

Tesis de Posgrado

Acción de la hormona juvenil sobre la regulación de la esteroidogénesis en células de Leydig

Vladusic, Esteban Arturo

1995

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

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

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

Cita tipo APA:

Vladusic, Esteban Arturo. (1995). Acción de la hormona juvenil sobre la regulación de la esteroidogénesis en células de Leydig. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2724_Vladusic.pdf

Cita tipo Chicago:

Vladusic, Esteban Arturo. "Acción de la hormona juvenil sobre la regulación de la esteroidogénesis en células de Leydig". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2724_Vladusic.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ACCION DE LA HORMONA JUVENIL SOBRE LA
REGULACION DE LA ESTEROIDOGENESIS
EN CELULAS DE LEYDIG**

Autor: Lic. Esteban Arturo Vladusic

Director: Dr. Eduardo H. Charreau

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas**

-1995-

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

Vta. de Obligado 2490, Buenos Aires, Argentina

14.1.3

A mis padres
A Fabiana y a Mariano

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo H. Charreau por haberme iniciado en la investigación científica y darme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación en su laboratorio.

Al Dr. Omar Pignataro por su ayuda durante estos años de formación científica.

Al Dr. Leonardo Bussmann, quién me guió en mis primeros experimentos.

A la Dra. Violeta Chiauzzi por sus enseñanzas sobre las técnicas de radioinmunoanálisis.

A los Dres. Eduardo Gros y Juan Baustista Rodriguez quienes se encargaron de la síntesis de los análogos de la hormona juvenil.

A la Dra. Isabel Luthy, Dr. Lino Baraño, Dra. Marta Tesone, Dr. Alberto Baldi Dra. Mónica Ritta por sus enseñanzas desinteresadas.

A Horacio Daud, Martín Gravano, Karina del Punta, Patricia Elizalde, Pablo Visconti, Paula Stein, y demás compañeros del Instituto de Biología y Medicina Experimental [IBYME] y del Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular [INGEBI] por su amistad y ayuda.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas [CONICET] por haberme otorgado becas de Iniciación y Perfeccionamiento, que hicieron posible la realización de esta Tesis.

A mi esposa la Dra. Fabiana G. de Vladusic, por los momentos de alegría y tristeza que compartimos, por su amor y su ayuda.

Quiero agradecer especialmente a mis padres Nedeljko Vladusic y Gigliola T. de Vladusic quienes junto a mi hermano Mariano P. Vladusic fueron los que me transmitieron la fuerza y esperanza para superar todas las dificultades encontradas y así llegar a la realización de esta Tesis.

ABREVIATURAS

ACAT	acil CoA colesterol aciltransferasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMP	adenosin monofosfato
AMPc	adenosin 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	adenosin trifosfato
AG	aminoglutetimida
BSA	albúmina sérica bovina
Bt2AMPc	dibutiril adenosin monofosfato cíclico
C	subunidad catalítica de la adenilil ciclasa
Ci	curie
CC	cianocetona
CoA	coenzima A
c.p.m.	cuentas por minuto
CE	colesterol esterasa
CSCC	enzima que escinde la cadena lateral del colesterol
DF	análogo de la HJ [2-(4 fenoxifenoxi)etoxi tetrahidropirano]
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
ES	error estándar
g	gravedad

GDP	guanosin difosfato
GTP	guanosin trifosfato
GTP γ S	guanosin trifosfato γ S
Gs	proteína "G" estimuladora
Gi	proteína "G" inhibitoria
G α s	subunidad α de la proteína "Gs"
G α i	subunidad α de la proteína "Gi"
G $\beta\gamma$	subunidades β y γ de la proteína "G"
hCG	gonadotropina coriónica humana
HJ	hormona juvenil
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etansulfónico
HMG-CoA	hidroximetil glutaril coenzima A
3 β -HSD	3 β hidroxí esteroide deshidrogenasa isomerasa
IC ₅₀	concentración de inhibición media
K _a	constante de afinidad
K _d	constante de disociación
LH	hormona luteinizante
LDL	lipoproteína de baja densidad
MIX	3-isobutil-1-metil-xantina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
PBS	buffer fosfato salino

PTTH	hormona protoraciotrópica
PKA	proteína quinasa A
Rf	frente de referencia
Rs	receptor estimuladorio
Ri	receptor inhibitorio
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TME-SA	tirosil metil éster de succinil AMPc

INDICE

INTRODUCCION.....	1
Consideraciones generales	
Hormonas y evolución.....	2
Sistema endocrino de insectos.....	6
Crecimiento y desarrollo de insectos.....	6
Historia de la hormona juvenil.....	8
Hormona juvenil: estructura y rol fisiológico.....	9
Hormona juvenil: proteína transportadora.....	12
Acción de la [HJ] durante el desarrollo.....	14
Acción de la [HJ] durante la reproducción.....	15
Regulación hormonal de la [HJ].....	15
Modo de acción de la [HJ] a nivel celular y molecular.....	16
Análogos de la [HJ].....	18
Endocrinología en vertebrados.....	21
Morfología testicular.....	21
Organización del tejido intersticial.....	22
Líquido intersticial.....	24
Célula de Leydig. Historia.....	24
Morfología de la célula de Leydig.....	25
Células de Leydig MA-10.....	27
Función endocrina del testículo	
Esteroides testiculares. Organización y regulación.....	28
Síntesis de andrógenos por las células de Leydig.....	28
El camino biosintético.....	29
Regulación de la síntesis de andrógenos por la hormona luteinizante.....	33
Roles de los componentes de la célula de Leydig	
Receptor LH.....	35
Adenilil ciclasa-rol del AMPc.....	35
Regulación de la formación de AMPc.....	36
Fuentes de colesterol para la síntesis esteroidea.....	40
Regulación del ciclo de los ésteres de colesterol en las células MA-10.....	41
Biosíntesis de colesterol en células esteroideogénicas.....	42
OBJETIVOS.....	45
MATERIALES Y METODOS.....	47

Materiales.....	48
Células MA-10.....	49
Cultivo celular.....	49
Preparación de membranas.....	50
Obtención de [¹²⁵ I]-hCG.....	50
Obtención del nucleótido marcado [¹²⁵ I]-AMPc.....	51
Ensayo de unión de hCG a su receptor.....	51
Ensayo de unión de GTP.....	52
Ensayo de actividad de adenilil ciclasa.....	52
Radioinmunoanálisis.....	52
Determinación de progesterona.....	53
Determinación de AMPc.....	54
Determinación de progesterona y AMPc intracelular.....	54
Marcación de la membrana plasmática con [³ H]-colesterol.....	55
Determinación del colesterol libre y de los ésteres de colesterol.....	55
Actividad de la colesterol esterasa.....	56
Determinación de la síntesis " <i>de novo</i> " de colesterol.....	57
Incorporación de radioactividad en esteroides extracelulares.....	58
Animales.....	58
Aislamiento de células intersticiales.....	58
Incubación con células de Leydig.....	59
Determinación de proteínas.....	59
Medición del contenido de ADN celular.....	60
Determinación del porcentaje de células viables.....	60
Análisis estadístico.....	60
RESULTADOS.....	61
CAPITULO I. Caracterización del efecto de la hormona juvenil III	
1.1. Efecto de la hormona juvenil III sobre la síntesis de progesterona en las células de Leydig MA-10.....	62
1.2. Efecto de los análogos sintéticos de la hormona juvenil sobre la síntesis de progesterona en células de Leydig MA-10.....	64
1.3. Metabolismo de progesterona en presencia del análogo de la HJ [DF].....	66
1.4. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre células MA-10 estimuladas con diferentes concentraciones de hCG.....	66
1.5. Variación en los tiempos de incubación de las células MA-10.....	69
1.6. Variación en los tiempos de agregado del análogo de la HJ [DF]....	71
1.7. Efectos de la HJ III y del análogo de la HJ [DF] sobre la producción del segundo mensajero AMPc.....	71
1.8. Análisis de progesterona y AMPc intracelular.....	74

CAPITULO II. Estudios sobre el sistema de la transducción de la señal hormonal de hCG.	
2.1. Estudio de la unión de hCG a su receptor en presencia del análogo de la HJ [DF].	77
2.2. Unión de GTP a membranas de células de Leydig.	79
2.3. Utilización de la toxina del cólera para estimular a la proteína "Gs" perteneciente al sistema adenilil ciclasa.	79
2.4. Utilización de la toxina pertussis para inhibir la proteína "Gi" perteneciente al sistema adenilil ciclasa.	82
2.5. Estimulación de la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa con forskolina.	84
2.6. Inhibición de la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa.	84
CAPITULO III. El camino biosintético de la progesterona.	
3.1. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la síntesis de progesterona.	88
3.2. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la esteroidogénesis estimulada por 25 y 20-OH colesterol.	88
3.3. Actividad del complejo enzimático 3β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa isomerasa.	90
3.4. Inhibición de la síntesis de pregnenolona.	93
CAPITULO IV. Fuentes de colesterol.	
4.1. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre el [³H]-colesterol unido a la membrana plasmática.	96
4.2. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre los ésteres de colesterol.	98
4.3. Inhibición de la colesterol esterasa.	100
4.4. Síntesis "de novo" de colesterol.	100
CAPITULO V. Células normales.	
5.1. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre células de Leydig normales.	104
DISCUSION	106
CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFIA	132

INTRODUCCION

CONSIDERACIONES GENERALES

HORMONAS Y EVOLUCION

Durante el desarrollo de los seres vivos la evolución ha poblado la tierra con un considerable número de especies animales y vegetales que ocupan prácticamente todos los medios. Las diferentes formas de los vertebrados [peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos], en primer lugar en los ambientes acuáticos, después en la conquista de los continentes estuvieron acompañados de la aparición de órganos nuevos como los pulmones, las alas, etc...

Sin embargo, la evolución de los vertebrados también supuso cambios de importancia fundamental para la supervivencia de los organismos en lo referente a los mecanismos fisiológicos; por ejemplo, en los mecanismos que regulan el desarrollo y la reproducción, o bien en los intercambios entre los organismos y el medio ambiente. Estas modificaciones precisaron paralelamente del perfeccionamiento del sistema de información que coordina entre sí las diferentes funciones del organismo y le informa de las características y variaciones del medio exterior.

La comunicación intercelular se requiere para la regulación del desarrollo celular y organización en tejidos, para controlar su crecimiento y división, y para coordinar sus diversas actividades. Las células pueden comunicarse entre sí de diferentes formas: en primer lugar, secretando mensajeros químicos que actúan sobre células distantes; en segundo lugar, por medio de moléculas unidas a la membrana plasmática; por último, formando uniones que comunican directamente los citoplasmas o las membranas de las células interactuantes. Asimismo, los mensajeros químicos secretados pueden actuar como mediadores químicos locales (neurotransmisores, prostaglandinas, etc.) los que son captados y metabolizados rápidamente en las inmediaciones, o pueden ser secretados por células especializadas llamadas endocrinas, liberándose a la sangre para ser transportados hasta las células efectoras.

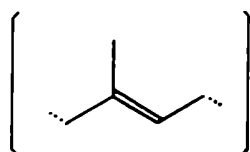
A éstos últimos mensajeros se los denomina "*Hormonas*". Se comprende así que el sistema nervioso y el sistema endocrino hayan tenido un importante papel en la evolución.

En los últimos años la Bioquímica y la Endocrinología han permitido abordar la evolución de las hormonas en el conjunto del mundo vivo, incluidos los seres microscópicos. Se sabe hace mucho tiempo de la existencia en los invertebrados de hormonas específicas, tales como las hormonas de la muda de los insectos [1]. Asimismo, hace unos pocos años se ha visto que ciertas hormonas de los vertebrados (o sustancias semejantes) también están presentes en invertebrados muy diversos, e incluso en organismos unicelulares (protozoos, hongos unicelulares) y bacterias.

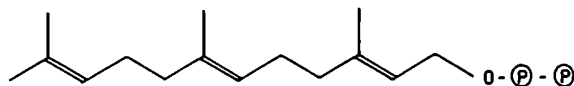
J Roth y su grupo demostraron la presencia de la insulina en la mosca *Drosophila*, en el gusano de tierra, en protozoos, en hongos microscópicos y en la bacteria *Escherichia Coli* [2]. Hacia 1977 el grupo de M.P. Dubois [3], en colaboración con otros grupos, encontró hormonas de vertebrados (somatostatina, vasopresina, factor liberados de TSH, etc.) en animales muy diferentes, desde las planarias (gusanos planos muy primitivos) a los insectos. El mismo grupo encontró en invertebrados y en organismos unicelulares, hormonas de vertebrados como ACTH, calcitonina, colecistoquinina y otras.

Los adelantos en la investigación sobre endocrinología de invertebrados, sumados al hallazgo de esteroides en organismos procariotas y vegetales superiores, indicaron un claro conservacionismo en los mecanismos de biosíntesis de estos compuestos, revelando la importancia que tienen los compuestos como los esteroides y terpenos tanto en la faz endocrina como en las interacciones ecológicas. Durante el proceso evolutivo la aparición de las hormonas de naturaleza lipídica, como las esteroideas, los terpenos y las prostaglandinas dependió de la presencia de oxígeno en el medio ambiente [4].

Podemos considerar como precursor de las hormonas esteroideas y de los terpenos a una unidad de cinco átomos de carbono denominada "*isopreno*".



La polimerización del isopreno conduce a la formación de una estructura de 15 átomos de carbono denominada "*farnesilpirofosfato*".



El farnesilpirofosfato constituye el compuesto a partir del cual se produce una bifurcación en dos vías (Fig. 1):

A)[mamíferos] La biosíntesis que conduce a la formación de colesterol, y finalmente de hormonas esteroideas.

B)[insectos] La biosíntesis de hormonas juveniles de insectos [HJ], que son terpenos de 16,17,18 y 19 átomos de carbono.

La posibilidad de que compuestos terpenoides estén involucrados en interacciones de animales y plantas a nivel ecológico se afirma con el hallazgo de productos vegetales que mimetizan la acción de las hormonas juveniles de insectos [HJ]. Debido a que compuestos con actividad de [HJ] se hallan ampliamente distribuidos en la biósfera y a que su estructura química presenta similitudes muy particulares con intermediarios presentes en caminos metabólicos de mamíferos podría existir la posibilidad de algún tipo de interacción.

Así fue como se ha desarrollado el presente trabajo de investigación y es por eso que comenzaremos detallando las propiedades y forma de acción de la hormona juvenil en los insectos, para luego describir los sistemas en los cuales se estudiaron sus efectos.

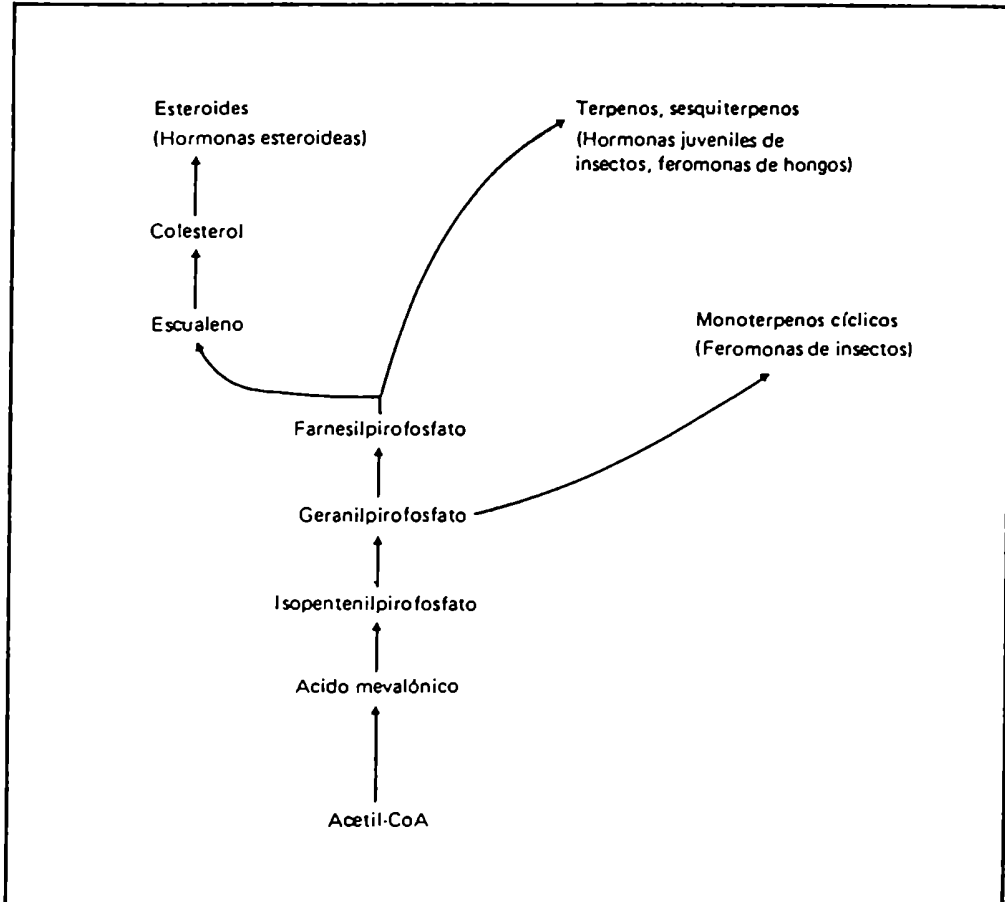


Figura 1: Caminos biosintéticos, en organismos animales, de hormonas de naturaleza lipídica.

Sistema endocrino de insectos.

La importancia de la señal hormonal en la metamorfosis de los insectos fue observada por primera vez por Stefan Kopec en 1917 [5,6]. A partir de ese momento el desarrollo de intensas investigaciones revelaron la complejidad del sistema endocrino de los insectos (Fig 2).

Este está compuesto por cuatro componentes principales:[7]

las células neurosecretoras en el cerebro

la corpora cardíaca

la corpora allata

las glándulas protorácicas.

La *corporata cardíaca* produce sus propias hormonas, pero en la mayoría de los insectos la función principal consiste en almacenar y liberar hormonas secretadas por el cerebro. De esta forma constituye junto a las células neurosecretoras el *sistema neurosecretorio cerebral*.

La *corporata allata* se encuentra localizada cerca del cerebro del insecto y en contacto con la *corporata cardíaca* a través de nervios. En varios grupos de insectos las originalmente *corporata cardíaca* y *allata* se fusionaron para formar un solo órgano. Cumple un rol muy importante en la regulación de la síntesis de la *hormona juvenil* [HJ] presente en la hemolinfa [8-10].

Las *glándulas protorácicas* por su parte sintetizan *ecdisona*. Tanto la *corporata allata* como las glándulas protorácicas son glándulas endocrinas epiteliales [7]. Estudios de microscopía electrónica demostraron que las células de la *corporata allata* y de las *glándulas protorácicas* son tan similares en cuanto a su estructura que son virtualmente indistinguibles [11]. B. Scharrer reportó además que el retículo endoplasmático en ambas glándulas era muy similar al que se encontraba en las células endocrinas de mamíferos que metabolizaban esteroides [11].

Crecimiento y desarrollo de insectos.

Los insectos, al igual que el resto de los artrópodos, poseen un exoesqueleto o cutícula que le sirve de soporte a los órganos internos y provee protección respecto de enemigos naturales y adversidades climáticas [12]. Todas estas cutículas son incapaces de crecer o modificarse como para permitir un desarrollo continuo del insecto semejante al de los vertebrados, por lo que deben ser descartadas y

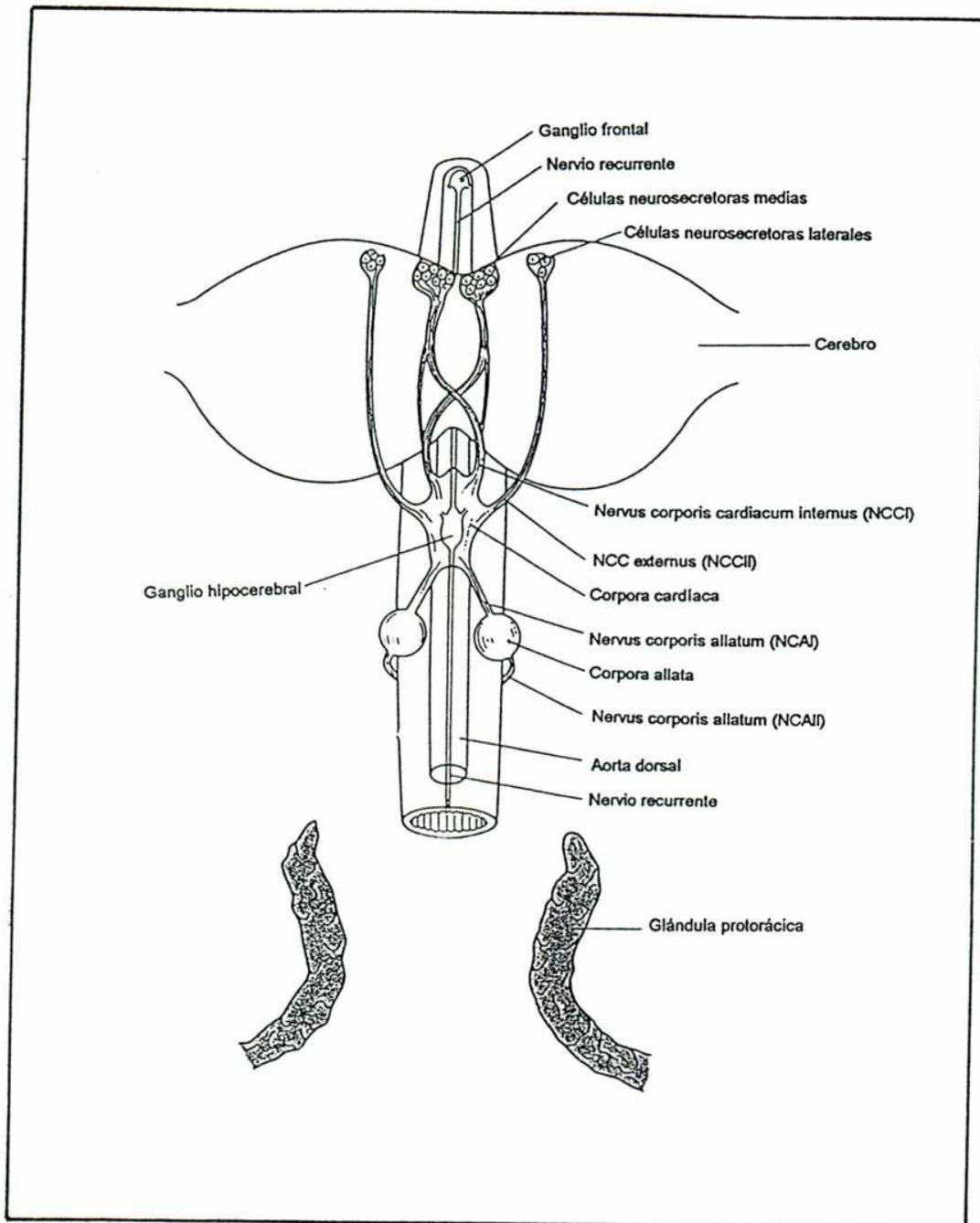


Figura 2: Diagrama del sistema endocrino de insectos.

Dos grupos de *células neurosecretoras* en cada mitad del cerebro distribuyen sus axones hacia la *corpóra cardíaca*. La mayoría de los axones provenientes de los grupos de células neurosecretoras medias se entrecruzan antes de abandonar el cerebro. La *corpóra cardíaca* se encuentra conectada a la *corpóra allata* a través de nervios. Las *glándulas protorácicas*, normalmente no se encuentran conectadas a la corpóra cardíaca o la corpóra allata.

reemplazadas por otras nuevas. Este proceso de muda o écdisis le permite al animal crecer y adquirir las características del adulto a través de un ciclo llamado *metamorfosis*, que comprende varios estadios discretos (*huevo, larva, pupa, adulto*) con diferencias radicales en cuanto a la forma del cuerpo [13].

La periódica multiplicación celular y muda de los insectos inmaduros se encuentra regulada por dos hormonas; una producida por las células secretoras en el cerebro del insecto [hormona protoracicotrófica PTTH], y la otra por las glándulas protorácicas [ECDISONA]. La hormona del cerebro [PTTH] actúa estimulando a las glándulas protorácicas las que a su vez incrementan la síntesis de ecdisona. Esta última es la encargada de desencadenar los eventos relacionados con el crecimiento y los procesos de muda.

Sin embargo existe una tercer hormona, la hormona juvenil [HJ], que inhibe los cambios de maduración que acompañan al proceso de la metamorfosis [14]. Su presencia en insectos inmaduros asegura que cuando una larva mude esta retendrá las características de larva y no se diferenciará en adulto. Se puede concluir que la hormona juvenil [HJ] es un agente que permite el crecimiento pero impide la maduración.

De esta forma se llega a la conclusión de que la muda se controla a través de la liberación de la hormona del cerebro PTTH y los niveles de Ecdisona, mientras que la maduración se controla por los niveles de la Hormona Juvenil.

Historia de la Hormona Juvenil.

En el año 1956 Williams preparó el primer extracto de hormona juvenil [15]. Cuando este extracto fue inyectado en un insecto que se encontraba en el estadio de pupa, esta mudó a un segundo estadio de pupa. Las células epiteliales, en lugar de secretar una cutícula de adulto, sintetizaron nuevamente una cutícula larval; observando que la inyección de cantidades variables de estos extractos producían efectos graduales.

Dos años más tarde fue Gilbert quien observó por primera vez que extractos de glándulas adrenales bovinas poseían actividad de hormona juvenil [16]. De esta forma, la actividad de hormona juvenil ha sido encontrada en extractos de tejidos de varios invertebrados, en vertebrados, en plantas y en microorganismos [17-19].

Estos resultados nos indicarían que estamos tratando con un grupo de sustancias que se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza. Hacia 1961 Schmialek [20] aisló el principio activo de los extractos de hormona juvenil, y lo describió como el alcohol de un terpeno de cadena abierta, *farnesol*, y su aldehído, *farnesal* (Fig. 3).

El farnesol posee una actividad análoga a la acción de la hormona juvenil [21]. Fue descrita como la primer sustancia de estructura conocida en actuar como la hormona de un insecto, aunque lamentablemente luego se llegara a la conclusión de que en realidad no era la hormona juvenil. El farnesol es un alcohol primario de cadena recta con estructura tipo terpeno, compuesto de tres estructuras isoprenoides, y como precursor del escualeno y de otros isoprenoides y esteroides en levaduras y en hígado, ha sido de considerable importancia.

El hecho de que los terpenos, esteroides, y alcoholes se encuentren ampliamente distribuidos en la naturaleza, sugiere que la actividad de hormona juvenil reportada en extractos de vertebrados, invertebrados, plantas y microorganismos se deba a compuestos de naturaleza similar a la hormona juvenil más que a la presencia de la hormona juvenil misma en todos ellos.

Hormona juvenil: estructura y rol fisiológico.

Las hormonas juveniles [HJ] son moléculas singulares tanto química como fisiológicamente. Desde el punto de vista químico las [HJ] son sesquiterpenos derivados del acetato, a través de los intermediarios mevalonato y farnesoato, seguido de una carboximetilación y una epoxidación (Fig. 4)[22].

Desde el punto de vista fisiológico se ha observado que las [HJ] tienen la capacidad de desempeñar distintos papeles:

- a) en los estadios juveniles
 - modula el crecimiento y el desarrollo
 - modula la síntesis de estructuras larvales
 - inhibe los cambios asociados a la metamorfosis
 - bloquea su propia síntesis por autoinhibición
- [23,24]

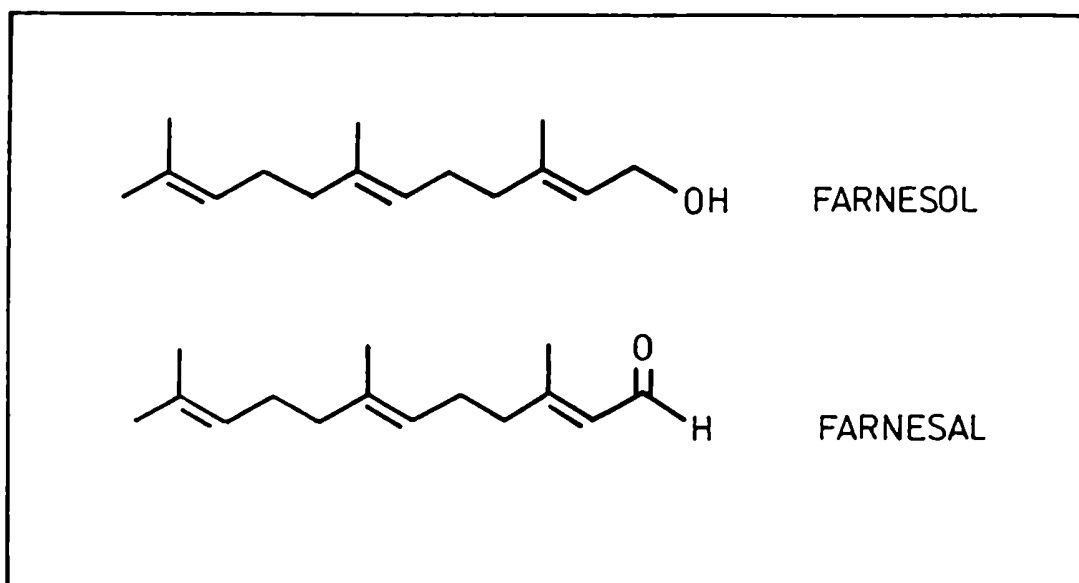


Figura 3: Estructuras químicas de los principios activos aislados por Schmialek.

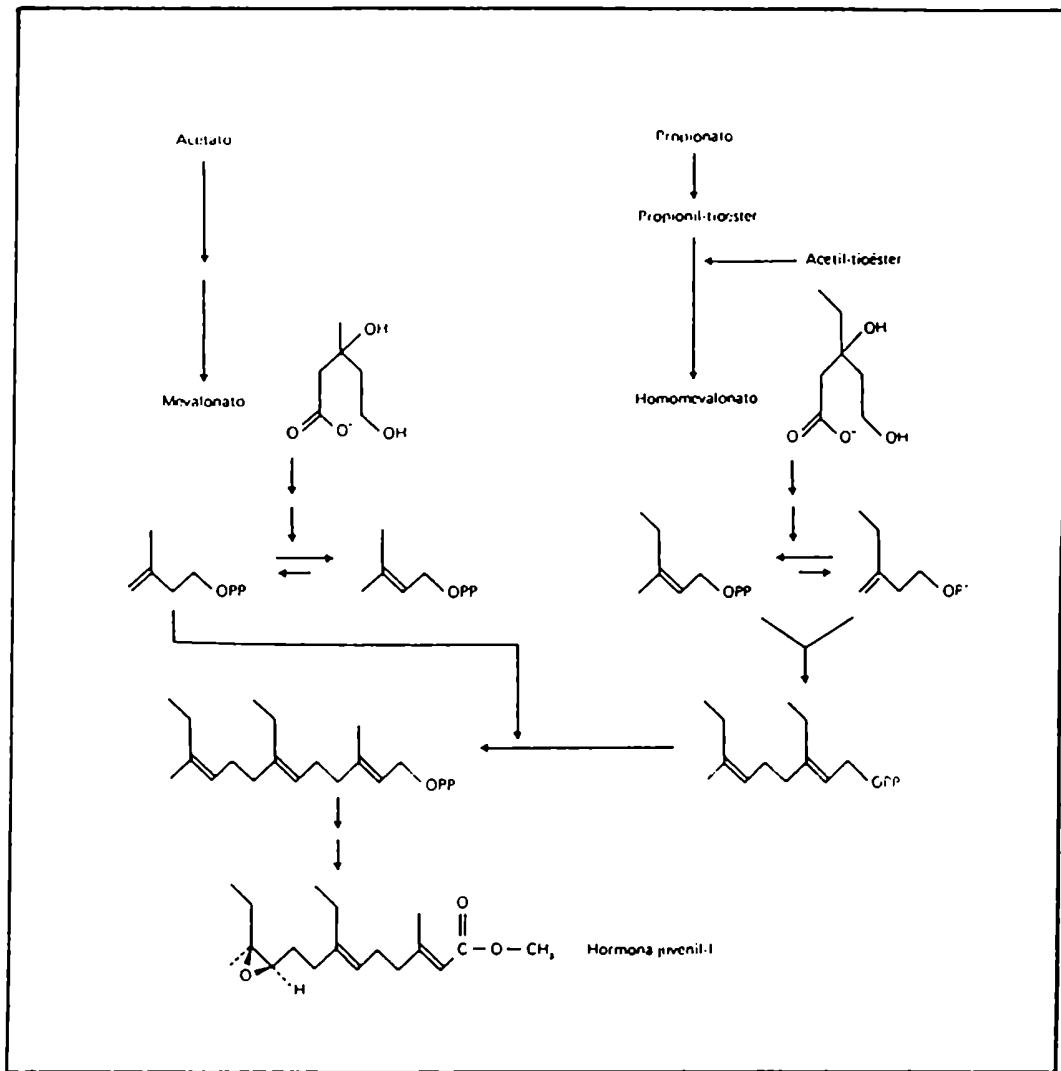


Figura 4: Probable secuencia de reacciones en la biosíntesis de la hormona juvenil I.

La síntesis de la [HJ-I] se produce a partir de una molécula de mevalonato y dos de homomevalonato; la de [HJ-II] a partir de una de homomevalonato y dos de mevalonato; y la de [HJ-III] a partir de tres moléculas de mevalonato.

b) en las hembras adultas - ejerce su efecto en la faz reproductiva estimulando la reproducción [12].

Se conocen 5 hormonas juveniles homologas naturales [25,26], las que fueron detectadas en diferentes insectos, en estadios particulares del desarrollo (Fig. 5).

Las diferencias estructurales entre las [HJ] están correlacionadas con variaciones en la actividad biológica. La [HJ I] y la [HJ II] son más potentes que la [HJ III] para mantener las características juveniles; la [HJ III] es más activa que las otras dos en el estadio adulto.

La hormona juvenil es un agente morfogenético único en el sentido que por un lado inhibe la expresión de características fenotípicas de estado adulto, y por el otro activa la expresión de procesos fundamentales responsables de la reproducción [24]. Para desarrollar una diversidad tal de roles los niveles de [HJ] deben controlarse cuidadosamente durante la vida del insecto.

Hormona juvenil: proteína transportadora.

La hormona juvenil se transporta a través de la hemolinfa hacia las células blanco formando un complejo junto a una proteína transportadora. Se ha postulado que la principal función de la proteína transportadora consiste en dar protección a la [HJ] contra la acción de las esterasas inespecíficas [27].

En insectos reducidos (*Triatoma*) [12] se observó la presencia de dos clases de transportadores de [HJ]; uno específico, de baja capacidad y alta afinidad, y otro inespecífico, de gran capacidad y baja afinidad.

Esto revela una situación semejante a la que se observa en vertebrados, donde la albúmina y varias lipoproteínas representan el componente de baja afinidad, baja especificidad y gran capacidad para interactuar con hormonas lipofílicas, las cuales coexisten con proteínas que poseen alta afinidad, alta especificidad y baja capacidad para asociarse con las mismas hormonas. Pese a la divergencia evolutiva entre vertebrados e insectos, ambos grupos han desarrollado un sistema binario de transporte para hormonas lipofílicas.

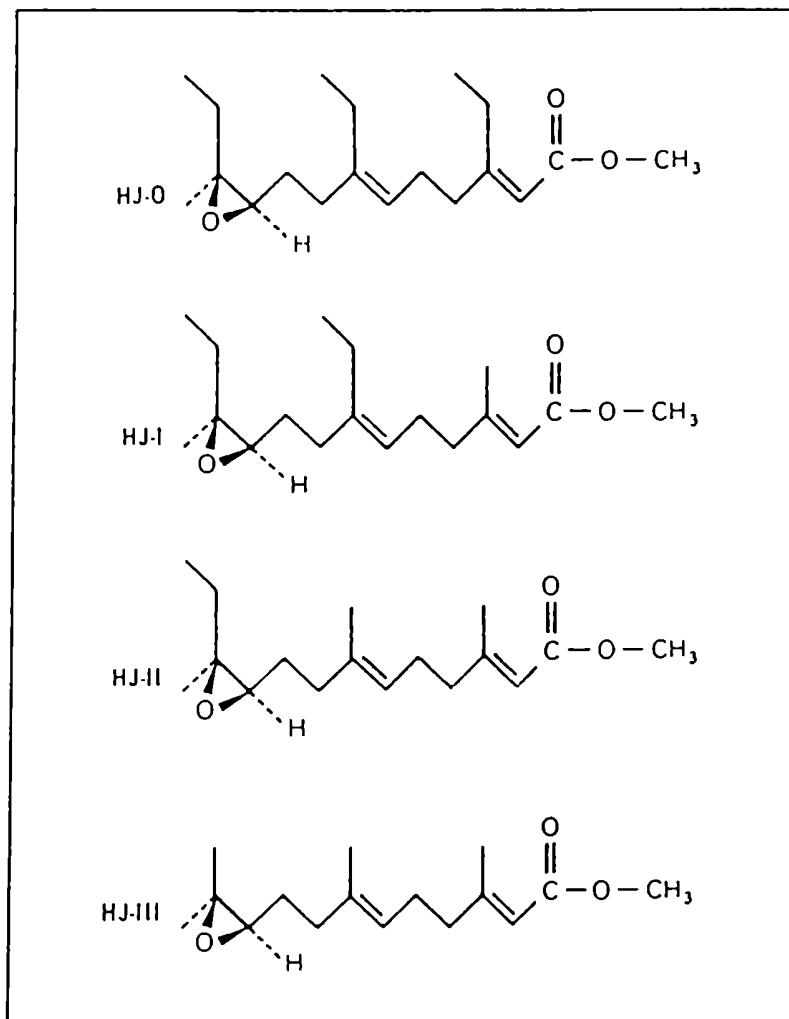


Figura 5: Estructuras químicas de las hormonas juveniles.

Acción de la [HJ] durante el desarrollo.

Durante el desarrollo del insecto a tiempos específicos se libera a la hemolinfa un neuropéptido, la *hormona protoracicatrófica* [PTTH], que actúa sobre las glándulas protorácicas para estimular la biosíntesis de *ecdisona* [28,29]. La síntesis de *ecdisona* está a su vez influenciada por otros factores regulatorios [30] pero solo recientemente se tuvo en cuenta que una parte importante en la respuesta a estos factores para la producción de *ecdisona* lo constituye la capacidad de respuesta de la glándula protorácica [31].

La liberación de [PTTH] y la concentración del factor estimulador *ecdisona* se encuentran regulados por la hormona juvenil [HJ][32] siendo posible que la [HJ] también regule la capacidad de respuesta de la glándula protorácica. El hecho de que la glándula protorácica adquiera capacidad de respuesta luego de que los niveles de [HJ] desciendan significativamente sugiere que su presencia suprime la capacidad de respuesta de estas glándulas.

La mayoría de las investigaciones en cuanto a la regulación de la biosíntesis de *ecdisona* se han centrado en el control de la actividad de la glándula protorácica por parte de moléculas bioregulatoras, siendo en el presente un tema importante de consideración. La determinación de como es que se controla la capacidad de respuesta de una glándula es algo crítico para comprender como se regula la síntesis de hormonas en los insectos. Teniendo en cuenta estos resultados la [HJ] podría suprimir la capacidad de respuesta de la glándula protorácica actuando directamente sobre esta, e indirectamente inhibiendo la liberación de [PTTH].

Mientras que la *ecdisona* inicia la cascada de eventos fisiológicos y de comportamiento que precede a la muda, la hormona juvenil media el carácter de esta muda [33]. Un modelo inicial proponía que altos niveles de [HJ] en presencia de ecdiesteroides resultaba en una muda con retención del fenotipo juvenil. En contraposición bajos niveles de [HJ] (en presencia de ecdiesteroides) resultaba en una muda a un estado maduro de pupa o adulto. Aunque se ha determinado que la relación entre [HJ] y ecdiesteroides es mucho mas compleja, el mecanismo a través del cual la [HJ] media los efectos de los ecdiesteroides es aun desconocido.

Acción de la HJ durante la reproducción.

En los insectos la reproducción depende de una sincronización óptima de procesos fisiológicos y de comportamiento en machos y hembras [34]. La maduración reproductiva y el comportamiento de apareo están controlados por la concentración de la [HJ] en la hemolinfa. Se necesitan altos niveles de [HJ] para el desarrollo y la maduración del sistema reproductivo, y el aumento del comportamiento de apareo [35]. Vinculando ambos procesos, observamos un mecanismo sumamente eficiente para la fisiología del insecto, ya que utiliza la misma hormona [HJ] en el proceso de maduración reproductiva y en señalar la puesta a punto y disposición para la fecundación [12].

En contraste con su rol morfogenético durante el desarrollo previo al estadio adulto, la hormona juvenil se considera la principal hormona gonadotrófica del estadio adulto, una regulación muy precisa de la concentración de la [HJ] en la hemolinfa es un prerequisite para la coordinación de los múltiples procesos controlados por esta hormona [36].

La diapausea reproductiva es un estado fisiológico donde el tamaño del sistema reproductivo es pequeño, o regresiona, donde los niveles de [HJ] son pequeños o nulos, y donde el comportamiento de apareo no se pone de manifiesto [37].

