

Tesis de Posgrado

Cultivo primario de células testiculares prepúberes humanas: Cambios madurativos de la regulación de la esteroidogénesis

Berensztein, Esperanza Beatriz

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Berensztein, Esperanza Beatriz. (1998). Cultivo primario de células testiculares prepúberes humanas: Cambios madurativos de la regulación de la esteroidogénesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3083_Berensztein.pdf

Cita tipo Chicago:

Berensztein, Esperanza Beatriz. "Cultivo primario de células testiculares prepúberes humanas: Cambios madurativos de la regulación de la esteroidogénesis". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3083_Berensztein.pdf

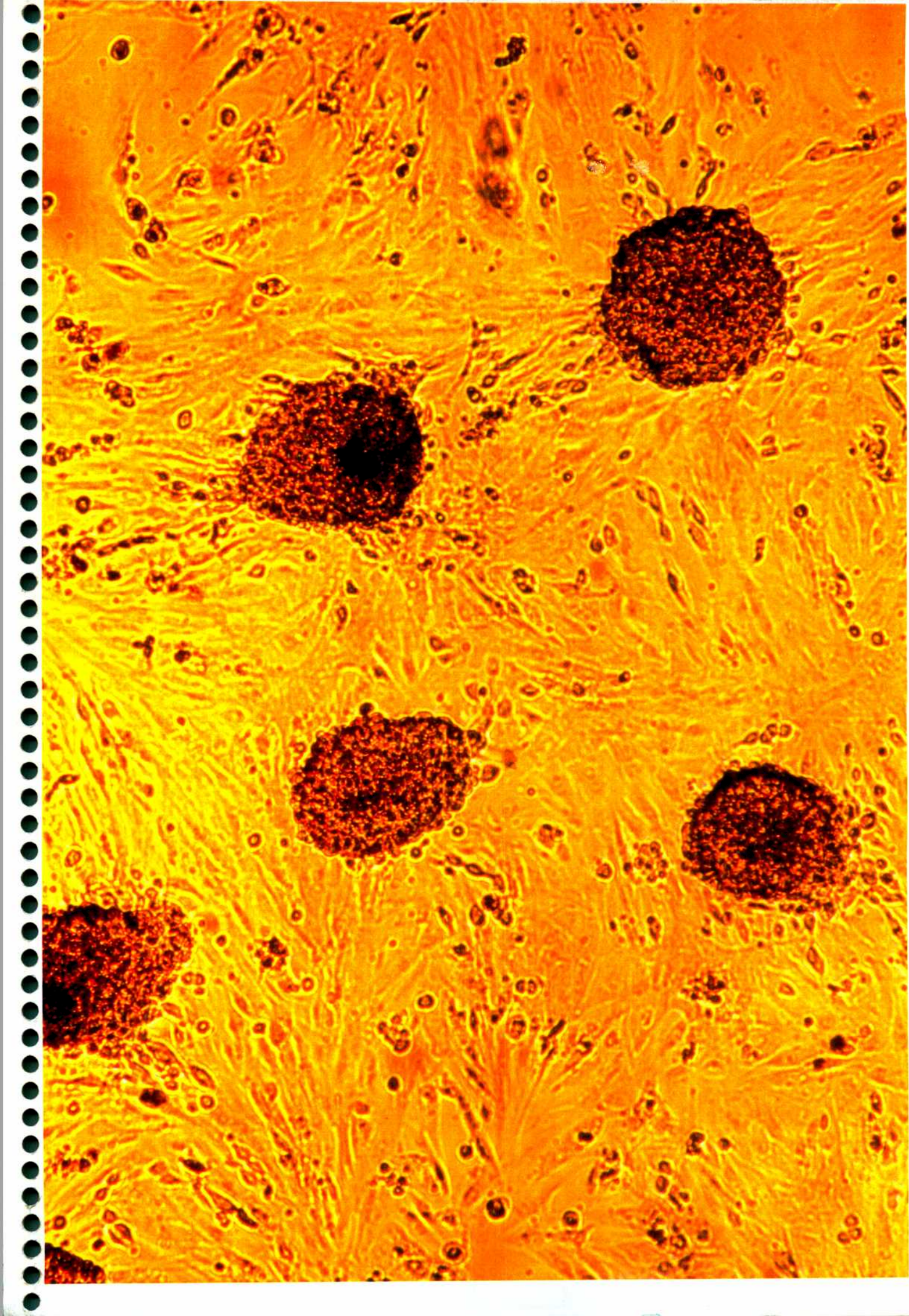
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Cultivo Primario de Células Testiculares Prepúberes
Humanas: Cambios Madurativos de la Regulación de
la Esteroidogénesis**

Autora: Lic. Esperanza Beatriz Berensztein

Director: Dr. Marco A. Rivarola

Co-Director: Dra. Alicia Belgorosky

Consejera de Estudios: Dra. Maria Cristina Maggese

**Tesis presentada para optar al título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires
Area de Ciencias Biológicas**

Año 1998

HOSPITAL DE PEDIATRIA GARRAHAN

Pozos 1881, 1245, Buenos Aires, Argentina

3083

University of Buenos Aires

School of Sciences

**Human Prepubertal Testicular Cells in Culture:
Maturative Changes in Steroidogenic Regulation**

by: Esperanza Beatriz Berensztein

Advisor: Dr. Marco A. Rivarola

Advisor Assistant: Dra. Alicia Belgorosky

Reader: Dra. Maria Cristina Maggese

**A dissertation submitted to the faculty of University of
Buenos Aires in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Doctor in Sciences
Department of Biology**

1998

GARRAHAN PEDIATRIC HOSPITAL
Pozos 1881, 1245, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

La regulación de la fase postnatal temprana de activación testicular así como de la posterior quiescencia en humanos es poco conocida. Tanto la secreción de hormonas hipofisarias como la composición celular del testículo correspondiente a la fase postnatal temprana son diferentes al testículo adulto. El objetivo fundamental del presente trabajo de tesis fue desarrollar el cultivo primario de células testiculares humanas provenientes de necropsia. Se estudiaron 50 testículos de pacientes neonatales (grupo 1, G1), de la etapa de activación postnatal (G2), de la etapa de quiescencia testicular (G3) y puberales (G4). El estudio de la secreción de testosterona (T), marcador de células de Leydig, en función del tiempo post mortem (tpm) encontró que el tpm debe ser de hasta 24 horas, ya que a tpm mayores no hay T y se activa la enzima aromatasa. Se comparó la T basal y la respuesta a gonadotrofinas en los 4 grupos, hallándose que la T basal es significativamente mayor en G1 y G2 que en G3 ($p < 0.05$) y que sólo G2 responde a gonadotrofinas. Se encontró que la actividad estimada de las enzimas 17β -HSD, 3β -HSD y 17,20 liasa de la P450c17, fue significativamente mayor en G2 que en G3 y que 17β -HSD y 3β -HSD están más activas que 17,20 liasa. Por análisis con precursores tritados de las vías $\Delta 4$ y $\Delta 5$ e identificación de metabolitos producidos por cromatografía en capa delgada se observó que la vía $\Delta 5$ es preferencial en testículo humano prepúber. Se observó un aumento de T en ausencia de gonadotrofinas bajo GH en G2 y bajo IGF-1 en los 4 G. Se estudió la secreción de inhibina-B, marcador de célula de Sertoli, encontrándose una disminución con la edad durante la prepubertad, un aumento en paralelo a la T y un efecto estimulador de FSH. Por el método de subcultivos y criopreservación de células testiculares humanas de necropsia, se encontró T, bajo colesterol ó pregnenolona, indicando que las enzimas esteroideogénicas están preservadas. El modelo experimental desarrollado ha demostrado además ser útil para estudiar la fisiopatogenia de diversas alteraciones de la función testicular en los niños.

ABSTRACT

The regulation of the early postnatal activation and subsequent quiescence in human testicular development is poorly understood. The secretion of pituitary hormones and the testicular cell composition in prepubertal are different than adult men. The main aim of this study was to develop the primary culture of human testicular cells obtained from necropsy. A total of fifty testes was studied and divided into: neonatal stage or group 1 (G1), postnatal activation stage (G2), stage of quiescence (G3) and pubertal stage (G4). Testosterone secretion (T), as marker of Leydig cell function, was related with post mortem hours (pmh). It was found that pmh must be less than 24 hours, because at pmh a higher T disappeared and aromatase activity increased. Basal T and response to gonadotrophins were analyzed in the 4 groups. Basal T was significantly higher in G1 and G2 than in G3 ($p < 0.05$), and only in G2 an increment of T was found under LH/FSH. Seventeen β -HSD, 3β -HSD and the 17,20 lyase of P450c17 activities were estimated in G2 and G3 and it was found that the three activities were higher in G2 than in G3, and 17β -HSD, 3β -HSD were more activated than 17,20 lyase. The analysis of the two pathways of steroidogenesis $\Delta 5$ and $\Delta 4$, studied after the incubation with radiolabeled precursors and the identification of products by TLC, showed that the preferential pathway is the $\Delta 5$. The stimulating effect of factors other than gonadotrophins was studied. An increment of T under GH in G2 and under IGF-1 in the four groups in the absence of LH/FSH was observed. Inhibin-B secretion, as marker of Sertoli cells, was studied. A negative correlation between Inhibin-B secretion and age during prepuberty was found. Moreover, a positive correlation between Inhibin-B and T and a stimulating effect of FSH on Inhibin-B secretion was also shown. Human testicular cells obtained from necropsies were subcultured and cryopreserved and their ability to secrete T was maintained, under cholesterol or pregnenolone, showing that steroidogenic enzymes were preserved. The present model of human testicular cells in culture was found to be useful to study the physiopathogenesis of some alterations of testicular function in boys.

A mis padres y hermanos,

a Nadia, Rocío e Irina

a Juan Manuel

con amor

AGRADECIMIENTOS

- *al Dr. Marco A. Rivarola y a la Dra. Alicia Belgorosky por haberme brindado esta oportunidad de crecer a su lado*
- *al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Pediatría Garrahan, a su jefe, el Dr. Guillermo Gallo por la provisión del material biológico y a la Dra. María T. G. de Dávila por su colaboración en la descripción de los tejidos*
- *al Dr. José M. Saez y al Dr. Lino Baraño por sus valiosos aportes intelectuales*
- *a Dora Díaz y Alejandra Ribas por el empeño puesto durante los primeros años del laboratorio*
- *a Diego Chirico y Sebastián Oknaián por su responsable asistencia técnica*
- *a Virginia Lencinas por su compromiso en la tarea de apoyo y manutención del laboratorio*
- *a Diego Bendersky por su colaboración en la realización de las figuras y a Elina Feinstein por su ayuda administrativa*
- *a Alejandro C. Lerner, del Instituto de Biología y Medicina Experimental, por su colaboración en la técnica de cromatografía en capa delgada*
- *al personal de los Servicios de Endocrinología, Farmacia, Inmunología, Pesquisa y Bacteriología del Hospital por toda su colaboración*

- a todos mis maestros por despertar en mí desde pequeña la pasión por el saber

- a mis amigos y compañeros del Colegio Nacional Buenos Aires por aquellos inolvidables seis años

- a los docentes e investigadores de la 2da Cátedra de Histología, Embriología y Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires por haber enriquecido mi formación de posgrado

-a mis compañeros del Hospital Garrahan por estar en las buenas y en las malas de todos los días

- a mis amigos del alma: Kety, Beatriz, Gloria, Tomás, Marisa. Claudio y Miguel por estar a mi lado cuando los necesito

- a mi querido tío Enrique porque es un ser humano ejemplar

- a mi querida Eugenia por ser tan especial

- a todos aquellos que iluminaron mi camino

- a Juan Manuel, por acompañarme en todo momento

- a mis alumnitos del Taller de Ciencias de la Escuela N° 3, D.E. N° 7 porque me ayudan a superarme con su constante curiosidad

- a mis padres, por haberme enseñado que todo se consigue con esfuerzo, sacrificio, talento y perseverancia y por darme la oportunidad de estudiar Biología

- a mis hermanos Miriam , Mauri, Sergio y Emily por alentarme a seguir adelante y a mis sobrinitos del alma Milton, Eva y Milena por su ternura

-A Nadia, a Rocío y a Irina porque son la luz de cada día, el motor que me ayuda a vencer los escollos y a querer superarme como ser humano

Esta tesis pudo llevarse a cabo gracias a los subsidios de :

- Hospital de Pediatría Garrahan*
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Secretaría de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Cultura y Educación*
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Secretaría de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Cultura y Educación*
- Organizaciór. Mundial de la Salud*
- Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH)*
- National Pituitary Agency (USA)*
- laboratorio Boehringer (que ha facilitado un reactivo no comercial)*

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AG	aminoglutetimida
ANOVA	análisis de la varianza
C	colesterol (colest-5-en-3 β -ol)
cAMP	adenosín mono fosfato cíclico
cDNA	ácido desoxirribonucleico "copy "
cel	célula
ClH	ácido clorhídrico
CN	cianocetona
CO ₂	anhídrido carbónico
cRNA	ácido ribonucleico "copy "
Δ 4	androstenediona (androst-4-en-3,17-diona)
DS	desvío estándar
DHEA	dehidroepiandrosterona (5-androsten 3 β -ol-17-ona)
DHT	dihidrotestosterona (5 α androstan 17 β -ol 3 ona)
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa
17 OHP4	17 hidroxiprogesterona
17, 20 DES	17,20 desmolasa
D MEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DS	desvío estándar
E2	estradiol (estra-1,3,5 (10)-trien-3,17 β diol)
EDS	etilen diamino sulfonato
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
ELISA	enzima inmuno ensayo
ES	error estándar
FA	fosfatasa alcalina
FSH	hormona folículo estimulante
g	gravedad (veces de aceleración de la gravedad)
GH	hormona de crecimiento
h	humano/a
HamF12	Medio Ham F12
HBSS	solución salina balanceada de Hank 's
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
IGF-1	factor de crecimiento similar insulina tipo 1
Inh-B	inhibina-B
INS	insulina
i.v.	intra venoso
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada

NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
P450c17	17 α - hidroxilasa/17,20 liasa
P450scc	complejo enzimático de ruptura de la cadena lateral del colesterol
p	probabilidad
P5	pregnenolona (3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona)
P4	progesterona (pregn-4-en-3,20-diona)
pl	punto isoeléctrico
r	recombinante
r	coeficiente de correlación
RIA	radioinmunoensayo
rpm	revoluciones por minuto
RNA	ácido ribonucleico
SFB	suero fetal bovino
7-DHC- Δ 7red	7-dehidrocolesterol Δ 7 reductasa
SHBG	globulina ligadora de hormonas esteroideas
T	testosterona (17 β -hidroxiandrost-4-en-3-ona)
TLC	cromatografía en capa delgada
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa
3-DIOL	3 α - androstandiol (5 α -androstan-3 α ,17 β -diol)
TRH	hormona liberadora de tirotrófina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TSH	hormona estimuladora de tiroides (tirotrófina)
V.N.	valor normal
vs	versus
v :v	volumen en volumen
x	media

UNIDADES

a	año
c	centi (10^{-2})
Ci	Curie
°C	grados centígrados
cm	centímetro
Da	dalton
dl	decilitro
d	día
f	femto (10^{-15})
g	gramo
hs	horas
KDa	kilo dalton
L	litro
m	mes
m	mili (10^{-3})
M	molar (mol por litro)
min	minuto
mg	miligramo
ml	mililitro
μ	micro (10^{-6})
μ g	microgramo
μ l	microlitro
μ m	micrometro
μ M	micromolar
mmol	milimolar
mU	miliunidades
n	nano (10^{-9})
N	normal
ng	nanogramo
nm	nanometro
nM	nanomolar
p	pico (10^{-12})
pg	picogramo
pmol	picomolar
sem	semana(s)
UI	unidades internacionales

INDICE

INTRODUCCIÓN	
Antecedentes Históricos	1
Desarrollo Embriológico	2-6
Regresión del Conducto de Muller	6-7
Desarrollo de las interacciones hipotálamo-hipófiso-testiculares	7-8
Características y regulación de la esteroidogénesis testicular fetal	8-9
Regulación autocrina y paracrina	10-17
Vida postnatal	18-19
La célula de Sertoli	19-22
La célula de Leydig	23-25
Esteroidogénesis testicular	25-32
Regulación de la expresión de P450scc y de P450c17	26-29
Modulación de la esteroidogénesis por estrógenos	30-32
Regulación hormonal de la función testicular: Rol de la LH	32-33
Efectos de LH/hCG, FSH y GH sobre las funciones diferenciadas de la célula de Leydig	33-35
Estudios in vitro	35-38
Métodos de cultivo para el estudio de funciones testiculares	38-40
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	40-41
Síndrome de insensibilidad a los andrógenos	41-42
Tumor calcificante de células grandes de Sertoli	42-43
OBJETIVOS	44
MATERIAL CLÍNICO	45-50
Observación microscópica de tejidos testiculares	51
MATERIAL Y MÉTODOS	
Materiales	52-54
MÉTODOS	
Obtención de la suspensión de células testiculares	54
Digestión del tejido	54-55
Siembra y cultivo primario	55-56
Histoquímica	57
Inmunocitoquímica	57
Determinación de esteroides por radioinmunoensayo	58-60
Estimación de actividades enzimáticas	60
Incubación con ,precursores radiactivos y análisis por cromatografía en capa delgada	61
Método de ELISA para inhibina-B	62-64
Desarrollo de la metodología de subcultivos y criopreservación	65
Cultivo de un tumor calcificante de células grandes de Sertoli	66
Análisis estadístico de los resultados	67

RESULTADOS

1.- Desarrollo metodológico del cultivo primario de células testiculares. Estudio en función del tiempo post mortem	68-69 70
2.- Observación y descripción de los cultivos Identificación de ls tipos celulares integrantes del cultivo primario mixto de células testiculares humanas. Histoquímica. Inmunocitoquímica	71-72 73-74
3.- Estudio de la cinética de secreción de testosterona	75-84
4.- Estudio de la esteroidogénesis testicular en condiciones basales y bajo estimulo gonadotrófico en cultivos correspondientes a los cuatro grupos etarios	85-87
5.- Estimación de las actividades de las enzimas 3 β -HSD, 17 β -HSD y de la actividad 17,20 liasa de la P450c17 por análisis de regresión lineal en los grupos 2 y 3	88-90
6.- Estudio de las vías 5-ene y 4-ene utilizando precursores tritiados y cromatografía en capa delgada	91-101
7.- Estudio del rol de la insulina, la GH y el IGF-1 en la esteroidogénesis de células testiculares humanas en cultivo	102-104
8.- Presencia de inhibina-B	105-111
9.- Desarrollo del método de subcultivos y criopreservación de células testiculares humanas	112
10.- Análisis de la esteroidogénesis testicular en pacientes con patologías endocrinas	112-114
10A- Estudio in vitro de un paciente con síndrome de Smith-Lemli-Opitz	115-116
10B- Actividad aromatasa en un cultivo de células testiculares de un paciente con síndrome de insensibilidad a los andrógenos	117-123
10C- Estudio in vitro de un tumor calcificante de células grandes de Sertoli	
CONCLUSIONES	124-138
BIBLIOGRAFÍA	139-171

INTRODUCCION

Antecedentes Históricos

Desde los primeros años de la historia se ha observado que los testículos estaban relacionados con características sexuales del individuo y que poseían un rol reproductivo (1).

Trescientos años antes de Cristo, Aristóteles fue uno de los primeros en describir esta relación. Observó que la castración de los pájaros macho impedía el desarrollo de características sexuales como la coloración de la cresta y la atracción de las hembras y asoció los cambios de las aves con los descritos en niños castrados con voz aflautada persistente y vello sexual ausente en la vida adulta.

A mediados del siglo XIX Berthold presentó una evidencia sobre el rol del testículo en el control de características sexuales masculinas. Demostró que la atrofia de la cresta del gallo luego de la castración podía revertirse con la implantación de los testículos en la cavidad abdominal (1).

Hacia la misma época Claude Bernard demostró que un órgano puede secretar una sustancia directamente hacia la sangre y ésta actuar sobre otro órgano. El denominó "milieu intérieur", a la que actualmente se conoce con la denominación de "hormona" (1).

La testosterona fue extraída por primera vez en forma cristalina a partir de testículos totales por David y colaboradores en 1935 y ese mismo año pudo ser sintetizada químicamente (1).

A pesar de que la célula de Leydig fue identificada en mamíferos a mediados del siglo XIX y su posible rol endocrino fue sugerido a comienzos de este siglo, recién en 1960 se realizaron los primeros experimentos para aislar los compartimientos del testículo en túbulos seminíferos y tejido intersticial y se demostró que la célula intersticial de Leydig era la principal fuente de andrógenos testiculares (1). Más recientemente, desde 1970 y hasta el presente se desarrollaron técnicas para el aislamiento, la purificación y el cultivo de células de Leydig (2) y se han clonado las enzimas esteroideogénicas involucradas en la síntesis de testosterona (3,4) lo cual ha sido un importante avance en el conocimiento de la localización celular y la regulación de estas enzimas en el desarrollo testicular.

Desarrollo embriológico

Las células germinales primordiales en el embrión humano ya se pueden detectar al final de la gastrulación -día 19- en el endodermo extraembrionario de la pared del saco vitelino y en la vecindad del polo proximal del saco alantoideo (5). Histológicamente las células germinales se destacan por su tamaño relativamente grande, de 14 a 18 micrones de diámetro, su núcleo voluminoso y esférico con uno o dos nucleolos y su citoplasma claro, reacción positiva a la fosfatasa alcalina y un alto contenido en glucógeno (6). También en la fase gástrula se pueden localizar dos áreas nefrogénicas, anterior y posterior. Las células derivadas de ambas áreas migran hacia la línea primitiva y por invaginación constituyen un segmento intermedio o nefrotomo del mesodermo intraembrionario. Células derivadas del área nefrogénica anterior forman el pronefros y el mesonefros anterior, mientras que células derivadas del área nefrogénica posterior forman el mesonefros posterior y el metanefros. Por lo tanto el mesonefros, de gran importancia en la gonadogénesis, está formado por células de ambas áreas del epiblasto.

Los elementos que participan en la formación de la gonada son el epitelio celómico, las células germinales primordiales y el mesonefros. El epitelio celómico sufre múltiples divisiones y como resultado de las mismas se torna estratificado, profundizando su porción interna en el mesodermo subyacente. Forma de esta manera los cordones sexuales primarios.

Las células germinales sufren una activa migración usando un movimiento ameboide, como se demostró en anfibios, y obedeciendo a un quimiotactismo ejercido por la cresta genital. Estas células se multiplican a medida que migran: hay alrededor de cincuenta células en la pared del saco vitelino antes de la migración, el número se eleva a cuatrocientos cincuenta antes de la colonización de la gonada y excede los mil poco después de colonizar la cresta genital. Además, al mismo tiempo las células del mesonefros que están al nivel de la cresta genital y que no se diferencian hacia elementos renales se movilizan hacia la cresta y constituyen la médula primitiva de la gonada (7,8).

Respecto a la diferenciación gonadal se acepta que la causa que induce a una gonada embrionaria bipotencial a embarcarse a una diferenciación definitiva hacia testículo o hacia ovario tiene un origen exclusivamente genético. La diferenciación testicular requiere la presencia de un factor determinante testicular. Se ha demostrado que un gen, ubicado en el brazo corto del cromosoma Y, cercano a la región pseudoautosómica conocido como gen SRY (sex-determining region Y) codifica para un factor determinante testicular.

Estudios en ratones transgénicos Ftz-F1 y deficientes WT-1 han demostrado que habría otros genes esenciales para el desarrollo gonadal temprano (9).

Desde el punto de vista histogénico la gonada pasa por un período inicial indiferenciado en el cual es imposible distinguir entre gonada femenina y masculina y por esta razón se denomina "gonada indiferenciada". Sin embargo, en el embrión humano en estadio 18 - 44 días- cuando la morfología externa de los genitales no permite identificar el sexo del embrión, las gonadas ya están individualizadas en el mesonefros, exhiben forma ovalada y su histología permite la diferenciación entre testículo y ovario.

El desarrollo de túbulos seminíferos y células de Sertoli coincide con el comienzo de la secreción de FSH, hormona que regula la secreción de hormona anti-mülleriana. La concentración de AMH aumenta durante la vida fetal hasta llegar a un máximo en la mitad de la gestación y disminuye luego, hasta declinar en el testículo postnatal hacia los dos años (10,11). Más aún, se ha identificado por radioinmunoensayo hormona anti-mülleriana en fluido testicular y líquido folicular en bovinos, aunque se desconoce la acción de esta hormona en la gonada adulta. La secuencia que sigue la diferenciación gonadal hacia testículo es particular: una intensa proliferación del epitelio celómico que forma los cordones sexuales primitivos coincide con la participación de células mesonéfricas en formar la médula gonadal primitiva. Estos elementos migran hacia la superficie externa de la cresta genital y forman la albugínea primordial. Células mesonéfricas son incorporadas a los cordones para constituir cordones testiculares o medulares los cuales a su vez encierran células del epitelio celómico, células mesonéfricas y gonocitos primordiales. La porción distal de los cordones medulares forma a nivel del hilio gonadal la Red de Haller o "rete testis".

Respecto a las células subtentaculares de Sertoli se acepta su doble origen: epitelial y mesonéfrico mientras que las células de Leydig, por su parte derivan únicamente del mesonefros. Jost (12) señala que la aparición de un nuevo tipo celular, la célula primordial de Sertoli, y su agregación en cordones seminíferos sería el primer estadio de desarrollo en la diferenciación de una gonada indiferenciada hacia testículo. El mismo autor demostró que el desarrollo de estos cordones depende en gran medida de las relaciones entre epitelio y mesénquima establecidas entre las células epiteliales y las células mesenquimáticas. Se ha verificado experimentalmente que el uso de un competidor de la prolina que suprime la expresión de la capa de fibronectina en la gonada rudimentaria, lleva a la destrucción del rudimento e impide su formación si aun no ha comenzado (13).

Las células de Leydig como otras células somáticas de la gonada son derivados subespecializados de los cordones nefrogénicos (14). La diferenciación de células de Leydig en mamíferos es posterior a la diferenciación histológica del testículo en sus principales componentes: los cordones testiculares y el intersticio. Por esta secuencia de eventos se puede inferir que las células de Leydig se desarrollan a partir de células mesenquimáticas indiferenciadas ubicadas en el intersticio y que no cumplen un rol en la formación de los cordones testiculares, es decir, en la diferenciación primaria de la gonada (14). La función principal de la célula de Leydig antes de la pubertad es la regulación endocrina, a través de los andrógenos, de la diferenciación genital en el feto masculino. Durante la décima semana de gestación en la especie humana se puede distinguir entre las células mesenquimáticas indiferenciadas la presencia de precursores de células de Leydig fetales: en algunas células mesenquimáticas el núcleo comienza a aumentar de tamaño y el citoplasma crece por aumento de las mitocondrias, del retículo endoplásmico granular, de gotas lipídicas y especialmente del retículo endoplásmico liso. No aparecen cristales de Reinke ya que éstos son característicos de células de Leydig adultas. Las células se alargan y adoptan una forma poligonal alcanzando un diámetro de hasta 20 micrones. Sin embargo no se conoce el factor que determina la diferenciación de las células de Leydig (10).

La maduración funcional de las células de Leydig avanza junto con la diferenciación morfológica, como señala la aparición de la reacción histoquímica positiva para la enzima 3 β hidroxisteroide dehidrogenasa a la octava semana de gestación (15). Luego de iniciada la diferenciación de las células de Leydig fetales, su número se correlaciona con la concentración plasmática de gonadotrofina coriónica humana (hCG). También se ha demostrado su estimulación *in vitro* por hCG a esta edad (16).

A menudo las células de Leydig fetales están unidas entre sí formando clusters, los cuales llenan el espacio intersticial a la decimocuarta semana con algunas células mesenquimáticas ocasionales. Durante la decimoquinta semana las células de Leydig alcanzan su mayor número relativo -48 millones de células por par de testículos- ocupando el 50% de la superficie en cortes transversales de testículo (17). El número relativo de células de Leydig comienza a descender alrededor de la decimosexta semana a causa del rápido crecimiento testicular, aun cuando su número absoluto permanece constante hasta la vigésimocuarta semana. Durante el período fetal restante el número absoluto disminuye progresivamente hasta llegar a 18 millones por par de testículos justo antes del nacimiento (17). La reducción de la población de células de Leydig tiene lugar por degeneración y

destrucción completa de algunas células y por reducción del 50% del volumen de las restantes. Este proceso coincide con la disminución de la concentración de hCG plasmática, aunque no se sabe si estos fenómenos tienen una relación causa-efecto (18).

Dado que la laminina cumple un rol en la migración celular, en la adhesión y en la diferenciación de numerosos sistemas de desarrollo, el cambio observado en la rata de una localización en parches de laminina y colágeno tipo IV sobre la superficie de células precursoras de Leydig fetales a largas áreas de membrana basal cubriendo a las células de Leydig fetales diferenciadas sugiere que la matriz extracelular está involucrada en el desarrollo de las células de Leydig (19). Por lo tanto es probable que elementos de la matriz extracelular participen también en la migración y adhesión requerida para la formación de clusters de células de Leydig fetales. Estos llevan a la formación de islotes glandulares que están separados del intersticio restante por una membrana basal discontinua (19). Las células de Leydig están conectadas por uniones gap o nexos es decir que están química y eléctricamente acopladas y que moléculas de peso molecular hasta 1000 Dalton pueden pasar libremente de célula a célula (10). El significado funcional de estas conexiones aún no está bien comprendido (19). Las células mesenquimáticas indiferenciadas del intersticio también dan origen a las células mioides peritubulares, a las células del endotelio vascular y linfático y a los macrófagos. Este tipo celular se diferencia entre las semanas 16 y 20 de la gestación (20). Los macrófagos testiculares, probablemente se diferencien dentro del testículo. Se han observado macrófagos en contacto con células de Leydig fetales durante la maduración y la involución de las mismas y probablemente habría interacciones reguladoras entre ambos tipos celulares, sin embargo no parecen fagocitar células de Leydig en degeneración. Se ha demostrado que los macrófagos producen factores reguladores que tienen efectos locales sobre células de Leydig (21).

Finalmente, en el testículo fetal humano pueden diferenciarse tres fases: una fase de diferenciación -semanas 8 a 14 de gestación-, una fase de maduración, cuando la producción de andrógenos alcanza su máximo -semanas 14 a 18- y una fase de involución acompañada por la caída de los andrógenos -semanas 18 a 38- (10). Una explicación simple y teleológica para la involución es que la demanda fisiológica de andrógenos es menor durante la segunda mitad del embarazo, luego de la diferenciación de órganos genitales masculinos. Este comportamiento regulatorio, curiosamente, es análogo al observado en animales adultos con reproducción estacional.

Entre la cuarta y la octava semana el embrión posee conductos genitales indiferenciados: los conductos de Wolff y los conductos de Müller que forman un sistema doble que conduce al seno urogenital, una formación medial derivada de la cloaca. Si el embrión es portador del complejo cromosómico XY, las gonadas se diferencian en testículo y en consecuencia, debido al efecto de la testosterona el conducto de Wolff adquiere una túnica de músculo liso y se diferencia en vaso deferente. Los testículos descienden de una posición intraabdominal a una extraabdominal. Este descenso es parcialmente pasivo debido al desarrollo de la pelvis y al crecimiento del tronco y parcialmente activo como resultado de la influencia hormonal.

Regresión del conducto de Müller

La hormona que es específicamente producida por el testículo fetal y no por el adulto es la hormona anti-mülleriana (AMH) llamada también sustancia inhibidora Mülleriana. Producida por la célula de Sertoli fetal regula junto con la testosterona la diferenciación sexual masculina (22). En el macho la testosterona estabiliza los conductos de Wolff mientras que la AMH induce la regresión de los conductos de Müller. En la hembra, la ausencia de AMH permite que los conductos de Müller se diferencien en trompas de Falopio, útero y parte superior de vagina mientras que la falta de testosterona causa la regresión de los conductos de Wolff. La producción de AMH continúa durante el período de diferenciación genital y en el humano se mantiene elevada luego de nacer, declinando hacia la pubertad. El ovario también produce AMH pero sólo en la vida postnatal y los niveles aumentan en la edad adulta.

Puesto que la AMH se produce en el testículo en el período crítico de masculinización genital, en la vida postnatal y en el ovario adulto es de pensar que la AMH tendría funciones extra-Müllerianas. Se ha sugerido una acción como control de la maduración de células germinales, morfogénesis gonadal, inducción de la fase abdominal del descenso testicular e inhibición de células transformadas (23).

La diferenciación de genitales internos y externos está regulada por las dos hormonas del testículo fetal: la testosterona y el factor inhibidor de Müller. Este es secretado por la célula de Sertoli, su secreción es regulada por FSH y su rol conocido es provocar la regresión de los conductos de Müller en el embrión. Por su lado, la testosterona producida por las células de Leydig fetales es necesaria para la diferenciación de los conductos de Wolff, los

cuales tienen receptores para testosterona. La acción de la testosterona sería local, vía tisular o vía linfática, originando el epidídimo, el vaso deferente y la vesícula seminal

Desarrollo de las interacciones hipotálamo-hipofiso-testiculares

A nivel del sistema nervioso central, las neuronas secretoras de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) se originan en la placoda olfatoria media y entran al prosencéfalo, esta migración es necesaria para posibilitar el control hipotalámico de gonadotrofinas a través de GnRH. Parecería que la síntesis de LH pituitaria y la esteroidogénesis testicular se inician independientemente de un estímulo trófico reactivo. Por ejemplo, en la rata, la LH secretada por la hipófisis fetal aparece en circulación el día F 17 luego de iniciada la síntesis de testosterona y de la aparición de receptores para LH, el día F 15.5 (24). No se conoce aún el mecanismo que induce la aparición de receptores para LH en la gonada en desarrollo, se acepta que la LH no sería el estímulo inicial aunque sí es la encargada de mantener sus propios receptores en la gonada adulta (25).

En el humano, la hipófisis anterior comienza a desarrollarse entre la cuarta y quinta semana de vida embrionaria, la eminencia media es discernible en la novena y es posible detectar GnRH hacia la décima. Pero el sistema vascular hipotálamo-hipofisario no es funcional hasta la doceava semana y el GnRH solamente podría llegar a la hipófisis por difusión. La secreción de LH y FSH comienza en las onceava y doceava semanas habiendo una estrecha relación temporal entre la síntesis de GnRH y de LH y FSH (18,26). El máximo nivel de gonadotrofinas en la vida fetal es alcanzado en la semana 16. Se describe una interesante diferencia entre ambos sexos en cuanto al nivel de gonadotrofinas fetales en humanos. Los niveles séricos femeninos son similares a los niveles de mujeres postmenopáusicas mientras que los niveles séricos masculinos se mantienen considerablemente inferiores. Es en estos momentos cuando los testículos fetales están muy activos, produciendo andrógenos y péptidos como la inhibina mientras que los ovarios permanecen inactivos. Es decir que a esta edad el testículo fetal- pero no el ovario- participa de un control ó feedback negativo sobre la hipófisis (26,27). Por otro lado, la gonadotrofina coriónica humana (hCG), de origen placentario, es una hormona potencialmente estimuladora del testículo fetal. Sus niveles alcanzan un máximo en la semana 12 de vida fetal y disminuyen a un nadir en la vigésima semana. Los niveles máximos de esteroidogénesis del testículo fetal correlacionan más con el pico de hCG en circulación fetal que con los niveles de gonadotrofinas pituitarias (18,27). La profusa

información disponible indica que la hCG sería la responsable de la esteroidogénesis testicular fetal y del pico de actividad testicular intrauterino. Se ha demostrado que el testículo fetal posee receptores para LH y que a través de ellos la hCG es capaz de estimular la esteroidogénesis fetal (16,28) .

Características y regulación de la esteroidogénesis testicular fetal

La actividad funcional de las células de Leydig fetales precede claramente a su maduración morfológica. Su capacidad esteroidogénica es claramente superior a la de las células de Leydig adultas (29). Las células de Leydig adultas sufren una modulación negativa por hormonas y factores paracrinós (29) mientras que la elevada producción esteroidogénica de las células fetales sería consecuencia de la ausencia de muchas de estas influencias negativas.

En el testículo fetal humano la síntesis de testosterona comienza en la semana octava y alcanza un máximo entre las doceava y catorceava semanas . En el feto la testosterona sérica alcanza niveles adultos, llegando a ser hasta 10 veces superior a los niveles observados en fetos femeninos, aunque después de la semana 20, estos niveles disminuyen (11). Puesto que una cantidad importante de esteroides 5-ene son producidos previamente a este período, el incremento evidentemente ocurre a través de la activación de la enzima 3β -hidroxiesteroide dehidrogenasa, mientras que la caída de la esteroidogénesis testicular entre las semanas 16 y 20 sería secundaria principalmente a la disminución de la actividad de la enzima citocromo P450 17 hidroxilasa/ 17,20 liasa. La concentración de testosterona testicular tiene una estrecha correlación temporal con la expresión génica de las enzimas P450 scc y P450 17 α (30,31,32).

Cuando se compara la concentración de esteroides endógenos en el testículo humano fetal y adulto se observan evidentes diferencias ya que la concentración de testosterona es tres veces mayor en el testículo fetal. Esto puede deberse en parte al mayor volumen relativo de células de Leydig en el testículo fetal, a mayores niveles de androstenediona y de progesterona del testículo fetal respecto del adulto, mientras que el contenido de los conjugados de esteroides-sulfatos es más alto en testículo adulto (33,34).

Las diferencias funcionales entre las células de Leydig fetales y las adultas tienen una explicación fisiológica. Se ha observado que la inhibición de la esteroidogénesis por estrógenos observada en el testículo adulto no ocurre en la población fetal, así como no se

observan signos de regulación negativa del receptor para LH ante elevadas dosis de LH ó hCG en células de Leydig fetales en cultivo mientras que éstos son claros en cultivo de células de Leydig adultas (35,36). Si las células de Leydig fetales fueran inhibidas por altos niveles de gonadotrofinas o de estrógenos como ocurre con las adultas, dados los altos niveles de progestinas, estrógenos y hCG en circulación fetal, las células de Leydig fetales no podrían sintetizar los niveles de androgenos que son vitales para la diferenciación sexual masculina.

Un trabajo de Tapanainen y colaboradores demuestra que la actividad aromatasa y la expresión del gen CYP 19 es baja en el testículo fetal humano. Es posible que la producción de estradiol observada sea típica de células de Leydig fetales aunque no se puede excluir la participación de células de Sertoli (37).

Otra vía del metabolismo intratesticular de la testosterona es hacia la 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y la enzima 5 α reductasa parece estar activa tanto en testículo humano fetal como adulto. Se ha detectado dihidrotestosterona y 3 α -androstadiol en testículos fetales entre la 12 y 20 semanas, aunque en menor proporción que testosterona. La actividad 5 α reductasa está localizada principalmente en las células de Sertoli y el receptor de andrógenos une preferentemente (5 α -DHT) que testosterona, sugiriendo que a pesar de los bajos niveles encontrados los andrógenos 5 α reducidos jugarían un rol en la célula de Sertoli fetal. La 5 α -DHT es importante en la diferenciación de los genitales externos en el feto masculino (38).

Existe escasa información acerca de los mecanismos bioquímicos responsables de la elevada capacidad esteroidogénica de las células de Leydig fetales y de su aparente resistencia a numerosos factores que regulan negativamente a las células de Leydig adultas. Es posible que haya en la circulación fetal factores que inhiban a los mecanismos responsables de los efectos inhibitorios, aunque también es posible que tales mecanismos de inhibición no sean funcionales en el testículo fetal y que resulten de una activación específica durante el desarrollo postnatal (14).

Regulación autocrina y paracrina

En la rata las células de Leydig fetales, así como las adultas, producen péptidos opioides. La producción de β -endorfina es estimulada por LH y puede inhibir algunas funciones de la célula de Sertoli como por ejemplo la proliferación de células neonatales estimulada por FSH. Este efecto sería característico del periodo fetal y neonatal ya que la proliferación de células de Sertoli ocurre hasta los 20 días de vida. Es decir la β -endorfina sería uno de los factores paracrinicos que determinan el tamaño del pool neonatal de células de Sertoli y se postula que en el feto y en el recién nacido el efecto paracrina de la β -endorfina podría contribuir a mantener el estadio quiescente del testículo antes de la maduración sexual (39, 40).

Otro grupo de factores producidos por el testículo fetal y por el adulto es el de las inhibinas. Estos factores son heterodímeros de una subunidad alfa (α) y una subunidad beta (β), que puede ser βA ó βB . Las activinas, por su parte son homodímeros de dos subunidades β ($\beta A\beta A$, $\beta B\beta B$ ó $\beta A\beta B$). En testículo humano fetal estudios de mRNA y de inmunocitoquímica han detectado las subunidades α , βA y βB al comienzo del segundo trimestre de gestación. La subunidad α se encuentra tanto en túbulos como en intersticio siendo predominante en túbulos a fines de la gestación. Las subunidades β se observan en el intersticio y también en túbulos. Se ha demostrado que células testiculares fetales humanas en cultivo secretan subunidad α de inhibina en respuesta a FSH y a LH (41). En un trabajo reciente se describe la concentración de inhibina en gonadas y glándula adrenal humanas durante los primeros años de vida. Mediante un método para determinar inhibina inmunorreactiva en homogenados gonadales y adrenales provenientes de muestras de necropsias de niños de hasta 75 meses de edad, se encuentra que las mayores concentraciones de inhibina aparecen en testículo de niños de hasta tres meses de edad, mientras que los niveles en niños mayores de 3 meses fueron significativamente inferiores. La testosterona presenta su mayor concentración en tejido testicular dentro de los tres primeros meses, siendo significativamente menor en muestras de mayor edad. Por otro lado, en muestras de tejido ovárico se detecta inhibina inmunorreactiva aunque en concentraciones significativamente inferiores a las de tejido testicular. Finalmente, las concentraciones de inhibina en tejido adrenal fueron significativamente menores a aquellas de gonadas. Los autores concluyen que la inhibina inmunorreactiva, producida por la células de Sertoli en testículo y por células de la granulosa ovárica, alcanza un máximo

entre el tercer y cuarto mes de vida siguiendo el aumento de las hormonas esteroideas gonadales, que podría estar estimulada por FSH y que tendría una actividad paracrina y/o autocrina, como se ha demostrado en placenta e hipófisis. La mayor concentración de inhibina en testículo que en ovario concuerda con lo descrito para niveles de inhibina sérica. Es decir que la mayor concentración de inhibina en gonadas durante los primeros meses de vida es similar a la activación postnatal transitoria de la biosíntesis de hormonas esteroideas sexuales. En este período de activación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal la presencia de inhibina posiblemente no se trate de un fenómeno transitorio sino que podría ser un factor importante para el desarrollo gonadal y adrenal en la infancia (42).

Varias observaciones sugieren la presencia de efectos específicos de ciertos factores de crecimiento sobre las células de Leydig fetales. La familia del factor de crecimiento epitelial (epitelial growth factor ó EGF) incluye al EGF, factor de crecimiento transformante tipo α (transforming growth factor α , TGF α) y la anfiregulina. Sus precursores son glicoproteínas de membrana que por un clivaje del dominio extracelular liberan los factores maduros (43). El EGF y TGF α son los péptidos más importantes de esta familia involucrados en el desarrollo en los mamíferos. Ambos se unen al receptor de EGF y tienen efectos semejantes en muchos tipos celulares. Con respecto a la producción testicular de los mismos, los resultados son contradictorios: se ha detectado EGF inmunorreactivo en extractos testiculares de ratón, rata y de humano mediante anticuerpos específicos (44, 45, 46). Recientes resultados indican que el EGF se produce en células germinales y se une a células de Sertoli (47).

Se ha descrito que las células de Sertoli y las células peritubulares de rata en cultivo expresan mRNA para TGF α (48). En cuanto al TGF α inmunorreactivo se ha localizado en células de Leydig y en células peritubulares pero queda por demostrarse la expresión de mRNA para TGF α en células de Leydig y la secreción del péptido en las mismas (49). Estudios de inmunocitoquímica demuestran la presencia de receptor para EGF en células de Leydig humanas, murinas y de primate (50, 51, 52).

En células MA-10 el EGF, en forma aguda, estimula la producción de progesterona sin afectar los niveles de cAMP y potencia el efecto de concentraciones submáximas de hCG o de análogos de cAMP (53), este efecto agudo es mediado, al menos en parte, por productos generados por una lipoxigenasa de ácido araquidónico (54). Se ha observado en cultivos de células de Leydig que el EGF inhibe la secreción de testosterona estimulada por hCG/LH debido principalmente a una reducción de la actividad 17 hidroxilasa (55).

Si bien se ha demostrado que la célula de Leydig de varias especies es blanco para EGF/TGF α y que ambos péptidos parecen ser sintetizados dentro del testículo, es aun incierto el potencial papel autocrino ó paracrino sobre la célula de Leydig ya que faltan estudios *in vivo* y que el efecto observado *in vitro* es muy suave.

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) corresponde a una familia de al menos siete polipéptidos, entre los cuales figuran FGFácido (aFGF ó FGF1) y FGF básico (bFGF ó FGF2) (56). El receptor para FGF es una proteína de transmembrana de una sola cadena glicosilada con un dominio tirosina kinasa citoplasmático y dos o tres dominios extracelulares similares a los de las inmunoglobulinas (57, 58). Los más estudiados de esta familia de factores, aFGF y bFGF, tienen un 55% de homología. Ya que carecen de una secuencia señal que facilite su secreción estos factores no se liberan en forma soluble sino sólo asociados a la matriz extracelular (59).

Se ha aislado bFGF a partir de testículo humano y bovino (60, 61). Recientemente se ha detectado mRNA para bFGF en testículos de rata y sus niveles disminuyen con la madurez sexual (62). En rata, tanto células peritubulares, de Leydig y de Sertoli expresan mRNA para bFGF y proteína de tipo bFGF es producida por células peritubulares y de Sertoli en cultivo (63). La FSH aumenta la producción de bFGF por células de Sertoli de ratas. También se ha observado mRNA para bFGF en cultivo de células de Sertoli y de Leydig porcinas (O.Avallet y J.M.Saez, datos no publicados). Se ha demostrado que el bFGF influye sobre la multiplicación y la diferenciación de células de Sertoli y también sobre la célula de Leydig (63, 64, 65), ya que disminuye el número de receptor para LH/hCG y la formación de testosterona estimulada por LH/hCG, disminuye la actividad de las enzimas 17 α -hidroxilasa (66), 3 β -HSD (67) y 5 α -reductasa (68) en cultivos de células de Leydig de rata neonatales e inmaduras. Se ha demostrado un efecto bifásico de bFGF sobre el número de receptores a LH/hCG en células de Leydig de rata inmadura: inhibidor a bajas concentraciones (0.1-1 ng/ml) y parcialmente revertido a altas concentraciones (10-200 ng/ml) (69).

Por otra parte, el aFGF sólo tiene un efecto inhibitorio aún a altas concentraciones (70). Se ha descrito el efecto de bFGF sobre células de Leydig porcinas en cultivo. Estas tienen receptores específicos de alta afinidad para bFGF (71) y el agregado de este factor produce un aumento rápido de la expresión de *c-fos*, *c-jun*, *jun-B* y *c-myc* (72) con aumento leve de la testosterona basal (71, 73) y de la actividad aromatasa (74). Si bien está demostrada la expresión de bFGF dentro del testículo y la modulación de bFGF exógeno

sobre las funciones de la células de Leydig, el rol fisiológico de este péptido está aún por ser dilucidado.

Los factores de crecimiento tipo insulina (insulin-like growth factors, IGFs) sus receptores y las proteínas transportadoras (IGFBPs) son moduladores celulares con roles esenciales en la regulación del crecimiento y desarrollo. Los IGFs son polipéptidos de una sola cadena que se expresan ubicuamente. Las dos formas principales, IGF-1 e IGF-2 poseen un 62 % de homología en su secuencia. Se conocen dos receptores específicos para IGFs el receptor tipo 1 y el receptor tipo II que es idéntico al receptor de manosa-6-P cation independiente. Mientras que el primero es el principal mediador de la acción de IGF-1 el segundo no tiene una función como mediador de la señal de IGF sino en el tráfico de enzimas lisosomales. El receptor para insulina también puede ligar IGFs aunque con menor afinidad. Los receptores para IGF-1 y para insulina poseen una porción citoplasmática con un dominio catalítico tirosina kinasa altamente conservado, mientras que la señal via receptor para IGF-II involucra la activación de una proteína de unión a GTP (75,292,293).

La acción biológica de los IGFs está modulada por una familia de al menos seis proteínas transportadoras, IGFBPs, que se encuentran tanto en circulación como en el compartimiento extracelular. Las IGFBPs pueden inhibir ó estimular los efectos de IGFs y aún pueden tener efectos propios independientes del ligando.

Se ha descrito IGF-1 inmunorreactiva en el medio condicionado de túbulo seminífero de rata adulta, de células de Sertoli de ratas inmaduras y en extractos crudos de testículo de rata. También células peritubulares y células de Leydig de ratas inmaduras producen IGF-1 (76,77). Se detectan cambios en función de la edad en la producción de IGF-1 en testículo de rata: hasta las dos semanas de vida postnatal todas las células del testículo en crecimiento presentan inmunorreactividad a IGF-1, luego las células de Sertoli se negativizan. Durante la pubertad aumenta el número de células espermatogénicas positivas y en el adulto se localiza sólo en el citoplasma de espermatocitos (78).

En testículo humano la producción de IGF-1 se localiza por inmunohistoquímica en células de Sertoli y una menor expresión en células de Leydig y espermatocitos. (76,79).

La expresión de mRNA para IGF-1 se demostró en testículo de rata inmadura y adulta (80, 81,84). El análisis de la ontogenia de la expresión de mRNA para IGF-1 e IGF-II en rata revela una máxima expresión de ambos en el día 2 de vida y una disminución con la edad.

La administración de LH, FSH ó GH en ratas hipofisectomizadas resulta en un aumento de la expresión de IGF-1 testicular (82, 83). Aunque el rol de la GH sobre el IGF-1 testicular es discutido: en células de Sertoli ó de Leydig porcinas en cultivo la GH no estimuló la secreción de IGF-1 (85), sin embargo la GH bovina aumentó el mRNA para IGF-1 en

testículos de ratas inmaduras hipofisectomizadas, aunque ese efecto sería indirecto pues no se ha detectado receptor somatogénico en testículos de rata (82).

En cultivos de células de Leydig inmaduras porcinas la producción de IGF-1 es estimulada en forma dosis dependiente por LH y FGF, mientras que en células de Sertoli lo es por FSH y FGF (85).

No se detecta mRNA para IGF-II en testículo de rata adulta, sólo pequeña cantidad en ratas inmaduras (82, 84), mientras que en cerdo es detectado en testículo fetal e inmaduro (86). Asimismo el testículo humano fetal presenta una abundante expresión de mRNA para IGF-II la cual disminuye entre las semanas 13 y 25 de gestación. En el adulto se detectó mRNA para IGF-II en células vasculares y peritubulares por hibridización *in situ* (87).

La presencia de receptores para IGF-1 se observó en células de Sertoli y espermátocitos paquiténicos de rata inmadura y en células de Sertoli porcinas inmaduras pero no en células de Leydig de rata adulta (88, 89, 90). En ambas especies la LH/hCG estimula la expresión del receptor de IGF-1 (RcIGF-1). En testículo humano, la expresión de RcIGF-1 se detecta en espermátocitos secundarios, espermátides tempranas y en algunas células de Leydig (76).

Por análisis de Northern Blot se detecta una abundante expresión de mRNA para IGFBP2 e IGFBP3 en testículo de rata, y se observó secreción de IGFBP2 y IGFBP3 en cultivo de células peritubulares y de células de Sertoli prepuberales, pero no se detecta IGFBP1.

En testículo humano adulto tampoco se detecta mRNA para IGFBP1 mientras que IGFBP2 se expresa en células de Sertoli y de Leydig, IGFBP3 e IGFBP4 en endotelio de vasos sanguíneos, IGFBP5 en tejido conectivo en bajos niveles en células de Leydig e IGFBP6 en células peritubulares e intersticiales (87).

Si bien se describe un efecto mitogénico de IGF-1 sobre las células de Leydig de ratas, éste es leve (91) y los principales efectos del IGF-1 descritos son sobre las funciones diferenciadas de la célula de Leydig: aumentar el número de receptores para LH/hCG así como la actividad y la expresión de mRNA de varias enzimas de la esteroidogénesis 3β -HSD, 17α hidroxilasa como se ha observado en células testiculares porcinas (90, 92, 93, 94).

Ya que los efectos estimuladores del IGF-1 sobre la diferenciación de la célula de Leydig son similares a los de la GH es probable que la GH actúe a través del IGF-1 en las células de Leydig. Posiblemente, en condiciones fisiológicas, la secreción endocrina dependiente de GH cumpla un rol en el proceso de maduración testicular participando en el desarrollo normal de la pubertad. En contraste, en condiciones de deficiencia persistente de GH como

en el enanismo de Laron (95) ó en el ratón enano de Snell con deficiencia génica de GH (96) la producción local de IGF-1 regulada por gonadotrofinas podría ser suficiente para inducir una casi completa, aunque retardada diferenciación del testicular.

De la familia de proteínas diméricas del tipo factor de crecimiento transformante tipo β (transforming growth factor β ó TGF β) sólo β 1, β 2 y β 3 se expresan en mamíferos. Estas proteínas, a su vez, forman parte de una superfamilia de proteínas relacionadas estructuralmente que incluye inhibina, activina, hormona anti-Mülleriana y otras (97). Se han descrito tres receptores de membrana para TGF β , tipo I, II y III. El receptor de tipo III conocido como betaglicano no tiene un rol directo sobre TGF β pero aumenta el binding de TGF β 2 al receptor tipo II de TGF β y aumenta la respuesta celular a TGF β . El receptor tipo II contiene un dominio serina-treonina kinasa, es capaz de unir TGF β pero requiere de la presencia del receptor tipo I para lograr la inhibición del crecimiento. Por último el receptor tipo I, que requiere del tipo II para su transporte a la superficie celular y para binding de TGF β parece modular los efectos de TGF β sobre la expresión de *junB* y sobre componentes de la matriz extracelular (98) .

Se ha demostrado la presencia de mRNA para TGF β en testículo de cerdo y de rata (73, 99, 100, 101) así como de material inmunorreactivo (102). En rata y ratón, se detecta mRNA para TGF β 1 y 3 en células de Sertoli y peritubulares a lo largo del desarrollo testicular, mientras que mRNA para TGF β 2 se expresa predominantemente en el periodo prepuberal (100, 101). En testículo de cerdo inmaduro tanto las células de Sertoli como las de Leydig expresan mRNA para TGF β 1 y contienen TGF β 1 inmunorreactivo (102). El TGF β posee propiedades multifuncionales ya que puede estimular ó inhibir la diferenciación de muchos tipos celulares. Ha sido comprobado en estudios realizados en cerdo, rata y ratón, que el TGF β es un inhibidor potente de las funciones diferenciadas de células de Leydig. En las dos primeras especies TGF β 1 reduce la respuesta esteroidogénica a derivados de cAMP, lo que sugiere un daño en la vía esteroidogénica (103, 104, 105). Evidencias en células de Leydig porcinas sugieren que este péptido disminuye los niveles de mRNA para P450c17 y no modifica los niveles de mRNA para 3 β -HSD (A.Clark y J.M.Saez, datos no publicados).

Es decir que TGF β tiene efectos pleiotrópicos sobre las células de Leydig, actuando sobre múltiples puntos en la esteroidogénesis testicular.

Por otro lado, los andrógenos y los glucocorticoides inhiben la esteroidogénesis dependiente de LH en células de Leydig adultas pero no en fetales y la hormona antidiurética inhibe la misma función en células neonatales y adultas pero no en células fetales(106).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) consiste en un compuesto dimérico de 30 KDa formado por dos polipéptidos, A y B, unidos por puentes disulfuro. Escasos estudios se han realizado sobre el efecto de PDGF sobre las células de Leydig. Uno de ellos describe que el tratamiento con PDGF-BB sobre células de Leydig de ratas inmaduras en cultivo produce una inhibición dosis dependiente de la secreción de testosterona inducida por hCG, asociada con la disminución de las actividades 3 β -HSD y 5 α -reductasa (107). Otro estudio demuestra la unión específica de células de Leydig de rata a PDGF-BB (108).

