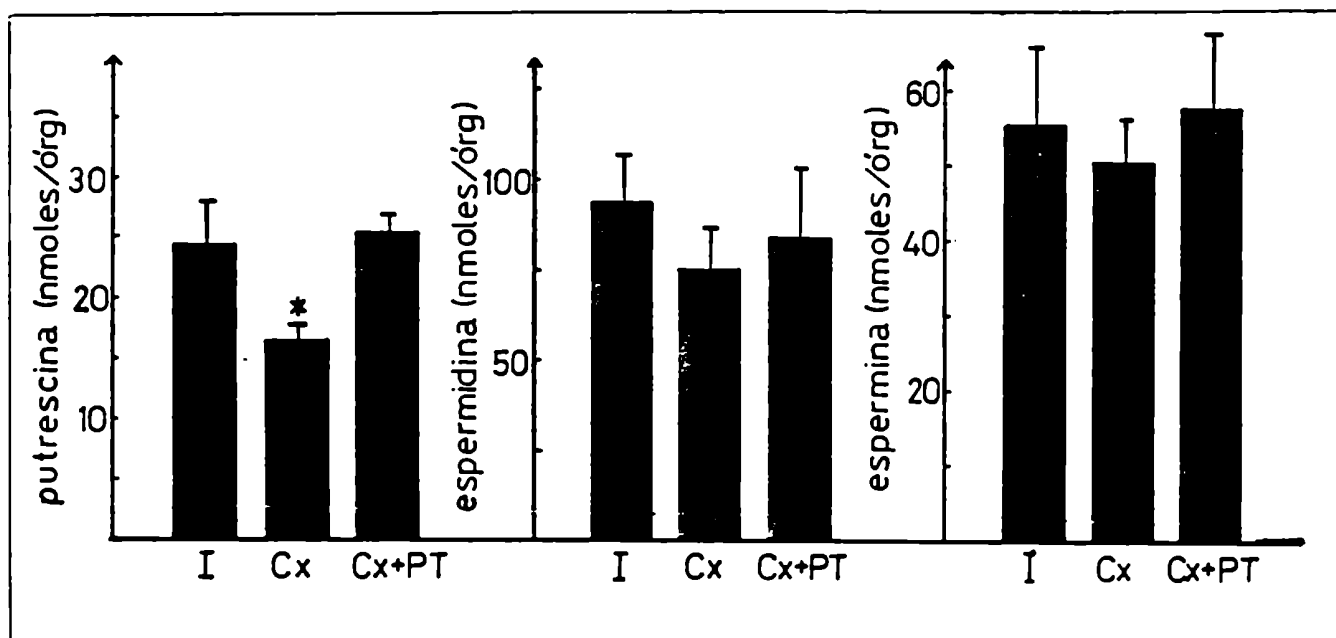


Figura 46. Efecto de la administración de PT a ratas castradas sobre el contenido epididimario de putrescina, espermidina y espermina. Los animales recibieron 500 µg/día del andrógeno, comenzando el tratamiento inmediatamente luego de la castración. Los valores representan promedios ± DS de 5 determinaciones individuales. \* P < 0,05 con respecto a los valores de los animales intactos.

Luego de 7 días, la orquidectomía bilateral resultó en una pérdida del 62% del peso del epidídimo, el cual fue parcialmente restablecido por tratamiento con 50 µg/día de PT (Tabla VII). Dicha pérdida de peso fue acompañada por una disminución del contenido tisular de putrescina, espermidina y espermina, expresado en nmoles/órgano (Tabla VII). Esta caída fue significativa para los 3 compuestos. El tratamiento con PT aumentó el contenido de poliaminas en epidídimo de animales castrados (Tabla VII). Resulta interesante destacar que el contenido de putrescina aumentó un 200% con respecto a los animales castrados no tratados, mientras que el contenido de espermidina y espermina aumentó un 92% y 34% respectivamente. Al expresar los resultados en nmoles/g de tejido (Tabla VII), se observó una disminución significativa de putrescina y espermidina, sin cambios en espermina. El tratamiento con PT normalizó la concentración de putrescina, sin efecto sobre espermidina y espermina.

#### Acción de flutamida

La administración de flutamida (1 y 5 mg/día en dos aplicaciones durante 7 días) a animales intactos no afectó el contenido ni la concentración de poliaminas en el epidídimo. En animales castrados tratados con 50 µg de PT/día, la flutamida, a la dosis de 1 mg/día, inhibió a valores comparables a



		Intactas	Castradas	Castradas + PT
Peso (mg)		243 ± 8	91 ± 5	155 ± 7 *
Contenido (nmol/órg)	Pu	23,3 ± 1,8	5,6 ± 0,2	17,0 ± 1,8 *
	Sd	103,0 ± 5,7	30,3 ± 0,7	58,1 ± 3,6 *
	Sp	65,4 ± 2,8	29,7 ± 1,8	39,9 ± 1,3
Concentración (nmol/g)	Pu	95,7 ± 7,3	63,6 ± 5,2	109,6 ± 11,8 *
	Sd	425 ± 22	325 ± 22	382 ± 21
	Sp	268 ± 24	300 ± 18	258 ± 8

Tabla VII. Contenido y concentración de putrescina (Pu), espermidina (Sd) y espermina (Sp) en epidídimos de ratas intactas, castradas y castradas tratadas con PT (0,05mg/día). los valores representan promedios ± ES para 4 determinaciones individuales. \* P < 0,05 con respecto a los valores obtenidos en los animales castrados.

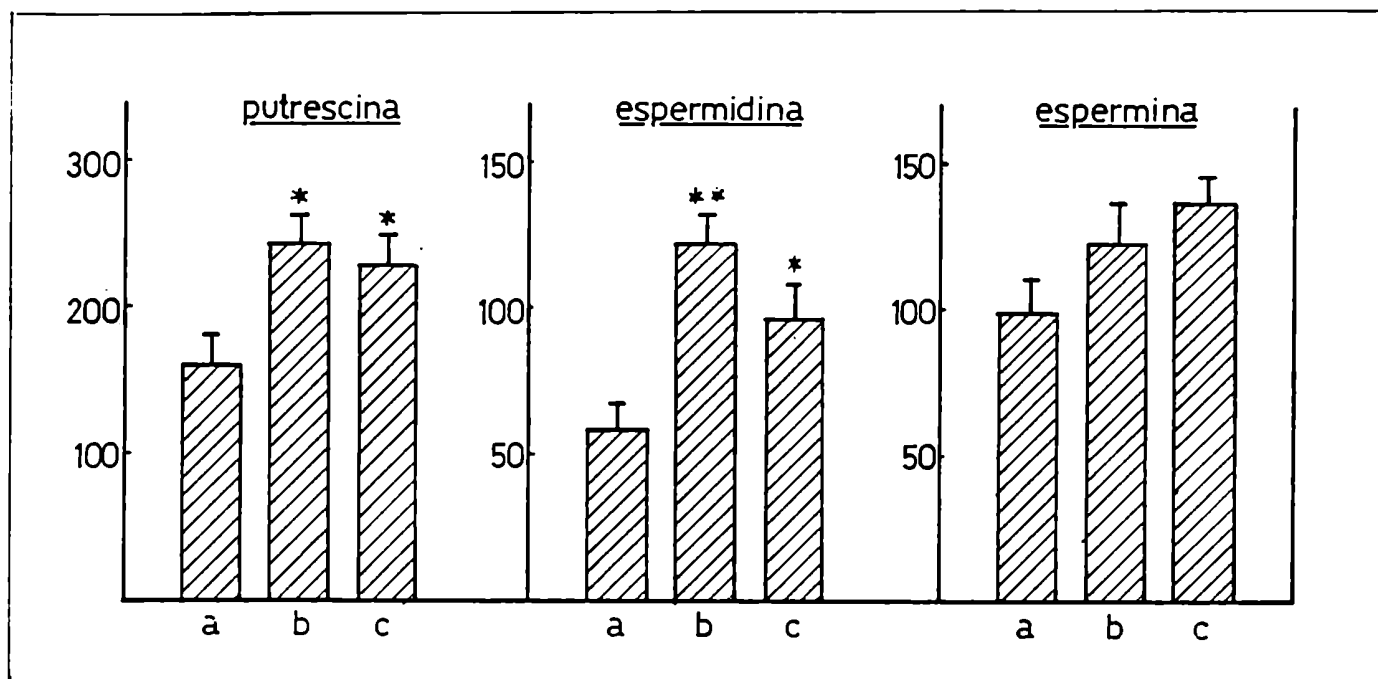
los de animales castrados el aumento del contenido de putrescina y espermidina provocado por PT, sin evidenciar efecto sobre el contenido de espermina (Tabla VIII).

Contenido de putrescina y poliaminas en espermatozoides epididimarios

En este caso se utilizaron ratas de 90 días de edad, determinándose el contenido de putrescina y poliaminas en espermatozoides obtenidos de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo. Como se observa en la Figura 47, el contenido de los 3 compuestos fue mayor en espermatozoides obtenidos de los segmentos más distales del epidídimo, siendo la diferencia, con respecto a los valores obtenidos en el segmento proximal, estadísticamente significativa en el caso de la putrescina y la espermidina.

Tratamiento	Putrescina (nmoles/órg)	Espermidina (nmoles/órg)	Espermina (nmoles/órg)
Intactas:			
Vehículo	23,3 ± 1,8	103,0 ± 5,7	65,4 ± 2,8
F (1 mg/día)	22,5 ± 0,8	97,1 ± 0,4	64,6 ± 3,1
F (5 mg/día)	19,4 ± 1,0	83,3 ± 6,4	56,7 ± 3,5
Castradas:			
Vehículo	5,6 ± 0,2	30,3 ± 0,6	29,7 ± 1,8
PT (0,05 mg/día)	17,0 ± 1,8	58,1 ± 6,2	39,9 ± 1,3
PT (0,05 mg/día)	7,4 ± 0,3 *	39,4 ± 2,8 *	34,6 ± 1,2

Tabla VIII. Efecto de flutamida sobre el contenido de putrescina y poliaminas en epidídimos de ratas intactas y ratas castradas suplementadas con propionato de testosterona. Los valores representan promedios ± ES de 4 determinaciones.  
\* P < 0,05 vs animales castrados tratados con PT.