Regulación hormonal de la [HJ].

Los cambios en el nivel hormonal de la [HJ] se regulan por dos procesos: biosíntesis y degradación [38]. La biosíntesis se podría estimular mediante factores *allatostáticos* provenientes del cerebro del insecto y transmitidos a través de terminales nerviosas, las que actuarían estimulando a la *corpora allata* [36].

Biosíntesis: Las hormonas juveniles se sintetizan a partir de acetato y/o propionato de acuerdo al camino biosintético isoprenoide, el mismo que en vertebrados conduce a la síntesis de colesterol.

Se observó que el mevalonato exógeno servía como precursor de la [HJ III] en la *corpora allata* de varias especies y que las enzimas limitantes en el camino biosintético de la [HJ] se encontraban situadas antes de la síntesis de mevalonato.

La velocidad de síntesis de [HJ] en glándulas tratadas con mevalonolactona eran superiores a la velocidad espontánea, lo cual indicaría que bajo condiciones espontáneas de síntesis los pasos enzimáticos posteriores a la formación del mevalonato no son limitantes [39].

También existirían evidencias que sugerirían que la capacidad biosintética de la *corpora allata* se modificaría durante la vida del insecto en función a cambios tanto del desarrollo [40,41] como ambientales [41-43].

Camino degradativo: por lo general la degradación de la hormona juvenil [HJ] sigue dos caminos principales: hidrólisis a través de esterasas para formar la [HJ-ácida], o el clivaje del anillo epóxido por epóxido hidrolasas que dan como resultado la [HJ-diol] (Fig. 6).

Recientemente se describieron efectos inhibitorios sobre la actividad de biosíntesis de la [HJ] en la *corpora allata* de *Manduca Sexta* utilizando concentraciones de [HJ I], [HJ II], y [HJ III] de 100 μ M [44]. Si bien las concentraciones descritas eran muy superiores a las presentes en la hemolinfa circulante, eran del mismo orden de magnitud presente dentro de la glándula. En base a estos resultados, se planteó la posibilidad de que un mecanismo autoinhibitorio podría operar dentro de la glándula [45].

De esta forma en condiciones fisiológicas, la inhibición intraglandular podría operar cuando la velocidad de liberación de [HJ III] es máxima. En *B. germanica* los mayores niveles de liberación de [HJ] se encuentran antes de finalizar el ciclo gonadotrófico [46]. Los mecanismos regulatorios en la producción de [HJ] pueden ser comparados en complejidad con aquellos encontrados en sistemas similares de vertebrados, como es el caso del control de la síntesis de colesterol por una regulación sobre la [HMG-CoA] reductasa [47,48].

Modo de acción de la [HJ] a nivel celular y molecular.

La diversidad de efectos fisiológicos que media la [HJ] sugiere que las células blanco responden a la hormona vía genes y/o mecanismos de segundos mensajeros [24]. Se ha demostrado que ciertos genes se encuentran bajo el control estimulador de la [HJ] [24,49].

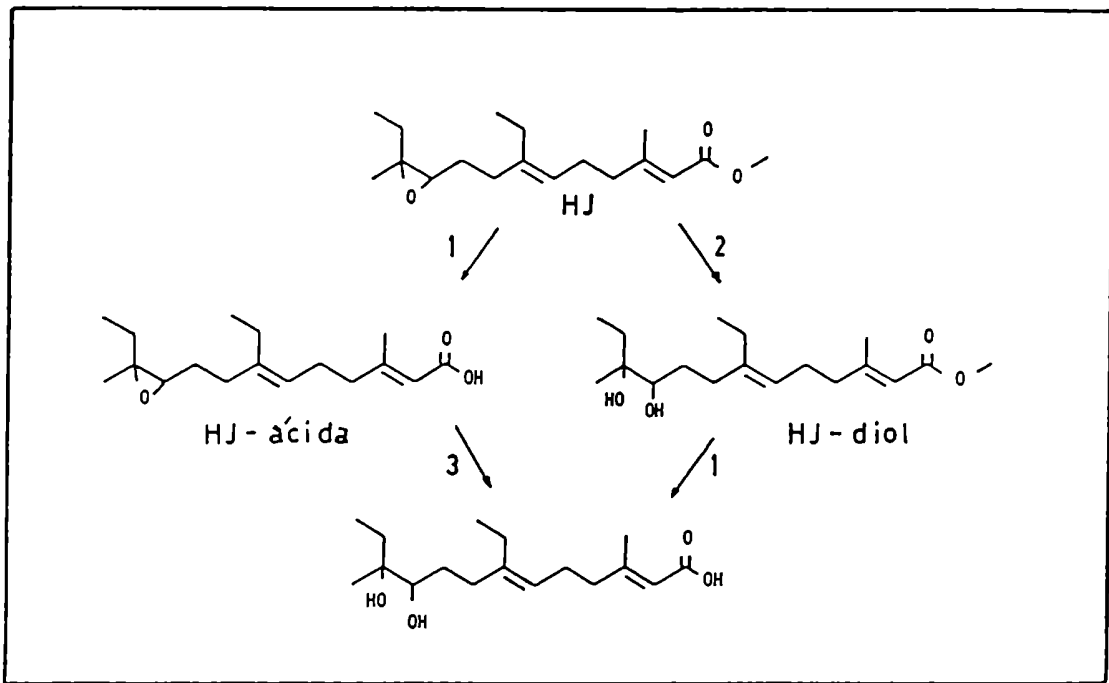


Figura 6: Secuencia degradativa para hormonas juveniles de insectos.

Enzimas implicadas: 1, carboxiesterasas; 2 y 3, epóxido hidrolasas.

También se ha descrito que los tejidos blanco poseen proteínas intracelulares (citosólicas o nucleares) que tienen un alta afinidad hacia la [HJ] [50,51] que tienen la capacidad de interactuar con el núcleo [52,53] y que podrían estar involucrados en el control de la síntesis de proteínas [54,55]. De esta forma parece ser que la [HJ] puede activar o reprimir genes blanco específicos o grupos de genes por unión a receptores específicos estimulatorios o inhibitorios [24].

La [HJ] podría actuar también a través de la membrana plasmática por un sistema mediado por proteínas [56], mediante la mediación de iones calcio y la proteína quinasa C [57].

Análogos de la HJ

Los estudios realizados sobre la degradación de hormonas juveniles [58] mostraron que estas se inactivaban metabólicamente de acuerdo a varios caminos. Esta inactivación se producía por hidrólisis del éster como así también por la hidratación del epóxido. Estos procesos pueden ocurrir tanto en la hemolinfa como en el cuerpo graso o en otros tejidos.

Dado que las hormonas producen acciones biológicas importantes, ya sea por su presencia o por su ausencia, la necesidad de una regulación interna controlada para su metabolismo e inactivación es comprensible. En vista al interés en utilizar a las hormonas juveniles en el control de insectos, se debió evitar el metabolismo de las mismas para obtener un efecto letal máximo como agente morfogenético. Los intentos para desarrollar análogos de la hormona juvenil capaces de resistir las defensas metabólicas condujeron a la síntesis de miles de análogos de hormonas juveniles [59-64].

Muchos de los análogos sintéticos de la hormona juvenil mantuvieron su esqueleto isoprenoide, mientras que otros no. En 1966 [65] se sintetizaron distintos compuestos con una actividad de hormona juvenil extraordinariamente alta por tratamiento de ácido farnésico en solución etanólica con HCl concentrado.

Empleando condiciones similares de reacción se obtuvo una mezcla de compuestos activos de la cual Romanuk y colaboradores identificaron correctamente una estructura altamente activa como el diclorhidrato del farnesoato de metilo.

Una importante información estructural sobre los análogos de las hormonas juveniles provino de una gran variedad de fuentes, y uno de los más grandes descubrimientos fue la actividad de hormona juvenil permanente en varios productos derivados de la pulpa del papel producido a partir de la madera del pino balsamo [66].

En la Fig. 7 se observan las estructuras químicas de los análogos de la [HJ] utilizados durante la realización del presente trabajo de Tesis. Estos compuesto se podrían agrupar en

- A) compuestos que conservan la estructura isoprenoide (II-III).
- B) compuestos con una estructura bifenilo (IV-VIII).

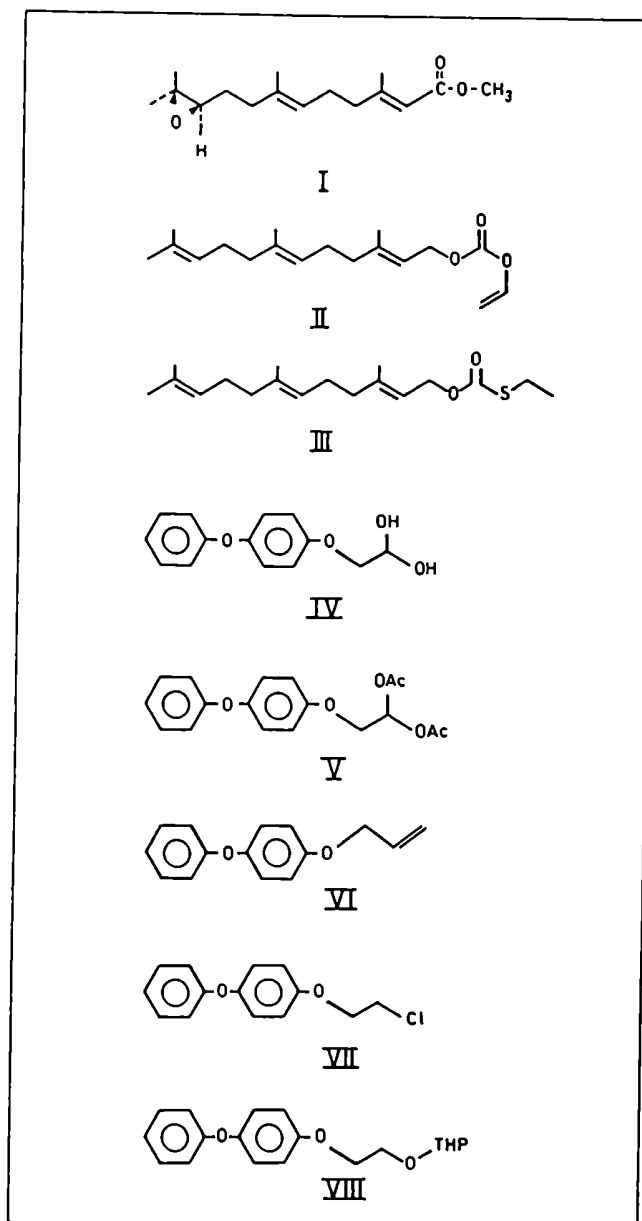


Figura 7: Estructura química de compuestos análogos sintéticos de hormonas juveniles de insectos.

[I]: hormona juvenil III; [II-III]: análogos sintéticos que conservan la estructura isoprenoide; [IV-VIII]: análogos sintéticos cuya estructura básica consiste en dos fenilos unidos entre si.

ENDOCRINOLOGIA EN VERTEBRADOS

Luego de haber descripto en forma resumida el sistema endocrino de los insectos, y las principales características de la *hormona juvenil* [HJ] tanto estructural como funcionalmente, quedó claro que a pesar de estar describiendo una hormona presente en insectos esta presentaba una complejidad comparable a la presentada por hormonas de vertebrados.

Para la realización de los experimentos en vertebrados se eligió como modelo a la célula esteroideogénica de Leydig que se encuentra situada en el testículo, por lo que esta segunda parte de la introducción corresponde a su descripción y localización.

El tracto genital masculino de los mamíferos comprende un conjunto de órganos y conductos cuya función principal consiste en la producción de espermatozoides aptos para la fecundación. Los mismos pueden clasificarse según sus funciones en 3 grupos:

- a) los *testículos*, cuya función principal es la producción de espermatozoides y la síntesis de andrógenos y una serie de factores que proveen el medio adecuado para el desarrollo de la espermatogénesis.
- b) las *vías eferentes*, constituidas por el epidídimo, el conducto eferente y la uretra. Este sistema está involucrado en el transporte, maduración y almacenamiento de espermatozoides.
- c) las *glándulas sexuales accesorias* (vesículas seminales, próstata, glándulas coagulantes, glándulas bulbouretrales y glándulas uretrales) cuyas secreciones constituyen la fracción principal del líquido seminal.

Morfología testicular.

El testículo de los mamíferos es un órgano ovoide que se encuentra de a pares, ubicado fuera del abdomen, en el escroto. El parénquima testicular, rodeado externamente por la cápsula testicular, está formado por dos compartimientos, uno no vascularizado compuesto por una serie de túbulos seminíferos que constituyen la unidad funcional para la producción, maduración y almacenaje de espermatozoides y

un compartimiento intersticial, altamente vascularizado, que rodea los túbulos seminíferos, y contiene entre otros tipos celulares a las *células de Leydig* responsables de la síntesis de esteroides.

La figura 8 muestra un corte de testículo en el cual se observan las zonas mencionadas.

Está bien determinado que las funciones de ambos compartimientos se encuentran reguladas por las gonadotropinas hipofisarias [67,68] y que además, están interrelacionadas, ya que los andrógenos, que se definen como las hormonas que desarrollan y mantienen los órganos sexuales accesorios y las características sexuales secundarias masculinas, tienen una importancia vital en los procesos de espermatogénesis [69,70] y maduración de los espermatozoides [71,72].

El hecho de que las células de Leydig estuviesen involucradas en la secreción de los andrógenos testiculares, ha sido la razón fundamental del interés de estas células.

Organización del tejido intersticial.

El compartimiento intersticial está compuesto por una malla irregular de tejido conectivo laxo que llena los espacios entre los túbulos seminíferos y contiene a los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios del testículo.

Sin duda el componente celular más importante de este compartimiento es la célula de Leydig, responsable de la producción de los andrógenos esenciales para el mantenimiento de la espermatogénesis, el trofismo de todo el tracto reproductivo, y de los caracteres sexuales secundarios. Las células de Leydig se encuentran generalmente agrupadas en cúmulos asociados a los vasos sanguíneos o bien cercanos a la pared de los túbulos seminíferos.

En el espacio intersticial también se encuentran fibroblastos, macrófagos [73], linfocitos [74,75] y en algunas especies mastocitos [76]. Al examinar el tejido intertubular se confirma una organización histológica consistente con la función endocrina, debido a la rica vascularización y una asociación entre las células de Leydig y los vasos sanguíneos, lo cual facilitaría el pasaje de los esteroides a la circulación (Fig. 8).

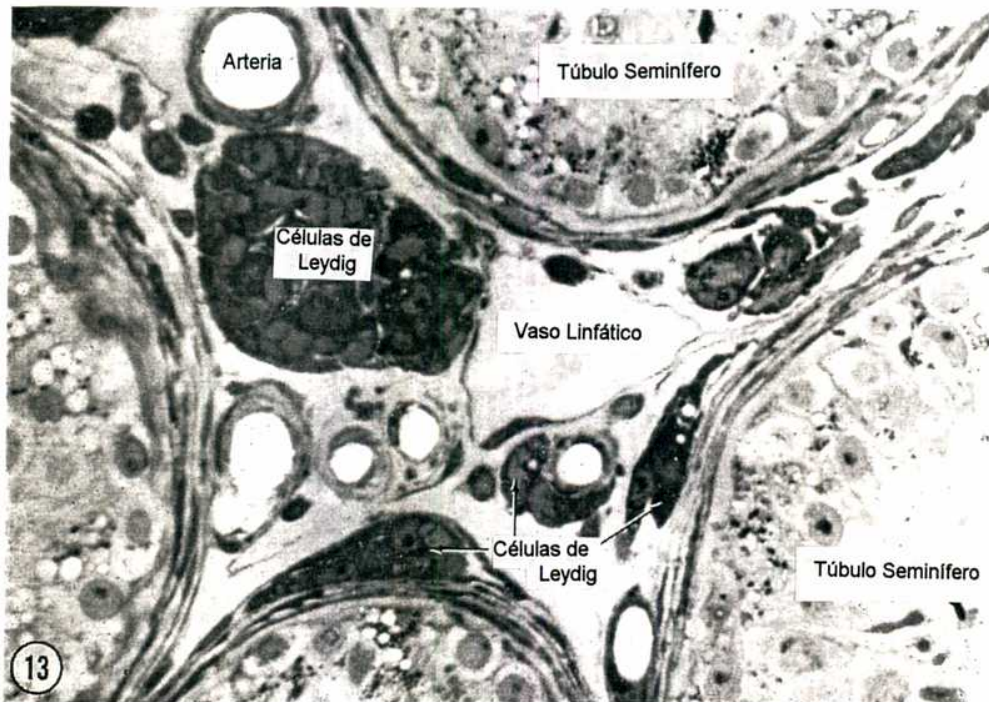


Figura 8: Esquema de un corte de testículo.

Microfotografía (450 X) de tejido intersticial proveniente de un testículo perfundido. Los capilares y los vasos linfáticos se encargan de transportar andrógenos hacia otras partes del cuerpo. Las células de Leydig, que constituyen el tipo celular mayoritario del intersticio, se encuentran en forma de cúmulos.

Líquido intersticial.

Los túbulos seminíferos y las células del tejido intersticial se encuentran rodeados por el líquido intersticial. Todas las hormonas y los nutrientes que llegan al testículo por la circulación deben pasar de los capilares hacia el líquido intersticial para llegar luego hasta sus células efectoras. Este fluido contiene además hormonas y factores producidos localmente y es el medio a través del cual se comunican bidireccionalmente los túbulos, las células de Leydig y otras células del intersticio [77,78].

Célula de LEYDIG. Historia.

La primera descripción histológica del tejido intratubular del testículo fue hecha por Leydig en 1850 [79], quien reportó que los espacios entre los tubos seminíferos se encontraban ocupados por masas conspicuas de células conteniendo vacuolas lipídicas y considerando a las células como una forma específica del tejido conectivo. Aunque Berthold [80] demostró que el testículo secretaba sustancias al torrente sanguíneo que influenciaban el crecimiento anatómico de tejidos distantes, la pregunta sobre cuál era el tejido responsable en el testículo que contribuía a esta secreción permaneció sin ser resuelto por muchos años.

Como consecuencia de la organización de las inclusiones lipídicas dentro de la célula de Leydig de varias especies, varios investigadores comenzaron a pensar en las gotas lipídicas contenidas en la célula de Leydig como las responsables de proveer el sustrato a partir del cual las hormonas del testículo eran sintetizadas. Y fueron los estudios de Bouin y Ancel [81-83], quienes concibieron el termino "*la glande interstitielle*", los que evidenciaron que las células de Leydig proveían del estímulo hormonal necesario para la producción de esperma y para el mantenimiento de las características sexuales secundarias. Posteriormente se demostró que las inclusiones lipídicas en las células de Leydig contenían ésteres de colesterol [84-86].

Finalmente la testosterona fue identificada de extractos lipídicos de testículo [87,88] y rápidamente sintetizada a partir del colesterol como material de partida [89,90].

Morfología de la célula de Leydig.

La estructura de la célula de Leydig muestra características comunes a todos los vertebrados, con algunas diferencias entre especies [91]. Es una célula poligonal, con un diámetro de 15-20 μm . Está rodeada por una membrana plasmática, la cual forma numerosos pliegues o microvelocidades. Presenta un núcleo grande, esférico u ovoide localizado en forma excéntrica, aunque no son raras las células binucleadas y uno, dos, o a veces, tres nucleolos excéntricos. El citoplasma de la célula de Leydig madura es usualmente abundante, finamente granuloso y acidófilo, el cual contiene gotas lipídicas, principalmente compuestas por ésteres de colesterol, microtúbulos y microfilamentos [92-95]. El rol funcional de las inclusiones lipídicas en las células de Leydig [91,96] se ha relacionado con la evidencia de que ellos representarían sitios de almacenamiento y/o síntesis de colesterol.

La célula de Leydig posee un número moderado de mitocondrias, su estructura ha sido bien descrita previamente [91,96,97] y el complejo de Golgi está bien desarrollado y comúnmente ubicado en un polo del núcleo. La organela citoplasmática más abundante es el retículo endoplasmático liso, característico de células esteroideogénicas y secretoras (Fig 9), el cual provee de los sitios de anclaje sobre su superficie para numerosas enzimas necesarias para una variedad de conversiones esteroideogénicas. Aproximadamente el 39% del volumen de la célula de Leydig se encuentra ocupado por esta organela, indicándose que posee una vasta superficie. Una gran diversidad en cuanto a su arquitectura ha sido indicada a partir de estudios sobre su ultraestructura [91,96].

Luego, las membranas del retículo endoplasmático liso aparecen como una vasta concentración de túbulos interconectados, para formar una malla que se extiende a lo largo de todo el citoplasma de la célula de Leydig. Estas membranas encierran un compartimiento separado del resto del citoplasma. La forma más común de los retículos endoplasmáticos consiste en túbulos interconectados al azar [98].

Hasta hace unos años la síntesis de andrógenos era considerada como la única función de la célula de Leydig. Sin embargo, actualmente se sabe que la célula de Leydig sintetiza otras sustancias bioactivas principalmente involucradas en la regulación parácrina y autócrina de la función testicular.

Las células de Leydig proveen varias hormonas y factores potencialmente activos: oxitocina [99] péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC)

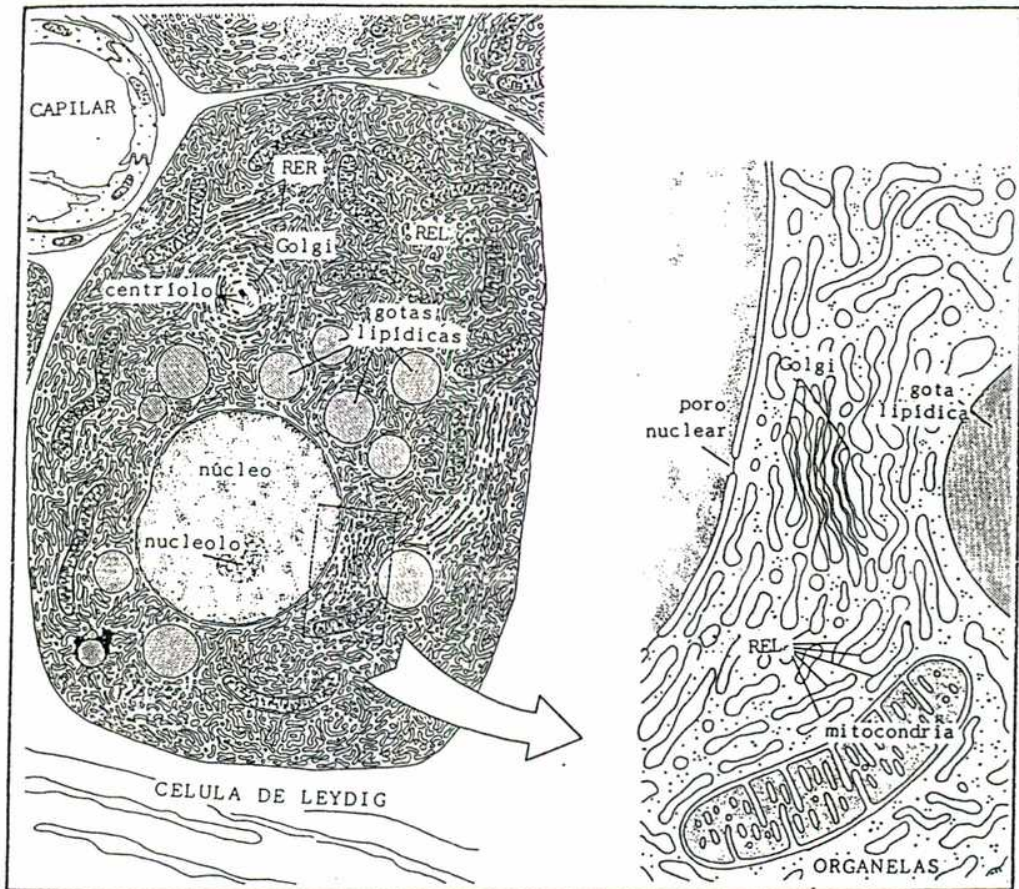


Figura 9: Esquema de la célula de Leydig.

La organela más importante es el retículo endoplasmático liso [REL], aunque también está presente, pero en mucho menor proporción, el retículo endoplasmático rugoso [RER]. En la ampliación de la derecha se observan algunas organelas con más detalle.

tales como hormona melanocito estimulante (MSH) y β -endorfina [100], prostaglandinas [101], leucotrienos [102], activina [103], renina/angiotensina [104,105] y factor liberador de corticotrofina (CRF) [106].

Células de Leydig MA-10.

La utilización de cultivos de líneas celulares de origen endocrino jugó un importante rol en la comprensión de los procesos involucrados en la biosíntesis hormonal y en la forma de acción de las hormonas [107-111]. Las células MA-10 [112] pertenecen a una línea clonal obtenida del cultivo de células de Leydig provenientes de un tumor denominado [M5480P] [113,114], que producen progesterona en lugar de testosterona como el principal producto esteroideo, cuando se las estimula con hCG, LH, o por análogos del AMPc.

Éstas células comparten muchas características con las células de Leydig normales. La principal ventaja de su utilización radica en el hecho de que generalmente las células tumorales son más fáciles de crecer en cultivo (Fig. 10), y que la población celular es generalmente homogénea.

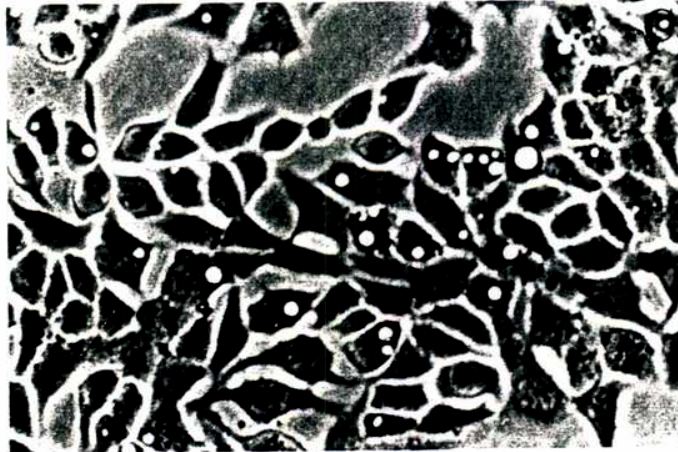


Figura 10: Células MA-10.

Microfotografía [contraste de fase (800 X)] de un cultivo de células de Leydig MA-10.

FUNCION ENDOCRINA DEL TESTICULO

ESTEROIDES TESTICULARES. ORGANIZACION Y REGULACION.

La función de las células de Leydig del testículo consiste en secretar andrógenos de una forma regulada. El principal mecanismo regulador consiste en la secreción de pulsos de hormona luteinizante (LH) por la adenohipófisis [115].

Los andrógenos son responsables del desarrollo y mantenimiento de la genitalia interna y externa, de las características sexuales secundarias, el desarrollo del sistema muscoesquelético, el feedback negativo del eje hipotálamo-hipofisario, y la estimulación de la espermiogénesis. Además los andrógenos estimulan otros tejidos como la piel y los riñones. Los principales esteroides secretados por el testículo son los andrógenos, y la testosterona es el andrógeno más importante [116,117].

Síntesis de andrógenos por las células de Leydig.

La síntesis de hormonas esteroideas requiere:

A)-de un sustrato, esto es, una fuente del sistema del anillo del esteroide

B)-de una serie de enzimas y cofactores, que juntos constituyen el camino biosintético.

La fuente inmediata que el sistema utiliza para la síntesis de hormonas esteroideas consiste en los depósitos de colesterol en el citoplasma [118]. El almacenamiento de colesterol se ha observado en las células de Leydig de varias especies en la forma de gotas lipídicas en el citoplasma [91]. Se realizaron muchos trabajos con el fin de determinar si el colesterol se sintetizaba en las células de Leydig o era llevado a las células por lipoproteínas, llegando a observarse que ambos mecanismos eran utilizados [119,120].

La contribución del colesterol del plasma para la síntesis de hormonas esteroideas proviene de lipoproteínas. En el caso de las células de Leydig MA-10, estas utilizan LDL (lipoproteínas de baja-densidad) como fuente de colesterol esteroideogénico [121]. El camino clásico de los receptores de LDL seguido de la acción de lisosomas hasta la obtención del colesterol se encuentra presente en este tipo de células. Durante la estimulación con gonadotrofina coriónica humana [hCG] más de la mitad del colesterol proveniente de LDL, y las reservas intracelulares de colesterol se consumen aproximadamente en 4 horas [121].

El camino en estas células es inusual debido a que el colesterol proveniente de LDL no inhibe la síntesis de colesterol a partir de acetato [121,122].

Las gotas lipídicas de las células de Leydig se consumen en función del tiempo al encontrarse la síntesis de andrógenos incrementada [91], de acuerdo con la idea de que los depósitos intracelulares de colesterol son utilizados durante la síntesis de andrógenos. El testículo posee una hidrolasa de ésteres de colesterol [CE], sensible al estímulo gonadotrófico [123] que, tal como ocurre en la glándula adrenal, interviene en la movilización del colesterol (Fig. 11) [124].

A partir de aquí muy poco es lo que se conoce acerca del camino biosintético de esteroides hasta la aparición del colesterol en la membrana interna de la mitocondria para la producción de pregnenolona.

El camino biosintético.

La síntesis de andrógenos involucra la conversión de colesterol a testosterona. Las reacciones enzimáticas requeridas para esta conversión se encuentran esquematizadas en la Figura 12. El camino biosintético comienza con la conversión del colesterol a pregnenolona (el clivaje de la cadena lateral C₂₇ se cataliza por un complejo enzimático [CSCC], dependiente de citocromo P-450), el cual tiene lugar en la mitocondria [125,126] en tres pasos: La clásica actividad de hidroxilación del P-450 se utiliza en los dos primeros pasos, y la unión C-C en cuyos carbonos se produjo la hidroxilación, sufre una ruptura para dar dos productos oxigenados.

A partir del hecho de que la enzima aparece homogénea en geles electroforéticos, y por ensayos de doble difusión utilizando anticuerpos anti la enzima se debería considerar que los tres pasos de la reacción se encuentran catalizados por una sola enzima [CSCC]. La importante familia de enzimas conocidas como P-450 se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza [127]. Estas enzimas utilizan oxígeno atmosférico o molecular, un átomo de este se une al sustrato en un grupo hidroxilo, mientras que el segundo se reduce a agua. A este tipo de oxidación se la denomina monooxidación, debido a que un solo átomo de oxígeno aparece en el producto. El grupo hidroxilo del producto reemplaza un hidrógeno en el sustrato.

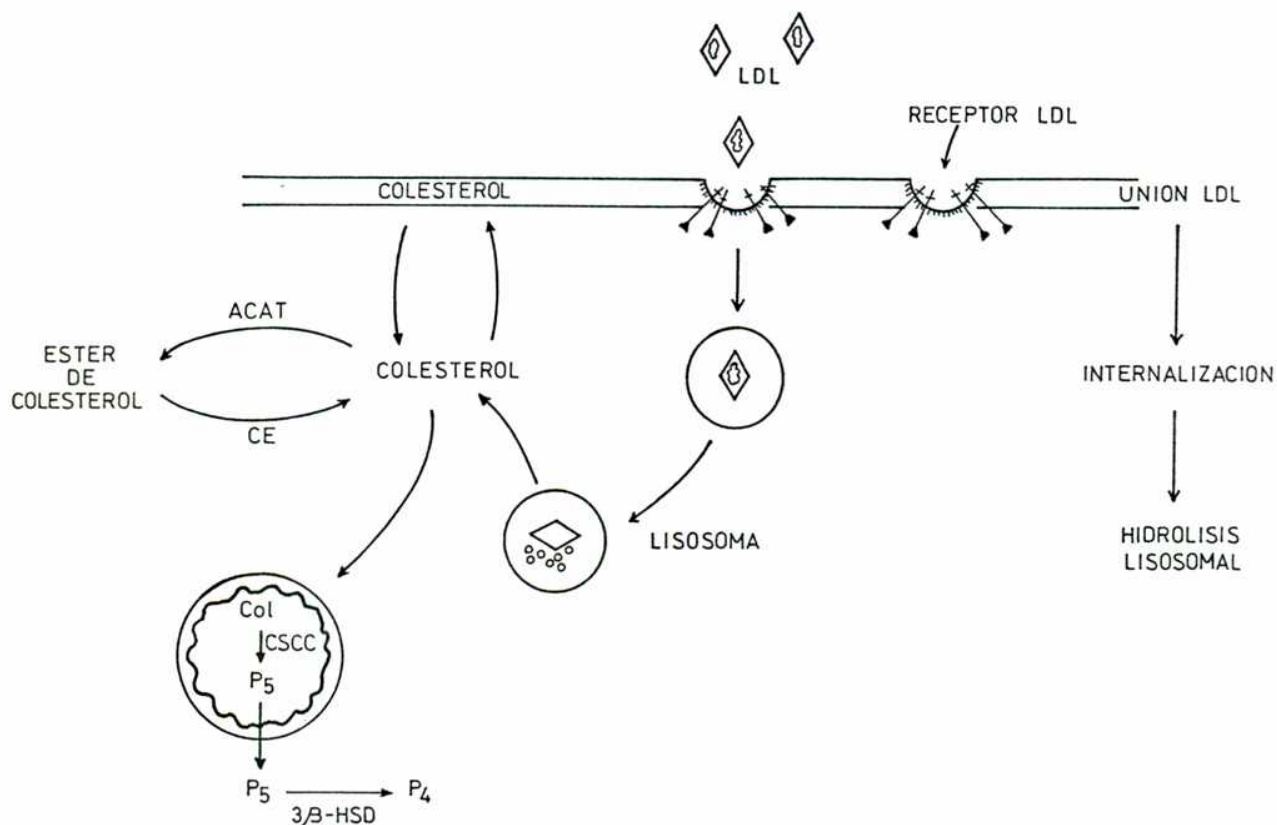


Figura 11: Transporte de colesterol.

El colesterol proveniente de la síntesis "*de novo*" o de la captación de lipoproteínas de baja densidad [LDL] se encuentra en la forma de colesterol libre, o en la forma de ésteres de colesterol. La interconversión se produce mediante la acción de dos enzimas: acil CoA colesterol aciltransferasa [ACAT] y colesterol esterasa [CE]. El colesterol libre se utiliza en la mitocondria para la síntesis de pregnenolona [P₅] mediante la acción de la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol [CSCC], y luego se convierte en progesterona [P₄] mediante la acción de la enzima 3β-hidroxi esteroide deshidrogenasa [3β-HSD].

El citocromo P-450 pertenece al grupo de las hemo-proteínas. La etapa limitante en la biosíntesis de testosterona es el paso de colesterol a pregnenolona. La formación de pregnenolona (y aldehído isocapróico) a partir de colesterol, comprende algunos metabolitos intermediarios que incluyen 20 α -hidroxicolesterol, 22 R-hidroxicolesterol y 20 α , 22 R-dihidroxicolesterol [128-131].

La pregnenolona formada sale de la mitocondria y pasa al compartimiento microsomal, donde se convierte en el sustrato de un complejo enzimático de membrana [17-20 liasa] semejante al [CSCC] [132] que convierte los esteroides de 21 átomos de carbono en andrógenos de 19 carbonos [133]. Esta conversión ocurre en dos pasos, primero un 17 α -hidroxilación seguida por la ruptura de la unión C 17-20.

En el compartimiento microsomal también se encuentra el sistema enzimático 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa [3 β -HSD] que convierte los anillos A y B de la pregnenolona a una estructura Δ 4-3 ceto: la *progesterona*.

Luego, la conversión de pregnenolona a androstenodiona en la fracción microsomal puede ocurrir por dos caminos, dependiendo del orden en que actúen los sistemas [3 β -HSD] y [17-20 liasa]. Cuando la [3 β -HSD] actúa primero sobre la pregnenolona y en segundo término el sistema [17-20 liasa] convierte la progesterona en androstenodiona, se habla del *camino de la progesterona* o camino Δ 4, cuando se invierte el orden de las reacciones se esta en presencia del *camino de la dehidroepiandrosterona* o Δ 5.

La elección del camino esteroidogénico no está librada al azar. Como puede verse hay varias alternativas posibles: la *vía Δ 5-intermediarios* (que involucra: pregnenolona, 17-hidroxi-pregnenolona, dehidroepiandrosterona y androstenodiol) y la *vía Δ 4-intermediarios* (progesterona, 17-hidroxiprogesterona y androstenodiona) [134-142]. La velocidad del metabolismo de la pregnenolona en el testículo a través de los caminos Δ 4 ó Δ 5, varía según las especies animales, y probablemente el camino metabólico que ocurre en condiciones fisiológicas en todas las especies incluye esteroides Δ 4 ó Δ 5.

Se ha descrito que la rata usa casi exclusivamente el camino Δ 4 [143,144] mientras que en el cerdo [145] conejo y perro se utiliza el camino Δ 5 en distintas proporciones. Teóricamente la preferencia de un camino sobre otro puede deberse a la afinidad relativa de cada enzima por sus distintos sustratos o a la disposición de las enzimas en las membranas.

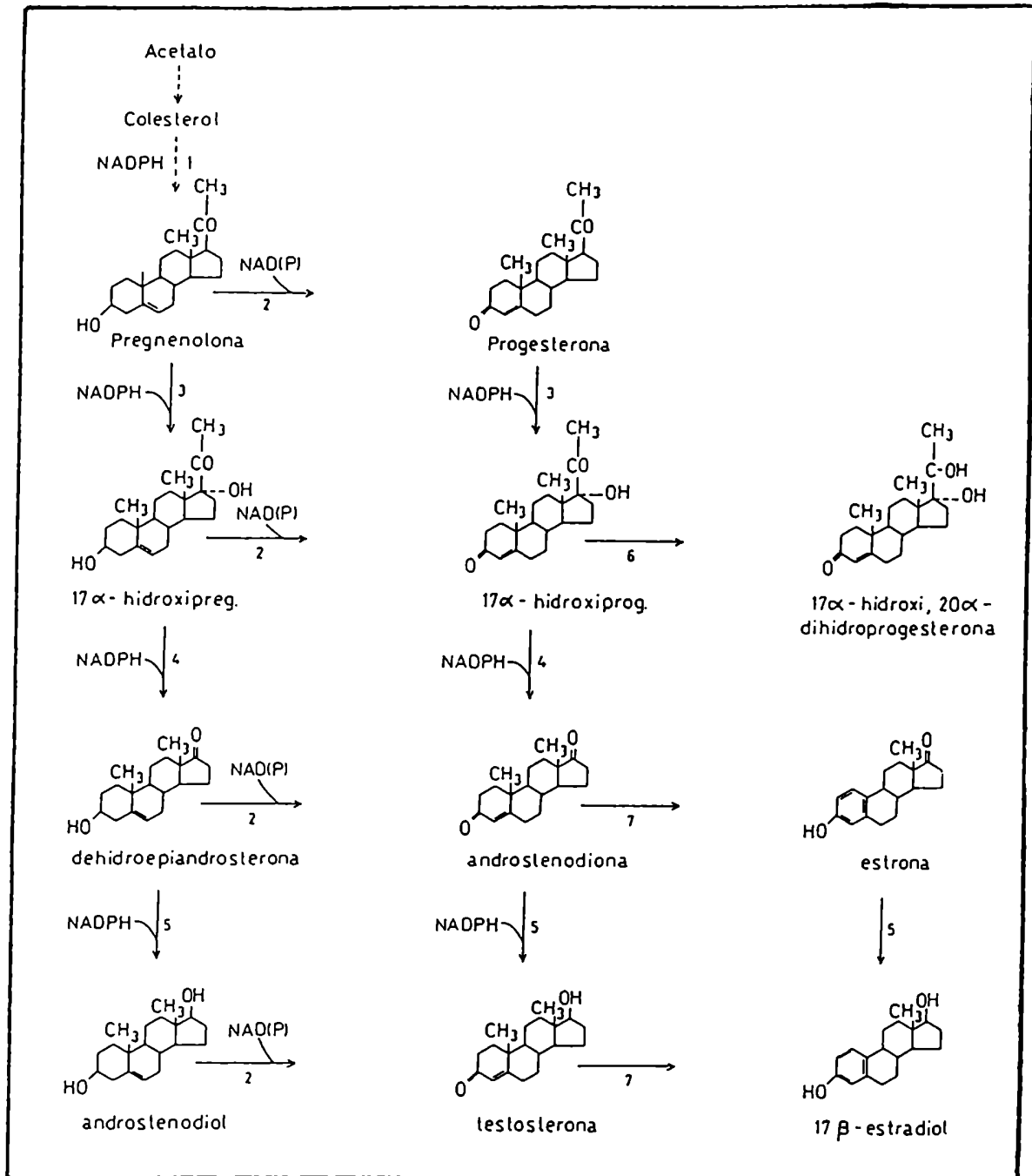


Figura 12: Pasos enzimáticos de la biosíntesis de esteroides testiculares.

1: complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol; 2: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3: 17α-hidroxilasa; 4: 17,20-liasa; 5: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 6: 20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 7: complejo de la aromatasa.