El factor de crecimiento neuronal (NGF) consiste en una proteína dimérica cuyo rol principal se ha demostrado sobre el desarrollo del sistema nervioso periférico (109). Se ha demostrado que tanto espermatocitos como espermátides tempranas, aunque no células somáticas testiculares, expresan y secretan NGF (110). Se ha encontrado receptor para NGF en células de Sertoli de rata por Northern Blot e Hibridización *in situ* (111). Se observó que su expresión aumenta luego de la destrucción química de las células de Leydig (con EDS) y se normaliza con el agregado de testosterona. Se ha descrito receptor para NGF en células peritubulares humanas (112).

Se ha descrito que tanto el testículo de rata como el humano producen grandes cantidades de un factor tipo interleukina 1 (IL-1), de peso molecular 15-20 KDa y pl <6, similar a IL-1 α (113). Varios tipos de células dentro del testículo pueden producir factor con actividad tipo IL-1, en ratas es producido por células de Sertoli (114) aunque células de Leydig cultivo expresan mRNA de IL-1 α e IL-1 β este último significativamente en mayor nivel, y se ha descrito que hCG administrada a ratas produce un aumento de mRNA para IL-1 β en células de Leydig sin afectar los niveles de IL-1 β en macrófagos testiculares (115). Por su parte, la administración de lipopolisacáridos en ratones aumenta la expresión de mRNA para IL-1 β en macrófagos testiculares pero no en células de Leydig.

El macrófago es un tipo de célula ubicada en el intersticio testicular que está íntimamente relacionado con las células de Leydig a través de uniones especializadas. Los macrófagos testiculares son una fuente importante de citoquinas como IL-1 y TNF- α los cuales regulan la secreción de testosterona (116).

Se ha descrito la unión específica de IL-1 α a tejido intersticial de testículo de ratón adulto (118). IL-1 disminuye drásticamente el cAMP y la testosterona estimulada por hCG en cultivos de células de Leydig de rata (neonatal, inmadura y adulta) (119, 120, 121). Los efectos de IL-1 sobre la célula de Leydig serían complejos e implicarían la inhibición de la expresión de varios genes codificantes de funciones diferenciales de las células de Leydig como la reducción de niveles de mRNA para P450c17 (116,117) y la disminución de la disponibilidad de colesterol como sustrato de la esteroidogénesis (122).

Los efectos de otra citoquina, el factor de necrosis tumoral tipo α (TNF α) ha sido estudiado en menor grado. Se ha descrito que TNF α estimula la testosterona basal y la inducida por hCG en cultivos de células de Leydig de rata (123). Paracería haber un efecto inhibitorio de TNF α sobre células de Leydig de ratón sobre la expresión de mRNA de P450scc y P450c17 (124). Se ha demostrado la expresión de receptor para TNF α en células de Leydig y de Sertoli, pero no en células germinales en ratón. Las células germinales pero no las somáticas expresan mRNA TNF α y secretan un factor de tipo TNF α (125). Las citoquinas producidas por macrófagos tendrían una regulación de la función reproductiva y podrían jugar un rol fundamental en los mecanismos de control local de la biosíntesis de testosterona. Condiciones patológicas como una inflamación crónica o una infección asociadas a un aumento de las citoquinas resultan en un daño de la función reproductiva.

La utilización de testículo fetal, neonatal o inmaduro como modelo de estudio de la función de las células de Leydig es válido en sí mismo pero sin extrapolar los resultados obtenidos a la situación adulta. Los efectos estudiados dependerán de la naturaleza de la población celular estudiada si es fetal, inmadura o adulta.

Vida postnatal

Se ha descrito que la concentración de testosterona en el recién nacido en sangre de cordón y periférica es más alta en varones que en niñas. Durante los primeros años de vida las variaciones de concentración plasmática de testosterona, androstenediona y 17 hidroxiprogesterona son específicas de cada sexo (126). En niños, la testosterona plasmática disminuye durante la primer semana de vida y aumenta entre la segunda y quinta semanas. El pico de testosterona se mantiene entre el primer y tercer mes de vida postnatal y la concentración disminuye hacia el séptimo, semejándose desde entonces a la concentración hallada en las niñas. El significado biológico de la fase postnatal temprana de activación de las células de Leydig es un tema de especulación (127, 128). Sin embargo, el bloqueo de esta actividad neonatal en monos macho resulta en un retraso en el inicio de la pubertad y en una alteración de la diferenciación de centros del sistema nervioso central (129). Se ha postulado que la secreción perinatal de testosterona es necesaria para la masculinización del sistema nervioso central. Por otra parte se ha sugerido que altas concentraciones de testosterona intratesticular son necesarias para la maduración del testículo mismo, especialmente del epitelio germinativo (127). Los niveles de androstenediona y 17 hidroxiprogesterona siguen un curso paralelo a los de testosterona.

El sexo masculino, entonces, se caracteriza por una actividad gonadal significativa, máxima en el tercer mes de vida y que desaparece en el sexto mes (11).

Durante la primer semana de vida, la función gonadal estaría controlada por hCG. Ésta desaparece completamente de circulación entre el 5^{to} y 6^{to} día de vida y simultáneamente disminuye el número de células de Leydig. Al descender la concentración de andrógenos y estrógenos circulantes, se activa el eje hipotálamo-hipofisario y aumenta la LH pituitaria. Se observan niveles elevados de LH en niños hasta el cuarto mes de vida. Sin embargo, la ontogenia y la intensidad de respuesta de la célula de Leydig está modulada por múltiples interacciones entre las mismas células testiculares (130).

En ausencia de testículo, los genitales externos son femeninos. La diferenciación de los mismos depende de la testosterona la que actuaría vía sistémica a través de su forma reducida por la enzima 5 α reductasa, la dihidrotestosterona (DHT). Esta enzima está presente en el seno urogenital. Es decir que los andrógenos, testosterona en los conductos de Wolff o dihidrotestosterona en el seno urogenital y los genitales externos, son los responsables de la diferenciación del feto masculino. En el sexo masculino el complejo

testosterona-receptor regula la secreción de LH en el eje hipotálamo-hipofisario mientras que el complejo DHT-receptor induce la virilización del seno urogenital y de los genitales externos en el feto y es responsable en gran parte de la virilización puberal, de la acción androgénica en músculo y de la espermatogénesis.

La célula de Sertoli

La célula de Sertoli fue descrita en 1865 por el científico homónimo. La célula de Sertoli se extiende desde la membrana basal del túbulo seminífero, donde se encuentran las células mioides, hasta la luz del mismo. Mientras su base está en contacto con las espermatogonias, su superficie lateral envía procesos alrededor de espermatocitos y espermátides tempranas y su porción apical se relaciona con espermátides en maduración, espermátides maduras y con la luz tubular donde se liberan los espermatozoides. Esta disposición particular permite que la célula de Sertoli tenga capacidad de interactuar morfológica y químicamente con diferentes generaciones de células germinales, con células mioides así como con otras células presentes en el compartimiento intersticial, incluyendo las células de Leydig. Su porción basal recibe señales de origen extratesticular, vía sanguínea o linfática a través del intersticio. Su aspecto morfológico varía desde el nacimiento hasta la adultez. La formación de la barrera hemato-testicular, entre células de Sertoli cerca de la base del túbulo seminífero marca la entrada progresiva a la vida adulta. *In vivo*, las células de Sertoli forman, en asociación con células germinales constituyen el epitelio seminífero (131). De acuerdo a lo revisado por Ploen y Setchell (132), la barrera constituida por las células de Sertoli es un elemento clave de la barrera fisiológica entre la sangre y la luz del túbulo seminífero. Ésta se forma por complejos de unión estrecha (tight junctions) célula-célula localizados en la porción basal del epitelio seminífero. De este modo el epitelio se divide en un compartimiento basal que contiene las células germinales premeióticas y un compartimiento adluminal que contiene células germinales meióticas y postmeióticas (133). Tanto en mamíferos como en aves, reptiles, peces, anfibios, insectos y nematodos el establecimiento de uniones estrechas entre células de Sertoli durante la vida postnatal desencadena la maduración de la célula de Sertoli y resulta un pre-requisito para el desarrollo normal de la meiosis y espermiogénesis (134). La barrera de células de Sertoli cumple con las funciones de promover la citoarquitectura del epitelio seminífero, formar un microambiente necesario para la meiosis y separar el epitelio germinativo en dos dominios distintos: basal y adluminal. Es interesante remarcar que la compartimentalización del epitelio seminífero permite una secreción bidireccional de los productos de la célula de Sertoli: proteínas destinadas a interactuar con células germinales

adluminales o con el epidídimo se secretan apicalmente mientras que aquellas que controlan a las células germinales tempranas, a las células mioideas y a las células de Leydig son secretadas basalmente. Por otra parte existe una comunicación intercelular entre células de Sertoli adyacentes proporcionada por uniones espaciadas, tipo nexus, con un poro central que permite el pasaje de iones y moléculas pequeñas (135).

En cultivo, sobre soporte plástico las células de Sertoli también pueden formar una monocapa, sin embargo no mantienen su morfología y pierden su polaridad. Si se cultivan sobre soporte permeable, la célula de Sertoli toma una forma cúbica con el núcleo en posición basal y la secreción de sus productos es vectorial.

En el testículo inmaduro la célula de Sertoli es capaz de dividirse. Se ha demostrado *in vitro* que la célula de Sertoli inmadura puede dividirse un número limitado de veces. Cuando el testículo es expuesto a condiciones deletéreas ó con edad avanzada, el número de células de Sertoli puede disminuir (136, 137).

Un amplio rango de funciones esenciales se ha descripto para la célula de Sertoli: soporte estructural del epitelio seminífero, desplazamiento de células germinales y liberación de espermatozoides, formación de la barrera hemato-testicular, secreción de varios productos y nutrición de células germinales, fagocitosis de células germinales en degeneración y de restos citoplasmáticos de espermátides tardías. Con respecto a la función secretora, ésta incluye la producción de fluidos del túbulo seminífero y de aproximadamente 100 proteínas diferentes entre las cuales figuran la proteína ligadora de andrógenos (androgen binding protein ó ABP), la hormona antimulleriana, la transferrina, la glicoproteína-sulfatada-2 y la inhibina (131), además de proteasas, componentes de la matriz extracelular y factores involucrados en la proliferación celular. La mayoría de proteínas, péptidos y esteroides de la célula de Sertoli cumplen un rol paracrino mientras que otros como la hormona anti-mulleriana, la inhibina y el esteroide 3 α -hidroxi-4-pregnen-20 ona tienen una función endocrina. Excepto el efecto estimulador del heterodímero de inhibina o el inhibidor del homodímero de inhibina sobre la producción de testosterona por la célula de Leydig, se desconoce la acción específica de las restantes sobre la misma.

La regulación de las funciones de la célula de Sertoli consiste en un control humoral y uno celular: la mitosis y las funciones de la célula de Sertoli están controladas por FSH y por testosterona, el efecto de ambas hormonas es mediado por receptores específicos (138).

Dentro del túbulo seminífero la célula de Sertoli es la que provee de la mayor parte de los nutrientes a las células germinales vecinas. Por ejemplo, en humanos jóvenes, secreta transferrina bajo el control de FSH o de cAMP. Los espermátocitos secundarios y las espermátides tempranas poseen receptores específicos para transferrina, siendo el hierro esencial para el crecimiento celular, en especial para el desarrollo de las células germinales. Con respecto a los substratos energéticos producidos por la célula de Sertoli humana, se ha identificado lactato en el medio condicionado aunque no piruvato, lo cual significa que la enzima láctico-deshidrogenasa está muy activa, probablemente para suplementar de lactato a las células germinales (138,139).

Los complejos de unión específicos establecidos entre células de Sertoli crean una barrera que impide el acceso de componentes séricos a células germinales a partir del estadio de leptotene.

Si bien se ha sugerido que la actividad aromatasa en testículo humano está localizada principalmente en células intersticiales (140) se cree que la célula de Sertoli es también una fuente de estradiol en el humano (139).

Las funciones de la célula de Sertoli están moduladas por la célula de Leydig a través de la testosterona, por la célula peritubular y por las células germinales. Estos efectos pueden ser estimuladores o inhibidores de acuerdo al tipo de célula germinal, al estadio de la espermatogénesis, al estadio de maduración testicular y al medio ambiente hormonal en el que se encuentren las células de Sertoli (141, 142).

La disposición estructural intrincada de los elementos que componen el epitelio seminífero es una evidencia de la interdependencia absoluta entre células germinales y células de Sertoli. La comunicación entre ambos tipos celulares está basada en elementos estructurales y factores químicos (143). Los mecanismos paracrinos son importantes en todo órgano ya que permiten una coordinación eficiente de las funciones de los diferentes tipos celulares que forman el órgano. El testículo probablemente tenga un requerimiento único de estos mecanismos no sólo porque presenta muchos tipos celulares con funciones radicalmente diferentes sino también porque necesita coordinar las funciones de estas células de una manera cíclica y dependiente del tiempo. Según las especies, cada célula germinal requiere 8 a 11 semanas para desarrollarse hasta un espermatozoide. Durante este período sus funciones y requerimientos así como su forma cambian radicalmente. Estos requerimientos cambiantes son sostenidos por la célula de Sertoli. La manera más simple de que esto ocurra es que la célula germinal

"informe" a la célula de Sertoli sobre sus necesidades a través de una vía paracrina. Son muy poco conocidos los factores de la célula de Sertoli que estarían involucrados en la respuesta esteroideogénica aguda de la célula de Leydig. Se ha descrito un factor termolábil, tripsina-sensible de 10 a 30 KDa de peso molecular. La relación entre células mioideas peritubulares que bordean los túbulos seminíferos y células de Sertoli ha sido demostrada en testículos fetales (144), prepuberales (145) y adultos (146, 147).

Las células peritubulares aseguran la cohesión estructural y probablemente la contracción del túbulo seminífero, constituyen parte de la barrera hemato-testicular y producen componentes de la matriz extracelular junto con la célula de Sertoli. Dentro del túbulo la matriz extracelular promueve el histotipo normal de la célula peritubular y de la célula de Sertoli, estas últimas conectadas a la lámina basal por hemidesmosomas. Además promueve y mantiene la polaridad celular y la formación de cordones tubulares. A su vez la polaridad celular es un requisito para la normal función de la célula de Sertoli.

Se ha demostrado que las células peritubulares y las células de Sertoli cooperan metabólicamente *in vitro*. Las primeras estimulan la secreción de proteínas y de transferrina por las segundas. Varios efectos son mediados por un factor no-mitogénico llamado P-Mod-S (148). Otros productos de las células peritubulares que pueden actuar sobre la célula de Sertoli son el $TGF\alpha$ y el $TGF\beta$, aunque éstos son también producidos por la misma célula de Sertoli.

Se conoce poco acerca de cómo actúa la célula de Sertoli sobre la célula peritubular. Se ha sugerido un posible rol de la IGF-1, $TGF\alpha$ y $TGF\beta$, producidos por la célula de Sertoli sobre la migración y el crecimiento de la célula peritubular (148).

La estructura normal del túbulo seminífero adulto depende de la secreción de testosterona por parte de las células de Leydig vecinas. No es de sorprender, entonces, que tanto el número como la función de las células de Leydig estén modulados por las células de Sertoli. Si bien está aceptada la interdependencia Sertoli-Leydig, poco se conoce acerca de la identidad de todos los factores que mediarían esta interacción (148).

La célula de Leydig

El testículo adulto difiere del fetal y del prepuberal en cuanto a la necesidad de células de Leydig tanto por su mayor tamaño como por los elevados niveles de testosterona requerida. A su vez, el testículo fetal contiene una población diferente de células de Leydig y es poco conocida la regulación paracrina de las mismas. La pubertad implica el desarrollo de una gran cantidad de células de Leydig de tipo adulto. Los factores claves que regulan este desarrollo parecerían ser la FSH y la célula de Sertoli. Durante la pubertad temprana los niveles plasmáticos de FSH son los más altos, y serían responsables de la iniciación de la espermatogénesis temprana. Durante la pubertad temprana el número de células de Leydig aumenta progresivamente en respuesta, se piensa, a factores de crecimiento producidos por la célula de Sertoli estimulada por FSH. Estos factores actuarían sobre precursores de células de Leydig estimulando su multiplicación y diferenciación a células de Leydig tipo adultas.

Estudios en rata demuestran que cuanto mayor es el número de células de Sertoli mayor es el tamaño del testículo y que la relación entre células de Leydig y células de Sertoli permanece constante. Por otro lado debe existir una señal paracrina que regule negativamente la proliferación de células de Leydig y que equilibre el efecto estimulador de la LH y de los factores paracrinicos de la célula de Sertoli. El mayor candidato para esta regulación negativa sería el estradiol ya que se ha descrito que el estradiol en ratas puede inhibir la proliferación de las células de Leydig a partir de sus precursores. Puesto que la célula de Leydig es la principal fuente de estradiol en la rata, ella misma podría autorregular su número y diferenciación. El conjunto de estos datos indica que existe una regulación paracrina del número de células de Leydig por la célula de Sertoli e indirectamente por las células germinales (149, 150, 152).

Se ha demostrado que el cocultivo de células de Sertoli y de Leydig de animales inmaduros (cerdo) o maduros (rata) aumenta, con respecto al cultivo de Leydig solas, la producción de testosterona basal y estimulada por LH/ hCG en células de Leydig. Efectos semejantes se han obtenido utilizando el medio condicionado de células de Sertoli. La modulación de la estructura y función de la célula de Leydig por la célula de Sertoli requiere que un factor modulador sea secretado al fluido intersticial. El factor podría ser similar a una proteína inductora de la esteroidogénesis (steroidogenesis induced protein, SIP) que fue aislada del fluido folicular ovárico y es capaz de aumentar la esteroidogénesis en células ováricas, adrenales y de Leydig (151).

A pesar de la gran cantidad de evidencias sobre la modulación de las células de Leydig por parte de las células de Sertoli muy poco se sabe sobre la identidad de los factores que mediarían estos efectos. Sin embargo posibles candidatos son la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la IL-1, el IGF-1 y miembros de la familia TGF como EGF y TGF α y TGF β . Por otro lado el TGF β y el IGF-1 estarían entre los factores responsables de los efectos a largo plazo. El TGF β sería uno de los factores secretados por la célula de Sertoli involucrados en la regulación negativa de las funciones diferenciadas de la célula de Leydig. El mRNA para TGF β fue encontrado en células de Sertoli y receptores para TGF beta fueron identificados en células de Leydig de cerdo y rata. Los efectos tróficos positivos del IGF-1 sobre la función de las células de Leydig son mejor conocidos. Células de Leydig porcinas y murinas tienen receptores de alta afinidad de IGF-1 de tipo 1 y la hCG regula positivamente a los receptores de IGF-1 en ambas especies. Si bien el IGF-1 no tiene un efecto agudo sobre la esteroidogénesis, el pretratamiento con este péptido causa cambios dosis y tiempo dependientes en las funciones diferenciadas específicas de la célula de Leydig como un aumento de tres veces del número de receptores para hCG y un aumento de la testosterona en respuesta a AMPc y a hCG. El IGF-1 no sólo aumenta el complejo receptor-adenilciclase sino que estimula la vía esteroidogénica aumentando la disponibilidad de colesterol para la esteroidogénesis, la actividad de la enzima P450_{scc} y de algunas enzimas entre pregnenolona y testosterona. La mayoría de los efectos del IGF-1 pueden lograrse con insulina a concentraciones micromolares, pero no nanomolares. Ya que la insulina a altas concentraciones se une al receptor tipo 1 de IGF-1, ejercería su acción sobre este receptor mientras que a bajas concentraciones actuaría sobre su propio receptor, presente en células de Leydig. El significado fisiológico *in vivo* del rol del IGF-1 sobre las funciones testiculares es sugerido por el hecho de que en humanos (153) y en animales experimentales (154) la deficiencia en hormona de crecimiento está asociada a pubertad retardada y respuesta pobre a hCG exógena la cual mejora con el tratamiento con GH. Mas aún, tanto en el enanismo de Laron (anormalidades en el receptor de GH) y en el ratón enano de Snell (con fallas en la secreción de hormona de crecimiento) el crecimiento y la función testiculares se desarrollan en forma retardada (95, 153). Se postula que en estas situaciones la producción local gonadal de IGF-1 que dependería parcialmente o no dependería de GH permite la maduración de las funciones testiculares. Recientes datos demuestran por inmunocitoquímica que IGF-1 se localiza en células de Sertoli mientras que receptores para IGF-1 se encuentran en células de Sertoli, de Leydig, espermatoцитos secundarios y espermátides tempranas. D. Naville y col. describen la

producción de IGF-1 por células de Leydig y de Sertoli porcinas cultivadas aisladamente y cocultivadas y plantean un modelo de interacción célula-célula (154).

Esteroidogénesis testicular

La función de la célula de Leydig es la biosíntesis de testosterona, hormona esencial para la diferenciación sexual masculina, para el mantenimiento de la espermatogénesis y para la expresión de características sexuales secundarias. La biosíntesis de testosterona depende de la estimulación crónica y aguda de la célula de Leydig por la hormona hipofisaria LH. Esta hormona se une específicamente a receptores de alta afinidad sobre la superficie de las células de Leydig, unión que provoca la activación de adenilciclase seguida por el aumento de cAMP intracelular. Los efectos agudos y crónicos están mediados por un incremento del cAMP. El precursor para la síntesis de testosterona es el colesterol que puede ser sintetizado *in situ* o tomado de la circulación sistémica. El colesterol intracelular es almacenado como éster de ácido graso en gotas lipídicas. La gonadotrofina (LH) favorece la síntesis y almacenamiento así como la incorporación de colesterol desde la sangre. En la mitocondria el colesterol es oxidado por la enzima citocromo P450_{scc}, una oxidasa de función mixta localizada en la membrana interna mitocondrial, por medio de una serie de oxidaciones sucesivas cuyos intermediarios serían 20- α hidroxicolesterol y 20 α 22-hidroxicolesterol. Luego de las oxidaciones se produce la ruptura de la cadena lateral del colesterol por un complejo de clivaje denominado colesterol desmolasa o liasa y se forman isocaproaldehído y pregnenolona. La función principal del estímulo de LH es la conversión de colesterol a pregnenolona (155). En condiciones fisiológicas el paso limitante en la síntesis de esteroides es la transferencia de colesterol a P450_{scc} (1, 294, 295).

La respuesta aguda a LH es rápida e involucra el transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial, sitio de acción de la primera enzima de la vía colesterol-testosterona. Si bien el mecanismo de transporte del colesterol libre a la membrana interna mitocondrial no ha sido aún del todo dilucidado, varios factores entre ellos elementos del citoesqueleto una proteína (sterol carrier protein 2) estarían mediando la transferencia desde el citoplasma a la membrana externa de la mitocondria. Recientemente se ha caracterizado una proteína de 30 KDa sintetizada y presente en mitocondrias de células de Leydig MA-10 estimuladas por c-AMP, que estaría mediando la transferencia del colesterol de la membrana externa a la interna mitocondrial (157). Utilizando oligonucleótidos basados en la secuencia de aminoácidos de la proteína se ha aislado un cDNA que expresado en células de Leydig MA-10 es capaz de aumentar la producción de esteroides en ausencia de

estimulo hormonal ó de cAMP. Esta proteína llamada proteína estimuladora aguda de la esteroidogénesis (steroidogenic acute regulatory protein, STAR) podría ser un factor regulador requerido para el transporte de colesterol a través de la membrana mitocondrial (157,158,159). También intervienen receptores de benzodiazepinas (160,161).

La estimulación crónica de las células de Leydig con LH/hCG ó cAMP es necesaria para la expresión óptima de las enzimas de la biosíntesis de testosterona a partir de colesterol. El paso inicial es la conversión de colesterol C₂₇ a un esteroide C₂₁, pregnenolona, es catalizado por una enzima citocromo P450, de clivaje de la cadena lateral de colesterol (side chain cleavage) conocida como P450scc. La pregnenolona difunde a través de la membrana mitocondrial para ser posteriormente metabolizada por enzimas asociadas al retículo endoplásmico liso.

Regulación de la expresión de P450scc y de P450c17

Se han descrito secuencias específicas en el gen que codifica para la enzima P450scc, el Cyp11a, en células de Leydig murinas. Una secuencia localizada entre -2.5 y -5 kb en la región 5' es esencial para la expresión de Cyp11a en células de Leydig. Estos datos indican la existencia de factores específicos que regulan la expresión en células de Leydig diferentes a los factores necesarios para la expresión en células adrenales (162).

Se ha informado que los testículos fetales humanos expresan mRNA para P450scc y P450c17, que esta expresión es mayor entre las semanas 14 y 16 de gestación y disminuye entre las semanas 20 y 26 (162).

El testículo produce andrógenos entre los cuales la testosterona es el más importante. Si bien se ha propuesto que el túbulo seminífero tendría capacidad esteroidogénica, estudios recientes demostraron que dos enzimas claves de la esteroidogénesis, el citocromo P450 scc y la 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa/ 5-ene-4-ene isomerasa, no se expresan en el túbulo seminífero. Sin embargo la célula de Sertoli de rata inmadura puede convertir progesterona en 3- α -hidroxi-4-pregnen-20-ona, un esteroide capaz de inhibir la secreción de FSH en células aisladas de hipófisis y estimular el desarrollo de espermatoцитos cuando es inyectado a ratas prepúberes.

Como se ha descrito previamente, el interferón gama (IFN γ) reduce la capacidad de producción de testosterona en células de Leydig porcinas disminuyendo la expresión de mRNA para P450scc y P450c17, así como la disponibilidad de colesterol (164). La interleukina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral de tipo α (TNF- α) son producidos por los

macrófagos testiculares. Ambos reducen la expresión del mRNA para P450_{scc} y P450_{c17} en células de Leydig de ratón y de rata e inhiben la síntesis de testosterona estimulada por LH ó cAMP (119, 164). El efecto principal de ambas citoquinas es a nivel del mRNA P450_{c17}. Estos datos sugieren que el daño en la función reproductiva en machos afectados por enfermedades inflamatorias crónicas o por infecciones se debería a la expresión reducida de mRNA P450_{c17} que lleva a una disminución de la producción de testosterona (164).

La célula de Leydig puede utilizar la vía 5-ene en la cual la secuencia es la formación de 17-OH pregnenolona por la acción de la enzima 17 α -hidroxilasa, dehidroepiandrosterona (DHEA) por acción de la enzima 17,20-liasa, Δ 4 androstenediona (Δ 4-diona) por acción de la 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa- Δ 5, Δ 4-isomerasa y finalmente testosterona por acción de la 17 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa.

En la vía 4-ene la secuencia comienza con la formación de progesterona a partir de pregnenolona, luego 17 hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona. Hay evidencias que sostienen que la vía preferencial en testículo humano fetal y adulto, de cerdo, de conejo y de perro es la Δ 5 mientras que en la rata sería la vía Δ 4 (165, 166, 167).

La conversión de esteroides 3 β -hidroxi-5-ene a 3 ceto-4-ene es catalizada por la enzima 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa. En el humano se han clonado dos genes (tipo I y tipo II) y tres pseudogenes. Utilizando sondas específicas de cRNA se pudo observar que el mRNA de 3 β -HSD tipo II es detectable exclusivamente en glándula adrenal y gonadas humanas. El mRNA tipo I se expresa especialmente en piel, placenta y glándula mamaria y en menor grado en gonadas. Ambos tipos catalizan la 3 β -hidroxiesteroide dehidrogenación y la isomerización de esteroides C-21 y C-19 (168). Mediante un cDNA aislado de una biblioteca génica de placenta humana fue localizado el gen correspondiente al tipo 1 en la región p11-p13 del cromosoma 1 el cual codifica para una proteína de 372 aminoácidos (169). El cDNA tipo II humano produce una proteína de 371 aminoácidos y 41.921 dalton. La secuencia de aminoácidos de 3 β -HSD tipo II tiene un 93.5% de homología con la del tipo I. Esta enzima se localiza en membrana de retículo endoplásmico y en mitocondrias. Tanto el tipo I como el tipo II presentan dos dominios de transmembrana. Se conoce como actividad intracrina a la formación de esteroides sexuales activos a partir de precursores inactivos (DHEA, sulfato de DHEA y/o androstenediona) localizada en la célula donde la síntesis tiene lugar, sin liberación al espacio extracelular. Ésta corresponde a un sistema económico que requiere una cantidad mínima de hormona para ejercer su óptima función

en el tejido blanco. La importancia de la biosíntesis de esteroides en los tejidos periféricos se constata por la amplia distribución de la expresión de enzimas claves de la esteroidogénesis, como la 3β -HSD, la 17β -HSD, la 5α -reductasa y la aromatasa en tejidos humanos periféricos incluidos piel, tejido adiposo, próstata, mamas, endometrio, pulmón e hígado (169).

La conversión de esteroides C₂₁ a C₁₉ incluye dos pasos: 17α hidroxilación y clivaje de la unión c₁₇-c₂₀, ambos catalizados por una sola enzima, citocromo P450 17α hidroxilasa/ $17,20$ liasa. Mientras que todas las reacciones de hidroxilación en el retículo tienen propiedades de oxidasa de función mixta similares al citocromo P-450 con especificidad de sustrato para cada caso, un solo citocromo P450 cataliza la 17α hidroxilación y la ruptura de la unión c₁₇-c₂₀ (170).

Se postula que la regulación de la transcripción del gen Cyp17 que codifica para la enzima P450 17α es de la siguiente manera: la región respondedora a AMPc que confiere la respuesta del promotor Cyp17 a cAMP del gen Cyp17 de ratón carece de una región CRE, esto indica que la acción de cAMP sobre la expresión de Cyp17 no es mediada por la proteína de binding a CRE (CREB) (171). No habría homología en la secuencia de esta región entre especies murina, bovina y humana (172). Por el contrario, la inducción de la expresión de Cyp17 por cAMP en ratón requiere síntesis de una ó más proteínas y procede por una vía diferente. El binding de proteínas en células MA-10 tratadas con cAMP a la región respondedora a AMPc es específico, habría dos sitios diferentes de unión en la región -346/-245.

Un factor que influiría en la expresión tejido específica de algunas enzimas es el steroidogenic factor-1 (SF-1), una proteína huérfana de receptor nuclear, que se expresa en glándulas adrenales, testículo y ovario (173). Se ha demostrado que es necesario para la expresión de tres enzimas P450: P450_{scc}, 21-hidroxilasa y la isoenzima sintasa de aldosterona 11β -hidroxilasa en glándulas adrenales de ratón (174), para aromatasa en ovario de rata y en células de Leydig de tumor de rata R2C (175). El SF-1 regula la expresión de estas enzimas P450 por unión a un elemento promotor consenso AGGTCA. Este sitio de binding aún no ha sido identificado en el Cyp17 α , aunque por análisis computado se han identificado dos sitios potenciales de unión, AGGCCA en posición -146/-141 y -73/-68 (172, 176).

Faltan identificar aún las proteínas requeridas para la expresión de Cyp17 α en células de Leydig así como la secuencia específica que media la expresión de este gen inducida por

llamado CRS 1 (176). Este estudio sugiere que el Pbx estaría participando en la mediación de la transcripción inducida por cAMP del gen Cyp17 bovino.

Hasta el presente no se sabe si las enzimas esteroideogénicas no-citocromo P450 requieren SF-1 para su expresión en células esteroideogénicas, así como el mecanismo de regulación de la expresión del gen que codifica para la reductasa 17-cetoesteroide testicular, conocida como 17 β -HSD. Se ha aislado el cDNA de una biblioteca genómica humana, que codifica para una enzima microsomal, 17 β -HSD isoforma tipo 3 la cual utiliza el NADPH como cofactor y que favorece la reducción de androstenediona a testosterona. El cDNA de 17 β -HSD de tipo 3 tiene un 23% de homología con los cDNA previamente clonados tipo 1 y 2 los cuales catalizan la dehidrogenación de estrógenos y de andrógenos y que utilizan como cofactor el NADH (178). La enzima microsomal 17 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa (17 β -HSD) cataliza la interconversión entre androstenediona y testosterona, dehidroepiandrosterona y 5-androstene-3 β ,17 β -diol y entre estrona y estradiol. En el testículo la actividad de esta enzima estaría bajo un control genético diferente al de otros tejidos extragonadales. Actualmente se han aislado y caracterizado tres secuencias de cDNA codificantes para tres isoenzimas 17 β -HSD humanas y el mRNA del tipo 2 se encuentra en altos niveles en placenta (179).

Se ha descrito en varias especies que los testículos son capaces de producir estrógenos, aunque en muy baja cantidad a excepción del caballo y del pecarí, los cuales producen grandes cantidades en forma de sulfato. La contribución de cada tipo celular dentro del testículo a la secreción de estrógenos es controvertida. En la rata inmadura el sitio de aromatización es la célula de Sertoli, capaz de metabolizar testosterona a estradiol, esta actividad aromatasa es aumentada por FSH, mientras que en la rata madura el sitio de aromatización es la célula de Leydig (180). En el cerdo la habilidad de producir estrógenos es muy baja cuando se trata de células de Leydig purificadas, mientras que preparaciones crudas que contienen células de Sertoli y de Leydig son capaces de responder a hCG aumentando la testosterona y los estrógenos, sugiriendo que la célula de Sertoli es la principal fuente de aromatización en esta especie (181). La célula de Leydig humana adulta es capaz de metabolizar testosterona a estradiol y androstenediona a estrona. La enzima P450 aromatasa utiliza promotores alternativos en la regulación de la expresión tejido-específica. Se ha propuesto que el promotor tipo II es el que regula la expresión P-450 aromatasa en tejidos humanos adultos.

Modulación de la esteroidogénesis por estrógenos

El mantenimiento de las funciones de la célula de Leydig y de la producción de andrógenos depende de la hormona luteinizante, liberada por la hipófisis de manera pulsátil y que circula a bajas concentraciones, alrededor de 10^{-10} M. La estimulación intermitente con LH es responsable de mantener las funciones diferenciadas de la célula de Leydig, y de la inducción y/o mantenimiento de receptores de LH y de las enzimas esteroidogénicas. Incrementos mayores de los niveles de gonadotropina circulante, de fuente exógena o endógena causan una regulación negativa de los receptores de LH en testículo y de la respuesta de la célula de Leydig (182).

Se ha descrito que luego de dosis altas de hCG ocurre una severa depleción del receptor a LH/hCG y una pérdida de la respuesta máxima de pregnenolona. Se ha demostrado que un defecto de la actividad 17,20 desmolasa es responsable de la respuesta esteroidogénica disminuida de las células desensibilizadas por altas dosis de hCG intravenoso. Se propone que el bloqueo en la esteroidogénesis no sólo es consecuencia de una depleción del receptor sino que depende de efectos inhibitorios locales de la producción de esteroides durante la respuesta testicular aguda a gonadotropinas (296).

Si bien el aumento de gonadotropinas circulantes inicialmente estimula la secreción de testosterona, la respuesta esteroidogénica a LH/hCG es seguida por un período durante el cual la célula de Leydig está desensibilizada (o refractaria) a una segunda estimulación con LH/hCG *in vitro*. Nozu y colaboradores plantean que la falta de inducción por gonadotropina o "down regulation" de receptores de LH es precedida por una lesión esteroidogénica de la biosíntesis de andrógenos posterior a la formación de progesterona que sigue a aumentos moderados de gonadotropinas y por una lesión adicional anterior a la formación de pregnenolona luego de aumentos marcados de gonadotropinas. El defecto tardío inducido por gonadotropinas en la producción de testosterona se debe principalmente a la disminución de las actividades 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa con la consecuente acumulación de progesterona y 17 α -hidroxiprogesterona y estos cambios se producen por un efecto inhibitorio del estrógeno intracelular formado a partir de andrógeno durante el aumento inicial de la secreción de testosterona bajo acción hormonal (182).

Si bien la inhibición de la secreción de testosterona por estradiol se debe en parte a un feedback negativo sobre la secreción de LH pituitaria, se ha observado un efecto inhibitorio

directo del estradiol sobre el testículo de ratas hipofisectomizadas. El contenido de estradiol en la célula de Leydig aumenta luego de una sola dosis de hCG y a este aumento sigue la traslocación nuclear del receptor de estrógenos. Estos cambios que ocurren previos a la lesión de la esteroidogénesis sugieren que el estrógeno podría ser responsable de la lesión enzimática en la biosíntesis de andrógenos (183).

Las enzimas 17β -HSD y 3β -HSD no son afectadas en testículos desensibilizados, en los cuales el contenido de citocromo P-450 sí está marcadamente disminuído y es paralelo a la disminución de las actividades 17α -hidroxilasa y $17,20$ -liasa. Estas observaciones indican la importancia potencial del estrógeno endógeno como un modulador intra-testicular de la biosíntesis y secreción de andrógenos(183).

La regulación de la esteroidogénesis por gonadotrofinas incluye la síntesis de proteínas específicas que se conocen como componentes de la activación de la vía biosintética. Dos proteínas, de peso molecular 62.000 y 50.000 aumentan dentro de las 3 horas de estimulación con hCG y declinan a las 20 horas y están relacionadas con la acción estimuladora de las gonadotrofinas sobre el metabolismo de las células de Leydig y la esteroidogénesis. En contraste, dos proteínas de peso molecular 40.000 y 27.000 se comienzan a detectar a las 6 horas de estimulación y aumentan hacia las 20 horas. La proteína de 27.000 es inhibida por Tamoxifeno mientras que la síntesis de la misma es estimulada por estradiol y actuaría posiblemente a través de la reducción del citocromo P-450 microsomal. Este mecanismo regulador funcionaría como un modulador fisiológico para limitar la producción y secreción de andrógenos biológicamente activos por la célula de Leydig durante la estimulación con gonadotrofinas (182).

A diferencia de la célula de Leydig adulta, la célula de Leydig fetal y la inmadura son refractarias a la desensibilización inducida por gonadotrofinas. Puesto que la célula de Leydig fetal exhibe un aumento del número de receptores a LH y de la esteroidogénesis durante la exposición a gonadotrofinas y a dibutilil cAMP la falta de desensibilización puede ser atribuida a una baja capacidad de aromatización y al bajo contenido de receptor de estrógenos (184). La baja actividad aromatasa en la célula de Leydig fetal es la principal responsable de la falta de desensibilización en la célula de Leydig inmadura. El pequeño aumento de la actividad aromatasa observado luego del tratamiento con LH no es suficiente para inducir la regulación por estrógenos observada durante el tratamiento con estrógenos exógenos. Estudios en células de Leydig fetales de rata demuestran que el estradiol exógeno es capaz de causar una estimulación de sus receptores y una inducción del mecanismo regulatorio de la vía androgénica, como el observado en células adultas. La

falta de regulación endógena en la vida fetal se debe a muy bajos niveles de actividad aromatasa y a una producción de estradiol no detectable. Entonces la lesión esteroidogénica a nivel 17α -hidroxilasa/ $17,20$ -liasa es una característica de las células de Leydig adultas (184).

La conversión de 4-ene-3-cetosteroides a 5α -dihidro-3-cetosteroides está a cargo de una enzima microsomal, NADPH dependiente, la 5α reductasa. Su rol más conocido es la conversión de testosterona en dihidrotestosterona, el andrógeno más potente responsable de la diferenciación de genitales externos y próstata (185). La mayor conversión ocurre en tejidos periféricos, aunque alguna actividad está presente en el testículo. Se ha descrito que células de Leydig de rata aisladas producen dihidrotestosterona (186). El tratamiento de ratas inmaduras con prolactina aumenta la actividad de la enzima 5α -reductasa. Tanto la LH como la prolactina están involucradas en el mantenimiento de la actividad 5α -reductasa en testículos de ratas prepuberes. Se han identificado dos tipos de 5α -reductasa en una biblioteca de cDNA humano siendo el tipo 2 es el predominante en fibroblastos de piel y en próstata (187, 188).

La enzima 5α -reductasa es muy activa en el testículo de ratas inmaduras y por ende los andrógenos 5α reducidos son más abundantes que la testosterona. Esta actividad aumenta durante la maduración temprana, alcanza un nivel máximo entre los días 25 y 45 de vida y luego disminuye (186). Se acepta que el patrón de producción de andrógenos testiculares observado durante la maduración sexual refleja los cambios de la actividad esteroidogénica de la células de Leydig, a pesar de que se ha descrito alguna actividad 5α -reductasa en los túbulos seminíferos de ratas inmaduras (189, 190).

De acuerdo a la edad del individuo se observan diferencias en el metabolismo de sustratos por parte de enzimas testiculares específicas. En el humano, la enzima P450c17, por ejemplo, declina su actividad a medida que aumenta la edad en el adulto (191). La actividad 5α reductasa también es dependiente de la edad siendo muy escasa, o despreciable en el testículo fetal y prepuberal y aumentando después de la pubertad (192).

Regulación hormonal de la función testicular : Rol de la LH

Como se ha visto, las hormonas LH/hCG causan dos tipos de respuestas en las células de Leydig la primera, dentro de los primeros minutos es un fuerte incremento de la producción

de cAMP y de esteroides y no requiere la síntesis de mRNA para enzimas esteroidogénicas. Este efecto agudo es mediado por cAMP e implica un aumento de la translocación de colesterol del citosol a la membrana interna mitocondrial, seguido por su conversión a pregnenolona y finalmente a testosterona. Esta respuesta aguda depende del estado de diferenciación celular, especialmente del número de receptores para LH/hCG, su acoplamiento a efectores intracelulares, la actividad de las enzimas esteroidogénicas y la cantidad de colesterol disponible. El segundo tipo de respuesta consiste en un efecto trófico a largo plazo de la hormona sobre la estructura y función celular, implica síntesis de mRNA para enzimas esteroidogénicas y se manifiesta con un aumento de la actividad de dichas enzimas (1).

Uno de los mecanismos propuestos para relacionar los efectos agudo y a largo plazo es la inducción de la transcripción de proteínas reguladoras. En muchos tipos celulares la expresión de protooncogenes nucleares de la familia *jun* y *fos* es una respuesta inmediata a un amplio rango de hormonas y factores de crecimiento. En células MA-10, la hCG induce un aumento rápido y transitorio de mRNA *c-fos* y *c-myc* (210, 211). En cultivos de células de Leydig porcinas, luego de estimulación con hCG ó con análogos de cAMP se observa un rápido y transitorio aumento de los niveles de mRNA de *c-fos*, *c-myc* y *jun-B* pero no de *c-jun* (72).

Efectos de LH/hCG, FSH y GH sobre las funciones diferenciadas de la célula de Leydig

Algunos estudios *in vivo* en animales adultos indican que la LH es el único factor requerido para mantener la estructura y la función de la célula de Leydig (212), mientras que otros estudios proponen que hormonas pituitarias como la prolactina (213) y la GH (214) serían necesarias. Altas dosis de LH/hCG sobre las células de Leydig producen tres tipos sucesivos de respuesta: 1) respuesta esteroidogénica aguda, 2) desensibilización transitoria, como resultado de varios fenómenos (pérdida de receptores a LH/hCG, desacoplamiento entre receptor y adenilatociclasa y disminución de actividad de enzimas esteroidogénicas) y 3) efectos tróficos a largo plazo sobre organelas intracelulares y aumento de la actividad esteroidogénica.

Estudios *in vitro* en varias especies han demostrado el efecto estimulador de las gonadotrofinas sobre la P450 scc, aumentando la síntesis *de novo* en rata (215) y en cerdo (216), incrementando el mRNA P450scc en cerdo inmaduro. Se han investigado los elementos genómicos involucrados en la regulación transcripcional de P450 scc y se

ha observado que la secuencia reguladora de P450scc parece ser especie-específica y tejido-específica (216).

Una enzima que juega un rol crucial en la síntesis de andrógenos es la P450c17, localizada en retículo endoplásmico liso y encargada de catalizar dos reacciones: 17-hidroxilación de esteroides c21 y clivaje de una cadena lateral de dos carbonos para rendir esteroides c19 (217, 218). La regulación de la expresión de mRNA P450c17 es cAMP dependiente. La expresión de P450c17 es inhibida por DHT y/o por receptor de andrógenos. El efecto de hCG sobre los niveles de mRNA P450c17 depende de la dosis utilizada, como se describe en un estudio *in vivo* en ratas mientras dosis pequeñas de hCG (0.2 µg) aumentan los mismos, dosis elevadas de hormona (10 µg) producen un suave aumento seguido de una disminución de mRNA (219). Habría factores tejido-específicos y especie-específicos necesarios para la expresión basal e inducida por cAMP del gen P450c17.

Se ha descrito que el cAMP aumenta el mRNA para la enzima 3β-HSD así como la proteína en células de Leydig de rata inmadura y adulta (220). También se ha descrito en células de Leydig y granulosa porcinas la estimulación de mRNA para 3β-HSD por gonadotrofinas. La cicloheximida no afecta la expresión constitutiva de la enzima pero reduce el efecto estimulador de hCG. Estudios *in vivo* demuestran que la LH aumenta marcadamente la actividad 17β-HSD en células de Leydig murinas. Por otra parte la actividad aromatasa de la célula de Leydig del cerdo inmaduro es estimulada por hCG de manera dosis dependiente (74).

Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado claramente la habilidad de la FSH para aumentar el número de receptores para LH en ovario entero, folículos aislados y cultivo de células de la granulosa. Se postula que esta facultad depende de AMPc ya que el efecto de FSH puede ser estimulado por análogos de AMPc ó por otros factores que aumentan el AMPc intracelular como prostaglandinas E1, E2 y toxina colérica. El aumento de receptores para LH producido por FSH puede ser regulado positivamente por estrógenos (221).

Por otro lado las progestinas, los andrógenos, el PDGF y la LH también pueden aumentar el efecto inductor de la FSH en el contenido de receptor de LH. Garzo y Dorrington han descrito que la insulina puede aumentar la acción de la FSH sobre la actividad aromatasa. Como la dosis efectiva 50 es 120 ng/ml y dosis menores no son efectivas, se ha postulado que otro factor, como el IGF-1 podría tener un rol fisiológico y que la insulina a altas dosis estaría actuando a través del receptor de IGF-1 (222).

Por su parte, el EGF y los glucocorticoides inhiben la acción de FSH. La exposición excesiva a LH resulta en la regulación negativa del contenido de receptor para LH.

Con respecto a la función de la GH se observó que la reducción del tamaño testicular en ratas enanas deficientes de GH podría reflejar su rol en el desarrollo de la función testicular normal. Esta reducción del tamaño testicular, sin daño en la función espermatogénica, indicaría una disminución de la población de células de Sertoli, sugiriendo que la GH podría tener importancia en el desarrollo del testículo prepuberal (223). Como el incremento en el crecimiento y maduración esquelética preceden el comienzo de la pubertad en monos y en humanos, factores que regulan el crecimiento pueden reactivar directa o indirectamente el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal. Niños con deficiencia en hormona de crecimiento tienen pubertad retardada y una terapia de reemplazo con GH en estas condiciones puede iniciar la maduración reproductiva o acelerar el proceso una vez comenzado éste (224).

Estudios *in vitro*

J. Mather y col. compararon cultivos de células de Leydig provenientes de tres especies: rata, ratón y cerdo y proponen que el cerdo es el más ventajoso para el estudio de la regulación de gonadotrofinas (193). Asimismo C. Monet-Kuntz e Y. Fontaine han propuesto que el cerdo es un modelo valioso para estudio de la esteroidogénesis testicular por presentar, a diferencia de la rata, un prolongado período postnatal de quiescencia prepuberal (194). B.C. Lee y col. estudiaron el modelo de mono que también presenta la ventaja de un desarrollo puberal tardío y estudian el efecto de FSH en función de la edad en cultivos de células de Sertoli de mono (195).

En un estudio en el mono capuchino, se ha descrito que el testículo metaboliza progesterona principalmente a 20α -dihidroprogesterona y se encuentra sólo trazas de testosterona. Sin embargo la dehidroepiandrosterona puede ser convertida en androstenediona y testosterona (196).

Por su parte, en el mono tití *Saquinus oedipus*, el más primitivo primate del nuevo mundo de la familia Callitricadae, la pregnenolona es convertida a testosterona exclusivamente por la vía 4-ene, siendo el mayor metabolito la 17 hidroxiprogesterona y se postula que la c17-c20 liasa sería la enzima limitante para la síntesis de testosterona (197).

Resultados comparables se obtuvieron al estudiar el babuino *Papio anubis* tanto en testículos de individuos inmaduros como maduros. En ambos casos la conversión de pregnenolona es por la vía 4-ene. Mientras que el testículo adulto evidencia la presencia de

actividad 20 α -hidroxiesteroide dehidrogenasa y 5 α -reductasa, el inmaduro carece de esta última enzima.

En estudios *in vitro* sobre la esteroidogénesis testicular en el mono rhesus *Macaca mulatta*, Sharma y colaboradores (198) concluyeron que la vía predominante de biosíntesis de testosterona es la 4-ene, mientras que otros autores (199) postulan la vía 5-ene y un reciente trabajo informa que ambas vías son utilizadas pero que la 4-ene es la predominante (200).

En el testículo del orangután *Pongo pygaeus*, la pregnenolona puede convertirse a testosterona a través de ambos caminos, siendo el 4-ene el predominante. La testosterona es el metabolito principal y es importante la actividad de las enzimas 20 α -hidroxiesteroide dehidrogenasa y 5 α reductasa (201).

En resumen, los primates más primitivos como el mono tití convierten la pregnenolona a testosterona exclusivamente a través de la vía 4-ene y tienen como metabolitos predominantes otros distintos de testosterona. En primates superiores como el orangután la pregnenolona es convertida a testosterona principalmente a través de la vía 5-ene y la testosterona es el metabolito principal.

Rey y col. estudiaron los cambios madurativos en el túbulo seminífero de una especie de primates del nuevo mundo, el *Cebus apella*. Describieron que el volumen testicular aumenta continuamente desde el nacimiento hasta la pubertad, que esto depende del aumento de longitud del túbulo seminífero, que a su vez se debe a la rápida multiplicación de células de Sertoli en el período neonatal. En la pubertad aumenta la población espermatozoal lo que provoca un incremento en el diámetro y también en la longitud de los túbulos seminíferos. El incremento más importante del volumen testicular es desde el nacimiento hasta los cinco meses de vida postnatal (202). Estudiaron la esteroidogénesis testicular durante el desarrollo postnatal, demostrando que el testículo del mono *Cebus* es esteroidogénicamente activo a todas las edades del desarrollo postnatal, con un aumento progresivo en el contenido y la producción de andrógenos que alcanza su pico en la pubertad. La testosterona fue el principal andrógeno encontrado dentro del testículo a casi todas las edades. Los principales precursores fueron pregnenolona y dehidroepiandrosterona pero sus concentraciones fueron menores que las de testosterona, excepto en animales infantiles - de 4 meses a 1 año-. En incubaciones de tejido testicular con precursores radiactivos de ambas vías los autores observaron que el agregado de hCG promueve cambios madurativos en cuanto a la preferencia de la vía esteroidogénica,

aumenta la producción de testosterona y la actividad 5α reductasa y plantearon que habría un cambio filogénético de la vía 4-ene más activa en monos primitivos a la 5-ene más activa en primates superiores y en humanos (203).

Estos y otros estudios han contribuido a comprender las interacciones paracrinas dentro del testículo así como a identificar nuevos productos de secreción y receptores específicos. Sin embargo la mayoría han sido realizados en modelos animales, siendo muy escasa la información acerca de trabajos realizados a partir de testículo humano. En esta especie se ha descrito que la vía 5-ene es la preferida para la conversión de pregnenolona en testosterona, aunque la vía 4-ene tiene algo de importancia. Cuando se usa progesterona como sustrato el metabolito más abundante es la 17α -hidroxiprogesterona mientras que 20α -dihidroprogesterona y 17-hidroxi 20α -dihidro progesterona son metabolitos menores (204).

El trabajo con material humano prepuberal es escaso. Chemes y col. estudiaron la producción de testosterona y la respuesta a hCG en cultivo de células mesenquimáticas precursoras de Leydig obtenidas a partir de la orquidectomía de pacientes prepúberes con insensibilidad a los andrógenos. Demostraron que los precursores mesenquimáticos de Leydig son capaces de sintetizar testosterona, que la hCG aumenta dicha secreción y promueve un efecto trófico estimulando la diferenciación citológica de precursores mesenquimáticos a células de Leydig maduras (205).

Cigorruga y col. estudiaron las características morfogenéticas y esteroidogénicas de células peritubulares aisladas de fragmentos de túbulos seminíferos de dos pacientes con insensibilidad a los andrógenos. Describieron que en el compartimiento peritubular hay células capaces de expresar funciones esteroidogénicas que están asociadas con células de Sertoli en una interacción específica mesenquimática-epitelial y que podrían regular la secreción de ABP por células de Sertoli (206).

G. Verhoeven y J. Cailleau en 1987 estudiando *in vitro* testículos humanos obtenidos por orquidectomía, por diagnóstico de insensibilidad a los andrógenos, identificaron un factor producido por túbulos seminíferos en cultivo capaz de estimular a células de Leydig (207).

H. Lejeune estudió la secreción de testosterona en un modelo de células de Leydig humanas adultas aisladas y cocultivadas con células de Sertoli. En este caso el material fue removido de pacientes adultos con muerte cerebral (208). P. Foucault estudió la producción de lactato, 17β -estradiol y transferrina en cultivos de células de Sertoli de

testículos obtenidos de pacientes adultos durante el proceso de transplante de órganos (139).

Al comenzar la puesta a punto del cultivo primario de células testiculares humanas prepúberes a partir de necropsias nos encontramos con una falta total de información acerca de un modelo similar. Sólo un trabajo de Ruokonen y col. menciona que no habría diferencias en la composición de esteroides entre testículos removidos quirúrgicamente y testículos de necropsias (209).

Métodos de cultivo para el estudio de funciones celulares

Si bien los distintos tipos de microscopio permiten observar desde estructuras histológicas hasta moléculas de gran tamaño y organelas intracelulares, y por otro lado una molécula puede ser localizada por tinción específica, la comprensión molecular de una célula requiere de análisis bioquímicos que implican la ruptura celular. Con el fin de preservar la mayor información posible acerca de un tipo celular, los biólogos celulares han desarrollado técnicas para disociar las células de un tejido y separarlas en sus diferentes tipos celulares obteniéndose como resultado una población celular relativamente homogénea para ser analizada (225). El primer paso, que consiste en reducir el tejido a una suspensión de células individuales se hace rompiendo la matriz extracelular y las uniones que mantienen unidas las células entre sí. El mejor rendimiento de células disociadas viables se obtiene a partir de tejidos fetales o neonatales, tratados con enzimas proteolíticas (como colagenasa ó tripsina) y con agentes como el EDTA (ácido etilen diamino tetra acético) que unen ó quelan el calcio del cual depende la adhesión célula-célula. Se han hecho varios intentos para separar tipos celulares diferentes a partir de una suspensión mixta. Por ejemplo se utilizó una diferencia en las propiedades físicas como la densidad celular, haciendo centrifugación en gradientes de densidad. También se utilizó la capacidad de algunos tipos celulares de adherirse fuertemente a una superficie de vidrio o plástico y separar las células que se adhieren de las que no. Técnicas más sofisticadas implican la marcación específica con anticuerpos acoplados a colorantes fluorescentes y la separación posterior de las células marcadas y no marcadas con un "cell sorter" activado por fluorescencia. Pero todo método de purificación implica una pérdida en el rendimiento final y entonces es necesario que la muestra de partida tenga un tamaño -en masa- considerable para que luego de la purificación la cantidad de células sea apreciable.

Cuando el material de partida consiste en lotes de animales de experimentación -rata, ratón- se pueden aplicar las técnicas de aislamiento de células a partir de un tejido y su

posterior purificación. En cambio, cuando el material de partida es un tejido humano y la masa es escasa es necesario sacrificar pasos de purificación para obtener una cantidad considerable de células.

Una población celular puede ser utilizada para estudios bioquímicos y para conocer el comportamiento de las células en condiciones estrictamente definidas. En condiciones apropiadas, la mayoría de las células animales y vegetales pueden vivir, multiplicarse y expresar sus propiedades diferenciales en una placa de cultivo celular. Pueden observarse en un microscopio de contraste de fase ó bien ser analizadas bioquímicamente. Por ejemplo, se puede estudiar el efecto de agregar ó de remover moléculas específicas como hormonas ó factores de crecimiento. Además en un cultivo mixto se pueden estudiar las interacciones entre un tipo celular y otro.