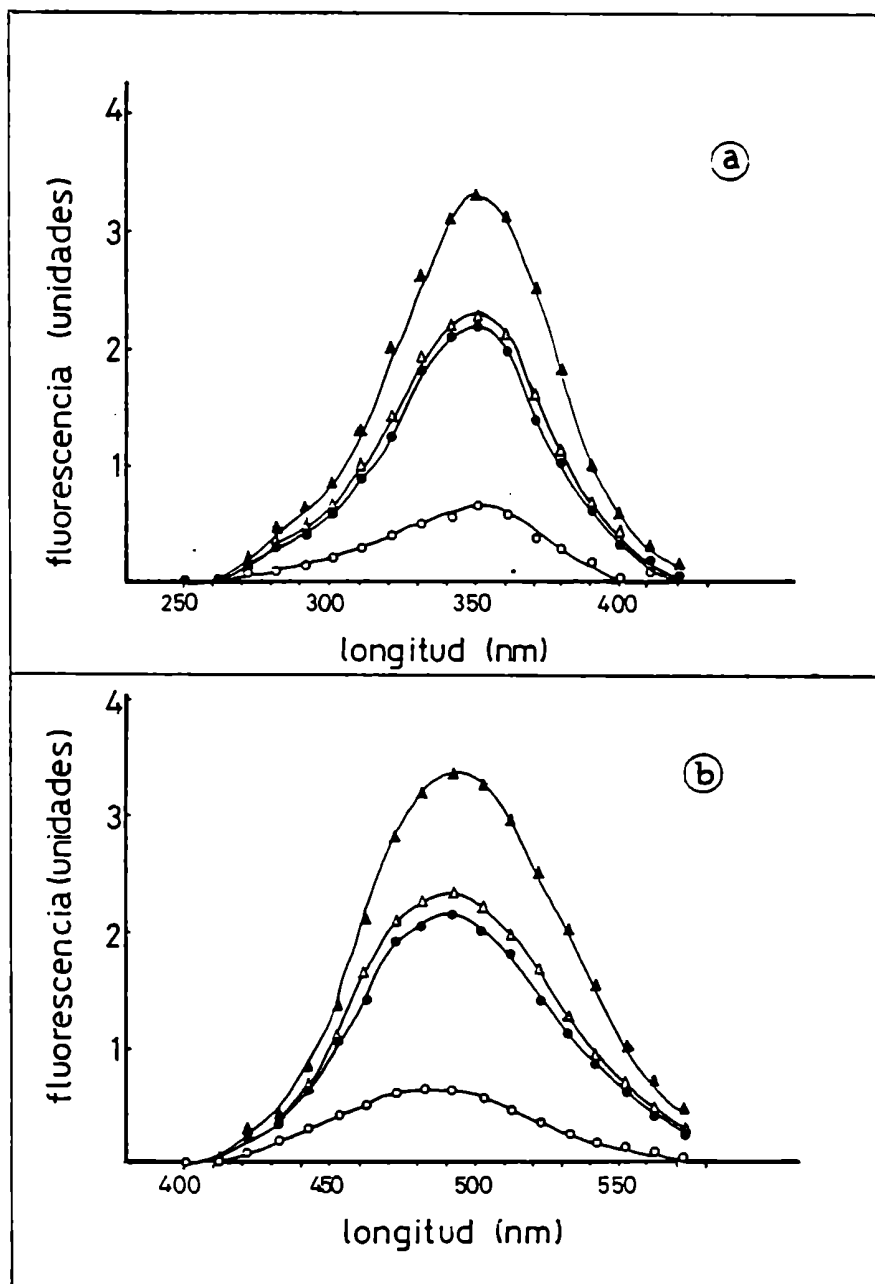
**Figura 47.** Contenido de putrescina, espermidina y espermina en espermatozoides obtenidos de cabeza (a), cuerpo (b) y cola (c) de epidídimo. Los resultados se expresan en nmoles/10 células, y representan promedios  $\pm$  ES de 5 determinaciones individuales. \*  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$  con respecto a los valores de (a).

#### 4. CONTENIDO Y CONCENTRACION DE ACETILPUTRESCINA Y ACETILPOLIAMINAS

##### Validación del método de determinación

El método utilizado para la determinación de acetilputrescina y acetilpoliaminas, análogo al descrito para la determinación de putrescina y poliaminas, resultó adecuado para su aplicación al tejido epididimario, si bien los niveles de dichos compuestos fueron cercanos al límite de detección del ensayo (0,125 nmoles). En consecuencia, fue necesario modificar las condiciones de homogeneización, extracción y elución para minimizar errores inherentes a la baja sensibilidad.

La fluorescencia de los derivados dansilados de acetilputrescina, N<sup>1</sup>-acetilespermidina, N<sup>8</sup>-acetilespermidina y acetilespermina resultó proporcional al volumen de muestra analizada y al volumen de extracto sembrado. Los espectros de excitación y emisión de estos compuestos también presentaron máximos a 350 nm para la excitación y 490 nm para la emisión (figura 48). La fluorescencia molar guardó la relación 1,17:4,5:4,4:6,6 para acetilputrescina, N<sup>1</sup>-acetilespermidina, N<sup>8</sup>-acetilespermidina y acetilespermina, respectivamente. Los valores de  $r_f$  fueron 0,37, 0,53, 0,58 y 0,68 para acetilputrescina, N<sup>8</sup>-acetilespermidina, N<sup>1</sup>-acetil-



**Figura 48.** Espectros de excitación y emisión de los derivados dansilados de acetilputrescina (○), N<sup>1</sup>-acetylespermidina (△), N<sup>6</sup>-acetylespermidina (●) y acetylespermina (▲). a: excitación (emisión: 490 nm). b: emisión (excitación: 350 nm).

espermidina y acetilespermina, respectivamente.

Presencia de acetilpoliaminas en el epidídimo. Efecto de la castración y del reemplazo androgénico

Como se observa en la Tabla IX, no fue posible detectar la presencia de acetilputrescina en ninguna de las condiciones. En cambio, las acetilpoliaminas fueron detectables en el epidídimo, si bien en cantidades mucho menores que las poliaminas. En el caso de las acetilespermidinas y la acetilespermina, la castración provocó, luego de 7 días, una disminución del contenido de los 3 derivados. Sin embargo, la concentración epididimaria de estos compuestos mostró un perfil diferente, aumentando como consecuencia de la castración.

El efecto de la castración sobre el contenido de acetilpoliaminas fue revertido por administración de PT. En el caso de la concentración tisular, la acción del andrógeno fue evidente en N<sup>8</sup>-acetilespermidina y acetilespermina.

		Intactas	Castradas	Castradas + PT
Peso de epidídimo (mg)		205 ± 14	55 ± 3	147 ± 6 **
Contenido (nmol/órg)	AcPu	ND	ND	ND
	N <sup>1</sup> -AcSd	2,29 ± 0,14	1,01 ± 0,02	2,60 ± 0,24 **
	N <sup>8</sup> -AcSd	2,15 ± 0,08	0,94 ± 0,02	2,00 ± 0,05 **
	AcSp	2,75 ± 0,12	1,14 ± 0,02	2,49 ± 0,11 **
Concentración (nmol/g)	AcPu	ND	ND	ND
	N <sup>1</sup> -AcSd	11,2 ± 0,35	18,7 ± 1,06	17,8 ± 1,48
	N <sup>8</sup> -AcSd	10,6 ± 0,51	16,8 ± 0,98	13,7 ± 0,71 *
	AcSp	13,5 ± 0,66	21,0 ± 1,36	17,0 ± 0,94 *

Tabla IX. Contenido y concentración tisular de acetilputrescina (AcPu), N<sup>1</sup>-acetilespermidina (N<sup>1</sup>-AcSd), N<sup>8</sup>-acetilespermidina (N<sup>8</sup>-AcSd) y N<sup>1</sup>-acetilespermina (AcSp) en ratas intactas, castradas y castradas tratadas con propionato de testosterona (0,5 mg cada 2 días durante 7 días). Los valores representan promedios ± ES para 4 determinaciones individuales. \* P < 0,05. \*\* P < 0,01 con respecto a los valores obtenidos en los animales castrados.



## DISCUSION

Los resultados presentados en esta sección demuestran que existe un activo metabolismo de las poliaminas en el epídimo de rata, y que dicho metabolismo se encuentra bajo el control predominante de los andrógenos. Para ello, se analizaron las actividades de las dos enzimas más importantes de su metabolismo, ODC y SAMDC, los niveles de poliaminas y la presencia de formas acetiladas como intermediarios de su interconversión.

### Actividad ornitina descarboxilasa

La actividad ODC, considerada la enzima limitante de la síntesis de poliaminas, fue el primer parámetro estudiado, debido a que en la mayoría de los casos su actividad es el indicador más sensible a variaciones en el entorno hormonal.

El estudio ontogénico de la actividad ODC indicó que ésta es indetectable antes de los 25 días de edad. Es conveniente destacar que en todos los casos en que se consideró a la actividad no detectable, no fue posible obtener valores superiores al doble de los blancos de reacción aun con la máxima cantidad de proteína utilizable (2 mg) y a valores de actividad específica de la ornitina hasta 5 veces los utilizados para detectar actividad en animales intactos de 45 días de

edad. La aguda activación de la ODC epididimaria hacia el día 25 ya hace cierta alusión al control androgénico de esta enzima. Entre los 20 y 25 días de edad, aumenta la producción de andrógenos testiculares (Podestá y Rivarola, 1974; Moger, 1977), se hace detectable el contenido epididimario de DHT y de los receptores citosólicos de andrógenos (Calandra y col., 1974) y se produce un aumento en los niveles de ABP en la cabeza del epidídimo (Hansson y col., 1974). Según otros autores (Danzo y Eller, 1985) la proteína ligadora de andrógenos (ABP) se detecta en el epidídimo de rata hacia el día 25. Estas evidencias son indicativas de un aumento de la disponibilidad de andrógenos en el epidídimo a esa edad. En relación a esto, Setty y Jehan (1977) demostraron que la fase de mayor crecimiento del epidídimo, evaluada por examen histológico, comienza hacia el día 21, lo cual se encuentra en aceptable correspondencia con el pico de incorporación de timidina al ADN que se detecta en el epidídimo en el día 25 (De Larminat y col., 1981).

Los presentes resultados demuestran que la actividad ODC se halla bajo un estricto control androgénico en el epidídimo de rata. Ya a las 12 horas post-castración, su actividad, expresada por mg de proteína, disminuye en más del 70%, alcanzando niveles cercanos al límite de sensibilidad del ensayo a las 72 horas. La disminución de la actividad se halla relacionada temporalmente con la caída de los

andrógenos circulantes. Nuestros resultados son compatibles con los obtenidos por otros autores (Coyotupa y col., 1973), quienes analizaron la cinética de caída de los andrógenos circulantes provocada por la castración a tiempos muy cortos: al menos en ratas adultas, la concentración sérica de testosterona y 5 $\alpha$ -DHT disminuye luego de la castración con una vida media inicial de 5 a 7 minutos. Por otra parte, si bien en el presente trabajo no se analizó la cinética de caída de los andrógenos epididimarios post-castración, el intervalo de tiempo entre la castración y la inhibición de la ODC se encuentra en excelente concordancia con los resultados de Aafjes y Vreeburg (1972), quienes observaron que luego de la castración la DHT desaparece del epidídimo con una vida media de 4 a 5 horas. Por lo tanto, según lo hallado por dichos autores el contenido epididimario de DHT caería en un 80% a las 12 horas post-castración. Los mismos autores demostraron que a las 6 horas post-castración el contenido intraepididimario de DHT cae en un 70%. Según lo hallado en el presente trabajo (Figura 19), a tal tiempo la ODC no se halla afectada, indicando que el contenido epididimario de DHT es mucho mayor que el necesario para mantener una estimulación máxima de la actividad ODC, al menos en la rata de 45 días de edad. Esta hipótesis se verifica por la falta de efecto de la testosterona exógena sobre la ODC en ratas intactas de la misma edad (Figura 25).