Estos dos sistemas enzimáticos comparten el mismo mecanismo para lograr el clivaje de los enlaces C-C pero difieren en su localización y en el número de pasos requeridos. El sistema [17-20 liasa] requiere de solo dos pasos ya que el sustrato ya está oxigenado en la posición 20 mientras que el sistema [CSCC] requiere de dos hidroxilaciones contiguas para luego escindir la cadena lateral.

En el siguiente paso, la enzima microsomal 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa cataliza la interconversión de androstenediona al andrógeno más importante, testosterona. Esta enzima muestra la propiedad inusual de activación por producto, la testosterona promueve la formación de testosterona a partir de androstenediona y androstenediona hace lo mismo a partir de testosterona [146]. La reacción catalizada por la enzima es reversible y posee dos sitios de unión [147]. El testículo de animales inmaduros y púberes sintetiza, además de testosterona, varios metabolitos 5 α -reducidos, siendo el 3 α -androstanoediol (3 α -diol) el más abundante [148].

Las células MA-10 poseen una deficiencia en la actividad de la enzima 17 α -hidroxilasa por lo que el principal esteroide producido es progesterona. Sin embargo poseen una pequeña actividad de 20 α -hidroxilasa que hace que la progesterona producida lentamente se metabolice a 20-hidroxiprogesterona.

Regulación de la síntesis de andrógenos por la hormona luteinizante.

La regulación fisiológica más importante en la síntesis de andrógenos testiculares se ejerce por la adenohipófisis a través de la secreción pulsátil de la hormona luteinizante [LH]. El efecto de la LH sobre la célula de Leydig ha sido ampliamente utilizado como modelo para el estudio del mecanismo de acción de las hormonas protéicas sobre sus órganos efectores.

En los últimos años, se ha demostrado que la mayoría de las células utilizan un número limitado de mecanismos moleculares. Cuando una célula responde a un estímulo lo hace mediante la alteración de las propiedades o la velocidad de síntesis de proteínas preexistentes o iniciando la síntesis de nuevas proteínas. Los mensajeros intracelulares y los cambios que ellos producen en las proteínas intracelulares modifican las funciones de varios componentes celulares, los que a su vez, proveen la respuesta al estímulo original.

En el caso particular de la célula de Leydig el mecanismo desencadenado por la unión de la LH a sus receptores específicos de membrana ha sido extensamente estudiado [116,149,150]. El principal segundo mensajero que ha sido descubierto (el AMPc) produce cambios en las proteínas intracelulares que modifican las funciones de varios componentes de la célula, quienes son los encargados de responder al estímulo.

ROLES DE LOS COMPONENTES DE LA CELULA DE LEYDIG

Receptor LH.

Los receptores ubicados en la membrana plasmática de las células de Leydig [151] pueden unir a LH y hCG con alta afinidad ($K_a 10^{10} M^{-1}$), por lo que se los conoce como receptores LH/hCG. Cada célula de Leydig en la rata contiene aproximadamente 20.000 receptores, y el testículo puede unir aproximadamente 1pmol LH/g de tejido húmedo [152].

Sólo necesitan ser ocupados el 1% del total de sitios receptores para dar la máxima respuesta esteroideogénica. La función del gran exceso de sitios denominados "*receptores de repuesto*" no se conoce, y se postuló que pueden favorecer la interacción del complejo *hormona-receptor* a bajas concentraciones de ligando y además proveer de sitios de reserva para reemplazar a aquellos utilizados o procesados como consecuencia de la unión de hormona endógena durante el control fisiológico de la secreción de esteroides.

El mensaje llevado por la LH se transmite a través de su receptor en la membrana plasmática hacia el interior celular por medio de la estimulación del complejo enzimático adenilil ciclasa, dando como resultado un incremento en la formación de AMP cíclico a partir de ATP.

Adenilil ciclasa-rol del AMP cíclico.

Se conoce desde hace tiempo que el AMP cíclico acelera la síntesis de andrógenos en las células de Leydig [153] y que la hormona luteinizante [LH] incrementa los niveles de AMP cíclico en estas células [154-156]. En vista de la gran evidencia que el AMPc media las acciones de varias hormonas, se ha concluido que las respuestas de las células de Leydig a [LH] y [hCG] resultan en un incremento en la producción de AMPc como resultado de la activación de su receptor.

El AMPc formado se une a la subunidad regulatoria de una proteína quinasa [PKA] (dependiente de AMPc) causando la liberación de una subunidad catalítica activa. Así, la PKA activada cataliza la fosforilación de proteínas intracelulares que intervienen en la síntesis de esteroides [157]. Una de las proteínas afectadas por este tipo de modificación postraduccional es una enzima que interviene en el ciclo de los ésteres de colesterol, la hidrolasa de ésteres de colesterol [CE] cuya actividad aumenta por fosforilación.

Este mecanismo se detiene al degradarse el AMPc por acción de una fosfodiesterasa. La estimulación de la esteroidogénesis por [LH] en células de Leydig se puede reproducir al utilizar activadores de la adenilil ciclase y por análogos del AMPc, y es además potenciada por inhibidores de la fosfodiesterasa como la isometilxantina [MIX]. Estas evidencias experimentales permitieron postular al AMPc como segundo mensajero en la acción de la LH. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de mensajeros alternativos.

Si bien el camino de la adenilil ciclase-proteínas quinasas en la estimulación de la esteroidogénesis en las células de Leydig está bien establecido, no puede excluirse la existencia de otras respuestas rápidas, particularmente a nivel de la membrana plasmática. Procesos tales como cambios en el flujo iónico transmembrana y en la distribución de calcio y alteraciones en el metabolismo y recambio de fosfolípidos, podrían ser parte de los mecanismos desencadenados por la [LH] en su célula efectora. Además de la [LH], la prolactina [PRL] y probablemente la ACTH también determinan el estado funcional de las células de Leydig [158-160].

Regulación de la formación de AMP cíclico.

Para comprender el mecanismo a través del cual el receptor hormonal ocupado estimula la formación de AMP cíclico por el sistema adenilil ciclase, se requiere previamente entender las propiedades estructurales y funcionales de este sistema (Fig. 13).

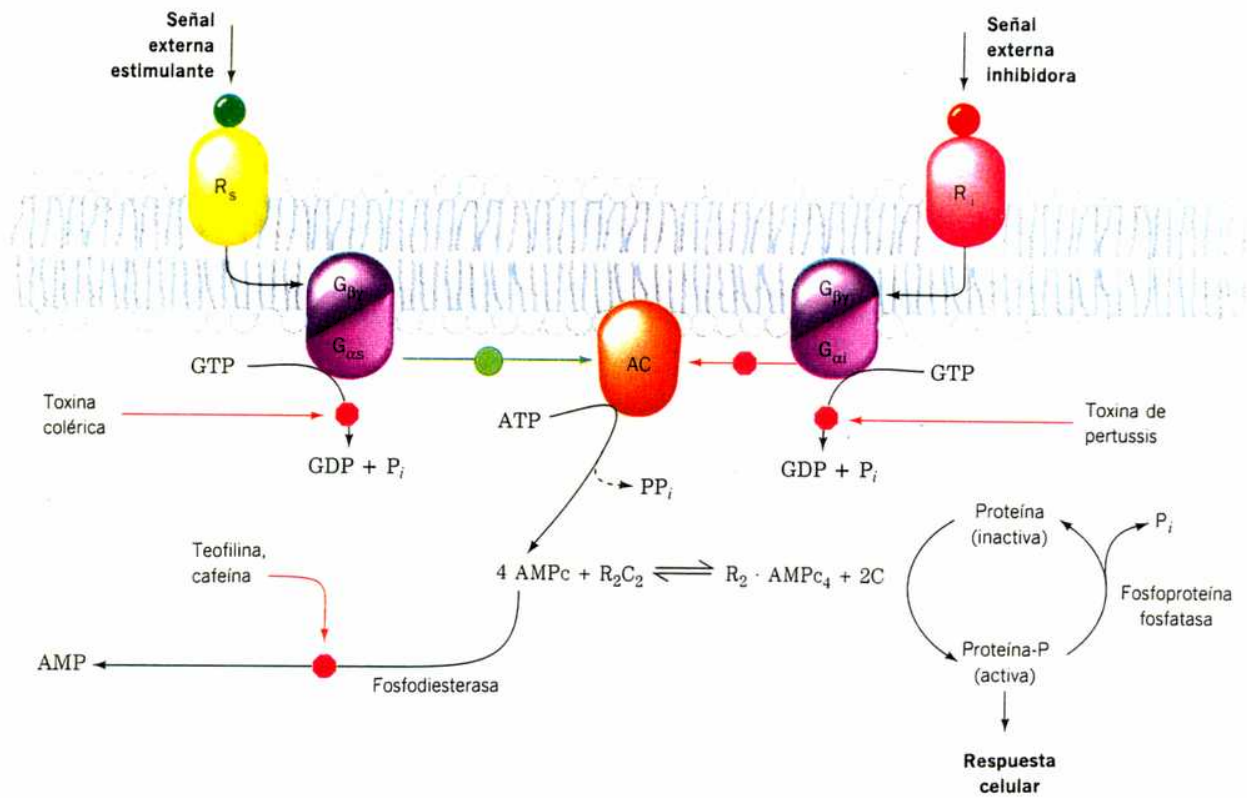


Figura 13: Componentes del sistema adenilil-ciclasa.

La adenilil-ciclasa es la responsable por la conversión de ATP a AMPc. Al activarse el receptor estimulador *Rs* se produce la disociación de la subunidad "G α s" y un aumento en la actividad de la adenilil ciclasa. Al activarse el receptor inhibitorio *Ri* se produce la disociación de la subunidad "G α i" y una disminución en la actividad de la adenilil ciclasa.

Entre el proceso de ocupación del receptor y el aumento de la actividad catalítica existen proteínas transductoras de la señal hormonal, generalmente conocidas como proteínas "G". Cada una de estas proteínas tienen la propiedad de unir Mg y *nucleótidos de guanina* [GTP] como cofactores.

Sin embargo mientras que una de estas proteínas, conocida como G estimuladora "Gs" [161,162] es responsable por mediar de una forma dependiente de Mg y GTP, el efecto de los receptores hormonales *estimuladores*, la otra, conocida como proteína G inhibitoria "Gi" [163] media de forma Mg y GTP dependiente, el efecto de los receptores hormonales *inhibitorios* [164,165]. En realidad el sistema de la *Adenilil Ciclasa* al cual los receptores se acoplan sería mejor descripto como un "sistema de tres componentes", formado por la subunidad catalítica adenilil ciclasa "C", la cual forma AMP cíclico y MgPPi a partir del sustrato MgATP, y las proteínas "Gs" y "Gi".

La forma de acción del receptor de LH (receptor estimulador) afecta únicamente a las proteínas "Gs". Ambas proteínas "G" han sido purificadas [162,166-168], y aunque diferentes son bastante similares. Se encuentran formadas por tres subunidades diferentes denominadas α , β y γ [168], ambas unen GTP y sus análogos [167,169], son sustratos de ADP-ribosiltransferasas de toxinas bacterianas [166,167,170] ambas interactúan con Mg [171,172] y poseen actividad de GTPasas [164,173] (Fig. 14).

Poseen un peso molecular cercano a 100.000 KD y ambas proteínas al unir Mg y un análogo de GTP no hidrolizable y activarse, como ser GNP-P(NH)P o GTP γ S sufren una disociación para dar la subunidad α de la proteína "Gs" o "Gi" unida al nucleótido de guanina por un lado [168,174-177], y lo que parece ser un complejo de las subunidades $\beta\gamma$ por el otro.

La subunidad α_s se ADP-ribosila por la toxina del cólera [178-182], mientras que la α_i se ADP-ribosila por la toxina pertussis [183-185]. La presencia del complejo adenilil ciclasa que responde a LH ha sido bien descripto en células de la granulosa, en células luteales y en las células de Leydig [186-188].

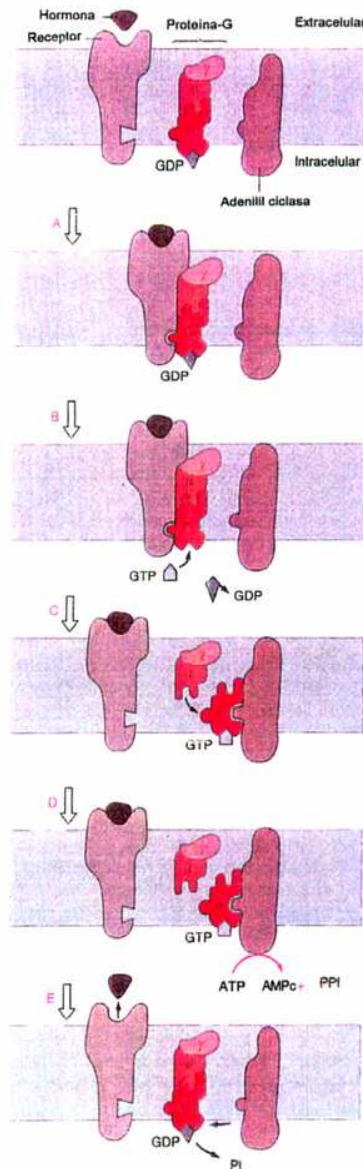


Figura 14: Regulación de la formación de AMPc.

La unión hormona-receptor produce la activación de este último, el cual a su vez se une a una proteína "G" inactiva. La proteína "G" intercambia GDP por GTP y se disocia en las subunidades " $G\alpha$ " y " $G\beta\gamma$ ". La subunidad " $G\alpha$ " es la que se une al componente catalítico *adenilil ciclasa*, activándola e incrementando de esta forma la conversión de ATP a AMPc. Cuando el GTP se hidroliza a GDP las subunidades " $G\alpha$ " y " $G\beta\gamma$ " se reasocian nuevamente permaneciendo inactivas hasta iniciar un nuevo ciclo.

Fuentes de colesterol para la síntesis esteroidea.

Existen 3 tejidos de mamíferos: adrenales, ovarios y testículos, en donde la biosíntesis de esteroides se encuentra incrementada por hormonas polipeptídicas (adrenocorticotrofina, LH y hCG). Cuando se estimula la esteroidogénesis, el incremento en la demanda de colesterol se puede suplir utilizando uno o más de las siguientes fuentes: a) reservas intracelulares de colesterol y ésteres de colesterol, b) síntesis "*de novo*" c) lipoproteínas [189].

Para realizar esto, el colesterol debe movilizarse de sus sitios de almacenamiento o síntesis hacia el sitio mitocondrial donde se encuentra la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol [CSCC] [190].

Las células tumorales de Leydig MA-10 utilizan las reservas de colesterol libre y esterificado como sustratos para la síntesis de hormonas esteroideas [121,189-192]. Estas reservas constituyen la fuente más importante de sustrato para mantener la esteroidogénesis por períodos de tiempo cortos (0-4 h) [189] y se puede relacionar con el incremento en la formación de progesterona [190]. El colesterol libre utilizado para la esteroidogénesis proviene predominantemente de la membrana plasmática [192,193]. El colesterol de la membrana plasmática de células estimuladas disminuye por dos razones:

A) la primera consiste en que el transporte hacia esta membrana en células estimuladas se encuentra alterado. Las células sintetizando hormonas esteroideas dirigen el colesterol sintetizado *de novo* o de lipoproteínas hacia el camino biosintético [194].

B) la estimulación hormonal de las células induce la internalización del colesterol de la membrana plasmática.

Todas las alteraciones en el movimiento del colesterol en células que sintetizan esteroides parecen ser consecuencia de la utilización del colesterol para la esteroidogénesis. Recientemente se han descrito otros mecanismos que inducen la internalización del colesterol que se halla situado en la membrana plasmática [195,196]. Las células de Leydig MA-10 difieren de las células adrenales y luteales normales de rata en cuanto a la forma en la que almacenan el colesterol intracelular.

Mientras que las últimas poseen de 3 a 10 veces más colesterol esterificado que libre [197,198] las células de Leydig MA-10 [112] poseen de 3-4 veces más colesterol libre que esterificado. La incubación de las células MA-10 con concentraciones saturantes de hCG causan una rápida reducción en las reservas celulares de colesterol libre y esterificado, luego la demanda de colesterol se suple por un incremento en la síntesis *de novo* del colesterol.

Debido a que los derivados hidroxilados del colesterol atraviesan rápidamente las membranas celulares y producen un incremento en la producción de progesterona similar al obtenido mediante la utilización de hormonas tróficas [190,199] se ha postulado que la traslocación del colesterol a través de la membrana mitocondrial está controlado por hormonas.

Regulación del ciclo de los ésteres de colesterol en las células MA-10.

Las células tumorales de Leydig MA-10 toman LDL del medio de cultivo y lo almacenan como ésteres de colesterol intracelulares, que pueden ser movilizados y utilizados posteriormente para la síntesis de hormonas esteroideas. La concentración de los ésteres de colesterol intracelulares se encuentra en un estado de equilibrio dinámico mediante la actividad de 2 enzimas. Una de ellas es la colesterol esterasa [CE] que se encarga de hidrolizar a los ésteres de colesterol, y la otra la acil-Coenzima A colesterol aciltransferasa [ACAT] que se encarga de esterificar al colesterol libre. Ambas enzimas se encuentran en equilibrio conformando el llamado ciclo de los ésteres de colesterol.

Una de las acciones más importantes del AMP cíclico consiste en incrementar la actividad enzimática tanto de la [CE] como de la [ACAT], lo que a su vez resulta en un incremento del "*turnover*" del ciclo de los ésteres de colesterol. El incremento en la actividad de la [CE] [200-202] se produce mediante la fosforilación realizada por una proteína quinasa activada por AMPc [124,203]. La estimulación de células esteroideogénicas por hormonas tróficas resulta en una disminución de aproximadamente el 82% de los ésteres de colesterol [189,200-202] como consecuencia de la utilización del colesterol libre, que es sustrato de la ACAT, en el camino biosintético de las hormonas esteroideas.

Biosíntesis de colesterol en células esteroideogénicas.

Los tejidos que se sabe son capaces de sintetizar colesterol incluyen al hígado, corteza adrenal, piel, intestino, testículos y aorta. La fracción microsomal de la célula es responsable de la síntesis de colesterol. La acetil-CoA es la fuente de todos los átomos de carbono en el colesterol. La manera como se sintetiza esta molécula compleja ha sido el tema de investigación de muchos científicos, con el resultado de que en la actualidad es posible trazar en un diagrama el origen de todas las partes de la molécula de colesterol (Fig. 15).

El proceso de síntesis se realiza en varias etapas. La primera de éstas consiste en la síntesis del mevalonato, un compuesto de seis átomos de carbono, a partir de la acetil-CoA. La siguiente etapa importante es la formación de unidades isoprenoides a partir del mevalonato, por la pérdida de CO₂. Las unidades isoprenoides pueden ser consideradas como los bloques de construcción del esqueleto del esteroide. Seis de estas unidades se condensan para formar un intermediario, el escualeno, el cual a su vez da origen al esteroide progenitor lanosterol. El colesterol se forma del lanosterol después de varios pasos posteriores, incluyendo la pérdida de tres grupos metilo.

La vía para la formación de mevalonato, implica al intermediario hidroximetil glutaril coenzima A [HMG-CoA]. Aunque se han propuesto otras vías, se considera que la vía a través de la HMG-CoA es cuantitativamente más significativa. La HMG-CoA es convertida en mevalonato en una reducción por el NADPH en dos etapas, catalizada por la [HMG-CoA] reductasa. En el segundo estadio, el mevalonato es fosforilado por el ATP para formar varios intermediarios fosforilados activos. Por medio de una descarboxilación, se forma la unidad isoprenoide activa, el isopentenilpirofosfato. El siguiente estadio implica la condensación de moléculas de isopentenilpirofosfato para formar farnesilpirofosfato. Esto ocurre por la vía de una isomerización del isopentenilpirofosfato que implica un cambio de la doble ligadura para formar kumetilalilpirofosfato, seguido muy probablemente por condensación con otra molécula de isopentenilpirofosfato para formar el intermediario de diez carbonos, el geranilpirofosfato.

Una condensación posterior con isopentenilpirofosfato forma el farnesilpirofosfato (precursor también de la hormona juvenil). Dos moléculas de este último intermediario se condensan en una reacción que involucra una reducción con NADPH con la eliminación de radicales de pirofosfato dando como compuesto resultante el escualeno.

El escualeno tiene una estructura que semeja al núcleo esteroide. Este es convertido en lanosterol por ciclación. Antes que ocurra el cierre, el grupo *0 metilo* en el C-14 es transferido al C-13 y aquél del C-8 al C-14 y luego el C-3 es hidroxilado.

El último estadio, la formación del colesterol a partir del lanosterol, implica cambios en el núcleo esteroide y la cadena lateral. El grupo metilo en el C-14 es oxidado a CO₂ para formar el 14-dimetil lanosterol. De la misma forma, dos grupos metilos más en el C-4 son removidos para producir zimosterol. El Δ⁷, 24-colestadienol se forma a partir del zimosterol, por el doble enlace entre C-8 y C-9, que se mueve a la posición entre C-8 y C-7. El desmosterol se forma en este punto por otro desplazamiento del doble enlace en el anillo II para tomar la posición entre C-5 y C-6, como en el colesterol. Finalmente, se produce el colesterol cuando se reduce el doble enlace de la cadena lateral [204].

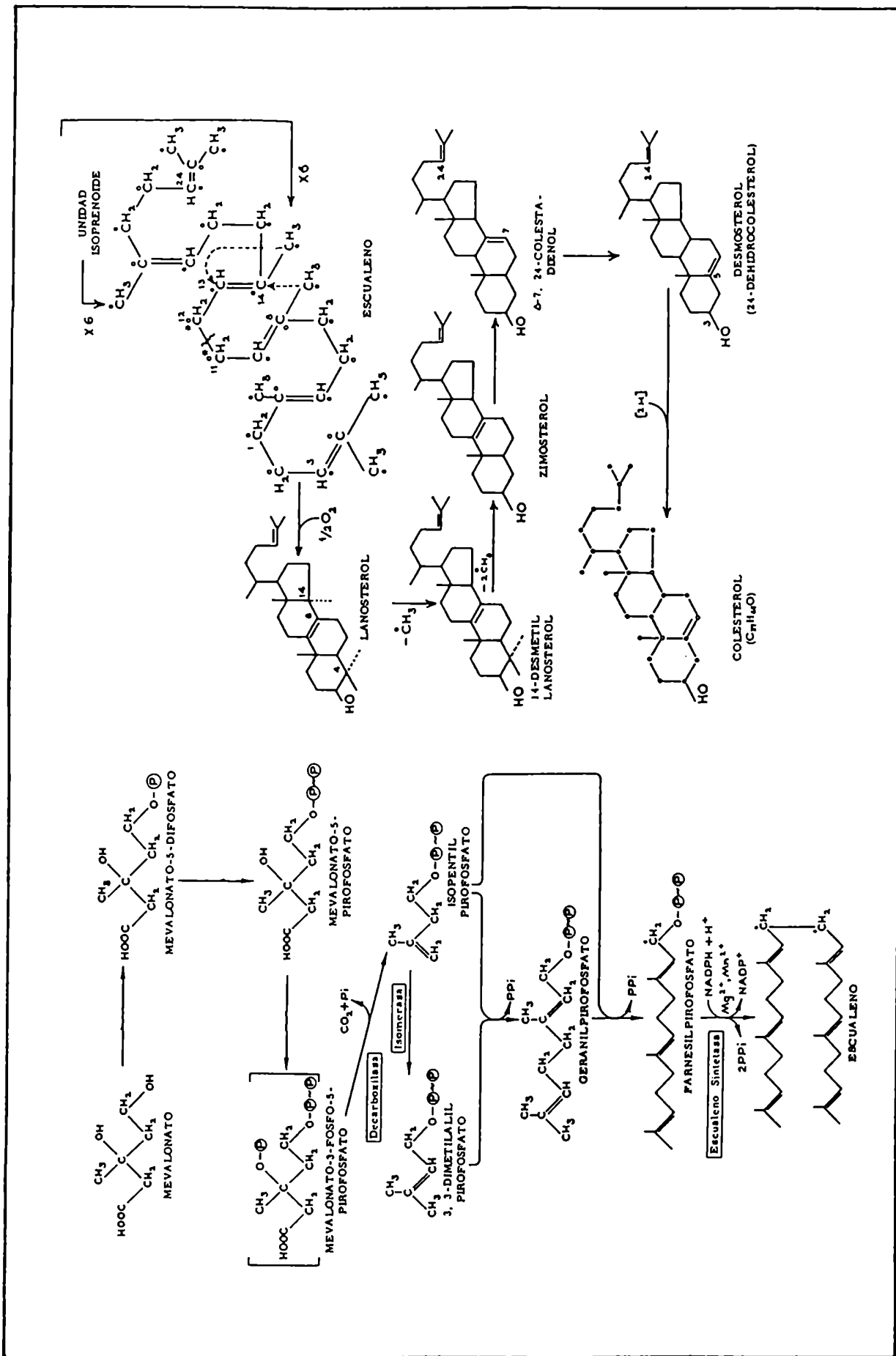


Figura 15: Camino biosintético del colesterol.

OBJETIVOS

Se ha mencionado la similitud que poseen los caminos que conducen a la síntesis de la hormona juvenil en insectos y a compuestos como el colesterol en mamíferos. El principal objetivo de este trabajo fue determinar como la presencia de la hormona juvenil de insectos alteraba la respuesta esteroidogénica en cultivos de células de mamíferos.

Los objetivos parciales que se plantearon para estudiar el efecto de la hormona juvenil III o alguno de sus análogos sintéticos fueron los siguientes:

- Estudio de la respuesta esteroidogénica en células tumorales de Leydig MA-10.
- Determinación de la influencia de la variación de los tiempos de incubación, tiempos de preincubación, concentración de estímulos gonadotróficos sobre la producción esteroidogénica.
- Determinación de la producción del segundo mensajero AMPc.
- Análisis de la unión de la hormona hCG a su receptor.
- Determinación de la actividad de las diferentes proteínas que componen al sistema adenilil ciclasa (proteína "Gs", proteína "Gi", adenilil ciclasa).
- Análisis de la actividad de enzimas pertenecientes al camino biosintético de progesterona [CSCC] y [3 β -HSD].
- Estudio de la internalización del colesterol y su utilización en la síntesis esteroidogénica.
- Determinación de la actividad del ciclo de los ésteres de colesterol.
- Análisis de la síntesis "*de novo*" de colesterol.
- Determinación de la respuesta esteroidogénica en células de Leydig normales.

MATERIALES Y METODOS

Materiales.

Progesterona, 20α -hidroxiprogen-4-ene-3-ona, pregnenolona, HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etansulfónico], albúmina sérica bovina grado radioinmunoanálisis [BSA], 3-isobutil-1-metil-xantina [MIX], toxina del cólera, toxina pertussis, forskolina, hormona juvenil III, carbón activado, anhídrido acético, trietilamina, colesterol, 25-hidroxi-colesterol, 20-hidroxi-colesterol, colesterol oleato, aminoglutetimida [AG], cianocetona [CC], AMPc, dibutilil AMPc [Bt₂AMPc], tirosil metil éster de succinil AMPc [TME-SA], fueron obtenidos de Sigma Chemical Col. (St. Louis, MO, U.S.A.).

La gonadotropina hCG fue provista por el National Institute of Health, [Bethesda, MD, USA] (partida CR 127). La colagenasa tipo CLS II (125 UI/mg) fue de Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ, USA). Las placas de sílica para cromatografía en capa delgada [Eastman Kodak] fueron obtenidos de Fisher Scientific Co.

[1,2,6,7-³H]-progesterona (80,2 Ci/mmol), [7-³H]-pregnenolona, [1,2,6,7-³H]-colesterol (71,4 Ci/mmol), [26-¹⁴C]-colesterol (54 Ci/mmol), and [26-¹⁴C]-colesterol oleato (54 Ci/mmol), [α -³²P]ATP (50-200 cpm/pmol), 5'-[γ -[³⁵S] guanosina trifosfato, (1500 Ci/mmol) fueron adquiridos de New England Nuclear (Boston, MA, USA).

El material de cultivo fue de Corning o Falcon. Tripsina, suero de caballo, medio Waymouth's MB 752/1 y Medio 199 fueron de Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA). Los análogos de la hormona juvenil fueron sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y gentilmente cedidos por el Dr. J.B. Rodriguez y Dr. E.Gros.

El anticuerpo anti-progesterona hecho en conejo fue gentilmente donado por el Dr. Leonardo Bussmann. El anticuerpo anti-AMPc fue de Chemicon International (U.S.A.). Todo otro reactivo utilizado fue de grado analítico.

Células MA-10.

Se utilizaron las células de Leydig murinas denominadas MA-10 [112] provistas por el Doctor Mario Ascoli, del Departamento de Farmacología, de la Universidad de Iowa, USA. Aunque estas son células malignas cuyo producto esteroide más abundante es progesterona, tienen un complemento normal de receptores de LH/hCG funcionales. Esta característica, sumada al hecho de trabajar con una línea celular clonal permanente, hacen de las células MA-10 un modelo experimental de gran utilidad.

Desde el punto de vista funcional, las células MA-10 también tienen la ventaja de que la activación de la esteroidogénesis por LH/hCG es mucho más pronunciada que en las células de Leydig normales (MA-10: 500 veces de estimulación sobre los valores basales; Leydig normales: 1-10 veces).

Cultivo celular.

Se utilizaron las condiciones descritas por M. Ascoli para el cultivo de las células MA-10 [112,205]. Estas se sembraron en placas de plástico de 24 pozos a una densidad de 75.000 células/pozo, o en placas de 6 pozos 250.000 células/pozo, y se crecieron durante 3 días en un medio de cultivo (Waymouth's 752/1, HEPES 20mM, NaHCO₃ 1,2 g/l, pH 7,4) suplementado con 15% de suero de caballo. Luego las células se lavaron, e incubaron en un medio de cultivo, en donde el suero de caballo se reemplazó por BSA 0,1%, y al cual se agregaron los factores a estudiar. hCG, Bt₂AMPc, la toxina del cólera, la toxina pertussis, se agregaron en un buffer [PBS] (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM), mientras que la forskolina se disolvió en etanol absoluto.

La hormona juvenil III y los análogos de la [HJ] se disolvieron en etanol, y se agregaron al medio de incubacion en una relación 1/100 del volumen final.

Las células se incubaron en una cámara de cultivo por 4 horas a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire.

Luego de la incubación, el medio de cultivo se removió e hirvió durante 5 minutos para inactivar a la fosfodieterasa. Luego de una centrifugación a 1000 r.p.m., los sobrenadantes se guardaron a -20°C para las determinaciones que correspondieran.

Preparación de membranas.

El siguiente método fue utilizado para obtener una preparación de membranas de células de Leydig. Se partió de un frasco Falcon de 75 cm² de superficie con células MA-10 crecidas a confluencia. El medio de cultivo se descartó y las células se lavaron 3 veces con un buffer [PBS] (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5mM). Se agregó durante 1 minuto una solución de tripsina, y luego de descartada las células se incubaron durante 3 minutos para completar la tripsinización. Este procedimiento permitía resuspender las células, y continuar el cultivo de la línea tumoral; en este caso se resuspendieron en 10 ml de medio Waymouth's con BSA 1% y se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos.

El "*pellet*" de células se resuspendió en 2 ml de una solución NaHCO₃ 1mM, EDTA 1mM y mercaptoetanol 1mM, y se rompieron utilizando un oscilador de ultrasonido. El homogenato se centrifugó a 7.000 g durante 10 minutos, y el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 g durante 60 minutos. El "*pellet*" obtenido se utilizaría posteriormente como la preparación de membrana.

Obtención de [¹²⁵I]-hCG.

La marcación de la hormona hCG se realizó en el laboratorio, mediante el método de la cloramina T limitante [206]. Todos los reactivos fueron agregados en forma consecutiva de acuerdo con la siguiente proporción: 5 µl de una solución (0,006%) de cloramina T a 20 µl de buffer fosfato 0,05M (pH 7,4) conteniendo 1mCi de [¹²⁵I]-NaI y 20 µg de hCG.

La iodinación se detuvo cuando la actividad específica, determinada luego de precipitar una alícuota con TCA, fue de aproximadamente 150 µCi/µg. La mezcla de iodinación se diluyó con buffer fosfato 0,05 M y transferida a una columna de Sephadex G-50 (0,9x10 cm.) previamente equilibrada con Na₃PO₄ 0,05M, NaCl 0,1M, azida sódica 0,02%, BSA 0,2%, pH 7,4. Una vez separado el pico hormonal del de iodo libre, la fracción correspondiente a la hormona, se dividió en alícuotas que se guardaron congeladas a -70°C para su posterior utilización.

Obtención del nucleótido marcado [¹²⁵I]-AMPc.

Se partió del tirosil metil éster de succinil AMPc [TME-SA]. Se mezcló 1 nmol (0,6 µg) del derivado [TME-SA] contenido en 10 µl de agua con 2 mCi de [¹²⁵I]-NaI contenido en 5 µl de una solución de NaOH 0,1 N y con 25 µl de una solución de fosfato de potasio 0,5 M, pH 6,5. Luego se agregaron 10 µl de cloramina T (3 mg/ml de agua) que se preparó en el momento. La mezcla se agitó inmediatamente (vortex) y el producto de reacción se purificó por TLC en placas de celulosa usando una mezcla de 1-butanol/ácido acético glacial/agua (12:3:5) como solvente de desarrollo.

El derivado radioactivo tuvo un frente de referencia [Rf] de 0,6 y se eluyó de la celulosa con agua. Por último se dividió en alícuotas y se guardó a -70°C. Así guardado podía utilizarse hasta por lo menos 5 meses después. La eficiencia de la marcación fué de un 50 %.

Ensayo de unión de hCG a su receptor.

La interacción entre la hormona hCG y su receptor se estudió sobre la base de la unión de cantidades variables de [¹²⁵I]-hCG a membranas de células MA-10. La mezcla de reacción contenía 100 µl de la fracción receptora (3mg de proteínas/ml), cantidades crecientes (20.000-200.000 c.p.m.) de [¹²⁵I]-hCG (actividad específica de 50 µCi/µg) en un volumen de 50 µl y según correspondiera 50 µl de hormona no marcada para determinar la unión no específica. El volumen final de reacción de 500 µl se completó con un buffer [PBS]- BSA 0,2%.

Luego de incubar las membranas durante toda una noche a temperatura ambiente, el experimento se detuvo por el agregado de 2 ml de [PBS]- 0,2% BSA frío, conteniendo 1mg/ml de celite. Luego de centrifugar los tubos a 2000 g durante 10 minutos, la fracción sobrenadante se removió por aspiración, y la radioactividad del precipitado se determinó utilizando un contador Beckman Gamma 4000.

Los resultados se analizaron por el método de Scatchard [207] para determinar el número total y la constante de disociación de los sitios de unión de hCG.

Ensayo de unión de GTP.

La unión específica de GTP a membranas de células de Leydig MA-10 se determinó utilizando una modificación del método descrito por Northup [169]. Las muestras conteniendo 30-50 μg de proteínas de membrana se incubaron durante 30 minutos a 30°C en 200 μl de un buffer [Tris-HCl 50mM (pH 8,0), EDTA 1mM, DTT 1mM], con 30 nCi de [^{35}S]GTP γ S (actividad específica de 1500 Ci/mmol).

Para determinar la unión no específica se realizó un ensayo en paralelo en presencia de un exceso de 100 veces de GTP γ S no marcado.

Al finalizar la incubación el [^{35}S]GTP γ S unido a las proteínas de membrana fue separado del [^{35}S]GTP γ S libre mediante un rápido método de filtrado a través de una membrana Millipore HA de 0,45 μM de poro, y la radioactividad determinada en un contador Beckman Gamma 4000.

Ensayo de actividad de adenilil ciclasa.

La actividad de la adenilil ciclasa se determinó de acuerdo al método de Salomon [208]. Las membranas de las células MA-10 se incubaron en una solución conteniendo buffer Tris-ClH 50mM (pH 7,4), MLX 0,2mM, Cl_2Mg 2,5mM, α -[^{32}P]ATP (actividad específica 50-200 cpm/pmol) 0,5mM, fosfoenol piruvato 2mM y piruvato kinasa 20 μg .

Las incubaciones se iniciaron por la adición de 50 μl de membranas (50-70 μg de proteínas) y se continuaron durante 15 minutos a 30°C en un volumen total de 100 μl . La reacción se detuvo por el agregado de una solución conteniendo un exceso de ATP no marcado. El [^{32}P]AMPc sintetizado se separó del [^{32}P]ATP, y la radioactividad correspondiente al [^{32}P]AMPc se determinó en un contador Beckman Gamma 4000.

Radioinmunoanálisis.

Se utilizó el método del radioinmunoanálisis para la cuantificación de las diversas hormonas producidas por las células de Leydig (progesterona, 20-OH progesterona, pregnenolona, testosterona) y el segundo mensajero AMPc.

La metodología es similar para las diferentes hormonas esteroides, por lo que la descripción para una de ellas se puede hacer extensiva al resto.

Determinación de progesterona.

De los sobrenadantes de las incubaciones, guardados a -20°C , se tomó una alícuota adecuada que, sin extracción previa, se utilizó para la determinación de progesterona. El dosaje se realizó mediante la utilización de un suero anti-progesterona, obtenido por inmunización activa de conejos, a intervalos de dos semanas, con un conjugado de progesterona-albúmina sérica bovina [BSA], preparado por acoplamiento de la carboxi-metil-oxima de la progesterona a [BSA]. El suero anti-progesterona se utilizó en una dilución apropiada (1:1200) para ligar el 40% de la [^3H]-progesterona de referencia (aproximadamente 10.000 c.p.m.).

Luego de una incubación durante 16 horas a 4°C , la hormona libre se separó de la hormona unida al anticuerpo mediante el agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón (Norit A) (0,5% P/V)-dextranso (dextranso 70) (0,05% P/V) en el buffer de ensayo (Na_2HPO_4 40 mM; NaH_2PO_4 30 mM, NaCl 150 mM; azida sódica 0,01 %; y gelatina 0,1%; pH 7,0) [buffer RIA], y centrifugación posterior a 3500 r.p.m. durante 10 minutos. Los sobrenadantes completos fueron transferidos a viales de conteo, a los que se les agregó 3ml de una mezcla centellante (PPO 0,5% y POPOP 0,05% en tolueno). La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%. El rango de utilidad del ensayo fue de 12,5 a 800 pg de progesterona en un volumen final de 0,5 ml.

Para la determinación de 20α -hidroxi-progesterona, pregnenolona y testosterona, se utilizó un procedimiento similar al descrito previamente para progesterona. Se utilizó en cada caso un anticuerpo preparado contra el esteroide a determinar y verificando previamente que no diera reacción cruzada con otros.

Determinación de AMPc.

La medición de AMPc se realizó por radioinmunoanálisis según el método de Steiner y col. [209]. Este método se basa en el desplazamiento competitivo de un derivado de AMPc marcado con [¹²⁵I] capaz de unirse a un anticuerpo preparado contra succinil-AMPc conjugado con albúmina (anticuerpo anti AMPc de Chemicon Int.

La medición se realiza en alícuotas de 100 µl provenientes del medio de incubación en una dilución apropiada. Estas alícuotas se acetilan agregándoles 5 µl de una mezcla de anhídrido acético-trietilamina (1:2 v/v) y agitando inmediatamente (vortex). El AMPc acetilado tiene una mayor afinidad por el anticuerpo, lo que aumenta la sensibilidad del radioinmunoanálisis. La reacción se completa en 1 minuto. Luego se agrega secuencialmente 100 µl de [¹²⁵I]-TME-SA (15.000 c.p.m.) y 100 µl de anticuerpo en una dilución óptima. Cada partida de anticuerpo debe ser titulada para conocer la dilución óptima.

La dilución que se elige es la que une un 40 % de la marca. Luego de 16 horas de incubación a 4°C, el AMPc unido al anticuerpo se separa del libre mediante una precipitación al agregar 50 µl de una solución de BSA al 2 % en un buffer acetato 50 mM, pH 6,2 y 2 ml de etanol (95 %), seguido de una centrifugación a 2000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se aspira y se descarta, y la radioactividad en el "*pellet*" se cuenta en un Beckman Gamma 4000. En cada experimento se realiza una curva control con patrones de AMPc disueltos en un buffer acetato de sodio 50mM, en el rango de sensibilidad del ensayo que va de 25 a 5.000 fmoles de AMPc.

Determinación de progesterona y AMPc intracelular.

Luego de finalizados los experimentos, y de retirados los medios de incubación, se agregaron 2 ml de etanol a las células MA-10, y se rompieron mediante la acción de 3 pulsos de 15 segundos cada uno con un oscilador de ultrasonido. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf y se secaron en una centrifuga de vacío Speedvac. Para la determinación de progesterona intracelular, las muestras secas se resuspendieron en el buffer utilizado para el radioinmunoanálisis de hormonas esteroideas.

Para la determinación del AMPc intracelular las muestras se resuspendieron en un buffer acetato de sodio 250mM, pH 6,2. Las proteínas precipitadas se removieron por centrifugación a 800 g. El contenido de progesterona y de AMPc de los sobrenadantes se determinó por radioinmunoanálisis como se describiera previamente.

Marcación de la membrana plasmática con [³H]-COLESTEROL.