El primer cultivo de tejidos data de 1907, se trató de un experimento diseñado para resolver la doctrina neuronal, una controversia neurobiológica acerca del origen unicelular de una fibra nerviosa. Los primeros experimentos de cultivo se realizaban a partir de pequeños trozos de tejido o explantos. Actualmente los cultivos se realizan a partir de suspensiones celulares.

Se entiende por cultivo primario a un cultivo de células preparadas directamente de un tejido de un organismo. Éstas a su vez se pueden remover de la placa de cultivo y ser utilizadas para sembrar un cultivo secundario. Muchas veces las células así cultivadas despliegan muchas de las propiedades diferenciadas que tenían originalmente. Si este fenómeno ocurre, se tiene acceso a estudiar a la célula de una manera que no es posible hacer en el tejido intacto.

Luego de un número finito de divisiones mitóticas en cultivo, la mayoría de las células de vertebrados mueren. Por ejemplo, los fibroblastos de piel humana pueden vivir hasta cinco meses en cultivo, dividiéndose entre 50 y 100 veces antes de morir. Se sugiere que la duración máxima de vida de las células en cultivo está relacionada con la duración máxima de vida del animal del cual derivaron. Ocasionalmente una variante celular puede propagarse indefinidamente para formar una línea celular. Experimentalmente puede inducirse a células normales para que se dividan indefinidamente transformándolas químicamente ó a través de un virus tumoral. Las líneas celulares transformadas y no transformadas son muy útiles como fuente de un tipo celular uniforme y numeroso, pueden almacenarse a -70 ó -180 °C y mantenerse viables luego de ser descongeladas. Sin embargo, las células de líneas celulares

frecuentemente difieren de sus ancestros del cultivo primario. La utilización de células provenientes de tejidos embrionarios, fetales o jóvenes permite el estudio en cultivo aprovechando la capacidad proliferativa de los tejidos jóvenes y sin alejarse demasiado del tejido original.

El modelo de estudio de testículo prepúber humano normal en cultivo permite que sea utilizado como patrón de comparación para el estudio de testículos patológicos.

Síndrome de Smith-Lemli-Opitz

El colesterol constituye un metabolito enigmático esencial: a pesar de que las recomendaciones de disminuir el colesterol sérico sean generalizadas, su bajo contenido está asociado a una morbilidad aún poco comprendida. El colesterol sérico puede aumentarse con dietas ricas en lípidos a pesar de que el colesterol de la dieta tiene relativamente escasa influencia en la concentración del colesterol del suero. El síndrome de Smith-Lemli-Opitz caracterizado por niveles de colesterol sérico extremadamente bajos constituye un modelo para la evaluación de la absorción y del metabolismo del colesterol de la dieta (226, 227).

Utilizando modelos animales, se encontraron cambios degenerativos en el sistema nervioso de ratas que recibían drogas hipocolesterolémicas y se propuso que el motivo de los daños sería un efecto tóxico de 7-dehidrocolesterol elevado ó una deficiencia de colesterol (228, 229, 230). Roux y col. observaron que una dieta hipercolesterolémica administrada en ratas preñadas tratadas con agentes hipocolesterolémicos disminuye pero no elimina el efecto teratogénico de la inhibición de la síntesis de colesterol (231).

Las ratas fetales y jóvenes utilizan principalmente el colesterol endógeno pero también obtienen algo de colesterol exógeno (232). El colesterol plasmático es bajo en niños recién nacidos a término, 60 mg/dl, y aumenta rápidamente en los primeros días de vida (233). Los recién nacidos y niños más pequeños pueden sintetizar el colesterol necesario para la mielinización, la síntesis de hormonas, los metabolitos de vitamina D y la integridad de la membrana celular. Hasta el presente no se han establecido los requerimientos de colesterol de la dieta (226).

En un reciente trabajo de Ness (234) se estudia la regulación en el desarrollo de la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la homeostasis del colesterol. El estudio en ratas abarca la hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, colesterol 7 α hidroxilasa y el receptor para LDL. Se examina las fuentes de colesterol para las necesidades del cerebro, el hígado y el testículo durante el desarrollo. En el cerebro el colesterol es necesario para la mielinización, en el hígado para la

regulación de la síntesis de ácidos biliares. En el cerebro, la HMG-CoA sintetasa presenta un pico de actividad a los 4 días de vida, el cual corresponde al comienzo del período de crecimiento rápido del cerebro y de la mielinización. El aumento es a nivel de la transcripción. En el hígado durante los primeros 18 días de vida de la rata, los niveles de colesterol sérico se duplican respecto a los del nacimiento, aumento que está asociado a una disminución de la actividad de la HMG-CoA reductasa. Es decir que el colesterol provisto por la leche materna ejerce un efecto regulador tanto a nivel transcripcional como post transcripcional. Luego del destete se observa un pronunciado incremento del mRNA y de la actividad de la HMG-CoA reductasa. En el testículo se ha encontrado expresión del mRNA para receptor de LDL así como isoformas tejido-específicas de mRNA de HMG-CoA reductasa y de farnesil pirofosfato sintetasa. Las formas testículo específicas de mRNA de estas enzimas aumentan marcadamente a medida que la rata madura sexualmente, alrededor de los 30-40 días (235). La actividad HMG-CoA reductasa es máxima a los 21 días y luego declina, mientras que el mRNA del receptor de LDL aumenta entre los 31 y 120 días.

Estos estudios del desarrollo sugieren que en cerebro, en hígado y en riñón, la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de colesterol, de ácidos biliares y del receptor LDL parecen estar relacionadas con las necesidades de colesterol de cada tejido. Parecería que la síntesis *de novo* de colesterol juega un rol extremadamente importante en el desarrollo temprano de estos tejidos. De esta manera se explicarían la microcefalia, la falta de ácidos biliares y los genitales ambiguos observados en pacientes con Smith-Lemli-Opitz (236).

Síndrome de insensibilidad a los andrógenos

El síndrome de insensibilidad a los andrógenos es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por una insensibilidad de la piel genital a los andrógenos, independientemente de los niveles plasmáticos normales de testosterona, es decir, es la pérdida de la capacidad de la célula blanco a responder a los andrógenos. Ha sido descripto hace más de un siglo, ya que el primer caso publicado data de 1848. Hay dos tipos de insensibilidad a los andrógenos la forma completa y la parcial o incompleta, dependiendo del mayor o menor grado de expresión del síndrome como resultado de factores aun poco comprendidos. En la prepubertad este síndrome muchas veces no se diagnostica debido a la ausencia de indicios clínicos obvios. El individuo afectado suele presentar fenotipo y genitales externos femeninos signos que son más pronunciados a medida que se acerca la pubertad. Se evidencian hemias inguinales que cuando se operan demuestran ser gonadas masculinas (237). El cariotipo es 46,XY y deben hacerse estudios más detallados

de los genitales externos y biopsia de piel genital. La amenorrea primaria es un signo en la postpubertad, otro es la infertilidad. Los niveles de testosterona plasmática corresponden a los de un adulto así como también están elevados dehidroepiandrosterona y su sulfato. La respuesta a la estimulación con hCG es normal o está aumentada en la forma completa. Son elevados también los niveles de LH plasmática. La globulina que transporta hormonas sexuales (SHBG) está elevada y esto altera la concentración de testosterona libre, explicando el aumento de LH. Los estrógenos urinarios están elevados respecto a los niveles normales masculinos. Se sabe que el testículo produce estradiol, el cual, habiendo falta de respuesta a los andrógenos, puede ser responsable de la ginecomastia. La histología testicular varía de acuerdo a la edad del paciente. En general los testículos son inmaduros, de apariencia fetal o criptorquídica. Los túbulos seminíferos inmaduros se agrupan en microadenomas. Las células de Leydig son inmaduras, similares a las fetales, aun en pacientes puberales. Puede haber fibrosis e incluso hialinización del estroma. También puede observarse hiperplasia de células de Leydig junto con aplasia germinal. Se observa feminización completa ó incompleta con hipospadia y microfalo y ginecomastia puberal. Estudios en fibroblastos de piel genital humana de individuos con insensibilidad a los andrógenos demostraron un defecto de la fijación del andrógeno al receptor citosólico. El gen del receptor de andrógenos o de un factor regulador del mismo está en el cromosoma X humano. Mutaciones o deleciones parciales de este gen fueron encontradas en pacientes con este síndrome, por lo que se piensa que sería un grupo heterogéneo de lesiones moleculares.

Dado que el fenotipo y los genitales externos son femeninos, los pacientes deben clasificarse como de sexo femenino (237). El tratamiento incluye intervención quirúrgica, orquidectomía bilateral a causa de la posibilidad de degeneración maligna de los testículos, terapia de reemplazo hormonal con estrógenos y psicoterapia.

Tumor Calcificante de Células Grandes de Sertoli

El tumor de células de Sertoli es una lesión poco frecuente que representa sólo el 1% de todas las neoplasias testiculares. Un subtipo caracterizado por células de Sertoli atípicamente agrandadas y por calcificaciones intratubulares ha sido descrito bajo el nombre de Tumor Calcificante de Células Grandes de Sertoli (LCCSCT) (238, 239). De los veinte casos descritos hasta el presente aproximadamente la mitad ocurrió en niños prepúberes, asociado con pubertad precoz y/o ginecomastia mientras que otras asociaciones encontradas fueron adenoma pituitario e hiperplasia adrenal cortical bilateral (240).

En 1985 Carney y col. (241) describieron un cuadro clínico complejo caracterizado por mixomas, pigmentación en manchas e hiperactividad endocrina en cuarenta pacientes, dieciséis de sexo masculino, nueve de los cuales presentaron un tumor de células de Sertoli que correspondía, en su mayoría, a la variante de células grandes calcificantes.

En el laboratorio de cultivo celular del Hospital Garrahan se ha estudiado un tumor calcificante de células grandes de Sertoli bilateral, endocrinológicamente activo e independiente de gonadotrofinas, presente en un niño de 8 años de edad quien consultó por ginecomastia bilateral.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Los objetivos generales se basaron en el desarrollo metodológico del cultivo primario de células testiculares humanas a partir de testículos de necropsias con el fin de establecer algunas respuestas a los interrogantes acerca de la fisiología testicular de la prepubertad y pubertad humanas y de sus alteraciones, analizando los factores involucrados en la modulación de la esteroidogénesis testicular.

Objetivos parciales

Se definieron 10 objetivos parciales que se describen a continuación:

- 1- Establecer las condiciones óptimas para la obtención y conservación de las muestras de necropsias (tiempo *post mortem*, temperatura), digestión del tejido y preservación del cultivo de las células. Analizar la secreción de testosterona en el medio de cultivo como marcador de actividad de células de Leydig
- 2- Identificar los tipos celulares que componen el cultivo primario mixto de células testiculares humanas por técnicas de histoquímica y de inmunocitoquímica
- 3- Estudiar la secreción de testosterona a lo largo de los días de cultivo y hallar el día óptimo de estudio
- 4- Estudiar la esteroidogénesis en cultivo a partir de testículos correspondientes a cuatro grupos etarios. Éstos son: grupo 1, de 1 a 10 días de vida que corresponde al período neonatal temprano; grupo 2, de 1 a 9 meses de edad que equivale al período de activación testicular postnatal; grupo 3, de 1 a 7 años, o período de quiescencia testicular prepuberal y grupo 4, de 12 a 15 años, que representa al período puberal. Comparar la secreción de testosterona basal y la respuesta a LH/ hCG y FSH entre los grupos etarios
- 5- Estimar la actividad de las enzimas intervinientes en la biosíntesis de testosterona midiendo la secreción de esteroides por el método de radioinmunoensayo
- 6- Estudiar las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$ de la esteroidogénesis por incubación con precursores tritiados y cromatografía en capa delgada
- 7- Estudiar el efecto de GH, insulina e IGF-1 sobre la esteroidogénesis testicular humana
- 8- Estudiar la secreción de inhibina-B como marcador biológico de células de Sertoli
- 9- Desarrollar la técnica de subcultivos de células testiculares humanas prepúberes para lograr obtener material para estudios subsiguientes
- 10- Aplicar la metodología desarrollada para estudiar la capacidad esteroidogénica en tumores testiculares y en testículos de gonadectomías de pacientes con anomalías en la diferenciación sexual, para profundizar el conocimiento de los mecanismos que producen alteraciones de la esteroidogénesis en estas patologías.

MATERIAL CLINICO

Se estudiaron células testiculares en cultivo en un total de 50 pacientes, 43 provenientes de necropsias de sujetos menores de 8 años de edad, 4 de orquidectomías de sujetos entre 12 y 15 años y 3 de orquidectomías de pacientes con patología gonadal: tumor testicular (1), con síndrome de Smith-Lemli-Opitz (1) y con síndrome de insensibilidad a los andrógenos (1). Las primeras 47 muestras elegidas para estos estudios no presentaron diagnósticos asociados a enfermedades endocrinológicas. En varias ocasiones la misma muestra se utilizó para más de un objetivo. El presente protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital de Pediatría Garrahan.

El total de cultivos fue clasificado en cuatro grupos etarios de acuerdo a los conocimientos previos de la fisiología del testículo humano. El grupo 1 comprende 9 cultivos provenientes de niños entre 1 y 10 días de vida, momento en el cual el parénquima testicular está bajo la influencia de hormonas maternas, fundamentalmente de origen placentario. El grupo 2 abarca 18 cultivos provenientes de niños entre 0.7 y 9 meses de edad. Dentro de esta edad está descrito el pico postnatal de actividad testicular de la prepubertad, con aumento en los niveles de testosterona plasmática. El grupo 3 incluye 16 cultivos provenientes de niños entre 12 y 84 meses de edad. En esta etapa se describe el periodo de reposo testicular prepuberal. El grupo 4 comprende 4 cultivos provenientes de niños en edad puberal -entre 12 y 15 años-. A diferencia de los anteriores, estos testículos provienen de orquidectomías relacionadas a patologías no endocrinas (recidivas de leucemias).

Para la identificación de los cultivos primarios se utilizó un código que consiste en las dos primeras letras del apellido del paciente, la edad y la unidad en que está expresada: días (d), meses (m) o años (a). Por ejemplo, Za1m es el código que identifica al cultivo primario de un paciente de apellido Za... y de 1 mes de edad. Para identificar a los subcultivos al código del cultivo primario se agrega "sub" y una cifra que corresponde al número de subcultivo. Por ejemplo, Za1msub2 es el código que hace referencia al subcultivo 2 del paciente Za... de 1 mes de edad. Para los cultivos criopreservados se añade "crio" y una cifra que simboliza el número de subcultivos después de la criopreservación. En el ejemplo anterior, Za1msub2crio1 es el código que identifica al primer subcultivo después de la criopreservación del subcultivo 2 del paciente Za... de 1 mes de edad. Sumando las cifras de sub y crio se obtiene el número total de subcultivos. En la tabla M1 se detalla cada grupo etario con los cultivos correspondientes expresados en el código descripto.

Para llevar a cabo el primer objetivo que consistió en la puesta a punto del cultivo primario de células testiculares humanas, los testículos estudiados fueron 7, 3 del grupo 2 y 4 del

grupo 3. Se define el tiempo *post mortem* (tpm) al intervalo -expresado en horas- entre el fallecimiento del paciente y el comienzo del procesamiento del tejido. Los tpm de estas muestras fueron entre 10 y 72 horas: 10, 24 (n=2), 38, 45, 48 y 72 horas.

Para cumplir con el segundo objetivo, identificación de tipos celulares por estudio de histoquímica para 3 β -HSD e inmunocitoquímica para filamentos específicos, se estudiaron cultivos del grupo 1 para 3 β -HSD y del grupo 3 para la inmunocitoquímica.

Para llevar adelante el tercer objetivo, estudio de la cinética de secreción de testosterona, se utilizaron 3 cultivos del grupo 2, 3 cultivos del grupo 3 y 2 cultivos del grupo 4.

Para realizar el cuarto objetivo, que fue el estudio de la secreción basal de testosterona y de la respuesta a estímulos gonadotrópicos en cultivo, se estudió un total de 17 cultivos, 4 del grupo 1, 6 del grupo 2, 5 del grupo 3, y 2 del grupo 4.

El quinto objetivo, la estimación de la actividad de las enzimas de la biosíntesis de testosterona, fue llevado a cabo por el análisis de regresión lineal entre testosterona y otros esteroides de la biosíntesis de testosterona, dosados por radioinmunoensayo en 15 cultivos, 8 del grupo 2 y 7 del grupo 3.

El sexto objetivo, estudio de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$ mediante la incubación con precursores tritados y análisis por cromatografía en capa delgada se realizó en 5 cultivos, 2 del grupo 1, 2 del grupo 2 y 1 del grupo 3.

El séptimo objetivo, estudio del efecto de GH, insulina e IGF-1 fue analizado en 11 cultivos -6 del grupo 2 y 5 del grupo 3- para GH, en 8 cultivos -7 del grupo 2 y 1 del grupo 3- para insulina y en 18 cultivos -4 del grupo 1, 7 del grupo 2, 6 del grupo 3 y 1 del grupo 4- para IGF-1.

La secreción de inhibina-B, octavo objetivo, se analizó en un total de 28 cultivos distribuidos de la siguiente manera: 7 cultivos del grupo 1, 9 del grupo 2, 9 del grupo 3 y 3 del grupo 4.

La técnica de subcultivos, objetivo noveno, fue llevada a cabo en 3 cultivos del grupo 2 y de 1 del grupo 4.

Finalmente, el décimo objetivo, estudio de la esteroidogénesis testicular en patologías relacionadas al testículo fue realizado en un paciente de 33 meses con Síndrome de Smith-Lemli-Opitz, en un niño de 30 meses con diagnóstico de Insensibilidad a los Andrógenos, y

en un niño de 9 años con diagnóstico de Tumor Calcificante de Células Grandes de Sertoli. A continuación se describen las principales características de estos tres pacientes así como el diseño experimental.

Paciente 1

El paciente con Síndrome de Smith-Lemli-Opitz era el primer hijo de matrimonio joven no cosanguíneo. En el embarazo se detectaron pocos movimientos fetales y oligoamnios. La gesta fue de 38 semanas y el parto eutócico. Los datos al nacer fueron 2450 g de peso 48 cm de talla y 33 cm de perímetro cefálico. A los 3 meses de edad el examen físico presentaba peso de 3250 g (-3,5 DS), talla 53.5 cm (-4,0 DS) y 36 cm perímetro cefálico (-3 DS). El examen físico mostraba hipotonía generalizada, cabeza con microcefalia y tortícolis congénita, cara con hipertelorismo, narinas antevertidas, micrognatia, paladar alto, orejas dismórficas, manos con línea simiana bilateral, clinodactilia del 5to dedo, pies con sindactilia blanda entre 2do y 3er orjejo. Se observó por tomografía axial computada ventriculomegalia dismórfica, quistes del septum pellucidum y displasia cortical. Los genitales externos estaban escasamente virilizados con un falo ligeramente hipertrófico (0,7 a 1,0 cm de largo) y cuerpos cavernosos muy finos. Presentaba un orificio único, amplio, perineal, y repliegues labio-escrotales. A la palpación presentaba dos resaltos gonadales en el trayecto inguinal. Se le asignó sexo femenino. Se practicó la orquidectomía bilateral a los 33 meses de vida. Se realizaron exámenes complementarios que revelaron un cariotipo: 46,XY.

Como grupo control para el cultivo del Smith-Lemli-Opitz, se utilizaron 3 cultivos de células testiculares provenientes de necropsia de niños de 33 (2) y 36 meses de edad sin patología genética ni endocrinológica (tumor abdominal, tumor hepático, pioventriculitis).

Para el estudio del efecto del inhibidor de la enzima 7-DHC- Δ 7reductasa (BM 15766) se hizo un cultivo de células testiculares control de un testículo de necropsia de un niño de 2 meses de edad con diagnóstico de insuficiencia renal crónica, en el cual se usó una dosis del inhibidor de 10^{-5} M, como solvente dimetilsulfóxido (DMSO) 0.2%. El protocolo consistió en 6 días de cultivo, los últimos 4 días con estímulo crónico de LH, LH + DMSO ó LH+BM15766.

Paciente 2

Se estudió un paciente 46,XY fenotípicamente femenino, con la forma parcial de Insensibilidad a los Andrógenos, sometido a gonadectomía bilateral a los 30 meses de edad. Como grupo control se estudiaron 4 cultivos de testículos provenientes de necropsia, de niños de 7, 16, 18 y 33 meses de edad, cuyos diagnósticos fueron bronqueolitis aguda, bronconeumonía, atresia pulmonar y tumor abdominal, respectivamente.

Paciente 3

Para el estudio *in vitro* de un tumor calcificante de células grandes de Sertoli el paciente fue un niño de 8 años quien consultó al Servicio de Endocrinología del Hospital Garrahan por presentar ginecomastia bilateral. El score de desvío estándar de su altura fue +2 y la edad ósea +1 año. El examen físico reveló grandes mamas, estadio de Tanner 4 y grandes nódulos duros en ambos testículos. El desarrollo del pene era acorde a su edad y presentaba signos mínimos de crecimiento de vello púbico. Se encontró una pigmentación en manchas marrones oscuras generalizada en toda la piel en el paciente, así como en su hermano varón de 9 años y en su madre. Ella a su vez había sido operada de una mixoma cardíaco a la edad de 34 años. El estudio ecográfico del paciente reveló múltiples nódulos testiculares calcificados y bilaterales mientras que sus glándulas adrenales eran normales. A los 9 años de edad se procedió a la orquidectomía bilateral y a la remoción de ambas mamas. Los testículos fueron utilizados para exámenes histológicos y para el estudio del cultivo celular.

Como control se utilizó un cultivo de células testiculares de un niño de 7 meses de edad, fallecido por una cardiopatía congénita, sin alteraciones endócrinas.

Además, un cultivo de células testiculares de un niño de 1 mes de edad, fallecido por una malformación cardiovascular severa, fue utilizado para testear el efecto del medio condicionado del cultivo del tumor sobre la regulación de la esteroidogénesis testicular.

Finalmente la tabla M2 resume toda la información del material clínico utilizado para el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral.

Tabla M1 Distribución de los cultivos primarios de células testiculares por grupos etarios utilizando el código descripto

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
<u>1-10 d</u>	<u>0.7-9 m</u>	<u>12-84m</u>	<u>12-15 a</u>
Ra1d	Va21d	Qu12m	Sa12a
Ap1d	Za1m	Ur16m	Fe14a
Bu2d	Gi1m	Va18m	Al15a
Fe4d	Lu1m	Pa18m	Lu15a
Ac5d	Te1.5m	He20m	
Vi6d	Or1.5m	Go21m	
Va8d	Ov2m	Mi22m	
Ca9d	Er2m	He24m	
Ra10d	Go3m	Ro24m	
	Di3m	Mo33m	
	Ol4m	Mi33m	
	Ch5m	Du36m	
	Ma6m	Se36m	
	Ba7m	Ar36m	
	Gi7m	Ri41m	
	Th7m	Ch84m	
	Ta8m		
	Ca9m		

Tabla M2 Distribución del número de cultivos utilizados para llevar a cabo cada uno de los objetivos

Objetivo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
	<u>1-10 d</u>	<u>0.7-9 m</u>	<u>12-84m</u>	<u>12-15 a</u>
1	—	3	4	—
2	1	—	1	—
3	—	3	3	—
4	4	6	5	2
5	—	8	7	—
6	2	2	1	—
7	4	7	6	1
8	7	8	10	4
9	—	3	—	1

Observación microscópica de tejidos testiculares

Se han observado y descrito preparaciones histológicas de los testículos de todas las muestras estudiadas. En los cortes histológicos correspondientes a un testículo de un niño de 2 días de vida, se observan cordones celulares rodeados de membrana basal y en el espacio intersticial, un acúmulo de células grandes, de citoplasma eosinófilo, núcleo con cromatina laxa y nucleolos evidentes características que recuerdan a células de Leydig fetales (figura I-A). En los cortes histológicos de testículos del grupo 2 (figura I-B) se pudieron diferenciar células de Leydig de tipo fetal y cordones seminíferos inmaduros con células de Sertoli inmaduras y espermatogonias. Esta combinación de células intersticiales maduras con células de los cordones seminíferos estaría presente en los cultivos mixtos de células testiculares humanas prepúberes de los primeros meses de vida postnatal. En los cortes histológicos correspondientes al grupo 3 no se pudieron reconocer células de Leydig diferenciadas, aunque sí células mesenquimáticas precursoras de Leydig, también es de notar la presencia de cordones seminíferos inmaduros, característicos del período prepuberal, figura I-C.

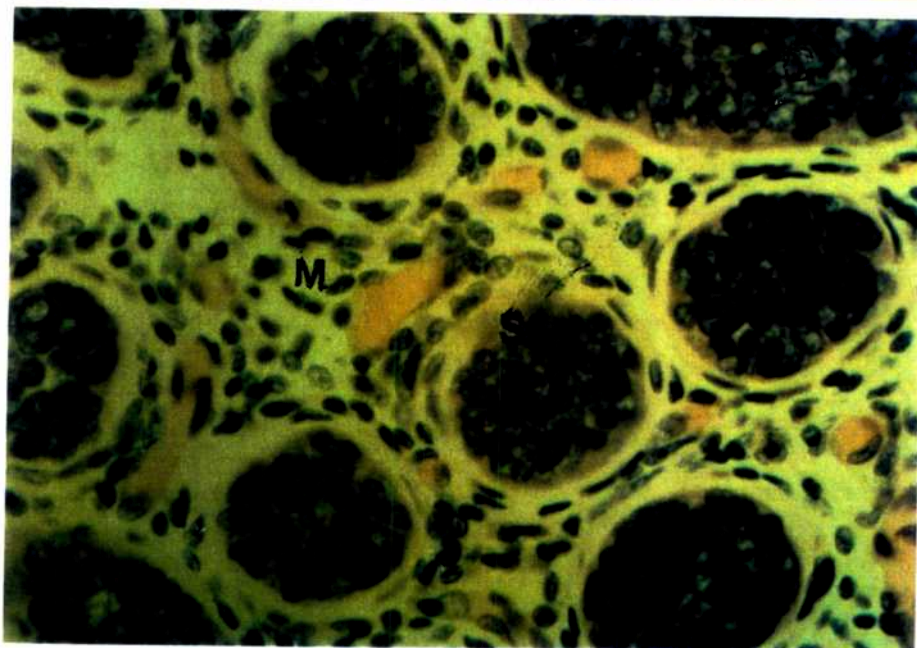
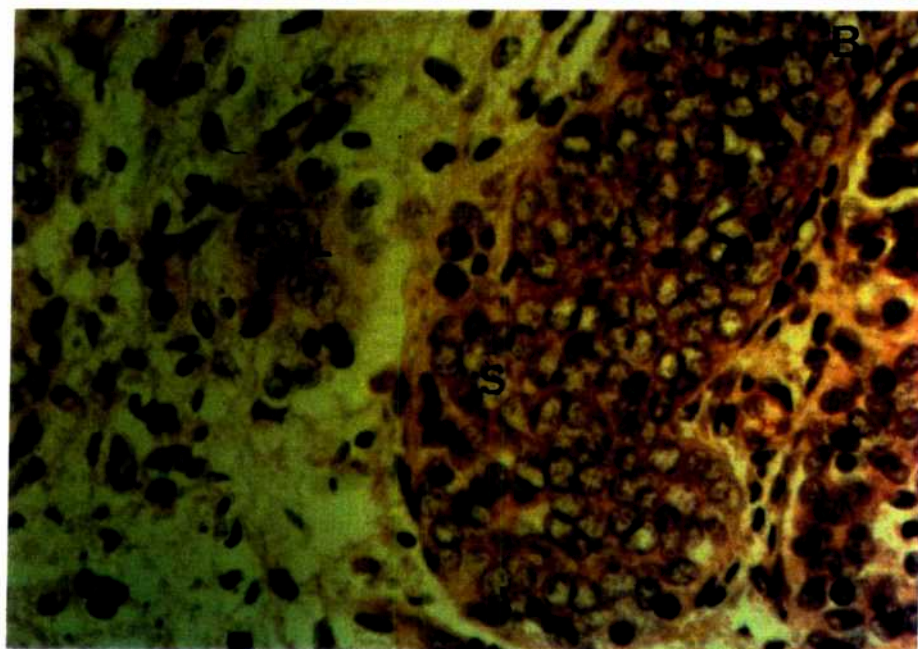
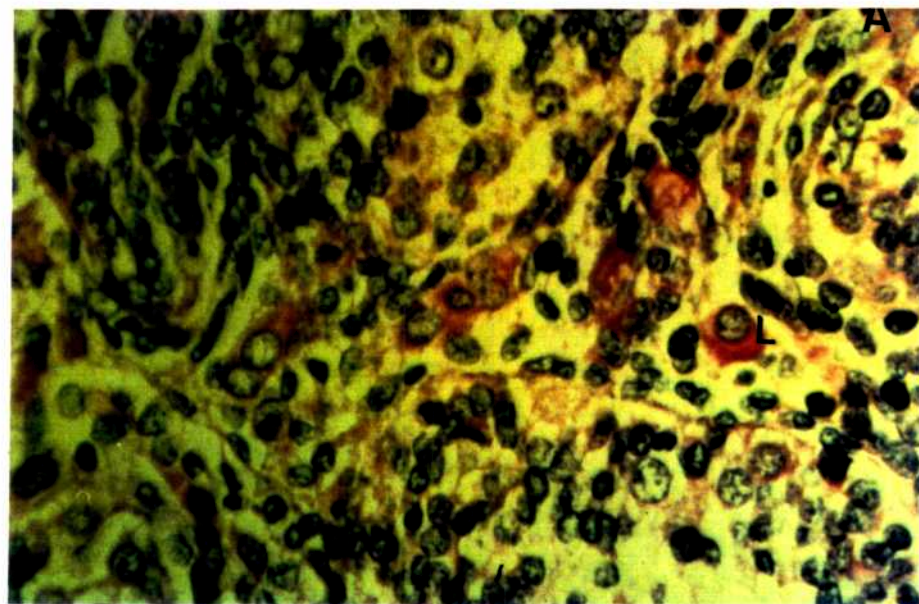


Figura 1 Microfotografías de cortes histológicos de testículos de pacientes de distintas edades. 1-A paciente de 2 días de vida. Cordones celulares rodeados de membrana basal y células grandes, intersticiales, de citoplasma eosinófilo, núcleo con cromatina laxa y nucleolos evidentes características de células de Leydig fetales (L) 1-B paciente de 3 meses de edad. En el intersticio células grandes, con características compatibles con células tipo Leydig (L) y a la derecha un túbulo seminífero inmaduro (S) 1-C paciente de 33 meses. Cordones seminíferos (S) y células intersticiales algunas con características de células mesenquimáticas (M). Ausencia de células de Leydig (H&E, A y B 40 x, C 25 x)

MATERIAL Y METODOS

MATERIALES

Los reactivos utilizados para el aislamiento y el cultivo celular fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. El suero fetal bovino fue de Gibco B.R.L.

Los antibióticos utilizados fueron facilitados por el Servicio de Farmacia del Hospital de Pediatría Garrahan.

La elección de los antibióticos para evitar o controlar las contaminaciones en los cultivos primarios provenientes de muestras de autopsias ha demandado una serie de pruebas que no siempre resultaron satisfactorias. Los antibióticos de rutina utilizados en cultivo celular han debido ser reemplazados por otras fórmulas con el fin de controlar el problema de las contaminaciones. Las probables fuentes de contaminación son: el medio intra-hospitalario, que el material de estudio sean muestras de autopsias realizadas en un ambiente sucio -no estéril- no comparable a un quirófano, las sepsis propias de muchos de los pacientes y/o los tratamientos antibióticos previos a su deceso.

El uso de antibióticos tuvo distintas etapas: en primer lugar el medio DME-Ham F12 es preparado con Gentamicina 20 mg/L (un aminoglucósido cuyo mecanismo de acción es alterar la síntesis proteica de los microorganismos en fase de proliferación logarítmica). Su espectro de acción es Gram - y + pero se observa resistencia de los microorganismos a través de plásmidos. No cubre todo el espectro de microorganismos-.

Para el cultivo primario se ha comenzado con los antibióticos más comúnmente utilizados en estudios *in vitro*: penicilina-estreptomicina (50.000 U/ml-0.2%). La penicilina es un bactericida que compete con la síntesis de mucopéptidos de la pared celular bacteriana, pero su espectro es limitado (cocos y bacilos Gram +) mientras que los Gram - son resistentes y pueden producir penicilasas. La combinación penicilina-estreptomicina no resultó suficiente para el control de las contaminaciones intrahospitalarias y fue necesario acudir al uso de drogas más complejas. Se utilizó cefalotina 100 µg/ml pero tampoco resultó eficiente. Actualmente se utiliza Imipenem (tienamicina formamidina/cilastatina sódica) (MSD) a una concentración final de 32 µg/ml en medio de cultivo. Este pertenece al grupo de β-lactámicos con una nueva estructura química. Su actividad antibacteriana consiste en inhibir la síntesis de la pared bacteriana a través de la inactivación de una o más transpeptidasas. Su espectro de acción es cocos Gram + (estafilo y enterococos), bacilos Gram - (enterobacterias) y pseudomonas. Se adiciona anfotericina-B (Amfostat) concentración 2.5 µg/ml como antimicótico.

En el procesamiento del tejido se tuvo en cuenta el control en agar-sangre del tejido recibido así como de todos los pasos llevados a cabo dentro de la preparación de la suspensión celular es decir disección, digestión enzimática, lavados, con el fin de identificar el origen de la contaminación si la hubiere. Apenas recibida, la muestra de tejido es colocada en alcohol 70% como desinfectante. La limpieza y desinfección del cuarto de cultivo así como de la incubadora de cultivo -con lavandina y solución fenolada al 5%- es otro punto indispensable para evitar las contaminaciones.

El material descartable para la manipulación de las células -pipetas, tubos cónicos para centrífuga, placas de Petri, placas multiwell- fue de poliestireno de tipo Falcon.

Todo el material de vidrio fue neutralizado, antes de utilizar, con ácido clorhídrico (ClH) 1N mientras que los tapones de goma recibieron tratamiento previo con hidróxido de sodio (OHNa) y ClH, 30 minutos en agua a 100 °C, para eliminar posibles residuos tóxicos.

Las hormonas gonadotrofina coriónica humana (hCG), luteinizante humana (hLH) y foliculo estimulante humana (hFSH) fueron facilitadas por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales, perteneciente al Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIDDK, NIH, USA). La hCG (13450 UI/mg) se utilizó, según la bibliografía, en una concentración de 10 ng/ml (134.5 mUI/ml). La hLH (40 UI/L) se utilizó en una dosis de 10 ng/ml (40 mUI/ml).

La hormona foliculoestimulante humana mencionada es altamente purificada por inmunoafinidad hFSH (2ng/ml=0.003UI/L). Se utilizó además una hormona foliculoestimulante humana recombinante (rhFSH) facilitada por Serono Argentina S.A.

La hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) (Genotropin, KabiVitrum, Suecia) fue facilitada por el laboratorio Astra de Argentina.

La insulina humana de Sigma tiene 25.6 UI/mg ($5 \mu\text{g/ml} = 128 \text{ mUI/mL} = 918.4 \text{ nmol/L}$).

Se utilizó factor de crecimiento similar insulina de tipo 1 (IGF-1) recombinante humano de Genentech. Para establecer la dosis efectiva 50 (ED50) se realizaron protocolos utilizando concentraciones crecientes de IGF-1 crónicamente administrado a cultivos entre 6.25 y 5000 ng/ml. Se ha observado un aumento de la testosterona respecto del basal (11.3 ± 3.96 , $x \pm \text{DS}$, pmol/ 10^6 cel. 24hs) en presencia de 12.5 ng/ml de IGF-1 (26.2 ± 5.08 , $p < 0.05$), bajo 25 ng/ml (22.8 ± 5.72 , NS) y bajo 50 ng/ml (27.5 ± 2.43 , $p < 0.05$), este último valor

permanece alto hasta 5000 ng/ml. Se decidió utilizar la dosis de 50 ng/ml para los estudios posteriores.

MÉTODOS

Obtención de la suspensión de células testiculares

Aproximadamente una hora después de fallecer, por norma del Hospital, el cuerpo se coloca a 4 °C hasta que se realiza la autopsia. Inmediatamente después de ser extraídos, los testículos fueron colocados en un frasco estéril con medio de cultivo y mantenidos a 4 °C hasta su procesamiento.

Los testículos fueron pesados en una balanza de precisión, sumergidos en alcohol al 70% e inmediatamente lavados con una solución salina balanceada de Hank's (HBSS). Luego el tejido adiposo y el epidídimo son separados y la albugínea se abre y se separa del parénquima, el que luego se corta en trozos de aproximadamente 1 mm³. Se debe destacar que el aspecto del testículo puberal es característico y presenta diferencias con respecto al prepuberal ya que al disecar se distinguen unos túbulos blanquecinos delgados (túbulos seminíferos) y un parénquima intersticial más friable que el correspondiente a testículos prepuberales.

Se aísla un fragmento de tejido el cual es fijado para estudios histológicos. Como solución fijadora se utilizó, en primer término, la solución de Bouin (ácido pícrico:formol:acético 75:25:5). Esta fue reemplazada por glutaraldehído en buffer cacodilato y finalmente por formaldehído 4 % en buffer fosfato salino. La muestra fijada se procesó para microscopía óptica.

Digestión del tejido

EL medio de digestión es preparado en medio DME-Ham F12 conteniendo 15 nmol/L de Hepes, 2.46 nmol/L de l-glutamina, 15 nmol/L de bicarbonato de sodio, 20 mg/L de gentamicina, a pH 7.4 (denominado Medio "A"), con el agregado de colagenasa 1182 x 10³ U/L, deoxinbonucleasa 5000 U Kunitz/L e inhibidor de tripsina 1 mg/L. Los trozos de parénquima se colocan en un Erlenmeyer con medio de digestión y la primera digestión se realiza durante 20 minutos a 37 °C con agitación suave y resuspendiendo mecánicamente con pipeta plástica a los 10 minutos para disgregar los trozos de tejido. Finalizada , se

transfiere el material a un tubo cónico y se deja sedimentar 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se separa el sobrenadante de la sedimentación (enriquecido en células dispersas) el cual se denomina Fracción 1 (F1). F1 se centrifuga a 700 rpm 5 minutos, y se lava 2 veces con HBSS, guardándose a 4°C la suspensión celular obtenida. El pellet resultante de la sedimentación, que contiene trozos de tejido sin digerir se somete a una segunda digestión, se incuba con medio de digestión fresco otros 20 minutos a 37 °C con agitación suave. Finalizada la segunda digestión, el material se filtra por una membrana de nylon de 0.4 mm de poro a fin de separar algún resto de tejido conectivo o albugínea que haya quedado sin digerir. La suspensión celular que resulta de la segunda digestión - Fracción 2- se centrifuga y se lava como F1. Se toma una alícuota de las fracciones 1 y 2 por separado, y se hace una dilución para contar las células en cámara de Neubauer utilizando el método de exclusión por azul tripán. Si ambas fracciones tienen una viabilidad superior a 80 % se juntan. De no ser así, se descarta la fracción con mayor mortalidad. El cálculo del rendimiento celular resultó en aproximadamente 30×10^6 células por gramo de tejido.

Siembra y cultivo primario

Las células se resuspenden a una densidad de 10^6 por mililitro y se cultivan en el denominado medio "A" suplementado con 5 mg/L de transferrina humana, 0.1 nmol/L de vitamina C y 0.2 UI/L de vitamina E con el agregado del antibiótico imipenem y del antimicótico anfotericina. Este medio enriquecido (denominado medio "E") se adiciona con suero fetal bovino al 10 % para sembrar las células. En la puesta a punto del método la concentración de suero fetal bovino osciló entre 5 y 20 %, aunque no se hallaron diferencias dentro de este rango en la eficiencia de adhesión de las células sembradas a la placa multiwell.

Se siembran placas multiwell de 24 well (100 mm^2) con 0.5 ml/well (aproximadamente 500.000 células/well) y se dejan 3 wells sin células, con medio de cultivo como control. Las placas se colocan en estufa gaseada a 37°C, en una atmósfera de 95% aire/ 5% CO₂ y 98% humedad. Todo el material proveniente de necropsia fue sometido a control de contaminación en agar-sangre tanto de la muestra inicial como de cada paso sucesivo de purificación. A las 48 horas se remueve el medio que se almacena a -20°C, se lava la monocapa 2 veces con HBSS y se agrega medio "E" sin suero, es decir, medio químicamente definido, solo (condición basal) ó con el agregado de hormonas, en todos los

casos por triplicado. Como estímulos hormonales se utilizaron insulina, hCG, hLH, hFSH, rhFSH, rhGH e IGF-1. Al cabo de 48 horas, día 4 de cultivo, se guarda el medio condicionado de cada well a -20°C y se renueva el medio solo o con el estímulo correspondiente por otras 48 horas. Para medir la actividad de la enzima aromatasa se incubaron wells en paralelo con el agregado de testosterona (T) $0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ como sustrato. El día 6 de cultivo se recogen los medios condicionados y se guardan a -20°C y las células se cosechan incubando la monocapa con Tripsina-EDTA (0.5% y 0.2% respectivamente) durante 3 minutos a 37°C . Para el recuento celular final las células se tiñen con azul tripán como se describe anteriormente. El rendimiento (células sembradas/ células cosechadas $\times 100$) fue de aproximadamente $30.7 \pm 10.5\%$.

En algunos cultivos se realizó, al día 7 de cultivo, un protocolo de estimulación de 24 horas con LH/hCG luego de la preincubación de las células en diferentes condiciones.

Durante los días de cultivo, las células se observaron con un microscopio de contraste de fase Zeiss modelo ICM 405 y se tomaron microfotografías utilizando films Kodak Plus-X Pan 125/22 (135-36) o Ektachrome diapositivas color.

HISTOQUIMICA

La reacción histoquímica para la enzima 3β -hidroxiesteroide dehidrogenasa se lleva a cabo el día 6 de cultivo según el método descrito por Steinberger et al. (242). Se incuba la monocapa con 0.25 nmol/L nitrobluetetrazolium, 1.5 nmol/L NAD y 0.4 nmol/L 3β -hidroxi- 5 β androstan- 17-ona. La incubación se realiza en estufa gaseada, a 37°C durante 60 minutos. Se hace un blanco sin el esteroide sustrato de la enzima. Finalizada la incubación se observa al microscopio de contraste de fase y se toman microfotografías.

INMUNOCITOQUIMICA

Para la identificación de células peritubulares (243,244) la monocapa se lava con HBSS y se fija con metanol/ ácido acético 95:5 (v:v) durante 20 minutos a -20 °C. El siguiente paso es la incubación con metanol/ H₂O₂ (30% vol) al 10% durante 15 minutos con el fin de inhibir la peroxidasa endógena. Luego se lava y se bloquea con suero normal de conejo 1% en Tris-HCl 0.05 mol/L, pH 7.4 y se incuba con el anticuerpo primario un monoclonal anti-desmina de ratón diluido 1/50 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después se lava y se incuba con el segundo anticuerpo, una inmunoglobulina biotinilada de conejo anti-ratón durante 30 minutos a temperatura ambiente y otros 30 minutos con estreptoavidina conjugada con peroxidasa en Tris-HCl 0.05 nmol/L. La reacción se revela con 3,3' diaminobenzidina en Tris HCl con 0.01% H₂O₂ bajo observación al microscopio. Después de lavar, se tiñen los nucleos con hematoxilina. Se deshidrata con etanol y xilol y se observan los preparados tomándose microfotografías.

Para el estudio de la expresión de citoqueratinas en la monocapa de células testiculares (245) se incuba con el anticuerpo primario, un suero policlonal de conejo antiqueratina diluido 1/200 en buffer Tris-HCl durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se hacen dos lavados y se incuba con el segundo anticuerpo biotinilado, una IgG de cerdo anti-conejo, seguido por el conjugado avidina-biotina-peroxidasa. Para revelar, se usa nuevamente 3,3' diaminobenzidina

Para estudiar la expresión de vimentina (246) se utilizó un primer anticuerpo de conejo anti-vimentina mientras que el segundo anticuerpo y la reacción enzimática se realizaron al igual que lo descrito para queratina.

DETERMINACION DE ESTEROIDES POR RADIOINMUNOENSAYO

El contenido de testosterona (T) en los medios condicionados de los cultivos fue determinado por radioinmunoensayo utilizando un método MAIA (Biodata, Italia), que parte de muestras sin extracción previa, un trazador derivado de T marcado con 125 Iodo, un suero anti-testosterona, un inhibidor proteico y un segundo anticuerpo acoplado a partículas magnéticas. El volumen de muestra utilizado es de 50 μ l. En todos los ensayos se procesa un blanco de medio de cultivo. La dosis mínima detectable fue de 0.41 nmol/L. El perfil de error intraensayo fue menor a 10% entre un rango de 0.5 y 25 nmol/L. Concentraciones por fuera de este rango fueron descartadas. En dos muestras estudiadas se encontró un paralelismo adecuado con estándares en tres dosis diferentes.

El contenido de estradiol (E₂) fue determinado en el medio condicionado por radioinmunoensayo, por duplicado, utilizando un kit de Biodata MAIA para E₂. El método es similar la de Testosterona MAIA . La dosis mínima detectable fue de 36.7 pmol/L. El error intraensayo fue menor a 12% entre 40 y 2400 pmol/L, descartándose concentraciones por fuera de este rango. La corrección de los valores fue como para testosterona. El test de paralelismo con estandars fue similar al de RIA para testosterona. Este ensayo se utiliza para determinar el contenido de E₂ endógeno y la actividad de la enzima aromatasa, en presencia de Testosterona 0.5 μ mol/L. Un blanco para este último caso es chequeado de rutina dosando el nivel de E₂ en un well sin células conteniendo Testosterona 0.5 μ mol/L. No se detecta interferencia de este blanco en el RIA de E₂. La reacción cruzada de Testosterona en el RIA de E₂ es menor que 0.02%.

Para determinar el contenido de progesterona en los medios condicionados se utilizó el método MAIA de radioinmunoensayo (Biodata Diagnostics, Italia). Este método utiliza muestras sin extracción previa y es similar al de testosterona. Se usa un volumen de 50 μ l de muestra , por duplicado, y blancos de medio de cultivo. La dosis mínima detectable es de 0.069 nmol/L. En un rango entre 0.477 y 159.0 nmol/L el perfil de error intraensayo fue menor a 10% descartándose valores por fuera de este rango. Se encontró paralelismo con estándares en dos muestras estudiadas.

La presencia de 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP4) en los medios condicionados fue detectada por un radioinmunoensayo diseñado en fase sólida (Diagnostic Products Corporation, CA, USA). En este método el anticuerpo está inmovilizado en un tubo de

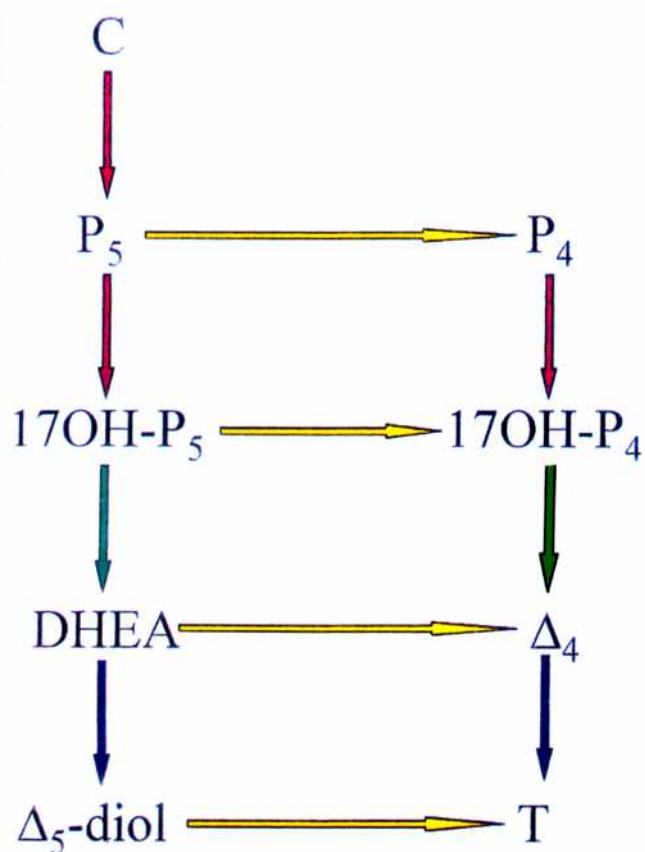
polipropileno en el cual se coloca una cantidad de 17OHP4 marcada con 125 Iodo y la muestra a estudiar. El contenido de 17OHP4 de la muestra va a competir con la 17OHP4 radiactiva durante la incubación. Luego se descarta el sobrenadante y queda la fracción unida al anticuerpo. Se cuenta el tubo en un contador gama y el dato obtenido se convierte a concentración de 17OHP4 en un curva de calibración. Las muestras ingresan al ensayo sin requerir extracción previa. Se utilizan 25 μ l de muestra y blancos de medio de cultivo. La dosis mínima detectable es de 0.21 nmol/L. El perfil de error intraensayo fue menor a 6% en un rango entre 0.3 y 60.5 nmol/L que fue el rango utilizado.

Para determinar el contenido de androstenediona se utiliza un radioinmunoensayo en fase sólida al igual que para 17OHP4. En este caso la muestra debe ser previamente extraída con eter etílico (Merck calidad espectrofotometría) en una proporción 1/10 muestra/solvente, luego evaporada y resuspendida en el calibrador cero del equipo. En este caso la androstenediona marcada con 125 Iodo compite con la androstenediona contenida en la muestra por los sitios del anticuerpo adherido al tubo. Para la extracción se utilizan 500 μ l de muestra y 200 μ l para ingresar al ensayo. La dosis mínima detectable fue de 0.07 nmol/L. El error intraensayo es menor a 10% en un rango entre 0.35 y 21.0 nmol/L, que fue el utilizado.

El método de determinación de dehidroepiandrosterona fue un radioinmunoensayo diseñado en fase sólida (DPC, LA, USA) que requiere la extracción previa de la muestra con diclorometano (o cloruro de metileno) de grado de pureza para espectrofotometría. La extracción se adaptó para 0.6 ml de muestra y 6 ml de solvente y el volumen de muestra para ingresar al ensayo es de 200 μ l. Examinando la reproducibilidad, el error intra-ensayo fue menor al 10% en un rango de 1.7 a 104 nmol/L, que fue el utilizado para interpretar los resultados. La dosis mínima detectable fue de 0.138 nmol/L.

Todos los resultados de los esteroides determinados por radioinmunoensayo fueron corregidos por el número de células cosechadas negativas al azul tripán y por unidad de tiempo, para ser expresados en pmol/ 10^6 células x 24 horas.

La elección de dosar testosterona en los medios condicionados de los cultivos testiculares se adoptó por ser la testosterona el esteroide marcador de las células de Leydig -ó de las células esteroideogénicamente activas en el testículo-. Además, como se ha descrito, se dosaron esteroides precursores de la biosíntesis de testosterona. El análisis de los mismos permitió estimar las actividades de algunas de las enzimas involucradas en la biosíntesis



Correlación	actividades estimadas
17OH-P ₄ vs T	17β-HSD + 17,20-DES
DHEA vs T	3β-HSD + 17β-HSD
Δ ₄ vs T	17β-HSD

→ 3β-HSD
 → 17β-HSD
 → 17,20-DES

Figura II Esquema de la esteroidogénesis testicular a partir de la biosíntesis de pregnenolona en la mitocondria. Correlaciones estudiadas y actividades enzimáticas estimadas a partir de cada correlación. C :colesterol, P5: pregnenolona, P4: progesterona, 17OHP5 : 17 hidroxipregnenolona, 17OHP4: 17 hidroxiprogesterona, DHEA: dehidroepiandrosterona, Δ4: androstenediona, T: testosterona, Δ5diol: androsten 3β17β-diol.

de testosterona, si bien otros estudios serían necesarios a nivel de la expresión de los mRNA de dichas enzimas.

ESTIMACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Todos los esteroides fueron dosados por duplicado y se calculó la media de tres wells de células pertenecientes a un mismo paciente y a una misma condición. Se estimaron las actividades de algunas de las enzimas de la biosíntesis de testosterona haciendo la regresión lineal entre el producto final, testosterona, y el sustrato de la enzima correspondiente.

Se calculó la regresión lineal entre testosterona y androstenediona para estimar la actividad 17 β -HSD. La regresión lineal entre testosterona y 17-hidroxiprogesterona se empleó para estimar las actividades 17,20 liasa + 17 β -HSD. El cálculo de la regresión lineal entre testosterona y dehidroepiandrosterona se aplicó para estimar las actividades de las enzimas 3 β -HSD + 17 β -HSD. La figura II ilustra un esquema parcial de la esteroidogénesis testicular y las correlaciones que se utilizaron para estimar las actividades enzimáticas. Éstas se calcularon a partir de la pendiente de cada regresión lineal y las pendientes fueron comparadas por un test de pendientes. Un aumento de la pendiente en una condición experimental indica menor actividad de las enzimas involucradas entre un esteroide dado y el producto final, testosterona.

INCUBACIÓN CON PRECURSORES RADIATIVOS Y ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (TLC)

Se utilizaron Pregnenolona ($7\text{-}^3\text{H}$ pregnenolona) y progesterona ($1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$ progesterona) que fueron de DuPont (NEN Research Products, Boston, MA). Los precursores tritiados se prepararon en una solución de benceno/etanol de $10\text{ }\mu\text{Ci}/100\mu\text{l}$. Luego de evaporar el solvente se resuspendió en medio de cultivo para obtener una concentración final de $1\text{ }\mu\text{Ci}/100\text{ }\mu\text{l}$. Se agregaron $0,5\text{ }\mu\text{Ci}$ en cada well.

La cianocetona se prepara en una solución madre de 10 mg/ml en etanol, una solución hija de $35,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ en medio de cultivo y se agrega diluída $1/10$, siendo la concentración final 10^{-5} M ($3,55\text{ }\mu\text{g/ml}$). La aminoglutetimida se prepara en una solución madre de 1 mg/ml en H_2O destilada, luego una solución hija en medio de cultivo de $296\text{ }\mu\text{g/ml}$, resultando una concentración final de $29,6\text{ }\mu\text{g/ml}$, 10^{-4} M .

Todos los estándares no radioactivos fueron de Sigma Chemical Co., St Louis, MO. Se utilizó una mezcla 3-ceto- Δ^4 : P4, Δ^4 , 20 OHP4, 17OHP4, T. Además, por separado, 5β pregnano 3,20 diona, 5α pregnano 3β lo 20 ona, 3α OH (alopregnenolona) y 20α 3 ceto diol.

Los medios condicionados de los cultivos fueron extraídos con éter y fueron resueltos por TLC en una mezcla de ciclohexano, cloroformo, éter (2:2:1). Las membranas de sílica gel fueron tratadas con un spray aumentador de tritio (DuPont NEN Research Products) y fueron expuestas a autorradiografía con un film Kodak X-OMAT AR-5 durante 4 días. Los metabolitos producidos por los cultivos se identificaron comparando su movilidad con respecto a la de esteroides estándar sembrados en paralelo.

METODO DE ELISA PARA INHIBINA-B

La detección de Inhibina-B se lleva a cabo por un enzimoimmunoensayo sandwich ELISA en fase sólida (Serotec Limited, Oxford OXS IJE).

La placa de microtitulación de 96 wells tiene pegado un anticuerpo monoclonal anti-subunidad β B de inhibina. La placa se lava previamente y se incuban las muestras junto a una curva standard y controles de manera tal que el antígeno queda capturado por su subunidad β B y es inmovilizado. Luego de lavados se agrega un anticuerpo monoclonal específico para la subunidad α de inhibina que está acoplado a fosfatasa alcalina. Se llevan a cabo 6 a 8 lavados posteriores a la incubación para eliminar todo el material no unido específicamente. Un sistema de sustrato amplificado es utilizado para detectar la presencia de la enzima fosfatasa alcalina (FA). El producto de reacción de color rojo se lee a 495 nm y la intensidad del producto es directamente proporcional a la concentración de inhibina-B dimerica presente en las muestras.