La actividad enzimática es inducida por una única dosis de testosterona luego de 12 horas, y se conserva mientras se mantienen concentraciones séricas de andrógenos por encima o cercanas a las fisiológicas (Figura 20). En los esquemas de administración crónica, la alta sensibilidad de la ODC a los andrógenos es revelada por el hecho de que la administración de una muy baja dosis (20 µg cada 2 días) de PT restaura la actividad. Sin embargo, la sensibilidad al andrógeno parece variar con el tiempo transcurrido entre la castración y el comienzo del tratamiento. En efecto, comparando las Figuras 21 y 25 se puede observar que la respuesta al PT es mayor en ratas castradas y mantenidas sin reemplazo androgénico durante 7 días, que en aquellas en las que se comenzó el tratamiento a las 24 horas. En el primer caso se obtuvo una estimulación por encima de los valores de los controles intactos, mientras que en el segundo la respuesta no superó el valor control. Una posible explicación de esta diferencia es que la castración a largo plazo resultaría en una supersensibilización del órgano a la acción androgénica, probablemente por un aumento del número de receptores activos o por aumento de la afinidad de los receptores por el ligando. El reemplazo inmediato con andrógenos prevendría este efecto. Esta hipótesis es compatible con los resultados obtenidos por Tezón y Blaquier (1983), quienes demostraron que si bien el número de receptores citosólicos de andrógenos

disminuye en el epidídimo a los 6 días post-castración, se produce un aumento en el valor de  $K_a$  de los receptores remanentes. Este efecto no se observa a los 2 días post-castración.

La acción del antiandrógeno acetato de ciproterona fue evidente en vista de que una dosis de 10 mg cada 2 días disminuyó la actividad ODC inducida por 200  $\mu$ g de PT a los valores obtenidos por administración de 20  $\mu$ g del andrógeno, es decir una inhibición del 90%. El acetato de ciproterona actúa en el epidídimo inhibiendo la traslocación nuclear del receptor de andrógenos inducida por 5 $\alpha$ -DHT (Tezón y col., 1982), lo cual sugiere la participación de un receptor funcional de andrógenos para la inducción de la ODC. En consonancia con los presentes resultados, también en el riñón de ratón la inducción de la ODC por testosterona fue bloqueada por el acetato de ciproterona (Bullock, 1983).

El efecto observado no es específico para la testosterona, por cuanto otros andrógenos (DHT y 3 $\alpha$ -diol) también estimulan la ODC epididimaria (Figura 22). El menor grado de activación por 3 $\alpha$ -diol coincide con su menor actividad androgénica con respecto a T y DHT, si bien este compuesto es considerado un andrógeno activo en el epidídimo de rata entre los días 20 y 30 de edad (De Larminat y col., 1981).

El epidídimo recibe andrógenos de ambos testículos y de las glándulas adrenales por vía sanguínea a través del plexo

pampiniforme, y por vía luminal del testículo ipsilateral. Además, los andrógenos son probablemente sintetizados en el propio tejido. Con el objeto de evaluar la participación de los aportes sanguíneo y luminal en la inducción de la actividad ODC, se efectuaron los experimentos de hemicastración y ligadura de los conductos eferentes, en los que se previene la entrada al epidídimo del líquido proveniente del testículo. En ambos modelos, si bien la concentración sérica de andrógenos cae inicialmente, se encuentra normalizada a los tiempos analizados en nuestros experimentos. Tanto por hemicastración (Figura 23) como por ligadura de los conductos eferentes (Figura 24) la actividad ODC epididimaria no resultó modificada con respecto al lado intacto. La posterior remoción del testículo remanente a ratas hemicastradas nuevamente llevó la actividad ODC a valores no detectables, indicando así que el aporte sanguíneo de andrógenos es suficiente pero esencial para el mantenimiento de la actividad.

Durante las 3 primeras semanas de edad en la rata, el epidídimo está exclusivamente sujeto al control ejercido por los andrógenos séricos, por cuanto no se ha iniciado aún el aporte de líquido testicular (Resko y col., 1968; Dohler y Wuttke, 1975). La castración unilateral y la ligadura de los conductos eferentes antes de esta edad provoca marcadas alteraciones en la diferenciación del epidídimo, más evidentes en el segmento inicial y en las células principales

(Delongas y col., 1987), destacando la importancia del líquido luminal en este proceso. Además, uno o más componentes luminales podría actuar per se o sinérgicamente con otros factores séricos diferentes de los andrógenos, como por ejemplo la PRL. Los resultados presentados no permiten distinguir cuál es el origen de los factores que desencadenan la activación de la ODC hacia el día 25, pero demuestran que una vez que el epitelio se encuentra completamente diferenciado, dicha actividad no depende del aporte luminal y sí de los andrógenos séricos.

La actividad ODC fue aumentada por incubación de cortes de epidídimo en medio químicamente definido conteniendo testosterona (Figura 26). La inhibición de dicho efecto por cicloheximida sugiere la participación de la síntesis proteica en la activación de la ODC. No obstante no puede descartarse la presencia de antienzima en este órgano y un posible rol del andrógeno sobre la interacción ODC-anti enzima o sobre la vida media de la enzima.

Resultó de interés, posteriormente, analizar la actividad ODC como marcadora de la potencia antiandrogénica de la flutamida a nivel epididimario. Hasta el presente, este compuesto es el único antiandrógeno que actúa exclusivamente a nivel de receptor, y no posee actividad sobre la liberación de gonadotrofinas a nivel hipotalámico-hipofisario. Luego de su conversión en el hígado a una forma hidroxilada

biológicamente activa (Katchen y Buxbaum, 1975), este compuesto se une específicamente y con alta afinidad al receptor de andrógenos de diferentes tejidos (Raynaud y col., 1979; Schmidt y Katzenellenbogen, 1979; Simard y col., 1986). En el riñón de ratón, considerado un modelo adecuado para el estudio del mecanismo de acción de andrógenos, se demostró que la flutamida inhibe la inducción, mediada por andrógenos, de la actividad ODC y del ARN mensajero de la enzima, por medio de la formación de complejos nucleares inactivos (Kontula y col., 1985). Estudios previos (Sufrin y Coffey, 1973) demuestran que en la próstata ventral la flutamida inhibe en forma efectiva la síntesis de ADN inducida por testosterona. Sin embargo, los resultados obtenidos por administración de este compuesto no parecen reflejar claramente su acción antiandrogénica a nivel epididimario (Dhar y Setty, 1976; Dhar y col., 1982).

En ratas intactas, la flutamida redujo el peso del epidídimo y la actividad ODC de este órgano. Sin embargo, fueron necesarias altas dosis del antiandrógeno para que se manifestara su acción, y aun en estas condiciones la inhibición de la ODC fue parcial. Estos resultados aparentemente no confirman la andrógeno-dependencia de la ODC, que desciende a valores no detectables por castración. En consecuencia, se decidió estudiar en qué medida la administración de flutamida provoca un aumento de la producción de andró-



genos, que interferiría en la propia acción del anti-andrógeno. De acuerdo a nuestros resultados, la flutamida actuaría a nivel hipotalámico-hipofisario aumentando los niveles séricos de LH (Figura 27). Sin duda, este efecto resulta del bloqueo de los receptores hipofisarios de andrógenos que intervienen en el mecanismo de retroalimentación negativa de la síntesis de LH (Simard y col., 1986), sin descartarse la posibilidad de un efecto sobre la vida media de la hormona. Demostramos además que la LH liberada en esta situación es biológicamente activa (Tabla IV). Como consecuencia de esto, los niveles séricos e intraepididimarios de andrógenos se hallan incrementados (Figuras 27 y 28), muy probablemente como resultado de la estimulación de la síntesis de andrógenos testiculares. No obstante, no puede descartarse un efecto de la flutamida sobre el catabolismo de andrógenos a nivel hepático. El hecho de que el testículo responde al aumento de LH implica, a su vez, que la flutamida no daña la esteroidogénesis testicular ni interfiere en la acción de la gonadotrofina a las dosis utilizadas.

Así, la acción de la flutamida en epidídimo de ratas intactas resulta interferida por 2 hechos: 1) la alta concentración de andrógenos en el epidídimo, que es mayor que la de los demás órganos andrógeno-dependientes (Pujol y col., 1976); 2) la ya alta concentración intraepididimaria de andrógenos es incrementada por acción de la flutamida. El

hecho de que la afinidad de la DHT por el receptor de andrógenos es 100 veces superior a la de la flutamida hidroxilada (Simard y col., 1986) implica que pequeños aumentos en los niveles de andrógenos interferirán considerablemente en la acción de la flutamida.

Por otro lado, se demostró que el epidídimo posee receptores para PRL (Orgebin-Crist y Djiane, 1979) y que esta hormona aumenta la concentración nuclear de DHT en epidídimo de ratas hipofisectomizadas (Baker y col., 1979). En consecuencia, un posible aumento en los niveles de PRL podría resultar en una sensibilización del epidídimo a los andrógenos. No obstante, los niveles de PRL no fueron modificados por tratamiento con flutamida (Figura 27), por lo que se descarta esta posibilidad.

Los experimentos en ratas castradas tratadas con PT confirman la hipótesis de que los andrógenos interfieren marcadamente en la acción de la flutamida. En efecto, la actividad ODC inducida por PT resultó inhibida por flutamida a bajas dosis. A la dosis de 5 mg resultó indetectable, es decir que esta situación es análoga a la de la castración.

Un marcador de la acción de los andrógenos testiculares en un determinado tejido debe cumplir al menos los siguientes requisitos: 1) disminuir por castración; 2) dicha disminución debe ocurrir a una velocidad que refleje la caída en el aporte de andrógenos al tejido; 3) debe restaurarse en

ratas castradas por reemplazo androgénico; 4) dicha restauración debe ocurrir a una velocidad compatible con la cinética de acción del andrógeno; 5) debido a que el epitelio epididimario es andrógeno-dependiente en toda su longitud (aunque en diferente grado), el efecto de la castración y del reemplazo androgénico sobre el marcador en cuestión debe observarse en los diferentes segmentos del epidídimo en una forma compatible con su andrógeno-dependencia; 6) debe disminuir a valores cercanos a los obtenidos por castración, por administración de un compuesto de reconocida actividad antiandrogénica.