Se utilizó el procedimiento descrito por Nagy y col. [194] para marcar la membrana plasmática con [³H]-colesterol. Este método consistía en agregar al medio de cultivo de las células MA-10 1μCi de [³H]-colesterol (71,40 Ci/mmol; en solución de etanol) e incubarlas durante 2 horas a 37°C. Luego de esta preincubación, las células se lavaban 2 veces utilizando 2 ml del medio de cultivo, para eliminar el radioactivo no adherido a la membrana plasmática.

Luego cada cultivo recibía 2 ml del medio de cultivo conteniendo los factores indicados y retornaba al incubador durante 4 horas a 37°C. El colesterol de la membrana plasmática que se internalizó fue determinado midiendo la cantidad de [³H]-colesterol libre incorporado a los ésteres de colesterol intracelular, y la cantidad de [³H]-esteroide liberado al medio de cultivo.

Determinación del colesterol libre y de los ésteres de colesterol.

Luego de las 4 horas de incubación, el medio de cultivo se recogió para la determinación de la radioactividad liberada al medio (que se podría comparar con el esteroide producido durante la incubación), y las células MA-10 se extrajeron con 4 ml de una solución [Folch] cloroformo:metanol (2:1) [194]. Esta solución permite extraer tanto al colesterol libre como a los ésteres de colesterol. Los extractos provenientes de cada cultivo se colocaron en tubos de ensayo de vidrio a los que se agregó 1 ml de H₂O, se agitó (vortex) durante 30 segundos y se dejó reposar durante 30 minutos.

La fase orgánica conteniendo al colesterol libre y a los ésteres de colesterol se tomó y se secó bajo una corriente de N₂. El colesterol libre se separó de los ésteres de colesterol mediante la técnica de cromatografía en placa delgada; para ello las muestras previamente secadas se resuspendieron en 50 µl de solución [Folch], y se sembraron sobre una placa de sílica gel. La cromatografía se desarrolló utilizando como solvente de corrida heptano:eter etílico:ácido acético (85:12:2).

Luego del desarrollo de la corrida cromatográfica, la posición del colesterol libre y de los ésteres de colesterol se determinó sobre la placa de sílica mediante la utilización de vapores de I₂. La determinación de la radioactividad asociada a cada esteroide se cuantificó cortando las áreas correspondientes al colesterol libre y al esterificado y contando en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801.

La masa de colesterol libre y de los ésteres de colesterol se cuantificó eluyendo los esteroides de la placa de cromatografía mediante la utilización de la solución [Folch], luego se evaporó y redisolvió en un volumen conocido. La masa presente en una alícuota se determinó utilizando un *kit* suministrado por Boehringer Mannheim. Todos los valores se corrigieron mediante la utilización de un estándar de recuperación interna. Este consistió en el agregado de una cantidad conocida de radioactividad [¹⁴C]-colesterol al inicio de la extracción y de esta forma se pudo evaluar las pérdidas producidas a lo largo de todos los pasos.

Actividad de la colesterol esterasa.

La actividad de la colesterol esterasa fue medida en células enteras de acuerdo al método descrito por Freeman y col. [210]. Para determinar la actividad de esta enzima mediante la cuantificación de los ésteres de colesterol, debía asegurarme que su síntesis se encontrara bloqueada. Este requisito se logró mediante la utilización del compuesto 58-035, un inhibidor de la [ACAT].

Luego de las 4 horas de incubación a 37°C con los factores en estudio, el medio de incubación fue removido, y los esteroides presentes en las células extraídos con una solución [Folch] cloroformo-metanol (2:1). Los ésteres de colesterol se separaron de otros lípidos como se ha descripto previamente. Luego se eluyeron de las placas cromatográficas de sílica y se cuantificó su masa.

El porcentaje de actividad de la colesterol esterasa fue calculado como la diferencia (en concentración de ésteres de colesterol) entre las células no tratadas control a tiempo cero de incubación [C_0] y las células tratadas luego de 4 horas de incubación con los diferentes factores.

La concentración de los ésteres de colesterol a tiempo cero en células no tratadas representan a la cantidad inicial de los ésteres de colesterol. El 100% de actividad de la enzima se consideró como la diferencia entre la concentración de ésteres de colesterol en células control (0 horas) y las tratadas con Bt₂AMPc en presencia del inhibidor de la ACAT [58-035].

Determinación de la síntesis "*de novo*" del colesterol.

Las células MA-10 se incubaron en 2 ml de medio de cultivo conteniendo 15% suero de caballo. A tiempo $t=0$, los mismos fueron lavados 2 veces con medio de cultivo fresco y posteriormente se les agregó 2 ml de medio de cultivo conteniendo 1,5 μ Ci de [¹⁴C]-Acido acético y los factores a estudiar.

Luego de 4 horas de incubación a 37°C, el medio de cultivo se recogió y guardó a -20°C. La monocapa de las células de cada cultivo se trataron como se indicó previamente para la determinación del colesterol libre y los ésteres de colesterol. Los extractos obtenidos se cromatografiaron según la técnica de placa delgada, y la radioactividad comigrante con el colesterol y los ésteres de colesterol cuantificada. Los valores obtenidos fueron corregidos utilizando estándares internos.

Incorporación de radioactividad en esteroides extracelulares.

Con el objeto de determinar la incorporación de radioactividad en los esteroides extracelulares (principalmente progesterona en el caso de estas células), alícuotas de 1 ml del medio de cultivo provenientes de células marcadas con [³H]-colesterol se extrajeron con 10 ml de eter etílico. La fase orgánica se transfirió a un vial de conteo, se evaporó a sequedad y luego del agregado de una solución centelleante se determinó la radioactividad.

Animales.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, adultas (aproximadamente de 60 días de edad), salvo especificación en contra, provenientes del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Condiciones del bioterio: temperatura controlada en 21-25°C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron dieta balanceada y agua "*ad libitum*".

Aislamiento de células intersticiales.

Para la obtención de las células intersticiales se utilizó la técnica descrita por Mendelson y col. [211], utilizando colagenasa (Worthington) para la dispersión del tejido tubular. Los testículos descapsulados, colocados en tubos de plástico de 50ml (Falcon) (seis testículos por tubo), fueron suspendidos en Medio 199 (Gibco Co.), en la relación 1 testículo por ml. de Medio 199, conteniendo 1 mg de colagenasa/ml. La incubación se realizó a 37°C, durante 25 minutos, en un incubador Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno (O₂: 95%, CO₂:5%), con agitación constante.

Finalizada la incubación, la reacción se detuvo por dilución con Medio 199 (8 ml por cada ml de incubación). Con el objeto de dispersar mejor el tejido, se agitó en forma rotatoria el tubo incubado, durante 3 minutos, dejándolo reposar otros 3 minutos.

Cuando decantaron los túbulos, el sobrenadante fue aspirado con una jeringa de plástico y filtrado a través de Nitex (malla de poro 50), recogiendo el líquido filtrado en otro tubo de plástico. La resuspensión se repitió una vez más y el líquido filtrado se juntó con el anterior. Este filtrado, conteniendo las células intersticiales, se centrifugó a 700 g, durante 10 minutos.

Para eliminar los glóbulos rojos presentes en este preparado las células se resuspendieron en una solución isotónica de Tris-NH₄Cl (1,7 y 140 mM respectivamente) e incubaron durante 10 minutos a 37°C con agitación constante.

La lisis de los glóbulos rojos se detuvo por dilución con M199, y las células se centrifugaron nuevamente a 700 g durante 10 minutos. El "*pellet*" así obtenido se resuspendió en Medio 199, en la relación de 1 testículo en 6 ml de medio. En estas condiciones se obtuvieron preparaciones de aproximadamente 7×10^6 células de Leydig/ml.

Incubación con células de Leydig.

Las células obtenidas según la técnica ya mencionada constituyen una fracción de células intersticiales cuya proporción mayoritaria lo conforman las células de Leydig. Aproximadamente 1.000.000 de células de Leydig se incubaron en un volumen final de 2ml de Medio 199, con MIX 0,1 mM y suplementado con las hormonas a estudiar.

La incubación se realizó durante 4 horas, a 37°C, en un incubador Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno y con agitación constante. Finalizada la incubación, el medio de cultivo fue centrifugado a 1.000 r.p.m., durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se guardó a -20°C, para la determinación de testosterona utilizando anticuerpos específicos.

Determinación de proteínas.

El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. [212], utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

Las muestras de membrana fueron previamente digeridas con NaOH 0,5N durante 16 hs a T ambiente.

Medición del contenido de ADN celular.

Luego de extraer el medio de incubación de cada placa de cultivo, y agregar 200 μ l de EDTA 2mM, éstas se guardaban a -20°C hasta la determinación del contenido de ADN de cada pozo.

Luego de descongelar y romper a las células con un oscilador de ultrasonido (3 pulsos de 15 segundos), el contenido de ADN de los cultivos celulares se cuantificó por fluorometría utilizando una solución del colorante Hoescht 33258 (Sigma, St. Louis, MO), cuya sensibilidad es de 10 ng de ADN [213].

Determinación del porcentaje de células viables.

El porcentaje de células viables presentes en cada preparación se determinó mediante el test de exclusión de azul tripan. A 100 μ l de una suspensión celular en el Medio 199 se le agregaron 500 μ l de una solución de azul tripan 0,4% y 400 μ l de Medio 199 conteniendo 0,2% de albúmina sérica bovina [BSA]. Las células permanecieron 5 minutos a temperatura ambiente en presencia de azul tripan antes de su observación microscópica. El porcentaje de células teñidas [muertas] se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados por el análisis de la variancia. Las diferencias significativas entre los promedios de los diferentes tratamientos fueron realizados utilizando el análisis de la variancia. Un valor de P menor que 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

CAPITULO I

CARACTERIZACION DEL EFECTO DE LA HORMONA JUVENIL III

Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de determinar la forma de acción de la hormona juvenil III y sus análogos sintéticos sobre la síntesis esteroidea en células de Leydig MA-10.

Como primera aproximación se examinaron los efectos sobre la producción de progesterona, la influencia de diferentes tiempos de preincubación e incubación, y la variación de las concentraciones de hCG.

1.1. Efecto de la hormona juvenil III sobre la síntesis de progesterona en las células de Leydig MA-10.

Para la realización de los siguientes experimentos, las células MA-10 se sembraron a una densidad de 75.000 células por pozo, y se crecieron durante 3 días en un medio de cultivo suplementado con 15% de suero de caballo como se describe en Materiales y Métodos.

Para determinar si la presencia de la hormona juvenil III afectaba de alguna forma la síntesis de esteroides, las células de Leydig MA-10 se preincubaron durante 30 minutos con dosis crecientes de hormona juvenil III (30ng/ml-30µg/ml) seguida de incubaciones por 4 horas luego del agregado de un estímulo máximo de hCG(5ng/ml), en un medio de cultivo con BSA al 0,1% y MIX 0,1mM.

La presencia de la hormona juvenil III durante las incubaciones dió como resultado un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la producción de progesterona inducida en presencia de hCG (Fig 16).

Este efecto se caracterizó por una dosis de inhibición media (IC₅₀) de 5x10⁻⁵M (15 µg/ml). A la máxima concentración de inhibidor utilizada (10⁻⁴M), la producción de progesterona fue inhibida alrededor del 90 %.

Luego de las 4 horas de incubación y de retirarse el medio de cultivo para determinar la cantidad de progesterona por radioinmunoanálisis, las células se trataron con el colorante azul tripan como se describe en Materiales y Métodos para analizar la viabilidad celular luego del ensayo.

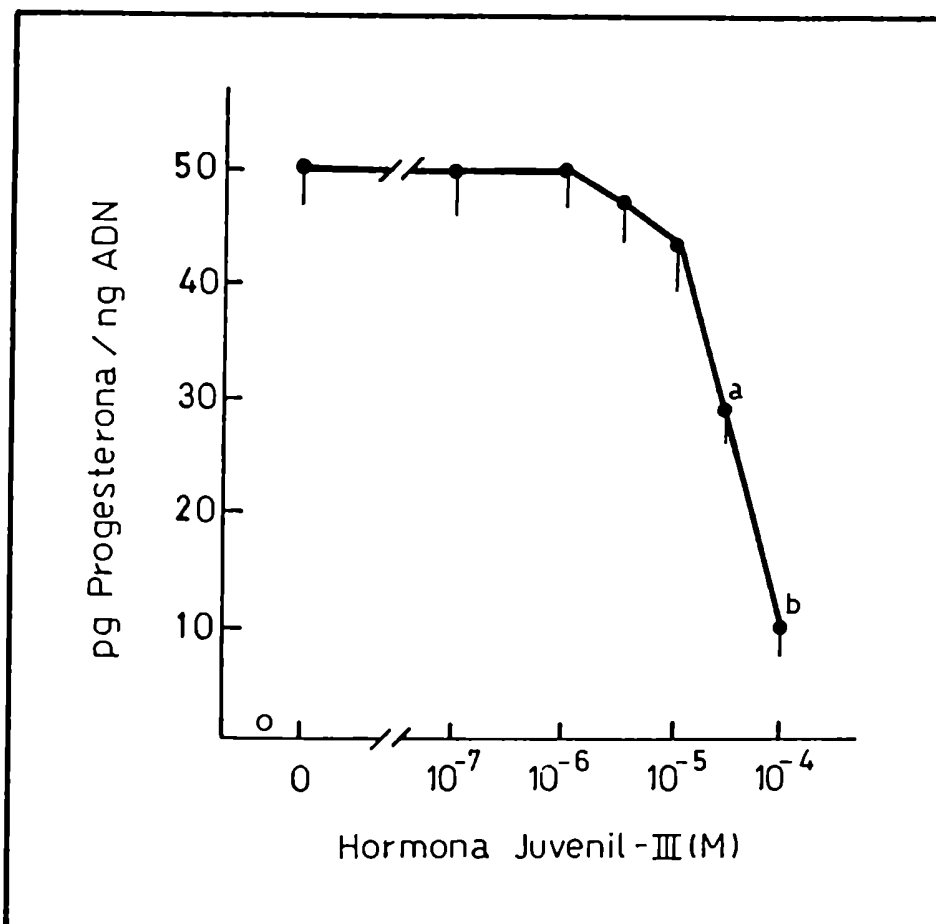


Figura 16: Efecto de la hormona juvenil III sobre la síntesis de progesterona en células tumorales de Leydig MA-10.

Las células MA-10 se preincubaron durante 30 minutos con dosis crecientes (30ng-30μg/ml) de la hormona juvenil III, seguida de una incubación durante 4 horas en presencia de una dosis máxima de hCG (5ng/ml). Los valores representan el promedio ± ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. ^aP<0,01 cuando se compara con el control, ^bP<0,001 cuando se compara con el control.

El efecto inhibitorio de la HJ III sobre la producción de progesterona en células de Leydig MA-10 estimuladas con hCG no se relacionó con una disminución en la viabilidad celular, siendo esta aproximadamente del 95% tanto para las células controles como para las tratadas con la HJ III.

1.2. Efecto de los análogos sintéticos de la hormona juvenil sobre la síntesis de progesterona en células de Leydig MA-10.

Una vez que se determinó la existencia de un efecto inhibitorio sobre la síntesis de progesterona en presencia de la hormona juvenil III se procedió a analizar el efecto de un grupo de análogos sintéticos de la HJ III.

Estos análogos sintéticos se pueden agrupar de acuerdo a su estructura química en isoprenoides y no isoprenoides como se ha descrito en la Introducción (Fig 7).

Se ha demostrado que a pesar de poseer una estructura muy variada respecto de la estructura química de la hormona juvenil III, todos ellos poseen una actividad análoga a la producida por la hormona juvenil en insectos.

Para este estudio las células MA-10 se preincubaron durante 30 minutos con concentraciones de los análogos de la [HJ] que variaban entre (30ng/ml-30µg/ml), para posteriormente agregar a las mismas una dosis máxima de hCG de 5ng/ml e incubarlas durante 4 horas más.

Luego de la incubación el medio de cultivo se retiró, centrifugó a 1000 g durante 10 minutos y se analizó la concentración de progesterona por radioinmunoanálisis. La presencia de los análogos de la [HJ] dió como resultado un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la producción de progesterona estimulada en presencia de hCG (Fig. 17), de manera similar al efecto descrito previamente al utilizarse la hormona juvenil III.

Sin embargo se observó que la naturaleza de la estructura química como así también el tipo de sustituyentes de cada análogo de la [HJ] determinaron una intensidad diferente para el efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona. A partir de la Fig. 17 se observó que el análogo de la HJ [2-(4 fenoxifenoxi)etoxi tetrahidropirano] [DF] de estructura no isoprenoide fue uno de los compuestos con mayor actividad inhibitoria sobre la producción de progesterona.

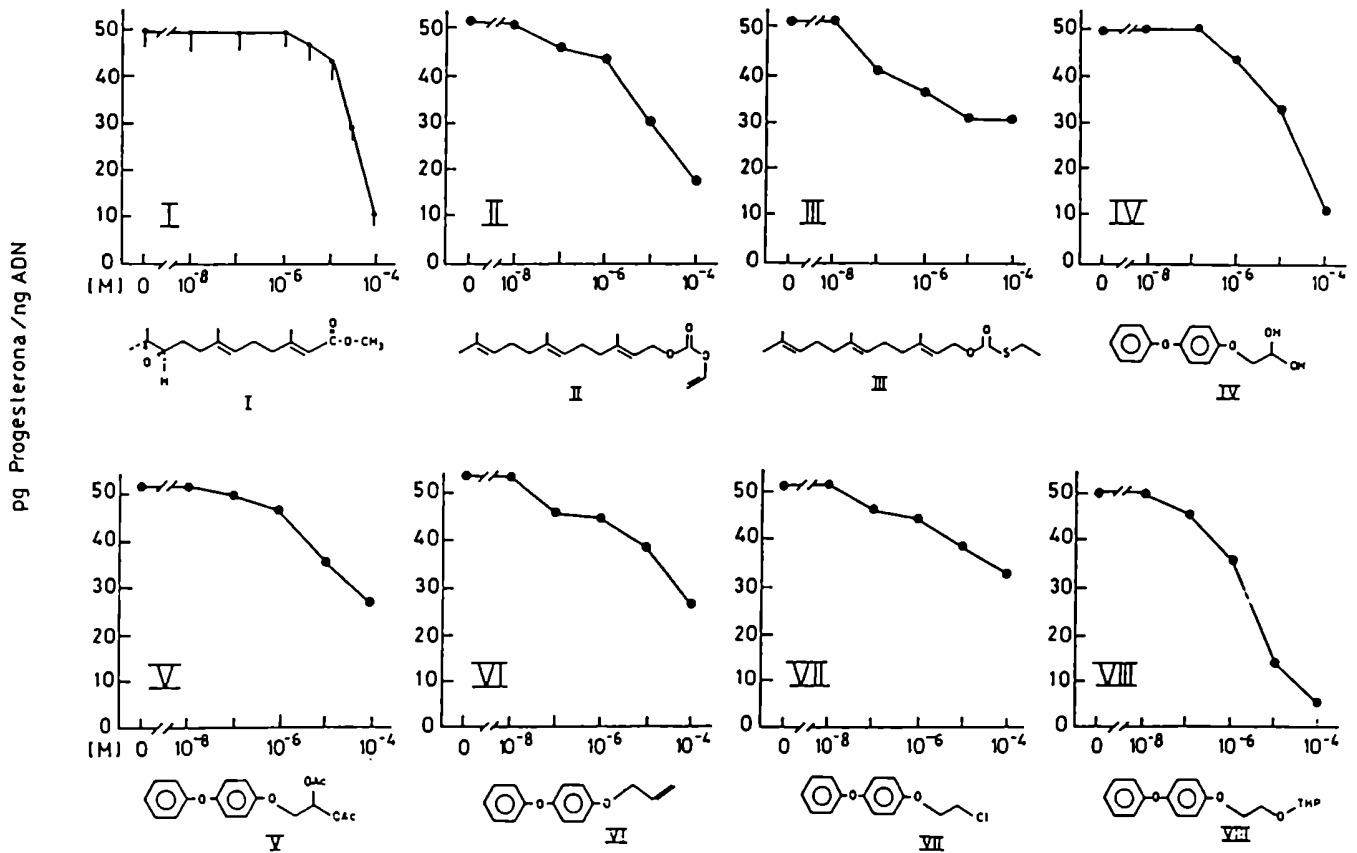


Figura 17: Efecto de los análogos sintéticos de la hormona juvenil sobre la síntesis de progesterona en células de Leydig MA-10.

Las células MA-10 se preincubaron durante 30 minutos con concentraciones crecientes (10^{-8} - 10^{-4} M) de análogos sintéticos de la [HJ], seguida de una estimulación con una dosis máxima de hCG de 5ng/ml. La progesterona del medio de cultivo se determinó por radioinmunoanálisis. Los valores representan el promedio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo.

En base a este resultado se decidió continuar el estudio sobre la caracterización del efecto inhibitorio con este compuesto.

1.3. Metabolismo de progesterona en presencia del análogo de la HJ [DF].

Se ha descrito que como consecuencia de una deficiencia en la actividad enzimática de la 17α -hidroxilasa, la principal hormona esteroide producida en las células pertenecientes a la línea tumoral de Leydig MA-10 es la progesterona. Sin embargo se sabe también que parte de la progesterona producida se metaboliza a 20-OH progesterona, y su proporción respecto a progesterona se incrementa al aumentar el tiempo de incubación de las células.

Para descartar la posibilidad de que la inhibición observada sobre la producción de progesterona no se deba a un aumento en el metabolismo de progesterona a 20-OH progesterona, se tomaron los medios de incubación de experimentos en los cuales previamente se había determinado el efecto inhibitorio del análogo de la HJ [DF] sobre la producción de progesterona, para determinar en los mismos 20-OH progesterona por radioinmunoanálisis.

Los resultados que se observan en la Fig 18 demuestran que el efecto inhibitorio sobre la producción de 20-OH progesterona es similar al observado previamente sobre la producción de progesterona al estimular las células con hCG, descartando por lo tanto un aumento en la metabolización de la progesterona en presencia del análogo de la HJ [DF].

1.4. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre células MA-10 estimuladas con diferentes concentraciones de hCG.

Con el fin de determinar si el efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la producción de progesterona dependía de la concentración de hCG utilizada para estimular a las células de Leydig MA-10, estas se incubaron durante 4 horas utilizando una concentración del análogo de la HJ [DF] cuyo efecto inhibitorio resultaba máximo ($10^{-4}M$), y concentraciones de hCG que variaban entre 0,3 y 5 ng/ml.

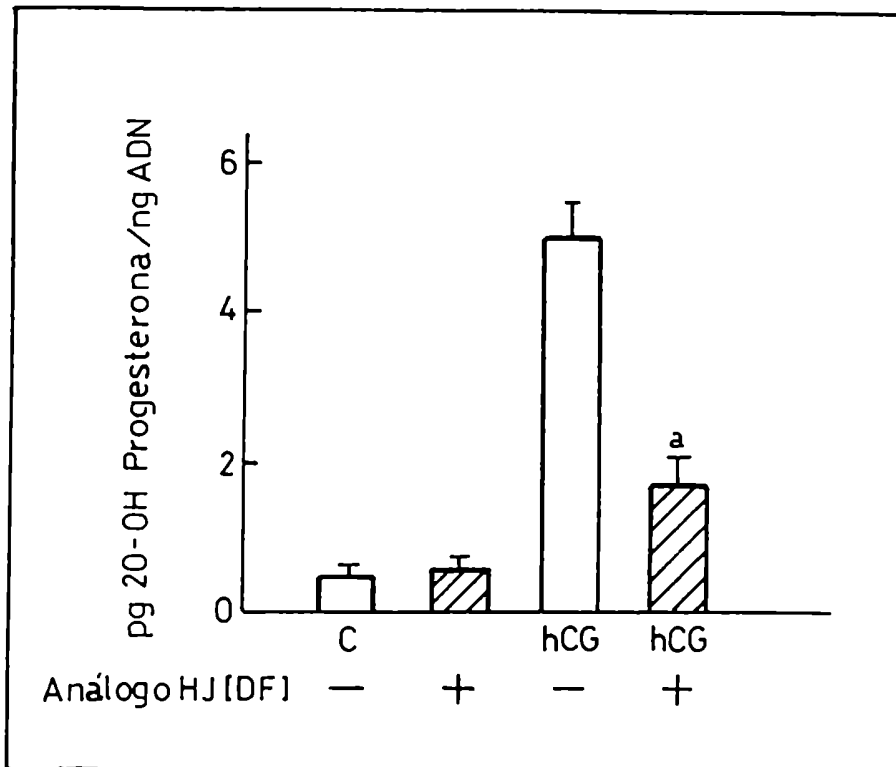


Figura 18: Metabolismo de progesterona en presencia del análogo de la HJ [DF].

Los valores de 20-OH progesterona que se determinaron por radioinmunoanálisis corresponden al promedio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. ^aP<0,001 cuando se compara con el control estimulado en ausencia del análogo de la HJ [DF].

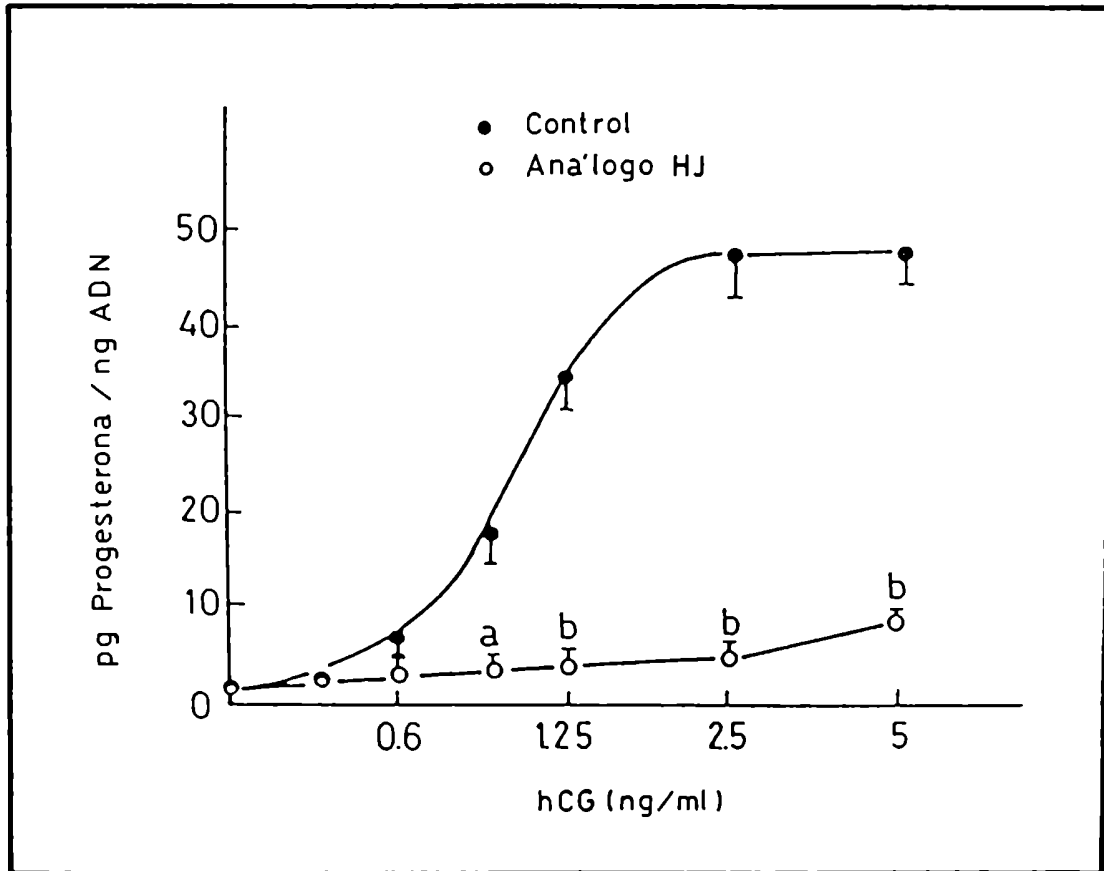


Figura 19: Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre células MA-10 estimuladas con diferentes concentraciones de hCG.

Las células MA-10 se preincubaron durante 30 minutos con el análogo de la HJ [DF] ($10^{-4}M$), para luego ser estimuladas con diferentes dosis de hCG (0,3-5ng/ml). La cantidad de progesterona acumulada en el medio de incubación se determinó por radioinmunoanálisis luego de 4 horas de incubación a 37°C. Los valores representan el promedio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. ^a indica que el valor es diferente al control con un $P < 0,005$, y ^b indica que el valor es diferente del control con un $P < 0,001$.

Se observó que la máxima estimulación esteroideogénica se producía al utilizar una concentración de hCG de 2,5 ng/ml, concentración a partir de la cual el efecto estimulador llegaba a una meseta en la producción de progesterona.

La presencia del análogo de la HJ [DF] resultó en un efecto inhibitorio significativo (mayor al 80%) sobre la estimulación de la producción de progesterona inducida por las diferentes concentraciones de hCG sugiriendo que la magnitud del efecto del análogo de la HJ [DF] era independiente de la concentración de hCG utilizada para estimular a las células (Fig. 19).

1.5. Variación en los tiempos de incubación de las células MA-10.

Los primeros experimentos con las células de Leydig MA-10 se realizaron durante períodos de incubación de 4 horas. Esto tenía su razón de ser, debido a que en este tipo de línea celular la máxima acumulación de progesterona en el medio de cultivo al estimular las células con hCG se observaba a las 4 horas de incubación, momento a partir del cual la acumulación de la progesterona sintetizada llegaba a un punto de inflexión comenzando a incrementarse el metabolismo de progesterona a 20-OH-progesterona.

Sin embargo no dejó de ser interesante el hecho de tratar de determinar si el efecto inhibitorio observado en presencia del análogo de la HJ [DF] se producía desde un comienzo y prevalecía durante todo momento durante la incubación, o este efecto se encontraba condicionado por el tiempo de incubación.

Las células MA-10 se preincubaron media hora con el análogo de la HJ [DF] utilizando una concentración ($10^{-4}M$), momento a partir del cual definimos el tiempo cero del experimento y en el que se estimularon las células por el agregado a los medios de cultivo de 5ng/ml de hCG. El ensayo se detuvo a intervalos de 2 horas, comenzando a tiempo cero, retirando de cada grupo de discos el medio de cultivo para determinar progesterona. El tiempo máximo de incubación se extendió hasta las 8 horas (Fig 20).

Se observó que en presencia del análogo de la HJ [DF] el efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona se mantenía independientemente al tiempo de incubación.

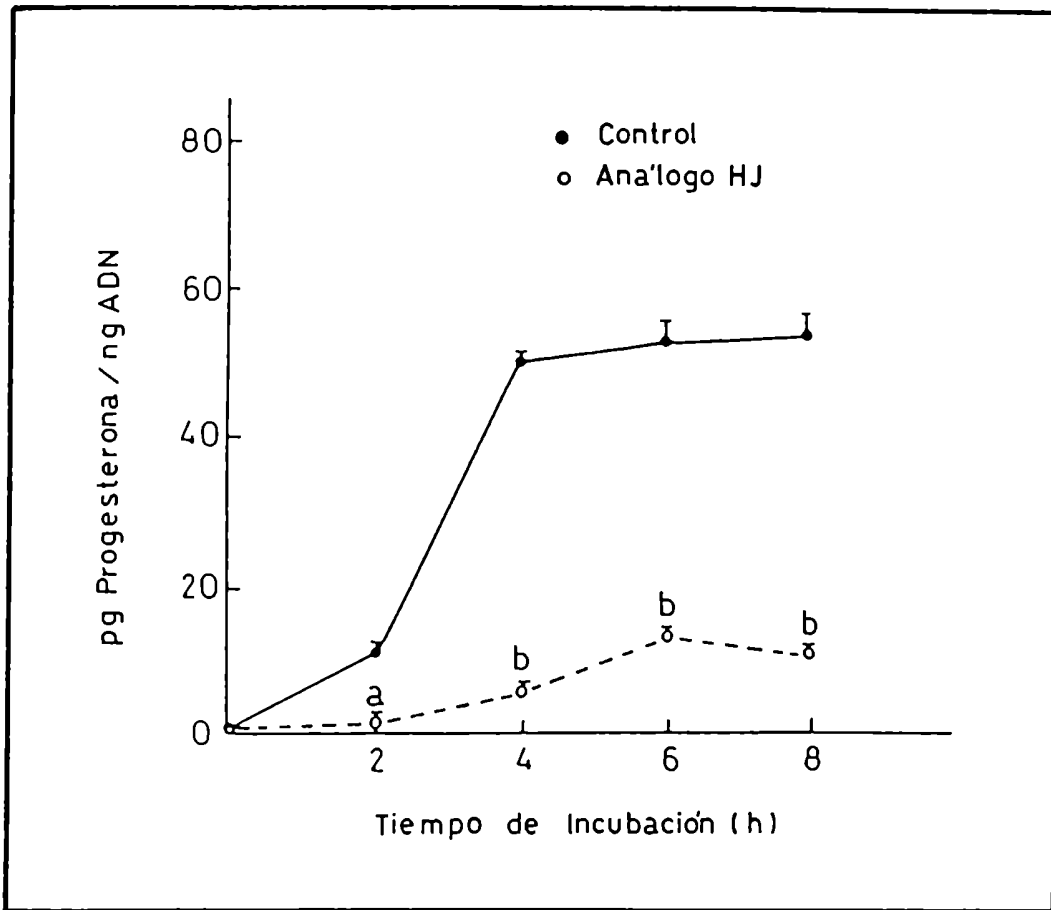


Figura 20: Variación en los tiempos de incubación de las células MA-10.

Los cultivos de células MA-10 se mantuvieron como se describió en Materiales y Métodos. Las células se dividieron en dos grupos, por un lado aquellas células controles tratadas con 5ng/ml de hCG, y por el otro las células incubadas en presencia del análogo de la HJ [DF] ($10^{-4}M$) más 5ng/ml de hCG. El medio de incubación se recogió a la 2,4,6,8 horas luego de iniciado el experimento para determinar el nivel de progesterona. Los valores corresponden al promedio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. ^a indica que el valor es diferente al control con un $P < 0,005$, y ^b indica que el valor es diferente del control con un $P < 0,001$.

1.6. Variación en los tiempos de agregado del análogo de la HJ [DF].

Luego se realizaron experimentos con el fin de determinar si la variación en el tiempo de preincubación con el análogo de la HJ [DF] modificaba el efecto inhibitorio que se observaba sobre la producción de progesterona. Las células MA-10 se preincubaron con el análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) partiendo de tiempos de preincubación de 0 minutos en donde el análogo de la HJ [DF] y el estímulo de hCG (5ng/ml) se agregaron al mismo tiempo, hasta llegar con intervalos de 15 minutos a tiempos de preincubación de 45 minutos, para luego agregar el estímulo gonadotrófico (hCG 5ng/ml) y continuar la incubación por 4 horas. Un mayor tiempo de preincubación no se correlacionó con un aumento del efecto inhibitorio para la concentración de inhibidor utilizada (Fig. 21 A).

A partir de estos resultados, se realizaron otra serie de experimentos en los cuales el análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) se agregó a diferentes tiempos [que variaban entre 0 y 30 minutos] luego de iniciada la incubación de 4 horas mediante el agregado inicial del estímulo gonadotrófico hCG (5ng/ml) considerado en este caso como tiempo cero. En estos experimentos se observó que el efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona se mantenía a pesar de haberse agregado el inhibidor hasta 30 minutos luego de estimular las células con hCG (Fig. 21 B).

1.7. Efectos de la HJ-III y del análogo de la HJ [DF] sobre la síntesis del segundo mensajero AMP cíclico

En las células de Leydig la activación del camino que transduce la señal hormonal que producen tanto LH como hCG resulta en un incremento de la actividad de la adenilil ciclasa dando como resultado un aumento en la producción del segundo mensajero AMP cíclico.

La estimulación de las células de Leydig al utilizar (5ng/ml) de hCG resultó en un incremento en la cantidad de AMPc de aproximadamente 300 veces respecto a los valores basales. El experimento se desarrolló utilizando concentraciones de la HJ III y de su análogo [2-4 fenoxifenoxi (etoxitetrahidropirano)] [DF] que variaban entre (10^{-6} y 10^{-4} M), en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa MIX 0,1 mM y un estímulo de (5ng/ml) de hCG (Fig. 22).

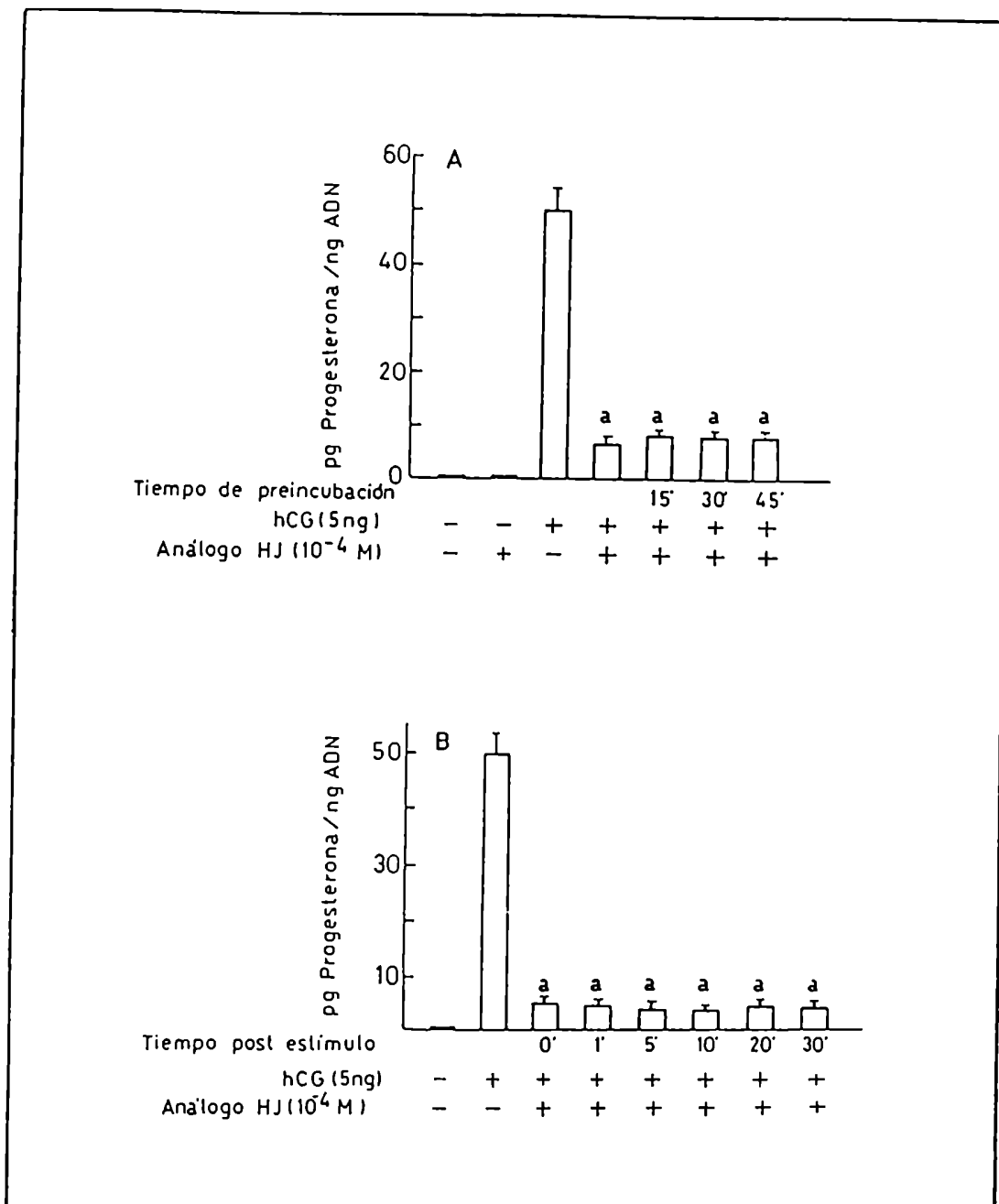


Figura 21: Variación en los tiempos de agregado del análogo de la HJ [DF].

Figura (A), las células MA-10 se preincubaron en presencia del análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) durante 45, 30, 15 o 0 minutos, para luego agregar 5ng/ml de hCG y continuar la incubación por 4 horas a 37°C. Luego se determinó progesterona en el medio de cultivo por radioinmunoanálisis.

Figura (B), el análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) se agregó 0, 1, 5, 10, 20, 30 minutos luego de estimular las células MA-10 con 5ng/ml de hCG. Estas se incubaron durante 4 horas a 37°C y se determinó progesterona en el medio de cultivo por radioinmunoanálisis. Los valores corresponden al promedio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. ^aP<0,001 cuando se compara con el control estimulado en ausencia del análogo de la HJ [DF].