Antes del ensayo tanto las muestras como la curva standard son pretratados con dodecil sulfato de sodio (SDS), calentados a 100 °C y expuestos a peróxido de hidrógeno. Este pretratamiento aumenta la especificidad y la sensibilidad del ELISA ya que modifica por oxidación los residuos de metionina del epítopo para la unión del anticuerpo, mejorando la afinidad de la reacción. Se coloca 100 μ l de cada dilución del standard y de la muestra en respectivos tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, se agrega 50 μ l de SDS 6% y se mezcla, se colocan los tubos 3 minutos a 100°C. Se agrega 50 μ l de H₂O₂ 6% preparada en el momento y se deja actuar 30 minutos. Se centrifuga para separar un precipitado gelatinoso y se utiliza el sobrenadante, del cual se agregan 80 μ l, por duplicado a la placa de microtitulación y se incuba toda la noche. Luego de 5 lavados se agregan 50 μ l de anticuerpo de ratón anti subunidad α de inhibina humana conjugado con FA. Se incuba 3 horas a temperatura ambiente. Se hacen 8 ciclos de lavado y se agrega el sustrato NADPH (50 μ l/well). Se incuban 45 minutos a temperatura ambiente y se agregan 50 μ l de amplificador (alcohol dehidrogenasa y diaforasa), incubándose 45 minutos más. La reacción se detiene con 50 μ l de H₂SO₄ 0.3 M y la absorbancia se lee a 495 nm. Los tiempos de incubación de sustrato y de amplificador se establecieron luego de hacer lecturas de absorbancia en función del tiempo de incubación.

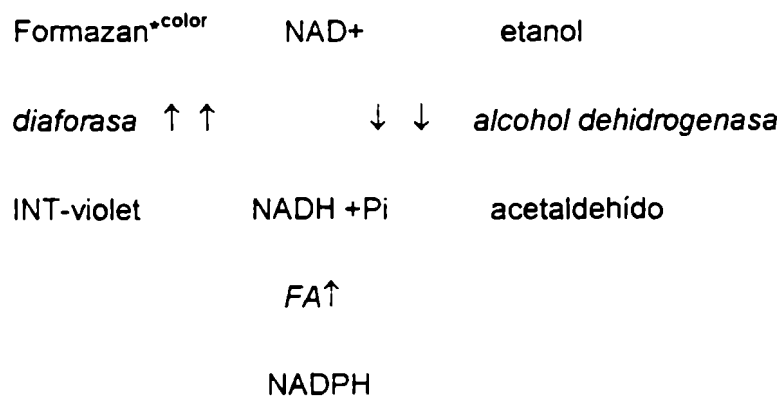
Lecturas en función del tiempo de incubación (valores expresados como $x \pm SD$, pg/ml)

	<u>Tiempo de incubación</u>		
	15 min	30 min	45 min
muestra 1	0.060 ± 0.001	0.118 ± 0.011	0.178 ± 0.085
muestra 2	0.167 ± 0.025	0.337 ± 0.051	0.523 ± 0.087
muestra 3	0.023 ± 0.000	0.047 ± 0.003	0.083 ± 0.001

Se utiliza un control positivo de estreptoavidina conjugada con FA 250 ng/ml en el well. El standard de inhibina-B proviene de la extracción de una mezcla de las formas de inhibina de fluido folicular humano y posterior purificación de la inhibina-B. Éste se reconstituye en suero fetal bovino y mediante diluciones al medio se prepara una curva de 15.6 a 1000 pg/ml.

El sistema de amplificación es de Gibco BRL (ELISA Amplification System). El principio del mismo es que la enzima fosfatasa alcalina unida al well actúa sobre un sustrato cuyo producto inicia una reacción enzimática secundaria cíclica, cuyo producto es coloreado -ver esquema adjunto-. Cada molécula de producto de la primer reacción interviene varias veces en la segunda reacción de manera tal que la señal generada por la primer reacción enzimática es amplificada por la participación de su producto final en los ciclos de la segunda reacción. El sustrato es nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido el cual se defosforila por la FA de NADPH a NADH. El producto, NADH, activa un sistema enzimático secundario que comprende un ciclo redox conducido por una diaforasa y una alcohol dehidrogenasa. En este ciclo NADH, en presencia de diaforasa reduce una sal de tetrazolium (violeta de iodonitrotetrazolium, INT-violet) para formar un color formazan y a su vez se oxida para formar NAD⁺. Este NAD⁺ es reducido a NADH por una alcohol dehidrogenasa mientras que un alcohol es oxidado a acetaldehído. El índice de reducción es directamente proporcional a la concentración de NADH formado por la fosfatasa alcalina unida al conjugado.

Esquema de la señal de amplificación de fosfatasa alcalina



DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE SUBCULTIVOS Y CRIOPRESERVACIÓN

La metodología empleada para llevar a cabo los subcultivos fue la siguiente: un frasco de cultivo con, aproximadamente 3×10^6 células se mantuvo en medio DME-HamF12 con 10% de suero fetal bovino (SFB) durante 6 días. Luego, la monocapa es levantada con Tripsina-EDTA y la suspensión celular lavada con SFB 10% para eliminar el efecto de la enzima. La suspensión celular es resuspendida en SFB 10%. Pruebas en paralelo sin realizar el paso de lavado y centrifugación mostraron que la presencia de la enzima, aunque diluida, perjudicaba la viabilidad celular del cultivo. Realizado el recuento celular, se separan dos fracciones, una para subcultivos y otra para criopreservación.

El cultivo se llevó a cabo al igual que el cultivo primario: 48 hs en medio con 10% SFB luego lavados e incubación en DME-HamF12 en ausencia de SFB. Se ensayaron distintas condiciones de estimulación: IGF-1 (50 ng/ml), LH (10 ng/ml), FSH (2 ng/ml), colesterol (C, 10 μ M ó 4.03 μ g/ml) ó pregnenolona (P5, 0.6 μ M ó 200 ng/ml).

Además del dosaje de testosterona en el medio condicionado se hicieron dosajes de progesterona, 17-hidroxiprogesterona, y androstenediona.

Criopreservación

Para la puesta a punto de la criopreservación se probaron dos medios de congelación: dimetilsulfóxido en SFB (1/9) y Cell Freezing Medium de Sigma (C6039). Los pasos a seguir fueron: colocar la suspensión celular en el orden de 1×10^6 células en el medio de congelación dentro de un criotubo y el mismo en un recipiente con alcohol isopropílico, que permite un descenso lento de la temperatura, de 1 °C por hora, a -85 °C. Posteriormente los criotubos se almacenan en un tanque de N₂ líquido a -196 °C. La descongelación se realiza rápidamente, diluyendo y lavando la suspensión congelada para eliminar el congelante.

CULTIVO DE UN TUMOR CALCIFICANTE DE CÉLULAS GRANDES DE SERTOLI

A partir de los testículos removidos del paciente se separaron dos fracciones macroscópicamente diferentes las cuales se procesaron por separado para aislamiento y cultivo celular. Por un lado un nódulo testicular amarillo brillante de consistencia dura que parecía un nódulo tumoral (fracción tumoral= Tu), por el otro lado un tejido rosado, blando, macroscópicamente parecido a parénquima testicular (fracción extratumoral= ExTu). Ambas fracciones del paciente así como los testículos del control fueron procesados como se describió anteriormente. Una porción de cada fracción del testículo tumoral y del control fueron procesadas para microscopía óptica.

Tes^t del efecto del medio condicionado del Tumor (TuMC) sobre la esteroidogénesis de células testiculares control

Las células testiculares de un niño control de 1 mes de edad fueron cultivadas durante 6 días como ya se ha descrito. Luego de cosechar las células con Tripsina-EDTA, éstas fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células/ml en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie. Se dejó crecer el subcultivo durante 10 días aproximadamente hasta formar casi una monocapa confluyente. Luego del quinto pasaje, el día 46 de cultivo, las células se sembraron en una placa multiwell para estudiar la estimulación hormonal y el efecto del TuMC. El TuMC guardado a -20°C fue descongelado, centrifugado y filtrado a través de una membrana de 0.22 µm de poro antes de ser utilizado. Diluciones al medio y al cuarto del TuMC en medio de cultivo fresco se agregaron el día 2 del último subcultivo, por triplicado, y se cultivaron durante 4 días en paralelo con células incubadas en condición basal o con 40 UI/L de hLH (NIDDK, Bethesda, MD, USA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todas las determinaciones se realizaron por triplicados (3 wells) y se calculó la media y la desviación estandar.

En el caso de comparar grupos etarios entre sí, así como las distintas condiciones de estimulación crónica respecto de la condición basal se calcularon las medianas de los esteroides las que se compararon por el test de Wilcoxon.

Se utilizó el análisis de varianza y el test de Bonferroni (o el test de t) para evaluar la respuesta de las células a cada uno de los estímulos y las diferencias entre los distintos días de cultivo.

Se realizó el test de pendientes con el fin de comparar las pendientes de las correlaciones estudiadas para estimar actividades enzimáticas.

Con el fin de normalizar los datos, en el estudio del efecto del IGF-1, se calculó el logaritmo decimal de la secreción de testosterona y se hallaron las medias por grupo.

Se utilizó el análisis de regresión lineal y correlación para estudios de una variable en función de otra (niveles de inhibina-B en medios condicionados de cultivo en función de la edad del donante) (247).

RESULTADOS

1.- DESARROLLO METODOLÓGICO DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS TESTICULARES. ESTUDIO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO POST MORTEM

Dado que el modelo elegido para el presente trabajo de tesis era el de cultivos de testículos provenientes de necropsias, la variable tiempo *post mortem* (tpm), desde el fallecimiento hasta que se lleva a cabo la autopsia y las horas posteriores hasta que se recibe el material para su procesamiento, podría influir en los resultados, fue necesario evaluar qué implicancias tenía esta variable. Se estudió la secreción de testosterona (T) y la actividad aromatasa en presencia de insulina (5 µg/ml), en el medio condicionado del día 6 de cultivo, comparándose cultivos de distintas horas *post mortem* (hpm) de 3 pacientes del grupo 2 y de 4 pacientes del grupo 3 (tabla 1-A). Se observó que la secreción de testosterona disminuía considerablemente en cultivos con más de 24 hpm en una relación inversa al número creciente de hpm. Como se observa en la figura 1-1 graficada en base a cuatro de los cultivos, en un experimento de 24 hpm las células testiculares en cultivo, en presencia de insulina, la secreción de testosterona fue de 36.2 ± 1.87 pmol de T/10⁶ cel.24hs (media $\pm$ desviación estandar) mientras que la secreción de estradiol no fue detectable. Sin embargo, la secreción de estradiol fue elevada en un cultivo proveniente de un paciente de 72 hpm (Figura 1-1). Además, la actividad aromatasa estudiada bajo estímulo crónico de insulina y en presencia de testosterona exógena, aumentó con el incremento de las hpm, siendo especialmente elevada en un cultivo de células aisladas luego de 72 hpm (figura 1-2).

De los presentes resultados se puede concluir que los testículos provenientes de autopsias deben tener menos de 24 hpm para ser utilizados en estudios de cultivo pues dentro de este lapso se preserva su capacidad de sintetizar testosterona, mientras que a mayores hpm esta capacidad de las células se ve dañada ó bien las propias células esteroidogénicas presentes en el testículo prepúber son más lábiles que el resto de las células y no sobreviven más de 24 hpm. Por otra parte, con tpm mayores a 24 horas aparece una mayor actividad de la enzima aromatasa posiblemente por la presencia de una subpoblación celular que expresa esta enzima y que persiste a pesar de las hpm (248).

Tabla 1-A Secreción de testosterona (T), de estradiol (E2) y actividad aromatasa (ARO) en 3 cultivos del grupo 2 y 4 cultivos del grupo 3 de distintos tiempos post mortem (tpm) (datos expresados en pmol/10⁶cel.24hs, x ± DS)

<u>Paciente</u>	<u>tpm</u>	<u>T</u>	<u>E2</u>	<u>ARO</u>
Ba7m (G2)	10	69.3 ± 6.9	0.17	
Pa18m (G3)	24	36.2 ± 1.87	0.01 ± 0.01	del
Du36m (G3)	24	70.7 ± 14.4	del	0.07 ± 0.01
OI4m (G2)	38	del	del	0.13 ± 0.03
Mo33m (G3)	45	14.0 ± 0.21	0.02 ± 0.01	5.62 ± 0.10
Lu1m (G2)	48	del	0.14 ± 0.02	3.09 ± 0.59
He24m (G3)	72	del	17.5 ± 2.74	34.9 ± 1.74

del: valor no detectable

-- : no dosado

m : meses

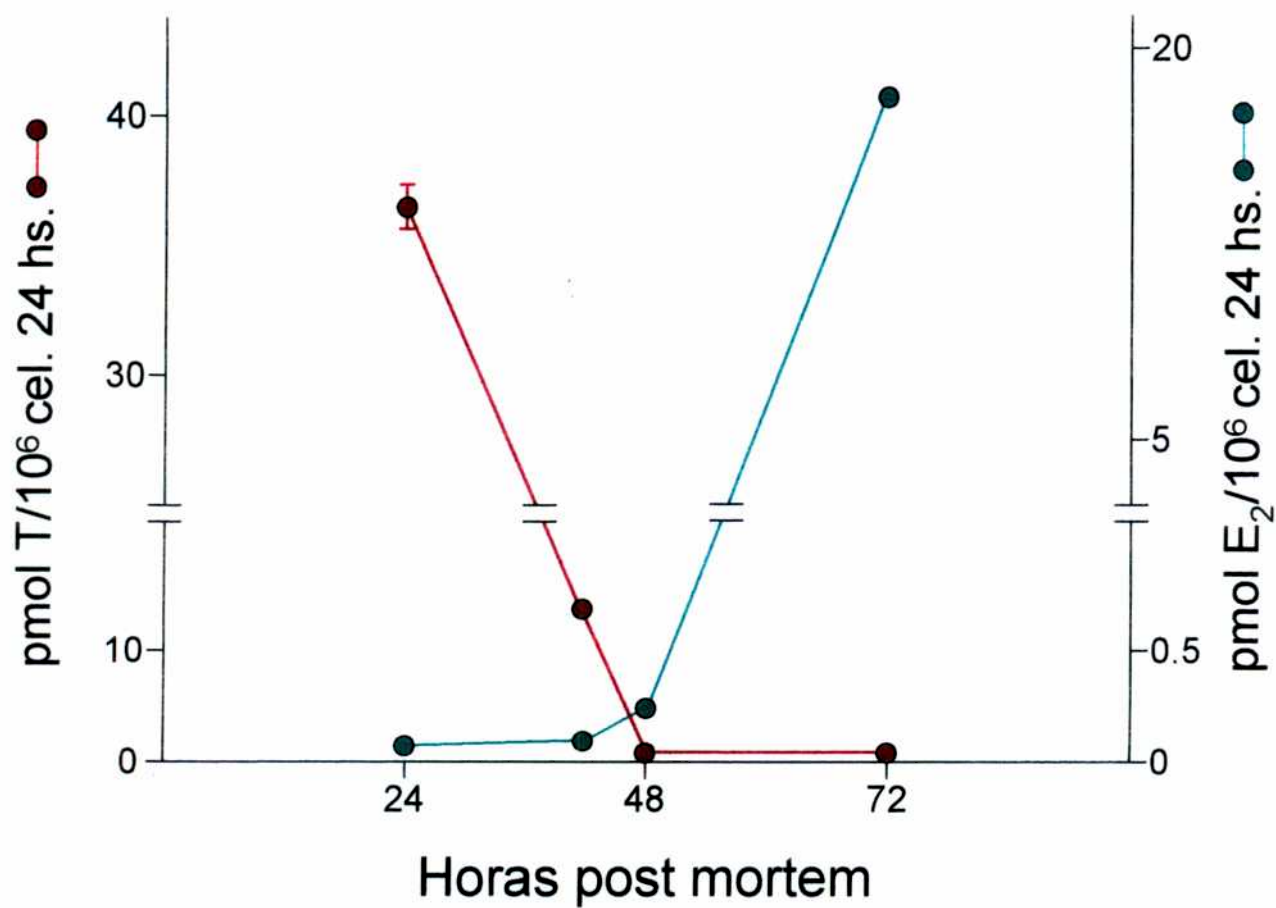


Figura 1-1 Secreción de testosterona y de estradiol en función del tiempo post mortem. Cada punto corresponde a la media de triplicados de un cultivo.

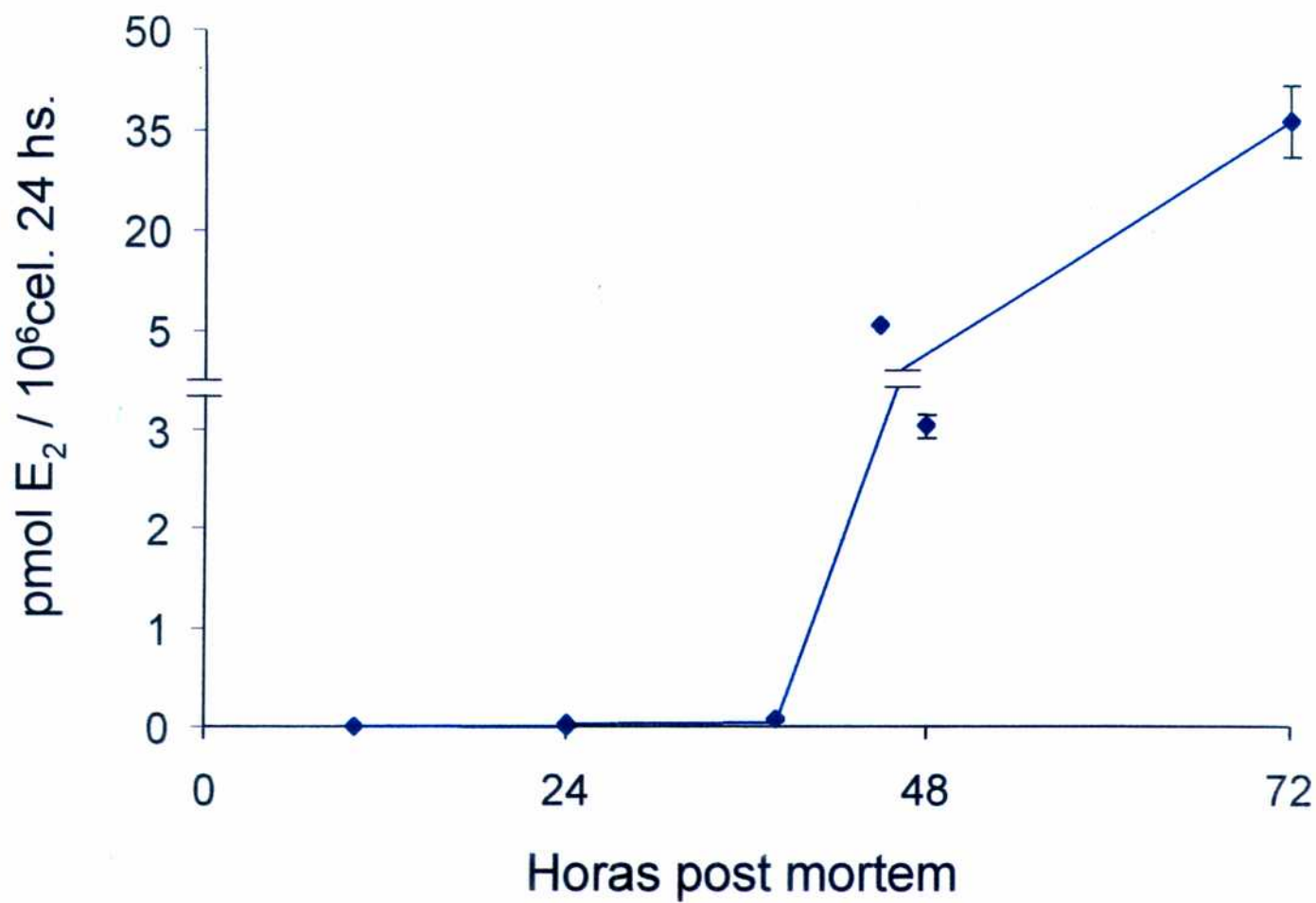


Figura 1-2 Actividad aromatasa en función del tiempo post mortem. Cada punto corresponde a la media de triplicados de un cultivo.

2.- OBSERVACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS CULTIVOS

A lo largo de los días de cultivo la observación y descripción minuciosa de las células al microscopio de contraste de fase ha sido una herramienta fundamental para el conocimiento de sus características y la posterior interpretación de los resultados. Se han observado cambios en el aspecto morfológico de los cultivos a lo largo del periodo de puesta a punto de la metodología. Ejemplo de una monocapa al día 6 de cultivo de un paciente de 18 meses de edad se observa en la figura 2-1, panel c. El aspecto es el de un cultivo mixto, con presencia de varios tipos celulares diferentes: clusters de células poligonales con núcleos ovalados y nucleolos evidentes -todas características compatibles con células de Sertoli inmaduras- y expansiones celulares a partir de los clusters con puentes citoplasmáticos y aspecto de tipo fibroblástico que recuerdan a células del intersticio testicular. El cultivo de células testiculares de pacientes puberales presenta un aspecto particular pues hay una predominancia de estructuras tubulares y escasas células de tipo fibroblástico. En pacientes puberales no se observan imágenes de mitosis y el crecimiento del cultivo consiste en la expansión de células a partir de los agregados tubulares (Figura 2-1, panel d).

En los cultivos primarios de pacientes prepuberales se han podido observar imágenes de células en mitosis aún en ausencia de suero fetal bovino y de gonadotrofinas, lo cual indica que las células estudiadas tienen capacidad proliferativa, tal vez por ser de origen juvenil. La microfotografía de la figura 2-2 ilustra una de las imágenes de mitosis que comúnmente se observan en nuestros cultivos de células testiculares prepuberales humanas, en este caso se trata de un cultivo de un paciente de 9 meses de edad (grupo 2) donde se observa una anafase tardía. Estas células en mitosis coexisten con células totalmente diferenciadas, vacuoladas, que presentan núcleos con cromatina laxa y nucleolo evidente.

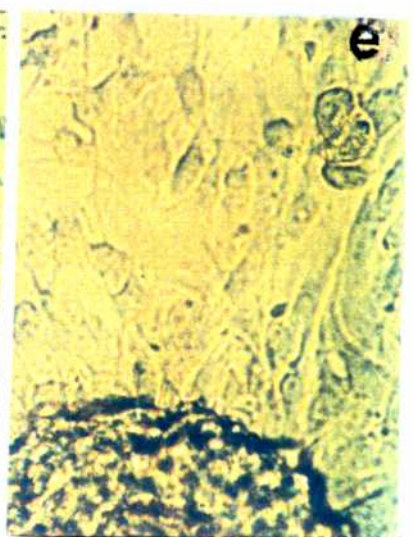
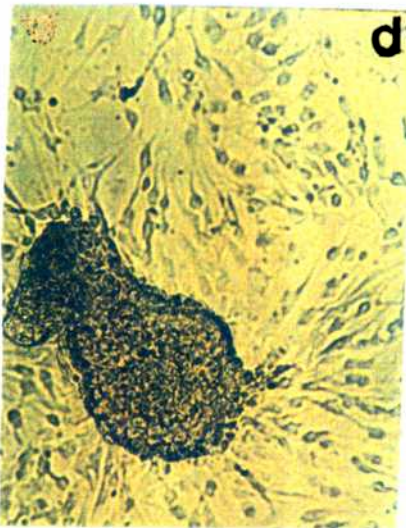
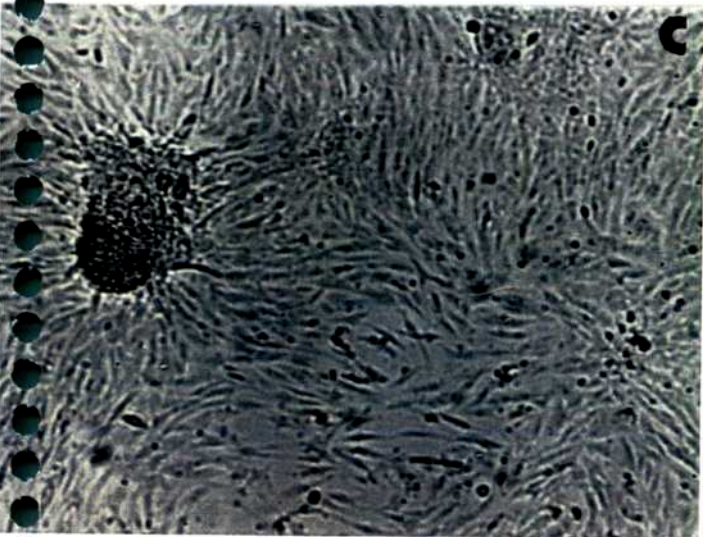
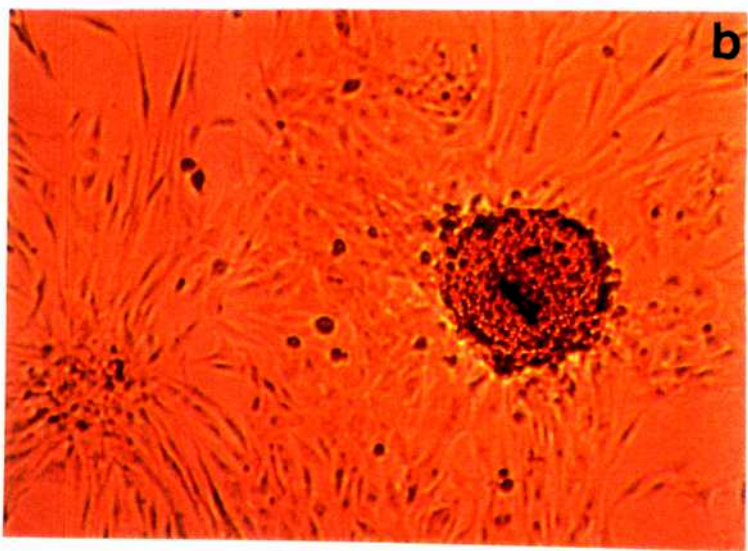
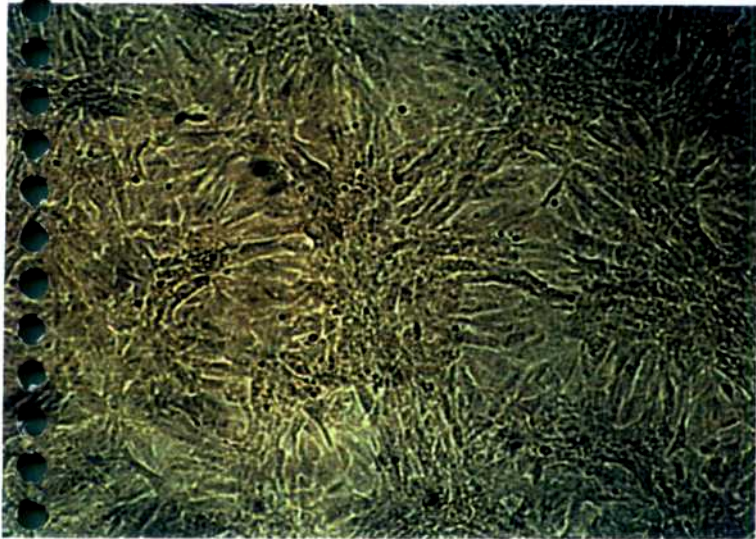


Figura 2-1 Aspecto al día 6 de cultivos de pacientes de distintas edades. Panel a : paciente de 6 días de vida (Vi6d) Se observa un entramado de células fibroblásticas entre grumos celulares expandidos. Panel b : paciente de 9 meses (Ca9m). Se destaca un grumo celular con células fibroblásticas expandidas. Panel c : paciente de 18 meses (Pa18m) grumo celular y células de tipo fibroblástico. Paneles d y e : paciente de 15 años (Lu15a) resto de túbulo seminífero con células fibroblásticas (a, b, c y d : 50 x, e :128 x)

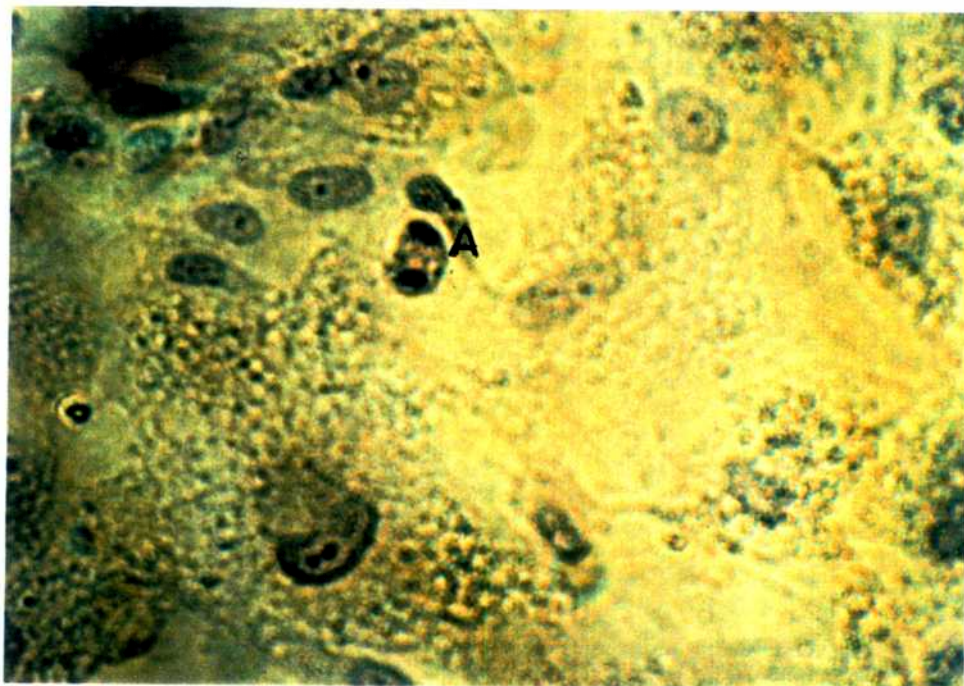


Figura 2-2 Imagen de mitosis. Cultivo de un paciente del grupo 2 (Ca9m) donde se observa una célula en anafase tardía (A) en cocultivo con células vacuoladas, con núcleo de cromatina laxa y nucleolo (128x).

IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES INTEGRANTES DEL CULTIVO PRIMARIO MIXTO DE CÉLULAS TESTICULARES HUMANAS

Histoquímica

La reacción histoquímica para 3β -hidroxiesteroide dehidrogenasa permite identificar en cultivo células positivas para dicha enzima, de aspecto fibroblástico y distribuidas alrededor de los clusters de células poligonales -los cuales son negativos para esta enzima-. En la figura 2-3 se puede observar la microfotografía de un cultivo mixto de células testiculares humanas correspondientes a un niño de 6 días de edad. Las células positivas para 3β -HSD se disponen formando un entramado alrededor de grumos negativos para 3β -HSD. Esta organización de los tipos celulares ocurre espontáneamente en el cultivo a lo largo de los días y recuerda a la estructura del parénquima testicular con cordones seminíferos (3β -HSD negativos) rodeados de células intersticiales, entre las cuales están las células tipo Leydig (3β -HSD positivas). Este método permite afirmar que en el presente modelo de cultivo primario mixto de células testiculares humanas hay una subpoblación que expresa actividad de la enzima 3β -HSD, marcadora de células esteroideogénicamente activas (242).

Inmunocitoquímica

Por inmunocitoquímica con anticuerpo antidesmina se revelaron células desmina-positivas dispersas entre la monocapa proveniente de un paciente de 18 meses, las cuales por su gran tamaño, su aspecto fusiforme y estrellado y su tinción positiva para desmina fueron identificadas como células mioides peritubulares (figura 2-4).

La expresión de queratina es considerada una evidencia de la presencia de células de Sertoli e incluso de precursores de las mismas, sin embargo no todas las células de Sertoli expresan queratina (245). Con la reacción inmuno-específica para queratina en un cultivo de un paciente de 18 meses se encontró células positivas ubicadas en los clusters los cuales representarían fragmentos de cordones seminíferos (figura 2-5).

La inmunocitoquímica para vimentina (figura 2-6) en un cultivo de un paciente del grupo 3, permite observar células de aspecto estrellado, con tinción positiva, que se ubican

externamente a los grumos, hallazgo que señala la presencia de células mesenquimáticas dentro del cultivo mixto de células testiculares humanas prepúberes (246).

Las figuras de células en mitosis que coexisten con células completamente diferenciadas, con vacuolas lipídicas, expansiones fibroblásticas, núcleos con cromatina laxa y nucleolos y tinción positiva para 3β -HSD, indica que estos cultivos son mixtos y dinámicos, y que hay un cambio permanente de las subpoblaciones que lo integran. Estas observaciones sugieren que en los cultivos primarios mixtos de células testiculares prepúberes humanas hay una distribución organizada de las poblaciones celulares, análoga a la del parénquima testicular, compuesta por grumos de células poligonales, positivas para queratina y no esteroideogénicas - representantes del parénquima tubular- rodeados por células de aspecto fibroblástico con crecimiento centrifugo respecto a los grumos - representantes de células mioides peritubulares y de parénquima intersticial-.

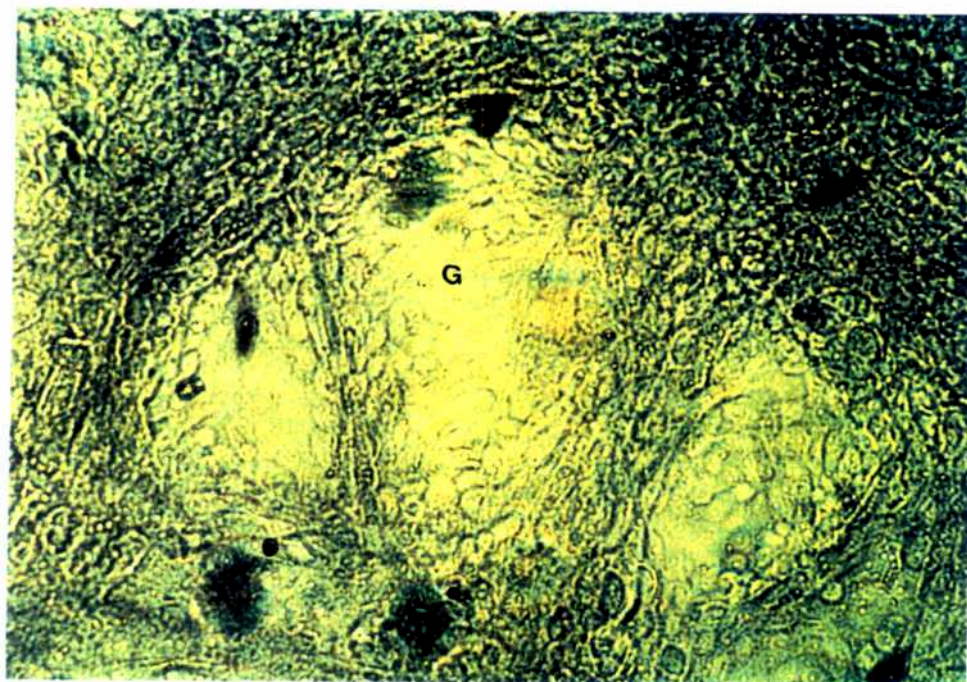
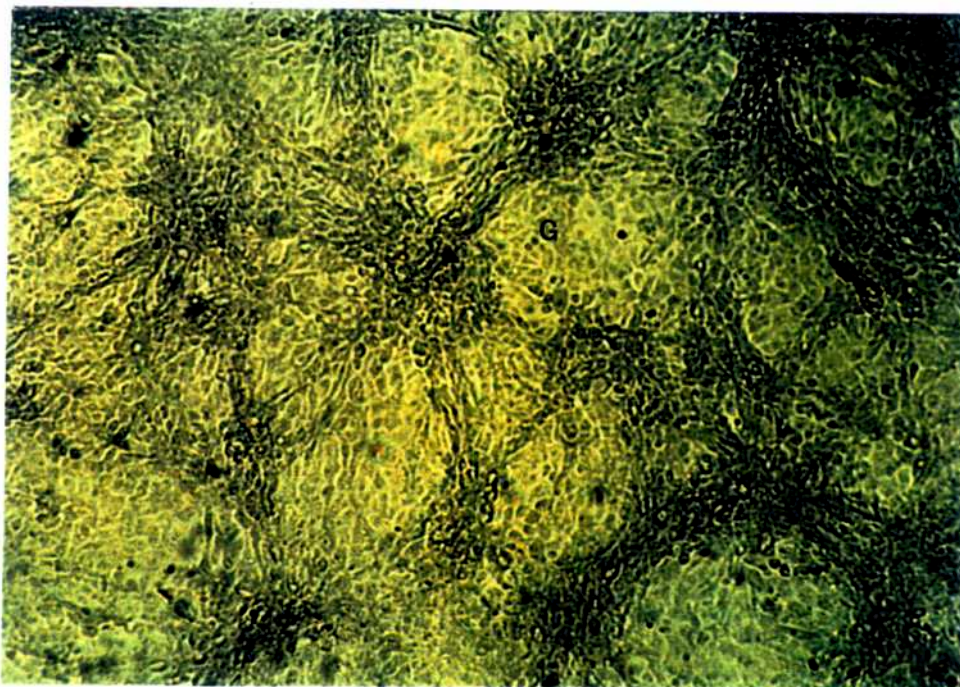


Figura 2-3 Actividad 3β -HSD Microfotografía de un cultivo mixto de células testiculares humanas prepúberes correspondientes a un paciente del grupo 1 (Vi6d). Células positivas para 3β -HSD (●) se disponen formando un entramado alrededor de grumos (G) negativos (A 20 x, B 50 x)

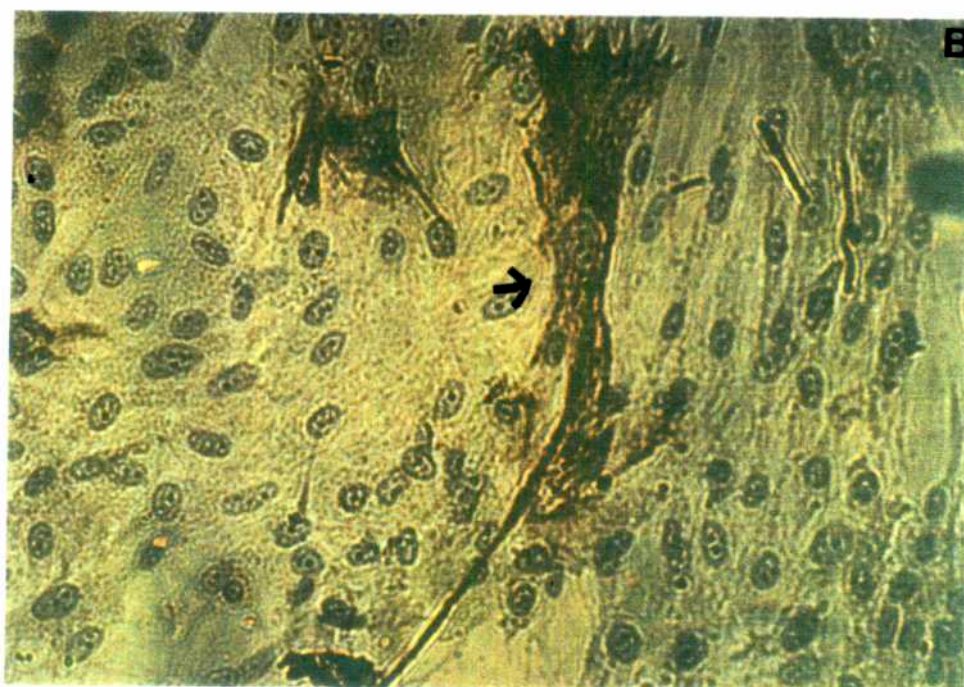
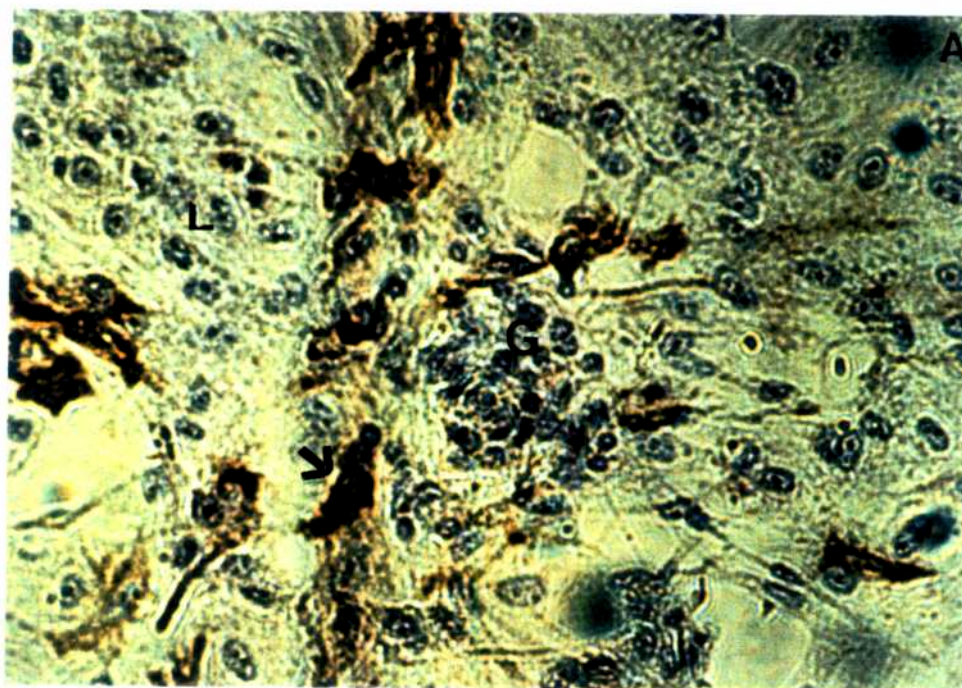


Figura 2-4 Inmunocitoquímica para desmina. Panel A Cultivo de un paciente del grupo 3 (Pa18m) que presenta células positivas para desmina (flecha) que rodean a un grumo celular desmina-negativo (G) (50 x) Panel B Detalle de célula desmina-positiva (128 x)

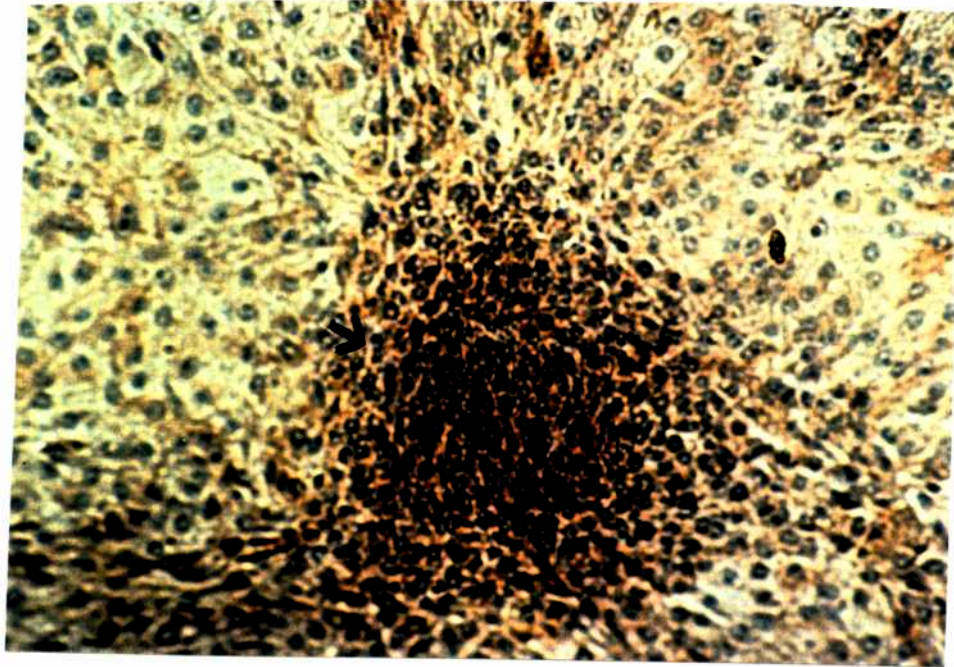


Figura 2-5 Inmunocitoquímica para queratina Microfotografía del cultivo de un paciente del grupo 3 (Pa18m) en el cual se observa un grumo de células queratina-positivas (flecha) rodeado de células negativas para queratina (50 x).

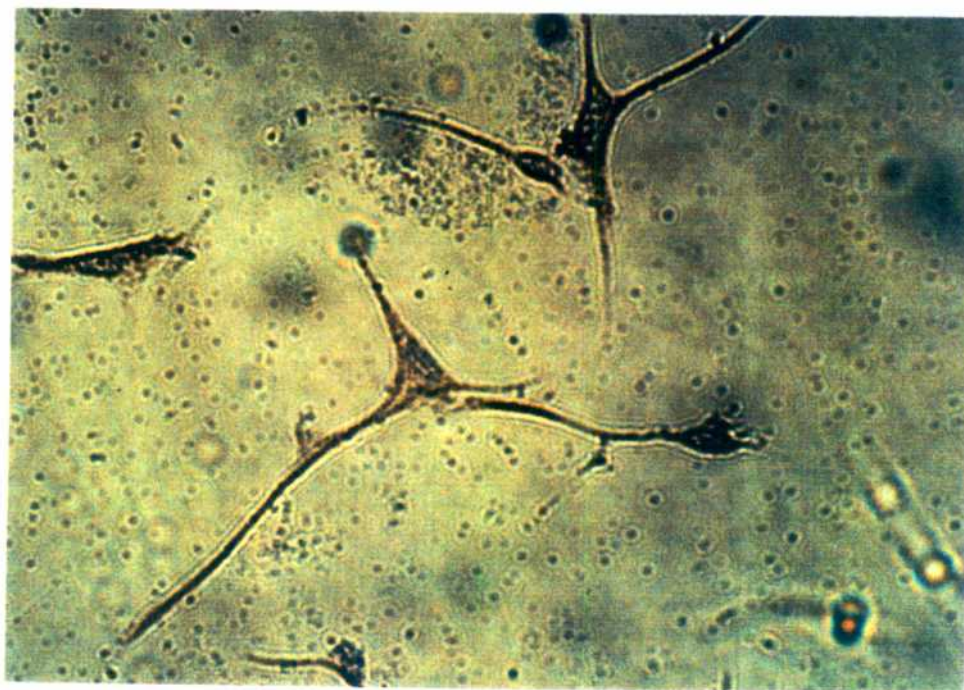


Figura 2-6 Inmunocitoquímica para vimentina. Microfotografía de un cultivo primario de un paciente del grupo 3 (Pa18m) donde se observan células de aspecto estrellado positivas para vimentina. (128 x).

3.- ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE SECRECIÓN DE TESTOSTERONA

La secreción de testosterona a lo largo de los días de cultivo fue estudiada en condiciones basales. En la figura 3-1 se observan las microfotografías de un cultivo primario de células testiculares de un paciente de 1.6 meses de edad a lo largo de los días de cultivo. Se destaca la progresiva expansión de células de tipo fibroblástico a partir de los grumos de células poligonales, en sentido centrífugo hasta alcanzar una monocapa. Asimismo, la secreción de testosterona aumenta significativamente a lo largo de los días de cultivo. Como se observa en la tabla 3, para 6 cultivos primarios de edades entre 1.6 y 36 meses, correspondientes a los grupos 2 y 3, los datos de testosterona expresados en medianas y rangos fueron el día 2 de 4.97 (0.82 - 13.2) pmol/10⁶cel.24hs, el día 4 13.6 (9.05 - 29.4), $p=0.055$ vs día 2 y el día 6 50.2 (37.4 - 67.7), $p=0.001$ vs día 2 y $p=0.01$ vs día 4.

Estos resultados señalan que las células testiculares prepúberes humanas poseen una capacidad intrínseca de sintetizar testosterona *de novo* aún en ausencia de gonadotrofinas ya que los niveles de testosterona, reflejo de células esteroideogénicamente activas, aumentan con los días de cultivo. Si bien en estas condiciones no hay gonadotrofinas en el medio de cultivo no se puede descartar el posible efecto estimulador de las gonadotrofinas u otros factores presentes en el suero fetal bovino colocado al 10% durante las primeras 48 horas de cultivo. Algunos cultivos se han prolongado por 8 a 10 días pero se ha observado un descenso de la secreción de testosterona y desprendimiento celular, ya sea por muerte celular ó como reacción a la confluencia. Por este motivo se ha establecido el día 6 como día óptimo para posteriores estudios.

El análisis de la cinética de la secreción de testosterona en los cultivos primarios de testículos de pacientes puberales (tabla 3) indica que la misma resulta inversa a la estudiada en testículos prepuberales, en los cuales, como ya se ha descrito, la secreción aumenta a lo largo de los días de cultivo. En cambio, las células testiculares provenientes de testículos de pacientes puberales, que ya están diferenciadas *in vivo*, secretan alta concentración de testosterona el día 2 de cultivo y la misma disminuye hacia el día 6. Si bien se trata de solamente dos sujetos, se podría interpretar que este fenómeno es el resultado de la privación de gonadotrofinas a que son sometidas estas células durante los 6 días de cultivo.

Tabla 3 Cinética de la secreción basal de testosterona en cultivos de pacientes prepuberales de los grupos 2 y 3. Datos expresados como mediana, en pmol/10⁶ cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Grupo</u>	<u>día 2</u>	<u>día 4</u>	<u>día 6</u>
Te1.5m	2	—	29.4 ± 2.8	67.7 ± 2.9
O1.5m	2	3.73	11.5 ± 1.66	37.4 ± 2.69
Ma6m	2	13.2 ± 3.57	24.5 ± 9.57	—
Qu12m	3	—	9.95 ± 3.63	39.7 ± 4.63
Va18m	3	0.82	13.6 ± 1.41	50.2 ± 3.68
Ar36m	3	<u>6.21 ± 1.17</u>	—	<u>53.0 ± 11.8</u>
	Mediana	4.97	13.6^a	50.2^{b,c}
Al15a	4	—	64.0 ± 19.4	34.3 ± 0.66
Lu15a	4	30.0 ± 5.95	19.3 ± 6.59	11.3 ± 3.96 ^d

^a p= 0.055 vs día 2

^b p= 0.001 vs día 2

^c p= 0.01 vs día 4

^d p= 0.05 vs día 2

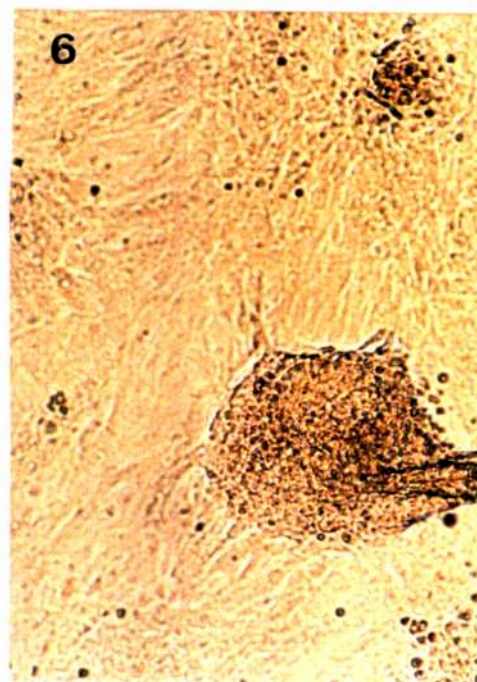
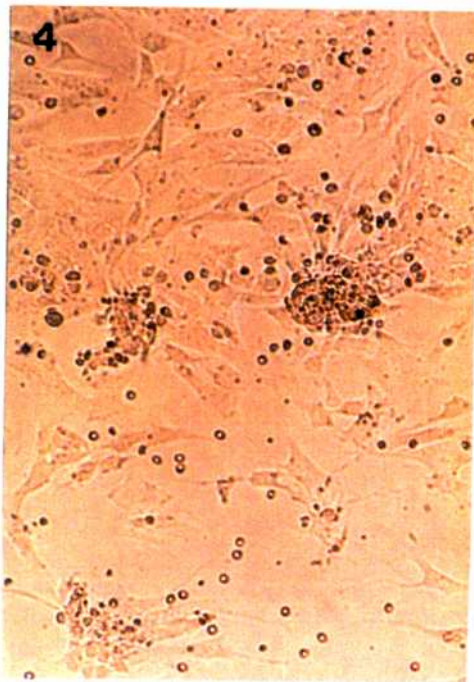
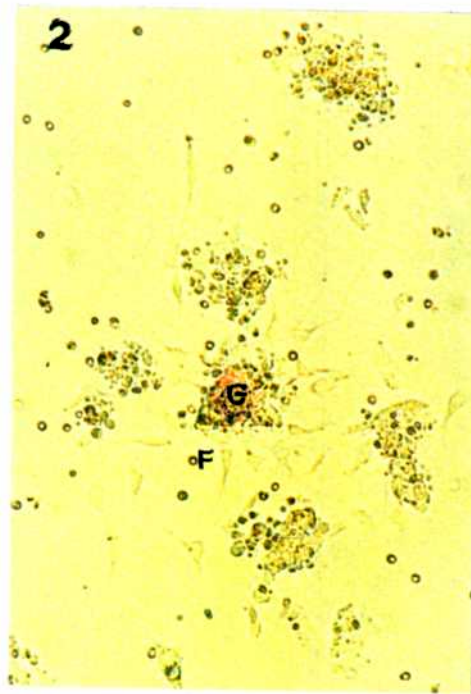


Figura 3-1 Aspecto del cultivo de un paciente del grupo 2 (Te1.6m) al día 2, 4 y 6. Se observa una progresiva expansión de células fibroblásticas (F) a partir de grumos celulares (G) alcanzando una monocapa (50 x).

4.- ESTUDIO DE LA ESTEROIDOGÉNESIS TESTICULAR EN CONDICIONES BASALES Y BAJO ESTÍMULO GONADOTRÓFICO EN CULTIVOS CORRESPONDIENTES A LOS CUATRO GRUPOS ETARIOS

4 A Características del grupo 1

Se analizó la secreción de testosterona en un grupo de 6 cultivos testiculares de pacientes de 1 a 9 días de edad -grupo 1-. En la tabla 4-A1 se pueden observar algunas características de estos pacientes: la edad cronológica, la edad gestacional, el peso al momento de nacer. Los diagnósticos, como se puede ver, no están relacionados con patologías endocrinas.

En la Tabla 4-A2 se observan los valores de testosterona en el medio condicionado del día 6 de cultivo tanto en condición basal como en presencia de estímulos crónicos con gonadotrofinas. Se destaca una gran dispersión entre los distintos cultivos. Se observa también un aumento significativo de la testosterona en 2 de los 6 cultivos bajo estímulo con LH y en 4 de 6 con FSH. Niveles muy elevados de testosterona basal se observan en 2 de los 6 cultivos, uno de los cuales responde a FSH pero no a LH. Se calculó la mediana para cada condición experimental y no se observan diferencias significativas entre la mediana basal y la mediana bajo las condiciones de estimulación estudiadas, analizadas por el test de medianas.

Tabla 4-A1 Grupo 1: edad cronológica (Ec), edad gestacional (Eg), peso al nacer (PN), y diagnóstico anatomopatológico (DAP) de cada uno de los pacientes

<u>Cultivo</u>	<u>Ec</u> (días)	<u>Eg</u> (semanas)	<u>PN</u> (g)	<u>DAP</u>
Ra1d	1	32 ¹	1230	hemorragia, neumotórax
Ac2d	2	30	1500	shock séptico
Fe4d	4	38	3600	cardiopatía congénita
A5d	5	38	3040	asfixia perinatal
Vi6d	6	39	3350	cardiopatía congénita
Ca9d	9	41	4200	fallo multisistémico

¹ Prematuro, rotura de membranas

Tabla 4-A2 Grupo 1: Testosterona basal y respuesta a estímulo crónico con LH (10 ng/ml) y FSH (2 ng/ml) al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$ en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>LH</u>	<u>FSH</u>
Ra1d	1.46 ± 0.33	$7.31 \pm 1.23^*$	$7.98 \pm 2.45^*$
Ac2d	15.6 ± 1.21	14.7 ± 1.65	12.0 ± 0.28
Fe4d	6.02 ± 1.72	9.48 ± 0.75	$16.3 \pm 2.92^*$
A5d	147 ± 20.0	239 ± 56.0	$275 \pm 29.0^*$
Vi6d	14.9 ± 4.82	$53.5 \pm 0.07^*$	$35.6 \pm 5.95^*$
Ca9d	<u>147 ± 45</u>	<u>134 ± 22.1</u>	<u>84.1 ± 13.7</u>
Mediana	15.2	34.1**	25.9**

* $p < 0.05$ vs Basal, test de t

** no significativo, test de Wilcoxon

4 B Secreción de testosterona de los grupos 2 y 3 y análisis comparativo de los grupos 1, 2 y 3

En la Tabla 4-B1 se observan los valores de testosterona en el medio condicionado del día 6 de cultivo tanto en condición basal como en presencia de estímulos crónicos con gonadotrofinas para 5 cultivos correspondientes al grupo 2. Se destaca un aumento significativo de la testosterona en presencia de LH en 4 de 5 cultivos y en presencia de FSH en 4 de 4 cultivos. La mediana tanto bajo LH como bajo FSH resultó ser significativamente mayor que la mediana basal, aunque no se observaron diferencias significativas entre la mediana bajo LH y la mediana bajo FSH (249).