Numerosos grupos han intentado buscar indicadores de acción androgénica en el epidídimo. Para ello, se enfocó la atención preferentemente sobre aquellas especies sintetizadas y segregadas específicamente por el epidídimo, o captadas de circulación y concentradas en el órgano. Sin embargo, resulta difícil evaluar la utilidad de aquellas especies presentes en el epitelio y el lumen epididimarios, ya que tanto la función absortiva como la secretoria del epidídimo son reguladas por andrógenos. Así, la expresión de los resultados en términos de contenido total, concentración por gramo de tejido o concentración por  $\mu$ l de fluido luminal llevan en muchos casos a resultados contradictorios. Así, se espera que una especie intracelular no segregada hacia el lumen sea un marcador más confiable de andrógeno-dependencia.

En este sentido, diferentes actividades enzimáticas han sido utilizadas con la intención de evaluar la actividad metabólica del epidídimo en un determinado entorno androgénico (Rastogi y col., 1979; Brooks, 1981). No obstante, la mayoría de ellas no reflejan claramente el estado androgénico del órgano, por cuanto no son afectadas o aun son estimuladas por castración a largo plazo (Rastogi y col., 1979). En el caso de las enzimas del camino glucolítico, su actividad es inhibida por castración (Brooks, 1976), pero el tiempo necesario para alcanzarse un estado estacionario es considerablemente largo, indudablemente como consecuencia de su baja velocidad de recambio. Los presentes resultados demuestran que la ODC cumple todos los requisitos mencionados, debido a que es una enzima intracelular y su corta vida media permite una rápida respuesta a variaciones en el entorno androgénico.

Mediante los modelos experimentales utilizados, hemos logrado crear diferentes situaciones que pueden dividirse en los siguientes grupos:

- 1) animales intactos no tratados, con altos niveles de actividad ODC.
- 2) animales intactos tratados con flutamida, con actividad ODC parcialmente inhibida.
- 3) animales castrados y animales castrados inyectados con testosterona y flutamida, con actividad ODC inhibida a

valores no detectables.

Resultó de interés, entonces, analizar la correlación entre la actividad ODC y el trofismo del epidídimo por medio del análisis histológico. Como puede observarse en las Figuras 30 a 32 y en la Tabla VI, existe una estrecha relación entre los parámetros histológicos (especialmente el diámetro tubular) y los valores de actividad ODC de cada grupo, confirmando que la ODC es un marcador sensible y confiable de la acción de andrógenos y antiandrógenos sobre el trofismo del epidídimo.

#### Actividad S-adenosil-L-metionina descarboxilasa

La reacción catalizada por la SAMDC provee el sustrato para la formación de espermina a partir de espermidina, y de ésta a partir de putrescina. En algunos tejidos, tales como la próstata y las vesículas seminales de ratas castradas tratadas con andrógenos (Kapyaho y col., 1980), la síntesis de SAM descarboxilada ocurre a una velocidad menor que la de putrescina, y por consiguiente constituye la etapa limitante en la síntesis de espermidina y espermina. Estos compuestos son considerados mucho más activos que su precursor, putrescina. Así, ambas actividades, ODC y SAMDC, son necesarias para la síntesis de espermidina y espermina, y resultó de interés, entonces, evaluar también esta última actividad en los mismos modelos experimentales que los utilizados para el

análisis de la actividad ODC.

El valor de Km para la reacción de descarboxilación del SAM en el epidídimo, descrito en el presente trabajo, se encuentra en concordancia con los resultados descritos para la enzima de próstata (Pegg y Williams-Ashman, 1969), si bien la actividad en el epidídimo es unas 6 veces menor que la descrita en ese órgano.

Por filtración de la preparación a través de Sephadex para eliminar la putrescina endógena, se comprobó una marcada dependencia de esta diamina para la actividad, en forma análoga a lo descrito en otros tejidos (Pegg y Williams-Ashman, 1969). La existencia de una actividad en ausencia de putrescina en preparaciones no filtradas no implica de ninguna manera que dicha actividad opera en el epidídimo en condiciones fisiológicas, por cuanto la putrescina presente en la preparación puede no reflejar la concentración en el espacio intracelular disponible a la SAMDC.

La actividad SAMDC, al igual que la ODC, presentó las características de una enzima andrógeno-dependiente. No obstante, no parece constituir un marcador de acción androgénica tan sensible como la ODC. En primer lugar, si bien el máximo de actividad SAMDC se produce a los 25 días de edad (Figura 37), existe una actividad basal detectable al menos a los 15 días, edad a la cual el epidídimo es

insensible a la acción de los andrógenos, y no se ha producido aún una entrada efectiva de andrógenos al órgano. En segundo lugar, su actividad disminuye por castración pero con una cinética mucho menor que la ODC. La actividad SAMDC se mantiene invariable durante 2 días post-castración; a este tiempo, se ha producido ya una considerable disminución del contenido epididimario de andrógenos (Aafjes y Vreeburg, 1972). Este resultado ofrece al menos 2 posibilidades: 1) la vida media de la SAMDC sería considerablemente mayor que la de la ODC, en aparente discordancia con el valor de 1 hora descrito para la SAMDC de otras fuentes (Tabor y Tabor, 1984); 2) la actividad SAMDC epididimaria sería mantenida por otros factores testiculares, diferentes de los andrógenos, de baja velocidad de recambio en el epidídimo, o por factores no testiculares. En tercer lugar, ni la castración a largo plazo (7 días) ni la administración de flutamida a ratas castradas tratadas con PT conducen a la pérdida total de la actividad. Estos resultados, junto al hecho de que existe actividad SAMDC en epidídimos aún no diferenciados, apoyan la idea de la presencia de al menos una forma de la enzima no regulable por andrógenos. Con los datos disponibles no es posible evaluar la existencia de isoformas de la enzima con regulación diferencial, ni la distribución de éstas en los diferentes tipos celulares del epidídimo. Se considera que las células principales del epidídimo son mucho más sensibles

a la acción de los andrógenos que los otros tipos celulares presentes en el epidídimo (Moore y Bedford, 1979a, 1979b). En consecuencia, es probable que la ODC se encuentre predominantemente en las células principales, mientras que la SAMDC podría encontrarse presente también en otros tipos celulares con menor sensibilidad o insensibles a andrógenos. Alternativamente, la coexistencia de isoformas en la misma célula podría asegurar la formación de espermidina y espermina en ausencia del estímulo androgénico, por ejemplo a partir de putrescina captada de la circulación.

#### Niveles de poliaminas

El objetivo de estos experimentos fue analizar de qué manera las variaciones en las actividades limitantes de la síntesis de poliaminas llevan a cambios en el contenido y la concentración epididimarios de estos compuestos. A tal efecto, es necesario tener en cuenta que la particular situación del epidídimo con referencia al testículo impide una comparación directa entre epidídimos de animales intactos y castrados, por cuanto la castración lleva a la pérdida tanto del estímulo androgénico como de la totalidad del aporte luminal, que puede contener concentraciones considerables de poliaminas. En efecto, como se desprende de las Figuras 43 y 44, la hemicastración, que resulta en la



supresión del aporte luminal pero manteniendo en forma aceptable las características histológicas del epitelio, resulta en una caída del contenido de putrescina y poliaminas, sin cambios en su concentración tisular. Este hecho sugiere que una fracción considerable de la putrescina y las poliaminas determinadas en el epidídimo proviene del aporte testicular. Por consiguiente, los efectos de los andrógenos sólo pueden evaluarse considerando como controles ratas castradas, hemicastradas o con ligadura de los conductos eferentes.

Los experimentos realizados demuestran que la castración a corto plazo (24 y 48 horas), sin alteraciones del peso del epidídimo, resulta en una disminución de los niveles epididimarios de putrescina, sin cambios en espermidina y espermina (Figura 45). El hecho de que a este tiempo la ODC se encuentra ya en valores no detectables, y que la caída de putrescina es prevenida por tratamiento con PT (Figura 46) sugiere que al menos una fracción importante de la putrescina determinada es de origen epididimario. La falta de efecto sobre espermidina y espermina indica una menor velocidad de recambio de las poliaminas con respecto al precursor. Además, la disminución en putrescina sin cambios en poliaminas sugiere la conversión de aquélla a otro tipo de compuestos. Se intentó analizar la acetilación de la putrescina en estas condiciones, pero la baja sensibilidad del método utilizado

no permitió corroborar este hecho. Una segunda posibilidad sería su conversión a productos de oxidación tales como el ácido gama-aminobutírico (GABA). A este respecto, resultados de nuestro laboratorio indican que el GABA es un constituyente normal del tejido testicular de rata (Ritta y Calandra, 1986), y podría ser sintetizado también en el epidídimo.

Los experimentos de castración a largo plazo indican una marcada caída del contenido de putrescina y poliaminas luego de 7 días. Este efecto obedece obviamente tanto a la falta del aporte testicular como a la atrofia del epidídimo. El tratamiento con PT fue efectivo en el orden putrescina > espermidina > espermina. La acción antiandrogénica de la flutamida se corresponde exactamente con la acción androgénica de la testosterona (Tabla VIII). Además, con la excepción de la leve disminución de espermidina por castración, la concentración tisular de poliaminas no se vio afectada por castración ni por reemplazo androgénico. Estos hechos permiten sugerir que: 1) el principal punto de control de los niveles de poliaminas se halla a nivel de ODC, por cuanto su producto directo es el más afectado por castración y reemplazo androgénico; 2) la concentración tisular de poliaminas se mantiene constante en los modelos utilizados. La explicación más simple de este fenómeno sería que la falta de andrógenos estimula la captación de poliaminas

circulantes. En referencia a esto, en otros modelos ha sido descrito un mecanismo de transporte de poliaminas a través de la membrana plasmática (Bachrach y Seiler, 1981; Volkow y col., 1983; Rinehart y Chen, 1984). La putrescina radiactiva, inyectada sistémicamente, es captada por la próstata en mayor grado que otros órganos (Clark y Fair, 1975), y esta captación es incrementada cuando la síntesis de poliaminas se encuentra inhibida por tratamiento con DFMO (Kadmon y col., 1982). Una explicación alternativa sería la inhibición por castración del catabolismo de las poliaminas. De todos modos, interesa rescatar que el epidídimo parece disponer de mecanismos para prevenir la disminución de la concentración de las poliaminas más activas.

#### Acetilación de poliaminas

La determinación de acetilputrescina y acetilpoliaminas se vio dificultada por el hecho de que su concentración es extremadamente baja en el epidídimo, y se encuentra en el límite de detección del ensayo. Modificando la técnica original, fue posible detectar los derivados acetilados de espermidina y espermina, pero no la acetilputrescina. El objetivo de estos ensayos fue analizar si la acetilación de poliaminas, proceso que media su interconversión, es activa en el epidídimo, y sus posibles modificaciones por castración

y tratamiento con PT. Como se observa en la Tabla IX, la concentración epididimaria de acetilpoliaminas aumentó luego de la castración. Este efecto se halla de acuerdo con la observación de que las poliaminas acetiladas se hacen detectables en situaciones en que la degradación de las poliaminas se encuentra aumentada (Bolkenius y Seiler, 1981).