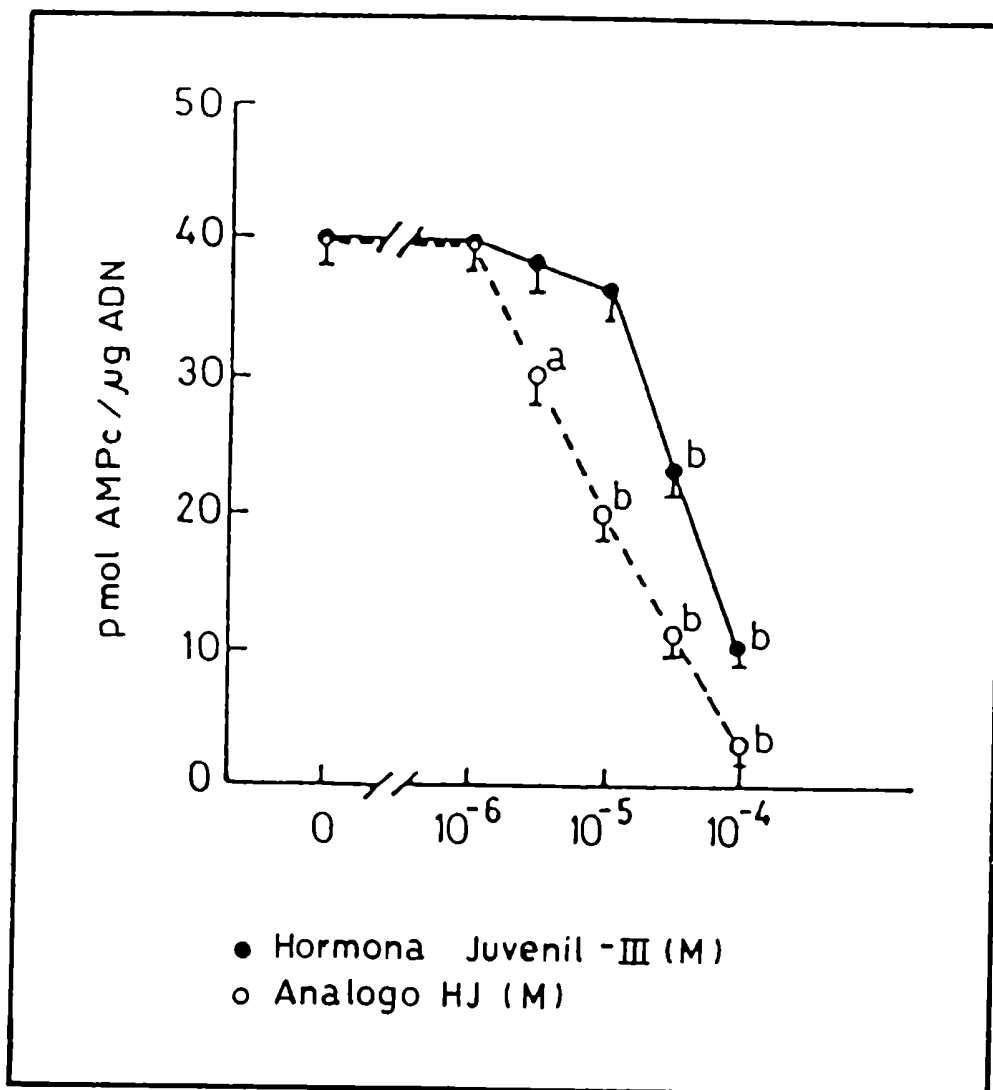


Figura 22: Efectos de la HJ-III y del análogo de la HJ [DF] sobre la producción del segundo mensajero AMP cíclico.

Las células MA-10 se preincubaron durante 30 minutos con dosis crecientes (10^{-6} - 10^{-4} M) de la hormona juvenil III y del análogo de la HJ [DF], seguida de una incubación durante 4 horas en presencia de una dosis máxima de hCG (5ng/ml). Los valores representan el promedio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. ^aP<0,01 cuando se compara con el control, ^bP<0,001 cuando se compara con el control.

La HJ-III así como también su análogo [DF], inhibieron la síntesis de AMP cíclico inducida por hCG (5ng/ml) en una forma dosis-dependiente con una concentración de inhibición media (IC₅₀) de 5×10^{-5} M y 10^{-5} M respectivamente. Si comparamos estas concentraciones de inhibición media con las obtenidas de los experimentos en los cuales se determinó progesterona se llega a la conclusión de que existe una mayor sensibilidad al inhibidor sobre la síntesis de progesterona que sobre la síntesis de AMPc. Experimentos realizados utilizando un medio de cultivo al cual no se le agregó MIX no revelaron un cambio en los niveles de inhibición de AMPc respecto a los resultados observados previamente en presencia de MIX (datos no presentados).

1.8. Análisis de progesterona y AMPc intracelular.

Como la progesterona y el AMPc determinados hasta el momento correspondían a mediciones realizadas en el medio de cultivo, estos valores representaban al esteroide y al nucleótido liberados al medio extracelular. En los mismos experimentos en los que se determinó progesterona y AMPc del medio de incubación, se procedió a tratar a las células de Leydig MA-10 de acuerdo a como se describe en la sección Materiales y Métodos de forma tal de poder determinar los niveles intracelulares de progesterona y AMPc (Fig. 23).

De esta manera se corroboró que la disminución en el medio extracelular no se correlacionaba con una incremento a nivel intracelular, y por lo tanto el efecto inhibitorio se debía a una disminución en la producción de AMPc y progesterona y no a un cambio en la permeabilidad de la membrana.

En una segunda parte de este experimento se estudió el efecto del análogo de la HJ [DF] sobre las células MA-10 utilizando concentraciones que variaban entre (10^{-7} y 10^{-4} M), en condiciones basales. Luego de 4 horas de incubación en presencia unicamente del análogo de la HJ [DF], se determinó la progesterona y el AMPc intracelular y extracelular. Se observó que al aumentar la concentración del análogo de la HJ [DF] se producía un incremento en el nivel de progesterona de aproximadamente un 100% respecto al valor basal, (aunque se sabe que en este tipo de células el hCG estimula a las células más de 200 veces), sin llegar a detectar ningún cambio a nivel intracelular.

En cuanto al segundo mensajero AMPc, este tiene la particularidad de que los valores basales intracelulares son mayores que los extracelulares; y en este caso no se observó ningun cambio significativo al agregar el análogo de la HJ [DF].

El hecho de observar que la presencia de la HJ III o del análogo de la HJ [DF] producían una disminución en la producción del segundo mensajero AMPc cuando se estimulaban las células MA-10 con hCG nos condujo a realizar la serie de experimentos agrupados en el Capítulo II.

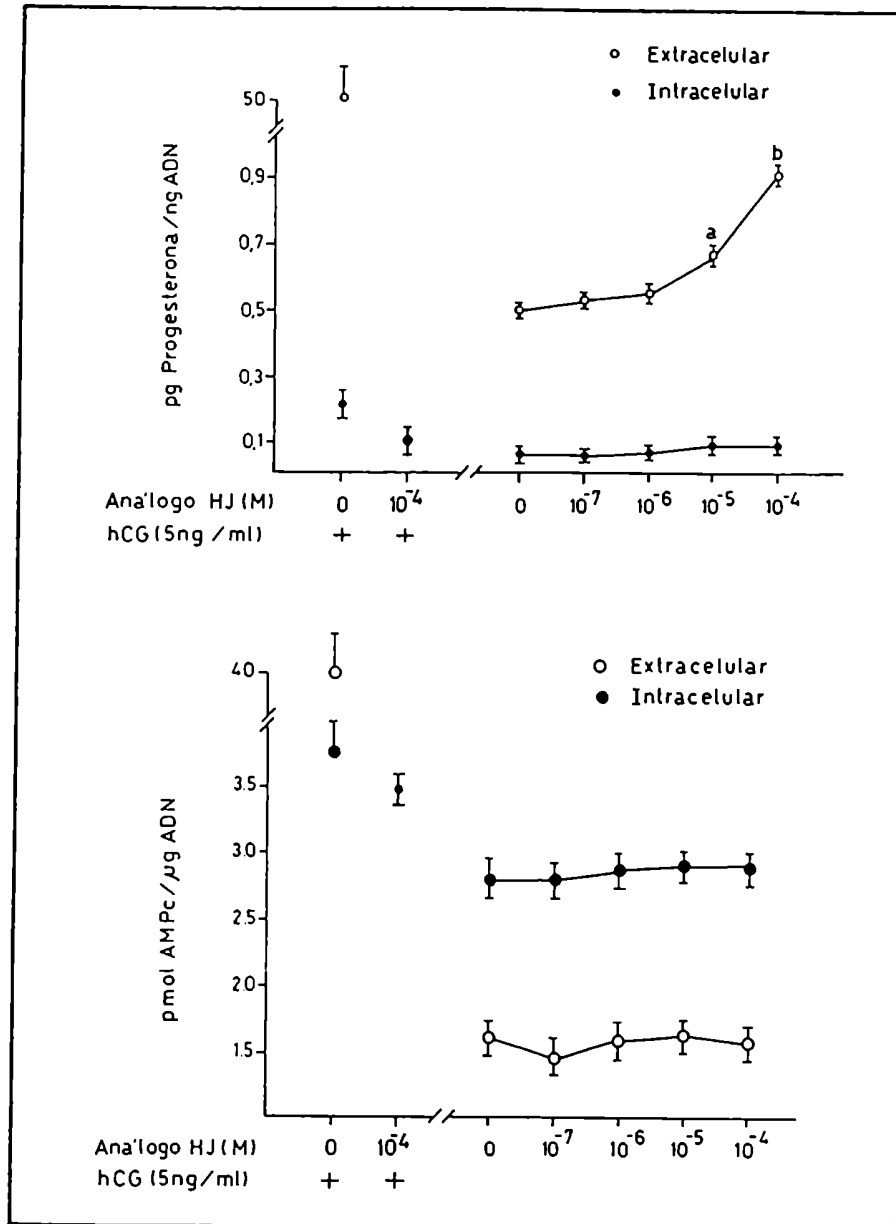


Figura 23: Análisis de progesterona y AMPc intracelular.

Las células MA-10 se incubaron en condiciones basales con dosis crecientes del análogo de la HJ (10^{-7} - 10^{-4} M) durante 4 horas, y en condiciones estimuladoras con 5 ng/ml de hCG en presencia del análogo de la HJ (10^{-4} M). Luego de la incubación, el AMPc y la progesterona extracelular se determinaron de alícuotas del medio de cultivo, mientras que el AMPc y la progesterona intracelular se determinaron como se indica en Materiales y Métodos a partir de las células MA-10. Los valores representan el promedio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. ^aP<0,01 cuando se compara con el control, ^bP<0,001 cuando se compara con el control.

CAPITULO II

ESTUDIOS SOBRE EL SISTEMA DE LA TRANSDUCCION DE LA SEÑAL HORMONAL DE hCG.

En base a los estudios iniciales realizados para caracterizar los principales efectos tanto de la HJ III como de su análogo [DF] resultó significativo detectar una disminución en los niveles de AMPc en células estimuladas con hCG y tratadas con los compuestos en estudio.

Estos resultados nos dieron la pauta de como continuar la investigación, por lo que el presente capítulo se refiere a un conjunto de experimentos en los cuales el foco principal de la investigación se centró en tratar de detectar el o los sitios de acción del análogo de la HJ [DF] en el camino que transduce la señal hormonal inducida por hCG hasta la producción del segundo mensajero AMPc.

2.1. Estudio de la unión de hCG a su receptor en presencia del análogo de la HJ [DF].

Debido a que el análogo de la HJ [DF] inhibe la producción de progesterona y la producción de AMP cíclico estimulada por hCG un posible sitio de acción podría hallarse en el receptor de LH/hCG, por lo que se determinó el efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la unión de [¹²⁵I]-hCG a sus receptores en las células de Leydig MA-10.

Los experimentos de unión se realizaron durante 24 horas a temperatura ambiente, en presencia de concentraciones crecientes de [¹²⁵I]-hCG, utilizando 150 µg de proteína correspondiente a membranas plasmáticas, obtenidas como fue descrito en Materiales y Métodos, de células MA-10 controles o células tratadas con el análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M).

La unión no específica se determinó en incubaciones en paralelo conteniendo además un exceso 100 veces superior de hCG no marcada.

Los análisis de Scatchard [207] de los datos de unión indicaron (Fig. 24) que el análogo de la HJ [DF] no alteró significativamente la constante de afinidad (K_d 6×10^{-11} M) ni el número de los sitios de unión de hCG.

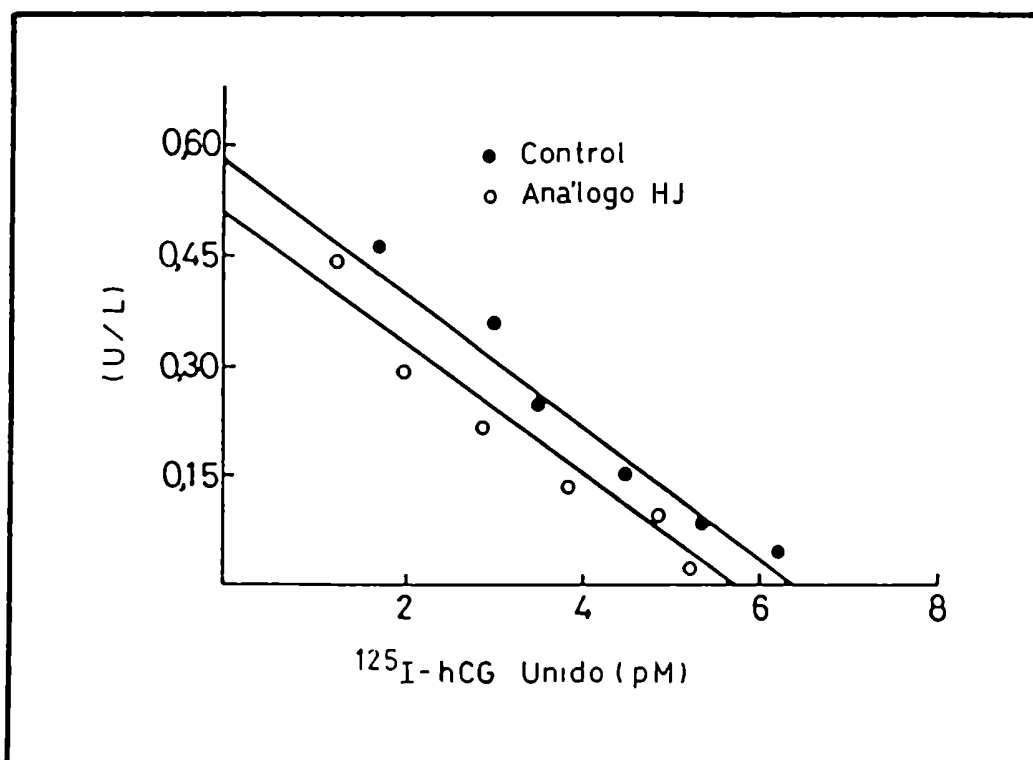


Figura 24: Estudio de la unión de hCG a su receptor en presencia del análogo de la HJ [DF].

Las células de Leydig MA-10 se incubaron en presencia [•] o en ausencia [o] del análogo de la HJ [DF] (10^{-4}M). Luego de 4 horas de incubación se prepararon las membranas como se describe en Materiales y Métodos. Las membranas de las células MA-10 se incubaron con concentraciones crecientes de [^{125}I]-hCG, determinándose la unión inespecífica en presencia de hCG no marcada. La figura muestra el gráfico de Scatchard de los resultados de un experimento representativo.

2.2. Unión de GTP a membranas de células de Leydig.

Teniendo en cuenta que las proteínas "G" que integran el sistema que trasduce la señal inducida por el receptor de LH/hCG en las células de Leydig tienen un rol esencial y específico en la estimulación de la esteroidogénesis, se estudiaron los efectos del análogo de la HJ [DF] sobre estas proteínas.

Se sabe que para que sean funcionales, las proteínas "G" deben tener la capacidad de unir GTP en forma normal, por lo que determinamos la unión de GTP a proteínas provenientes de membranas plasmáticas de células MA-10 tratando de detectar algún posible efecto por parte del análogo de la HJ [DF] sobre el proceso de unión del GTP a estas proteínas.

Las membranas de las células MA-10 se obtuvieron e incubaron con el nucleótido no hidrolizable de guanina [³⁵S]GTP γ S como se indica en Materiales y Métodos.

La unión inespecífica de la guanina trifosfato se estableció por incubaciones a las que además se les agregó un exceso de GTP sin marcar, el cual inhibió la unión del nucleótido marcado en más de un 90%.

Se observó (Fig. 25) que la presencia del análogo de la HJ [DF] no redujo los sitios de unión del [³⁵S]GTP γ S a las proteínas de la membrana plasmática, y por lo tanto no afectaría este tipo de unión necesaria para la activación de las proteínas "G".

2.3. Utilización de la toxina del cólera para estimular la proteína "Gs" perteneciente al sistema adenilil ciclasa.

Dado que el receptor que une LH/hCG como así también la unión de GTP a las proteínas "G" parecerían no haber sido afectados por la presencia del análogo de la HJ [DF], el siguiente paso consistió en analizar las proteínas G estimuladoras [Gs] del sistema adenilil ciclasa.

Las proteínas [Gs], que se encargan de mediar la señal proveniente del receptor de hCG, tienen la propiedad de activarse al interactuar en forma directa con la toxina del cólera. Los resultados de la tabla I indican que los niveles de AMP cíclico se incrementaron en presencia de la toxina del cólera en forma dosis-dependiente, como era de esperarse debido a la activación de la proteína [Gs].

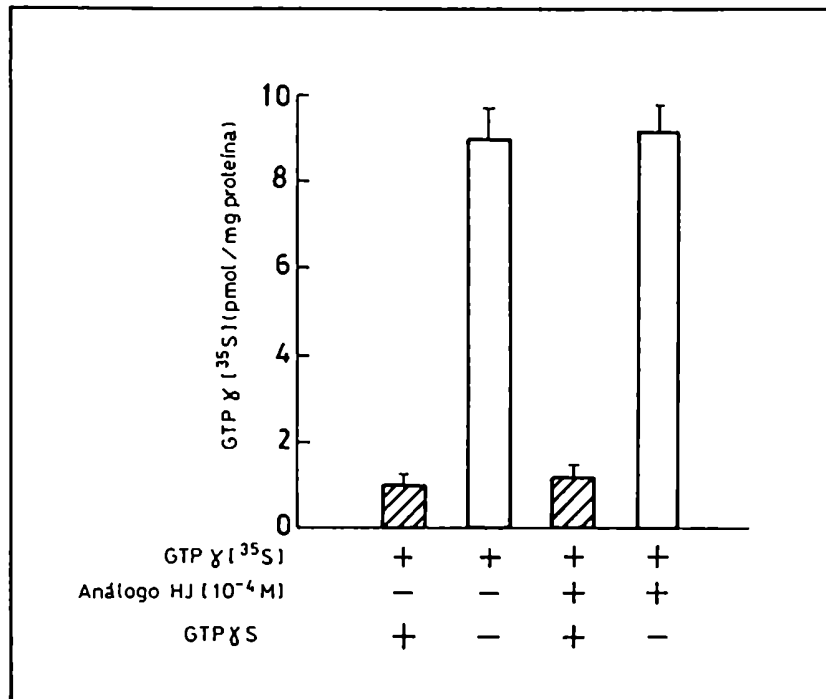


Figura 25: Unión de GTP a membranas de células de Leydig.

Se utilizó aproximadamente 50 μg de membrana plasmática de células MA-10 por muestra, las que se obtuvieron como se describió previamente en Materiales y Métodos. Las membranas se incubaron en presencia de [^{35}S]GTP γ S a 30°C durante 30 minutos solo (control) o en presencia del análogo de la HJ [DF] (10^{-4}M). La reacción se detuvo por el agregado de un "buffer stop", las muestras se filtraron y se determinó la radioactividad asociada a la membrana plasmática. La unión no específica se determinó por el agregado de un exeso de GTP frío. Los valores representan el promedio \pm ES de 4 determinaciones.

TRATAMIENTO	pmol AMPc / μ g ADN	
	- Análogo HJ	+ Análogo HJ
Control	0,10 \pm 0,05	0,13 \pm 0,06
Toxina del cólera (ng/ml)		
5	1,11 \pm 0,08	0,25 \pm 0,01*
50	14,73 \pm 2,16	3,87 \pm 1,35*
100	40,12 \pm 4,90	36,90 \pm 3,80

Tabla 1: Utilización de la toxina del cólera para estimular la proteína "Gs" perteneciente al sistema adenilil ciclasa.

Las células MA-10 se incubaron en presencia del análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) y varias dosis crecientes de toxina del cólera (5-100 ng/ml), mientras que el tratamiento control se realizó en ausencia del análogo de la HJ [DF]. El contenido de AMPc del medio extracelular se determinó luego de 4 horas de incubación a 37°C por radioinmunoanálisis. En todos los casos se utilizó [MIX] a una concentración final de 0,1mM. Los valores representan el promedio de incubaciones realizadas por triplicado, de 3 experimentos realizados. *P<0,001 cuando se compara con el tratamiento sin el análogo de la HJ [DF].

Dosis crecientes de toxina del cólera (5-100 ng/ml) estimularon la formación de AMP cíclico en una magnitud similar a como lo harían dosis crecientes de hCG. La presencia del análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M), redujo la producción de AMPc en los casos en los cuales la concentración de toxina de cólera utilizada fue de (5 a 50 ng/ml), sugiriendo que el análogo de la HJ [DF] podría interferir con la producción del AMP cíclico a nivel de las proteínas regulatorias [Gs] del sistema adenilil ciclasa. Sin embargo la presencia de una concentración elevada de toxina del cólera como 100 ng/ml fue capaz de contrarrestar el efecto inhibitorio producido por el análogo de la HJ [DF], demostrando que el efecto inhibitorio se revertía al activar en forma directa a la proteína [Gs] utilizando una gran concentración de toxina del colera.

2.4. Utilización de la toxina pertussis para inhibir la proteína "Gi" perteneciente al sistema adenilil ciclasa.

Otra de las proteínas pertenecientes al sistema adenilil ciclasa es la proteína G inhibitoria [Gi] cuya función se cumple a través de una acción inhibitoria sobre la proteína [Gs] y sobre la subunidad catalítica adenilil ciclasa.

La toxina pertussis tiene la particularidad de interactuar directamente con la proteína [Gi] inhibiendo su acción, y de esta manera el sistema pierde la regulación negativa por parte de la proteína [Gi].

Inicialmente las células MA-10 se incubaron en presencia de la toxina pertussis (150 ng/ml) durante 4 horas, y luego se determinó progesterona en el medio de incubación. La presencia de la toxina pertussis produjo un incremento de 4 veces sobre la producción basal de progesterona, lo que indicaría que una inhibición de la proteína G inhibitoria conduciría a la acción sobre la adenilil ciclasa unicamente de la G estimuladora (Fig. 26).

A partir de este resultado, en otra serie de experimentos se incubaron células MA-10 como se describe en Materiales y Métodos, durante 4 horas tanto en condiciones basales como en presencia de una dosis máxima de hCG (5ng/ml), el análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) y la toxina pertussis (150ng/ml).

Si bien no se observaron cambios del efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona al utilizar toxina pertussis en presencia del análogo de la HJ [DF], si hubo una disminución en la inhibición al medir la producción de AMPc.

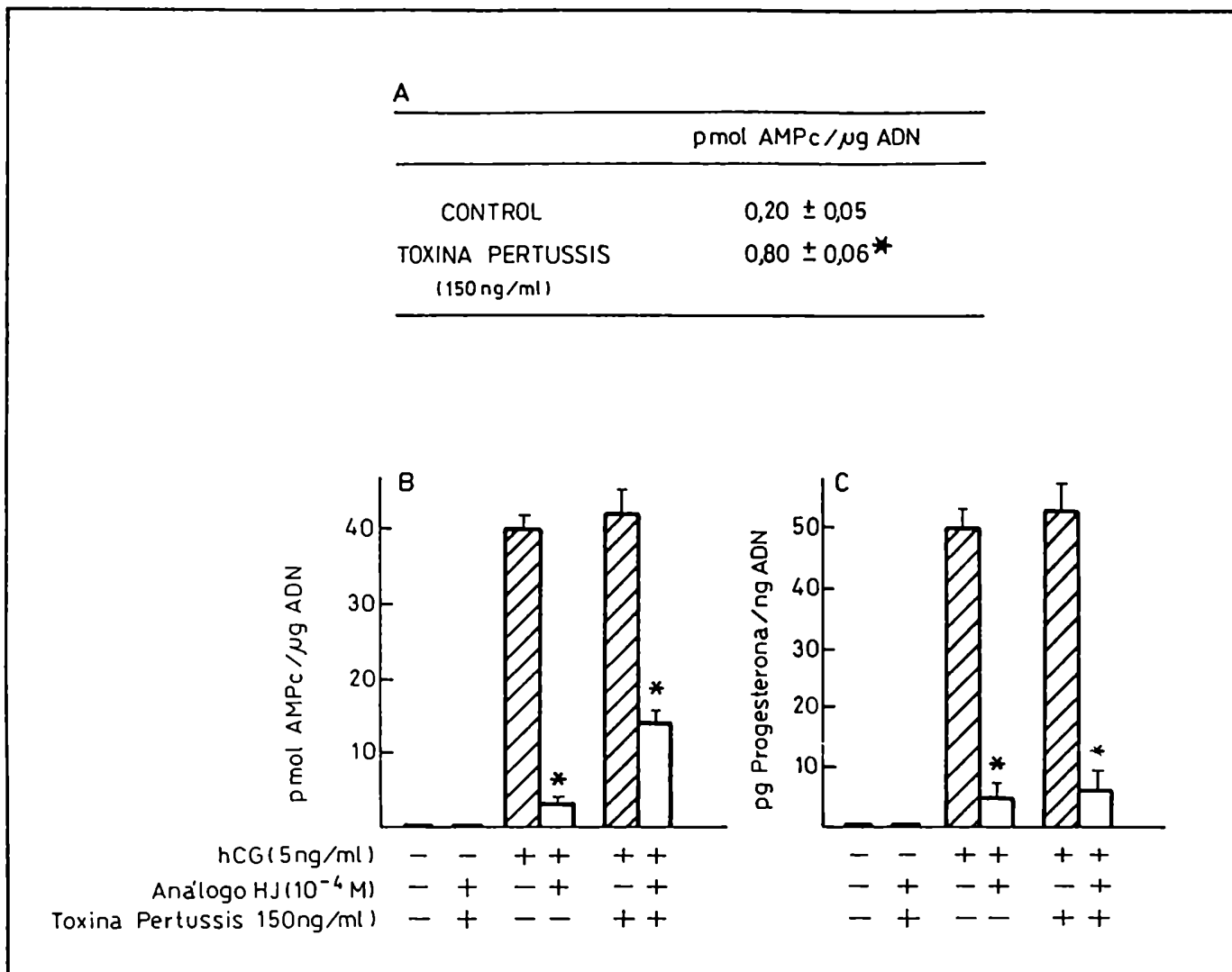


Figura 26: Utilización de la toxina pertussis para inhibir la proteína "Gi" perteneciente al sistema adenilil ciclasa.

Tabla (A) las células MA-10 controles y tratadas con la toxina pertussis (150ng/ml) se incubaron durante 4 horas a 37°C. La progesterona se determinó del medio de incubación por radioinmunoanálisis. Fig (B) y (C) determinación de AMPc y progesterona de células MA-10 incubadas en presencia o no de hCG 5ng/ml, análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M) y toxina pertussis (150ng/ml). Los valores representan el promedio de incubaciones realizadas por triplicado, de un experimento representativo de 3 realizados. *P<0,001 cuando se compara con el tratamiento sin el análogo de la HJ [DF].

Este resultado sugeriría algún tipo de interacción entre el análogo de la HJ [DF] y la proteína "Gi".

2.5. Estimulación de la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa con forskolina.

La subunidad catalítica [C] del sistema adenilil ciclasa se puede estimular utilizando forskolina, este compuesto interactúa directamente con la subunidad catalítica produciendo su estimulación y el consiguiente aumento en la producción de AMPc. De esta forma, la utilización de forskolina produce un "*by pass*" sobre la acción de las proteínas "Gs" y "Gi" pertenecientes al sistema adenilil ciclasa permitiendo el análisis de la funcionalidad de la subunidad catalítica [C].

Como muestra la figura 27, luego de 4 horas de incubación en presencia de concentraciones de forskolina que variaban entre (1-100 μ M) se observó un efecto estimulador con un importante incremento en la producción de AMPc. El agregado al medio de cultivo de las células MA-10 del análogo de la HJ [DF] en concentraciones que variaban entre (10^{-7} M y 10^{-4} M) muestra como la magnitud del efecto inhibitorio depende de la concentración del inhibidor utilizado.

2.6. Inhibición de subunidad catalítica del sistema adenilil ciclasa.

Para determinar si el efecto inhibitorio del análogo de la HJ [DF] sobre la producción de AMPc estaba mediado por una acción sobre la subunidad catalítica del sistema adenilil ciclasa, se estudió la influencia del análogo de la HJ [DF] sobre la actividad enzimática de esta.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando membranas obtenidas de células de Leydig MA-10 como se describió previamente en Materiales y Métodos. Se utilizaron membranas de células pretratadas durante 4 horas con el análogo de la HJ [DF] ((B) experimento "*in vivo*"), o membranas sin tratamiento previo a las cuales el análogo de la HJ [DF] se agregó durante el ensayo de actividad de ciclasa ((C) experimento "*in vitro*").

La presencia del análogo de la HJ [DF] redujo la actividad de la adenilil ciclasa en un 60% en presencia de Mg^{2+} +hCG (Fig. 28).

La inhibición de la adenilil ciclasa en presencia del análogo de la HJ [DF] concuerda con los resultados previos en los cuales la producción de AMP cíclico se encontraba disminuída.

		pmol AMPc / 10 ⁶ cel			
Adiciones	—	Análogo HJ 10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M
Forskolina	—	0,6 ± 0,1			
	1 μM	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2
					0,1 ± 0,1*

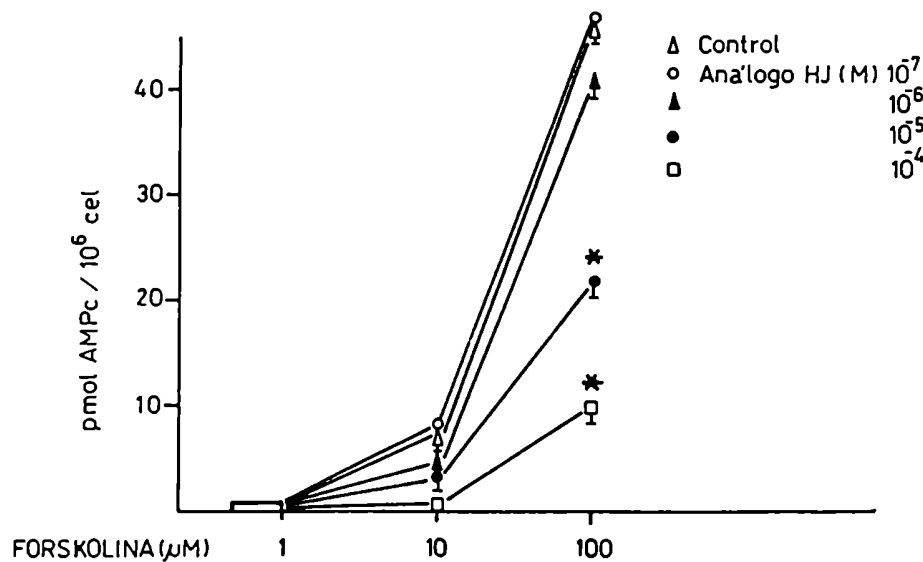


Figura 27: Estimulación de la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa con forskolina.

Las células MA-10 se incubaron con dosis crecientes del análogo de laHJ [DF] (10^{-7} - 10^{-4} M) y dosis de forskolina que variaban entre 1, 10, y 100 μ M durante 4 horas a 37°C. Luego de la incubación, el AMPc se determinó a partir de alícuotas del medio de cultivo. En todos los casos se utilizó MIX a una concentración final de 0,1mM. Los valores representan el promedio \pm ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. * $P < 0,01$ cuando se compara con el control.

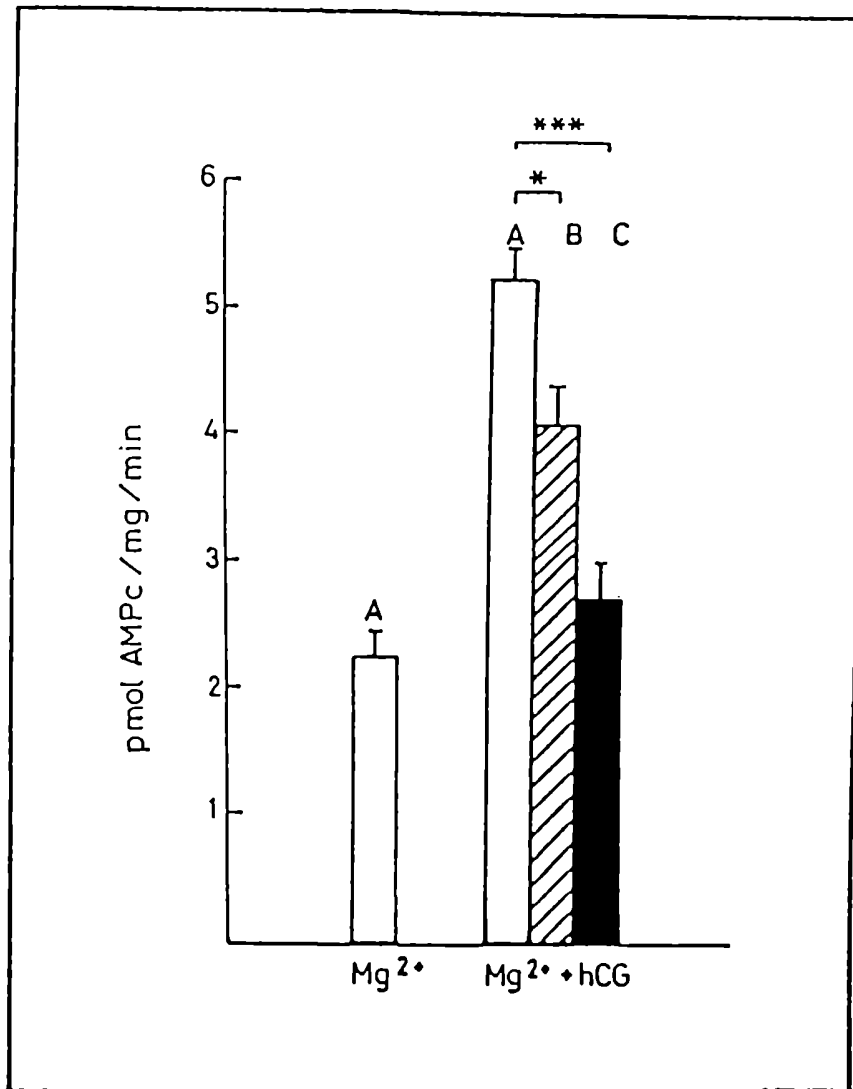


Figura 28: Inhibición de la subunidad catalítica del sistema adenilil ciclasa.

Los experimentos se realizaron con membranas obtenidas de células MA-10 como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de Mg²⁺ o Mg²⁺+hCG. (A) células controles, (B) células tratadas con el análogo de la HJ [DF] antes de aislar las membranas (ensayo *in vivo*), (C) membranas control tratadas con el análogo de la HJ [DF] durante el experimento (ensayo *in vitro*). Cada barra representa el promedio ± ES de determinaciones por triplicado. *P<0,05; ***P<0,001.

CAPITULO III

EL CAMINO BIOSINTETICO DE LA PROGESTERONA

3.1. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la síntesis de progesterona.

Teniendo en cuenta el efecto inhibitorio por parte del análogo de la HJ [DF] sobre la producción de progesterona en las células de Leydig MA-10, se determinó que al menos la producción del segundo mensajero AMPc se encontraba afectada. Con el fin de determinar en que medida la inhibición en la producción de progesterona por parte del análogo de la HJ [DF] se podría deber a la acción en otros sitios, se estudió el efecto de este compuesto sobre el camino que conduce a la síntesis de progesterona.

La esteroidogénesis puede ser estimulada por análogos del segundo mensajero AMP cíclico, como el dibutilil AMP cíclico [Bt₂AMPc] (Fig. 29). Se observó un efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona en células estimuladas con 1mM dibutilil AMP cíclico y tratadas con el análogo de la HJ [DF] con las siguientes concentraciones 10⁻⁴M y 10⁻⁵M. Este resultado indicaría que el análogo de la HJ [DF] afectaría la esteroidogénesis en las células de Leydig en algún paso/s localizado posteriormente a la formación del AMP cíclico.

3.2. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la esteroidogénesis estimulada por 25 y 20-hidroxicolesterol.

Los estudios sobre la inhibición de la producción de progesterona en las células de Leydig MA-10 en presencia del análogo de la HJ [DF] mostraron que el efecto inhibitorio persistía aún en células estimuladas con dibutilil AMP cíclico. Con el fin de investigar la posibilidad de que un suministro insuficiente de colesterol hacia la mitocondria fuera una de las causas de la inhibición observada en las células tratadas con el análogo de la HJ [DF], se realizaron experimentos utilizando derivados hidroxilados del colesterol.

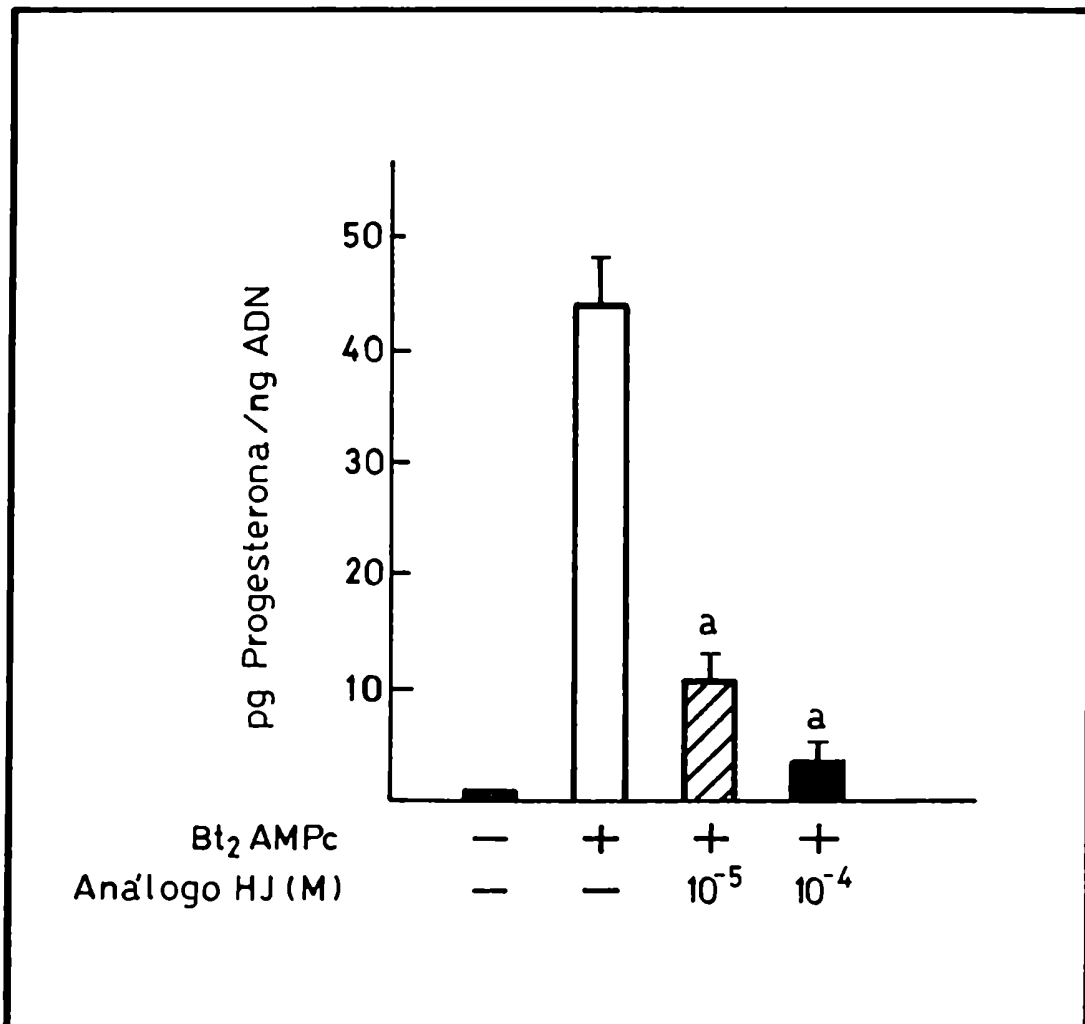


Figura 29: Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la síntesis de progesterona.

La síntesis de progesterona se estimuló utilizando Bt₂AMPc (1mM), y se ensayó el efecto de dos concentraciones del análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M-10⁻⁵M). Los valores representan el promedio ± ES de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. ^aP<0,001 cuando se compara con el control estimulado.

Si la inhibición se debiera a una limitación en el suministro de colesterol hacia la mitocondria, el suplemento de las células con un sustrato exógeno de la esteroidogénesis como el derivado hidroxilado del colesterol [25-hidroxicolesterol] permeable a las membranas plasmática y mitocondrial [199,214], debería revertir el efecto inhibitorio.