Por otro lado, la tabla 4-B2 corresponde a los valores de testosterona en el medio condicionado del día 6 de cultivo tanto en condición basal como en presencia de estímulos crónicos de 4 cultivos del grupo 3. Sólo se observó un incremento significativo de testosterona en el medio condicionado bajo estímulo con LH en 1 de los cultivos mientras que no se observaron cambios bajo estímulo con FSH (249).

Tabla 4-B1 Grupo 2: Testosterona basal y respuesta a estímulo crónico con LH (10 ng/ml) y FSH (2 ng/ml) al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$ en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>LH</u>	<u>FSH</u>
Za1m	7.15 ± 2.04	$30.2 \pm 3.05^*$	$40.3 \pm 4.6^*$
Di3m	4.45 ± 0.54	$86.3 \pm 4.76^*$	$28.5 \pm 3.63^*$
Go3m	3.54 ± 0.04	$13.5 \pm 0.50^*$	
Ch5m	4.04 ± 0.95	6.02 ± 1.63	$7.48 \pm 1.47^*$
Gi7m	<u>2.63 ± 0.56</u>	<u>$18.5 \pm 3.14^*$</u>	<u>$15.3 \pm 4.64^*$</u>
Mediana	4.45	18.5**	21.9**

* $p < 0.05$ vs Basal, test de t

** $p < 0.05$ vs Basal, test de medianas

Tabla 4-B2 Grupo 3: Testosterona basal y respuesta a estímulos gonadotróficos al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$ en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>LH</u>	<u>FSH</u>
Ur16m	1.39 ± 0.10	3.47 ± 0.52	
Ro24m	2.78 ± 0.86	$10.4 \pm 4.10^*$	1.52 ± 0.27
Mo33m	2.18 ± 0.22	1.35 ± 0.18	--
<u>Mi33m</u>	<u>1.73 ± 0.31</u>	<u>2.30 ± 0.25</u>	<u>1.62 ± 0.35</u>
Mediana	1.95	2.88**	--

* $p < 0.05$ vs Basal, test de t

** no significativo, test de medianas

Se analizó la secreción basal de testosterona al día 6 de cultivo comparando cultivos provenientes de autopsias de pacientes de los grupos 1, 2 y 3. Se observó que la mediana (y rango), expresada en $\text{pmol}/10^6$ células.24 horas, fué para el grupo 1, $n=6$, de 15.2 (1.46-147) y para el grupo 2 de 4.45 (2.63-7.15) ambas significativamente mayores que para el grupo 3, 1.95 (1.39-2.78), $p<0.05$ (Figura 4-1). Además, bajo estímulo crónico con LH no se observó un aumento de la secreción de testosterona ni en el grupo 1 ni en el grupo 3, $n=4$, mientras que en el grupo 2, $n=5$, la secreción de testosterona aumentó significativamente alcanzando un valor de 18.5 (6.02-86.3), $p < 0.05$, test para medianas de Wilcoxon (Figura 4-1).

En la figura 4-1 también está representada en medianas (y rangos) la testosterona en respuesta a FSH. Para el grupo 1 fue de 25.9 (7.98-275) $\text{pmol}/10^6$ cel.24hs, no significativa respecto de la basal, para el grupo 2 aumentó significativamente a 21.9 (7.48-40.3), $p<0.05$ respecto de la basal y para el grupo 3 fue de 1.57, media de dos datos, no aumentó significativamente de la basal. La mediana de testosterona bajo FSH fue significativamente mayor en el grupo 1 y 2 que en el grupo 3, $p<0.05$, test para medianas. El efecto de FSH no fue significativamente diferente al de LH. Para analizar posibles impurezas de la preparación de FSH hipofisaria, se comparó el efecto de ésta con el de la FSH recombinante. No se detectaron diferencias entre las dos preparaciones de FSH: 24.1 y 19.7 $\text{pmol}/10^6$ cel.24hs.

Estos resultados se pueden comparar con las diferentes etapas de la maduración testicular descritas en el ser humano. Los testículos del grupo 1 se encuentran probablemente bajo la influencia del medio hormonal del embarazo controlado en gran parte por las hormonas placentarias. Los resultados de este estudio muestran, dentro de una variabilidad importante, que las células testiculares de los pacientes del grupo 1 segregan una gran cantidad de testosterona pero responden escasamente a los estímulos gonadotróficos. Los resultados correspondientes al grupo 1, no se pudieron explicar sólo por la edad cronológica ni por la edad gestacional al momento de nacer y es posible que el contenido de células de Leydig fetales en la suspensión de células sembradas u otros factores, puedan tener relación con las características disímiles de los cultivos de este grupo. Los altos niveles de testosterona basal podrían asociarse a la presencia de células de Leydig fetales esteroidogénicamente activas, aunque el pico descrito de actividad de las células de Leydig fetales es entre las semanas 14 y 18 de gestación. Probablemente estas células

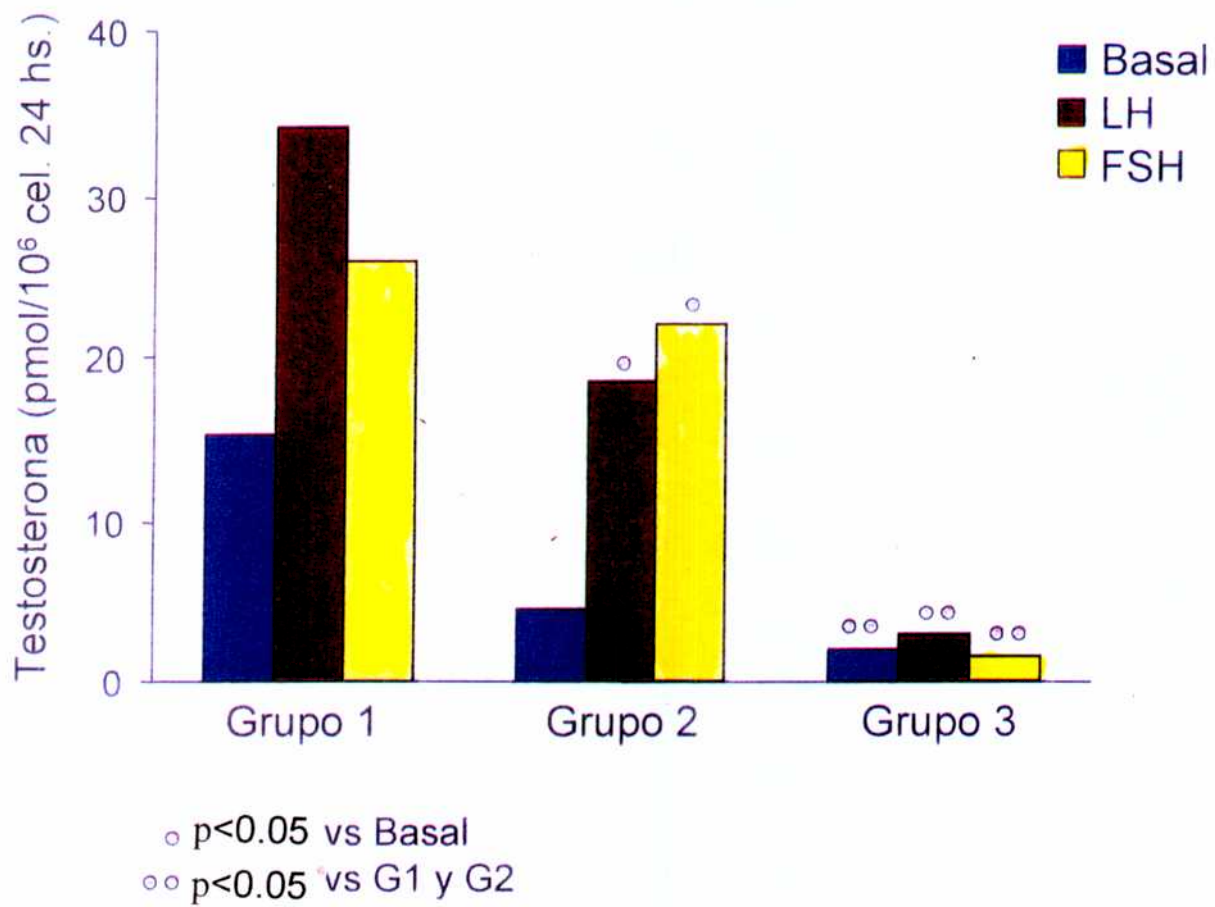


Figura 4-1 Testosterona basal y bajo estímulos gonadotróficos crónicos al día 6 de cultivo. Comparación entre los grupos 1, 2 y 3. Datos expresados como medianas, en pmol/10⁶ cel. 24hs

Los testículos del grupo 2 están influenciados por la fase de activación postnatal de la función testicular. Estas células reflejan que cultivos provenientes de pacientes del primer semestre de vida contienen células esteroidogénicamente activas que son capaces de responder al estímulo gonadotrófico crónico.

Por último, los testículos del grupo 3, se encuentran en la prolongada fase de quiescencia de la prepubertad y carecen de células de Leydig diferenciadas. Los resultados mostraron que en este grupo la población de células esteroidogénicamente activas es muy escasa y que estas células no tienen capacidad de responder a estímulos gonadotróficos.

Los presentes datos indican que la regulación de la esteroidogénesis para cada etapa de la prepubertad sería diferente.

4 C Secreción de testosterona y características del grupo 4

El estudio de muestras testiculares derivadas de dos jóvenes de 15 años de edad (Lu15a, Al15a) con características puberales ha permitido obtener datos acerca del comportamiento de las células testiculares diferenciadas con respecto a las inmaduras provenientes de testículos prepuberales.

Una característica diferencial del grupo puberal es la respuesta del cultivo a la estimulación crónica con LH. Mientras que LH/hCG administrada crónicamente estimuló significativamente la secreción de testosterona en los cultivos de niños de hasta 7 meses de edad, la LH administrada en forma crónica a igual concentración fue incapaz de estimular en los cultivos de 15 años, produciendo incluso un efecto inhibitorio en uno de ellos. Por otra parte las células testiculares de pacientes puberales tampoco respondieron a FSH, como se ha observado en las células testiculares del grupo 2 (tabla 4-C).

Los testículos puberales se asemejan más a los de adultos que a los de prepúberes, probablemente a causa de todos los cambios citológicos y fisiológicos que ocurren en la edad puberal, como la aparición del epitelio germinativo, el aumento de células de Leydig diferenciadas, la formación de la barrera hemato-testicular, la diferenciación de las células de Sertoli (251) y en consecuencia el estudio de testículos puberales en cultivo debe tener en cuenta todas estas características.

La falta de respuesta a las gonadotrofinas observada en estos experimentos puede ser atribuida a un fenómeno de desensibilización. En efecto, el estímulo repetido con hCG induce desensibilización de la secreción de testosterona por las células de Leydig tanto *in*

vitro como *in vivo* (182, 183). Este fenómeno podría tener lugar tanto con la LH como con la FSH en las condiciones de cultivo utilizadas.

Tabla 4-C Secreción basal de testosterona expresada como $x \pm DS$ de triplicados de cada cultivo, en $\text{pmol}/10^6\text{cel.24hs}$ en cultivos testiculares puberales y respuesta a estímulos crónicos con LH (10 ng/ml) y FSH (2 ng/ml)

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>LH</u>	<u>FSH</u>
Lu15a	11.3 ± 3.96	$7.43 \pm 1.53^{**}$	$9.84 \pm 5.63^{**}$
Al15a	34.3 ± 0.66	$0.45 \pm 0.00^*$	$47.4 \pm 12.2^{**}$

* $p < 0.05$ vs condición Basal

** no significativo vs condición Basal

5.- ESTIMACIÓN DE ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS 3 β -HSD, 17 β -HSD Y DE LA ACTIVIDAD 17,20-LIASA DE LA ENZIMA P450c17 POR ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL EN LOS GRUPOS 2 Y 3

Los resultados de la producción basal de testosterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona, 17 hidroxiprogesterona y progesterona en el día 6 de cultivo para los grupos 2 y 3, expresados en medianas y rangos semicuartiles se observan en la tabla 5-A. Se destaca que la testosterona producida por los cultivos del grupo 2 es significativamente mayor que la producida por el grupo 3 ($p < 0.05$). Respecto a los restantes esteroides también se observa que las medianas correspondientes a dehidroepiandrosterona y a 17 hidroxiprogesterona para el grupo 2 son mayores que las correspondientes del grupo 3 ($p < 0.05$). También se puede destacar que en el grupo 2 la producción de 17 hidroxiprogesterona es cinco veces mayor que la de testosterona, mientras que la producción de androstenediona corresponde a cantidades equimolares respecto a la de testosterona. En el grupo 3 los cuatro esteroides analizados, menos progesterona, están en cantidades equimolares entre sí. En todos los casos los valores de progesterona resultaron muy inferiores a los de 17 hidroxiprogesterona.

En la Figura 5-1 los resultados se expresan como las pendientes de la regresión lineal de las relaciones entre testosterona y cada uno de los tres precursores esteroides estudiados analizadas para el grupo 2 y para el grupo 3, como se describe en Material y Métodos. No se incluyeron los datos de progesterona porque los valores resultaron en el límite de sensibilidad del método. En las ordenadas se grafica el valor de la pendiente.

Para la correlación entre 17 hidroxiprogesterona y testosterona, el valor de la pendiente del grupo 3 es significativamente mayor que su correspondiente del grupo 2 ($p < 0.01$).

El análisis de regresión lineal entre dehidroepiandrosterona y testosterona permite observar que hay correlación con pendiente igual a 0 en el grupo 2 y que el valor de la pendiente del grupo 3 es significativamente mayor que el del grupo 2 ($p < 0.01$).

Al analizar la correlación androstenediona versus testosterona se observa que el valor de la pendiente del grupo 3 es significativamente mayor que el del grupo 2 ($p < 0.01$).

Finalmente al analizar las tres columnas correspondientes al grupo 3 se observa que el valor de la pendiente para la correlación 17 hidroxiprogesterona versus testosterona es significativamente mayor que el valor correspondiente a la correlación entre dehidroepiandrosterona y testosterona y que el valor de la correlación entre androstenediona y testosterona ($p < 0.01$).

En base a los resultados descriptos se puede concluir que la enzima 17β -HSD y sobre todo la enzima 3β -HSD están muy activas en los cultivos del grupo 2. Estas actividades disminuyen en los cultivos del grupo 3. Por su parte, la actividad $17,20$ -liasa de la enzima citocromo P450c17 es menor que la actividad de las enzimas 17β -HSD y 3β -HSD en ambas etapas del desarrollo postnatal estudiadas, grupos 2 y 3. La actividad $17,20$ liasa disminuye en el grupo 3 con respecto al grupo 2. Esto sugeriría que la $17,20$ -liasa sería una enzima limitante de la esteroidogénesis testicular en la prepubertad.

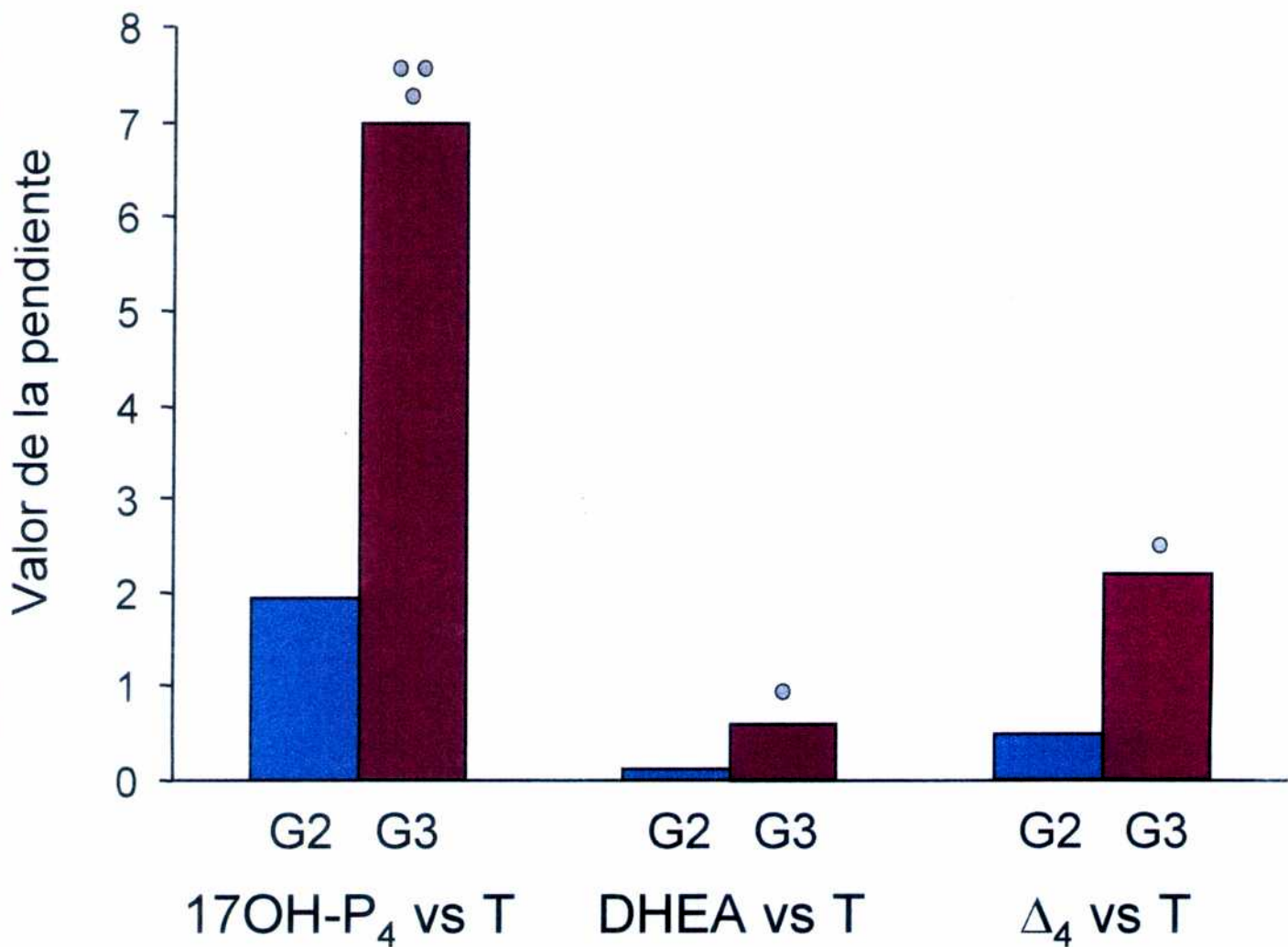
Los presentes resultados indicarían que en el grupo correspondiente al primer semestre de vida habría una mayor actividad de las enzimas P450 c17 y 17β -HSD con respecto al grupo de edad de quiescencia testicular, ya sea porque las células esteroidogénicas están más diferenciadas ó porque los cultivos tienen mayor número de células esteroidogénicas en el primer grupo.

Tabla 5-A Secreción Basal de esteroides correspondiente a los grupos 2 y 3. Datos expresados como mediana y rango semicuartil, en pmol/10⁶cel.24hs

	<u>Grupo 2</u>	<u>Grupo 3</u>
Testosterona	5.83* (3.79 - 24.9)	2.18 (1.39 - 6.15)
Androstenediona	4.80 (0.79 - 96.6)	3.57 (1.27 - 51.1)
Dehidroepiandrosterona	15.6* (3.83 - 26.6)	3.41 (1.69 - 15.6)
17 hidroxiprogesterona	29.5* (11.4 - 53.2)	2.30 (0.30 - 20.5)
Progesterona	2.47 (del - 10.9)	del (del - del)

* p<0.05 versus grupo 3, test de Wilcoxon

del : valor no detectable



- $p < 0.01$ vs G2
- ◉ $p < 0.01$ vs [DHEA vs T] y vs [Δ_4 vs T]

Figura 5 Valor de la pendiente correspondiente a cada una de las correlaciones estudiadas. 17OHP4 vs T (enzimas 17, 20 DES y 17 β -HSD), DHEA vs T (3 β -HSD y 17 β -HSD), y Δ_4 vs T (17 β -HSD) en cultivos de pacientes del grupo 2 y del grupo 3.

6.- ESTUDIO DE LAS VIAS 5-ENE ($\Delta 5$) Y 4-ENE ($\Delta 4$) UTILIZANDO PRECURSORES TRITIADOS Y CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (TLC)

El método de incubación con precursores tritiados y el posterior análisis de los productos secretados por cromatografía en capa delgada se utilizó para conocer cuál es la vía esteroidogénica de preferencia en los cultivos primarios mixtos de células testiculares humanas. Se realizó la comparación entre un precursor de la vía 5-ene (pregnenolona) y uno de la vía 4-ene (progesterona) en condiciones basales y luego de hCG, FSH, GH e insulina, para identificar todos los metabolitos de la biosíntesis de andrógenos y para analizar el efecto de las hpm sobre la capacidad de un cultivo de metabolizar un precursor. Para saber si la biosíntesis endógena afectaba los resultados obtenidos a partir de incubación con precursor exógeno se utilizó aminoglutetimida (AG), un inhibidor de la P450_{scc}. Se estudió el efecto de la cianocetona (CN), inhibidor de la 3 β -HSD/ Δ 5-4 isomerasa sobre la esteroidogénesis testicular. Se realizó el estudio por TLC en los medios condicionados de cinco cultivos primarios. Como se había descripto anteriormente, en el estudio de la secreción de testosterona en función de la variable tpm, los cultivos de menos de 24 hpm conservan su capacidad de sintetizar testosterona mientras que los de mayores tpm pierden esta capacidad a la vez que expresan actividad aromatasa, que se había definido como el aumento de estradiol en presencia de testosterona. Para comprobar estas observaciones realizadas por radioinmunoensayo se estudió por el presente método dos testículos provenientes de un mismo paciente de 24 meses de edad uno de los cuales se procesó de inmediato mientras que el contralateral fue almacenado en frasco estéril con medio de cultivo a 4°C durante 72 horas. Ambos cultivos se incubaron con pregnenolona para estudiar los productos de metabolización. En la figura 5-1 se observa que el cultivo de menos de 24 hpm (calle 2) fue capaz de convertir pregnenolona a testosterona en condiciones basales mientras que la pregnenolona no pudo ser metabolizada por el testículo contralateral (calle 7), almacenado durante 72 horas a 4°C. Los metabolitos producidos por el testículo de menos de 24 hpm en condiciones basales (calle 2) fueron progesterona, 17-hidroxiprogesterona, 20-hidroxiprogesterona y testosterona. En presencia de hCG (calle 5) ó de FSH (calle 4) no se observa un aumento de la testosterona. Este resultado fue semejante al observado por el método de determinación de esteroides por radioinmunoensayo para el grupo 3. En presencia de insulina (calle 3) en una dosis de 5 μ g/ml no se observan cambios respecto de la condición basal (calle 2). Las calles correspondientes al testículo de 72 hpm bajo insulina, FSH ó hCG (calles 8, 9 y 10

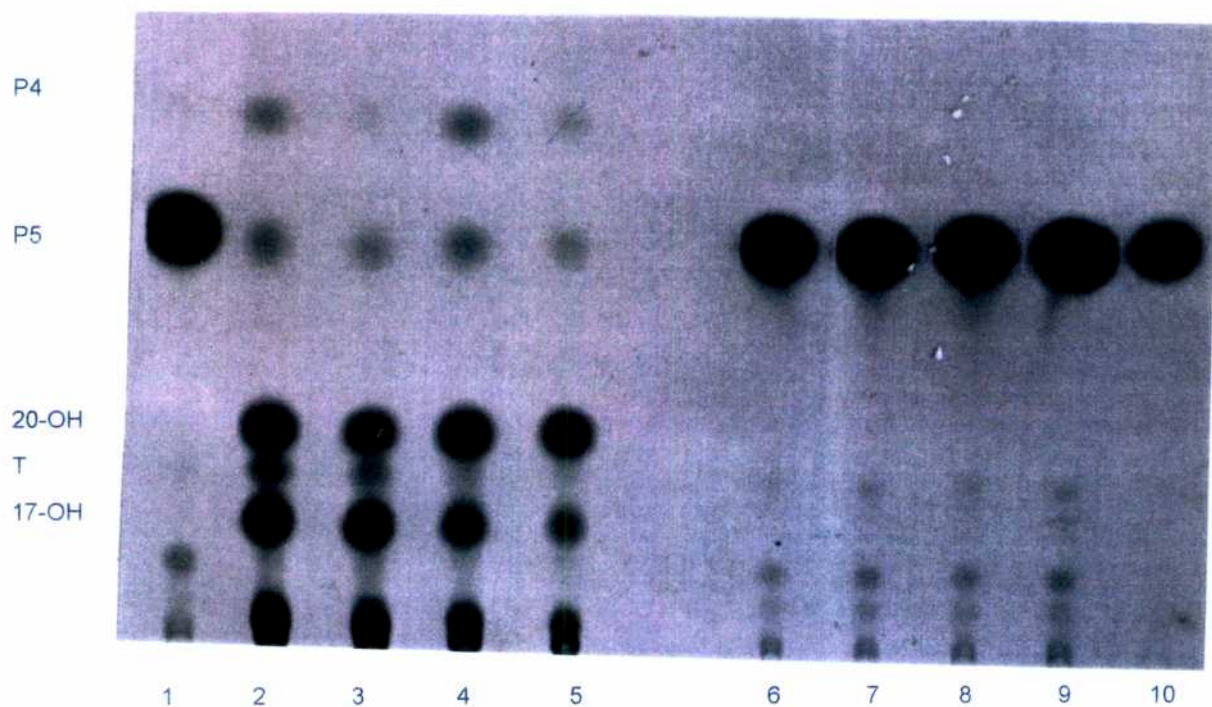


Figura 6-1 Radioautografía de una cromatografía en capa delgada (TLC) a partir de los medios condicionados de un cultivo de un paciente de 24 meses de edad, incubado con P5 tritiada. Calles 1-5: testículo de 9 hpm, calles 6-10: testículo contralateral de 72 hpm. Control sin células (calles 1 y 6), condición basal (calles 2 y 7), insulina 5 µg/ml (calles 3 y 8), FSH 2 ng/ml (calles 4 y 9), hCG 10 ng/ml (calles 5 y 10). P4: progesterona, P5: pregnenolona, 20-OH: 20α-hidroxiprogesterona, T: testosterona, 17-OH: 17αhidroxiprogesterona / pregnenolona

respectivamente) no presentan diferencias respecto de la condición basal (calle 7), ya que en todas se observa solamente la mancha correspondiente al precursor colocado sin productos de metabolización. Las calles 1 y 6 corresponden a la condición control, en la cual se coloca medio de cultivo con pregnenolona tritiada en ausencia de células. Este ensayo indicaría que a lo largo del tpm las enzimas que metabolizan pregnenolona a testosterona pierden su actividad ó bien que la población celular que expresa dichas enzimas es más lábil que la población no esteroidogénica del testículo humano prepúbere y no estaría presente en los cultivos de más de 24 hpm.

En la figura 6-2 se puede observar la fotografía de una TLC de un cultivo de un paciente de 10 días de edad, donde fue utilizada pregnenolona como precursor. Cuando se incubó pregnenolona en condiciones basales, en ausencia (calle 4) ó presencia (calle 5) de aminoglutetimida se producen los mismos metabolitos lo que indica que la producción endógena de esteroides no afecta los resultados obtenidos a partir de sustrato exógeno. La incubación en condición basal de pregnenolona con cianocetona (calle 6) permite observar una disminución en la cantidad de androstenediona con respecto a la condición de pregnenolona sin inhibidor (calle 4). Esto muestra la acción inhibitoria esperada de la cianocetona sobre la actividad 3β -HSD, aunque ésta fue parcial. En condiciones basales (calle 4), en presencia de pregnenolona el metabolito final más importante resultó ser la androstenediona y no la testosterona; sin embargo luego de la estimulación crónica con FSH (calle 13) ó con hCG (calle 10) se encontró testosterona como metabolito final. Estos resultados sugieren que habría un efecto estimulador de las gonadotrofinas en este paciente, como se ha descrito que sucede en algunos de los pacientes del grupo 1. En presencia de GH (calle 7) se observa un leve aumento de la androstenediona respecto de la condición basal (calle 4), una disminución de precursor y la aparición de la mancha correspondiente a testosterona.

La fotografía de una TLC con los productos de metabolización a partir de pregnenolona y de progesterona de un cultivo de un paciente de 2 días de vida se puede observar en la figura 6-3. Mientras que en condiciones basales en presencia de progesterona (calles 7 y 8) los productos observados son 17-hidroxiprogesterona y escasa cantidad de 20-hidroxiprogesterona y androsterona, en presencia de pregnenolona (calles 3 y 4) se observa progesterona, 17-hidroxipregnenolona o 17-hidroxiprogesterona, androstenediona y en menor cantidad 20-hidroxiprogesterona, androsterona, testosterona y dihidrotestosterona. El agregado de FSH, en presencia de pregnenolona (calles 1 y 2) no produce cambios importantes, sólo se observa la aparición de metabolitos 3α -reducidos,

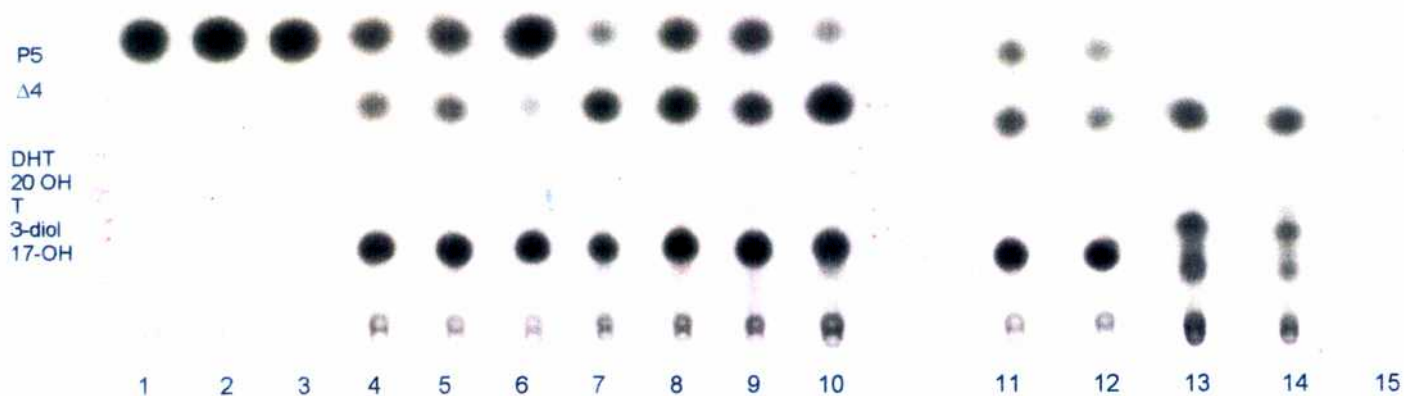


Figura 6-2 Radioautografía de una cromatografía en capa delgada (TLC) a partir de los medios condicionados de un cultivo de un paciente de 10 días de edad, incubado con P5 tritiada. De cada condición, por triplicado, la primera calle con P5 tritiada, la segunda calle P5 con AG y la tercera calle P5 con CN. Control sin células (calles 1,2,3), Cultivo en condición basal (calles 4,5,6), GH 50 ng/ml (calles 7,8,9), hCG 10 ng/ml (calles 10,11,12), FSH 2 ng/ml (calles 13,14,15). $\Delta 4$: androstenediona, AND: androsterona, T : testosterona, 3-diol: androstenediol, 17-OH: 17α hidroxiprogesterona/pregnenolona

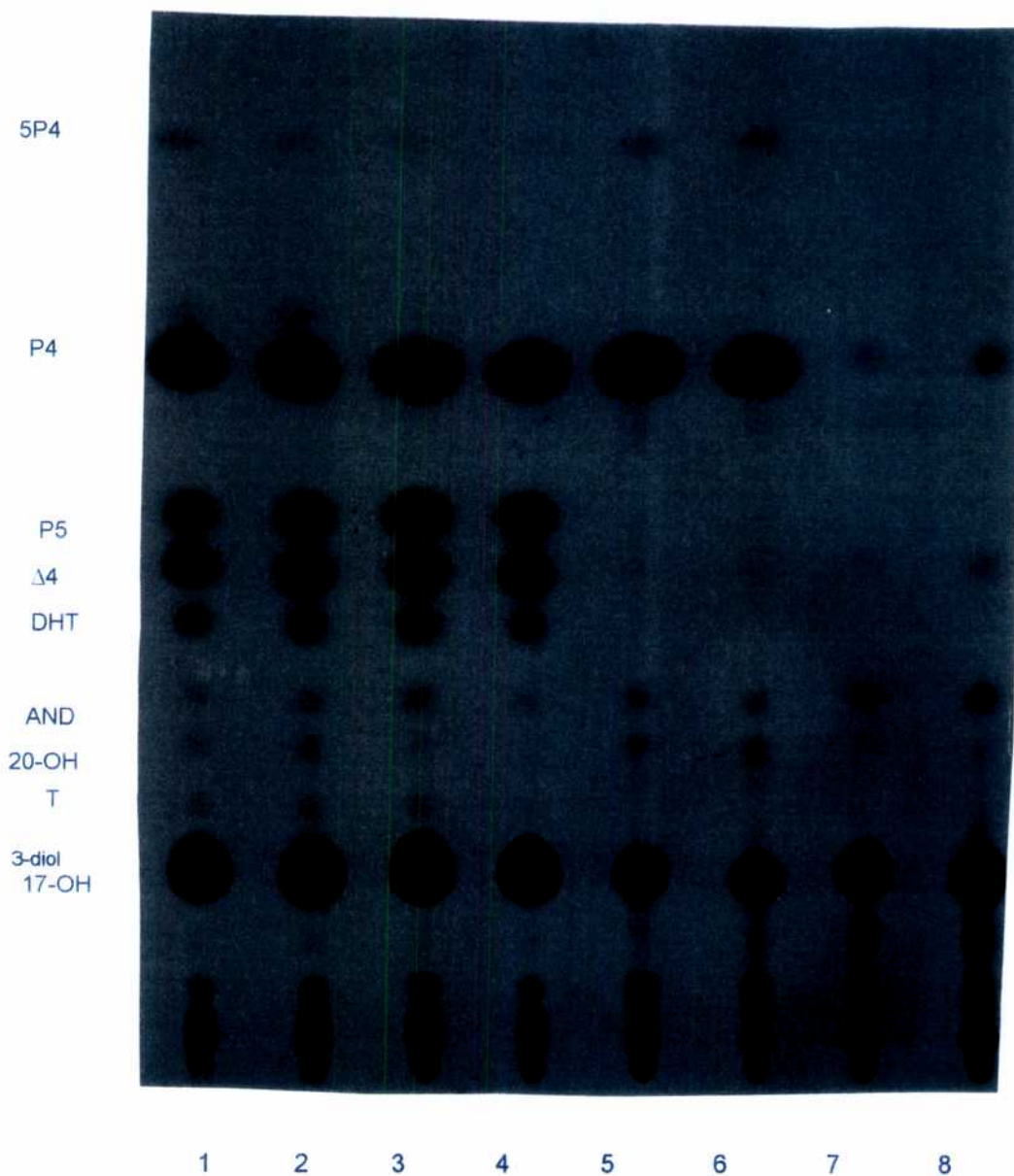


Figura 6-3 Radioautografía de una cromatografía en capa delgada (TLC) a partir de los medios condicionados de un cultivo de un paciente de 2 días de edad. Cultivo incubado con P5 tritiada (calles 1-4) y con P4 tritiada (calles 5-8), en condición basal (calles 3-4 y 7-8) y bajo FSH 2 ng/ml (calles 1-2 y 5-6). 5-P4: 5α hidroxiprogesterona, P4: progesterona, P5: pregnenolona, $\Delta 4$: androstenediona, DHT: dihidrotestosterona, AND : androsterona, 20-OH: 20α hidroxiprogesterona, T: testosterona, 3-diol: androstenediol, 17-OH: 17α hidroxiprogesterona/pregnenolona

como 3 α -androstenediol, mientras que FSH en presencia de progesterona (calles 5 y 6) no modifica la condición basal (calles 7 y 8). A partir de esta figura se deduce que la vía preferencial en este cultivo del grupo 1 es la vía $\Delta 5$, aunque por alguna razón que no podemos explicar el producto final de metabolización es androstenediona y no testosterona.

En el cultivo de un paciente de 7 meses, figura 6-4, se comparan los productos de metabolización a partir de pregnenolona tritiada (calles 1 a 9) o de progesterona tritiada (calles 10 a 13). En condición basal, en presencia de progesterona (calle 11) se obtienen 20-hidroxiprogesterona, 17-hidroxiprogesterona y no se observa testosterona mientras que con pregnenolona (calle 4) se observan manchas importantes de 17-hidroxiprogesterona y de testosterona. La FSH estimula la testosterona para la vía $\Delta 5$ (calles 8 y 9) mientras que la hCG aumenta la testosterona en la vía $\Delta 4$ (calle 13) y en la $\Delta 5$ (calle 7). El agregado de insulina (5 μ g/ml) implica un aumento de progesterona a partir de pregnenolona y la aparición de androstenediona lo que sugiere que la insulina estimula la vía $\Delta 4$, probablemente actuando a través del receptor de IGF-1.

En un cultivo de un paciente de 8 meses de edad, figura 6-5, los metabolitos producidos en condiciones basales luego de la incubación con progesterona fueron escasos y no se observó testosterona (calles 4 y 5). El efecto de la FSH (calles 1, 2 y 3) fue incrementar todos los metabolitos producidos en condición basal, especialmente la androstenediona.

En resumen, el método de estudio de la esteroidogénesis testicular con precursores tritiados permite obtener información cualitativa y semicuantitativa, sobre el comportamiento del cultivo en cuanto a su capacidad biosintética y a la formación de metabolitos que con otras técnicas no es posible. Si bien al agregar precursor estos datos no nos informan acerca de la capacidad del cultivo de sintetizar *de novo* los esteroides, en cambio nos suministra información complementaria a los métodos descriptos anteriormente.

Como dato relevante figura que las células testiculares prepúberes humanas metabolizan preferentemente a la pregnenolona para producir testosterona. La vía $\Delta 4$ a partir de progesterona está presente aunque no sería la preferencial, tal como se ha descripto en algunos primates (197-201).

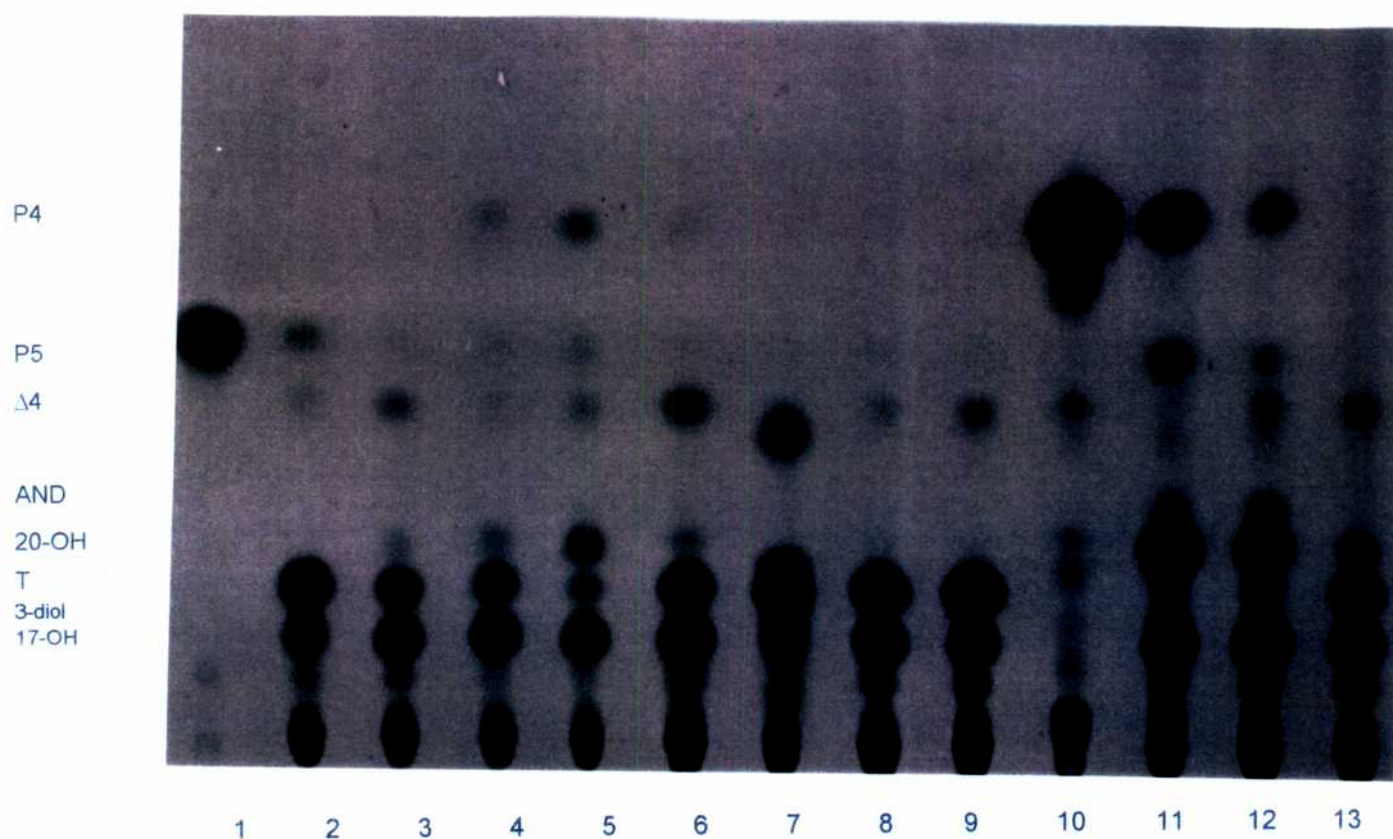


Figura 6-4 Radioautografía de una cromatografía en capa delgada (TLC) a partir de los medios condicionados de un cultivo de un paciente de 7 meses de edad, incubado con P5 tritiada (calles 1-9) y P4 tritiada (calles 10-13). Control sin células (calles 1 y 10), insulina 50 ng/ml (calle 2), insulina 50 ng/ml + rFSH 2 ng/ml (calle 3), basal (calles 4 y 11), insulina 5 μ g/ml (calle 5), rFSH 2 ng/ml (calles 6 y 13), hCG 10 ng/ml (calles 7 y 14), hpFSH 2 ng/ml (calles 8 y 9). P4: progesterona, Δ^4 : androstenediona, AND: androsterona, 20-OH: 20 α hidroxiprogesterona, T: testosterona, 3-diol: androstenediol, 17-OH: 17 α hidroxiprogesterona/pregnenolona

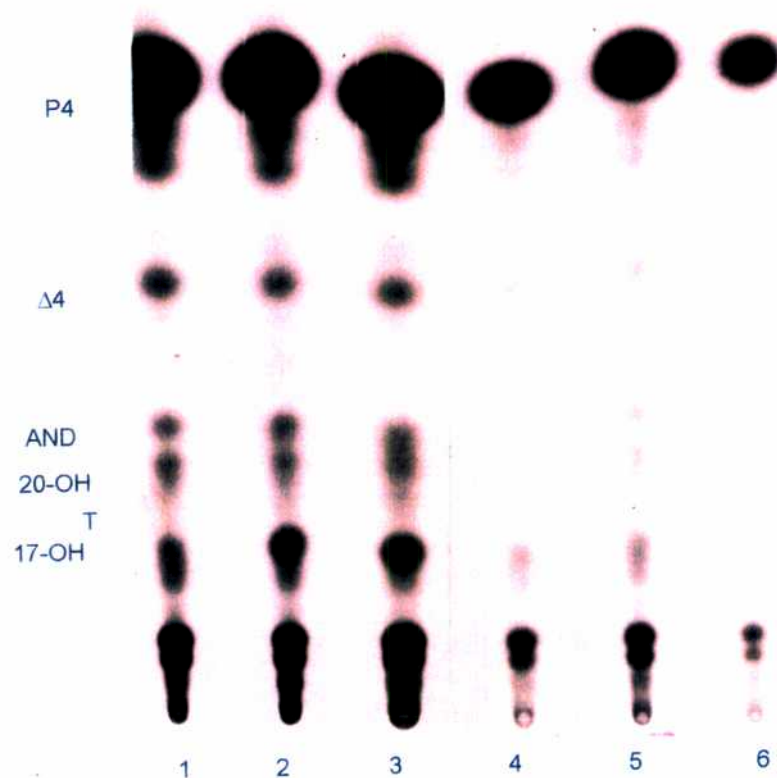


Figura 6-5 Radioautografía de una cromatografía en capa delgada (TLC) a partir de los medios condicionados de un cultivo de un paciente de 8 meses de edad, incubado con P4 tritiada en combinación con FSH 2 ng/ml (calles 1,2,3) condición basal (calles 4,5) y control sin células (calle 6). $\Delta 4$: androstenediona, AND: androsterona, 20-OH: 20 α hidroxipregesterona, T : testosterona, 3-diol : androstenediol, 17-OH: 17 α hidroxipregesterona

7.- ESTUDIO DEL ROL DE LA INSULINA, LA GH Y EL IGF-1 EN LA ESTEROIDOGENESIS DE CÉLULAS TESTICULARES HUMANAS EN CULTIVO

Efecto de la insulina y la GH en los 4 grupos etarios

Los valores de testosterona en el medio condicionado del día 6 de cultivo tanto en condición basal como en presencia de estímulos crónicos de insulina (50 ng/ml) y GH (50 ng/ml) de cuatro cultivos del grupo 1 se observan en la tabla 7-A. Se destaca una gran dispersión entre los datos de los distintos cultivos. Se nota un aumento de la secreción de testosterona bajo estímulo crónico con insulina en 2 de 4 cultivos estudiados y con GH también en 2 de 4, uno de los cultivos responde a ambos estímulos. Niveles muy elevados de testosterona basal se observan en 1 de los cultivos, el cual no responde ni a insulina ni a GH. Se calculó la mediana para cada condición experimental, no observándose diferencias significativas entre la mediana basal y la de ninguna de las condiciones de estimulación estudiadas.

Los valores de testosterona en el medio condicionado del día 6 de cultivo en condición basal y en presencia de estímulos crónicos de insulina y GH para cultivos del grupo 2 se observan en la tabla 7-B. Se destaca que en ambas condiciones de estimulación la secreción de testosterona aumenta respecto del basal, en 4 de 5 cultivos estudiados. Se observa que la mediana tanto bajo insulina como bajo GH es significativamente mayor respecto de la mediana basal. Sin embargo en el grupo 3 no se observó un incremento de la testosterona bajo estímulo crónico con GH (n=4) mientras que en 1 de 2 cultivos se observó un incremento significativo bajo estimulación crónica con insulina (tabla 7-C). En la figura 7-1 se representa la secreción basal y bajo estímulo crónico de insulina y GH al 6to día de cultivo, expresada en medianas para los grupos 1, 2 y 3 (249). En el grupo 4, en 2 cultivos de testículos puberales no se observaron cambios ni bajo insulina ni bajo GH (tabla 7-D).

Los datos presentados indican que tanto la GH como la insulina administradas crónicamente a una dosis de 50 ng/ml, son capaces de estimular significativamente la secreción de testosterona en cultivos primarios de células testiculares prepúberes humanas correspondientes al grupo 2, entre 1 y 9 meses de edad. Como se ha descripto en el capítulo 4, dentro de este rango etario las células testiculares fueron capaces de responder

al estímulo crónico de LH y de FSH. La respuesta a GH y a insulina indicaría que en la etapa postnatal de actividad testicular, la secreción de testosterona estaría modulada por múltiples factores. Por su parte, no se observó un aumento de la testosterona bajo estímulo crónico de GH ni de insulina en el grupo 1 ni en el grupo 3 y tampoco en los 2 cultivos puberales estudiados.

Tabla 7-A Grupo 1: Testosterona basal y respuesta a insulina (50 ng/ml) y a GH (50 ng/ml) al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$, en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>Insulina</u>	<u>GH</u>
Ra1d	1.46 ± 0.33	0.17 ± 0.09	$5.03 \pm 2.74^*$
Fe4d	6.02 ± 1.72	$13.1 \pm 2.48^*$	7.40 ± 1.25
A5d	147 ± 20.0	139 ± 10.9	205 ± 74.3
Vi6d	<u>14.9 ± 4.82</u>	<u>$49.8 \pm 6.7^*$</u>	<u>$24.3 \pm 2.13^*$</u>
Mediana	15.2	31.4**	15.8**

* $p < 0.05$ vs Basal (test de t)

** no significativo vs Basal (test de Wilcoxon)

Tabla 7-B Grupo 2: Testosterona basal y respuesta a insulina (50 ng/ml) y a GH (50 ng/ml) al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$, en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>Insulina</u>	<u>GH</u>
Za1m	7.15 ± 2.04	$83.9 \pm 25.2^*$	$34.0 \pm 5.43^*$
Go3m	3.54 ± 0.04	$8.23 \pm 0.13^*$	$11.9 \pm 0.9^*$
Di3m	4.45 ± 0.54	$93.0 \pm 9.98^*$	$32.7 \pm 2.75^*$
Ch5m	4.04 ± 0.95	$14.7 \pm 9.7^*$	$5.31 \pm 3.31^*$
Gi7m	<u>2.23 ± 0.56</u>	<u>2.06 ± 0.40</u>	<u>4.70 ± 1.27</u>
Mediana	4.45	14.7**	11.9**

* $p < 0.05$ vs basal (test de t)

** $p < 0.05$ vs mediana basal (test de Wilcoxon)

Tabla 7-C Grupo 3: Testosterona basal y respuesta a insulina (50 ng/ml) y a GH (50 ng/ml) al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$, en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>Insulina</u>	<u>GH</u>
Ur16m	1.39 ± 0.10	2.53 ± 0.21	3.05 ± 1.25
Ro24m	2.78 ± 0.86	$11.9 \pm 1.15^*$	1.64 ± 0.13
Mo33m	2.18 ± 0.22	--	2.29 ± 0.30
Mi33m	<u>1.73 ± 0.31</u>		<u>1.45 ± 0.34</u>
Mediana	1.91		1.96**

* $p < 0.05$ vs Basal (test de t)

** no significativo vs Basal (test de Wilcoxon)

Tabla 7-D Grupo 4: Testosterona basal y respuesta a insulina (50 ng/ml) y a GH (50 ng/ml) al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$, en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>Insulina</u>	<u>GH</u>
Lu15a	11.3 ± 3.96	$16.4 \pm 5.01^{**}$	$8.55 \pm 0.09^{**}$
Al15a	34.3 ± 0.66	$25.7 \pm 7.24^{**}$	$26.0 \pm 8.97^{**}$

** no significativo vs Basal (test de t)

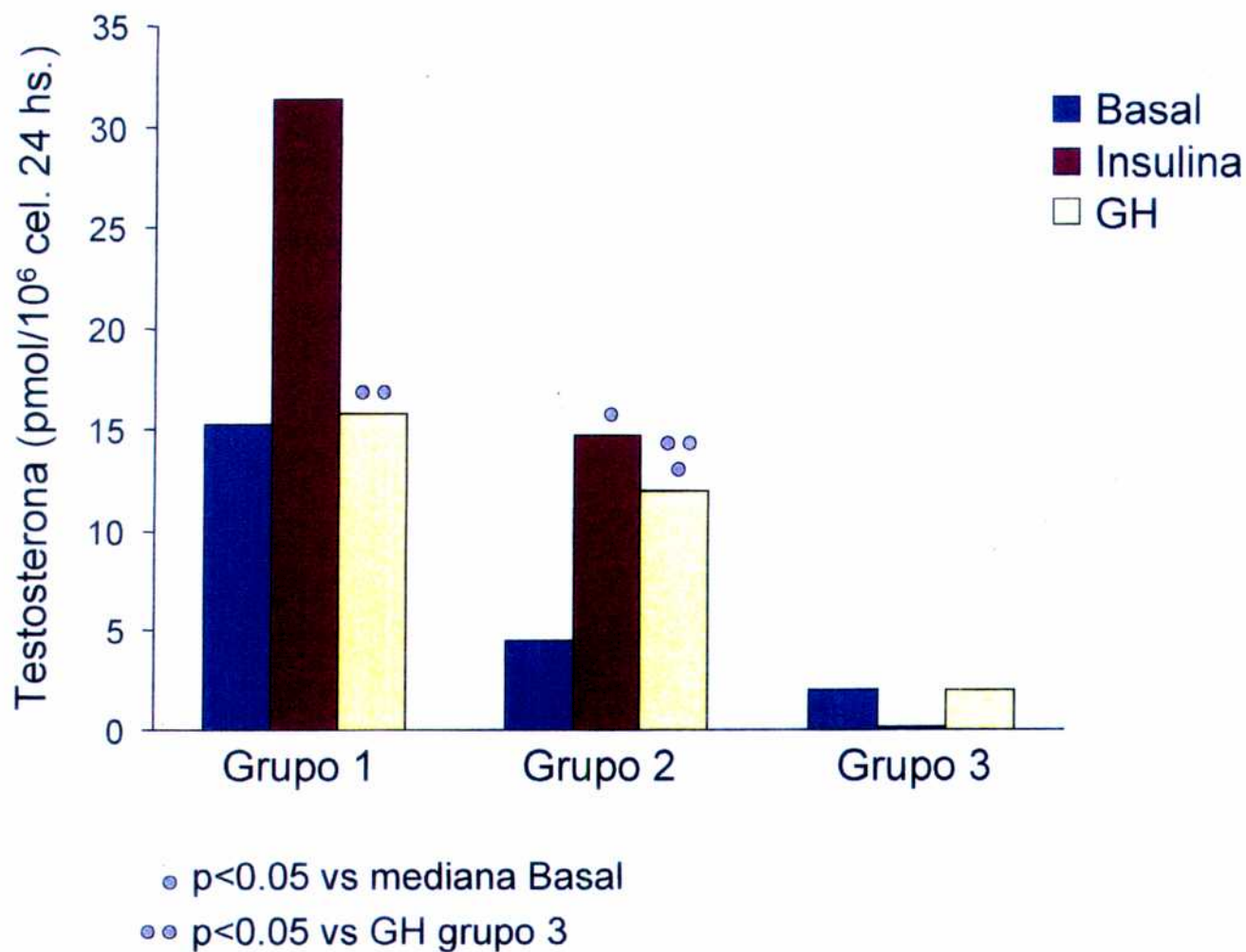


Figura 7-1 Secreción de testosterona basal y bajo estímulo crónico de insulina (50 ng/ml) y de GH (50 ng/ml) al día 6 de cultivo. Comparación entre los grupos 1, 2 y 3. Datos expresados como medianas, en pmol/10⁶ cel. 24hs

Efecto del IGF-1 en los 4 grupos etarios

Se analizó el efecto de la estimulación crónica con IGF-1 sobre : 1) la proliferación celular, 2) la secreción de testosterona y 3) la respuesta a LH.