Es de esperar que la producción de poliaminas acetiladas ocurra a expensas de las poliaminas libres. Cabe señalar que en estos experimentos el aumento de poliaminas acetiladas fue del orden de 20 nmoles/g de tejido, por lo cual no se detecta la disminución concomitante de la concentración de poliaminas, que se encuentran en niveles mucho mayores. Así, la acetilación no parece constituir un mecanismo de eliminación de poliaminas en el epidídimo de rata castrada, al menos hasta los 7 días post-castración. Esto estaría de acuerdo con la noción de que el epidídimo, luego de la caída de andrógenos, pondría en juego los mecanismos necesarios para evitar la pérdida de poliaminas.

#### Posible rol de las poliaminas epididimarias en la maduración del espermatozoide

La determinación de putrescina y poliaminas en espermatozoides aislados de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo indicó que el contenido de putrescina, espermidina

y espermina aumenta durante el tránsito del espermatozoide a través del epidídimo. Es interesante señalar la coincidencia de la distribución de las actividades ODC y SAMDC en los tres segmentos del epidídimo (Figuras 18 y 36) con el perfil observado en el contenido de putrescina y poliaminas en espermatozoides (Figura 47). Estudios realizados por Macindoe y Turkington (1973) y Qian y col. (1985) demuestran que el espermatozoide no presenta actividades ODC y SAMDC, si bien la primera enzima es detectable por técnicas inmunohistoquímicas en la región acrosomal. El aumento del contenido de poliaminas durante el tránsito epididimario junto a estas evidencias sugiere, entonces, que el espermatozoide captaría poliaminas durante su permanencia en el epidídimo. Por consiguiente, este órgano podría segregar putrescina y poliaminas al lumen epididimario para contribuir a la maduración del espermatozoide.

La única evidencia descrita hasta el presente (Bamberg y col., 1975) indica que en espermatozoides bovinos ocurre una disminución en los niveles de poliaminas durante la maduración, en aparente desacuerdo con los presentes resultados. No obstante, es necesario recordar que el plasma seminal bovino, a excepción del de otros mamíferos, contiene sólo trazas de poliaminas (Mann, 1964), de manera que dicho modelo no es homologable al utilizado en el presente trabajo.

La idea de que el epidídimo posee una capacidad secretora

de poliaminas es también apoyada, en forma menos directa, por el hecho de que la testosterona mantiene crónicamente altos niveles de actividad ODC y SAMDC. En numerosos casos estudiados, la estimulación de ambas actividades es transitoria aun manteniendo altas concentraciones del factor estimulador, fenómeno atribuido a la represión de la síntesis de las enzimas por las poliaminas producidas inicialmente. El hecho de que esta inhibición no se produzca en el epidídimo sugiere que en este órgano no ocurre una acumulación intracelular de poliaminas, en forma análoga a lo descrito en el riñón y la próstata, activos secretores de poliaminas hacia la orina y el semen (Henningsson y col., 1978; Pajunen y col., 1982; Piik y col., 1977).

Cabe finalmente preguntarse cuál sería la participación de las poliaminas en la maduración del espermatozoide. En relación a esto, ha sido descrito (Hoskins y col., 1974) que durante el tránsito por el epidídimo se incrementan los niveles intracelulares de AMP cíclico del espermatozoide; por otro lado, las poliaminas activan la adenilato ciclasa (Shah y col., 1975; Casillas y col., 1980) e inhiben la fosfodiesterasa de AMPc (Shah y Sheth, 1978) del espermatozoide. El aumento del contenido de AMPc durante la maduración del espermatozoide podría ser, entonces, una consecuencia de la acción de las poliaminas a este nivel. Pulkkinen y col. (1975) observaron que concentraciones

fisiológicas de espermina estimulan la fructólisis por espermatozoides epididimarios y potencian marcadamente el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre dicho proceso. A su vez, la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la iniciación de la motilidad del espermatozoide parece ser mediada por la estimulación de la síntesis de AMPe (Morton y col., 1974). Por otro lado, una acción directa de las poliaminas en el espermatozoide fue sugerida por Atmar y col. (1981), quienes describieron en espermatozoides epididimarios una actividad proteína quinasa dependiente de poliaminas. Estas evidencias y los presentes resultados permiten sugerir que algunos procesos que ocurren en el espermatozoide durante su maduración en el epidídimo podrían ser regulados por las poliaminas segregadas hacia el lumen por el epitelio epididimario.

## CONCLUSIONES

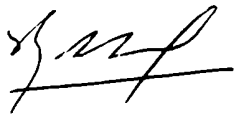
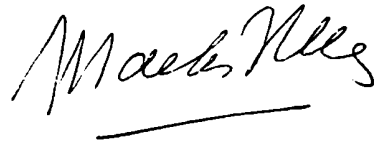
1) La actividad ornitina descarboxilasa es un marcador sensible de la acción hormonal en tejidos testicular y epididimario. En el caso del testículo, fue posible detectar la existencia de un ritmo circadiano claramente definido. Además, se describió que dicha actividad es estimulada por prolactina, al menos en presencia de una hipófisis funcional. Esta enzima podría ser utilizada, como una respuesta diferente de la estimulación de la esteroidogénesis, para el estudio del mecanismo de acción de la prolactina y de interacción de la interacción de esta hormona con la LH a nivel de la célula de Leydig.

2) Existe un activo metabolismo de poliaminas en el epidídimo, habiéndose detectado una alta actividad de las enzimas limitantes de su síntesis, ornitina descarboxilasa y S-adenosil-L-metionina descarboxilasa. Ambas actividades son dependientes de andrógenos, presentando la primera de ellas, características de su cinética de inhibición y activación que reflejan claramente la disponibilidad de andrógenos por el órgano. Por consiguiente, esta enzima es, según estas evidencias, el mejor marcador disponible para evaluar la acción androgénica o antiandrogénica de diferentes especies a nivel epididimario.

3) Si bien una fracción de las poliaminas detectadas en el



epidídimo podría provenir de la secreción testicular, la acción de los andrógenos sobre la actividad de las enzimas mencionadas resulta en la estimulación de la síntesis de poliaminas por el órgano. El aumento del contenido de putrescina y espermidina en espermatozoides durante el tránsito por el epidídimo indicaría una participación de estos compuestos, de origen epididimario, en algunos cambios involucrados en su maduración.

A handwritten signature in cursive script, possibly reading 'J. M. P.', with a horizontal line underneath.A handwritten signature in cursive script, possibly reading 'M. de la Torre', with a horizontal line underneath.

## REFERENCIAS

- Aafjes, J.H., Vreeburg, J.T.M. (1972) *J. Endocr.* 53:85-93.
- Acott, T.S., Hoskins, D.D. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:6744-6750.
- Allen, R.D., Roberts, T.K. (1987) *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 13:4-8.
- Allison, S.A., Herr, J.C., Schurr, J.M. (1981) *Biopolymers* 20:469-488.
- Amann, R.P., Almquist, J.O. (1962) *J. Reprod. Fertil.* 3:260-268.
- Amann, R.P., Hay, S.R., Hammerstedt, R.H. (1982) *Biol. Reprod.* 27:723-733.
- Atmar, V.J., Kuehn, G.D., Casillas, E.R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:8275-8278.
- Attramadal, A., Bardin, C.W., Gunsalus, G.L., Musto, N.A., Hansson, V. (1981) *Biol. Reprod.* 25:983-988.
- Bachrach, U., Seiler, N. (1981) *Cancer Res.* 41:1205-1208.
- Badr, F.M., Barcikowski, B., Bartke, A. (1975) *Prostaglandins* 9:289-297.
- Baker, H.W.G., Worgul, T.J., Santen, R.J., Jefferson, L.S., Bardin, C.W. (1979) En "The Testis in Normal and Infertile Men" (Troen, P., Nankin, H.R., editores). págs. 379-385. Raven Press, New York.
- Bamberg, E., Weiser, M., Desser, H. (1975) *J. Reprod. Fertil.* 45:363-365.
- Barañao, J.L.S., Legnani, B., Chiauzzi, V.A., Bertini, L.M.,

- Suescun, M.O., Calvo, J.C., Charreau, E.H., Calandra, R.S. (1981) *Endocrinology* 109:2188-2195.
- Baraňao, J.L.S., Tesone, M., Oliveira-Filho, R.M., Chiouzzi, V.A., Calvo, J.C., Charreau, E.H., Calandra, R.S. (1982) *J. Androl.* 3:281-288.
- Bardin, C.W. (1984) En "Médecine de la Reproduction Masculine" (Schaison, G., Bouchard, P., Mahoudeau, J., Labrie, F., editores) págs. 113-121. Flammarion Paris. Presses de l'Université de Montréal, Montréal.
- Bartke, A. (1965) *J. Reprod. Fertil.* 10:93-103.
- Bartke, A. (1969) *Nature* 224:700-701.
- Bartke, A., Goldman, D.B., Klemcke, H.G., Bex, F.J., Amador, A.G. (1980) En "Functional Correlates of Hormone Receptors in Reproduction" (Mahesh, V., Muldoon, T.G., Saxena, B.B., Sadler, W.A., editores) págs. 171-185. Elsevier North-Holland, New York.
- Bartke, A., Koerner, S. (1974) *Endocrinology* 95:1739-1743.
- Bedford, J.M. (1967) *J. Exp. Zool.* 166:271-282.
- Belanger, A., Auclair, C., Seguin, C., Caron, S., Labrie, F. (1981) *J. Androl.* 2:80-86.
- Belanger, A., Auclair, C., Seguin, C., Kelly, P.A., Labrie, F. (1979) *Mol. Cell. Endocrinol.* 13:47-53.
- Benoit, J. (1926) *Arch. Anat. Histol. Embryol.* (Strasb) 5:175-412.
- Besancon, J., Dacheux, J.L., Paquin, R., Tremblay, R.R. (1985)

- Biol.Reprod. 33:296-301.
- Bex,F.J., Bartke,A., Goldman,B.D., Dalterio,S. (1978)  
Endocrinology 103:2069-2080.
- Blaquier,J.A. (1971) Biochem.Biophys.Res.Commun. 45:1076-  
1082.
- Blaquier,J.A., Calandra,R.S. (1973) Endocrinology 93:51-60.
- Bloom,G., Nicander,L. (1961) Z.Zellforsch. 55:833-844.
- Bolkenius,F.N., Seiler,N. (1981) Int.J.Biochem. 13:287-292.
- Brooks,D.E. (1976) Biochem.J. 156:527-537.
- Brooks,D.E. (1979) J.Endocrinol. 82:293-303.
- Brooks,D.E. (1980) En "Carnitine Biosynthesis, Metabolism and  
Functions" (R.A.Frankel y J.D.McGarry, editores) págs. 219-  
235. Academic Press, New York.
- Brooks,D.E. (1981) Physiol.Rev. 61:516-555.
- Brooks,D.E. (1983) Mol.Cell.Endocrinol. 29:255-270.
- Brooks,D.E., Higgins,S.J. (1980) J.Reprod.Fertil. 59:363-375.
- Brooks,D.E., Tiver,K. (1984) J.Reprod.Fertil. 71:249-257.
- Brown,C.R., Von Glos,K.I., Jones,R. (1983) J.Cell Biol. 96:  
256-264.
- Bullock,L.P. (1983) Endocrinology 112:1903-1909.
- Calandra,R.S., Podestá,E.J., Rivarola,M.A., Blaquier,J.A.  
(1974) Steroids 24:507-518.
- Cameo,M.S., Blaquier,J.A. (1976) J.Endocrinol. 69:47-55.
- Canellakis,E.S., Viceps-Madore,D., Kyriakidis,D.A., Heller,  
J.S. (1979) Curr.Top.Cell.Regul. 15:155-202.