Sin embargo, los resultados de la Fig. 30 indicaron claramente que aunque el 25-hidroxicolesterol (50 μM) incrementa la síntesis de progesterona en forma significativa en estas células luego de 4 horas de incubación, no revertía el efecto inhibitorio que se observaba en presencia del análogo de la HJ [DF] (10^{-4}M) sobre la síntesis de progesterona. Un efecto similar se observó cuando las células MA-10 se incubaron durante 4 horas en presencia de otro compuesto hidroxilado el 20-hidroxicolesterol (50 μM) y el análogo de la HJ [DF] (10^{-4}M).

Bajo condiciones similares de experimentación el agregado de hCG (5ng/ml) a células tratadas con 20 o 25-hidroxicolesterol incrementó aún más la síntesis de progesterona; pero la presencia en el medio de cultivo del análogo de la HJ [DF] (10^{-4}M) también inhibió la producción esteroidea. Es posible que la disminución de la cantidad de progesterona sintetizada en las células estimuladas con 25-OH colesterol o 20-OH colesterol sea una consecuencia de la disminución en las actividades del complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol (CSCC) y/o de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD), aunque no podamos excluir la posibilidad de que el análogo de la HJ [DF] se encuentre afectando algún otro paso adicional en el camino metabólico que precede a la síntesis del colesterol.

3.3. Actividad del complejo enzimático 3β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa-isomerasa.

La función del complejo enzimático 3β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa-isomerasa (3β -HSD) consiste en convertir la pregnenolona proveniente de la mitocondria a una estructura Δ^4 -3 ceto: la progesterona. La actividad del complejo enzimático se determinó en células intactas como se describe en Materiales y Métodos.

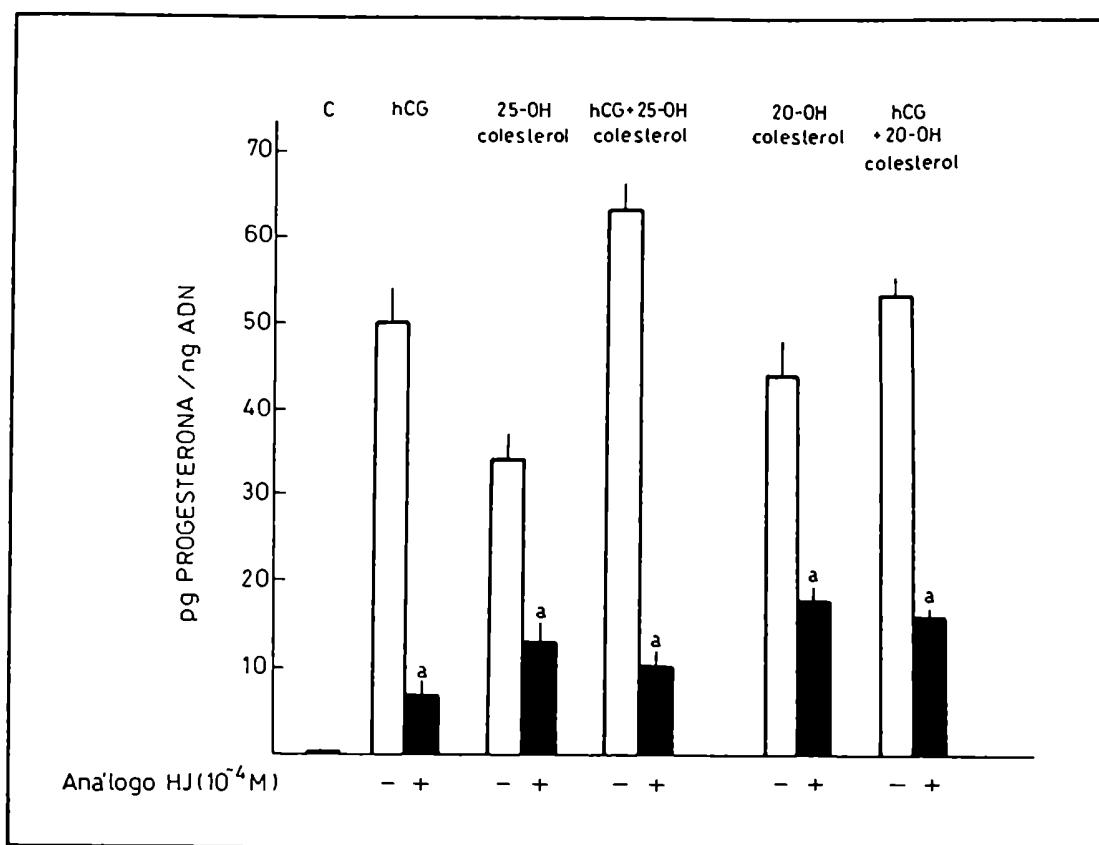


Figura 30: Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la esteroidogénesis estimulada por 25 y 20-hidroxicolesterol.

Las células MA-10 se crecieron como se describe en Materiales y Métodos. A tiempo cero se agregó a cada disco 2 ml de medio de cultivo conteniendo 25-OH colesterol (50 μ M) o 20-OH colesterol (50 μ M), con o sin el agregado de 5ng/ml de hCG; y donde se indica, el análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M). Luego de 4 horas de incubación, el medio de cultivo se removió para la determinación de progesterona por radioinmunoanálisis. Cada barra corresponde al promedio \pm ES de tres experimentos (cada determinación por triplicado en cada experimento). ^ap<0,001 cuando se compara con el valor del tratamiento en ausencia del análogo de la HJ [DF].

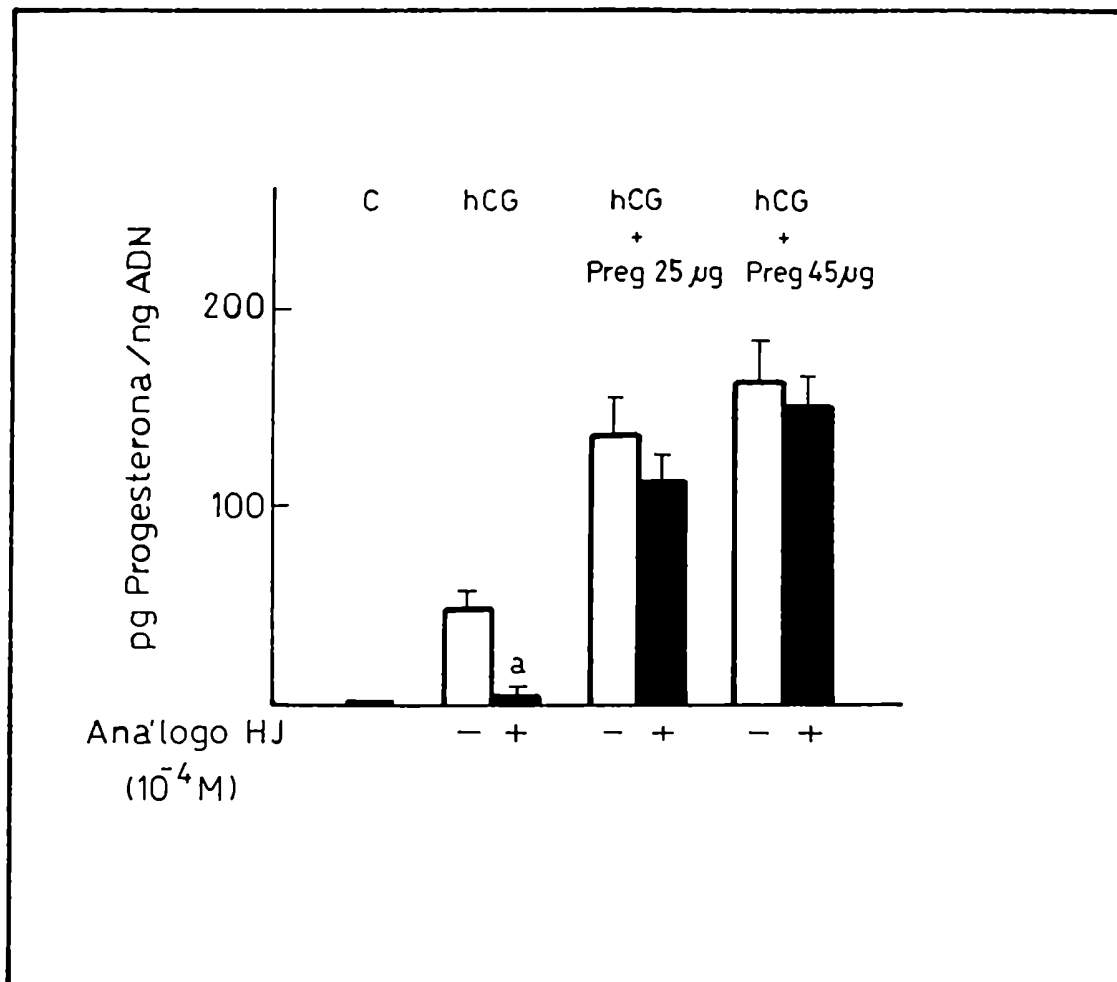


Figura 31: Actividad del complejo enzimático 3β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa-isomerasa.

Células MA-10 estimuladas con 5ng/ml de hCG se trataron con 25 o 45 μg/ml de pregnenolona y el análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M) en los casos indicados. La presencia de pregnenolona permitió la determinación de la actividad de la [3β-HSD] mediante la cuantificación de la producción de progesterona. La progesterona se determinó por radioinmunoanálisis luego de 4 horas de incubación a 37°C. Cada barra representa el promedio ±ES de determinaciones por triplicado. ^ap<0,001.

Las células MA-10 se incubaron durante 4 horas en presencia de dos concentraciones diferentes de pregnenolona (25-45µg/ml) que es el sustrato de la (3β-HSD), con o sin el agregado del análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M). Finalizada la incubación se determinó la formación de progesterona por radioinmunoanálisis habiendo verificado previamente que el anticuerpo utilizado no diera reacción cruzada con pregnenolona. Se observó que la incubación con pregnenolona producía un incremento en la formación de progesterona muy superior al observado con hCG (Fig. 31).

La inhibición en la producción de progesterona que se observaba en células estimuladas con hCG o análogos hidroxilados del colesterol en presencia del análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M), fue totalmente revertida en las células tratadas con pregnenolona (25-45µg/ml), indicando que el análogo de la HJ [DF] no afectaría la actividad del complejo enzimático 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (3β-HSD).

3.4. Inhibición de la síntesis de pregnenolona.

Si agrupamos los dos últimos resultados: [que el complejo enzimático (3β-HSD) no se encontraría afectado por el análogo de la HJ [DF] y sí en cambio la producción de progesterona al tratar a las células con derivados hidroxilados del colesterol] llegaríamos probablemente a la conclusión de que el análogo de la HJ [DF] actuaría inhibiendo el complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol (CSCC).

Para corroborar esta hipótesis se determinó el efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la producción de pregnenolona. Con este propósito las células MA-10 se incubaron durante 4 horas en presencia de inhibidores del metabolismo de pregnenolona como la cianocetona [inhibidor del complejo enzimático (3β-HSD)] (10 µM) a 37°C en 5% CO₂/aire.

La producción de pregnenolona se determinó por radioinmunoanálisis como se describe en Materiales y Métodos. La Fig. 32 (A) muestra como la presencia de la cianocetona [CC] (10 µM) en cultivos de células MA-10 disminuye la producción de

progesterona inhibiendo el metabolismo de la pregnenolona, siendo este el esteroide mayoritario. La adición del análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) al medio de cultivo de las células de Leydig MA-10 durante las 4 horas de incubación resultó en una inhibición significativa ($P < 0,001$) sobre la producción de pregnenolona en células estimuladas con 25-OH colesterol (Fig. 32 B)

A partir del análisis de estos datos se podría sugerir que el análogo de la HJ [DF] podría afectar al complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol (CSCC) y lo convierte a pregnenolona.

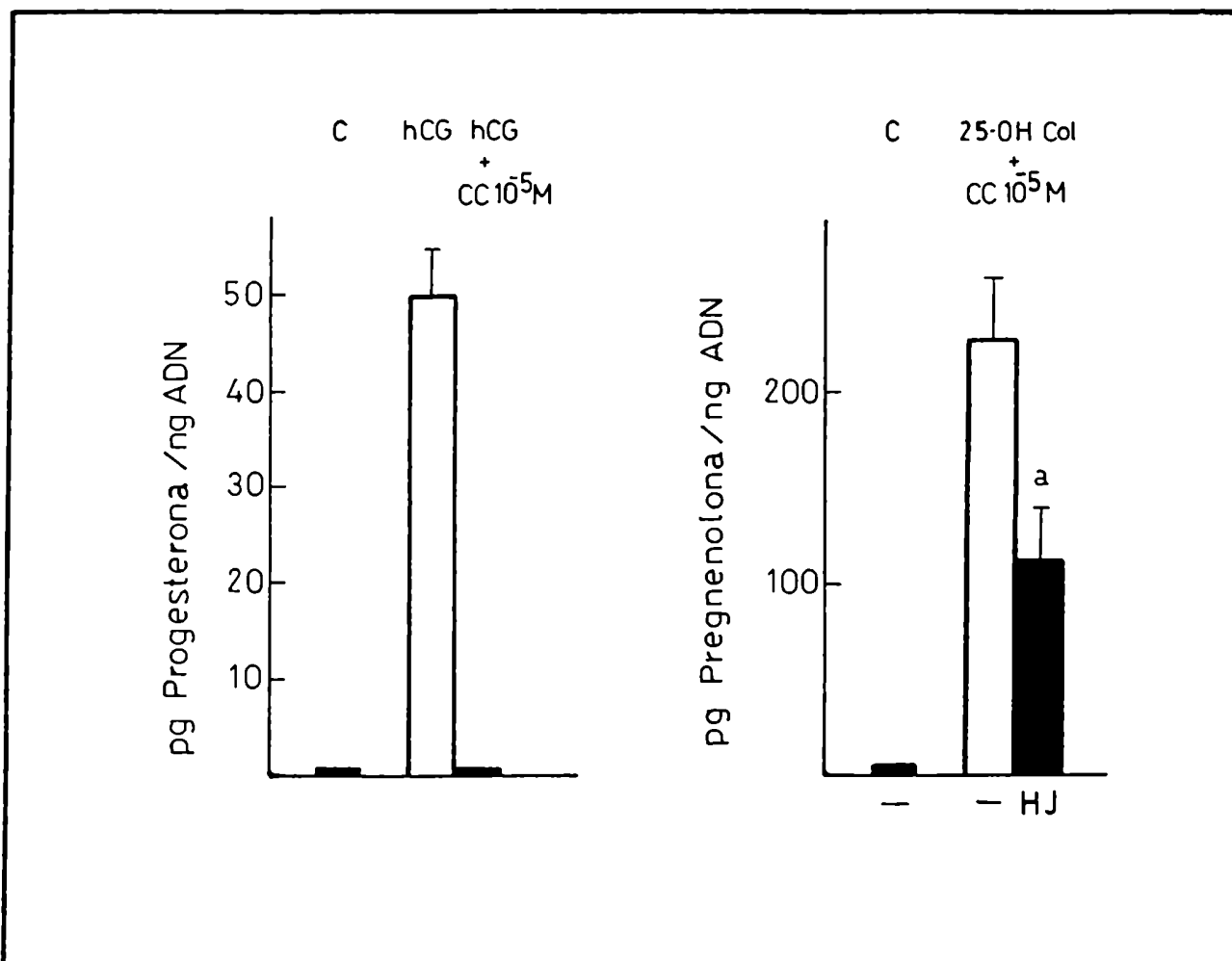


Figura 32: Inhibición de la síntesis de pregnenolona.

Las células MA-10 se incubaron 4 horas a 37°C con 5ng/ml de hCG para estimular la síntesis esteroidea, y cianocetona [CC] ($10^{-5}M$) para prevenir el metabolismo de la pregnenolona, como se observa en la Fig. (A). Paralelamente (Fig. B) se determinó pregnenolona de un cultivo tratado con [CC] ($10^{-5}M$), el análogo de la HJ [DF] ($10^{-4}M$), y estimulado con 25-OH colesterol (50 μM). Cada barra representa el promedio $\pm ES$ de determinaciones por triplicado. $^aP < 0,001$.

CAPITULO IV

FUENTES DE COLESTEROL

4.1. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre el [³H]-colesterol unido a la membrana plasmática.

El colesterol que se encuentra en la membrana plasmática actúa como una de las principales fuentes de sustrato para la síntesis de hormonas esteroideas en las células de Leydig MA-10 [190].

Este colesterol no se encuentra unido pasivamente a la membrana plasmática sino que continuamente se internaliza, esterifica, e hidroliza para retornar nuevamente a la membrana.

La internalización se puede acelerar en estas células al estimular la producción de hormonas esteroideas. Como el colesterol que se encuentra situado en la membrana plasmática es cuantitativamente importante para el mantenimiento de la esteroidogénesis [121,190,191], la interferencia con el proceso normal de reciclado a través de la membrana plasmática conduciría a una inhibición significativa de la esteroidogénesis.

En estos experimentos el [³H]-colesterol se empleó como un marcador de la membrana plasmática. La Fig. 33 (A) y (B) muestran la distribución de la radioactividad correspondiente al colesterol libre y a los ésteres de colesterol de células control luego de 2 horas de incorporación de la marca radioactiva (C₀); y la radioactividad correspondiente luego de 4 horas de incubación con los diferentes tratamientos.

Luego de 4 horas de incubación las células control internalizan una porción significativa (aproximadamente un 20%) del [³H]-colesterol de membrana y lo convierten en ésteres de [³H]-colesterol. La estimulación de las células con dibutil AMP cíclico causa una pérdida del [³H]-colesterol libre y del esterificado, con el consiguiente aumento de la radioactividad liberada al medio de cultivo (Fig. 33 C).

El tratamiento de las células MA-10 con el análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M) solo o el análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M) junto con dibutil AMP cíclico (1mM) tienen un efecto inhibitorio sobre la internalización y esterificación del colesterol

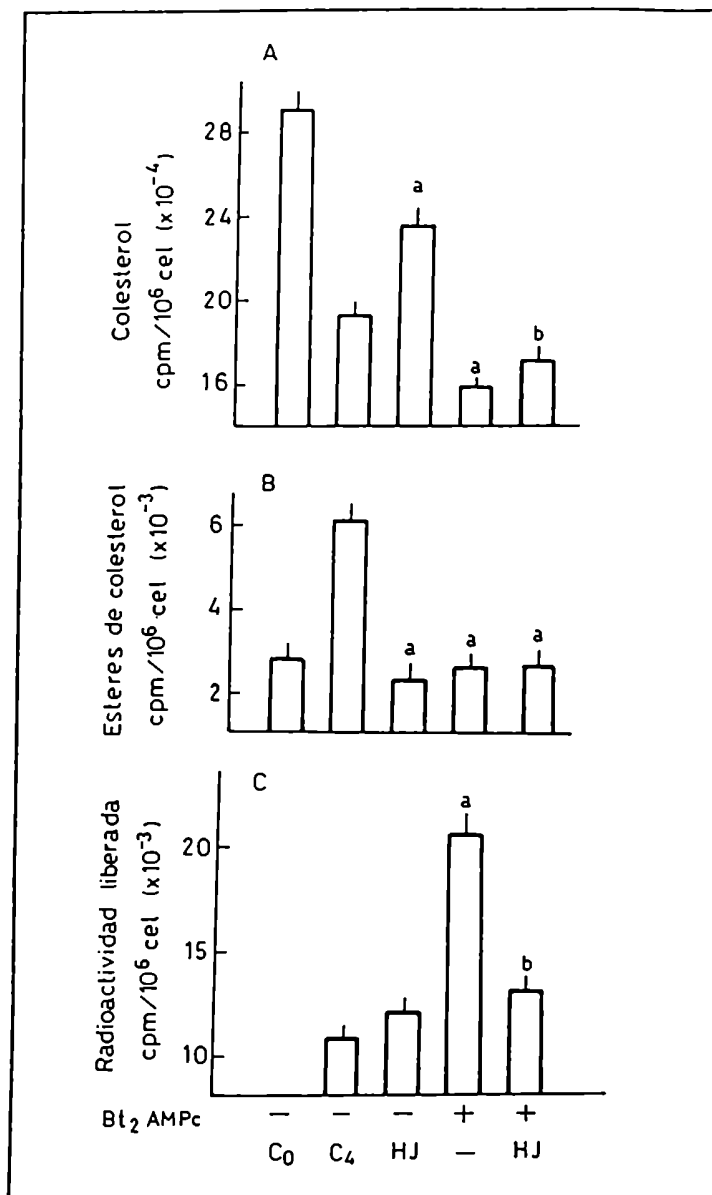


Figura 33: Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre el [³H]-colesterol unido a la membrana plasmática.

La membrana plasmática de células MA-10 se marcó con [³H]-colesterol como se indica en la sección Materiales y Métodos durante 2 horas. Luego de la marcación, los cultivos se lavaron 2 veces con medio de incubación y las células controles correspondientes al tiempo cero se cosecharon inmediatamente (C₀), o bien se incubaron durante 4 horas a 37°C en 2 ml de medio de cultivo sin adiciones (C₄), o con el análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M), Bt₂AMPc (1mM), o el análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M) y Bt₂AMPc (1mM). Luego de la incubación, el medio se removió y guardó para medir la radioactividad liberada (panel inferior). La radioactividad del colesterol libre (panel superior) o de los ésteres de colesterol (panel intermedio) se separó por cromatografía en capa delgada y luego se cuantificó. Los datos representan la radioactividad promedio ±ES de tres experimentos (tratamientos por triplicado en cada experimento). ^aP<0,001 cuando se lo compara con el control (C₄); ^bP<0,01 cuando se lo compara con el control (C₄).

que se encuentra en la membrana plasmática, observándose un incremento en los niveles de [³H]-colesterol libre. En la Fig. 33 (C) se observa un perfil de inhibición similar al efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis.

4.2. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre los ésteres de colesterol.

El pool de los ésteres de colesterol de las células MA-10 se incrementó al incubar las células toda la noche con 50 µg/ml de LDL, de esta forma la concentración de los ésteres de colesterol fue lo suficientemente alta como para poder ser debidamente medida utilizando un "kit" de Boehringer Mannheim como se describió en Materiales y Métodos.

Los datos presentados en la tabla 2 muestran los efectos de 4 tratamientos diferentes sobre la masa de los ésteres de colesterol intracelular. La incubación de células MA-10 con dibutil AMP cíclico (1mM) por 4 horas resultó en una disminución del 50% en las concentraciones de los ésteres de colesterol celular.

Cuando estos experimentos se realizaron en presencia del análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) o del análogo de la HJ [DF] (10^{-4} M) y dibutil AMP cíclico, no se observaron cambios en la masa de los ésteres de colesterol celular respecto a los valores basales. La utilización de un compuesto que inhibiera alguna de las enzimas del camino biosintético de la progesterona, impediría el consumo del colesterol celular y por lo tanto resultaría un buen control para el experimento. En este caso decidimos utilizar aminoglutetimida [AG] que resulta ser un conocido inhibidor del complejo enzimático que escinde la cadena lateral del colesterol (CSCC). Incubaciones con aminoglutetimida [221] (50 µM) en combinación con dibutil AMP cíclico (1 mM) en cultivos de células MA-10 no alteró la masa de los ésteres de colesterol celular.

De esta forma se podría concluir que la estimulación de las células MA-10 resulta en una disminución de las reservas de los ésteres de colesterol unicamente cuando son utilizados para la síntesis de hormonas esteroideas.

Adiciones			Esteres de colesterol
Bt ₂	AMPc	Análogo HJ	μg/10 ⁶ cel
-		-	6.04 ± 0.50
-		+	6.24 ± 0.59
+		-	3.07 ± 0.20*
+		+	6.85 ± 0.38
+		AG	6.60 ± 0.40

Tabla 2: Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre los ésteres de colesterol.

Las células MA-10 se preincubaron durante toda la noche con (50μg/ml) de LDL. Al iniciar el experimento (t=0), las células se lavaron 3 veces, y al medio de cultivo fresco se le agrega el análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M), Bt₂AMPc (1mM), el análogo de la HJ [DF] (10⁻⁴M) y Bt₂AMPc (1mM) juntos, o aminoglucetimidina [AG] (50μM) y Bt₂AMPc (1mM). Luego de 4 horas de incubación a 37°C, se removió el medio, se rastrillaron las células y los ésteres de colesterol se determinaron como se describió en Materiales y Métodos. Cada valor representa al promedio ±ES de 3 experimentos realizando triplicados en cada experimento. *P<0,001.

4.3. Inhibición de la colesterol esterasa.

La hidrólisis de los ésteres de colesterol puede ser medida en células intactas bloqueando previamente a la enzima colesterol acil transferasa (ACAT), que esterifica al colesterol, con el compuesto 58-035 [215].

Las células MA-10 se trataron durante toda la noche con 50 $\mu\text{g/ml}$ de LDL, de esta forma la concentración de los ésteres de colesterol fue lo suficientemente alta como para poder ser debidamente medida por un "kit" comercial.

Los datos presentados en la fig. 34 (A) muestra los efectos de 5 tratamientos diferentes sobre los ésteres de colesterol celular.

El compuesto 58-035 ($2\mu\text{g/ml}$) causó una disminución de los ésteres de colesterol de aproximadamente el 20% luego de 4 horas de incubación. El agregado del compuesto 58-035 ($2\mu\text{g/ml}$) más dibutiril AMP cíclico (1mM) a las células MA-10 resultó en una hidrólisis neta con una disminución en la concentración de los ésteres de colesterol de un 50 %. El tratamiento de las células MA-10 con el análogo de la HJ [DF] (10^{-4}M) solo o en presencia de dibutiril AMP cíclico (1mM), más el agregado del compuesto 58-035 ($2\mu\text{g/ml}$), no alteró la masa de los ésteres de colesterol celular, indicando que el análogo de la HJ [DF] afectaría la actividad de la enzima colesterol esterasa.

El porcentaje de hidrólisis de los ésteres de colesterol se determinó como está descrito en Materiales y Métodos. A la mayor concentración de inhibidor ensayada (Fig. 34 B), la actividad de la colesterol esterasa retorna a los valores basales.

4.4. Síntesis "de novo" de colesterol.

Además de utilizar el colesterol proveniente de las reservas intracelulares (ésteres de colesterol), y el presente en la membrana plasmática, las células de Leydig sintetizan colesterol para generar el sustrato necesario para asegurar la biosíntesis de esteroides. Este proceso es fundamentalmente importante cuando las células se someten a largos períodos de estimulación durante los cuales las reservas intracelulares se consumen.

Tal como se describió en la Introducción, la hormona juvenil comparte parte del camino de la síntesis isoprenoide con los mamíferos, el mismo que conduce a la síntesis de colesterol.

El siguiente experimento se realizó para determinar si la presencia de un compuesto como el análogo de la HJ [DF] afectaba la síntesis de colesterol.

Las células MA-10 se incubaron durante 4 horas a 37°C con 1,5 μCi de ^{14}C -ácido acético y los factores a estudiar. Luego de la incubación la monocapa de células de cada disco se trató como se indicó previamente en Materiales y Métodos para la determinación del colesterol libre y los ésteres de colesterol.

Los resultados mostraron que la presencia del análogo de la HJ [DF] (10^{-4}M) inhibía la síntesis "*de novo*" de colesterol, observándose además un menor nivel de ésteres de colesterol (Fig. 35).

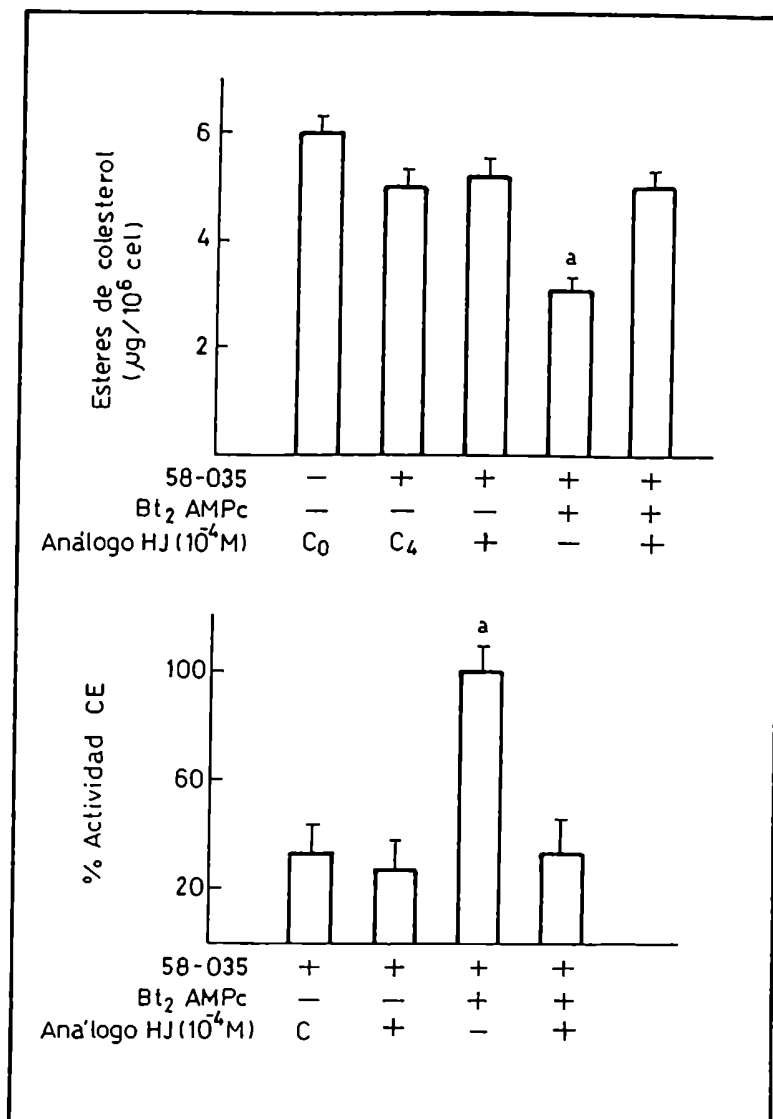


Figura 34: Inhibición de la colesterol esterasa.

Las células MA-10 se preincubaron durante toda la noche con (50 µg/ml) de LDL. Panel superior: a tiempo cero se lavaron los discos 2 veces con medio de cultivo y las células controles correspondientes al tiempo cero se cosecharon inmediatamente (C₀), o bien se incubaron durante 4 horas a 37°C en 2 ml de medio de cultivo conteniendo los factores indicados. El inhibidor de la ACAT (58-035) 2µg/ml se agregó para evitar la resíntesis de los ésteres de colesterol, y de esta forma poder determinar la hidrólisis de los ésteres. Luego de 4 horas de incubación el medio de cultivo se removió y los ésteres de colesterol se determinaron como se indica en la sección Materiales y Métodos. (C₄) células controles que contienen únicamente al compuesto (58-035). Panel inferior: el porcentaje de actividad de la colesterol esterasa se calculó como la diferencia entre las cantidades de ésteres de colesterol a tiempo cero y luego de 4 horas de incubación con los diferentes tratamientos. Cada barra representa el promedio ±ES de determinaciones por triplicado. ^aindica que el valor difiere del control con P<0,001.

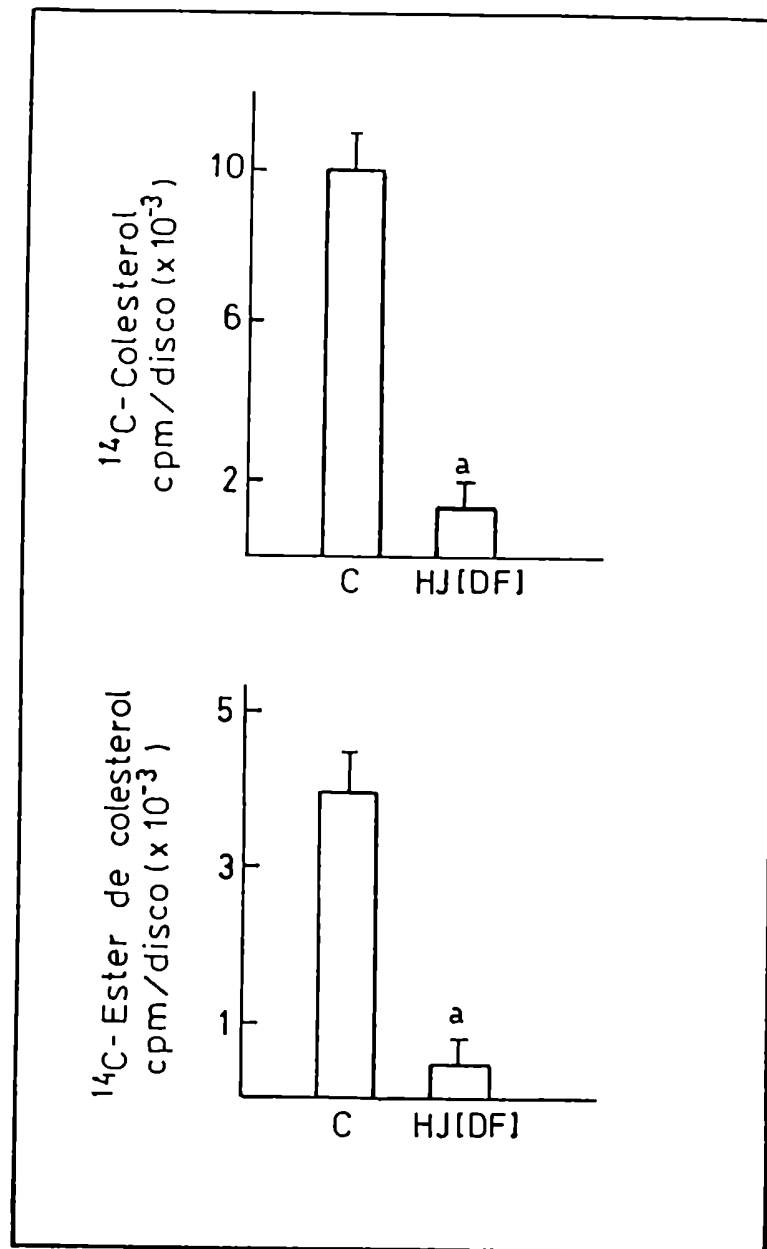


Figura 35: Síntesis de novo de colesterol.

Las células MA-10 se agruparon de acuerdo al tratamiento realizado en [C] (células controles) y [DF] (análogo de la HJ [DF] 10^{-4}M). Luego de 4 horas de incubación con $1,5\mu\text{Ci}$ de ^{14}C -ácido acético, se descartó el medio de incubación y se determinó el colesterol libre (panel superior) y los ésteres de colesterol sintetizados (panel inferior). Cada barra representa el promedio $\pm\text{ES}$ de determinaciones por triplicado. ^aindica que el valor difiere del control con $P < 0,001$.

CAPITULO V. Células normales.

El siguiente experimento se realizó con el fin de determinar si el comportamiento por parte del análogo de la HJ [DF] se podría hacer extensivo a células normales.

5.1. Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre células de Leydig normales.

Se utilizó el procedimiento descrito en Materiales y Métodos para el aislamiento de células de Leydig. Las células se utilizaron en una dilución apropiada, aproximadamente 1.000.000 células/ml, en un volumen de reacción de 500 μ l. Para determinar si la presencia del análogo de la HJ [DF] manifestaba un comportamiento similar al observado previamente en células tumorales, las células de Leydig normales se incubaron con concentraciones crecientes del análogo de la HJ [DF] (10^{-9} M- 10^{-5} M) y tres concentraciones crecientes de LH (10, 50, 200 ng) durante 4 horas en un medio de cultivo M199 suplementado con BSA 0,5%.

En ausencia del análogo de la HJ [DF] se observó un incremento significativo en la síntesis de testosterona en forma dosis dependiente de la concentración de LH. Se observó que el agregado del análogo de la HJ [DF] reprodujo el efecto inhibitorio, y que notablemente una concentración muy inferior a la que empleáramos previamente, como 10^{-8} M producía un efecto inhibitorio muy importante (Fig. 36). Al utilizar mayores concentraciones el efecto inhibitorio fue similar al observado al utilizar una concentración de 10^{-8} M. Las células se trataron con el colorante azul tripan como se describió en Materiales y Métodos para analizar la viabilidad celular luego del ensayo.

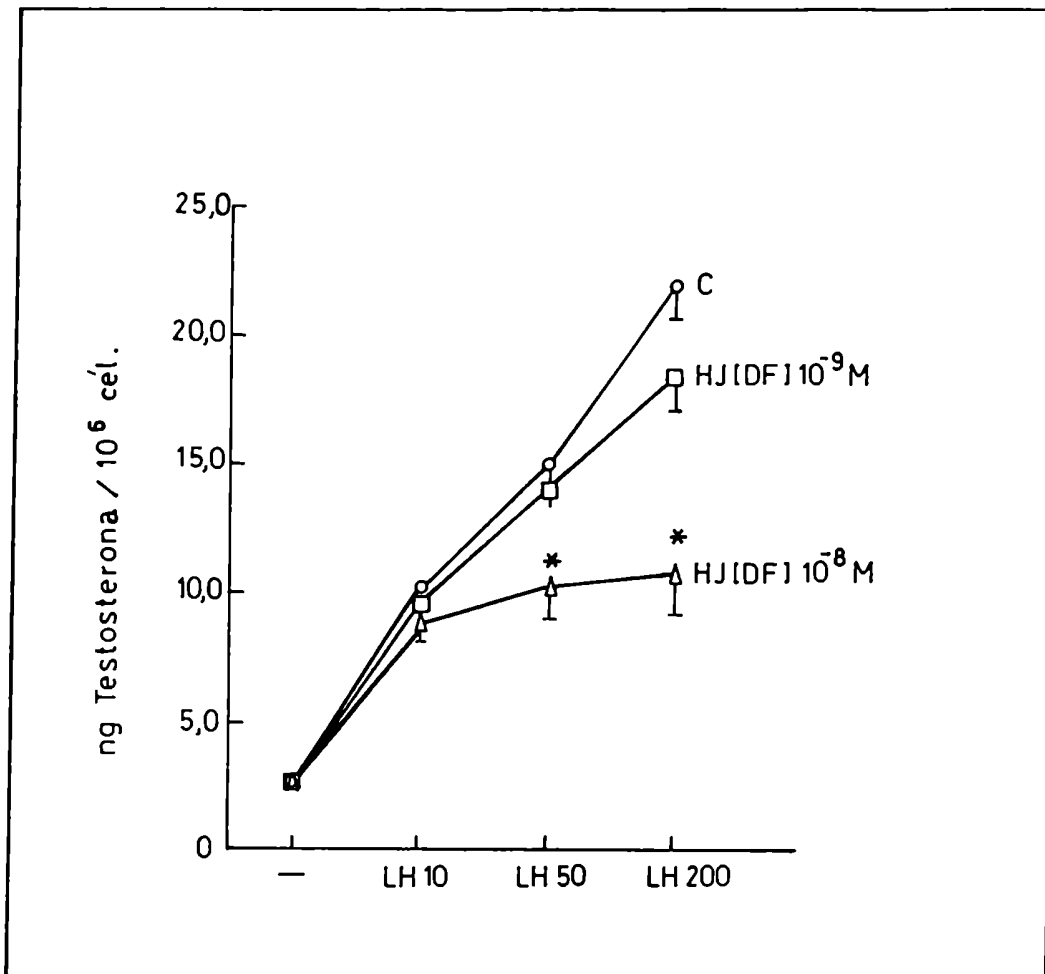


Figura 36: Efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la síntesis de testosterona en células de Leydig normales.

Las células de Leydig normales se incubaron durante 4 horas con concentraciones crecientes del análogo de la HJ [DF] (10^{-9} M- 10^{-5} M) y tres concentraciones de LH (10, 50, 200 ng). La testosterona del medio de cultivo se determinó por radioinmunoanálisis. Los valores representan el promedio de incubaciones realizadas por triplicado de un experimento representativo. *indica que el valor difiere del control con $P < 0,001$.

DISCUSSION

Se conoce que la hormona juvenil III es la principal hormona gonadotrófica de los insectos y que comparte el comienzo de su camino biosintético con el camino que en los mamíferos conduce a la síntesis de colesterol. El sitio de bifurcación entre insectos y mamíferos se produce luego de la síntesis del farnesil pirofosfato, compuesto que posee el esqueleto que dará lugar a la formación de la hormona juvenil III.

El estudio del efecto de la hormona juvenil III sobre la capacidad esteroidogénica en células de mamíferos se inició utilizando como modelo la línea de células tumorales de Leydig MA-10 [112]. La principal ventaja en lo que respecta a su utilización radicó en la posibilidad de poseer una línea clonal de células inmortales capaces de mantenerse en cultivo. Si bien se trata de una línea tumoral, esta comparte muchas características con las células de Leydig normales. En lo que respecta a su sistema de síntesis de hormonas esteroideas presenta sin embargo una deficiencia enzimática en la actividad de la 17α -hidroxilasa por lo que el principal esteroide sintetizado por este tipo de células es progesterona en lugar de testosterona.

Los experimentos se iniciaron tratando de determinar el efecto de la presencia de la hormona juvenil III en el medio de cultivo de estas células tumorales cuando se incubaban en presencia de una hormona como la gonadotropina coriónica humana (hCG), la que estimula la síntesis esteroidea a través de la activación de receptores específicos ubicados sobre la superficie celular.