Con el objeto de analizar si la estimulación crónica con IGF-1 aumentaba el número de células en cultivo, se analizó el número de células viables al finalizar el cultivo (día 6) en condición basal y bajo IGF-1, en 4 cultivos del grupo 1, 6 cultivos del grupo 2 y 5 cultivos del grupo 3. No se observaron cambios significativos en el número de células viables bajo IGF-1 respecto de la condición basal, tabla 7-E.

Se estudió el efecto de la estimulación crónica con IGF-1 sobre la secreción de testosterona en ausencia de gonadotrofinas para los grupos 1, 2, 3 y 4. Para el grupo 1 se observa que la testosterona aumenta significativamente en 4 de 4 cultivos (tabla 7-F), para el grupo 2, en 8 de 8 cultivos (tabla 7-G) y para el grupo 3, en 4 de 5 cultivos (tabla 7-H).

Para el análisis de los datos se calculó el logaritmo decimal de los valores de secreción de testosterona, así se normatizaron los datos y se calculó la media y la desviación estandar para los grupos 1, 2 y 3 tanto en condición basal como en presencia de IGF-1 y de LH. En la figura 7-2 se observa que el IGF-1 estimuló significativamente la secreción de testosterona en los tres grupos. Como ya se había observado el estímulo con LH sólo fue significativo en el grupo 2.

Tabla 7-E Efecto del IGF-1 (50 ng/ml) sobre la proliferación celular. Datos expresados como número de células viables (10^4 , $x \pm DS$ de n cultivos) al día 6 de cultivo

<u>GRUPO</u>	<u>BASAL</u>	<u>IGF-1</u>
1 (n=4)	57.5 $\pm$ 59.7	39.7 $\pm$ 30.1**
2 (n=6)	43.3 $\pm$ 31.6	42.3 $\pm$ 38.6**
3 (n=5)	55.6 $\pm$ 33.9	57.5 $\pm$ 50.6**

** no significativo vs Basal (ANOVA y Bonferroni)
n= número de cultivos

Tabla 7-F Grupo 1: Testosterona basal y respuesta a IGF-1 (50 ng/ml) al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$, en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>IGF-1</u>
Ra1d	1.46 $\pm$ 0.33	6.99 $\pm$ 1.92*
Fe4d	6.02 $\pm$ 1.72	25.2 $\pm$ 2.67*
A5d	147 $\pm$ 20.0	366 $\pm$ 6.01*
Vi6d	<u>14.9 $\pm$ 4.82</u>	<u>62.5 $\pm$ 5.94*</u>
Mediana	15.2	43.8**

* $p < 0.05$ vs Basal (ANOVA y Bonferroni)

** $p < 0.05$ vs mediana Basal (test de Wilcoxon)

Tabla 7-G Grupo 2: Testosterona basal y respuesta a IGF-1 (50 ng/ml) al día 6 de cultivo.
Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$, en $\text{pmol}/10^6\text{cel.24hs}$

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>IGF-1</u>
Gi1m	83.3 ± 11.9	$106 \pm 0.50^*$
Za1m	7.15 ± 2.04	$106 \pm 0.50^*$
Go3m	3.54 ± 0.04	$9.45 \pm 0.45^*$
Di3m	4.45 ± 0.54	$123 \pm 6.64^*$
Ch5m	4.04 ± 0.95	$139 \pm 20.4^*$
Gi7m	2.23 ± 0.56	$10.4 \pm 1.90^*$
Th7m	31.3 ± 4.95	$74.8 \pm 4.50^*$
Ca9m	<u>8.93 ± 4.00</u>	<u>$80.2 \pm 11.6^*$</u>
Mediana	5.80	77.5**

* $p < 0.05$ vs Basal (ANOVA y Bonferroni)

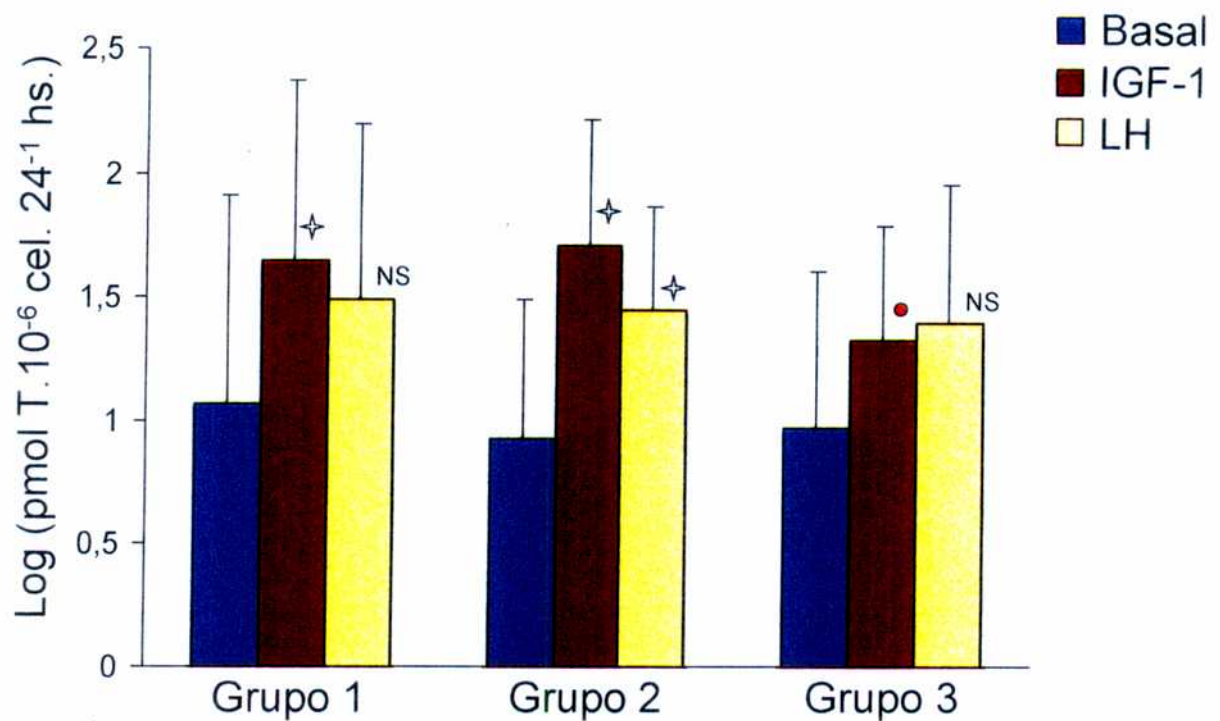
** $p < 0.05$ vs mediana Basal (test de Wilcoxon)

Tabla 7-H Grupo 3: Testosterona basal y respuesta a IGF-1 (50 ng/ml) al día 6 de cultivo.
Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$, en $\text{pmol}/10^6\text{cel.24hs}$

<u>Cultivo</u>	<u>Basal</u>	<u>IGF-1</u>
Ur16m	1.39 ± 0.10	$3.50 \pm 1.00^*$
He20m	6.15 ± 0.96	7.90 ± 0.79
Ro24m	2.78 ± 0.86	$9.01 \pm 2.25^*$
Mo33m	<u>2.18 ± 0.21</u>	<u>$13.8 \pm 1.4^*$</u>
Mediana	2.48	8.45**

* $p < 0.05$ vs Basal (ANOVA y Bonferroni)

** $p < 0.05$ vs mediana Basal (test de Wilcoxon)



✦ P=0.003 vs Basal (Test de muestras apareadas)

• p=0.05 vs Basal

NS : No significativo vs Basal

Figura 7-2 Secreción de testosterona basal y bajo estímulo crónico de IGF-1 (50 ng/ml) al día 6 de cultivo. Comparación entre los grupos 1, 2 y 3. Datos expresados como $\bar{x} \pm DS$, en Log (pmol T / 10^6 cel. 24hs)

Efecto del pretratamiento crónico con IGF-1 sobre la respuesta a LH

Con el fin de estudiar el efecto del IGF-1 sobre la respuesta de las células al estímulo de 24 horas con LH, células testiculares prepúberes humanas pretratadas crónicamente con IGF-1 (50 ng/ml) ó con insulina (50 ng/ml) fueron sometidas a 24 horas de estímulo con LH. La secreción de testosterona en el medio condicionado bajo estas condiciones experimentales se estudió en 3 cultivos de células testiculares de niños cuyas edades eran 6 días, 1 mes y 5 meses (grupos 1 y 2). La tabla 7-I ilustra los resultados obtenidos. Se puede observar que el pretratamiento con IGF-1 resulta en un aumento significativo de la respuesta a LH con respecto a la condición basal mientras que el pretratamiento con insulina no muestra cambios en la respuesta a LH.

En resumen, la estimulación crónica con IGF-1 en células testiculares humanas prepúberes aumentó la secreción de testosterona e incrementó la respuesta de las células a LH aunque no se observó un aumento en el número de células viables en el cultivo.

En dos cultivos de edad puberal en los que no se observó un aumento de la testosterona bajo GH ni bajo insulina se estudió el efecto de la estimulación crónica con IGF-1 (50 ng/ml) sobre la secreción de testosterona, observándose un aumento significativo de la testosterona bajo IGF-1 (tabla 7-J).

Los datos presentados sugieren que en la regulación de la esteroidogénesis testicular humana prepúber factores tales como la insulina y el IGF-1 jueguen un rol importante no sólo incrementando la capacidad esteroidogénica de las células en cultivo sino también aumentando la habilidad de las células de responder al estímulo con LH.

Tabla 7-I Respuesta al estímulo de 24 horas con LH (10 ng/ml) en células preincubadas 4 días con IGF-1 (50 ng/ml) o con insulina (50 ng/ml). Testosterona expresada como $x \pm DS$, en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Paciente</u>	<u>Grupo</u>	<u>Basal + LH</u>	<u>Insulina + LH</u>	<u>IGF-1 + LH</u>
Vi6d	1	21.7 ± 0.16	40.0 ± 4.29	$98.8 \pm 10.5^*$
Gi1m	2	17.8 ± 3.10	45.0 ± 10.5	$198 \pm 15.0^{*,**}$
Ch5m	2	10.8 ± 0.40	5.65 ± 2.70	$51.4 \pm 7.70^*$

* $p < 0.05$ vs Basal + LH (ANOVA y Bonferroni)

** $p < 0.05$ vs Insulina + LH (ANOVA y Bonferroni)

Tabla 7-J Grupo 4: Testosterona basal y respuesta a IGF-1 (50 ng/ml) al día 6 de cultivo. Dentro de cada cultivo los datos están expresados como $x \pm DS$, en pmol/ 10^6 cel.24hs

<u>Condición</u>	<u>Basal</u>	<u>IGF-1</u>
Lu15a	11.3 ± 3.96	$24.1 \pm 4.98^*$
Al15a	34.3 ± 0.66	$159 \pm 2.46^*$

* $p < 0.05$ vs Basal (ANOVA y Bonferroni)

8.- PRESENCIA DE INHIBINA-B

Con el fin de identificar la capacidad secretora de células de Sertoli en los cultivos primarios mixtos de células testiculares humanas se estudiaron los niveles de inhibina-B en los medios condicionados de 28 cultivos correspondientes a los cuatro grupos de edad al día 6 de cultivo. Las tablas 8-A y 8-B resumen los datos de cada cultivo de inhibina-B basal mientras que en la figura 8-1 se representa las medias y el error estándar de los cuatro grupos. Se observa que la secreción basal de inhibina-B es 575 ± 39.4 (pg/10⁶cel.24hs, $\bar{x} \pm ES$) en el grupo 1, 400 ± 38.6 en el grupo 2, 63.4 ± 7.03 en el grupo 3 y 237 ± 48.8 en el grupo 4. El valor de inhibina-B en el grupo 3 resultó ser significativamente menor que el del resto de los grupos (test de t).

El análisis de regresión lineal entre los niveles de inhibina-B y los de testosterona en condiciones basales para los 28 cultivos estudiados permite observar una correlación positiva $r = 0.583$ y significativa con una $p < 0.001$ (Figura 8-2).

Por otra parte en el grupo 2, se observa que la estimulación crónica con LH no aumenta significativamente los niveles de inhibina-B respecto de la basal mientras que la estimulación crónica con FSH aumenta significativamente la secreción de inhibina-B con una $p < 0.025$ (test de t para muestras apareadas) (Figura 8-3).

Se puede concluir que la inhibina-B es producida por células testiculares humanas prepúberes en cultivo. Similar a lo observado *in vivo*, la inhibina-B en condiciones *in vitro* disminuye con la edad durante los primeros años de vida. La estimulación crónica con FSH incrementa la secreción de inhibina-B en células testiculares humanas prepúberes de los primeros meses de edad. La falta de respuesta a LH observada *in vitro* sugiere que en los primeros meses de vida probablemente sólo la FSH estimule la síntesis de inhibina-B. La inhibina-B podría ser considerada un marcador de células de Sertoli inmaduras *in vitro*. La correlación observada entre la secreción de testosterona y la de inhibina-B sugiere una activación paralela de la función de las células de Leydig y de Sertoli durante el primer semestre de vida postnatal en ausencia de desarrollo espermatogénico.

Tabla 8-A Niveles basales de inhibina-B en medios condicionados de cultivos de grupos 1 y 2 (datos expresados como $x \pm DS$, en $pg/10^6 cel.24hs$)

<u>GRUPO</u>	<u>CULTIVO</u>	<u>EDAD</u> (días)	<u>INHIBINA-B</u>
1	Ra1d	1	465 ± 105
	Ap1d	1	412 ± 53
	Fe4d	4	437 ± 260
	Ac5d	5	872 ± 475
	Vi6d	6	225 ± 4.54
	Va8d	8	611 ± 61
	Ca9d	9	1007 ± 242

<u>GRUPO</u>	<u>CULTIVO</u>	<u>EDAD</u> (meses)	<u>INHIBINA-B</u>
2	Va21d	0.63	275 ± 22
	Gi1m	1	873
	Te1.5m	1.5	282 ± 60.8
	Or1.5m	1.5	286 ± 60.4
	Ov2m	2	225 ± 58.5
	Er2m	2	298 ± 109
	Di3m	3	143 ± 23.8
	Ch5m	5	107 ± 5.03
	Ma6m	6	1110 ± 186

Tabla 8-B Niveles basales de inhibina-B en medios condicionados de cultivos de grupos 3 y 4 (datos expresados como $x \pm DS$, en $pg/10^6 cel.24hs$)

<u>GRUPO</u>	<u>CULTIVO</u>	<u>EDAD</u> (meses)	<u>INHIBINA-B</u>
3	Qu12m	12	<15
	Va18m	18	<15
	Go21m	21	101 ± 9.86
	Mi22m	22	85.1 ± 20.2
	Mi33m	33	184 ± 56.5
	Se36m	36	<15
	Ar36m	36	<15
	Ri41m	41	<15
	Ch84m	84	126
<u>GRUPO</u>	<u>CULTIVO</u>	<u>EDAD</u> (años)	<u>INHIBINA-B</u>
4	Fe14a	14	349 ± 301
	Al15a	15	291 ± 30
	Lu15a	15	71.4 ± 17

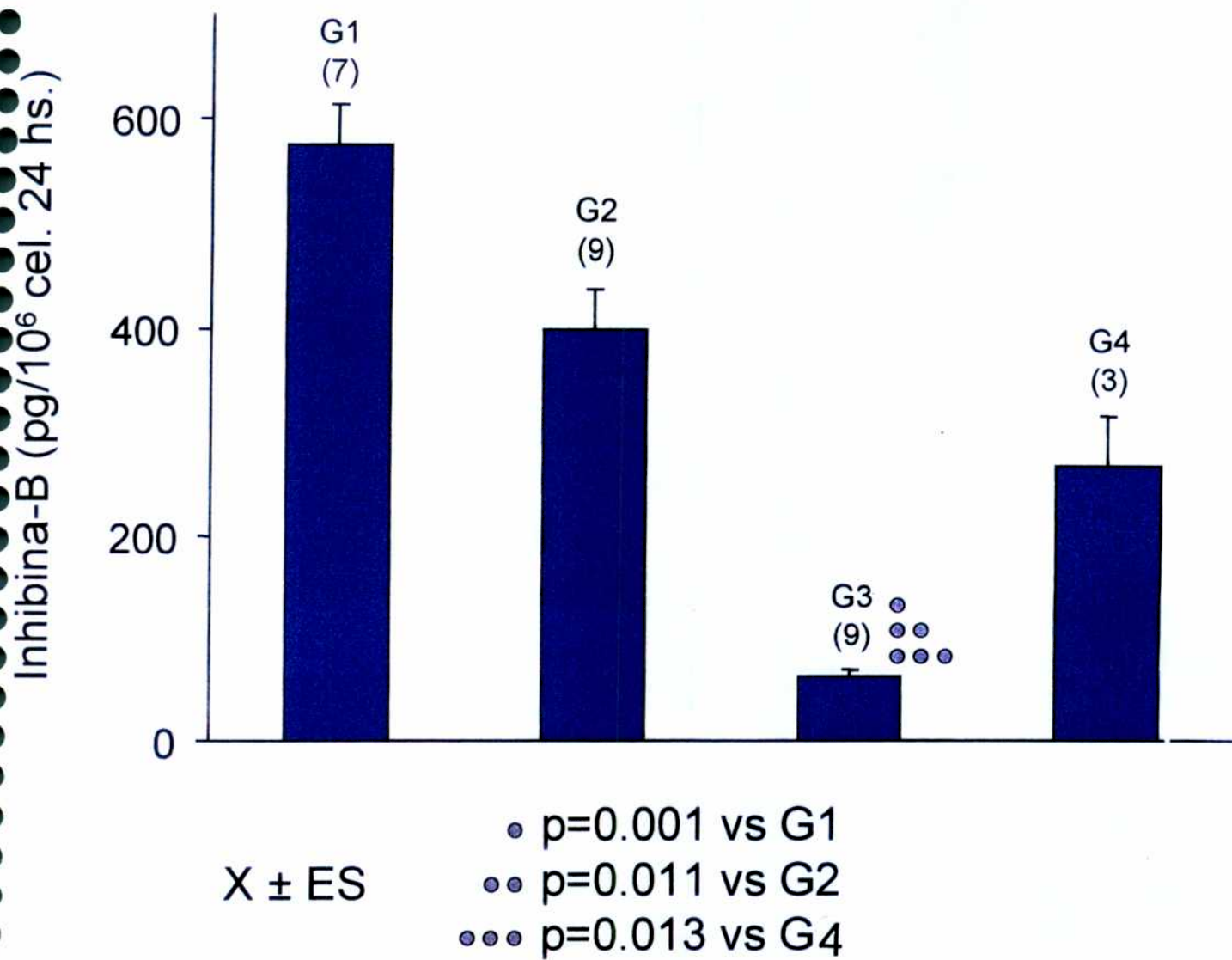


Figura 8-1 Secreción de inhibina-B basal en los cuatro grupos etarios. Datos expresados como $x \pm ES$, en $pg/10^6$ cel. 24hs. Datos entre paréntesis : número de cultivos estudiados

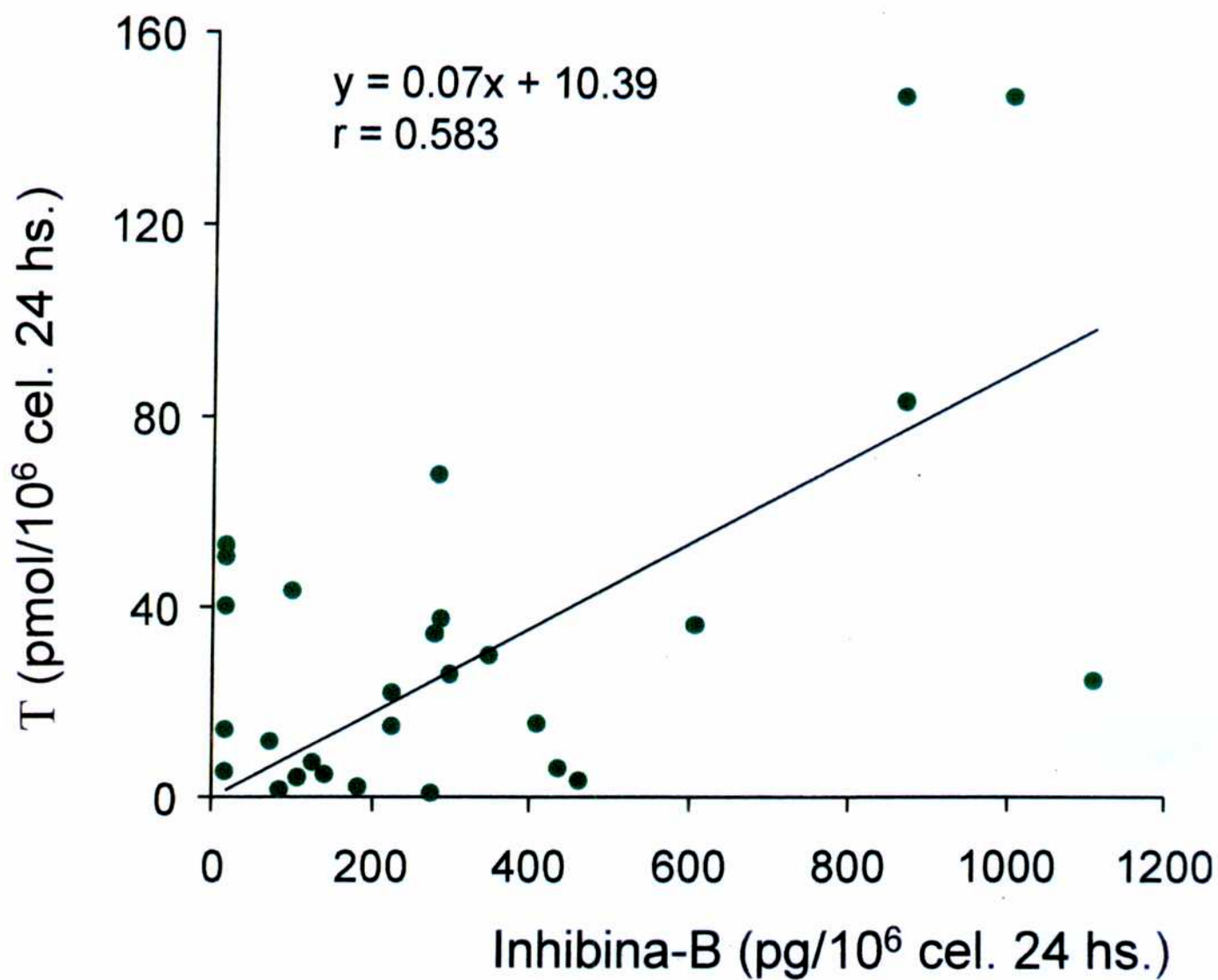


Figura 8-2 Análisis de regresión lineal entre la secreción basal de inhibina-B (pg/10⁶cel.24hs) y la de testosterona, pmol/10⁶cel.24hs) en los cuatro grupos etarios. Cada punto corresponde a la x de triplicados de cada cultivo

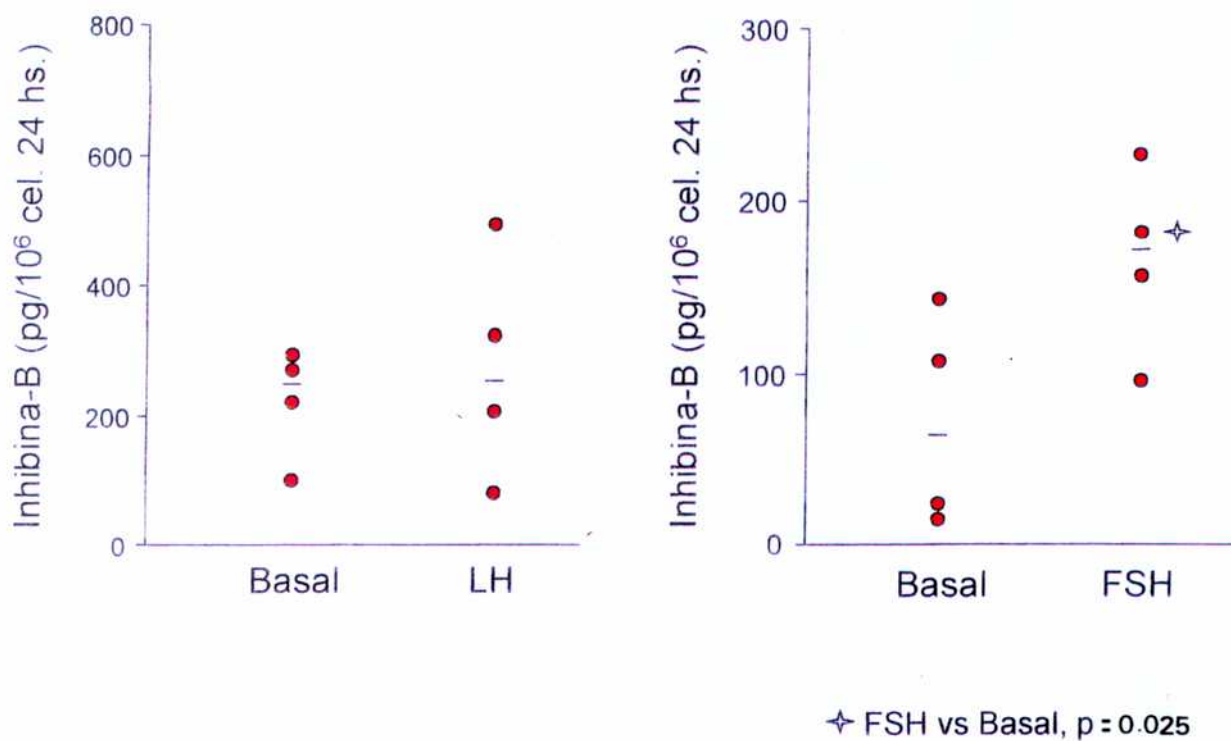


Figura 8-3 Secreción de inhibina-B bajo estímulo crónico de LH y de FSH en el grupo 2. Cada punto corresponde a la $\bar{x} \pm DS$ de triplicados de cada cultivo, en $\text{pg}/10^6 \text{ cel. } 24 \text{ hs.}$ La línea horizontal corresponde a la mediana.

9.- DESARROLLO DEL MÉTODO DE REPIQUES Y CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS TESTICULARES HUMANAS

Las células testiculares humanas prepúberes constituyen un material biológico difícil de conseguir. Con el objeto de contar con material de cultivo permanente como fuente de estudio sobre la esteroidogénesis testicular prepuberal humana y la modulación de la misma, se desarrolló la técnica de subcultivos y congelación de células.

Subcultivos

El estudio de 5 subcultivos a partir del cultivo primario de testículo de un paciente del grupo 2 (Za1m) se llevó a cabo como se describe en material y métodos. Brevemente, al décimo día de cultivo primario, se digiere con tripsina y se siembra el subcultivo 1 (Za1msub1). El subcultivo 1, al cabo de 10 días, se somete a la acción de tripsina y se siembra el subcultivo 2 (Za1msub2). Al día 12 de cultivo se obtiene el subcultivo 3, el cual se digiere con tripsina al día 6 para obtener el subcultivo 4. Al sexto día de cultivo del subcultivo 4 se somete a la acción de la tripsina y se siembra el subcultivo 5. En el segundo y quinto subcultivo se realiza un esquema de estimulación crónica con insulina (5 µg/ml), LH y FSH, guardando el medio condicionado del día 6 para la determinación de testosterona por radioinmunoensayo. La figura 9-1 ilustra el aspecto del subcultivo 2 al sexto día de cultivo.

La tabla 9-A ilustra la secreción de testosterona en condición basal y bajo estímulo crónico con insulina, FSH y LH en el cultivo primario y en los subcultivos 2 y 5. La secreción basal de testosterona aumenta bajo los estímulos en el cultivo primario, como se ha descrito. En el subcultivo 2 se observa que la secreción de testosterona se mantiene pero no varía en presencia de los estímulos con respecto a la condición basal. En el subcultivo 5, sorprendentemente, la secreción de testosterona persiste y aumenta bajo LH y FSH respecto de la condición basal. Estos resultados indicarían la presencia de células esteroidogénicamente activas que perduran a lo largo de los subcultivos y que poseen capacidad de responder a las gonadotrofinas.

Tabla 9-A Secreción de testosterona en condición basal y bajo estímulo crónico con insulina (5 $\mu\text{g/ml}$), FSH (2 ng/ml) y LH (10 ng/ml) en el cultivo primario (CP) y en los subcultivos 2 y 5 de un paciente de 1m (Za1m). Datos expresados como $\bar{x} \pm \text{DS}$ en $\text{pmol}/10^6\text{cel.24hs}$

	<u>Basal</u>	<u>Insulina</u>	<u>FSH</u>	<u>LH</u>
CP Za1m	7.15 ± 2.04	$69.6 \pm 20.8^*$	$40.4 \pm 4.66^*$	$30.3 \pm 2.57^*$
Za1msub2	1.45 ± 0.48	1.83 ± 0.20	2.77 ± 0.30	3.19 ± 0.30
Za1msub5	2.05 ± 0.49	2.77 ± 0.30	$11.8 \pm 4.40^*$	$11.8 \pm 4.0^*$

* $p < 0.05$ vs Basal respectivo (ANOVA y Bonferroni)

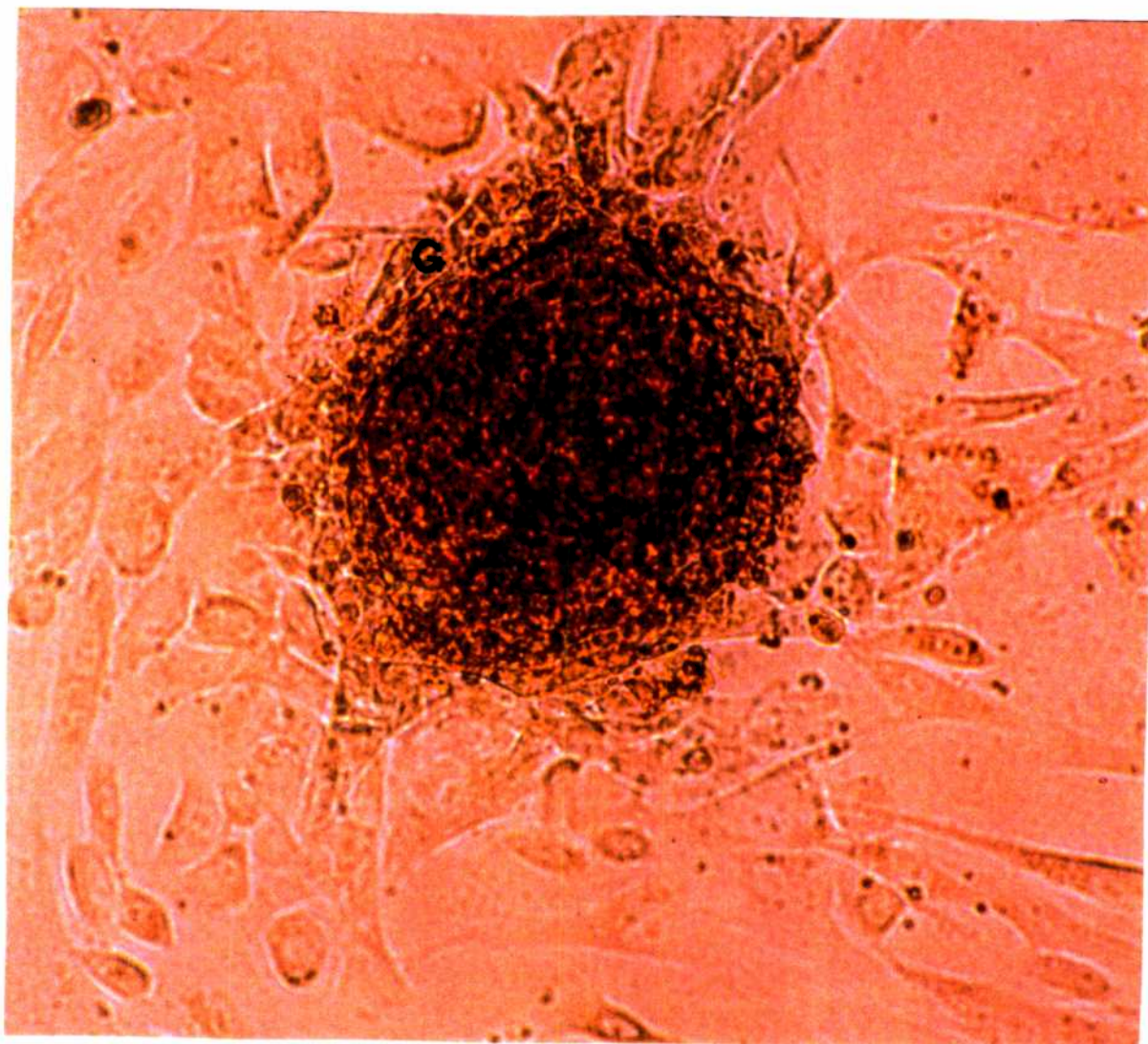


Figura 9-1 Microfotografía del subcultivo 5 de un paciente del grupo 2 (Za1msub5) Se observa un grumo de células (G) a partir del cual se expanden células fibroblásticas. Aspecto semejante al cultivo primario (128 x)

A partir de un cultivo primario de un paciente de 2 meses de edad (Ov2m) se realizaron 2 subcultivos, a los 10 días de cultivo cada uno. La secreción de testosterona en el subcultivo 2 fue no detectable. Con el objeto de evaluar la capacidad esteroidogénica del subcultivo se estudió la secreción de progesterona, 17 hidroxiprogesterona, androstenediona, precursores de testosterona. Los resultados (tabla 9-B) indican un descenso significativo de la secreción de esteroides en condición basal con respecto al cultivo primario. En presencia de IGF-1 (50 ng/ml) se observó un aumento que no alcanzó a ser significativo respecto del basal. Ante la posibilidad de que las células hubieran perdido la capacidad de síntesis de pregnenolona a partir del colesterol, se agregó pregnenolona (P5) a una concentración de 0.6 $\mu\text{mol/L}$. En presencia de pregnenolona se observó un aumento significativo de la progesterona, pero no se observaron cambios en los valores de 17 hidroxiprogesterona ni de androstenediona ni de testosterona. Sin embargo, la combinación pregnenolona e IGF-1 indujo un aumento significativo de la 17 hidroxiprogesterona y de la androstenediona. En la figura 9-2 se puede apreciar la microfotografía del subcultivo 2 de este paciente. Se observan grumos celulares desde los que se expanden, centrífugamente, células de tipo fibroblástico con un aspecto que semeja a un cultivo primario. Se observan imágenes de células en mitosis (telofase tardía).

Los resultados presentados parecen sugerir que el descenso de la secreción de esteroides observado en el subcultivo 2 es debido a la falta de precursor (colesterol o pregnenolona) ya que al ser agregado precursor exógeno aparecen esteroides en el medio de cultivo. Al parecer la actividad 3 β -HSD se mantiene como se observa al colocar pregnenolona. En cambio la actividad de la enzima P450c17 se estimularía en presencia de IGF-1.

Tabla 9-B Secreción de progesterona, 17 hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona en condición basal en el cultivo primario (CP) y en el subcultivo 2 (sub2) de un paciente de 2 meses de edad (Ov2m). Efecto de la pregnenolona (0.6 μ mol/L) y del IGF-1 (50 ng/ml) en el sub2. Datos expresados como $x \pm DS$ en pmol/ 10^6 cel.24hs

		<u>Progesterona</u>	<u>17OHprogesterona</u>	<u>Androstenediona</u>	<u>Testosterona</u>
CP Ov2m	Basal	15.9 $\pm$ 1.6	91.3 $\pm$ 9.73	6.8 $\pm$ 0.53	22.1 $\pm$ 0.64
Ov2msub2	Basal	0.70 ^a	0.27 $\pm$ 0.18 ^a	0.35 ^a	del ^a
	IGF-1	0.92 $\pm$ 0.8 ^a	4.49 $\pm$ 2.34 ^a	1.41 $\pm$ 0.58 ^a	del ^a
	P5	42.4 $\pm$ 17.8 ^b	5.67 $\pm$ 2.3 ^a	0.35 ^a	del ^a
	IGF-1+P5	39.2 $\pm$ 9.44 ^b	46 $\pm$ 18 ^{b c}	4.65 $\pm$ 2.36 ^d	del ^a

^a p<0.05 vs CP Ov2m, Basal

^b p<0.05 vs Ov2msub2, Basal e IGF-1

^c p<0.05 vs Ov2msub2, P5

^d p<0.05 vs Ov2msub2, Basal y P5

del : valor no detectable

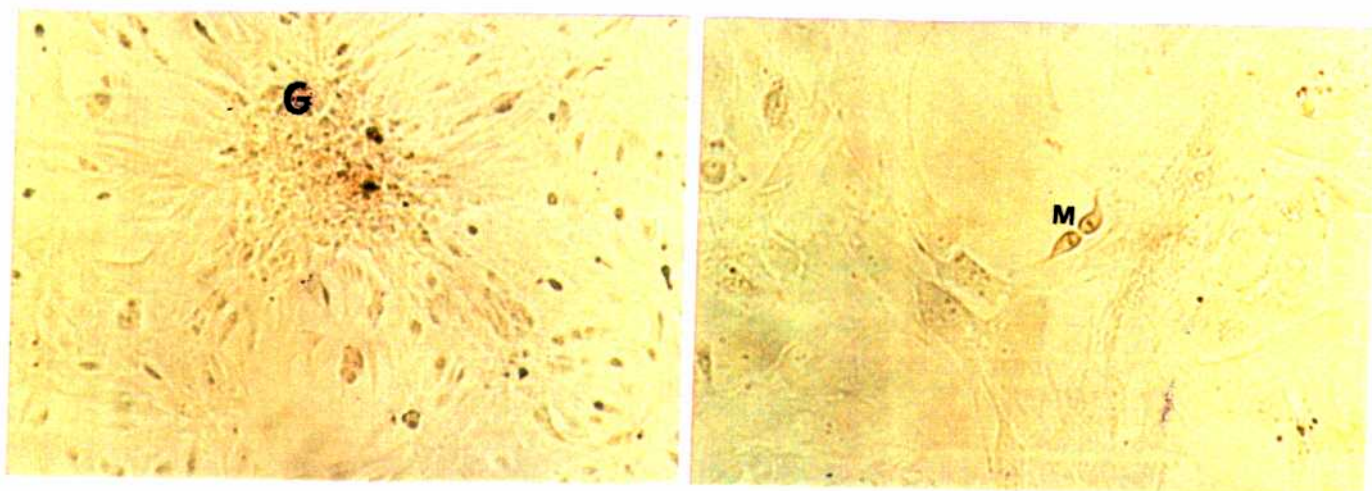


Figura 9-2 Microfotografías del subcultivo 2 de un paciente de 2 meses (Ov 2msub2). Panel izquierdo : grumo celular (G) y células de tipo fibroblástico en expansión centrífuga (20 x). Panel derecho: imagen de mitosis (M) (50 x)

A partir del cultivo primario de un paciente puberal (Lu15a) se realizaron 4 subcultivos, de 6 días de cultivo cada uno. La microfotografía del primer subcultivo permite observar grumos con expansiones de células fibroblásticas, células vacuoladas y células ramificadas (figura 9-3). La secreción de esteroides a lo largo de los subcultivos se ilustra en la tabla 9-C. Se observa que en condiciones basales la secreción de 17 hidroxiprogesterona y de testosterona del subcultivo 1 no fue diferente de la del cultivo primario. En cambio, en el subcultivo 2 los valores no fueron detectables en condición basal pero aumentaron en presencia de IGF-1 (50 ng/ml). En el subcultivo 3 no se detectaron esteroides en condición basal ni bajo IGF-1, en cambio, en presencia de 10 μ mol/L de colesterol (C) se detectaron progesterona y 17 hidroxiprogesterona, pero no testosterona. En el medio condicionado del subcultivo 4 sólo se detectó progesterona en presencia de colesterol. Estos resultados indicarían que a lo largo de los subcultivos se perdería la capacidad de sintetizar *de novo* el colesterol o bien que se consumen las reservas intracelulares de colesterol. Sin embargo permanecen activas algunas de las enzimas de la esteroidogénesis, al menos 3 β -HSD y P450_{scc}, y en el presente cultivo, hasta el subcultivo 2, P450_{c17} y 17 β -HSD.

Tabla 9-C. Secreción de esteroides (expresada como $X \pm DS$ de triplicados de cada cultivo, en pmol/10⁶cel.24hs) a lo largo de 4 subcultivos del paciente puberal Lu15a. Efecto del colesterol (C, 10 μ mol/L) y del IGF-1 (50 ng/ml)

		<u>Progesterona</u>	<u>17hidroxiprogesterona</u>	<u>Testosterona</u>
CP Lu15a	Basal	6.66 $\pm$ 1.88	65.1 $\pm$ 23.1	5.90 $\pm$ 2.46
Lu15asub1	Basal	1.23 $\pm$ 0.10	55.2 $\pm$ 0.50 **	20.8 $\pm$ 2.40 **
Lu15asub2	Basal	del	del	del
	IGF-1	2.31 $\pm$ 0.29 ^a	19.8 $\pm$ 3.3 ^a	16.7 $\pm$ 0.73 ^a
Lu15asub3	Basal	del	del	del
	IGF-1	del	del	del
	C	3.63 $\pm$ 0.16 ^b	5.81 $\pm$ 0.58 ^b	del
Lu15asub4	Basal	del	del	del
	IGF-1	del	del	del
	C	1.96 $\pm$ 0.20 ^c	del	del

del : valores no detectables

** no significativo vs CP LU15a

^a p<0.05 vs Lu15asub2, Basal

^b p< 0.05 vs Lu15asub3, Basal e IGF-1

^c p<0.05 vs Lu15asub4, Basal e IGF-1

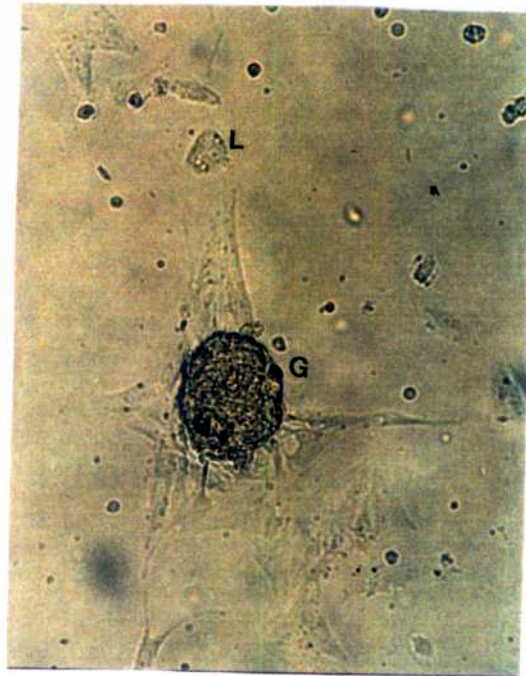


Figura 9-3 Microfotografía del subcultivo 1 de un paciente puberal (Lu15asub1). Grumo (G) con expansiones de células fibroblásticas, células con vacuolas de tipo esteroidogénica (L) (20 x)

Criopreservación

A partir del cultivo primario de un paciente de 9 meses de edad (Ca9m) se realizó un subcultivo el día 10 de cultivo. Este subcultivo 1 (Ca9msub1) fue estimulado crónicamente con IGF-1 (50 ng/ml). Bajo estas condiciones de estimulación se observó un aumento de androstenediona y de testosterona en el medio condicionado del día 6 (Tabla 9-D). El subcultivo 1 fue digerido con tripsina y congelado como se describe en materiales y métodos. El primer subcultivo descongelado (llamado Ca9msub1crio1) se incubó en condiciones basales y bajo IGF-1. No se detectaron esteroides en el medio condicionado de este subcultivo (tabla 9-D) ni de los 5 subcultivos siguientes (datos no mostrados). Finalmente en el Ca9msub1crio6 se agregó colesterol (10 $\mu\text{mol/L}$) ó pregnenolona (0.6 $\mu\text{mol/L}$) ambos precursores junto con IGF-1. En la tabla 9-D se observan los datos de la secreción de esteroides en el cultivo criopreservado en presencia de precursores. Tanto en presencia de colesterol como de pregnenolona, bajo IGF-1, se detectaron progesterona, 17 hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona, indicando la presencia de células esteroidogénicamente activas. Se observó un aumento significativo de progesterona y de testosterona en presencia de pregnenolona e IGF-1 respecto de colesterol e IGF-1. En la figura 9-4 se puede observar una microfotografía del Ca9msub1crio6, compuesto por células estrelladas y de aspecto fibroblástico aunque no por grumos de células poligonales. Se concluye que la técnica de subcultivo y la de almacenamiento de células congeladas puede ser útil para conservar material celular y estudiar la respuesta a estímulos bajo ciertas condiciones experimentales que deben estar bien controladas.

Tabla 9-D Secreción de esteroides antes y después de la criopreservación a partir de un cultivo de un paciente de 9 meses de edad. Efecto del colesterol (C, 10 $\mu\text{mol/L}$) de la pregnenolona (P5, 0.6 $\mu\text{mol/L}$) y del IGF-1 (50 ng/ml). Datos expresados como $x \pm \text{DS}$, en $\text{pmol}/10^6\text{cel.24hs}$

		<u>Progesterona</u>	<u>17OHP4</u>	<u>Androstenediona</u>	<u>Testosterona</u>
CP Ca9m	Basal	18.0 ± 0.03	42.3 ± 6.80	10.0 ± 1.87	11.5 ± 1.94
	IGF-1	3.22 ± 1.35	252 ± 48.0^a	45.3 ± 8.80^a	80.2 ± 11.6^a
Ca9msub1	Basal	0.41 ± 0.10	36.0 ± 0.45	25.4 ± 2.02	14.8 ± 0.9
	IGF-1	0.25 ± 0.01	31.4 ± 2.48	42.7 ± 1.40^b	31.5 ± 0.17^b
Ca9msub1crio1	Basal	del	del	del	del
	IGF-1	del	del	del	del
Ca9msub1crio6	C + IGF-1	4.61 ± 1.00^c	19.9 ± 2.00^c	3.78 ± 0.26^c	6.46 ± 0.11^c
	P5 + IGF-1	12.2 ± 1.55^d	12.2 ± 1.53	7.27 ± 2.25	11.2 ± 2.00^d

^a $p < 0.05$ vs CP Ca9m, Basal

^b $p < 0.05$ vs Ca9msub1, Basal

^c $p < 0.05$ vs Ca9msub1crio6, Basal y vs IGF-1

^d $p < 0.05$ vs Ca9msub1crio6, C + IGF-1

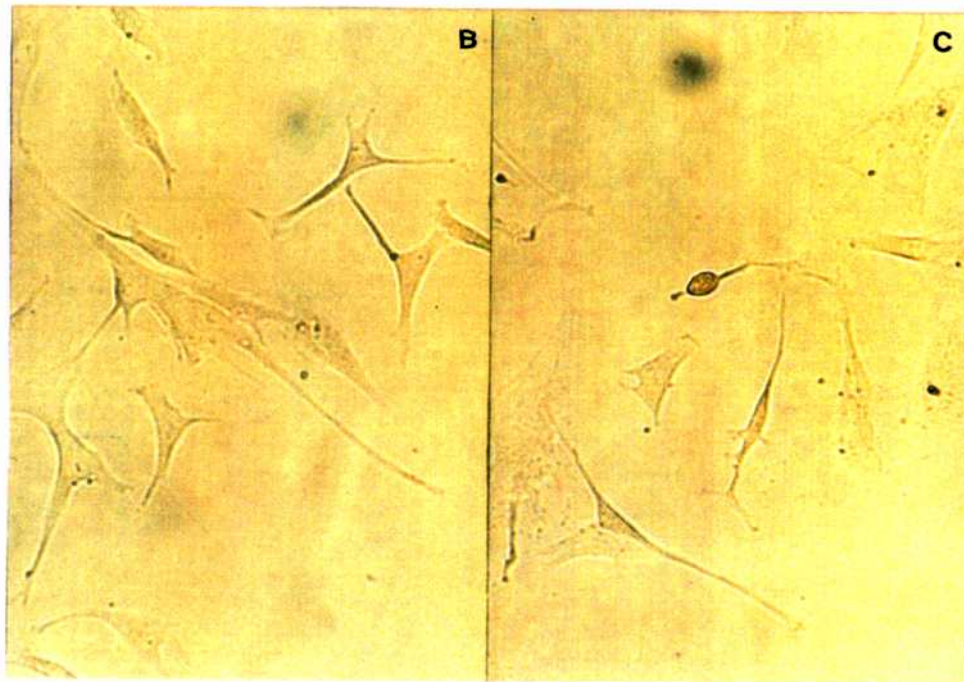


Figura 9-4 Microfotografías del sexto subcultivo post-criopreservación de un subcultivo 1 de un paciente de 9 meses (Ca9msub1crio6). Se observan células estrelladas y de aspecto fibroblástico. No se observan grumos de células poligonales. (A 20 x, B y C 50 x)

10.- ANÁLISIS DE LA ESTEROIDOGÉNESIS TESTICULAR EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS ENDOCRINAS

10 A Estudio *in vitro* de un paciente con Síndrome de Smith-Lemli-Opitz

Se llevó a cabo el cultivo primario testicular a partir de la orquidectomía del paciente con síndrome de Smith-Lemli-Opitz que presentaba ambigüedad genital para estudiar la secreción de esteroides testiculares y analizar el efecto de un inhibidor de la síntesis de colesterol que reproduce las características del síndrome en ratas (228).

Resultados clínicos

Los datos de laboratorio revelaron testosterona basal de 1.95 ng/ml (V.N. <0.5), 17 hidroxiprogesterona de 1.45 ng/ml (V.N. < 1.5), estradiol > 500 pg/ml (V.N. < 15), SO₄DHEA 759 ng/ml (rango normal 50-852), cortisol 14 µg/dl (5-25) o sea función hormonal corticosuprarrenal normal, TSH basal 6.1 mUI/ml (V.N.<5) , TSH postTRH 38 mUI/ml (V.N.<30) y tiroxina 11.9 µg/ dl (V.N.<14) es decir un leve déficit en la función tiroidea. Se realizaron exámenes complementarios que revelaron un cariotipo: 46,XY.

La evaluación de la respuesta endocrina testicular mediante el estímulo con hCG fue realizada a los 4 meses de edad y reveló una testosterona (T) basal: 1.95 ng/ml (V.N. prepuberal < 0.5) y T post hCG : 1.98 ng/ml, es decir niveles séricos de T compatibles con valores puberales pero falta de respuesta a la hCG.

Se evaluó la respuesta biológica a los andrógenos mediante el test de sensibilidad a los andrógenos (T exógena : 2 mg/Kg de peso). Se obtuvo un valor de SHBG del 43 % respecto del basal (V.N. < 80 % del basal). El descenso de la SHBG luego de la estimulación androgénica indica una adecuada respuesta biológica a los andrógenos.

Los niveles séricos de colesterol están francamente disminuidos (50 mg/dl, rango normal 125-200) mientras que el de 7 dehidrocolesterol fue de 546 µg/ml (V.N. <0.08). El incremento de los niveles séricos de 7 dehidrocolesterol confirma el diagnóstico del síndrome de Smith-Lemli-Opitz.

Resultados en cultivo

El estudio de la secreción basal de esteroides en el medio condicionado del cultivo testicular del paciente con SLOS reveló que la progesterona, la 17 hidroxiprogesterona, la testosterona y la dehidroepiandrosterona estaban significativamente incrementadas con respecto a los controles normales de la misma edad (Figura 10A-1).

El método fue validado estudiando la cinética de secreción basal de testosterona y comparándola con los cultivos control (descrito en objetivo 3). Se pudo observar un aumento de la secreción de testosterona entre el día 4 (5.10 ± 1.23) y el día 6 de cultivo (26.1 ± 11.7 pmol/ 10^6 cel.24 hs) aceptando por lo tanto que los esteroides medidos fueron sintetizados *in vitro*.

El estudio de la respuesta a los estímulos hormonales en el cultivo celular del paciente con SLOS reveló la falta de respuesta al estímulo crónico con LH en la secreción de testosterona pero un aumento significativo al estímulo crónico con FSH y con insulina (5 µg/ml). La testosterona basal, expresada en pmol/ 10^6 cel.24hs, $\bar{x} \pm DS$ fue de 26.1 ± 11.7 , con LH 18.6 ± 4.0 , con FSH $100 \pm 37.9^*$, y con insulina $118 \pm 12.9^*$ (* $p < 0.05$ vs BASAL), los resultados se aprecian en la figura 10-A2.

El estudio del efecto del inhibidor BM15766 de la enzima 7 dehidrocolesterol reductasa (7 DHC $\Delta 7$ reductasa) en un cultivo testicular control reveló que en presencia de LH el inhibidor disminuye la secreción de testosterona es decir la respuesta a LH mientras que el solvente utilizado, DMSO, no modificó los valores de testosterona bajo LH. Los datos obtenidos se pueden apreciar en la figura 10-A3 y en la tabla 10-A .

Estos resultados sugieren que en el síndrome de Smith-Lemli-Opitz la capacidad esteroidogénica testicular está conservada mientras que la respuesta al estímulo con LH estaría afectada.