- Carreau, S., Drosdowsky, M.A., Courot, M. (1984) J. Endocrinol. 103:273-279.
- Casillas, E.R., Elder, C.M., Hoskins, D.D. (1980) J. Reprod. Fertil. 59:297-302.
- Celotti, F., Massa, R., Martini, L. (1978) Neuroendocrinology 26:41-49.
- Clark, R.B., Fair, W.R. (1975) J. Nucl. Med. 16:337-381.
- Cochet, C., Job, D., Pirollet, F., Chambaz, E.M. (1981) Biochim. Biophys. Acta 658:191-201.
- Cooper, T.G. (1982) J. Reprod. Fertil. 64:373-379.
- Coyotupa, J., Parlow, A.F., Kovacic, N. (1973) Endocrinology 92:1579-1581.
- Crabo, B., Gustafsson, B. (1964) J. Reprod. Fertil. 7:337-345.
- Charreau, E.H., Attramadal, A., Torjesen, P.A., Purvis, K., Candalra, R.S., Hansson, V. (1977) Mol. Cell. Endocrinol. 6:303-307.
- Christensen, A.K. (1975) En "Handbook of Physiology" (Greep, R.O., Astwood, E.B., editores) Section 7, Vol 5, págs. 57-94. American Physiological Society, Washington.
- Chulavatnatol, M., Panyim, S., Witisuwannakul, D. (1982) Biol. Reprod. 26:197-207.
- Dacheux, J.L. (1977) IRCS Med. Sci. 5:18.
- Dacheux, J.L., O'Shea, T., Paquignon, M. (1979) J. Reprod. Fertil. 55:287-296.
- Daniels, G.R., Atmar, V.J., Kuehn, G.D. (1981) Biochemistry 20:

2525-2532.

Danzo, B., Eller, B.C. (1985) *Endocrinology* 117:1380-1388.

Danzo, B., Orgebin-Crist, M.C., Toft, D.O. (1973) *Endocrinology* 92:310-317.

Davies, T.F., Katikineni, M., Chan, V., Harwood, J.P., Dufau, M. L., Catt, K.J. (1980) *Nature* 283:863-865.

Dhar, J.D., Setty, S.B. (1976) *Fert. Steril.* 27:566-576.

Dhar, J.D., Srivastava, S.R., Setty, B.S. (1982) *Andrologia* 14: 55-61.

Debeljuk, L., Rozados, R., Daskal, H., Villegas Vélez, C., Mancini, A.M. (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148:550-552.

De Jong, R.A.P., Van der Schoot, P. (1979) *Biol. Reprod.* 21: 1263-1271.

De Larminat, M.A., Cuasnicú, P.S., Blaquier, J.A. (1981) *Biol. Reprod.* 25:813-819

De Larminat, M.A., Hinrichsen, M.J., Scorticati, C., Ghirlanda, J.M., Blaquier, J.A., Calandra, R.S. (1980) *J. Reprod. Fertil.* 59:397-402.

Della Ragione, F., Pegg, A.E. (1984) En "Advances in Polyamines in Biomedical Sciences" (Caldarera, C.M., Bachrach, U., editores) págs. 97-104. CLUEB, Bologna.

Delongas, J.L., Gelly, J.L., Leheup, B., Grignon, G. (1987) *Exp. Cell. Biol.* 55:74-82.

Del Rio, A.G., Raisman, R. (1978) *Experientia* 34:670-671.

Dion, A.S., Herbst, E.J. (1970) *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 171:

723-731.

Djakiew, D., Byers, S.W., Dym, M. (1984) Biol.Reprod. 31:1073-1085.

Djakiew, D., Byers, S.W., Lewis, D.M., Dym, D. (1985) J.Androl. 6:190-196.

Djakiew, D., Griswold, M.D., Lewis, D.M., Dym, M. (1986) Biol. Reprod. 34:691-699.

Dohler, K.D., Wuttke, W. (1975) Endocrinology 97:898-907.

Dohler, K.D., Wuttke, W. (1976) Acta Endocrinol. (Kbh) 83: 269-279.

Dorrington, J.H., Fritz, I.B., Armstrong, D.J. (1978) Biol. Reprod. 18:55-64.

Echandi, G., Algranati, I.D. (1975) Biochem.Biophys.Res. Commun. 62:313-319.

Eik-Nes, K.B. (1975) En "Handbook of Physiology" (Greep, R.O., Astwood, E.B. editores) Section 7, Vol 5, págs. 95-115. American Physiological Society, Washington.

Emanuelsson, H., Heby, O. (1982) Cell.Biol.Int.Rep. 6:951-954.

Evans, R.R., Johnson, A.D. (1975) J.Reprod.Fertil. 43:527-530.

Evans, R.W., Setchell, B.P. (1979) J.Reprod.Fertil. 57:197-203.

Fang, V.S., Refetoff, F.S., Rosenfeld, R.L. (1974) Endocrinology 95:991-998.

Fawcett, D.W. (1975) En "Handbook of Physiology" (Greep, R.O., Astwood, E.B., editores) Section 7, Vol 5, págs. 21-55.

American Physiological Society, Washington.

Fawcett, D. W., Hoffer, A. D. (1979). *Biol. Reprod.* 20:162-181.

Fawcett, D. W., Hollenberg, R. D. (1963) *Z. Zellforsch.* 60:276-292.

Fjosne, H. E., Strand, H., Ostensen, M. A., Sunde, A. (1988) *The Prostate* 12:309-320.

Fleming, A. D., Armstrong, D. T. (1985) *J. Exp. Zool.* 233:93-100.

Francis, G. L., Triche, T. J., Brown, T. J., Brown, H. C., Bercu, B. B. (1981) *J. Androl.* 2:312-320.

Frank, J. J., Hawk, I. A., Levy, C. C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 390:117-124.

Frankel, A. I., Mock, E. J. (1982) *J. Endocr.* 92:225-229.

Friedman, S. J., Bellantone, R. A., Canellakis, E. S. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 261:188-193.

Friend, D. S., Farquhar, M. G. (1967) *J. Cell Biol.* 35:357-376.

Fuerbringer, P. (1881) *Z. Clin. Med.* 3:287.

Fujita, K., Murakami, Y., Hayashi, S. (1982) *Biochem. J.* 204:647-652.

Fuller, D. J. M., Donaldson, L. J., Thomas, G. H. (1975) *Biochem. J.* 150:557-559.

Fung, M. C., Wah, G. C., Odell, W. D. (1989) *J. Androl.* 10:37-42.

Gaddum, P. (1968) *Anat. Rec.* 161:471-482.

Ganjam, V. K., Amann, R. P. (1976) *Endocrinology* 99:1618-1630.

Garberi, J. C., Kohane, A. C., Cameo, M. S., Blaquier, J. A. (1979) *Mol. Cell. Endocrinol.* 13:73-82.



- Giorgi, E. P. (1976). *J. Endocr.* 68:109-119.
- Gloyna, R. E., Wilson, J. D. (1969) *J. Clin. Endocrinol.* 29:970-977.
- Goldemberg, S. H., Algranati, I. D. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117:251-255.
- Goueli, S. A., Davis, A. T., Hiipakka, R. A., Liao, S., Ahmed, K. (1985) *Biochem. J.* 230:293-302.
- Grillo, M. A., Fossa, T. (1983) *Int. J. Biochem.* 15:139-141.
- Hafiez, A. A., Bartke, A., Lloyd, C. W. (1972b) *J. Endocr.* 53:223-230.
- Hafiez, A. A., Lloyd, C. W., Bartke, A. (1972a) *J. Endocr.* 52:327-332.
- Hafiez, A. A., Philpott, J. E., Bartke, A. (1971) *J. Endocr.* 50:619-623.
- Hamilton, D. W. (1971) *J. Reprod. Fertil.* (Suppl. 13):89-97.
- Hamilton, D. W. (1975) En "Handbook of Physiology" (Greep, R. O., Astwood, E. B., editores) Section 7, Vol 5, págs. 259-301. American Physiological Society, Washington.
- Hamilton, D. W. (1980) *Biol. Reprod.* 23:377-385.
- Hamilton, D. W., Fawcett, D. W. (1970) *Res. Soc. Exp. Biol. Med.* 133:693-695.
- Hamilton, D. W., Jones, A. L., Fawcett, D. W. (1969) *Biol. Reprod.* 1:167-184.
- Hammerstedt, R. H., Rowan, W. A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 710:370-376.

- Hansson, V., Djoseland, O., Reusch, E., Attramadal, A., Torjensen, O. (1973) *Steroids* 22:19-33.
- Hansson, V., Trygstad, O., French, F.S., McLean, W.S., Smith, A.A., Tindall, D.J., Wdington, S.C., Petrusz, P., Nayfeh, S.N., Ritzén, E.M. (1974) *Nature, Lond.* 250:387-391.
- Hansson, V., Weddington, S.C., Petrusz, P., Ritzen, E.M., Nayfeh, S.N., French, F.S. (1975) *Endocrinology (Baltimore)* 97:469-473.
- Hara, T., Endo, H. (1982) *Biochemistry* 21:2632-2637.
- Hayashi, S., Aramaki, Y., Noguchi, T. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46:795-800.
- Heby, O., Gray, J.W., Lindl, P.A., Marton, L.J., Wilson, C.B. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:99-105.
- Heby, O., Luk, G.D., Schindler, J. (1987) En "Inhibition of Polyamine Biosynthesis" (McCann, P.P., Pegg, A.E., Sjoerdsma, A., editores) págs. 165-186. Academic Press, New York.
- Heby, O., Marton, L.J., Zardi, L., Russell, D.H., Baserga, R. (1975) *Exp. Cell. Res.* 90:8-14.
- Henningsson, S., Persson, L., Rosengren, E. (1978) *Acta Physiol. Scand.* 102:385-393.
- Hermo, L., De Melo, V. (1987) *Anat. Rec.* 217:153-163.
- Hermo, L., Morales, C. (1984) *Am. J. Anat.* 1721:59-74.
- Hiipakka, R.A., Chen, C., Schilling, K., Oberhauser, A., Saltzman, A., Liao, S. (1984) *Biochem. J.* 218:563-571.
- Hinton, B.T., Hernandez, H. (1985) *J. Androl.* 6:300-305.