Estos experimentos nos permitieron determinar que la presencia de la hormona juvenil III inhibía en una forma dosis dependiente el efecto estimulador producido por 5ng/ml de hCG luego de 4 horas de incubación. Este efecto se caracterizó por una dosis de inhibición media (CI_{50}) de $5 \times 10^{-5}M$ (15 μ g/ml), encontrándose que a la máxima concentración de hormona juvenil III utilizada ($10^{-4}M$), la producción de progesterona se inhibía alrededor del 90%.

Al concluir las incubaciones y retirar el medio de cultivo para la determinación de las hormonas producidas, las células MA-10 se trataron con el colorante azul tripan para determinar la viabilidad celular luego del tratamiento con los factores en estudio.

El efecto inhibitorio de la HJ III sobre la producción de progesterona no se relacionó con una disminución en la viabilidad celular, siendo esta similar a la obtenida en las células controles.

Dado que la HJ III producía un efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig MA-10, el estudio se continuó utilizando análogos sintéticos de la hormona juvenil. Estos compuestos químicos sintéticos poseen la capacidad de imitar el comportamiento de las hormonas juveniles naturales, brindando como ventaja alternativa la posibilidad de una mayor resistencia a ciertos agentes degradativos los cuales disminuirían su actividad. Durante muchos años los químicos han tratado de mejorar la actividad de estos compuestos por medio de la síntesis orgánica a través de sustituciones químicas en el esqueleto isoprenoide de la hormona juvenil, hasta llegar a obtener miles de compuestos sintéticos de estructura isoprenoide y no isoprenoide que poseían características de hormona juvenil, en muchos casos con una actividad incrementada cientos de veces, y una mayor capacidad para resistir la degradación [59-62].

Los experimentos realizados con los análogos de la hormona juvenil revelaron que muchos de estos compuestos actuaban de la misma forma que la HJ III, es decir inhibían la producción de progesterona en células de Leydig MA-10 cuando estas se encontraban estimuladas con hCG. Sin embargo se pudo apreciar que la intensidad del efecto inhibitorio variaba de acuerdo al compuesto utilizado, encontrándose que algunos poseían una menor actividad inhibitoria sobre la síntesis esteroidea, y otros una actividad inhibitoria varias veces superior a la de la hormona juvenil III.

La naturaleza de la estructura química así como también el tipo de sustituyentes de cada análogo determinó una intensidad para el efecto inhibitorio diferente. En este análisis se pudo detectar con especial interés el efecto de un compuesto análogo de la [HJ] de estructura no isoprenoide de nombre [2-(4 fenoxifenoxi)etoxitetrahidropirano] numerado como el compuesto VIII en la figura 7 y que abreviamos como [DF], que inhibió la producción de progesterona en las células estimuladas con hCG hasta en un 90% luego de 4 horas de incubación.

El coeficiente de inhibición medio (CI₅₀) fué $3 \times 10^{-6}M$, siendo este último menor al de la hormona juvenil III, y por ende mostrando que el análogo ejercía su

efecto de manera más intensa. Debido a este último resultado la mayor parte de los experimentos se llevaron a cabo utilizando este análogo de la HJ.

Al llegar a este punto fue fundamental determinar que la inhibición observada se debiese verdaderamente a una disminución en la síntesis de progesterona y no a un aumento en el metabolismo de esta. Se sabe que el metabolismo de progesterona en las células MA-10 conduce a un incremento en la formación de 20-OH progesterona. El medio de cultivo proveniente de los experimentos en los que se determinó la inhibición en la producción de progesterona se utilizaron para determinar 20-OH progesterona. Los resultados revelaron un efecto inhibitorio similar al descrito también al determinar 20-OH progesterona, por lo que se podría concluir que la inhibición observada no se debía a un incremento en el metabolismo de progesterona.

Una vez detectado el efecto inhibitorio sobre la síntesis de progesterona, el estudio se continuó realizando modificaciones en las diferentes variables del cultivo celular para tratar de detectar si es que estas variaciones modificaban la forma e intensidad del efecto observado.

Una de las características más sobresalientes de las células de Leydig MA-10 consiste en la gran producción de progesterona al estimular las células. Si consideramos que en una célula de Leydig normal se produce un incremento en la producción de testosterona de aproximadamente 8 veces al estimular la célula con una dosis máxima de LH o hCG respecto a los valores en condiciones basales, en las células de Leydig MA-10 este incremento oscila las 200 veces [112]. Esto representa una gran ventaja, ya que cualquier influencia que modifique la producción de esteroides en las células MA-10 se reflejará a través de cambios en los niveles de hormona que son más fácilmente medibles.

Los estudios del efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig MA-10 se continuaron analizando si la variación en las concentraciones de la hormona hCG modificaba el efecto inhibitorio. La figura 18 mostraba como la producción de progesterona dependía de la concentración de hCG en forma dosis dependiente llegando a su máximo cuando la concentración de hCG era aproximadamente 2,5ng/ml luego de 4 horas de incubación.

Los mismas condiciones de cultivo se tuvieron en cuenta cuando se realizó el experimento en presencia de una dosis constante del análogo de la HJ [DF], el cual mostró que una variación en la concentración de hormona hCG no modificaba el perfil inhibitorio del análogo. A partir de este resultado se concluyó que el efecto del análogo de la HJ [DF] era independiente de la concentración de hCG utilizada para estimular la esteroidogénesis en las células de Leydig MA-10.

El tiempo de incubación tomado hasta este momento tenía su razón de ser a partir de los primeros datos publicados sobre las características de este tipo de células [112]. Según estos datos se mencionaba que la máxima producción de progesterona bajo condiciones estimuladoras se alcanzaba aproximadamente a las 4 horas de incubación.

Si bien ya se mencionó que la principal hormona producida por este tipo de células es la progesterona, (debido a una deficiencia en la actividad enzimática de la 17α -hidroxilasa, que imposibilita su metabolización para producir testosterona), luego de las 4 horas de incubación comienza a ser significativa la cantidad de progesterona que se metaboliza a 20-hidroxiprogesterona. De esta forma si se extendiese el período de incubación a tiempos muy largos se observaría una disminución en la cantidad de progesterona debido a su metabolización.

Volviendo a los estudios sobre el efecto del análogo de la HJ [DF], se procedió a analizar el efecto del aumento en el tiempo de incubación. Los datos se obtuvieron cada 2 horas, llegando a un tiempo máximo de incubación de 8 horas, tiempo superior al descrito (4 horas) como máximo para la estimulación esteroidogénica. Se observó que el efecto inhibitorio comenzaba a manifestarse desde un comienzo y que a mayor tiempo de incubación, el efecto inhibitorio no se revertía, sugiriendo que la presencia del análogo de la HJ [DF] producía su efecto inhibitorio en forma independiente al tiempo de incubación.

Conociendo que el estímulo gonadotrófico producido por el agregado de hCG al medio de cultivo celular inducía una serie de cambios que daban como resultado la síntesis de progesterona, nos interesó conocer si el efecto inhibitorio observado al agregar el análogo de la HJ [DF], se vería influenciado si este se agregaba a diferentes tiempos luego de iniciar la incubación con el estímulo gonadotrófico o si se agregaba a diferentes tiempos previo a la incubación con hCG.

El análogo de la HJ [DF] se agregó al medio de cultivo de las células de Leydig MA-10 variando el tiempo de preincubación hasta llegar a 45 minutos (con intervalos de 15 minutos) antes del agregado de hCG. Luego de 4 horas de incubación, el mayor tiempo de preincubación no evidenció ningún incremento en el efecto inhibitorio producido por el análogo de la HJ [DF].

Otra serie de experimentos se comenzaron por el agregado del estímulo gonadotrófico al medio de cultivo a tiempo cero, seguido luego por el agregado del análogo de la HJ [DF] a distintos tiempos, hasta llegar a un tiempo límite de 30 minutos para el agregado del análogo de la HJ [DF] luego de estimular las células. Tampoco en estos experimentos se encontraron cambios significativos en el perfil inhibitorio observado hasta el momento. El hecho de iniciar el experimento estimulando las células y de esta forma activar todos los eventos que conducen a la síntesis de progesterona no fueron suficientes para evitar el efecto inhibitorio al agregar el análogo de la HJ [DF] al medio de cultivo.

Cuando las células de Leydig responden al estímulo de hCG, lo hacen mediante la alteración de las propiedades o velocidad de síntesis de proteínas preexistentes o iniciando la síntesis de nuevas proteínas. Los mensajeros intracelulares y los cambios que ellos producen en las proteínas intracelulares modifican las funciones de varios componentes celulares, los que a su vez proveen la respuesta al estímulo original. En el caso de las células de Leydig, el mecanismo desencadenado por la unión de hCG a sus receptores específicos de membrana ha sido ampliamente estudiado [115,149,150] y conduce a un incremento del segundo mensajero AMP cíclico.

Se conoce desde hace tiempo que el AMPc incrementa la síntesis de andrógenos en las células de Leydig [153] y que la hormona hCG incrementa sus niveles [154-156]. En vista a la gran evidencia en cuanto al efecto inhibitorio sobre la síntesis de progesterona por parte del análogo de la HJ [DF], y el rol de intermediario del AMPc del efecto estimulador inducido por hCG, nos propusimos determinar de qué forma la presencia del análogo de la HJ [DF] afectaba la síntesis de AMPc, en células estimuladas con hCG.

Las células se estimularon con 5ng/ml de hCG en presencia de concentraciones de la HJ III y del análogo de la HJ [DF] que variaban entre 10^{-6} M y 10^{-4} M. La presencia de la HJ III y de su análogo [DF] permitió determinar que ambos inhibían la producción del segundo mensajero AMP cíclico estimulada por hCG.

Considerando que al estimular las células MA-10 con hCG se produce un incremento en la producción de AMPc el cual desencadena una serie de eventos que conducen a la estimulación esteroideogénica, una inhibición a nivel de este segundo mensajero sin duda conduciría a una inhibición en la producción de progesterona. Además el experimento permitió corroborar que el análogo de la HJ [DF] seguía manteniendo una actividad inhibitoria mayor si se comparaba con la hormona juvenil III.

Nos llamó la atención el hecho de que la dosis de inhibición media (CI_{50}) sobre la producción de AMPc fuese del orden de 10^{-5} M, y sobre la producción de progesterona del orden de 10^{-6} M para el análogo de la HJ [DF]. Esta diferencia se justificaría posteriormente al analizar con mayor detenimiento que sucedía en el camino biosintético de la progesterona.

En lo que respecta a la medición de progesterona y de AMP cíclico, estos se realizaron a partir de alícuotas del medio de cultivo, lo que representaría el medio extracelular y por ende lo que se libera al medio de cultivo. Debido a que el efecto observado constituye una disminución en el medio extracelular, cabe preguntarse si la HJ III y su análogo [DF] afectarían de alguna manera el flujo de progesterona y de AMPc del interior celular al medio extracelular. Por lo que decidimos realizar los mismos experimentos, aunque en lugar de determinar la progesterona y el AMPc liberados al medio extracelular en este caso procedimos a realizar determinaciones intracelulares.

Luego de estimular las células con hCG el nivel de progesterona extracelular fue 200 veces superior al nivel intracelular. Siguiendo la técnica descrita en Materiales y Métodos se pudo determinar que la presencia del análogo de la HJ [DF] reducía también los niveles intracelulares de progesterona.

En condiciones basales esta diferencia entre el nivel de progesterona extracelular y el intracelular se reduce a 4 veces. Durante el desarrollo del experimento en condiciones basales se observó que un incremento en la concentración del análogo de la HJ [DF] producía un incremento en la producción de progesterona, y esta variación no se vió acompañada por ningún cambio detectable a nivel intracelular.

Se puede concluir que el análogo de la HJ [DF] no modificaría el flujo de progesterona del interior celular al exterior, debido a que no se observaron cambios significativos en presencia del análogo de la HJ [DF] en el nivel de progesterona intracelular. Además se observó que si bien se producía un incremento de unas 200 veces en la progesterona del medio de cultivo al estimular las células con hCG respecto a las células controles, los cambios que se producían a nivel intracelular eran mucho más reducidos, lo cual sustentaría la hipótesis de que la progesterona que se produce es rápidamente liberada al medio extracelular.

El aumento observado en condiciones basales, al incrementar la concentración del análogo de la HJ [DF] en el medio de cultivo sugieren que su comportamiento diferiría de lo observado cuando la célula se encontraba estimulada. Sin embargo hay que considerar que aunque la diferencia es significativa respecto a los valores controles, es muy inferior en cuanto a magnitud si se lo compara con un efecto tan importante como es la estimulación con hCG, o el efecto inhibitorio mismo que presenta el análogo de la HJ [DF] sobre este efecto estimulador.

Si bien observamos el mismo perfil de comportamiento al determinar la cantidad del segundo mensajero AMPc intracelular y extracelular, con lo cual llegaríamos a las mismas conclusiones a las que arribamos al realizar el análisis sobre el efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la producción de progesterona en condiciones estimuladoras y basales a nivel intracelular, cabe destacarse que en lo que respecta al AMPc, este se encuentra en mayor cantidad en el interior celular respecto al medio extracelular en condiciones basales.

Estos resultados son inversos a los valores obtenidos anteriormente al determinar progesterona, sin embargo concuerdan con descripciones de bibliografía. En el caso del AMPc, no se observaron diferencias significativas en condiciones basales respecto a la concentración del análogo de la HJ [DF]. Nuevamente la

presencia del análogo de la HJ [DF] no modificaría el flujo del segundo mensajero que en las células de Leydig se liberan al medio extracelular.

A partir de los datos que se obtuvieron hasta este momento los esfuerzos de la investigación se dirigieron hacia la búsqueda de los sitios de acción del análogo de la HJ [DF] sobre el camino que conduce a la producción de esteroides en las células de Leydig. Los resultados demostraron que el análogo de la HJ [DF] inhibía la esteroidogénesis al menos inhibiendo la formación del segundo mensajero AMPc por lo que se deducía que un posible sitio de acción se encontraría localizado entre el camino de la trasducción de la señal hormonal y la formación del segundo mensajero [174].

El mecanismo involucrado en la formación del segundo mensajero AMPc se halla ampliamente descrito para las células de Leydig. Este comienza con la unión de las hormonas LH o hCG a su receptor específico [151]. Estos receptores se encuentran ubicados en la membrana plasmática y tienen la capacidad de unir LH y hCG con un alta afinidad ($10^{10}M^{-1}$). Este sistema indudablemente es de gran importancia en la estimulación de la producción esteroidea por las células testiculares de Leydig.

La interacción del complejo hormona receptor conduce a la activación de la proteína G estimuladora "Gs", que es el nexo entre la señal externa y la activación de la subunidad catalítica interna la adenilil ciclasa (C). Esta última convierte el ATP intracelular en el segundo mensajero AMPc, el que desencadenará una serie de eventos intracelulares con el fin de lograr un incremento en la producción de esteroides hormonales [187].

Si el análogo de la HJ [DF] lograra interferir en la unión de LH o hCG con su receptor entonces lograría inhibir la esteroidogénesis mediante la inhibición de la formación del segundo mensajero AMPc.

El estudio se continuó analizando los receptores para LH/hCG. Las membranas utilizadas durante el experimento provenían de células controles, y de células tratadas con el análogo de la HJ [DF]. Si la presencia del análogo de la HJ[DF] afectara a los receptores, esto se reflejaría en los resultados obtenidos de la aplicación del método de Scatchard.

En los ensayos para determinar el número de receptores por células y la afinidad de estos receptores, se observó que la presencia del análogo de la HJ [DF] no afectaba el número de receptores ni la afinidad por LH o hCG. Los parámetros cinéticos obtenidos fueron similares tanto para las células controles como para las tratadas con el análogo de la HJ [DF], siendo a su vez comparables con los valores reportados previamente en la literatura [91].

Al no observar una modificación en el número ni en la afinidad de los receptores por LH/hCG, continuamos los estudios analizando las proteínas "G" que pertenecen al sistema adenilil ciclasa.

Como se describió previamente entre el proceso de ocupación del receptor de LH y el aumento de la actividad de la adenilil ciclasa (C) existen proteínas "G" transductoras de la señal hormonal. Estas proteínas tienen la propiedad de unirse a Mg y nucleótidos de guanina (GTP) [169]. En realidad estas proteínas se encuentran conformadas por la unión de 3 subunidades denominadas α , β , y γ . Cuando se estimula al receptor de LH la proteína G estimuladora "Gs" en este caso une GTP, y la activación se produce al disociarse por un lado en la subunidad " $G\alpha_s$ " activa, que actúa estimulando directamente a la subunidad catalítica adenilil ciclasa, y por el otro las subunidades " $G\beta\gamma$ ".

También existen proteínas G inhibitorias "Gi", formadas por subunidades similares a las descritas para la proteína "Gs", sin embargo al estimularse la "Gi" en este caso la subunidad " $G\alpha_i$ " actuaría inhibiendo a la adenilil ciclasa, mientras que las subunidades " $G\beta\gamma$ " se asociarían a subunidades " $G\alpha_s$ " inhibiendo la actividad de las proteínas "Gs".

El siguiente paso en nuestro estudio consistió en estudiar la unión de GTP [169] a preparados de membranas de células de Leydig en los cuales se encuentran situadas las proteínas "G". Se determinó el efecto de la presencia del análogo de la HJ [DF] sobre la unión de GTP a las proteínas de membrana, y observamos que su presencia durante las incubaciones no afectó este tipo de unión necesaria como describimos previamente para la activación de las proteínas "G".

Además de la activación de las proteínas "G" a través de la activación del receptor para LH/hCG, estas proteínas se pueden activar mediante la utilización de agentes farmacológicos que actúan directamente sobre ellas. Estos compuestos permiten al actuar selectivamente sobre las proteínas "G" estimuladoras o inhibitorias en forma independiente desarrollar experimentos que permiten determinar la funcionalidad de cada una de ellas por separado.

La toxina del cólera (TC) es un compuesto cuyo efecto sobre la proteína G estimuladora "Gs" ha sido ampliamente descrito en la literatura. Este compuesto tiene la propiedad de interactuar en forma directa con la proteína "Gs" activandola de forma tal que a concentraciones suficientemente elevadas produce una estimulación similar a la obtenida a través de la activación del receptor de LH/hCG en la formación del segundo mensajero AMPc.

La estimulación en la formación del segundo mensajero AMPc inducida por la toxina del cólera, se revirtió en incubaciones realizadas en presencia del análogo de la HJ [DF]. Sin embargo cuando se utilizó una concentración máxima de toxina del cólera como 100ng/ml, la estimulación no pudo ser inhibida por el análogo de la HJ [DF]. Con este resultado solo no podríamos asegurar que el análogo de la HJ [DF] estuviese afectando la actividad de la proteína G estimuladora ya que en el camino de la transducción de la señal hormonal se encuentra involucrada también la actividad de la adenilil ciclasa, por ende solo luego de analizar la actividad de esta última se podría sugerir algún efecto por parte del análogo de la HJ [DF] sobre la proteína "Gs". Resulta interesante observar que el efecto inhibitorio producido por el análogo de la HJ [DF] se pudo revertir utilizando una concentración suficientemente elevada de la toxina del cólera, sugiriendo la presencia de un efecto inhibitorio reversible.

Otro de los compuestos farmacológicos ampliamente utilizados para estudiar como actúan las proteínas "G" consiste en la toxina pertussis. Esta toxina tiene la particularidad de actuar en forma directa sobre la proteína G inhibitoria "Gi" inhibiendo su acción [170]. La inhibición de una proteína que inhibe conduciría teóricamente a obtener una estimulación debido a que en el sistema en estudio se desregula el balance entre los dos tipos de proteínas G.

En condiciones basales el agregado de la toxina pertussis produjo un incremento de 3 veces sobre el valor basal de progesterona, como se ha mencionado anteriormente en este tipo de células los incrementos en condiciones estimuladoras son mucho mayores, por lo que si bien se ha determinado que existe este incremento y es significativo respecto a los valores basales, su magnitud es muchísimo menor al obtenido al estimular las células. Sin embargo se podría pensar que este aumento se debiera tal vez a la inhibición de la proteína G inhibitoria.

La presencia del análogo de la HJ [DF] en células estimuladas con hCG e incubadas con la toxina pertussis siguió inhibiendo la producción de progesterona, sin embargo se evidenció un cambio en la magnitud del efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc. La producción del segundo mensajero aunque inhibida, presentaba mayores niveles por lo que el agregado de la toxina pertussis modificó en alguna medida la forma de inhibición observada.

Al finalizar los experimentos realizados sobre los componentes regulatorios que median la señal hormonal quedó claro que los resultados debían completarse con un estudio sobre la actividad del componente catalítico de la adenilil ciclase. Estos experimentos se llevaron a cabo mediante la utilización de un compuesto derivado de una raíz "*forskolina*" que es capaz de estimular en forma directa a la adenilil ciclase y de esta forma obtener un aumento en la producción de AMPc. La ventaja de su utilización radica en el hecho de poder realizar un estudio directo sobre la actividad del componente catalítico sin tener en cuenta la influencia de otras proteínas, no activadas mediante su utilización. A su vez las incubaciones realizadas en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa como [MIX], aseguraron la independencia de los efectos de esa enzima.

Para realizar estos experimentos se utilizaron varias concentraciones de forskolina, obteniendo al determinar la producción de AMPc, una respuesta dosis dependiente. A pesar de no estar activados ni los receptores para LH/hCG ni las proteínas "G" que median su efecto, la estimulación de la subunidad catalítica fue capaz de producir un incremento en los niveles de AMPc comparables a los obtenidos al utilizar una dosis máxima de hCG.

Una vez más la presencia del análogo de la HJ [DF] inhibió el efecto estimulador que producía la forskolina sobre la producción de AMPc. En este caso se utilizaron también varias concentraciones del análogo de la HJ [DF], sin embargo es interesante mencionar que para las concentraciones del análogo [DF] utilizadas, el efecto inhibitorio persistía inclusive al utilizar una dosis de forskolina (100µM) que producía una estimulación significativa de la adenilil ciclasa.

El hecho de que la forskolina sea un compuesto que actúe directamente sobre la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa como se ha descrito previamente, y que que el análogo de la HJ [DF] en cultivos celulares tratados con forskolina manifestara un efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc nos sugiere que la propia adenilil ciclasa podría ser el blanco de la acción del análogo de la HJ [DF].

A partir de los resultados obtenidos y sabiendo que en un caso se utilizaba un compuesto farmacológico que activaba directamente la adenilil ciclasa, mientras que en el otro se utilizaba un compuesto que activaba a la proteína "Gs", que a su vez se encargaba de activar la adenilil ciclasa, se podría plantear la posibilidad de que los sitios en los que actuaría tanto la subunidad α_s de la proteína "Gs" como el compuesto *forskolina* no serían los mismos, y por lo tanto justificaría de esta forma los resultados observados.

Finalmente como un hecho adicional procedimos a determinar la actividad de la adenilil ciclasa a partir de membranas de células de Leydig MA-10 [208]. El efecto de la presencia del análogo de la HJ [DF] se determinó por dos métodos, realizando el experimento "*in vivo*" en el cual las membranas procedían de células que habían sido tratadas con el análogo de la HJ [DF] durante una incubación de 4 horas previas al aislamiento de las membranas y un experimento "*in vitro*" en el cual a membranas control se le agregaba el análogo de la HJ [DF] durante la determinación de la actividad de la ciclasa.

En estos experimentos observamos que la presencia del análogo de la HJ [DF] durante la determinación de la actividad de la adenilil ciclasa "*in vivo*" o su presencia previamente durante la incubación de las células "*in vitro*" modificaba la actividad de la adenilil ciclasa.

En ambos casos se puso de manifiesto el caracter inhibitorio del análogo de la HJ [DF] sobre la actividad de la adenilil ciclasa. Con toda esta serie de experimentos resultó fuertemente apoyada la idea de una posible acción por parte del análogo de la HJ [DF] sobre la subunidad catalítica de la adenilil ciclasa.

Esto refuerza todos los resultados obtenidos hasta el presente, además la probable inhibición sobre la adenilil ciclasa conduciría a una disminución en la formación de AMPc, con la consecuente inactivación de la cascada de eventos sobre las proteínas quinasas, que resultaría en un efecto inhibitorio sobre la síntesis de hormonas esteroideas en las células MA-10. Los estudios discutidos hasta el momento revelaron que el análogo de la HJ [DF] podía regular la esteroidogénesis celular particularmente por actuar sobre el camino de la transducción de la señal de LH/hCG.

Si recordamos que las dosis de inhibición media (CI₅₀) al determinar la producción de progesterona y AMPc en las células MA-10 estimuladas y tratadas con el análogo de la HJ [DF] diferían en magnitud, sería probable que además del sitio de inhibición determinado hasta el momento existiese algún otro sitio ubicado luego de la síntesis del segundo mensajero AMPc. Esta hipótesis se verificó mediante la utilización de compuestos análogos del segundo mensajero AMPc, como el dibutilil AMPc [Bt₂AMPc], el cual actúa estimulando la biosíntesis esteroidogénica en forma similar a como lo haría el AMPc, sin involucrar en su forma de acción a los componentes de la membrana plasmática.

De esta manera se realizó un experimento en el cual las células MA-10 se incubaron en presencia de dibutilil AMPc, logrando un incremento en la producción de progesterona similar al observado al estimular las células con hCG. El agregado del análogo de la HJ [DF] a las células tratadas con [Bt₂AMPc] inhibió la estimulación de la esteroidogénesis. Este resultado confirmó la suposición anterior demostrando que el efecto inhibitorio se produciría se también en algún paso posterior a la formación del AMPc.

Estos resultados nos condujeron a continuar los estudios realizando una serie de experimentos para tratar de determinar el posible sitio de acción sobre el camino que conduce a la síntesis de progesterona. La síntesis de andrógenos en las células de Leydig involucra la conversión de colesterol a testosterona.

El camino biosintético comienza con el transporte del colesterol proveniente de tres fuentes diferentes (colesterol libre, ésteres de colesterol, síntesis "*de novo*" de colesterol) [189] hacia la mitocondria donde tiene lugar el clivaje que da como resultado la formación de pregnenolona.

La formación de pregnenolona a partir del colesterol, comprende algunos metabolitos intermediarios hidroxilados como el 20-hidroxicolesterol y 22 R-hidroxicolesterol [128-131]. Al comenzar los estudios para tratar de ubicar los posibles sitios de inhibición sobre el camino biosintético afectados por el análogo de la HJ [DF] tratamos de independizarnos de los efectos del transporte de colesterol.

La utilización de los derivados hidroxilados del colesterol como 25-OH colesterol y 20-OH colesterol suministraron un herramienta muy útil para el estudio de la conversión del colesterol a progesterona.

Entre las principales ventajas que ofrecieron la utilización de estos compuestos se destacaba que ellos eran capaces de atravesar las membranas plasmáticas y las membranas mitocondriales externa e interna sin necesidad de estar regulado su tráfico por la acción del sistema del transporte del colesterol, (que por otro lado se conoce muy poco), y se convierten en sustratos del complejo enzimático [CSCC] intramitocondrial (enzima que escinde la cadena lateral del colesterol).

La incubación de las células MA-10 con los compuestos 20-OH colesterol o 25-OH colesterol resultó en un significativo incremento en la producción de progesterona y el agregado de hCG aumentó aún más la producción. La presencia del análogo de la HJ [DF] durante las incubaciones resultó en un efecto inhibitorio sobre la estimulación de progesterona producida tanto por los compuestos hidroxilados de colesterol solos como en presencia de hCG. El hecho de independizarme de efectos de transporte de colesterol nos permitió confirmar que el análogo de la HJ [DF] afectaría alguna de las enzimas involucradas en la síntesis de progesterona situadas entre el colesterol y la progesterona.

Existen dos enzimas que se encargan de transformar el colesterol a progesterona. Una de ellas la enzima [CSCC] se encuentra situada en la membrana mitocondrial interna y debido a la complejidad de las funciones que regula durante mucho tiempo se la ha tratado como un complejo de enzimas aunque se describió que es una sola enzima con diferentes sitios activos [126].

Su función consiste en producir dos hidroxilaciones sobre el colesterol y luego la ruptura de la cadena lateral del colesterol dando como producto de su acción pregnenolona.

La otra enzima perteneciente al camino biosintético de la progesterona es la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa [3 β -HSD], esta enzima microsomal es la encargada de transformar la pregnenolona que proviene de la mitocondria en progesterona. Teniendo en cuenta los resultados del experimento realizado en presencia de los análogos hidroxilados del colesterol tendría bastante sentido suponer que una falla en la actividad de alguna de las dos enzimas podría ser la causa del efecto inhibitorio observado en el camino de la síntesis esteroidea.

La actividad de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa [3 β -HSD] se determinó en células intactas. Para ello las células MA-10 se incubaron en presencia del sustrato de la enzima, (pregnenolona). Los resultados revelaron que a la concentración utilizada, la síntesis de progesterona fué superior a la obtenida en células tratadas con hCG.

La adición del análogo de la HJ [DF] a las células incubadas con pregnenolona no inhibió la estimulación sobre la síntesis de progesterona. Este resultado reflejaría que el análogo de la HJ [DF] no afectaría la actividad de la [3 β -HSD]. Se tuvo especial cuidado en verificar que el anticuerpo utilizado para la determinación de progesterona no diera reacción cruzada con pregnenolona.

Estos resultados nos indicarían indirectamente que la enzima afectada por el análogo de la HJ [DF] perteneciente al camino biosintético de la progesterona sería la que escinde la cadena lateral del colesterol [CSCC]. Se llegaría a esta conclusión si consideramos que la síntesis de progesterona se encontraba inhibida en células tratadas con el análogo de la HJ [DF] cuando se estimulaban con derivados hidroxilados del colesterol, y no cuando se trataban con pregnenolona.

Decidimos continuar los experimentos tratando de determinar si la presencia del análogo de la HJ [DF] confirmaba lo expuesto sobre la actividad de la [CSCC]. Para esto utilizamos un compuesto capaz de inhibir la actividad de la [3 β -HSD], y de esta forma determinar la actividad de la [CSCC] en células intactas, mediante la determinación de la producción de pregnenolona.

En un experimento control se determinó la efectividad de la concentración de cianocetona [CC] utilizada para inhibir la [3 β -HSD]. Se observó un bloqueo casi total en la producción de progesterona al incubar células estimuladas con hCG en presencia de cianocetona.

El agregado del análogo de la HJ [DF] inhibió la acumulación de pregnenolona en células MA-10 tratadas con cianocetona [CC] y estimuladas con 25-OH colesterol. Este resultado sumado a los resultados en el cuales se determinó que el análogo de la HJ [DF] no afectaría a la enzima [3 β -HSD], y los resultados provenientes de las incubaciones en presencia de los análogos hidroxilados del colesterol sustentan la posibilidad de que el análogo de la HJ [DF] afectaría la actividad de la enzima [CSCC].

Luego de determinar el sitio en donde se produciría una deficiencia en la transducción de la señal hormonal a nivel de la membrana plasmática, y de verificar una posible disminución en la actividad de la enzima [CSCC] en el camino esteroideogénico que conduce a la producción de progesterona en células incubadas en presencia del análogo de la HJ [DF], resultó de interés verificar si el sustrato necesario para la síntesis esteroidea "*el colesterol*" sufría algún tipo de alteración ya sea en cuanto a su disponibilidad como a su síntesis "*de novo*" en presencia del análogo de la HJ [DF].

La disponibilidad del colesterol para la esteroideogénesis se regula por varios procesos que incluyen: la síntesis "*de novo*" del colesterol, la captación de LDL vía receptores para lipoproteínas, la liberación del colesterol esterificado a partir de reservas de gotas lipídicas intracelulares por una colesterol esterasa [CE] dependiente de AMPc, el transporte hacia la mitocondria, y la translocación desde la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna [121,189-192].

El colesterol se convirtió en un fuerte candidato para ser utilizado como marcador de la membrana plasmática por dos motivos principales:

- a) la gran proporción del colesterol celular que se encontraba localizado en la membrana plasmática;
- b) el fácil procedimiento descripto para marcarla selectivamente con colesterol radioactivo [194].

En las células MA-10 no estimuladas, la mayor parte del colesterol se transporta hacia la membrana plasmática donde permanece hasta que se lo utilice para la síntesis de progesterona. En cambio las células estimuladas que sintetizan hormonas en forma activa dirigen el transporte de este colesterol, que ordinariamente se hubiese alojado en la membrana plasmática, hacia el camino de la síntesis esteroidea. El efecto neto consiste en la internalización del colesterol.

En condiciones basales y luego de las 4 horas de incubación se observó que se producía una internalización del [^3H]-colesterol libre ubicado en la membrana plasmática para dar lugar a la formación de ésteres de [^3H]-colesterol. El agregado del análogo de la HJ [DF] modificó los niveles del [^3H]-colesterol, observando una disminución tanto en la internalización como en la síntesis de los ésteres de [^3H]-colesterol, sugiriendo que la presencia del análogo de la HJ [DF] afectaría los procesos descritos previamente.

Luego de 4 horas de incubación en presencia de factores estimulatorios de la esteroidogénesis como hCG o Bt_2AMPC , la cantidad del [^3H]-colesterol que se había utilizado para marcar a la membrana plasmática se internalizó significativamente, correlacionándose la disminución del [^3H]-colesterol con las descripciones previas acerca de su utilización en la biosíntesis esteroidea. Esto se pudo confirmar mediante la cuantificación del producto esteroide radioactivo liberado al medio de cultivo.

El agregado del análogo de la HJ [DF] a los experimentos anteriores revirtió en gran proporción la utilización del [^3H]-colesterol radioactivo en la síntesis esteroidea. Debido a que la internalización y el uso del colesterol de la membrana plasmática y de los ésteres de colesterol requieren un camino esteroidogénico funcional, parecería ser que la inhibición del camino esteroidogénico en células incubadas con el análogo de la HJ [DF] podría generar el principal efecto sobre la utilización de colesterol.

Se conoce que en este tipo de células, durante la fase aguda de la estimulación esteroidogénica (0-4 horas), las reservas de colesterol (colesterol libre y ésteres de colesterol) proveen aproximadamente del 73% de todo el sustrato necesario para la biosíntesis esteroidogénica.

Los ésteres de colesterol intracelular se encuentran en un equilibrio dinámico con el colesterol libre mediante la acción de 2 enzimas que se encargan de cerrar un ciclo. Por un lado la enzima colesterol esterasa [CE] que hidroliza a los ésteres de colesterol, y por el otro a la acil Coenzima A colesterol acil transferasa [ACAT], que esterifica al colesterol libre. La preincubación de las células MA-10 con LDL durante la noche previa al desarrollo de los experimentos tuvo como finalidad el obtener niveles intracelulares de ésteres de colesterol lo suficientemente elevados como para poder ser cuantificados.

La estimulación de las células MA-10 con hCG o Bt₂AMPc produce un incremento de magnitud similar en las actividades de las enzimas [CE] y [ACAT], y como consecuencia del aumento en las actividades de estas enzimas se produce un incremento en el "*turnover*" del ciclo de los ésteres de colesterol.

Como las células estimuladas son capaces de utilizar el colesterol libre para la síntesis esteroidea, se produce una pérdida neta de colesterol, con lo que disminuye la cantidad de sustrato para la enzima [ACAT] que en otras condiciones se utilizaría para la resíntesis de los esteres de colesterol. Esta movilización del colesterol resulta en un efecto neto de hidrólisis de los ésteres de colesterol y por lo tanto en una disminución de su cantidad en células estimuladas.

La incubación de células MA-10 con Bt₂AMPc produjo una disminución del 50% en la cantidad de los ésteres de colesterol. El agregado del análogo de la HJ [DF] a células estimuladas con Bt₂AMPc bloqueó el efecto de hidrólisis de los ésteres de colesterol. Este resultado podría ser consecuencia de la no utilización del colesterol al estar inhibido el camino biosintético, a una inhibición sobre las enzimas del ciclo de los ésteres de colesterol o a ambos.

Se realizó entonces un experimento control utilizando "*aminoglutetimida*", un conocido inhibidor de la enzima [CSCC], para bloquear la síntesis esteroidea. Durante el desarrollo de este experimento control se obtuvo un efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de los ésteres de colesterol similar al descrito al utilizar al análogo de la HJ [DF]. El bloqueo de la esteroidogénesis en ambos casos resultó en la inhibición sobre el efecto de hidrólisis de los ésteres de colesterol.

Según los datos recogidos de la bibliografía, el inhibidor *aminoglutetimida* no afectaría las actividades de las enzimas pertenecientes al ciclo de los ésteres de colesterol [CE] y [ACAT] al estimular las células con hCG o Bt₂AMPc [192]. A pesar de esta descripción en células tratadas con *aminoglutetimida*, existirían indicios de que el comportamiento del análogo de la HJ [DF] sería distinto.

Esto se desprendería de la descripción de las enzimas [CE] y [ACAT] las que se encuentran reguladas por los niveles intracelulares de AMPc. El hecho que el análogo de la HJ [DF] afecte estos niveles podría conducir a algún efecto sobre la actividad de estas enzimas.

Para determinar si el efecto inhibitorio observado en presencia del análogo de la HJ era similar o diferente al producido por el inhibidor *aminoglutetimida*, procedimos a determinar la actividad de la colesterol esterasa [CE] en células intactas como fuera descrito por Freeman [192]. Para poder medir la actividad de una de las enzimas involucradas en el ciclo de síntesis e hidrólisis de los ésteres del colesterol en este caso la colesterol esterasa [CE], fue necesario inhibir la otra enzima perteneciente al ciclo, para lo cual nos valimos del compuesto [58-035], un inhibidor específico de la [ACAT], y consecuentemente prevenir la resíntesis de los ésteres de colesterol.

De esta manera y mediante la utilización del compuesto [58-035] nos fué posible arrestar la cantidad inicial de los ésteres de colesterol al comienzo del experimento y determinar cualquier efecto de hidrólisis al referirlo siempre a este valor inicial. El agregado del compuesto [58-035] por si solo produjo una disminución en la cantidad de los ésteres de colesterol en las células MA-10 luego de 4 horas de incubación. Es probable que esto se deba a la ausencia de resíntesis de los ésteres de colesterol y a una actividad basal de la colesterol esterasa [CE].

Al estimular las células con hCG o Bt₂AMPc como describimos previamente se produjo un incremento en la actividad de la [CE] por lo que los niveles de los ésteres de colesterol disminuyeron en mayor proporción. Luego el agregado del análogo de la HJ [DF] revirtió la disminución de los ésteres de colesterol. Estos resultados indicarían que el análogo de la HJ [DF] afectaría la actividad de la [CE].

Este hecho pone de manifiesto que a pesar de hallarse inhibida la síntesis esteroideogénica como en los experimentos en los cuales se utilizó *aminoglutetimida*, el efecto inhibitorio del análogo de la HJ [DF], se diferenciaría de esta última, en cuanto a que la actividad de la [CE] se encontraría de alguna forma afectada.

Hemos expresado anteriormente que además de utilizar el colesterol proveniente de las reservas intracelulares, y presente en la membrana plasmática, las células de Leydig tienen la capacidad de sintetizar el colesterol. Este proceso comienza a ser significativo en células estimuladas durante largos períodos de tiempo, en las que se produce el agotamiento de las reservas intracelulares, y la esteroideogénesis se mantiene gracias a este recurso.

La síntesis del colesterol transcurre como se ha descrito en la Introducción a través de una serie de reacciones que se inician con la formación de mevalonato, y se continúan con la formación del farnesil pirofosfato. Este compuesto es importante debido a que no solo es un intermediario en la síntesis del colesterol sino también en la síntesis de la hormona juvenil en los insectos.

Se ha descrito además en insectos que la hormona juvenil ejerce una regulación negativa sobre su propio camino esteroideogénico. Estos datos nos hicieron suponer que la presencia de algún compuesto análogo de la HJ podría afectar la síntesis "*de novo*" de colesterol, en la misma forma como ha sido descrito para su propia síntesis.

La síntesis "*de novo*" del colesterol se siguió mediante la incubación de las células MA-10 con ^{14}C -ácido acético. El agregado del análogo de la HJ [DF] a las células revelaron que la síntesis "*de novo*" del colesterol se encontraba inhibida en más de un 90%. Este resultado revelaría que las descripciones realizadas en cuanto al efecto que la hormona juvenil tendría sobre su propia síntesis se podrían extrapolar al efecto sobre el camino que conduce a la síntesis del colesterol.

Esta serie de resultados nos dieron una idea global acerca de cómo la presencia del análogo de la HJ [DF] afectaba tanto la disponibilidad del colesterol que se utilizaría para la síntesis de progesterona así como también su efecto inhibitorio sobre la síntesis "*de novo*" de colesterol.

Los resultados hallados hasta el momento nos permitirían establecer un modelo para la forma de acción del análogo de la HJ [DF] en las células MA-10, sin embargo sería de gran valor poder extrapolar estos resultados a células esteroidogénicas normales por lo que se desarrolló un experimento en donde se determinó el efecto del análogo de la HJ [DF] sobre la esteroidogénesis de células de Leydig normales.

Luego de determinar la síntesis de testosterona del medio de cultivo extracelular, los resultados nos indicarían que efectivamente la forma de acción sería similar en células normales a lo observado en las células tumorales, sin embargo se observó que la intensidad del efecto inhibitorio sería mucho mayor en células normales por lo que las concentraciones de inhibidor requerida serían mucho menores. El posterior ensayo de viabilidad celular demostró que no se encontraban afectadas.