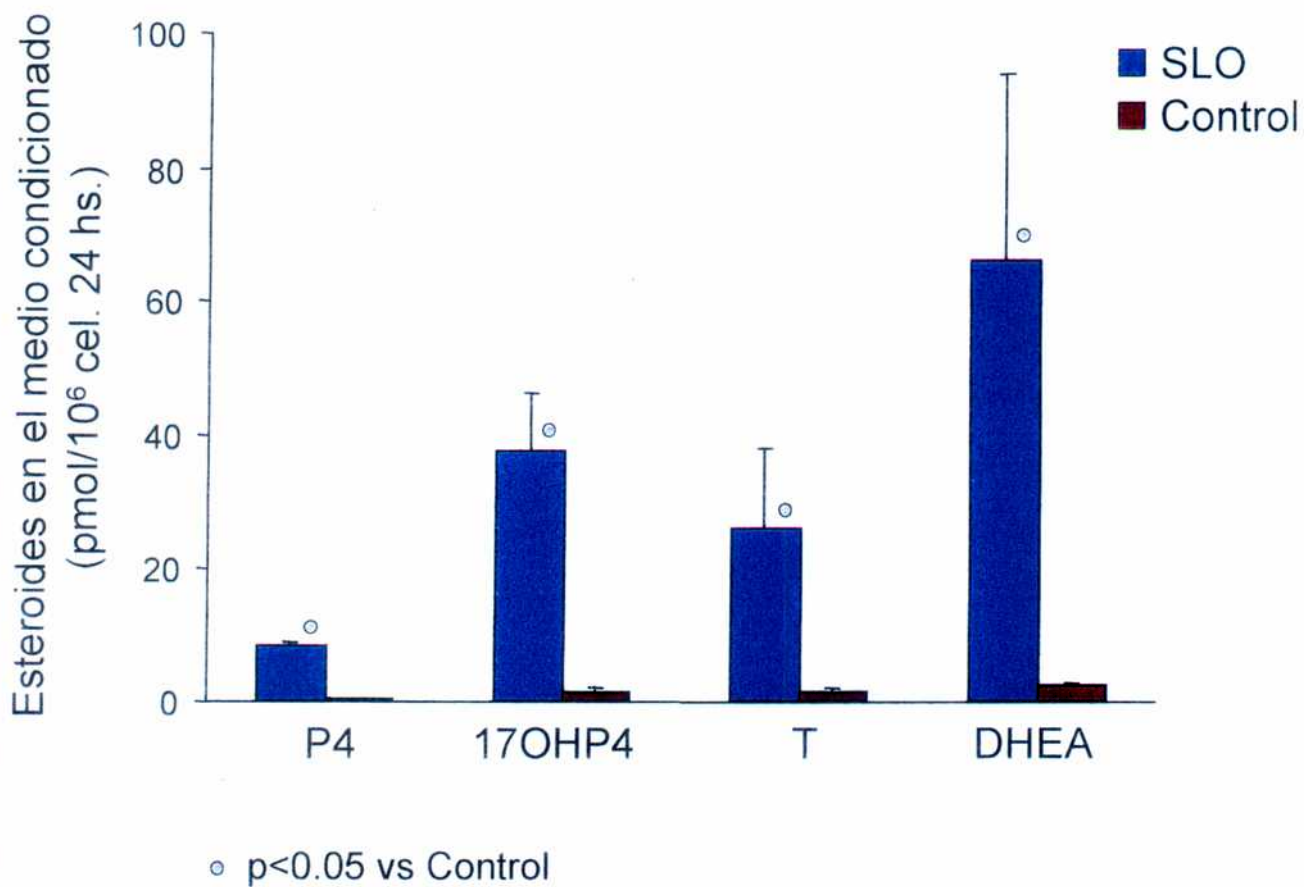


Figura 10-A1 Secreción basal de esteroides en el medio condicionado del día 6 de cultivo del paciente con SLOS (expresada como $\bar{x} \pm DS$), y de controles normales de la misma edad (expresada como $\bar{x} \pm DS$ de 4 cultivos). Datos expresados en pmol/10⁶ cel. 24hs

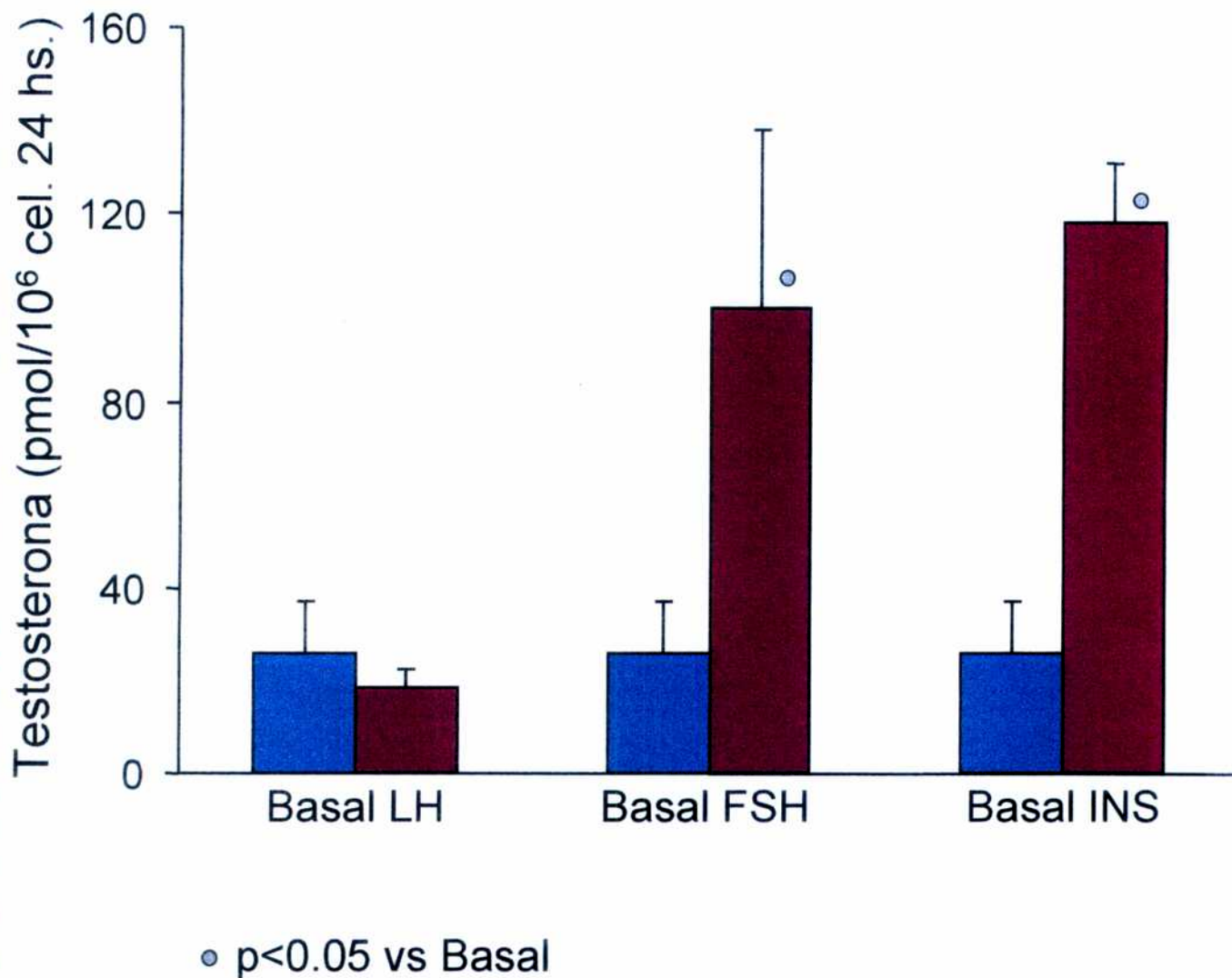


Figura 10-A2 Secreción de testosterona bajo estímulo crónico de LH, FSH e insulina (INS) a una dosis de 5 µg/ml en el cultivo del paciente con SLOS (datos expresados como $\bar{x} \pm DS$, en pmol/10⁶ cel. 24hs)

Tabla 10-A Efecto del BM15766 sobre la respuesta a LH (10 ng/ml). Datos expresados como $x \pm SD$, en pmol/ 10^6 células. 24hs

	<u>TESTOSTERONA</u>
LH	30.6 ± 3.06
LH+DMSO	27.4 ± 5.70
LH+BM15766	19.9 ± 1.35 * **

* $p = 0.011$ vs LH

** $p = 0.003$ vs LH+DMSO

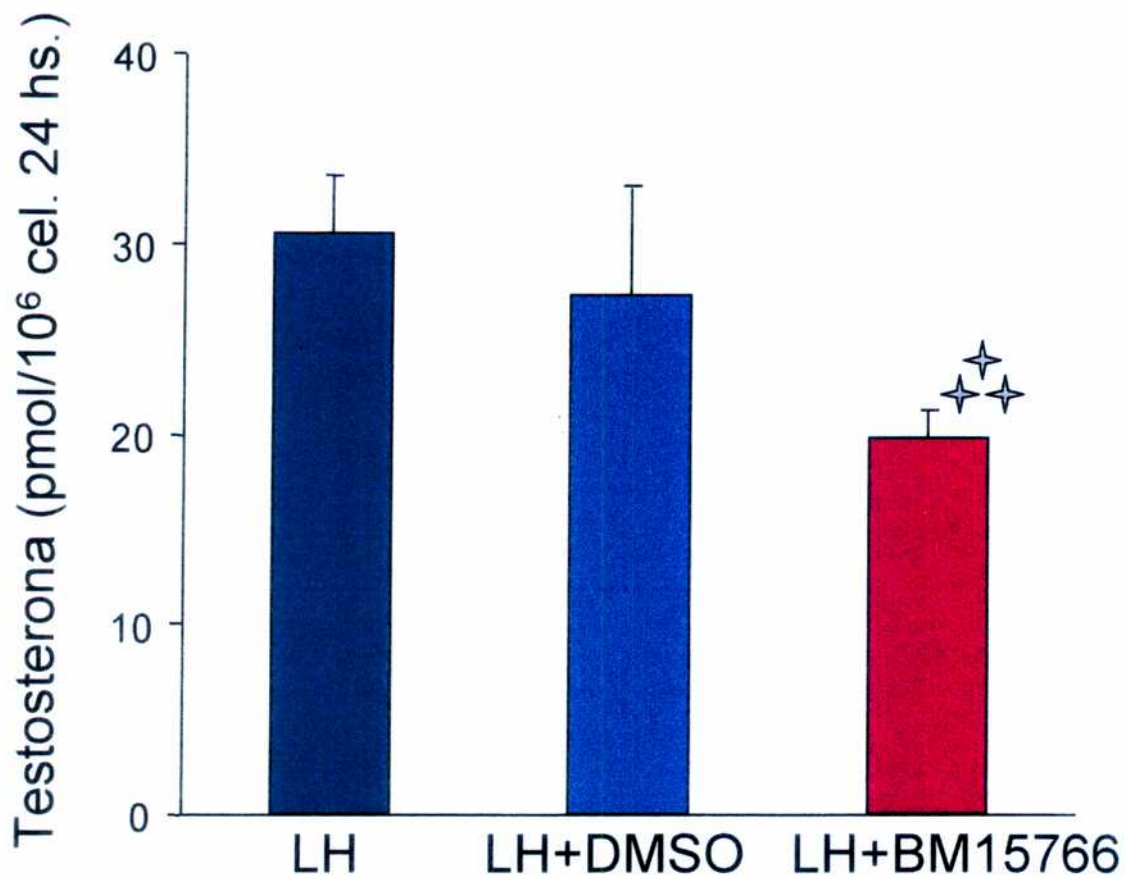


Figura 10-A3 Efecto del inhibidor BM15766 de la enzima 7DHC Δ 7 reductasa en un cultivo testicular control de 2 meses de edad sobre la secreción de testosterona bajo LH (datos expresados como $\bar{x} \pm DS$, en pmol/10⁶ cel. 24hs)

10 B- Actividad Aromatasa en un cultivo de células testiculares de un paciente prepuberal con Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos

Se estudió la secreción de testosterona y la actividad de la enzima aromatasa en condición basal y bajo estímulo de insulina en un cultivo de células testiculares de un paciente de 30 meses con síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA) y se hizo la comparación con cultivos de células testiculares de necropsia de cuatro niños sin patología endocrina, como se ha descrito en Material Clínico.

Resultados *in vitro*

En la Tabla 10- B se representan los valores de testosterona en el medio condicionado del día 6 de cultivo en condiciones basales y bajo 50 ng/ml de insulina. Se observa que bajo insulina tanto los cultivos del grupo control como el cultivo del paciente con SIA son capaces de segregar testosterona. Se estudió la actividad aromatasa (estradiol en presencia de testosterona), observándose que sólo el cultivo del paciente con SIA presenta actividad aromatasa que fue estimulada por insulina.

Tabla 10-B Niveles de testosterona (pmol/10⁶ cel.24hs) y actividad aromatasa (fmol E2/10⁶ cel.24hs) en un cultivo de un paciente con SIA comparado con un grupo control (n = 4, media $\pm$ SD)

	<u>TESTOSTERONA</u>		<u>ACTIVIDAD AROMATASA</u>	
	Control*	SIA	Control	SIA
Basal	0.69 $\pm$ 0.06	0.69 $\pm$ 0.06	del	40.4 $\pm$ 0.73 ²
I 50	3.50 $\pm$ 0.97 ¹	5.20 $\pm$ 0.50 ¹	del	239 $\pm$ 22.0 ²

¹ p<0.05 vs Basal

² p< 0.05 vs grupo control

del : valor no detectable

I 50 = insulina 50 ng/ml

10 C- Estudio *in vitro* de un tumor calcificante de células grandes de Sertoli (Large cell, calcifying Sertoli cell tumor, LCCSCT)

Información clínica

Se trata de un niño de 9 años de edad con un tumor testicular multinodular que presentaba signos leves de masculinización pero importantes de feminización a nivel de desarrollo mamario.

Hallazos patológicos

El testículo izquierdo medía 4.0 x 3.0 x 2.0 cm, pesaba 25 g y presentaba múltiples nódulos calcificados, el mayor de 1 cm de diámetro aproximadamente. El testículo derecho medía 4.0 x 3.0 x 1.5 cm, pesaba 20 g, y también contenía múltiples nódulos calcificados, el mayor de ellos de 0.5 cm de diámetro.

Histológicamente el tumor estaba compuesto por trabéculas, cordones y túbulos sólidos formados por células con abundante citoplasma eosinófilo (figura 10C-1a). Las células neoplásicas se observaban dentro de los túbulos seminíferos (figura 10C-1b). Abundantes focos de calcificación se observaron dentro de los túbulos seminíferos conteniendo células neoplásicas así como en el estroma (figura 10C-1a). Los túbulos seminíferos vecinos al tumor presentaban paredes engrosadas y espermatogénesis temprana hasta estadio de espermatocono primario (figura 10C-1c). Las células intersticiales de Leydig eran relativamente escasas en número pero de apariencia normal (figura 10C-1c) (288).

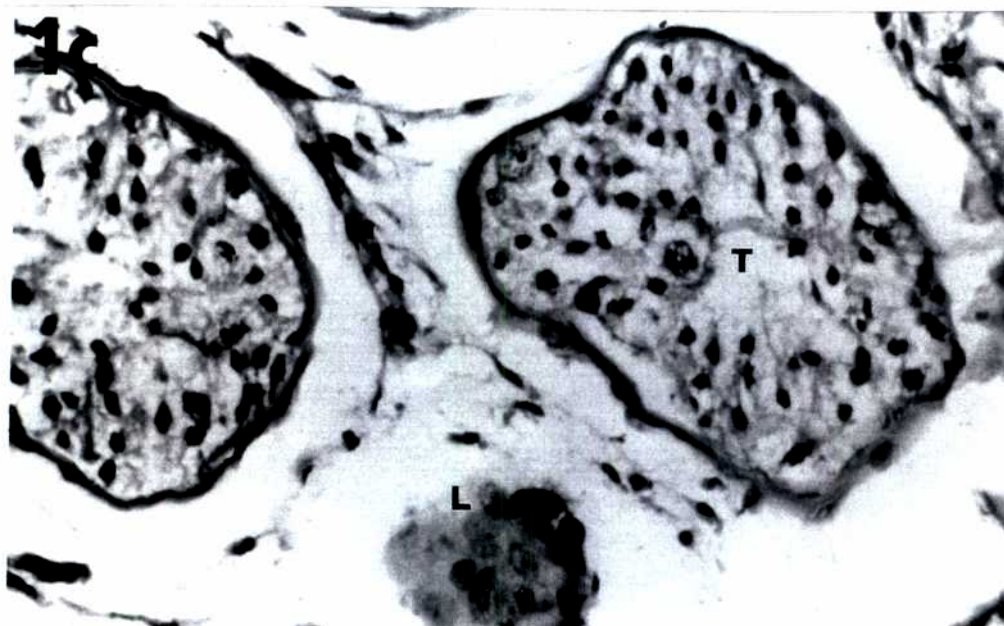
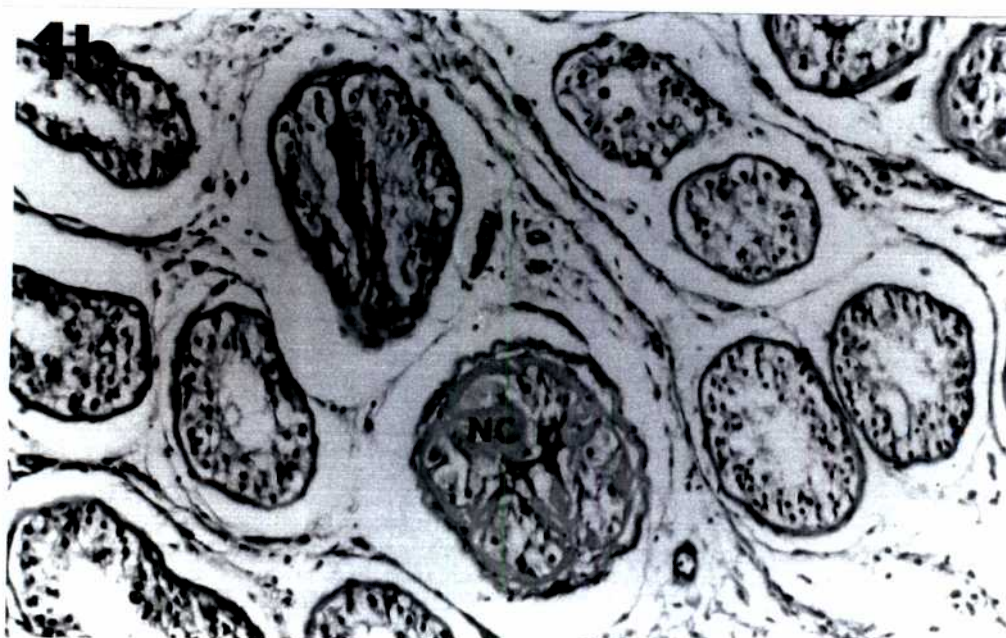
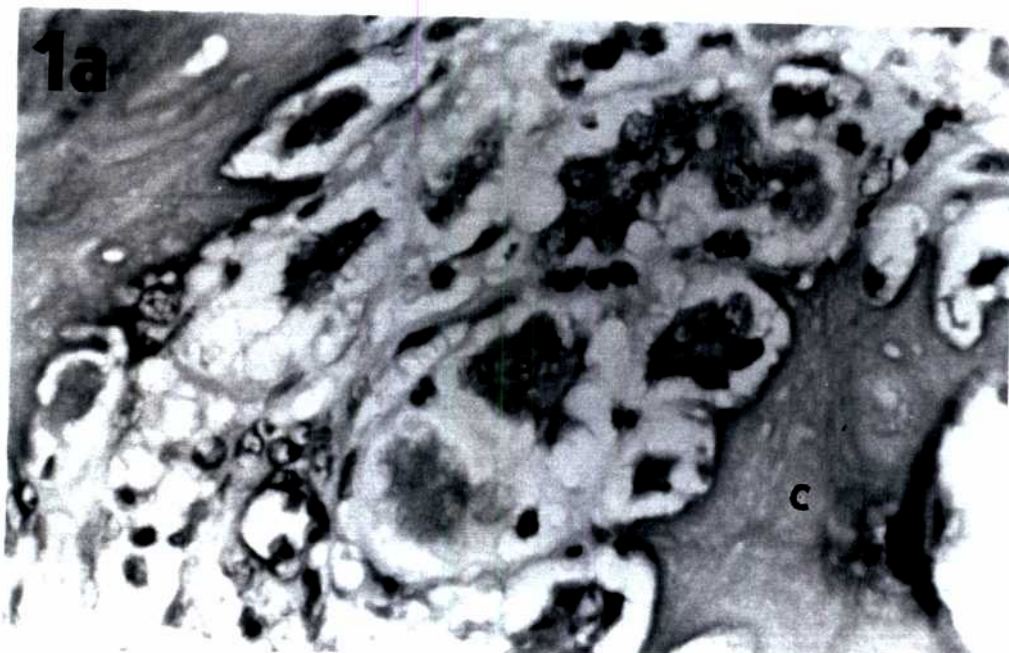


Figura 10C-1 Preparaciones histológicas. Panel a : clusters de células tumorales (S) con focos de calcificaciones laminadas (C), H&E, 40 x. Panel b : células neoplásicas (NC) creciendo in situ dentro de un túbulo seminífero. Membrana basal tubular engrosada y hialinizada, H&E, 25 x. Panel c : Túbulos seminíferos (T) con espermatogénesis temprana hasta estadio de espermatocito primario. Células intersticiales de Leydig (L), H&E, 40 x

Cultivos celulares

Se aislaron para cultivo dos fracciones: 1) fracción tumoral (Tu) y 2) fracción de testículo aparentemente normal fracción extratumoral (ExTu). Además, 3) se cultivaron células provenientes de necropsia de un paciente de 1 mes de edad (Control).

En la figura 10C-2 se presentan microfotografías de las células testiculares en cultivo. En la fracción tumoral predominan los clusters de células que se expanden según se ha observado a lo largo de los días de cultivo. La mayoría de estas células tiene una forma estrellada, un gran núcleo ovalado con nucleolo predominante, todas características correspondientes a la célula de Sertoli. También se observan células fibroblásticas, aunque en escasa cantidad (Panel a). En la fracción extratumoral la monocapa está compuesta por agregados celulares y abundantes células alargadas de tipo fibroblástico que establecen una malla entre los agregados. Si bien hay heterogeneidad de tipos celulares, predominan las células de tipo fibroblástico (Panel b). En el cultivo control (Panel c) se observa una disposición celular similar al cultivo extratumoral, con agregados de células tipo Sertoli y células alargadas tipo fibroblásticas expandiéndose desde aquellos.

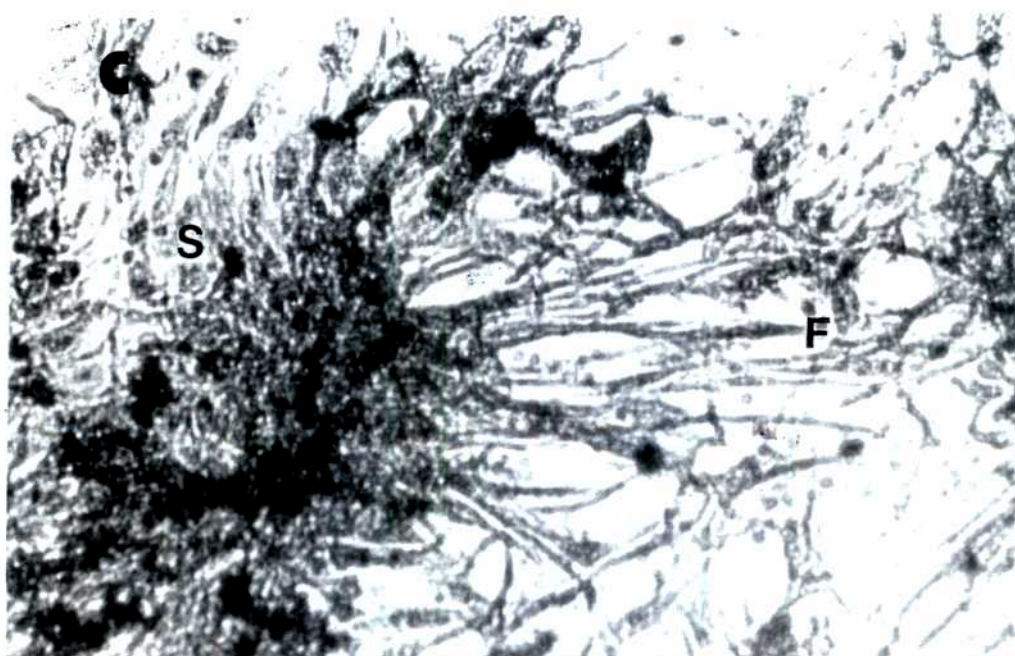
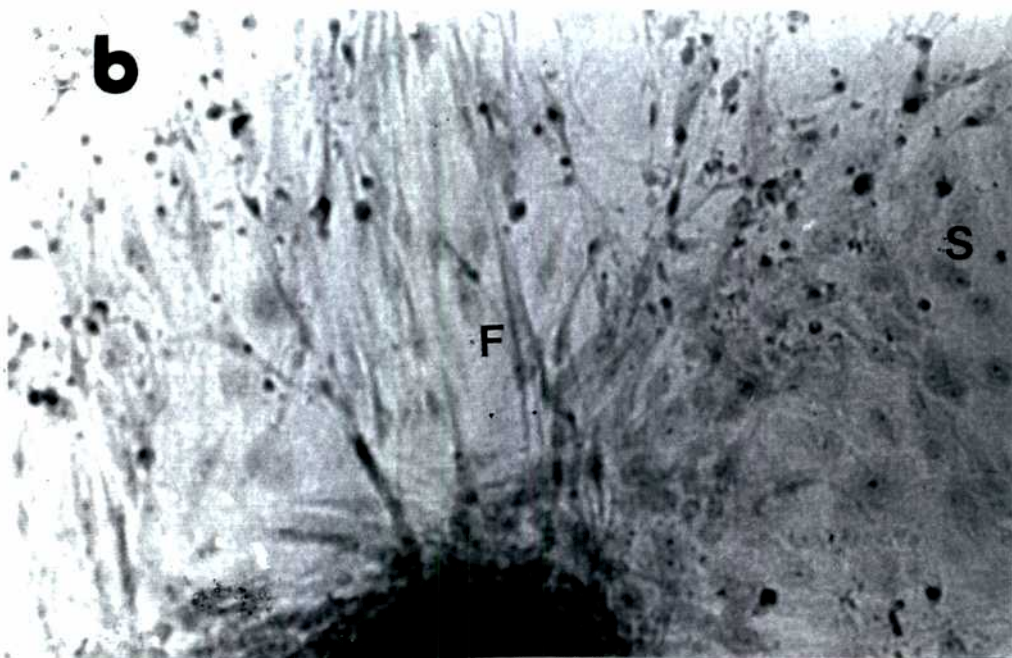
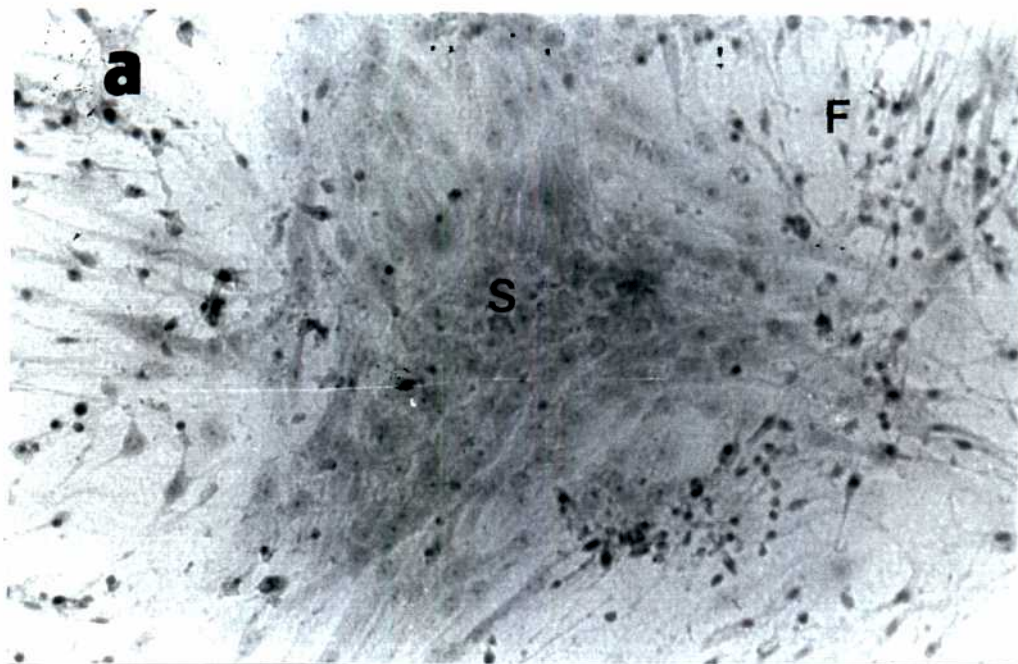


Figura 10C-2 Microfotografías del cultivo de la fracción tumoral (panel a) predominan los clusters de células de tipo Sertoli (S) y escasas células fibroblásticas (F). Cultivo de la fracción extratumoral (panel b) con agregados celulares, células de tipo fibroblástico (F) y células de Sertoli (S). Cultivo control (panel c) agregados de células poligonales (S) y células de tipo fibroblástico (F), (50 x).

A

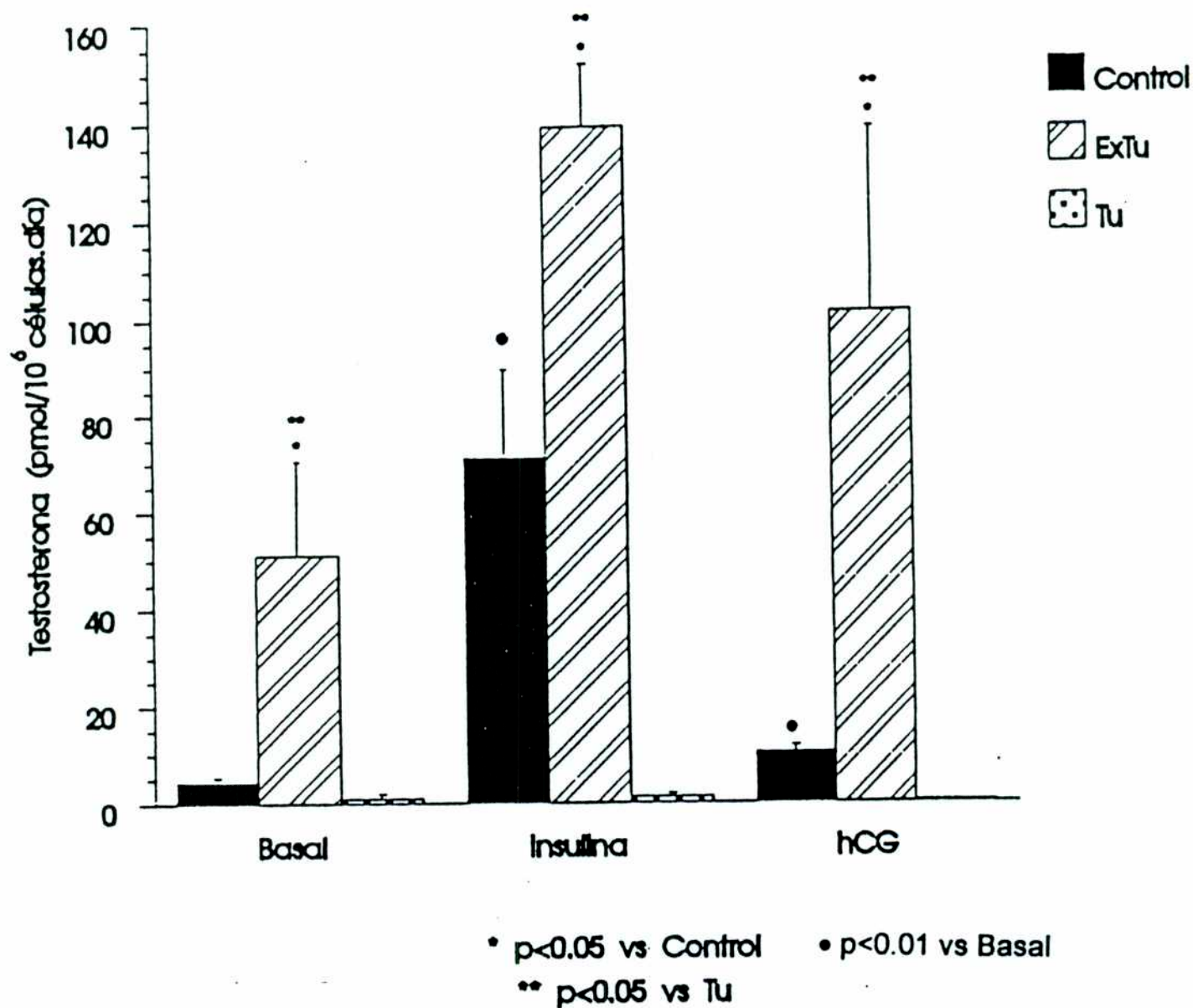


Figura 10C-3 Panel A. Secreción de testosterona al día 6 de cultivo en condición basal, bajo insulina (5 µg/ml), hCG (10 ng/ml), en un cultivo control (C) y en el cultivo del LCCSCT, fracción extratumoral (ExTu) y tumoral (Tu).

Secreción de esteroides en cultivo

La figura 10C-3, panel A representa la secreción de testosterona el día 6 de cultivo en condición basal, bajo estímulo con insulina (5 µg/ml) y con hCG estudiada en el medio condicionado de células obtenidas de ambas fracciones testiculares del paciente así como del testículo control. Tanto en condiciones basales como bajo tratamiento con insulina o hCG la secreción de testosterona fue significativamente más baja en el cultivo control que en la fracción extratumoral del LCCSCT ($p < 0.05$), mientras que fue apenas detectable en la fracción tumoral. Los tratamientos con insulina y con hCG aumentaron significativamente la secreción basal de testosterona sólo en el cultivo control ($p < 0.01$).

En condiciones basales, las diferencias en la secreción de androstenediona entre los cultivos comparados no fueron significativas (figura 10C-3, panel B). Sin embargo, bajo estímulo de insulina la androstenediona en la fracción extratumoral fue mucho más elevada que en la fracción tumoral y que en el cultivo control ($p < 0.05$). Bajo estímulo con hCG la androstenediona en la fracción extratumoral fue mayor que en la fracción tumoral ($p < 0.05$). El tratamiento con insulina aumentó significativamente la secreción basal de androstenediona sólo en las células de la fracción extratumoral ($p < 0.01$). La hCG por su parte no tuvo efecto estimulador.

En la figura 10C-3, panel C se representa la secreción de 17 hidroxiprogesterona. La misma tanto en condiciones basales como bajo estímulo con insulina y con hCG fue mayor en la fracción extratumoral que en la tumoral y en el control ($p < 0.05$). Sólo en las células de la fracción extratumoral el tratamiento con insulina aumentó significativamente la secreción basal de 17 hidroxiprogesterona ($p < 0.01$), mientras que la hCG no tuvo efecto.

La relación testosterona/androstenediona se ha tomado como un índice de la actividad 17β-hidroxiesteroide dehidrogenasa. En la tabla 10C-a se muestra que esta relación fue más elevada en la fracción extratumoral que en la tumoral bajo todas las condiciones estudiadas ($p < 0.05$). La relación en la fracción extratumoral fue mayor que en el control en condiciones basales y bajo estímulo con hCG ($p < 0.05$) pero no bajo estímulo con insulina. Por otro lado la insulina aumentó significativamente la relación basal testosterona/androstenediona sólo en el cultivo control ($p < 0.01$). No se observó efecto alguno de la hCG.

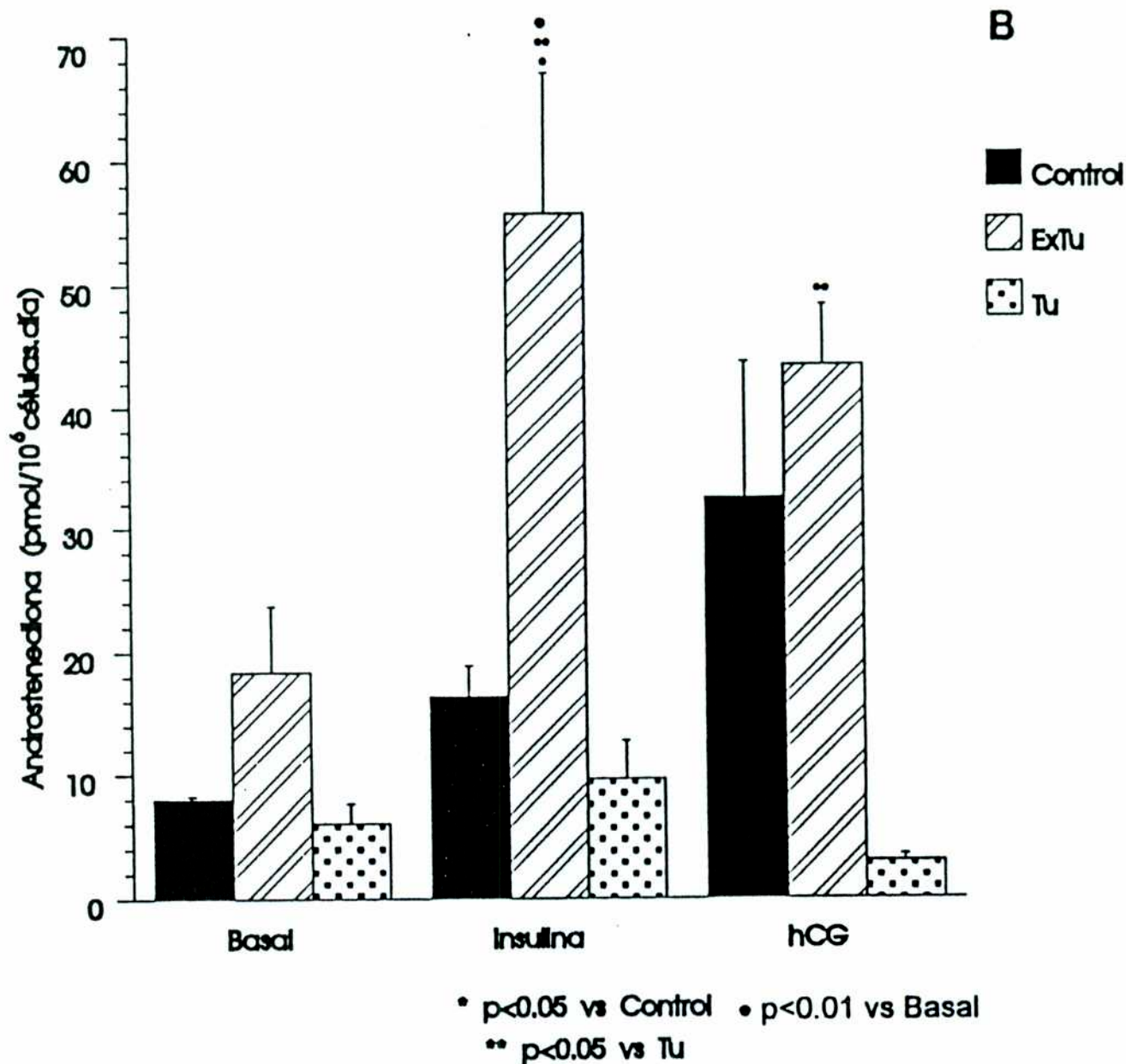


Figura 10C-3 Panel B. Secreción de androstenediona al día 6 de cultivo en condición basal, bajo insulina (5 μ g/ml), hCG (10 ng/ml), en un cultivo control (C) y en el cultivo del LCCSCT, fracción extratumoral (ExTu) y tumoral (Tu).

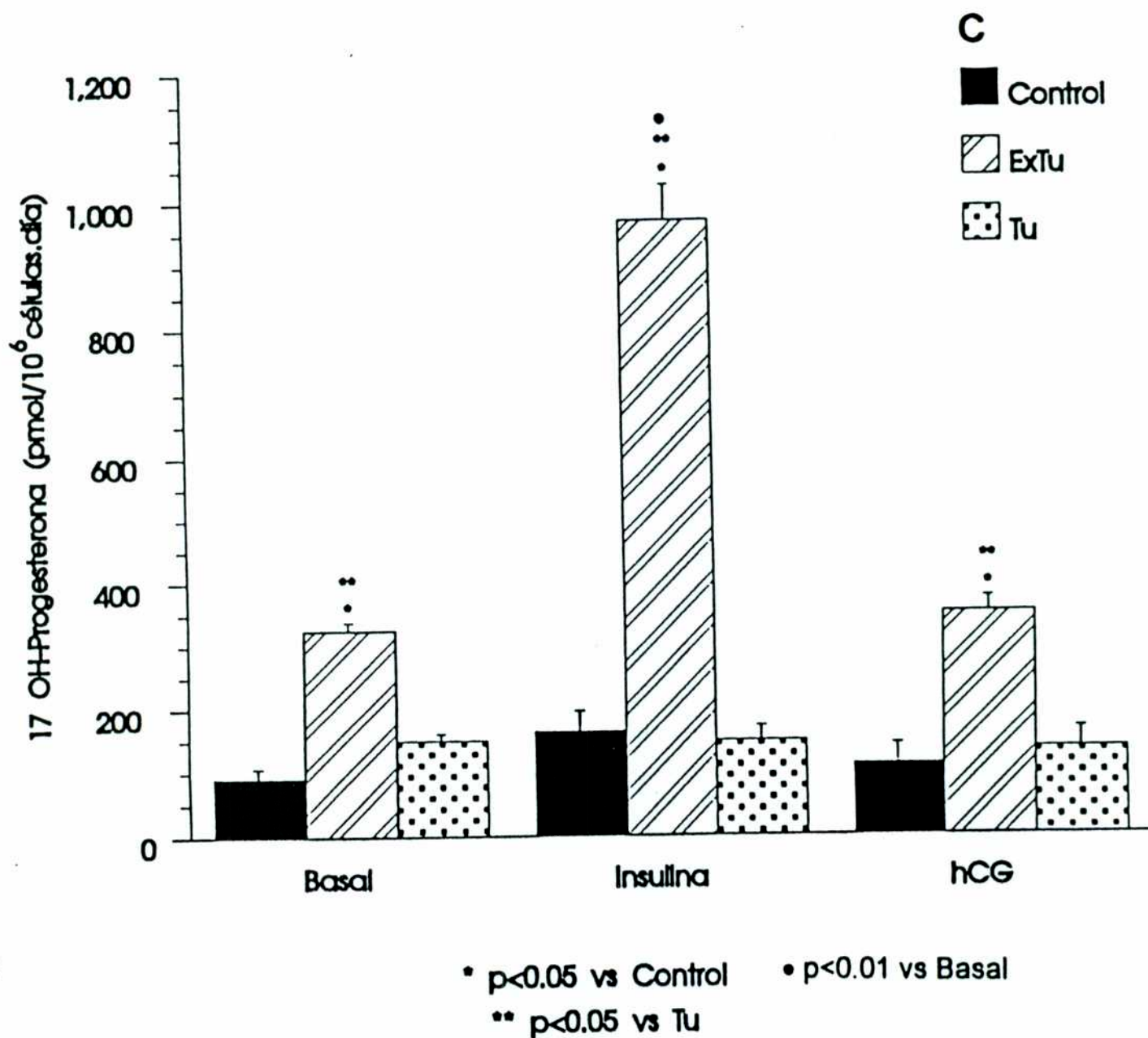


Figura 10C-3 Panel C. Secreción de 17 hidroxiprogesterona al día 6 de cultivo en condición basal, bajo insulina (5 μ g/ml), hCG (10 ng/ml), en un cultivo control (C) y en el cultivo del LCCSCT, fracción extratumoral (ExTu) y tumoral (Tu).

Como se representa en la figura 10C-3, panel D la actividad aromatasa no fue detectada en células control en condiciones basales, ni bajo estimulación con insulina ni con FSH. En contraste, la actividad aromatasa bajo insulina y bajo FSH fue mayor en la fracción tumoral que en la extratumoral del testículo con LCCSCT ($p < 0.05$). La FSH aumentó significativamente la actividad aromatasa basal sólo en células de la fracción tumoral ($p < 0.01$) (288).

Se ha estudiado el efecto del Medio condicionado del tumor (TuMC) sobre la secreción de testosterona en células testiculares de un subcultivo control (Za1msub5). Como se muestra en la tabla 10C-b células testiculares de un subcultivo control retienen su capacidad de secretar testosterona en los días 5 y 6 de cultivo luego de cinco pasajes bajo condición basal y son capaces de responder significativamente al estímulo con LH ($p < 0.01$). Después de agregar TuMC diluido $\frac{1}{4}$ la secreción de testosterona aumentó aunque la diferencia no fue significativa respecto a la secreción basal. Sin embargo, al agregar TuMC diluido al medio se observó un aumento significativo sobre la secreción basal ($p < 0.01$).

El patrón de secreción de esteroides al medio de cultivo por las células aisladas de los dos tejidos gonadales del paciente fue muy diferente. La secreción de testosterona, androstenediona y 17 hidroxiprogesterona fue significativamente mayor en la fracción extratumoral que en la fracción tumoral mientras que la insulina estimuló significativamente la secreción de androstenediona y 17 hidroxiprogesterona en la fracción extratumoral, la hCG estimuló la secreción de testosterona sólo en el cultivo control. Puesto que las células de la fracción extratumoral mostraron mayor actividad esteroidogénica que las células control, es posible pensar que las primeras ya estaban estimuladas al máximo en condiciones basales. Mas aún las células de la fracción extratumoral tuvieron alta actividad esteroidogénica en comparación a cuatro cultivos testiculares prepúberes provenientes de necropsia dentro de las primeras 24 hpm (248). En contraste, las células tumorales no fueron capaces de sintetizar testosterona. Mas aún analizando los bajos niveles de la relación testosterona/ androstenediona las células tumorales tendrían poca actividad 17 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa.

Existen dos clases de evidencias que sugieren un efecto trófico de las células tumorales sobre las células intersticiales vecinas: evidencias microscópicas de diferenciación de células de Leydig y células germinales y elevada producción de testosterona *in vitro*. También encontramos que el medio condicionado del tumor (TuMC) fue capaz de estimular la secreción de testosterona en un subcultivo de células testiculares control de manera similar al estímulo con LH.

Un hallazgo interesante en este estudio fue que la fracción tumoral presentaba alta actividad aromatasa. Se ha informado que la aromatasa está presente en otro tipo de tumor de células de Sertoli (250). La respuesta a FSH observada indica la presencia de receptores funcionales para FSH, es decir un alto grado de diferenciación en estas células de Sertoli tumorales. Posiblemente la actividad aromatasa presente en la fracción extratumoral se deba a células tumorales contaminantes. Teniendo en cuenta estas observaciones, es posible que la actividad aromatasa del tumor fue responsable de la estimulación *in vivo* del tejido mamario en este niño (288).

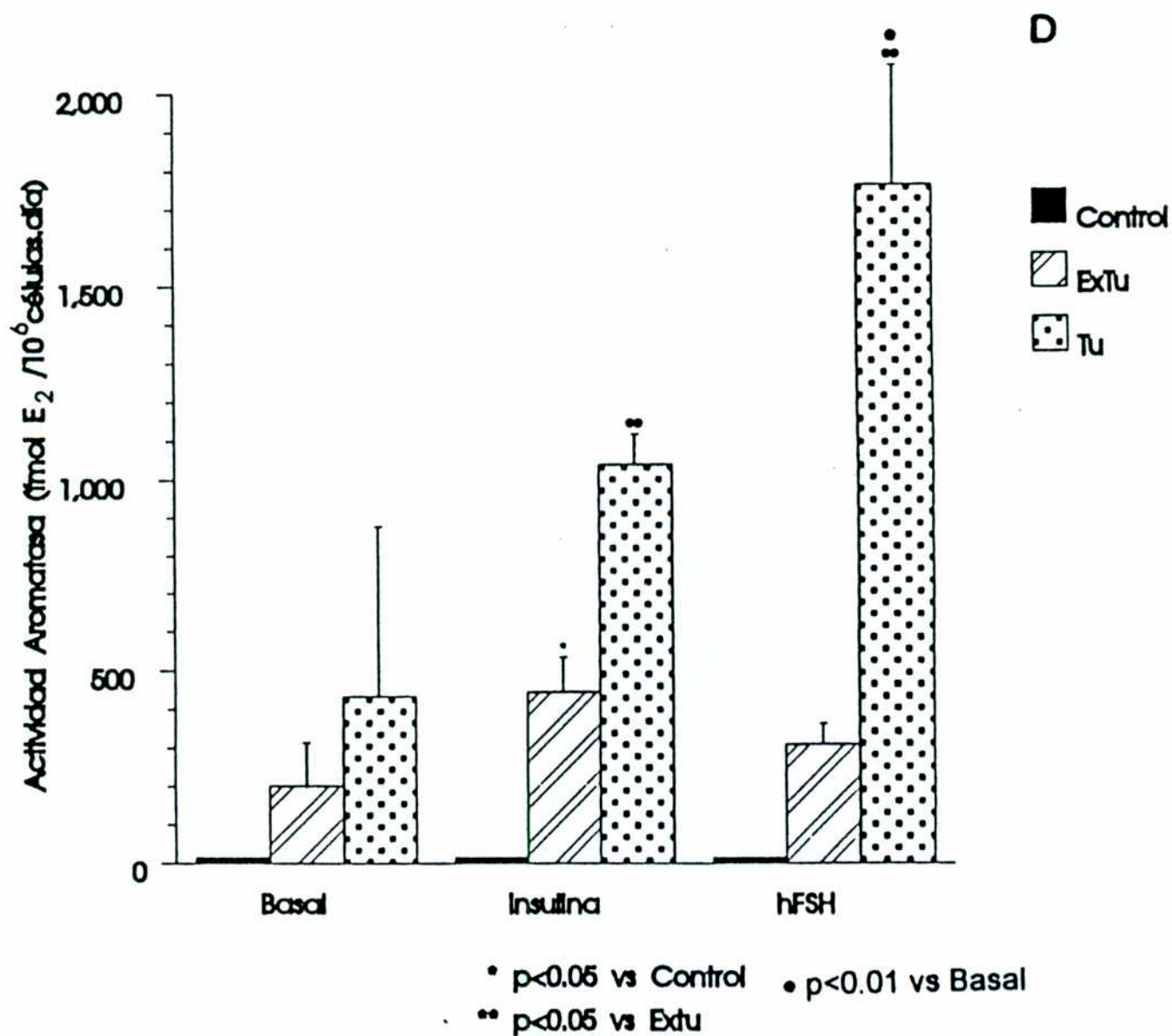


Figura 10C-3 Panel D. Actividad aromatasa día 6 de cultivo en condición basal, bajo insulina (5 µg/ml) o FSH (1.5 IU/ml), en un cultivo control (C) y en el cultivo del LCCSCT, fracción extratumoral (ExTu) y tumoral (Tu).

Tabla 10C-a Relación de la secreción de testosterona/androstenediona en el medio condicionado del día 6 de cultivo, en condición basal y bajo estímulo crónico con hCG (10 ng/ml) y con insulina (50 ng/ml).

	control	ExTu	Tu
Basal	$0.68 \pm 0.01^*$	2.34 ± 0.27	$0.36 \pm 0.21^{**}$
Insulina	$4.35 \pm 0.43^{***}$	3.45 ± 0.69	$0.13 \pm 0.04^{**}$
hCG	$0.66 \pm 0.32^*$	2.94 ± 0.17	$0.34 \pm 0.21^{**}$

* $p < 0.05$ control vs ExTu

** $p < 0.05$ Tu vs ExTu

*** $p < 0.01$ vs Basal

Tabla 10C-b Efecto del Medio Condicionado del tumor (TuMc) colocado en dos diluciones ($\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$) sobre la secreción de testosterona en células testiculares de un subcultivo control. Comparación con el efecto de LH (10 ng/ml). Datos expresados como $x \pm DS$ en pmol/ 10^6 cel.24hs

	Basal	LH	TuCM $\frac{1}{4}$	TuCM $\frac{1}{2}$
Testosterona	2.05 ± 0.16	$11.8 \pm 1.47^*$	4.06 ± 0.51	$12.9 \pm 1.05^*$

* p <0.01 vs Basal

CONCLUSIONES

El conocimiento de la fisiología y fisiopatología del testículo humano prepuberal y puberal es escaso porque se carece de diseños experimentales adecuados para su estudio. Era necesaria una metodología nueva que permita el estudio *in vitro* de la función del testículo humano prepuberal y puberal. Para ello se desarrolló un método para mantener en cultivo células testiculares obtenidas a partir de necropsias de pacientes prepúberes. En primer término y a juzgar por sus características microscópicas, por la exclusión con azul tripán y su capacidad de respuesta a la gonadotrofina LH, las células en cultivo resultaron ser vitales y funcionales, al menos durante los 6 y los 10 días de cultivo.

El material de partida, una población mixta de células testiculares humanas prepúberes difiere de la población testicular adulta y su composición cambia con la edad. Durante la etapa neonatal, los primeros días de vida, los testículos están bajo la influencia de hormonas maternas, placentarias. Luego, durante el primer semestre de vida ejercen su influencia las hormonas secretadas por la hipófisis infantil. Se han descrito células de Leydig completamente diferenciadas en testículos de recién nacidos aunque éstas disminuyen marcadamente luego de las primeras semanas de vida (251). Finalmente, en la etapa postnatal alejada, el tipo celular predominante en el espacio intersticial testicular son células fibroblásticas. Una capa externa de células peritubulares rodeando la membrana basal de los cordones seminíferos también ha sido descrita en el testículo prepuberal. Sin embargo las células más numerosas son precursores de células de Sertoli los cuales se encuentran unidos a la membrana basal. Por otro lado se observan con menor frecuencia gonocitos, espermatogonias grandes y espermatogonias pequeñas.

En los primeros experimentos se ha intentado separar antes de iniciar el cultivo las células intersticiales de las células de Sertoli, como se hace frecuentemente en animales de experimentación. Sin embargo no se ha podido obtener poblaciones celulares de pureza aceptable ya que en el testículo humano prepúber los cordones seminíferos están fuertemente unidos por tejido intersticial y son muy difíciles de separar del mismo. En consecuencia los presentes cultivos utilizados como modelo de estudio contienen todas las poblaciones celulares del testículo prepuberal con una predominancia de fibroblastos juveniles y de células de Sertoli inmaduras.

Uno de los principales objetivos de este estudio fue analizar la posibilidad de que los eventos que tienen lugar después de la muerte puedan influir sobre los resultados. Por este motivo se estudió el efecto del tiempo *post mortem* sobre la respuesta celular. Los datos demostraron que con tiempos post mortem cortos (hasta 24 horas) las células tuvieron baja actividad aromatasa y aumentaron la secreción de testosterona en presencia de insulina y

que con tiempos *post mortem* de más de 24 horas disminuye la capacidad de segregar testosterona y en las células testiculares se toma activa la enzima aromatasa ya sea con escasa o alta secreción de estradiol. Se puede especular que células con actividad aromatasa fueron resistentes a la anoxia mientras que otras células esteroidogénicas pudieron haber sido dañadas. Sin embargo esta explicación no se aplica a un cultivo donde todas las enzimas de la vía esteroidogénica hasta el estradiol están activas bajo estimulación con insulina. El hecho de no detectar testosterona en este caso que secreta los mayores niveles de estradiol y tuvo alta actividad aromatasa sugiere que toda la testosterona sintetizada dentro de la célula fue aromatizada antes de ser liberada al medio. En ratas, la actividad aromatasa está presente en células de Sertoli en testículos de animales inmaduros, pero disminuye en animales maduros en los cuales aparece en células de Leydig (252, 253, 254). Los presentes experimentos no permiten definir cuál es el mecanismo de la activación de esta enzima ni si la actividad aromatasa está ubicada en células peritubulares, precursores fibroblásticos de células de Leydig ó en células de Sertoli inmaduras. En todo caso los datos demuestran que la esteroidogénesis es influenciada por el tiempo *post mortem*.

Como primera conclusión, se demuestra la posibilidad de mantener en cultivo células testiculares humanas prepúberes obtenidas en necropsia. Con el fin de preservar la capacidad secretora de testosterona se establece que el tiempo entre la muerte y el comienzo del cultivo no debe exceder las 24 horas. Esta metodología es de utilidad para el estudio de la función de las células testiculares en humanos sexualmente inmaduros (248).

Se ha descrito que las células testiculares prepuberales obtenidas de necropsia pueden ser mantenidas en cultivo en buenas condiciones funcionales, formando una monocapa que se organiza en clusters de células poligonales semejantes a células de pre Sertoli y a partir de los clusters se irradian células elongadas de tipo fibroblástico. Utilizando el microscopio de contraste de fase también se han podido identificar figuras de mitosis coexistiendo con células totalmente diferenciadas. Utilizando marcadores histoquímicos se han podido identificar en la monocapa testicular células de Sertoli (245), células mesenchimáticas (246), células mioides peritubulares (243, 244) y células esteroidogénicamente activas, positivas para la reacción de la enzima 3β -HSD (242).

Los estudios llevados a cabo en función de los días de cultivo sugieren que las células capaces de producir testosterona aumentan su índice de producción durante los primeros diez días de cultivo. Puesto que la testosterona aumenta a lo largo del cultivo entre los días 2 y 10 pero que luego del día 6 se han observado células desprendidas -indicio de muerte

celular- se ha elegido como día óptimo para el estudio de la esteroidogénesis el día 6 de cultivo. Varias evidencias demuestran que los esteroides detectados en el medio de cultivo reflejan la síntesis *de novo* y no la liberación de esteroides preformados. Otros autores han demostrado que luego de incubar tejido testicular humano prepúber fresco, una cantidad de testosterona equivalente a la contenida en el tejido se libera al medio dentro de la primer hora (255). El incremento observado de la secreción de testosterona a lo largo de los días de cultivo apoya la hipótesis de la síntesis *de novo*. El aumento de la testosterona puede explicarse por un proceso de diferenciación *in vitro* de las células esteroidogénicamente activas o bien por la proliferación y diferenciación de las mismas. Es curioso que este fenómeno ocurra aún en ausencia de gonadotrofinas, aunque no se puede descartar que el suero fetal bovino, colocado al 10 % en los cultivos durante las primeras 48 horas, contenga hormonas o factores que desencadenen el proceso de diferenciación y/o de mitosis.

Se ha estudiado la secreción de testosterona basal -en ausencia de estímulos- y el efecto de la estimulación crónica con LH/hCG y FSH tanto sobre la secreción de testosterona como sobre la de otros esteroides intermedios en la biosíntesis de testosterona.

Las células testiculares inmaduras son capaces de segregar otros esteroides, tales como la 17 hidroxiprogesterona y la progesterona, que podrían ser considerados también como productos finales de secreción y tener efectos biológicos en otros tejidos. Por ejemplo la progesterona es aceptada como uno de los principales neuroesteroides (256).

Se acepta que la célula del testículo encargada de secretar testosterona es la célula de Leydig, aunque se ha demostrado que precursores mesenquimáticos de Leydig son esteroidogénicamente activos (255) y entonces, probablemente serían las células secretoras de testosterona en los cultivos descriptos. Además se ha medido testosterona en testículo humano prepúber *in vivo* (257, 258). El aumento postnatal de testosterona descripto en niños alcanza niveles máximos entre los 20 y los 60 días de vida y luego va disminuyendo dentro de los primeros 7 meses de vida (259).