- Hinton, B. T., Setchell, B. P. (1980) En "Carnitine Biosynthesis, Metabolism and Functions" (Frankel, R. A., McGarry, J. D., editores). págs. 219-235. Academic Press, New York.
- Hirashima, A., Harigai, H., Watanabe, I. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 88:1046-1051.
- Hogan, B. L. M. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45:301-307.
- Hohlbrugger, G., Schweisfurth, H., Dahlheim, H. (1982) J. Reprod. Fertil. 65:97-103.
- Holtta, E., Pohjanpelto, P. (1986) J. Biol. Chem. 261:9502-9508.
- Hoskins, D. D., Stephens, D. T., Hall, M. L. (1974) J. Reprod. Fertil. 37:131-133.
- Hostetter, M. W., Piacsek, B. E. (1977) Biol. Reprod. 16:495-498.
- Huhtaniemi, I., Catt, K. J. (1981) Endocrinology 109:483-490.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K., Kishida, K., Watanabe, I., Kogo, A., Hirose, S. (1979) Eur. J. Biochem. 93:345-353.
- Iizasa, T., Carson, S. A. (1985) Biochim. Biophys. Acta 844:280-287.
- Inano, H., Machino, A., Tamaoki, B. I. (1969) Endocrinology 84:997-1003.
- Janne, J., Poso, H., Raina, A. (1978) Biochim. Biophys. Acta 473:241-293.
- Janne, J., Williams-Ashman, H. G. (1971) J. Biol. Chem. 246:1725-1732.
- Jenkins, A. D., Lechene, C. P., Howards, S. S. (1980) Biol. Reprod.

23:981-987.

Jensen, E. V., Jacobson, H. I. (1962) *Rec. Prog. Horm. Res.* 18: 387-414.

Jones, R., Brown, C. R., Von Glos, K. I., Parker, M. G. (1980) *Biochem. J.* 188:667-676.

Jones, R., Pholpramool, C., Setchell, B. P., Brown, C. R. (1981) *Biochem. J.* 200:457-460.

Jones, R., Von Glos, K. I., Brown, C. R. (1983) *J. Reprod. Fertil.* 67:299-306.

Kadmon, D., Heston, W. D. W., Fair, W. R. (1982) *J. Nucl. Med.* 23: 998-1003.

Kahana, C., Nathans, D. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:15390-15393.

Kaiser, D., Tabor, H., Tabor, C. W. (1963) *J. Mol. Biol.* 6:141-147.

Kalra, S. P., Kalra, P. S. (1983) *Endocr. Rev.* 4:311-351.

Kaplan, M., Russell, L. D., Peterson, R. N., Martan, J. (1984) *Tissue Cell* 16:455-468.

Kapyaho, K., Poso, H., Janne, J. (1980) *Biochem. J.* 192:59-63.

Karkun, T., Rajalakshmi, M., Prasad, M. N. R. (1974) *Contraception* 9:471-485.

Katchen, B., Buxbaum, S. (1975) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41: 373-380.

Kidroni, G., Harnir, T., Menczel, J., Frutkoff, I. W., Palti, Z. Ron, M. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113:982-989.

Kontula, K. K., Seppanen, P. J., van Duyne, P., Bardin, C. W.,

- Janne, O. A. (1985) *Endocrinology* 116:226-233.
- Kontula, K. K., Torkkeli, T. K., Bardin, C. W., Janne, O. A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:731-735.
- Koskimies, A. I., Kormanio, M. (1975) *J. Reprod. Fertil.* 43:345-348.
- Kovacevic, R., Krsmanovic, L., Stojilkovic, S., Simonovic, I., Maric, D., Andjus, R. K. (1982) *Int. J. Androl.* 5:437-447.
- Kraft, L. A., Johnson, A. D. (1972) *Comp. Biochem. Physiol. (B)* 42:451-461.
- Kuehn, G. D., Atmar, V. J. (1983) En "Advances in Polyamine Research" (Bachrach, U., Kaye, A., Chayen, R., editores) Vol 3, págs. 615-629. Raven Press, New York.
- Leboy, P. S. (1971) *FEBS Lett.* 16:117-120.
- Lea, O. A., Petrusz, P., French, F. S. (1978) *Int. J. Androl. (Suppl. 2)*:592-607.
- Leewenhoek, A. van (1677) *Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, de Natis e semine genitali Animalculis.* (Publicado en 1678, en *Phil. Trans. Roy. Soc.* 12:1040).
- Levine, N., Marsh, D. J. (1971) *J. Physiol.* 213:557-570.
- Levy, C. C., Hieter, P. A., LeGendre, S. M. (1974) *J. Biol. Chem.* 249:6762-6769.
- Lewin, L. M., Yannai, Y., Sulimovici, S., Kraicer, P. F. (1976) *Biochem. J.* 156:375-380.
- Li, C. C. (1964) *Introduction to Experimental Statistics.* McGraw-Hill, New York.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Mach, M., Ebert, P., Ropp, R., Ogilvie, A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 104:1327-1334.
- Macindoe, J.H., Turkington, R.W. (1973) Endocrinology 92: 595-605.
- Madhubala, R., Reddy, P.R.K. (1980a) Prostaglandins 20:503-513.
- Madhubala, R., Reddy, P.R.K. (1980b) FEBS Lett. 122:197-198.
- Madhubala, R., Reddy, P.R.K. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 102:1096-1103.
- Madhubala, R., Reddy, P.R.K. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 109:269-274.
- Madhubala, R., Reddy, P.R.K. (1983) FEBS Lett. 152:199-201.
- Madhubala, R., Reddy, P.R.K. (1984a) Life Sci. 34:1041-1046.
- Madhubala, R., Reddy, P.R.K. (1984b) Biochem. Int. 8:437-444.
- Madhubala, R., Reddy, P.R.K. (1985) Biochem. Int. 11:225-232.
- Mancini, A.M., Guitelman, A., Vargas, C.A., Debeljuk, L., Aparicio, N.J. (1976) J. Clin. Endocrinol. Metab. 42:181-184.
- Mangan, F.R., Pegg, A.E., Maiwaring, W.I.P. (1973) Biochem. J. 134:129-142.
- Mandel, J.L., Chambon, P. (1974) Eur. J. Biochem. 41:367-378.
- Maneely, R.B. (1959) Acta Zool. 40:1-21.
- Mann, T. (1964) The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. John Wiley & Sons Inc, New York.

- Marx, K. A., Ruben, G. C. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:1839-1854.
- Matsui-Yuasa, I., Otani, S., Kamei, M., Morisawa, S. (1984) *FEBS Lett.* 178:297-300.
- Matsuzaki, S., Hamana, K., Imai, K., Matsuura, K. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:307-313.
- Mayorga, L. S., Bertini, F. (1982) *Int. J. Androl.* 5:345-352.
- Mayorga, L. S., Bertini, F. (1985) *J. Androl.* 6:243-245.
- Means, A. R. (1975). En "Handbook of Physiology" (Greep, R. O., Astwood, E. B., editores) Section 7, Vol 5, págs. 203-218. American Physiological Society, Washington.
- Meers, P., Hong, K., Bentz, J., Papahadjopoulos, D. (1986) *Biochemistry* 25:3109-3118.
- Melvin, W. T., Thomson, R. Y., Hay, J. (1972) *Biochem. J.* 130:78P-79P.
- Mendelson, C., Dufau, M. L., Catt, K. J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250:8818-8823.
- Mitta, M., Hall, P. F. (1982) *Biol. Reprod.* 26:445-455.
- Moger, W. H. (1977) *Endocrinology* 100:1027-1032.
- Mooradian, A. D., Morley, J. E., Korenman, S. G. (1987) *Endocr. Rev.* 8:1-28.
- Moore, H. D. M., Bedford, J. M. (1979a) *Anat. Rec.* 193:293-312.
- Moore, H. D. M., Bedford, J. M. (1979b) *Anat. Rec.* 193:313-328.
- Morris, P. L., Saxena, B. A. (1980) *Endocrinology* 107:1639-1645.
- Morton, B., Harrigan-Lum, J., Albagli, L., Jooss, T. (1974)

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 56:372-379.
- Moruzzi, M., Barbiroli, B., Monti, M.G., Tadolini, B., Hakim, G., Mezzetti, G. (1987) Biochem. J. 247:175-180.
- Moruzzi, G., Barbiroli, B., Moruzzi, M.S., Tadolini, B. (1975) Biochem. J. 146:697-703.
- Moulton, B.C., Leonard, S.S. (1969) Endocrinology 84:1461-1465.
- Nakhla, A.M., Tam, J.P. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:1180-1186.
- Negro-Vilar, A., Krulich, L., McCann, S.M. (1973) Endocrinology 93:660-664.
- Negro-Vilar, A., Saad, W.A., McCann, S.M. (1977) Endocrinology 100:729-737.
- Nicchitta, C.V., Williamson, J.R. (1984) J. Biol. Chem. 259:12978-12983.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D.A., Vary, J.C. (1985) Biochim. Biophys. Acta 815:486-498.
- Oka, T., Perry, J.W. (1976) J. Biol. Chem. 251:1738-1744.
- Oliva, R., Vidal, S., Mezquita, C. (1982) Biochem. J. 208:269-273.
- Olson, G., Orgebin-Crist, M.C. (1982) Ann. NY Acad. Sci. 383:372-391.
- Ono, M., Inoue, H., Suzuki, F., Takeda, Y. (1972) Biochim. Biophys. Acta 284:285-297.
- Orgebin-Crist, M.C. (1962) Ann. Biol. Animales Biochim. Biophys. 2:51-108.



- Orgebin-Crist, M. C. (1967) *Nature* 216:816-818.
- Orgebin-Crist, M. C. (1969) *Biol. Reprod.* 1:155-175.
- Orgebin-Crist, M. C., Djiane, J. (1979) *Biol. Reprod.* 21:135-139.
- Osterman, J., Muroso, E., Lin, T., Nankin, H. (1983a) *J. Androl.* 4:175-182.
- Osterman, J., Muroso, E. P., Lin, T., Nankin, H. R. (1983b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:496-501.
- Osterman, J., Barnett, D., Muroso, E. P., Lin, T., Nankin, H. R. (1983c) *Life Sci.* 33:353-357.
- Pajunen, A. E. I., Isomaa, V. V., Janne, O. A., Bardin, C. W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:7549-7553.
- Pegg, A. E. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 319:354-363.
- Pegg, A. E. (1984) *Cell Biochem. Function* 2:11-15.
- Pegg, A. E. (1986) *Biochem. J.* 234:249-262.
- Pegg, A. E., Lockwood, D. H., Williams-Ashman, H. G. (1970) *Biochem. J.* 117:17-31.
- Pegg, A. E., McCann, P. P. (1982) *Am. J. Physiol.* 243:C212-C221.
- Pegg, A. E., McCann, P. P. (1988) *ISI At. Sci-Biochem.* 1:11-18.
- Pegg, A. E., Williams-Ashman, H. G. (1968) *Biochem. J.* 109:32P-33P.
- Pegg, A. E., Williams-Ashman, H. G. (1969) *J. Biol. Chem.* 244:682-693.
- Pelliniemi, I. J., Dym, M., Gunsalus, G. L., Musto, N. A., Bardin, C. W., Fawcett, D. W. (1981) *Endocrinology* 108:925-931.
- Persson, L., Holm, I., Heby, O. (1986) *FEBS Lett.* 205:175-178.