CONCLUSIONES

- Se observó que la presencia de la hormona juvenil III inhibía en forma dosis-dependiente la producción de progesterona en células de Leydig MA-10 estimuladas con hCG.
- Análogos sintéticos de la hormona juvenil demostraron poseer el mismo efecto sobre la producción de progesterona, aunque la intensidad de este efecto dependía del compuesto utilizado.
- La inhibición observada en presencia del análogo sintético de la HJ [DF] no se debió a un aumento en la metabolización de progesterona a 20-OH progesterona.
- El efecto inhibitorio persistió tanto al utilizar dosis crecientes de hCG, como al variar los tiempos de preincubación o de incubación con el análogo [DF].
- Paralelamente al efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona se observó un efecto inhibitorio sobre la producción del segundo mensajero AMPc. Se dedujo entonces que existiría probablemente una falla en la transmisión de la señal hormonal correspondiente a hCG.
- No se observaron variaciones en la unión de la hormona hCG a su receptor, ni en el número de receptores por célula. Tampoco se observó un cambio en la capacidad de unión de GTP a las membranas de la célula de Leydig.
- El efecto inhibitorio persistió al estimular tanto a las células con la toxina del cólera como con forskolina. Estos resultados sumados a los obtenidos al medir la actividad de la adenilil ciclasa nos sugieren que el compuesto [DF] afectaría la actividad de la adenilil ciclasa, y probablemente la de la proteína Gs.
- La toxina pertussis parecería alterar la magnitud del efecto inhibitorio al observarse un incremento en la producción de AMPc.
- La inhibición de la síntesis de progesterona al tratar a las células con el análogo de la HJ [DF] no se revirtió en presencia de un análogo del AMPc como el Bt₂AMPc.

- Se observó que la presencia de análogos hidroxilados del colesterol como 25-OH colesterol no revirtieron el efecto inhibitorio del análogo de la HJ [DF] reforzando la idea de un posible sitio sobre el camino biosintético.
- El estudio de la actividad de la [3β -HSD] nos permitió determinar que esta enzima no se encontraba afectada. Este resultado sumado al anterior nos condujo a medir la producción de pregnenolona en células estimuladas observando una inhibición que se correlacionaría con un efecto sobre la [CSCC] por parte del análogo de la HJ [DF].
- Se observó que la incubación de las células MA-10 con el análogo de la HJ [DF] alteró la internalización del colesterol de membrana.
- El ciclo de los ésteres de colesterol también se vio afectado al encontrarse inhibida la actividad de la colesterol esterasa.
- Otra de las fuentes de colesterol como es la síntesis "*de novo*" también se vio afectada.
- Experimentos realizados utilizando células de Leydig normales revelaron un comportamiento inhibitorio similar por parte del análogo de la HJ [DF] al estimularlas con diferentes concentraciones de LH.

En base a los resultados obtenidos se podría plantear un modelo en donde el análogo de la HJ [DF] afectaría:

- 1) La *transducción de la señal hormonal* al menos mediante la acción sobre la subunidad catalítica adenilil ciclasa.
- 2) La *biosíntesis de progesterona* al inhibir la actividad del complejo CSCC.
- 3) El *tráfico de colesterol* al disminuir la internalización, la hidrólisis de los ésteres de colesterol, y su síntesis.

Algunos de los resultados presentados en esta Tesis dieron lugar a la publicación de los siguientes trabajos:

1. Effects of juvenile hormone on mammalian steroidogenesis.

E.A. Vladusic, L.E. Bussmann, P.E. Visconti, A.M. Stoka, J.B. Rodriguez, E.G. Gros, E.H. Charreau.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. (1994) 50: 181-187.

2. Regulation of the cholesterol ester cycle and progesterone synthesis by juvenile hormone in MA-10 Leydig tumor cells.

E.A. Vladusic, O.P. Pignataro, L.E. Bussmann, E.H. Charreau.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. (1995) 52: 83-90.

BIBLIOGRAFIA

1. Gilbert L. I., Bollenbacher W. E., Granger N. A. (1980). Insect endocrinology. Regulation of endocrine glands, hormone titer, and hormone metabolism. *Ann. Rev. Physiol.* **42**: 493-510.
2. Roth J., Le Roith D., Shiloach J., Rosenzwwig J. L., Lesniak M. A., Havrankova J. (1982). *New England J. Med.* **306**: 523.
3. Rémy C., Girardie J., Dubois M. P. (1979). Vertebrate neuropeptide-like substances in the subesophageal ganglion of two insects: *locusta migratoria* R. and F. (orthoptera) and *bombyx mori* L. (lepidoptera) immunocytological investigation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **37**: 93-100.
4. Stoka A. M.(1985). Aspectos evolutivos en endocrinología. p. 86-103. En *Endocrinología Molecular*. Calandra R. S. y De Nicola A. F. ed El Ateneo.
5. Kopec S. (1917). Experiments on metamorphosis of insects. *Bull. Int. Acad. Sci. Cracovie* (B), 57-60.
6. Kopec S. (1922). Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull.* **42**: 322-342.
7. Highnam K. C., Hill L. (1969). Invertebrate Endocrine Systems, p. 9-31. In *The Comparative Endocrinology of the Invertebrates*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
8. Schmidt G. H., Othman K. S. (1993). Changes in the size of corpora allata, in the juvenile hormone III titer in the hemolymph, and in the protein content of terminal oocytes throughout the first gonadotropic cycle in *aiolopus thalassinus* (Insecta: Orthoptera: Acrididae), *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* **24**: 45-54.
9. Lanzrein B., Gentinetta V., Fehr R. M., Lüscher M. (1978). Correlation between haemolymph juvenile hormone titre, corpus allatum volume, and corpus allatum *in vivo* and *in vitro* activity during oocyte maturation in a cockroach (*Nauphoeta cinerea*). *Gen Comp Endocrinol.* **36**: 339-345.
10. Tobe S. S., Ruegg R. P., Stay B. A., Backer F. C., Miller C. A., Schooley M. (1985). Juvenile hormone titre and regulation in the cockroach (*Diploptera punctata*). *Experientia.* **41**: 1.028-1.034.
11. Schneiderman H. A. and Gilbert L. I. (1964). Control of growth and development in insects. *Science.* **143**: 325-333.
12. Stoka A. M. (1985). Hormonas de invertebrados. p. 277-291. En *Endocrinología Molecular*. Calandra R. S. y De Nicola A. F. ed El Ateneo.

13. Jones G., Venkataraman V., Manczak M., Schelling D. (1993). Juvenile hormone action to suppress gene transcription and influence message stability. *Developmental Genetics*. **14**: 323-332.
14. Wigglesworth V. B. (1954). *The physiology of insect metamorphosis*. (Cambridge Univ. Press, Cambridge, England).
15. Williams C. M. (1961). Present status of the juvenile hormone. *Science*. **133**: 1.370.
16. Gilbert L. I., Schneiderman H. A. (1958). Occurrence of substances with juvenile hormone activity in adrenal cortex of vertebrates. *Science*. **128**: 844.
17. Schneiderman H. A., Gilbert L. I. (1958). *Biol. Bull.* **115**: 530.
18. Schneiderman H. A. (1961). *Casopis Československé Společnosti Entomol.* **58**: 12.
19. Schneiderman H. A., Gilbert L. I., Weinstein M. (1960). Juvenile hormone activity in microorganisms and plants. *Nature*. **188**: 1.041-1.042.
20. Schmielek P. (1961). *Z. Naturforsch.* **16b**: 461.
21. Wigglesworth V. B. (1961). *J Insect. Physiol.* **7**: 73.
22. Schooley D. A., Baker F. C. (1985). in *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (Kerkut G. A. and Gilbert L. I., eds), Vol. 7, p. 363-390. Pergamon Press, Oxford.
23. Roe R. M., Venkatesh K. (1990). *Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation; in Morphogenetic Hormones of Arthropods* (Gupta A. P. ed.) p. 126-179, Rutgers University Press, New Brunswick and London.
24. Krishna Kumaran A. (1990). Modes of action of juvenile hormones at cellular and molecular levels; en *Morphogenetic Hormones of Arthropods* (Gupta A. P. ed.) p. 182-227, Rutgers University Press, New Brunswick and London.
25. Bergot B. J., Baker F. C., Cerf D. C., Jamieson G., Schooley D. A. (1981). Qualitative and quantitative aspects of juvenile hormone titers in developing embryos of several insect species: discovery of a new JH-like substance extracted from eggs of *Manduca sexta*; en *Juvenile Hormone Biochemistry* (Pratt G. E. and Brooks G. T., eds.) p. 33-45, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
26. Tobe S. S., Feyereisen R. (1983). Juvenile hormone biosynthesis: regulation and assay; en *Endocrinology of Insects* (Downer R. G. and Laufer H., eds.) p. 161-178, Alan R. Liss, Inc., New York.

27. Sanburg L. L., Kramer K. J., Kezdy F. J., Law J. H. (1975). Role of juvenile hormone esterases and carrier proteins in insect development. *Nature (London)*. **253**: 266-267.
28. Bollenbacher W. E., Agui N., Granger N. A., Gilbert L. I. (1979). *In vitro* activation of insect prothoracic glands by the prothoracicotropic hormone. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 5.148-5.152.
29. Bollenbacher W. E., O'Brien M. A., Katahira E. J., Gilbert L. I. (1983). A kinetic analysis of the action of the insect prothoracic hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* **32**: 27-46.
30. Hiruma K., Shimada H., Yagi S. (1978). *J. Insect Physiol.* **24**: 215-220.
31. Ciancio M. J., Watson R. D., Bollenbacher W. E. (1986). Competency of *manduca sexta* prothoracic glands to synthesize ecdysone during development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **44**: 171-178.
32. Nijhout H. F., Williams C. M. (1974). *J. Exp. Biol.* **61**: 493-501.
33. Chang E. S. (1993). Comparative Endocrinology of Molting and Reproduction: Insects and Crustaceans. *Annu. Rev. Entomol.* **38**: 161-180.
34. Gadenne C., Renou M., Sreng L. (1993). Hormonal control of pheromone responsiveness in the male black cutworm *Agrotis ipsilon*. *Experientia.* **49**: 721-724.
35. Downer R. G., Laufer H. (1983). *Invertebrate endocrinology, Vol. 1, Endocrinology of insects*, p. 706. A.R. Liss, Inc., New York.
36. Altaratz M., Applebaum S. W., Richard D. S., Gilbert L. I., Segal D. (1991). Regulation of juvenile hormone synthesis in wild-type and *apterous* mutant *Drosophila*. *Molecular and Cellular Endocrinology.* **81**: 205-216.
37. DeWilde J. (1983). Endocrine aspects of diapause in the adult stage. In R.G.H. Downer and H. Laufer (eds.), *Invertebrate endocrinology, Vol. 1, Endocrinology of Insects*, p. 357-368. A.R. Liss, Inc., New York.
38. Kochman M., Wiczorek E. (1991). Molecular mechanism of the juvenile hormone action. *Acta Biochimica Polonica.* **38**: 393-404.
39. Coillaud F. (1991). Evidence for regulation of juvenile hormone biosynthesis operating before mevalonate in locust corpora allata. *Molecular and Cellular Endocrinology.* **77**: 159-166.
40. Bogus M., Wisniewski J. R., Scheller K. (1988). Titters, biosynthesis and metabolism of juvenile hormone in penultimate and last instar *Galleria mellonella* larvae. *Zool. Jb. Physiol.* **92**: 461-470.

41. Goodman W. G. (1990). Biosynthesis, titer regulation and transport of juvenile hormones; in *Morphogenetic Hormones of Arthropods* (Gupta, A.P., ed.) p. 83-124, Rutgers University Press, New Brunswick and London.
42. Bogus M. I., Wisniewski J. R., Cymborowski B. (1986). Effects of injury to the neuroendocrine system of last-instar larvae of *Galleria mellonella*. *J. Insect. Physiol.* **32**: 1.011-1.017.
43. Bogus M. I., Wisniewski J. R., Cymborowski B. (1987). Effects of lighting conditions on endocrine events in *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* **33**: 355-362.
44. Kramer S. J., Staal G. B. (1981). in: *Juvenile hormone biochemistry*, p. 425. G. E. Pratt and G. T. Brooks. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
45. Maestro J. L., Piulachs M. D., Bellés X. (1993). Autoinhibition of juvenile hormone production. The case of the cockroach *Blattella germanica* (L.). *Experientia.* **49**: 320-323.
46. Bellés X., Casas J., Messeguer A., Piulachs M. D. (1987). *Insect Biochem.* **17**: 1.007.
47. Brown M. S., Goldstein J. L. (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* **21**: 505-517.
48. Goldstein J. L., Brown M. S. (1990). *Nature.* **343**: 425.
49. Engelman F. (1983). Vitellogenesis controlled by juvenile hormone; in *Endocrinology of Insects* (Downer, R.G.H. and Laufer, H., eds.) pp. 259-270. Alan R. Liss, Inc., New York.
50. Wisniewski J. R., Kochman M. (1984). Juvenile hormone binding protein from silk gland of *Galleria mellonella*. *FEBS Lett.* **171**: 127-130.
51. Engelman F., Mala J., Tobe S. S. (1987). Cytosolic and nuclear receptors for juvenile hormone in fat bodies of *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem.* **17**: 1.045-1.052.
52. Roberts P. E., Jefferies L. S. (1986). Grasshopper as a model for the analysis of juvenile hormone delivery to chromatin acceptor sites. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* (Suppl.) p. 7-23.
53. Palli S. R., Osir E. O., Eng W., Boehm. M. F., Edwards M., Kulcsar P., Ujvary I., Hiruma K., Prestwich G. D., Riddiford L. M. (1990). Juvenile hormone receptors in insect larval epidermis: identification by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 796-800.

54. Shemshedini L., Lanoue M., Wilson T. G. (1990). Evidence for a juvenile hormone receptor involved in protein synthesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **265**: 1.913-1.918.
55. Michalik J., Sehnal F., Lassota Z. (1984). The synthesis of RNA and silk protein in *Galleria mellonella* silk glands. *Acta Biochim. Polon.* **31**: 139-147.
56. Illenchuk T. T., Davey K. G. (1987). The development of responsiveness to juvenile hormone in the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* **17**: 525-529.
57. Yamamoto K., Chadarevian A., Pellegrini M. (1988). Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C. *Science (London)*. **239**: 916-919.
58. Kramer S. J., Law J. H. (1980). *Acc. Chem. Res.* **13**: 297.
59. Patterson J. W., Schwarz M. (1977). *J. Insect. Physiol.* **23**: 121.
60. Wawrzńczyk C., Zabza A. (1987). *Liebigs Ann. Chem.* **169**:
61. Stupp H. P., Peter M. G. (1987). *Liebigs Ann. Chem.* **327**:
62. Henrick C. A. (1982). in *Insecticide Mode of Action* Coats J. R. (ed.), Academic Press, New York.
63. Henrick C. A., Anderson R. J., Staal G. B., Ludvick G. G. (1987). *J. Agric. Food. Chem.* **26**: 542.
64. Patel H. A., Singh A. N., Dev S. (1984). *Tetrahedron.* **40**: 1.873.
65. Law J. H., Yuan C., Williams C. M. (1966). Synthesis of a material with high juvenile hormone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**: 576-578.
66. Sláma K., Williams C. M. (1965). Juvenile hormone activity for the *bug pyrrhocoris apterus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **54**: 411-414.
67. Greep R. O., Fevold H. L. (1937). *Endocrinology.* **21**: 611.
68. Greep R. O., Fevold H. L., Hisaw F. L. (1936). Effects of two hypophyseal gonadotropic hormones on the reproductive system of the male rat. *Anat. Record.* **65**: 261-272.
69. Greep R. O. (1939). Some effects of androgens and gonadotropic preparations on the reproductive system of hypophysectomized adult male rats and rabbits. *Anat. Record.* **73**: Suppl. 2: 23.

70. Walsh E. L., Cuyler W. K., Mc Cullagh D.R. (1934). The physiologic maintenance of the male sex glands. *Am. J. Physiol.* **107**: 508-512.
71. Blaquier J. A., Cameo M. S., Burgos M. H. (1972). *Endocrinology.* **90**: 839.
72. Dyson A. L., Orgebin-Crist M.C. (1973). Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology.* **93**: 391-402.
73. Niemi M., Sharpe R. M., Brown W.R. (1986). Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tiss. Res.* **243**: 337.
74. Ritchie A. W., Hargreave T. B., James K., Chisholm G. D. (1984). Intraepithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm auto-antigens. *Br. J. Urol.* **56**: 79.
75. Pöllänen P., Maddocks S. (1988). Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. *J. Reprod. Fert.* **82**: 437.
76. Nistal M, Santamaria L., Paniagua R. (1984). Mast cells in the human testis and epididymis from birth to adulthood. *Acta Anat.* **119**: 156.
77. Fawcett D. W., Neaves W. B., Flores M. N. (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.* **9**: 500-532.
78. Clark R.V. (1976). Three dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *Anat. Rec.* **184**: 203.
79. Leydig F. (1850). Zur anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugetiere. *Z. Wiss. Zool.* **2**: 1-57.
80. Berthold A. A. (1849). Transplantation der Hoden. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.* **16**: 42-46.
81. Bouin P., Ancel P. (1903). Recherches sur les cellules interstitielles de testicule des mammifères. *Arch. Zool. (Stockh).* **1**: 437-523.
82. Bouin P., Ancel P (1904). La glande interstitielle a seule dans le testicule une action generale sur l'organisme. *Demonstr. Exp. CR Acad. Sci. (Paris).* **138**: 110.
83. Ancel P., Bouin P. (1903). L'apparition des caracteres sexuels secondaires est sous la dependance de la gland interstitielle. *CR Acad. Sci. (Paris).* **138**: 168.

84. Ciaccio C. (1910). Contributo alla distribuzione ed alla fisiopathologia cellulare dei lipoidi. *Arch. Zellforsch.* 5: 235.
85. Whitehead R. H. (1912). On the chemical nature of certain granules in the interstitial cells of the testis. *Am. J. Anat.* 14: 63.
86. Lotz A., Jaffe R. (1924). Die Hoden bei Allgemeinerkrankungen. *Z. Konstit.* 10: 99.
87. David K., Dingemans E., Freud J., Laquer F. (1935). Ueber krystallinisches mannliches Hormon aus Hoden (Testosterone), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin herites Androsteron. *Z. Physiol. Chem.* 233: 281-282.
88. Gallagher T. F., Koch F. C. (1929). The testicular hormone. *J. Biol. Chem.* 84: 495-500.
89. Butenandt A., Hanisch G. (1935). Uber Testosteron. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstenediol und Testosteron: ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin. *Z. Physiol. Chem.* 237: 89-97.
90. Ruzicka L., Wettstein A. (1935). Kunstliche Herstellung des mannlichen sexual Hormones. Transdehydro-androsten-3,17-dions. *Helv. Chim. Acta.* 18: 986-994.
91. Christensen K. (1975). Leydig cell. En: *Handbook of physiology*, Section 7, Vol 5, Cap. 3, Ed. Geifer S.R. p.57-94.
92. Rasmussen A. T. (1917). *Am. J. Anat.* 22: 475.
93. Stieve H. (1930). En: "Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des menschen" (W. von Mollendorff, Ed.) Vol. 7, Part 2, p 1-399, Springer, Berlin.
94. Hooker C. W. (1944). *Am. J. Anat.* 74: 1.
95. Wislocki G. B. (1949). Seasonal changes in the testes, epididymes and seminal vesicles of deer investigated by histochemical methods. *Endocrinology.* 44: 167-189.
96. Christensen A. K., Gillim S. W. (1972). The correlation of fine structure and function in steroid-secreting cells, with emphasis on those of the gonads. In: Mc Kerns W. W., ed. *The Gonads*. New York: Appleton-Century-Crofts, p. 415-488.
97. Russell L. D., Burguet S. (1977). Ultrastructure of Leydig cells as revealed by secondary tissue treatment with a ferrocyanide-osmium mixture. *Tissue Cell.* 9: 751-766.
98. Mori H., Christensen A. K. (1980). Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J. Cell. Biol.* 84: 340-354.

99. Guldenaar S. E., Pickering B. T. (1985). Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin in rat testis. *Cell Tiss. Res.* **240**: 485.
100. Bardin C. W., Shaha C., Mather J., Salomon Y., Margioris A. N., Liotta A. S., Gerendai I., Chen C. L., Krieger D. T. (1984). Identification and possible function of proopiomelanocortin-derived peptides in the testis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **438**: 346.
101. Abayaskeera D. R., Kurlak L. O., Cooke B. A., Jeremy J. Y., Dandona P., Sharpe R. M. (1988). Role of arachidonic acid metabolites in mediating the hCG-induced increases in interstitial fluid volume in rats. En: The molecular and cellular endocrinology of the testis. B. A. Cooke and R. M. Sharpe (eds) Sero symposium. vol. 50 Raven Press N.Y. p 143.
102. Sullivan M. H., Cooke B. A. (1985). Control and production of leucotriene B₄ in rat tumor and testicular Leydig cell. *Biochem. J.* **230**: 821.
103. Lee W., Schwall R., Mason A. J., Mather J. P. (1988). Interstitial cell cultures secrete an activity with characteristics of the inhibin β - β homodimer, activin. En: The molecular and cellular endocrinology of the testis. B. A. Cooke and R. M. Sharpe (eds) Sero symposium. vol. 50 Raven Press N.Y. p 21.
104. Parmetier M., Inagami T., Pochet R., Desclin J. C. (1983). Pituitary-dependent renin-like immunoreactivity in the rat testis. *Endocrinology.* **112**: 1.318-1.323.
105. Sharpe R. M. (1984). Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol. Reprod.* **30**: 29-49.
106. Thompson R. C., Seasholtz A. F., Herbert E. (1987). Rat corticotropin releasing hormone-gene: sequence and tissue-specific expression. *Mol. Endocrinol.* **1**: 363-370.
107. Martin T. F., Tashjian Jr A. H. (1977). Cell culture studies of thyrotropin-releasing hormone action. In: Litwack G (ed) Biochemical Action of Hormones. Academic Press, New York. vol 4: 270.
108. Moyle W. R., Greep R. O. (1974). Steroid secreting tumors as models in endocrinology. In: McKerns KW (ed) Hormones and Cancer. Academic Press, New York. p 329.
109. Kowal J. (1970). ACTH and the metabolism of adrenal cell cultures. *Recent Prog. Horm. Res.* **26**: 623-676.
110. Brown M. S., Kovanen P. T., Goldstein J. L. (1979). Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog. Horm. Res.* **35**: 215-257.

111. Simonian M. H., Hornsby P. J., Ill C. R., O'Hare M. J., Gill G. N. (1979). Characterization of culture bovine adrenocortical cells and derived clonal lines: regulation of steroidogenesis and culture life span. *Endocrinology*. **105**: 99-108.
112. Ascoli M. (1981). Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology*. **108**: 88-95.
113. Ascoli M., Puett D. (1978). Gonadotropin binding and stimulation of steroidogenesis in Leydig tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 99-102.
114. Lacroix A., Ascoli M., Puett D., McKenna T. J. (1979). Steroidogenesis in hCG responsive Leydig tumor cell variants. *J. Steroid Biochem.* **10**: 669-675.
115. Dufau M. L., Veldhuis J., Fraioli F., Johnson M. H., Catt K. J. (1983). Mode of bioactive LH secretion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**: 993-1.003.
116. Eik-Nes K. B., Hall P. F. (1965). Secretion of steroid hormones in vivo. *Vitam. Horm.* **23**: 153-181.
117. Christensen A. K., Mason N. R. (1965). Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-¹⁴C *in vitro*. *Endocrinology*. **76**: 646-650.
118. Hall P. F. (1963). The effect of interstitial cell-stimulating hormone on the biosynthesis of testicular cholesterol from acetate-1-C¹⁴. *Biochemistry*. **2**: 1.232-1.236.
119. Hall P. F. (1979). Testicular hormones: synthesis and control. En: *Endocrinology*. De Groot L. J., Cahill G. F., Martini L. et al. eds. Vol. 3. New York: Grune & Stratton. p. 1.511-1.519.
120. Hall P. F. (1970). Endocrinology of the testis. En: *Testicular physiology and biochemistry*. Johnson A. D., Gomez W. R., van Denmark V. L. eds. Vol. II. New York: Academic Press. p. 1.
121. Freeman D. A., Ascoli M. (1983). The LDL pathway of cultured Leydig tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **754**: 72-81.
122. Brown M. S., Goldstein J. L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science*. **191**: 150-154.
123. Albert D. H., Ascoli M., Puett D., Coniglio J. G. (1980). Lipid composition and gonadotropin-mediated lipid metabolism of the M5480 murine Leydig cell tumor. *J. Lipid Res.* **21**: 862-865.

124. Naghshineh S., Treadwell C. R., Gallo L. H., Vahouny G. V. (1978). Protein-kinase mediated phosphorylation of purified ester hydrolase from bovine adrenal cortex. *J. Lipid Res.* **19**: 561-569.
125. Guezse H. J., Slot J. W., Yanagibashi K., McCracken J. A., Hall P. F. (1987). Immunoelectron microscopy of cytochromes P450 in porcine adrenal cortex: two enzymes (11 β -hydroxylase and side-chain cleavage) are co-localized in the same mitochondria. *Histochemistry.* **86**: 551-559.
126. Shikita M., Hall P. F. (1973). Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: An enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. I Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **248**: 5598-5604.
127. Mason H. S. (1957). Mechanisms of oxygen metabolism. *Science.* **125**: 1185-1189.
128. Burstein S., Gut M. (1971). Biosynthesis of pregnenolone. *Recent Prog. Horm. Res.* **27**: 303-349.
129. Burstein S., Gut M. (1976). *Steroids.* **28**: 115.
130. Burstein S., Kimball H. L., Gut M. (1970). Transformation of labeled cholesterol, 20 α -hydroxy cholesterol, (22R)-22-hydroxycholesterol, and (22R)-20 α , 22-dihydroxycholesterol by adrenal acetone-dried preparations from guinea pigs, cattle and man: II. Kinetic studies. *Steroids.* **15**: 809-848.
131. Burstein S., Middleditch B. S., Gut M. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**: 692.
132. Nakajim S., Hall P. F. (1981). Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: Purification and properties of a C₂₁ steroid side-chain cleavage system (17 α -hydroxylase and C₁₇₋₂₀ lyase). *J. Biol. Chem.* **256**: 3871-3878.
133. Nakajim S., Shively J., Yuan P. M., Hall P. F. (1981). Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 α -hydroxylase and C₁₇₋₂₀-lyase) associated with one protein. *Biochemistry.* **20**: 4037-4045.
134. Acevedo H. F., Axelrod L. R., Ishikawa E., Takaki F. (1963). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **23**: 885.
135. Bedrak E., Samuels L. T. Steroid biosynthesis by the equine testis. (1969). *Endocrinology.* **85**: 1186-1195.
136. Bell J. B., Vinson G. P., Hopkin D. J., Lacy D. (1968). *Biochim. Biophys. Acta.* **164**: 412.

137. Hoschoian J. C., Brownie A. C. (1967). *Steroids*. 1: 49.
138. Ikonen M., Niemi J. (1966). Metabolism of progesterone and 17 α -hydroxypregnenolone by the foetal human testis *in vitro*. *Nature*. 212: 716-717.
139. Mathur R. S., Wiqvist N., Diezfalusy E. (1972). De novo synthesis of steroids and steroid sulphates by the testicles of the human foetus at midgestation. *Acta Endocrinol.* 71: 792-800.
140. Samuels M. T., Bussmann L., Matsumoto K., Huseby R. A. (1975). Organization of androgen biosynthesis in the testis. *J. Steroid Biochem.* 6: 291-296.
141. Tamaoki B. (1973). Steroidogenesis and cell structure. Biochemical pursuit of sites of steroid biosynthesis. *J. Steroid Biochem.* 4: 89-118.
142. Van der Molen H. J., Eik-Nes K. B. (1971). *Biochim. Biophys. Acta.* 248: 343.
143. Thomas J. L., Myers R. P., Strickler R. C. (1989). Human Placental 3 β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid-5-4-ene-isomerase: purification and characterization of mitochondrial microsomal enzymes. *J. Steroid Biochem.* 33: 209-217.
144. Samuels L.T. (1960). Metabolism of steroid hormones. En: Metabolic pathways. Vol 1. Greenberg (ed) Academic Press N.Y. p. 53.
145. Roukenen A., Vihko R. (1974). Steroid metabolism in testis tissue: Concentrations of unconjugated and sulfated neutral sterols in boar testis. *J. Steroid Biochem.* 5: 33-38.
146. Oshima H., Ochi A. I. (1973). On testicular 17 β -hydroxysteroid oxidoreductase: product activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 306: 227-235.
147. Bogovich K., Payne A. H. (1980). Purification of rat testicular microsomal 17 β -ketosteroid reductase. *J. Biol. Chem.* 255: 5.552-5.558.
148. Podestá E. J., Rivarola M. A. (1974). Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development. *Endocrinology.* 95: 455-461.
149. Hall P. F., Eik-Nes K. B. (1962). The action of gonadotropic hormones upon rabbit testis *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta.* 63: 411-419.
150. Hall P. F., Eik-Nes K. B. (1963). The influence of gonadotropins *in vivo* upon the biosynthesis of androgens by homogenate of rat testis. *Biochem. Biophys. Acta.* 71: 438-447.
151. Catt K. J., Tsuruhara T., Dufau M. L. (1972). *Biochim. Biophys. Acta.* 279: 194.

152. Aubry M., Collu R., Ducharme J. R., Crine P. (1982). Biosynthesis of a putative gonadotropin receptor component by rat Leydig cells. *Endocrinology*. **111**: 2.129-2.131.
153. Sandler R., Hall P. F. (1968). The influence of age upon the response of rat testis to interstitial cell-stimulating hormone *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta*. **164**: 445-451.
154. Marsh J. M. (1976). The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. *Biol. Reprod.* **14**: 30-55.
155. Schimmer B. P. (1980). Cyclic nucleotides in hormonal regulation of adrenocortical function. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **13**: 181-198.
156. Moyle W. R., Kong Y. C., Ramachandran J. (1973). Steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in rat adrenal cells. *J. Biol. Chem.* **248**: 2.409-2.417.
157. Podestá E. J., Dufau M. L., Catt K. J. (1976). Characterization of two forms of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase in rat testicular interstitial cells: hormonal activation and conversion to a single catalytic subunit "in vitro". *Mol. Cell. Endocrinol.* **5**: 109.
158. Juniewicz P. E., Johnson B. H. (1983). Phenotypic variation in testosterone and luteinizing hormone production among boars: differential response to gonadotropin releasing hormone and adrenocorticotrophic hormone. *Biol. Reprod.* **29**: 464-471.
159. Juniewicz P. E., Johnson B. H. (1981). Influence of adrenal steroid upon testosterone secretion by the boar testis. *Biol. Reprod.* **25**: 725-733.
160. Bartke A., Klemcke H., Matt K. (1985). Effects of physiological and abnormally elevated prolactin levels on the pituitary-testicular axis. *Med. Biol.* **63**: 264.
161. Rodbell M. (1980). The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature (London)*. **284**: 17-22.
162. Codina J., Hildebrandt, J. D., Sekura, R. D., Birnbaumer M., Bryan J., Manclark R., Iyengar R., Birnbaumer L. (1984). Ns and Ni, the stimulatory and inhibitory regulatory components of adenylyl cyclase. Purification of the human erythrocyte proteins without the use of activating regulatory ligands. *J. Biol. Chem.* **259**: 5.871-5.886.
163. Hildebrandt J. D., Sekura R. D., Codina J., Iyengar R., Manclark C. R., Birnbaumer L. (1983). Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct proteins. *Nature (London)*. **302**: 706.
164. Birnbaumer L., Codina J., Hildebrandt J. D., Sunyer T., Iyengar R., Sekura R. D., Manclark C. R. (1984). Mechanisms in the vectorial receptor-adenylyl cyclase signal transduction. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* **17**: 11.

165. Jakobs K. H., Aktories K., Schultz G. (1984). Mechanisms and components involved in adenylyate cyclase inhibition by hormones. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* **17**: 135.
166. Northup J. K., Sternweis P. C., Smigel M. D., Schleifer L. S., Ross E. M., Gilman A. G. (1980). Purification of the regulatory component of adenylyate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 6.516.
167. Bokoch G. M., Katada T., Northup J. K., Hewlett E. L., Gilman A. G. (1983). Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J. Biol. Chem.* **258**: 2.072-2.075.
168. Hildebrandt J. D., Codina J., Risinger R., Birnbaumer L. (1984). Identification of a *gamma* subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins Ns and Ni. *J. Biol. Chem.* **259**: 2.039-2.042.
169. Northup J. K., Smigel M. D., Gilman A. G. (1982). The guanine nucleotide activating site of the regulatory component of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **257**: 11.416-11.423.
170. Codina J., Hildebrandt J. D., Iyengar R., Birnbaumer L., Sekura R. D., Manclark C. R. (1983). Pertussis toxin substrate, the putative Ni of adenylyl cyclase, is an *alpha/beta* heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 4.276-4.280.
171. Iyengar R. (1981). Hysteretic activation of adenylyl cyclases. II. Mg ion regulation of the activation of the regulatory component as analyzed by reconstitution. *J. Biol. Chem.* **256**: 11.042-11.050.
172. Hildebrandt J. D., Birnbaumer L. (1983). Inhibitory regulation of adenylyl cyclase in the absence of stimulatory regulation. Requirements and kinetics of guanine nucleotide induced inhibition of the *cyc- S49* adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **258**: 13.141-13.147.
173. Brandt D. R., Asano T., Pedersen S. E., Ross E. T. (1983). Reconstitution of catecholamine-stimulated guanosine triphosphatase activity. *Biochemistry.* **22**: 4.357-4.362.
174. Northup J. K., Smigel M. D., Sternweis P. C., Gilman A. G. (1983). The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylyate cyclase. Resolution of the activated 45,000-dalton (α) subunit. *J. Biol. Chem.* **258**: 11.369-11.376.
175. Howlett A. C., Sternweis P. C., Macik B. A., VanArsdale P. M., Gilman A. G. (1979). Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylyate cyclase. Association of a regulatory component of the enzyme with membranes containing the catalytic protein and *beta*-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **254**: 2287.

176. Sternweis P. C., Northup J. I., Smigel M. D., Gilman A. G. (1981). The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **256**: 11.517-11.526.
177. Hanski E., Sternweis P. C., Northup J. K., Dromerick A. W., Gilman A. G. (1981). The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties of the turkey erythrocyte protein. *J. Biol. Chem.* **256**: 12.911-12.917.
178. Gill D. M., Meren R. (1978). ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis for the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 3.050-3.54.
179. Johnson G. L., Kaslow H. R., Bourne H. R. (1978). Genetic evidence that cholera toxin substrates are regulatory components of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **253**: 7.120.
180. Lai E., Rosen O. M., Rubin C. S. (1981). Differentiation-dependent expression of catecholamine-stimulated adenylate cyclase. Roles of the *beta*-receptor and G/F protein in differentiating 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **256**: 12.866-12.874.
181. Schleifer L. S., Kahn R. A., Hanski E., Northup J. K., Sternweis P. C., Gilman A. G. (1982). Requirements for cholera toxin-dependent ADP-ribosylation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **257**: 20-23.
182. Malbon C. G., Greenberg M. L. (1982). 3,3',5-triiodothyronine administration *in vivo* modulates the hormone-sensitive adenylate cyclase of rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* **69**: 414-426.
183. Katada T., Ui M. (1982). Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 3.129-3.133.
184. Katada T., Ui M. (1982). ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* **257**: 7.210-7.216.
185. Murayama T., Ui M. (1983). Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J. Biol. Chem.* **258**: 3.319-3.326.
186. Hunzicker-Dunn M., Jungmann R. A., Birnbaumer L. (1979). Hormone action in ovarian follicles: adenylate cyclase and protein kinase enzyme systems. In *Ovarian Follicular Development and Function*, Midgley A. R. Jr. and Sadler W. A., Eds., Raven Press, N.Y. p. 267.

187. Dufau M. L., Baukal A., Catt K. J. (1980). Hormone-induced guanine nucleotide binding and activation of adenylate cyclase in the Leydig cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 5.837.
188. Dix C. J., Schumacher M., Cooke B. A. (1982). Desensitization of tumor Leydig cells by lutropin: evidence for uncoupling of the lutropin receptor from guanine nucleotide-binding protein. *Biochem. J.* **202**: 739-745.
189. Freeman D. A., Ascoli M. (1982). Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells. *J. Biol. Chem.* **257**: 14.231-14.238.
190. Freeman D. A. (1987). Cyclic-AMP mediated modification of cholesterol traffic in Leydig tumor cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 13.061-13.068.
191. Freeman D. A., Ascoli M. (1982). Desensitization of steroidogenesis in cultured Leydig tumor cells: Role of cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 7.796-7.800.
192. Freeman D. A. (1987). Regulation of the cholesterol ester cycle of cultured Leydig tumor cells. *Eur. J. Biochem.* **164**: 351-356.
193. Freeman D. A. (1989). Plasma membrane cholesterol: Removal and insertion into the membrane and utilization as substrate for steroidogenesis. *Endocrinology* (Baltimore). **124**: 2.527-2.534.
194. Nagy L., Freeman D. A. (1990). Cholesterol movement between plasma membrane and the cholesteryl ester droplets of cultured Leydig tumor cells. *Biochem. J.* **271**: 809-814.
195. Tabas I., Rosoff W. J., Boykow G. L. (1988). Acyl coenzyme A:cholesterol acyl transferase in macrophages utilizes a cellular pool of cholesterol oxidase-accessible cholesterol as substrate. *J. Biol. Chem.* **263**: 1.266-1.272.
196. Slotte J. P., Bierman E. L. (1988). Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem. J.* **250**: 653-658.
197. Balasubramaniam S., Goldstein J. L., Faust J. R., Brunschede G. Y., Brown M. S. (1977). Lipoprotein-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity and cholesteryl ester metabolism in the adrenal gland of the rat. *J. Biol. Chem.* **252**: 1.771-1.779.
198. Andersen J. M., Dietschy J. M. (1978). *J. Biol. Chem.* **253**: 9.024-9.032.
199. Toaff M. E., Schleyer H., Strauss J. F. (1982). Metabolism of 25-hydroxycholesterol by rat luteal mitochondria and dispersed cells. *Endocrinology.* **111**: 1.785-1.792.

200. Davis W. W., Garren L. D. (1966). Evidence for the stimulation by adrenocorticotrophic hormone of the conversion of cholesterol esters to cholesterol in the adrenal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**: 805-810.
201. Trzeciak W. H., Boyd G. S. (1973). Effect of stress induced by ether anaesthesia on cholesterol content and cholesteryl-esterase activity in rat adrenal cortex. *Eur. J. Biochem.* **37**: 327-333.
202. Vahouny G. V., Chanderbhan R., Hinds R., Hodges V. A., Treadwell C. R. (1978). ACTH-induced hydrolysis of cholesteryl esters in rat adrenal cells. *J. Lipid Res.* **19**: 570-577.
203. Beckett E. J., Boyd G. S. (1977). Purification and control of bovine adrenal cortical cholesterol ester hydrolase and evidence for the activation of the enzyme by phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **72**: 223-233.
204. Mayes P. (1971). Metabolismo de los Lipidos, capítulo 14, p. 299-343. En: Manual de Química Fisiológica. Harper H. A. Ed. El Manual Moderno..
205. Freeman D. A., Ascoli M. (1981). Desensitization to gonadotropins in cultured Leydig tumor cells involves loss of gonadotropin receptors and decreased capacity for steroidogenesis. *Proc. Natn. Acad. Aci. U.S.A.* **78**: 6.309-6.313.
206. Molinolo A. A., Lanari C., Charreau E. H., Sanjuan N., Dosne Pasqualini C. (1987). Mouse mammary tumors induced by medroxy-progesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**: 1.341-1.350.
207. Scatchard G. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**: 660-672.
208. Salomon Y., Londos C., Rodbell M. (1974). A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Analyt. Biochem.* **58**: 541-548.
209. Steiner A. L., Pagliara A. S., Chase L. R., Kipnis D. M. (1972). Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3',5'-monophosphate and guanoside 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J. Biol. Chem.* **247**: 1.114-1.120.
210. Gocze P. M., Freeman D. A. (1992). A cholesteryl ester hydrolase inhibitor blocks cholesterol translocation into the mitochondria of MA-10 Leydig tumor cells. *Endocrinology.* **131**: 2.972-2.978.
211. Mendelson C., Dufau M. L., Catt K. J. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**: 8818.
212. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

213. Kim Y. J., Sah R. L., Doong J. Y., Grodzinsky A. J. (1988). Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst-33258. *Anal. Biochem.* **174**: 168-176.
214. Quinn P. G., Georgion M., Payne A. H. (1985). Differences in the control of sterol metabolism between mouse and rat Leydig cells. *Endocrinology.* **116**: 2.300-2.305.
215. Ross A. C., Go K. J., Heider J. G., Rothblat G. H. (1984). Selective inhibition of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase by compound 58-035. *J. Biol. Chem.* **259**: 815-819.