- Persson, L., Pegg, A. E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:12364-12367.
- Pett, D. M., Ginsberg, H. S. (1968) *Fed. Proc.* 27:615.
- Phillips, M. A., Coffino, P., Wang, C. C. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:8721-8727.
- Pholpramool, C., White, R. W., Setchell, B. P. (1982) *J. Reprod. Fertil.* 66:547-553.
- Piik, K., Rajamaki, P., Guha, S. K., Janne, J. (1977) *Biochem. J.* 158:379-385.
- Podestá, E. J., Rivarola, M. A. (1974) *Endocrinology* 95:455-461.
- Poehl, A. von (1898) *Die physiologisch-chemischen Grundlagen der Spermintheorie nebst klinischem Material zur therapeutischen Verwendung des Spermium* Poehl. Wienecke, San Petersburgo.
- Prasad, M. N. R., Rajalakshmi, M., Gupta, G., Karkun, T. (1973) *J. Reprod. Fert. Suppl.* 18:215-222.
- Pujol, A., Bayard, F. (1978) *Steroids* 30:41-51.
- Pujol, A., Bayard, F., Louvet, J. P., Boulard, C. (1976) *Endocrinology* 98:111-113.
- Pulkkinen, P., Piik, K., Koso, P., Janne, J. (1978) *Acta Endocr.* 87:845-854.
- Pulkkinen, P., Sinervirta, R., Janne, J. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67:714-722.
- Purvis, K., Clausen, O. P. F., Olsen, A., Haug, E., Hansson, V. (1979) *Arch. Androl.* 3:219-230.
- Purvis, K., Cusan, L., Attramadal, H., Ege, A., Hansson, V. (1982)

- J.Reprod.Fertil. 65:381-387.
- Qian,Z.U., Tsai,Y.H., Steinberger,A., Lu,M., Greenfield,  
A.R.L., Haddox,M.K. (1985) Biol.Reprod. 33:1189-1195.
- Raina,A., Janne,J. (1975) Med.Biol. 53:121-147.
- Raina,A., Pajula,R.L., Eloranta,T. (1976) FEBS Lett. 67:252-  
255.
- Rastogi,R.K., Milone,M., Di Meglio,M., Caliendo,M.F.,  
Chieffi,G. (1979) J.Reprod.Fertil. 57:73-77.
- Raynaud,J.P., Bonne,C., Bouton,M.M., Lagace,L., Labrie,F.  
(1979) J.Steroid Biochem. 11:93-99.
- Reddy,B.V., Madhubala,R., Reddy,P.R.K. (1986) Biochem.Int.  
13:109-114.
- Reddy,B.V., Madhubala,R., Reddy,P.R.K. (1987) Biochem.Int.  
15:545-552.
- Reddy,P.R.K., Villee,C.A. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun.  
65:1350-1354.
- Regaud,C. (1901) Arch.Anat.Microsc.Morphol.Exp. 4:101-156.
- Resko,J.A., Feder,H.H., Goy,R.W. (1968) J.Endocr. 40:485-491.
- Richards,J.F. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 63:292-299.
- Rillema,J.A. (1985) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 178:490-494.
- Rinehart,C.A., Chen,K.Y. (1984) J.Biol.Chem. 259:4750-4756.
- Ritta,M.N., Calandra,R.S. (1986) En "GABA and Endocrine  
Function" (Racagni,G., Donoso,A.O., editores). págs. 291-297.  
Raven Prss, New York.
- Robaire,B., Ewing,L.L., Zirkin,B.R., Irby,D.C. (1977)

- Endocrinology 101:1379-1390.
- Robaire, B., Hermo, L. (1988) En "Physiology of Reproduction" (Knobil, E., Neill, J., editores). págs. 999-1080. Raven Press, New York.
- Robaire, B., Hales, B.F. (1982) Biol.Reprod. 26:559-565.
- Robinson, R., Fritz, I.B. (1979) Can.J.Biochem. 57:962-967.
- Rostand, J. (1945) Esquisse d'une Histoire de la Biologie. Editions Gallimard, Paris.
- Rui, H., Purvis, K. (1987) Mol.Cell.Endocrinol. 50:89-97.
- Russell, D.H. (1981) Med.Biol. 59:286-295.
- Russell, D.H. (1985) Drug Metab.Rev. 16:1-88.
- Russell, D.H., Larson, D.F., Cardon, S.B., Copeland, J.G. (1984) Mol.Cell.Endocrinol. 35:159-166.
- Sardaños, M.L., Solano, A.R., Podestá, E.J. (1987) J.Biol.Chem. 262:11149-11155.
- Scheer, H., Robaire, B. (1980) Endocrinology 107:948-953.
- Schmidt, W.N., Katzenellenbogen, B.S. (1979) Mol.Cell. Endocrinol. 15:91-108.
- Schreiner, P. (1878) Liebig's Ann. 194:68.
- Seiler, N. (1980) Physiol.Chem.Physics 12:411-429.
- Seiler, N. (1985) En "Structure and Functions of Amine Oxidases" (Mondovi, B., ed.) págs. 21-35. C.R.C. Press, Boca Raton.
- Seiler, N. (1987) Can.J.Physiol.Pharmacol. 65:2024-2035.
- Seiler, N., Bolkenius, F.N., Knodgen, B. (1985) Biochem.J. 225:

219-226.

Seiler, N., Heby, O. (1988) *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 23:1-36.

Sertoli, E. (1965) *Il Morgagni* 7:31-39.

Setchell, B.P. (1978) "The Mammalian Testis". Elek Books, London and Cornell University Press, New York.

Setchell, B.P., Brooks, D.E. (1988) En "The Physiology of Reproduction" (Knobil, E., Neill, J., editores) págs. 753-836.

Raven Press, New York.

Setty, B.S., Jehan, Q. (1977) *J. Reprod. Fert.* 49:317-322.

Shah, G.V., Sheth, A.R. (1978) *Experientia* 34:980-981.

Shah, P.G., Sheth, A.R. (1979) *Experientia* 35:1555-1556.

Shah, G.V., Sheth, A.R., Mugatwala, P.P., Rao, S.S. (1975) *Experientia* 31:631-632.

Sheth, A.R., Shah, G.V., Rao, S.S. (1976) *Ind. J. Biochem. Biophys.* 13:129-131.

Shubhada, S., Lin, S.N., Qian, Z.Y., Steinberger, A., Tsai, Y.H. (1989a) *J. Androl.* 10:145-151.

Shubhada, S., Daver, R., Tsai, Y.H. (1989b) *J. Androl.* 10:152-153.

Simard, J., Luthy, I., Guay, J., Belanger, A., Labrie, F. (1986) *Mol. Cell. Endocrinol.* 44:261-270.

Singh, V.K., Sung, S.C. (1972) *J. Neurochem.* 19:2885-2888.

Skinner, M.K. (1987) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 513:158-171.

Stanger, J.D., Quinn, P. (1982) *J. Exp. Zool.* 220:377-380.

Stastny, M., Cohen, S. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 261:177-180.

- Steinberger, A., Steinberger, E. (1976) *Endocrinology* 99:918-921.
- Stevens, L. (1970) *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 45:1-27.
- Suescun, M. O., González, S. I., Chiauzzi, V. A., Calandra, R. S. (1985) *J. Androl.* 6:77-82.
- Sufrin, G., Coffey, D. S. (1973) *Invest. Urol.* 11:45-54.
- Swift, T. A., Dias, J. A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 885:221-230.
- Tabor, C. W. (1960) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2:117-120.
- Tabor, C. W., Tabor, H. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45:285-306.
- Tabor, C. W., Tabor, H. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53:749-790.
- Tadolini, B. (1988) *Biochem. J.* 249:33-36.
- Takyi, E. E. K., Fuller, D. J. M., Donaldson, L. J., Thomas, G. H. (1977) *Biochem. J.* 162:87-97.
- Tate, S. S., Orlando, J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:5573-5575.
- Tezón, J. G., Blaquier, J. A. (1983) *Endocrinology* 113:1025-1030.
- Tezón, J. G., Vazquez, M. H., Blaquier, J. A. (1982) *Endocrinology* 111:2039-2045.
- Thuren, T., Virtanen, J. A., Kinnunen, P. K. J. (1986) *J. Membrane Biol.* 92:1-7.
- Toowicharanont, P., Chulavatnatol, M. (1983) *J. Reprod. Fertil.* 69:303-306.
- Tuck, R. R., Setchell, B. P., Waites, G. M. H., Young, J. A. (1970) *Pfluegers Arch.* 318:225-243.
- Turner, T. T. (1979) *Invest. Urol.* 16:311-319.

- Turner, T. T., Hartmann, P. K., Howards, S. S. (1977) *Fertil. Steril.* 28:191-194.
- Turner, T. T., Jons, C. E., Howards, S. S., Ewing, L. L., Zegeye, B., Gunsalus, G. L. (1984) *Endocrinology* 115:1925-1932.
- Vauquelin, L. N. (1791) *Ann. Chim.* 9:64.
- Voglmayr, J. K., White, I. G. (1979) *Biol. Reprod.* 20:288-293.
- Volkow, N., Goldman, S. S., Flamm, E. S., Cravioto, H., Wolf, A. P., Brodie, J. D. (1983) *Science* 221:673-675.
- Waeber, C., Reymond, O., Reymond, M., Lemarchand-Beraud, T. (1983) *Biol. Reprod.* 28:167-177.
- Wallace, H. M., Macgowan, S. H., Keir, H. M. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* 13:329-330.
- Walters, M. R. (1985) *Endocr. Rev.* 6:512-543.
- Wilson, R. W., Bloomfield, V. A. (1979) *Biochemistry* 18:2192-2196.
- Wilson, R. M., Griswold, M. D. (1979) *Exp. Cell Res.* 123:127-135.
- Wong, P. Y. D., Yeung, C. H. (1978) *Endocrinology* 101:1391-1397.
- Wright, W. W., Musto, N. A., Mather, J. P., Bardin, C. W. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7565-7569.
- Yeung, C. H., Cooper, T. G., Waites, G. M. H. (1980) *Biol. Reprod.* 23:294-304.
- Younes, M., Evans, B. A. J., Chaisiri, N., Valotaire, Y., Pierre-point, C. G. (1979) *J. Reprod. Fertil.* 56:45-52.
- Young, D. V., Srinivasan, P. R. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 238:447-463.

Young, W. C. (1929) *J. Morphol. Physiol.* 47:479-495.

Young, W. C. (1929) *J. Morphol. Physiol.* 48:475-491.

Young, W. C. (1931) *J. Exp. Biol.* 8:151-162.

Young Lai, E. V. (1982) *Experientia* 38:973-974.