Teniendo en cuenta las marcadas diferencias en la histología testicular durante los primeros años de vida se ha dividido el material clínico en cuatro grupos etarios. Los datos mostraron que la secreción de testosterona por parte de las células en cultivo reflejó el potencial esteroidogénico de los testículos *in vivo*, es decir la secreción de testosterona en los niños durante los primeros 10 días de vida (definido como grupo 1) y el primer semestre de vida (grupo 2) es mayor que en niños de mayor edad (grupo 3) (260). La secreción de

testosterona elevada en el período postnatal se ha atribuido a la estimulación con LH, hormona que también se incrementa durante los primeros meses de vida (261). Las diferencias entre los grupos 1 y 2 y el grupo 3 se mantuvieron cuando las células se cultivaron en presencia de LH. Las células de Leydig maduras y aún los precursores mesenquimáticos poseen la maquinaria molecular para responder a LH y secretar testosterona (205,255). Esto sugiere que los cultivos del grupo 2 poseen mayor densidad de células con capacidad de responder a LH que los cultivos del grupo 3 (249), lo cual concuerda con lo observado *in vivo* (261). El aumento de la testosterona bajo la estimulación de LH sugiere que las células de Leydig en cultivo mantienen varias de sus características funcionales: presencia de receptor para LH, mensajeros intracelulares funcionales y regulación génica de la transcripción de enzimas esteroidogénicas. Es de destacar que sólo 2 de 6 cultivos del grupo 1 aumentaron la testosterona bajo LH y que ninguno de los cultivos del grupo 4 respondieron a LH, aunque el número de cultivos del grupo 4 es pequeño, la testosterona no sólo no aumenta sino que disminuye en presencia de LH.

Sorprendentemente, cuando las células de los pacientes del grupo 1 -primeros 10 días de vida- y del grupo 2 -primer semestre de vida- fueron estimuladas en cultivo con hFSH en ausencia de hLH respondieron de una manera similar a la respuesta a hLH. Estudios previos acerca del rol de la FSH sobre la esteroidogénesis testicular han sido cuestionados debido a que las preparaciones de FSH utilizadas entonces presentaban contaminación con LH. En el presente estudio una mínima contaminación de LH persiste en la hFSH altamente purificada (0,0035 UI/L de LH). Se ha confirmado que el efecto de FSH observado no se debe a una contaminación con LH utilizando FSH recombinante humana. El único tipo celular que expresa receptor de FSH en el testículo es la célula de Sertoli. Sin embargo ésta no posee capacidad de sintetizar *de novo* testosterona. Podríamos especular entonces que las células de Sertoli en cultivo en respuesta a la estimulación con FSH secretan uno ó más factores capaces de estimular a las células de Leydig vecinas las cuales sintetizan testosterona. Este mecanismo podría funcionar en niños normales.

Hay evidencias *in vitro* que el cocultivo células de Leydig- células de Sertoli de testículos inmaduros porcinos secreta más testosterona que el cultivo de células de Leydig solas, lo cual indicaría un efecto estimulador de las células de Sertoli sobre la función de las células de Leydig. Se ha propuesto al IGF-1 candidato para este efecto estimulador (94) aunque otros factores podrían estar involucrados. Se ha informado recientemente que células de

Sertoli adultas humanas aumentan la secreción de testosterona por parte de las células de Leydig (142).

Por otro lado se estimó la actividad de algunas de las enzimas de la esteroidogénesis en nuestros cultivos. Diferentes métodos pueden aplicarse para la estimación de actividades enzimáticas. Se pueden diseñar experimentos para determinar la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima de diferentes enzimas, midiendo los productos en presencia de diferentes concentraciones de sustrato. También es posible comparar actividades enzimáticas relativas utilizando la velocidad inicial. Los experimentos presentados a partir de cultivo de células testiculares humanas prepúberes están limitados a la escasez de material accesible. De todas formas se estimó la actividad de tres enzimas de la esteroidogénesis analizando la correlación entre tres precursores esteroideos de la vía esteroidogénica con la testosterona, el producto final. Cuanto mayor es la pendiente de una regresión lineal, menor es la actividad de la enzima involucrada en la conversión de cada precursor en testosterona. De esta manera, la correlación entre 17 hidroxiprogesterona y testosterona abarcaría las actividades 17,20 liasa y 17 β -HSD. Las pendientes de las tres regresiones lineales (17 hidroxiprogesterona, androstenediona y dehidroepiandrosterona en función de testosterona) indican que hay menor acumulación de estos precursores en los cultivos correspondientes al grupo 2 respecto del grupo 3, corroborando que los niños más pequeños -de los primeros meses de vida-, tienen una mayor actividad enzimática que los niños de más edad. A causa de los bajos niveles de progesterona detectados no se pudo establecer una correlación entre este esteroide y testosterona. Se estima que la actividad 17 hidroxilasa de la enzima P450c17 es alta debido a que no se detecta acumulación de progesterona. A partir de las regresiones lineales también se pudo estimar dentro de cada grupo los índices relativos de cada actividad enzimática. Las bajas pendientes de la regresión lineal entre dehidroepiandrosterona versus testosterona y androstenediona versus testosterona sugieren que la enzima 17 β -HSD (tipo 3) y 3 β -HSD (tipo 2) están muy activas en ambos grupos experimentales; mientras que el elevado valor de la pendiente de la regresión lineal de 17 hidroxiprogesterona versus testosterona sugiere que la actividad 17, 20 liasa es uno de los pasos limitantes de la esteroidogénesis en el testículo humano inmaduro, al menos en el grupo 3. Puesto que la función 17 α - hidroxilasa de esta enzima está muy activa, la explicación no sería que la expresión del gen CYP17 está reprimida. Es probable que factores presentes en la región microsomal de la célula determinen una regulación diferencial de las dos actividades de esta enzima. Las células de Leydig neonatales podrían ser diferentes de las células de Leydig fetales y de las adultas.

Los datos presentados sugieren que después del primer año de vida, cuando las células del intersticio testicular entran en reposo, la disminución de la actividad 17,20 liasa, entre otros factores, contribuye a los bajos niveles de secreción de testosterona.

Uno de los fines de el presente trabajo de tesis doctoral fue conocer si el testículo humano prepúber era capaz de sintetizar testosterona utilizando tanto la vía 5-ene como la vía 4-ene, y cuál de estas dos era preferencial.

Se ha descrito que los primates más primitivos convierten la pregnenolona a testosterona exclusivamente a través de la vía 4-ene y tienen como metabolitos predominantes a otros distintos de testosterona. En primates superiores la pregnenolona es convertida a testosterona principalmente a través de la vía 5-ene y la testosterona es el metabolito principal (198, 199, 200).

Se han estudiado células testiculares de pacientes de los grupos 1, 2 y 3 con precursores tritiados correspondientes a la vía 5-ene (pregnenolona) y 4-ene (progesterona), en condiciones basales y luego de distintos estímulos. Se analizaron por cromatografía en capa delgada los esteroides tritiados extraídos del medio condicionado del día 5 de cultivo. Los productos identificados permiten afirmar que ambas vías pueden ser utilizadas, pero es de destacar que cuando se metaboliza pregnenolona el producto final es testosterona y dihidrotestosterona mientras que cuando el sustrato es progesterona se obtienen como productos 17 hidroxiprogesterona, 20 hidroxiprogesterona y androsterona. Estos datos sugieren que la vía 5-ene es la preferencial en el testículo humano prepúber.

Con el objeto de analizar si otras hormonas ó factores, además de las gonadotropinas, son capaces de estimular la esteroidogénesis testicular humana prepúber, se estudió el efecto de la hormona de crecimiento (GH), la insulina y el IGF-1.

La secreción de testosterona por las células testiculares en cultivo fue detectada en varios experimentos bajo la acción de insulina. Los datos no permiten diferenciar si el efecto de la insulina es un efecto directo sobre la esteroidogénesis o un efecto general inespecífico sobre el metabolismo celular. Ni la viabilidad celular, evaluada por el método de exclusión con azul tripán ni el número de células por well fue diferente en presencia ó en ausencia de insulina. Se ha postulado que la insulina y el IGF-1 actúan como moduladores de la acción de LH y FSH (262). En particular se ha propuesto al IGF-1 como agente paracrina en estudios realizados en animales de experimentación (94).

El agregado de hGH en ausencia de LH aumenta la secreción de testosterona en 2 de 4 cultivos del grupo 1 y en todos los cultivos del grupo 2. Este resultado contrasta con observaciones previas en células testiculares inmaduras porcinas (155). Respuestas diferentes pueden explicarse por tratarse de especies diferentes ó por la preparación de GH utilizada. En nuestros cultivos el efecto de GH fue similar al de LH y no se observa en niños más grandes. La presencia de receptores para GH en testículo es controvertido: se han descrito receptores específicos para GH y prolactina (PRL) en testículo (263). Lobie y col. (264) detectaron fuerte inmunoreactividad para receptor de GH en células de Sertoli y en células de Leydig de ratas pero Tiong y Herington (265) no pudieron detectar mRNA para receptor de GH en testículos de la misma especie. Mercado y col. (266) hallaron expresión de mRNA para receptor de GH en un testículo humano utilizando la técnica de RT-PCR. Por otro lado, se han descrito sitios de binding para prolactina en células de Leydig de rata (267). Además la distribución del receptor para prolactina y GH puede incluir a las células del sistema inmune las cuales están presentes en el testículo (263, 268). Dado que la GH posee actividad somatotrópica y lactotrópica no es posible discernir si la respuesta biológica detectada es resultado de la interacción de GH con receptores de GH ó de prolactina (269). El efecto de GH descrito en este estudio sugiere que GH ó prolactina podrían tener un rol en la función testicular durante el primer semestre de vida.

Se sabe que pacientes con deficiencia de GH ó con insensibilidad a GH presentan un retardo en el desarrollo sexual (270, 271). Queda por demostrarse si este retardo se debe a la falta de acción de GH sobre el testículo en la infancia temprana. Sin embargo varios estudios en roedores (272, 273, 274) y en primates no humanos (129) demuestran que el rol secretor del testículo neonatal es crítico para la función normal del sistema nervioso central en el adulto.

Los cultivos del grupo 3, correspondientes a niños entre 12 y 36 meses y del grupo 4, de edad puberal, no responden a la estimulación hormonal. Presumiblemente muy pocas células esteroidogénicas estarían presentes en estos cultivos.

Teniendo en cuenta que uno de los factores paracrinicos postulados dentro del testículo prepuberal humano es el IGF-1 se estudió el efecto de la estimulación crónica con IGF-1 sobre la esteroidogenesis testicular en el modelo de cultivo primario de células testiculares humanas. Los resultados presentados permiten concluir que el IGF-1 es un modulador de la biosíntesis de testosterona durante la activación postnatal del testículo humano.

Como se ha observado en células de Sertoli prepuberales de rata y cerdo tanto el IGF-1 como el IGF-II estimulan la proliferación celular así como se ha descrito una acción mitogénica del IGF-1 sobre células de Leydig de rata inmadura (275). En ratón, ambos IGFs estimulan la síntesis de DNA en espermatogonias y el IGF-1 induce la diferenciación de espermatogonias tipo A (276). También se ha descrito que el IGF-1 estimula la producción de testosterona y potencia la formación de testosterona inducida por hCG en cultivo de células de Leydig murinas y porcinas siendo este efecto más pronunciado en células inmaduras que en adultas (277).

Una inyección de IGF-1 recombinante en ratones enanos Snell inmaduros (dw/dw) causa un aumento significativo del receptor de LH testicular y una respuesta esteroideogénica a hCG similar a la inducida por el tratamiento con GH lo que sugiere que los efectos de GH sobre el testículo serían mediados por IGF-1 (275). Ratones con deficiencia de GH utilizados como modelo animal para analizar los efectos de GH sobre la reproducción, permiten observar que, aunque fértiles, tienen un tamaño testicular disminuido (223).

La ausencia de expresión del gen para IGF-II en animales transgénicos demuestra que éste es esencial para el crecimiento normal de la placenta y del feto pero no del crecimiento postnatal, ya que mutantes null para IGF-II que son viables y fértiles presentan enanismo al nacer pero crecen a un ritmo normal en la vida postnatal (279). En contraste, el crecimiento postnatal de mutantes null para IGF-1 es reducido (280), esta mutación tiene un impacto dramático en el desarrollo y la fisiología del sistema reproductivo en ambos sexos (281). Los ratones homocigotas son enanos e infértiles, con testículos de tamaño reducido y una espermatogénesis del 18% de lo normal. Es interesante recordar que la deficiencia de andrógenos en los mutantes se correlaciona con una aparente diferenciación tardía de las células de Leydig, las cuales, en los mutantes secretarían más androstenediona que testosterona con respecto a los controles normales, característica de Leydig inmaduras.

Al parecer el IGF-1 tiene un grado de autonomía respecto a otros estímulos hormonales. Se ha descrito que los ratones con mutaciones en el gen de GH o en el receptor de GH son fértiles (282). Entonces, el efecto de IGF-1 en testículo se debería a su producción local, sin que exista una contribución endócrina de su forma circulante.

Los resultados indican que el IGF-1 tiene un rol determinante en el desarrollo y la diferenciación de las células de Leydig. Teniendo en cuenta que uno de los factores paracrinós postulados dentro del testículo prepuberal humano es el IGF-1 se estudió el efecto de la estimulación crónica con IGF-1 sobre la esteroideogénesis testicular en el

modelo de cultivo primario de células testiculares humanas. Los resultados presentados permiten concluir que el IGF-1 es un modulador de la biosíntesis de testosterona en el testículo humano durante toda la prepubertad.

Así como se ha estudiado la secreción de testosterona como marcador de la función de la célula de Leydig, se estudió la secreción de inhibina-B en los medios condicionados de los cultivos testiculares prepúberes humanos como indicador de células de Sertoli.

Se ha descrito que el dosaje de inhibina biológicamente activa es útil para comprobar la función de las células de Sertoli. La concentración sérica de inhibina B en niños desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad resulta tan elevada como en la pubertad. Luego del primer año de vida la inhibina-B disminuye gradualmente alcanzando un nadir entre los 4 y 6 años. En toda la infancia la concentración de inhibina-B es mayor en niños que en niñas. Por otro lado, la inhibina-A no es detectable hasta la pubertad temprana (283).

Un estudio en mono sobre el efecto de las gonadotropinas (FSH Y LH ó hCG) sobre la producción de inhibina muestra que la FSH tiene un claro efecto estimulador de los niveles de inhibina B mientras que no se observa un efecto de la hCG (284).

Por su parte, Toppani y col. (285) sugiere un rol de la inhibina como potencial gen supresor de tumor en gonadas y glándula adrenal en un estudio sobre la expresión de mRNA para las subunidades α , βA y βB por Northern Blot e hibridización *in situ* se detecta expresión de mRNA para α y βB en túbulos seminíferos mientras que para βA en células de Leydig. En suero de un paciente con tumor de células de Sertoli encuentra altos niveles de inhibina previos a la orquidectomía que luego de la misma se normalizan. Sugiere entonces que la inhibina sérica puede reflejar la actividad de las células de Sertoli y podría usarse como marcador tumoral.

Un estudio de Brennemann sobre la presencia de inhibina inmunoreactiva con dos anticuerpos anti subunidad α en homogenados de testículo y ovario de distintas edades, señala que la mayor concentración de inhibina intratesticular se halla en niños de 0 a 3 meses (286). Los resultados del dosaje de inhibina-B en los medios condicionados de cultivos testiculares humanos permiten concluir que la inhibina-B es producida por células testiculares humanas prepúberes en cultivo y que la secreción de inhibina-B disminuye con la edad durante el primer año de vida en condiciones *in vitro* de manera similar a lo observado *in vivo*. Se observa que la estimulación crónica con FSH incrementa la secreción de inhibina-B en células testiculares humanas prepúberes entre 1 y 9 meses de

edad. La falta de respuesta a LH observada *in vitro* sugiere que en los primeros meses de vida probablemente sólo la FSH estimule la síntesis de inhibina-B y que la inhibina-B podría ser considerada como un marcador de células de Sertoli inmaduras *in vitro*.

La correlación observada entre la secreción de testosterona y la de inhibina-B sugiere que hay una activación paralela sobre la función de las células de Leydig y de Sertoli durante el primer semestre de vida postnatal en ausencia de desarrollo espermatogénico.

El desarrollo de la técnica de subcultivos a partir de cultivos primarios de células testiculares prepúberes humanas y de la criopreservación, basado en el potencial mitótico de las células jóvenes y en su capacidad de diferenciarse *in vitro* permite obtener un material de estudio en forma permanente (225). Aunque los resultados presentados sean preliminares se podría afirmar que las células esteroideogénicamente activas provenientes de testículos prepúberes son viables en los subcultivos y luego de la criopreservación. Si bien, a lo largo de los subcultivos, se observa un enriquecimiento del cultivo en células fibroblásticas con la pérdida de la heterogeneidad celular característica del cultivo primario así como una disminución de la testosterona basal, el agregado de sustratos (colesterol o pregnenolona) permite afirmar la presencia de las enzimas de la biosíntesis de testosterona. Quedan por responder interrogantes como la capacidad de respuesta de los subcultivos al estímulo con LH, su modulación por otras hormonas o factores y la posibilidad de establecer líneas celulares a partir de los mismos.

El modelo experimental desarrollado en esta tesis demostró ser útil en el estudio de la fisiopatología de diversas alteraciones de la función testicular en los niños.

A partir de los resultados obtenidos *in vivo* y del estudio *in vitro* del cultivo de células testiculares provenientes de la orquidectomía de un paciente con síndrome de Smith-Lemli-Opitz que presentaba ambigüedad genital se puede concluir que los niveles basales de testosterona *in vivo* e *in vitro* fueron, paradójicamente, más elevados que lo normal en la edad prepuberal. Esto podría interpretarse como un retardo en la inhibición fisiológica del eje GnRH-LH-gonada que ocurre luego del primer trimestre de vida. Por otro lado, el inhibidor de la 7-DHC $\Delta 7$ reductasa fue capaz de inhibir la respuesta a LH en un cultivo de células testiculares control, produciendo una alteración similar a la observada en células testiculares del paciente con SLOS. El déficit de colesterol y/o el exceso de su precursor 7-dehidrocolesterol propios de este síndrome afecta la respuesta de la testosterona a LH *in vitro* y a hCG *in vivo* a pesar de que los valores basales son altos, mientras que la

respuesta a insulina y a FSH no estaría afectada. Este hallazgo podría explicar la ambigüedad genital presente en el paciente.

En el estudio del cultivo de células testiculares de un paciente con síndrome de insensibilidad a los andrógenos y de acuerdo a los datos obtenidos se puede concluir que el cultivo de células testiculares de un paciente con síndrome de insensibilidad a los andrógenos tiene capacidad de producir testosterona y tiene activa la enzima aromatasa, mientras que los cultivos de células testiculares de pacientes sin esta patología endocrina, tienen capacidad de producir testosterona pero no tienen activa la enzima aromatasa. Estas actividades funcionales son estimuladas por insulina. Se postula que la ausencia de receptor de andrógenos facilitaría la expresión de la actividad aromatasa.

Los tumores de células de Sertoli prepuberales suelen producir ginecomastia bilateral. Esto sugiere que las células tumorales son la fuente de estrógenos (287). También se observaron niveles anormalmente elevados de SHBG sérica. Esto podría ser una expresión del efecto de los estrógenos. En el paciente descrito con un tumor calcificante de células grandes de Sertoli (LCCSCT), la elevación de los andrógenos en suero correlaciona con la presencia de signos clínicos de comienzo de masculinización. Los estudios hormonales *in vivo* antes de la remoción del tumor indican ausencia de liberación de gonadotrofinas después de estimulación con GnRH, sugiriendo un bloqueo de las gonadotrofinas por parte de las hormonas sexuales y una actividad gonadal independiente de las mismas (288).

El examen microscópico muestra que el tumor estaba compuesto por células poligonales con abundante citoplasma eosinófilo y múltiples áreas de calcificación. Estas características son compatibles con el LCCSCT (239). Mas aún, se han visto múltiples focos de células tumorales intratubulares en túbulos seminíferos del parénquima testicular adyacente al nódulo tumoral. Otros túbulos tenían apariencia normal pero presentaban espermatogénesis temprana hasta estadio de espermatocono primario. Estas observaciones y la presencia de células de Leydig en áreas esparcidas en el intersticio son signos de iniciación de maduración testicular en el parénquima no tumoral. No se esperan signos histológicos de maduración testicular en niños normales menores a 10 años de edad. Puesto que los estudios *in vivo* han demostrado que la liberación de gonadotrofinas estaba bloqueada, es aceptable pensar que la estimulación independiente de gonadotrofinas se originó dentro de las gonadas. Se ha informado acerca de la estimulación de la espermatogénesis en túbulos vecinos a tumores de células de Leydig o de Sertoli (287, 152). Esto ha sido atribuido a un efecto local de las hormonas esteroideas. Sin embargo, considerando las evidencias de múltiples factores paracrinós dentro del testículo normal

(152) se puede pensar que las células tumorales secretan una variedad de factores (principalmente péptidos) los cuales podrían actuar localmente estimulando células intersticiales y tubulares inmaduras.

En resumen, la hipótesis, ilustrada en la figura C1, de que un factor trófico secretado por el tumor estimula tanto la diferenciación como la secreción de esteroides en el tejido testicular vecino está apoyada por las siguientes evidencias: 1) evidencias histológicas de maduración de células espermatogénicas y diferenciación de células de Leydig, 2) esteroidogénesis activa en cultivo, y 3) presencia de un factor soluble en el medio condicionado del tumor que estimula la secreción de testosterona en células testiculares control (288).

Estos efectos intercelulares podrían haber contribuido a la actividad hormonal de las gonadas: células tumorales podrían haber estimulado células intersticiales vecinas a diferenciarse a células de Leydig y secretar andrógenos, los cuales, a su vez, podrían haber sido aromatizados a estrógenos por las células tumorales. Estas interacciones célula-célula recuerdan la interacción célula granulosa-célula tecal para llevar a cabo la biosíntesis de estrógenos en el ovario normal (289).

El testículo constituye un sistema celular totalmente integrado. La regulación a nivel local, intragonadal es una parte integral de la regulación del desarrollo y del control funcional de la gonada masculina. La interacción extracelular dentro del testículo se extiende más allá del mismo tipo celular para incluir la interacción entre célula somática y célula germinal. Entre las señales utilizadas para la comunicación intercelular figuran los péptidos gonadales y se acepta que una alteración de la función ya sea durante el desarrollo ó en la vida adulta puede ser responsable de ciertos casos de infertilidad idiopática (75).

Si bien se ha descrito que el testículo prepúbere en primates, luego de una fase postnatal temprana de actividad, entra en un estado de quiescencia, Rey y col. en un estudio morfométrico, histológico y funcional llevado a cabo en mono *Cebus* durante la prepubertad describen que en los primeros cinco meses de vida y durante la pubertad el volumen del testículo aumenta debido al aumento del diámetro y de su longitud de los túbulos seminíferos. El número de espermatogonias aumenta hasta la pubertad tardía (203).

La hormona LH/hCG es absolutamente necesaria aunque no suficiente para el funcionamiento normal de las células de Leydig (1). Muchos factores producidos dentro del testículo pueden actuar sobre las células de Leydig ya sea regulando la esteroidogénesis

en forma aguda ó modulando las funciones diferenciadas de las células de Leydig y, entonces, su capacidad de respuesta a LH/hCG. Parecería que la principal acción de los factores producidos dentro del testículo es regular positiva ó negativamente las funciones diferenciadas de las células de Leydig. Los modelos *in vitro* de cultivo de células de Leydig aisladas ó de co-cultivos son de utilidad para generar datos acerca de la regulación multifactorial de células de Leydig, en éstos las células se encuentran en circuitos cerrados y la estructura testicular ha sido destruída. Por lo tanto la extrapolación de los datos *in vitro* a situaciones *in vivo* requiere cierta precaución antes de asignar una relevancia fisiológica a dichos datos. El rol *in vivo* de una proteína ó factor determinado se podría aproximar en estudios con animales transgénicos mediante la sobreexpresión ó la inactivación de un gen que codifique para dicho factor.

En fin ya que la célula de Leydig forma parte de un tejido complejo en el cual interacciones cruzadas entre los diferentes tipos celulares son necesarias para que el testículo lleve a cabo ambas funciones endocrina y exocrina, la regulación de las células de Leydig debe estar integrada con la de otras células somáticas y germinales vía un sistema de feedback corto.

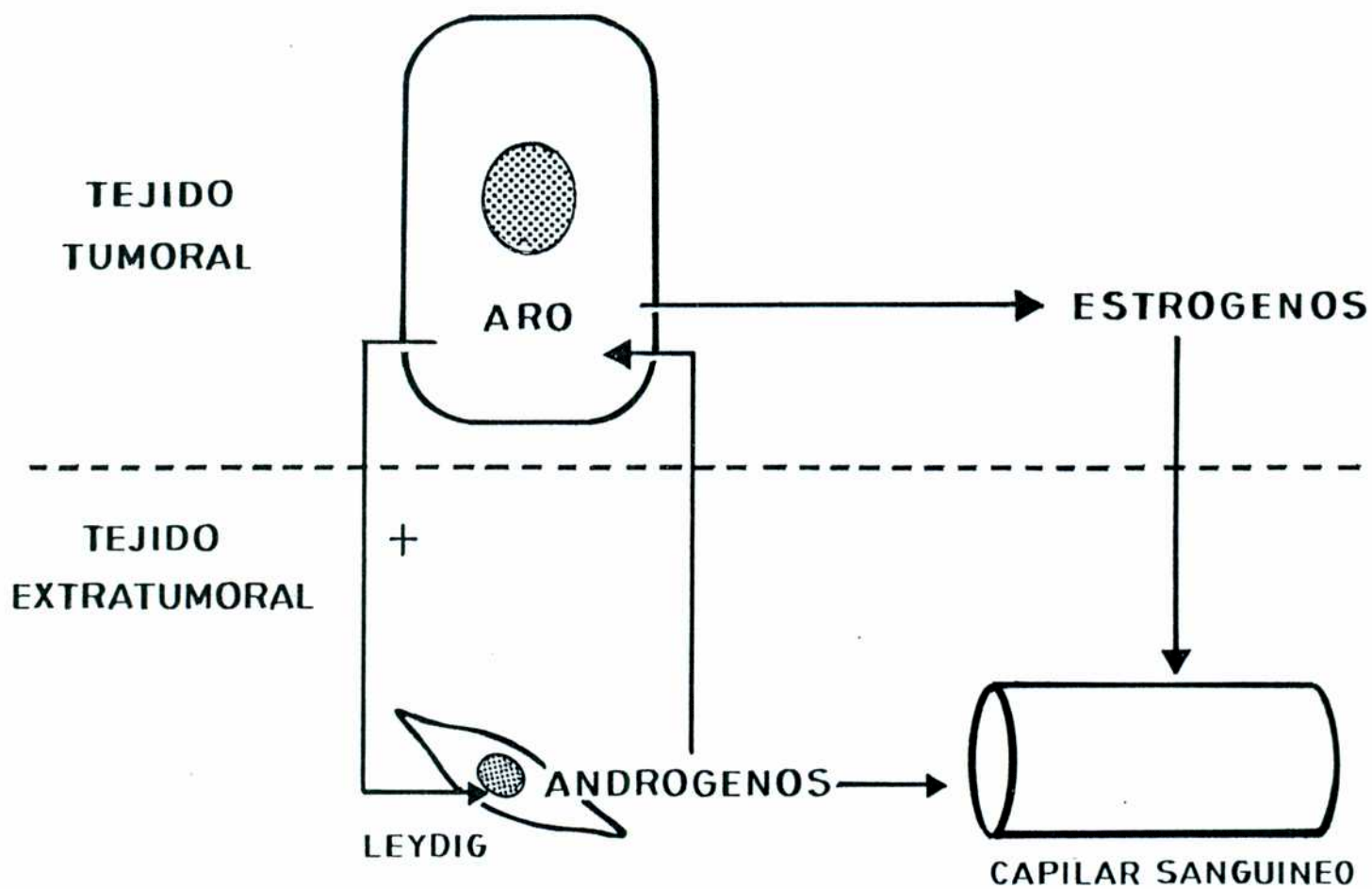


Figura C1 Hipótesis del mecanismo de acción de la célula de Sertoli tumoral sobre las células de Leydig vecinas

Conclusiones Finales

Dada la escasa información acerca de la esteroidogénesis del testículo humano prepúbere y de su modulación y contando con la posibilidad de realizar un proyecto de investigación con testículos provenientes de necropsias, se ha elegido la presente línea de estudio como tema de tesis doctoral.

Esta línea presenta características necesarias de puntualizar :

a-se trata de un sistema *in vitro* por lo cual toda conclusión que se obtiene del mismo debe extrapolarse con el cuidado necesario a la situación *in vivo*

b-se trata de cultivos primarios mixtos a partir de todas las poblaciones celulares presentes en el testículo que se siembran, se organizan e interactúan entre sí. Esta interacción facilita la función de la población de células esteroidogénicas ya que sucesivos subcultivos en los cuales una subpoblación celular de tipo fibroblástica prevalece a expensas de las demás presenta una caída en la capacidad esteroidogénica, tal como se observa en cocultivos de células de Leydig y de Sertoli versus células de Leydig en cerdo y en humano adulto (141, 142).

Este modelo de estudio cuenta con la desventaja con respecto al cultivo de células de origen animal que la fuente de testículos no es un conjunto de animales endocriados, de la misma edad y sacrificados en el momento justo. Cada una de las muestras de testículos provenientes de necropsia corresponde a un individuo diferente, con características genómicas, edad y patología propia. Si bien se han seleccionado aquellas muestras que no posean una aparente enfermedad endocrina ó metabólica. El estudio con muestras obtenidas de necropsias tienen la dificultad del intervalo entre la muerte y la necropsia y entre ésta y el tenerla en el laboratorio para comenzar a trabajar. Varias muestras se han desechado debido al excesivo tiempo ó a permanecer a temperatura ambiente y no en heladera hasta el momento de su entrega al laboratorio de cultivo celular.

El presente es un modelo experimental para estudiar la respuesta de células testiculares humanas prepúberes a una variedad de estímulos. También permite comparar la fisiología celular de cultivos preparados a partir de niños de distintas edades. Así se puede comparar la secreción de testosterona y sus precursores en cultivos de células testiculares obtenidas de niños desde 1 día de vida hasta 15 años.

En la propia dificultad del modelo elegido reside su originalidad, la ventaja de la escasa información y el haber descubierto que, en condiciones óptimas de manutención-esterilidad, asepsia, frío- el material proveniente de testículos de necropsia es una fuente de información nueva y original para el estudio de la fisiología de la prepubertad testicular humana.

A su vez, factores paracrinós podrían jugar un rol en la función testicular en la vida sana y en enfermedades. Se ha tenido la oportunidad de estudiar el efecto del medio condicionado de un tumor de células de Sertoli sobre una monocapa de células testiculares subcultivadas, aisladas de un paciente control. El medio condicionado fue capaz de estimular la secreción de testosterona de manera similar a la LH sugiriendo que las células tumorales secretaron un factor paracrino que tuvo un efecto estimulador sobre las células de Leydig. Mecanismos similares pueden explicar algunos de los efectos de los tumores gonadales sobre la función gonadal.

Finalmente, así como los niveles séricos de LH, FSH, GH y prolactina son mayores durante los primeros meses de vida que en los meses posteriores, este estudio avala la posibilidad de que la activación postnatal temprana del testículo estaría bajo múltiples influencias de hormonas pituitarias.

BIBLIOGRAFIA

1. Saez JM 1994 Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine Reviews*, 15(5):574-626
2. Conn MP, Tsuruhara T, Dufau ML, Catt KJ 1977 Isolation of highly purified Leydig cells. *Endocrinology* 101: 639-642
3. Labrie F, Simard J, Luu-The V, Belanger A, Pelletier G 1992 Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 805-820
4. Luu-The V, Labrie C, Simard J, Lachance Y, Zhao HF, Lovet J, Labrie F 1990 Structure of two tandem human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase genes. *Mol Endocrinol* 4: 268-275
5. Witschi E 1948 Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Carnegie Contr Embryol* 32: 67-80
6. Mintz B 1960 Embryological phases of mammalian gametogenesis. *J Cell Comp Physiol* 56(1):31-47
7. Witschi E 1956 Development of vertebrates. Saunders, Philadelphia
8. Witschi E 1951 Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands. In: Pincus G ed. *Rec Progr Hormone Res* 6 Academic Press, New York, 1-27
9. Dardis A, Saraco N, Mendilaharsu H, Rivarola M, Belgorosky 1997 Report of an XX male with Hipospadias and Pubertal Gynecomastia, SRY gene negative in Blood Leukocytes but SRY Gene Positive in Testicular Cells. *Horm Res* 47 : 85-88
10. Pelliniemi LJ, Niemi M 1969 Fine structure of the human foetal testis. The interstitial tissue. *Zellforsch* 99: 507-522
11. Audi L, Reventós J, Saez JM 1994 Hormonal control of sex differentiation in: *Textbook Intersexual states. Disorders of sex differentiation*. Martinez-Mora J. Doyma ed, S.A., Spain

12. Jost A 1985 Initial stages of gonadal development. *Archiv Anat Micr Morphol Exper* 74: 39-41
13. Jost A, Valentino O, Agelopoulou R, Magre S 1985 Action d'un analogue de la proline (acide lázetidine-2-carboxylique) sur la differentiation in vitro du testicule foetal du rat. *C R Acad Sci Paris* 301:225-232
14. Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ 1992 Fetal Leydig cells:Cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *P S E B M* 201: 125-140
15. Niemi M, Ikonen M, Hervonen A 1967 Histochemistry and fine structure of the interstitial tissue in the human foetal testis. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M, Eds. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. Endocrinology of the Testis. London:J&A Churchill, London, vol 16: 31-55
16. Huhtaniemi I, Korenbrot CC, Jaffe RB 1977 hCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol & Metab* 44:963-967
17. Codesal J, Regadera J, Nistal M, Regaderasejas J, Paniagua R 1990 Involution of human fetal Leydig cells- An immunohistochemical, ultrastructural and quantitative study. *J Anat* 72:103-114
18. Reyes FI, Winter JSD, Faiman C 1989 Endocrinology of the fetal testis. In: Burger H., de Krester D., Eds. *The Testis*, (2nd ed). New York: Raven Press :119-142
19. Kuopio T, Paranko J, Pelliniemi LJ 1989 Basement membrane and epithelial features of fetal-type Leydig cells in rat and human testis. *Differentiation* 40:198-206
20. Dechelotte P, Chassagne J, Labbe A, Afane M, Scheye T, Laquillaumie B, Boucher D 1989 Ultrastructural and immunohistochemical evidence of in situ differentiation of mononuclear phagocyte system cells in the interstitium of human fetal testis. *Early Hum Dev* 20:25-36
21. Huston JC 1990 Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol Reprod* 43: 885-890
22. Huhtaniemi I 1994 Fetal testis : a very special organ. *Eur J of Endocr* 130:25-31

23. Lee MM, Donahoe PK 1993 Mullerian inhibiting substance : a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev* 14:152-164
24. Warren DW, Huhtaniemi I, Tapanainen J, Dufau ML, Catt KJ 1984 Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology* 114:470-476
25. Catt KJ, Harwood JP, Clayton RN, Davies TF, Chan V, Katikineni M, Nozu K, Dufau ML 1980 Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Recent Prog Horm Res* 36:557-622
26. Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML 1976 The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: Maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. *Recent Prog Horm Res* 32:161-243
27. Beck-Peccoz P, Padmanabhan V, Paggiani AM, Cortelazzi D, Buscaglia M, et al. 1991 Maturation of hypothalamic-pituitary-gonadal function in normal human fetuses: Circulating levels of gonadotropins, their alpha-subunit and free testosterone, and discrepancy between immunological and biological activities of circulating follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 73:525-532
28. Abramovich PR, Baker TG, Neal P 1974 Effect of human chorionic gonadotropin on testosterone secretion by the foetal human testis in organ culture. *J Endocrinol* 60:179-185
29. Risbridger GD, de Krester DM 1989 Paracrine regulation of the testis. In: Burger H., de Krester D., Eds. *The Testis* (2nd ed). New York: Raven Press: 225-268
30. Siiteri PK, Wilson JD 1974 Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab* 38:113-125
31. Tapanainen J, Kellokumpu-Lehtinen P, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi Y 1981 Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 98-102
32. Voutilinen R, Miller WL 1986 Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc(20,22-desmolase), P450c17(17-hydroxylase/17,20-lyase), and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1145-1150

33. Huhtaniemi Y, Ikonen M, Vihko R 1970 Presence of testosterone and other neutral steroids in human fetal testes. *Biochem Biophys Res Commun* :1715-1720
34. Ruokonen A, Laatikainen T, Laitinen EA, Vihko R 1972 Free and sulfate-conjugated neutral steroids in human testis tissue. *Biochemistry* 11:1411-1416
35. Dufau ML 1988 Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu Rev Physiol* 50:483-508
36. Pakarinen P, Vihko KK, Voutilainen R, Huhtaniemi Y 1990 Differential response of luteinizing hormone receptor and steroidogenic enzyme gene expression to human chorionic gonadotropin stimulation in the neonatal and adult rat testes. *Endocrinology* 127:2469-2474
37. Tapanainen J, Voutilainen R, Jaffe RB 1989 Low aromatase activity and expression in human fetal testis. *J Steroid Biochem* 33:7-11
38. George FW, Carr BR, Noble JF, Wilson JD 1987 5 α -reduced androgens in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 628-630
39. Bardin CW, Chen C-LC, Morris PL, Gerendai I, Boitani C et al 1987 Proopiomelanocortin-derived peptides in testis, ovary and tissues of reproduction. *Recent Prog Horm Res* 43:1-28
40. Fabbri A, Knox G, Ruczko E, Dufau ML 1988 Beta-endorphin production by the fetal Leydig cell: regulation and implications for paracrine control of Sertoli cell function. *Endocrinology* 122:749-755
41. Hsueh AJW, Dahl KD, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin CW, Vale W 1987 Heterodimers and Homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5082-5086
42. Brennemann W, Klingmuller D, Eter N, Bidlingmaier F 1995 Immunoreactive inhibin concentrations in human gonads and adrenals during the first years of life. *Horm Res* 44:115 -120
43. Massague J, Pandiella A 1993 Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62:515-542

44. Byyny RL, Orth DN, Cohen S 1972 Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* 90:1261-1266
45. Bartlett JM, Spiteri-Grech J, Nieschlag E 1990 Regulation of insulin-like growth factor I and stage-specific levels of epidermal growth factor in stage synchronized rat testes. *Endocrinology* 127:747-758
46. Elson SD, Browne CA, Thorburn GD 1984 Identification of epidermal growth factor-like activity in human male reproductive tissues and fluids. *J Clin Endocrinol Metab* 58:589-594
47. Radhakrishnan B, Oke BO, Papadopoulos V, Diagustine RP, Suarez-Quian CA 1992 Characterization of epidermal growth factor in mouse testis. *Endocrinology* 131:3091-3099
48. Skinner MK, Takacs K, Coffey RJ 1989 Transforming growth factor- α gene expression and action in the seminiferous tubule :peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Endocrinology* 124:845-854
49. Teerds KJ, Rommerts FFG, Dornington JH 1990 Immunohistochemical detection of transforming growth factor- α in Leydig cells during the development of the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 69:R1-R6
50. Stubbs SC, Hargreave TB, Habib FK 1990 Localization and characterization of epidermal growth factor receptors on human testicular tissue by biochemical and immunohistochemical techniques. *J Endocrinol* 125:485-492
51. Suarez-Quian CA, Dai M, Onoda M, Kriss RM, Dym M 1989 Epidermal growth factor receptor localization in the rat and monkey testes. *Biol Reprod* 41:921-932
52. Suarez-Quian CA, Niklinski W 1990 Immunocytochemical localization of the epidermal growth factor receptor in mouse testis. *Biol Reprod* 43:1087-1097
53. Ascoli M, Euffa J, Segaloff DL 1987 Epidermal growth factor activates steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells without affecting the levels of cAMP and potentiates the activation of steroid biosynthesis by chorionic gonadotropin and cAMP. *J Biol Chem* 262:9196-9203

54. Majerick MH, Puett D 1991 Epidermal growth factor modulates intracellular arachidonic acid levels in MA-10 cultured Leydig tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 75:247-256
55. Welsh TH, Hsueh AJW 1982 Mechanism of the inhibitory action of epidermal growth factor on testicular androgen biosynthesis in vitro. *Endocrinology* 110:1498-1506
56. Burgess WH, Maciag T 1989 The heparin-binding (fibroblast), growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58:575-606
57. Partanen J, Makela TP, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Claesson-Welsch L, Alitalo 1991 FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J* 10:1347-1354
58. Werner S, Duan DSR, Vries C, Peters KG, Johnson DE, Williams LT 1992 Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor-I generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol Cell Biol* 12:82-88
59. Gospodarowicz D 1990 Fibroblast growth factor and its involvement in developmental processes. *Curr Top Dev Biol* 24:57-93
60. Story MT, Sassee J, Kakuska D, Jacobs SC, Lawson KL 1988 A growth factor in bovine and human testes structurally related to basic fibroblast growth factor. *J Urol* 140:422-427
61. Ueno N, Baird A, Esch F, Ling N, Guillemin R 1987 Isolation and partial characterization of basic fibroblast growth factor from bovine testis. *Mol Cell Endocrinol* 49:189-194
62. Mullaney BP, Skinner MK 1992 Basic fibroblast growth factor(bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule : follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology* 131:2928-2934
63. Smith EP, Hall SH, Monaco L, Frencj FS, Wilson EM, Conti M 1989 A rat Sertoli cell factor similar to basic fibroblast growth factor increases c-fos messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 3:954-961
64. Han IS, Sylvester SR, Kim KU, Schelling ME, Venkateswaran S, Blankaert ND, McGuinness MP, Griswold MD 1993 Basic fibroblast growth factor is a testicular cell product which may regulate Sertoli cell function. *Mol Endocrinol* 7:889-897

65. Jaillard C, Chatelain PG, Saez JM 1987 In vitro regulation of pig Sertoli cell growth and function: effects of fibroblast growth factor and somatomedin-c. *Biol Reprod* 37:665-674
66. Fauser BCJM, Baird A, Hsueh AJW 1988 Fibroblast growth factor inhibits luteinizing hormone-stimulated and androgen production by cultured rat testicular cells. *Endocrinology* 123:2935-2941
67. Murono EP, Washburn AL 1990 Basic fibroblast growth factor inhibits $\Delta 5$ - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in cultured immature Leydig cells. *Biochem Biophys Res Commun* 168:248-253
68. Murono EP, Washburn AL 1990 Fibroblast growth factor inhibits 5- α reductase activity in cultured immature Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 68:R19-R23
69. Murono EP, Washburn AL, Golforth DP, Wu N 1993 Biphasic effect of basic fibroblast growth factor on 125 I-human chorionic gonadotrophin binding in cultured immature Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 92:121-126
70. Murono EP, Washburn AL, Golforth DP, Wu N 1993 Effects of acidic fibroblast growth factor on $\Delta 5$ - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase and 5- α reductase activities and (125 I)-human chorionic gonadotrophin binding in cultured immature Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45:477-483
71. Sordolilet C, Chauvin MA, Revol A, Morera AM, Benhamed M 1988 Fibroblast growth factor is a regulator of testosterone secretion in cultured immature Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 58:283-286
72. Hall SH, Berthelon MC, Avallet O, Saez JM 1991 Regulation of c-fos, c-jun, jun-B and c-myc messenger ribonucleic acids by gonadotropin and growth factors in cultured pig Leydig cells. *Endocrinology* 129:1243-1249
73. Avallet O, Vigier M, Chatelain PG, Saez JM 1991 Regulation by growth factors of Leydig cells differentiated functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:453-464
74. Raeside JI, Berthelon MC, Sanchez P, Saez JM 1988 Stimulation of aromatase activity in immature porcine Leydig cells by fibroblast growth factor (FGF) *Biochem Biophys Res Commun* 151:163-169

75. Gnassi L, Fabbri A, Spera G 1997 Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 18(4):541-608
76. Vannelli BG, Natali A, Barni T, Serio M, Orlando C, Balboni G 1988 Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis : an immunohistochemical study. *Fertil Steril* 49:666-669
77. Tress LL, Smith EP, Van Wyk JJ, Kierszenbaum AL 1985 Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Exp Cell Res* 162:33-50
78. Hansson H-A, Billig H, Isgaard J 1989 Insulin-Like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biol Reprod* 40:1231-1238
79. Forti G, Barni T, Vannelli BG, Balboni GC, Orlando C, Serio M 1989 Sertoli cell proteins in the human seminiferous tubule. *J Steroid Biochem* 32:135-144
80. Casella SJ, Smith EP, van Wyk JJ, Joseph DR, Hynes MA, Hoyt EC, Lund PK 1987 Isolation of rat testis cDNAs encoding an insulin-like growth factor 1 precursor. *DNA* 6:325-330
81. Lin T, Wang D, Calkins JH, Guo H, Chi R, Housley PR 1990 Regulation of insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 73:147-152
82. Closset J, Gothot A, Sente B, Scippo ML, Igout A, Vandanbroeck M, Dombrowicz D, Hennen G 1989 Pituitary hormone dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol Endocrinol* 89:1125-1131
83. Spiteri-Grech J, Weinbauer GF, Bolze P, Chandolia RK, Bartlett JMS, Nieschlag E 1993 Effects of FSH and testosterone on intra-testicular IGF-I and specific germ cell populations in rat treated with a GnRH antagonist. *J Endocrinol* 137:81-89
84. Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG 1987 Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120:1279-1282

85. Naville D, Chatelain PG, Avallet O, Saez JM 1990 Control of production of insulin-like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. Cell-cell interactions. Mol Cell Endocrinol 70:217-224
86. Clark AM, Samaras SE, Hammond JM, Hagen DR 1994 Changes in the messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factor-I and -II in the porcine testis during and between two waves of testicular development. Biol Reprod 50:993-999
87. Zhou J, Bondy C 1993 Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis. Fertil Steril 60:897-904
88. Borland K, Mita M, Oppenheimer CL, Blinderman LA, Massague J, Hall PF, Czech MP 1984 The actions of the insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. Endocrinology 114:240-246
89. Oonk RB, Grootegoed JA 1988 Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. Mol Cell Endocrinol 55:33-43
90. Perrard-Sapori MH, Chatelain PG, Jaillard C, Saez JM 1987 Characterization and regulation of somatomedin-C/insulin-like growth factor I (SmC/IGF-I) receptors on cultured pig Leydig cells. Effects of SmC/IGF-I on luteotropin receptor and steroidogenesis. Eur J Biochem 165:209-214
91. Khan S, Teerds K, Dorrington J 1992 Growth factors requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. Biol Reprod 46:335-341
92. Saez JM, Sanchez P, Avallet O 1992 Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase and 17 α -hydroxylase cytochrome P450 mRNAs in cultured porcine Leydig cells. Program of the 7th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, 1992 (Abstract 26)

93. Lin T, Vinson N, Haskett J, Muroso EP 1987 Induction of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity by insulin-like growth factor-I in primary culture of purified Leydig cells. *Adv Exp Biol Med* 219:603-607
94. Saez JM, Chatelain PG, Perrard-Sapori MH, Jaillard C, Naville D 1988 Differentiating effects of somatomedin C/insulin-like growth factor I and insulin on Leydig and Sertoli cell functions. *Reprod Nutr Dev* 28:989-1008
95. Laron Z 1984 Laron-type dwarfism (hereditary somatomedin deficiency) A Review. *Adv Int Med Pediat* 51:117-140
96. Hochereau-de Reviers MT, de Reviers MM, Monet-Kuntz C, Perreau C, Fontaine Y, Viguier-Martinez MC 1987 Testicular growth and hormonal parameters in the male Snell dwarf mouse. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115:399-405
97. Massague J 1990 The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641
98. Chen RH, Ebner R, Derynck R 1993 Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- β activities. *Science* 260:1335-1338
99. Skinner MK, Moses HL 1989 Transforming growth factor- β gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interaction. *Mol Endocrinol* 3:625-634
100. Mullaney BP, Skinner MK 1993 Transforming growth factor- β ($\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 3$) gene expression and action during pubertal development of the seminiferous tubule: potential role at the onset of spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 7:67-76

101. Watrin T, Scotto L, Assoian RK, Wolgemuth DJ 1991 Cell lineage specificity of expression of the murine transforming growth factor- β 3 and transforming growth factor- β 1 genes. *Cell Growth Differ* 2:77-83
102. Avallet O, Vigier M, Leduque P, Dubois PM, Saez JM 1994 Expression and regulation of transforming growth factor- β 1 mRNA and protein in cultured porcine Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* 134:2079-2087
103. Morera AM, Cochet C, Keramidas M, Chavin MA, De Peretti E, Benhamed M 1988 Direct regulating effects of transforming growth factor- β on the Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *J Steroid Biochem* 30:443-447
104. Lin T, Blaisdell J, Haskell JF 1987 Transforming growth factor-B inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 146:387-394
105. van Bebakar NM, Honour J, Foster D, Lin YL, Jacobs HS. 1990 Regulation of testicular functions by insulin and transforming growth factor. *Steroids* 55:266-270
106. Meidan R, Lim P, Mc Allister JM, Hsueh AJW 1985 Hormonal regulation of androgen biosynthesis by primary cultures of testis cells from neonatal rats. *Endocrinology* 116:2473-2482
107. Muroso EF, Washburn AL 1990 Platelet derived growth factor inhibits 5α -reductase and $\Delta 5$ - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activities in cultured immature Leydig cells. *Biochem Biophys Res Commun* 169:1229-1234
108. Gnessi L, Emidi A, Farini D, Scarpa S, Modesti A, Ciampani T, Silvestroni L, Spera G 1992 Rat Leydig cells bind platelet-derived growth factor through specific receptors and produce platelet-derived growth factor molecules. *Endocrinology* 130:2219-2224

109. Levi-Montalcini R 1987 The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162
110. Ayer-Lelièvre C, Olson L, Ebendal T, Hallbook P, Persson H 1988 Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2628-2632
111. Persson H, Ayer-Lelièvre C, Soder O, Villar MJ, Metsis M, Olson L, Ritzen M, Hokfelt T 1990 Expression of β -nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone. *Science* 247:704-707
112. Seidl K, Holstein AF 1990 Organ culture of human seminiferous tubules: a useful tool to study the role of nerve growth factor in the testis. *Cell Tissue Res* 261:539-547
113. Khan S, Soder O, Syed V, Gustafsson K, Lindh M, Ritzén EM 1987 The rat testis produces large amounts of an interleukin-1 like factor. *Int J Androl* 10:494-503
114. Gerard N, Syed V, Barbin W, Genetet N, Jégou B 1991 Sertoli cells are the site of interleukin-1 α synthesis in the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 82:R13-R16
115. Lin T, Wang D, Nagpal L 1993 Human chorionic gonadotropin induces interleukin-1 gene expression in the rat Leydig cell *in vivo*. *Mol Cell Endocrinol* 95:139-145
116. Hales DB, Xiong Y, Tur-Kaspa Y 1992 The role of cytokines in the regulation of Leydig cell P450c17 gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:907-914
117. Hales DB 1992 Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis primarily by decreasing 17 α -hydroxylase/C17-C20 lyase cytochrome P450 expression. *Endocrinology* 131:2165-2172
118. Takao T, Mitchell WM, Tracey DE, De Souza EB 1990 Identification of interleukin-1 receptors in mouse testis. *Endocrinology* 127:251-258

119. Calkins JH, Sigel MM, Nankin HR, Lin T 1988 Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology* 123:1605-1610
120. Fauser BCJM, Galway AB, Hsueh AJW 1989 Inhibitory actions of interleukin-1 β on steroidogenesis in primary cultures of neonatal rat testicular cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 120:401-408
121. Moore C, Moger WH 1991 Interleukin-1 α -induced changes in androgen and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate release in adult rat Leydig cells in culture. *J Endocrinol* 129:381-390
122. Mauduit C, Chauvin MA, Hartmann DJ, Revol A, Morera AM, Benahmed M 1992 Interleukin-1 α as a potent inhibitor of gonadotropin action in porcine Leydig cells: site(s) of action. *Biol Reprod* 46:1119-1126
123. Warren DW, Pasupuleti V, Lu Y, Platler BW, Horton R 1990 Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells *in vitro*. *J Androl* 11:353-360
124. Xiong Y, Hales DB 1993 The role of tumor necrosis factor- α in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis *Endocrinology* 132:2438-2444
125. De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, Enders GC 1993 Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 133:389-396
126. Martinez-Mora J 1994 Textbook Intersexual States- Disorders of sex differentiation. Doyma de., S.A., Spain
127. Forest MG, de Peretti E, Bertrand J 1976 Hypothalamic- pituitary-gonadal relationship in human from birth to puberty *Clin Endocrinol* 5:551-569

128. Huhtaniemi I, Warren DW 1990 Ontogeny of pituitary- gonadal interactions. Recent advances and controversies. *Trends Endocrinol Metab* 1:356-362
129. Mann DR, Akinbami MA, Gould KG, Tanner JM, Wallen K 1993 Neonatal treatment of male monkeys with a gonadotropin-releasing hormone agonist alters differentiation of central nervous system centers that regulate sexual and skeletal development. *J Clin Endocrinol Metab* 76(2):1319-1324
130. Saez JM, Tabone E, Perrard-Sapori MH, Chatelain PG 1987 Regulation of testicular functions. *Coll Soc Etudes Fertil* 25:51-67
131. Jégou B 1992 The Sertoli cell in vivo and in vitro .*Cell Biology and Toxicology* 8(3):49-54
132. Ploen L, Setchell RP 1992 Blood-testis barriers revisited. An homage to Lennart Nicander. *Int J Androl* 15:1-4
133. Dym M, Faucett DW 1970 The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308-326
134. Jégou B 1992 The Sertoli Cell. *Balliere`s Clin Endocrinol Metab* 6:273-311
135. Weiss L 1986 *Histología, Biología Celular y Tisular*. El Ateneo (ed) 5ta edición. Buenos Aires, Argentina
136. Steinberger A and Steinberger E 1971 Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture *Biol Reprod* 4:84-87
137. Griswold MD, Solari A, Tung PS, Fritz IB 1977 Stimulation by Follicle-stimulating hormone of DNA synthesis of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from testis of immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 7:151-165

138. Jégou B, Le Magueresse B, Sourdain P et al. 1988 Germ cell- Sertoli cell interactions in vertebrates. In: Cooke B.A., Sharpe R.M. eds. The molecular and cellular endocrinology of the testis. vol 50. New York: Raven Press, 255-270
139. Foucault P, Carreau S, Kuczynski W, Guillaumin JM, Bardos P, Drosowsky MA 1992 Human Sertoli cells *in vitro*. Lactate, Estradiol-17 β and transferrin production. J Androl 13:361-367
140. Payne AH, Kelch RP, Musich SS, Halpern ME 1976 Intratesticular site of aromatization in the human. J Clin Endocrinol Metab 42:1081-1087
141. Tabone E, Benhamed M, Reventos J, Saez JM 1984 Interaction between immature porcine Leydig and Sertoli cells in vitro. Ultrastructural and biochemical study. Cell Tissue Res 237:357-362
142. Lejeune H, Skalli M, Sanchez P, Avallet O, Saez JM 1993 Enhancement of testosterone secretion by normal adult human Leydig cells by co-culture with enriched preparations of normal adult human Sertoli cells. Int J of Androl 16 :27-34
143. Jégou B, Sharpe RM 1993 Paracrine mechanisms in testicular control. Mol Biol of the Male Reproductive System, Academic Press Inc :271-310
144. Paranko J, Pelliniemi LJ, Vaheri A, Foidart JM, Lakkala-Paranko T 1983 Morphogenesis and fibronectin in sexual differentiation of rat embryonic gonads . Differentiation (suppl) 23:72-81
145. Bresler RS, Ross MH 1972 Differentiation of peritubular myoid cells of the testis: Effects of intratesticular implantation of newborn-mouse testis into normal and hypophysectomized adults. Biol Reprod 6:148-159

146. Tung PS, Fritz IB 1986 Extracellular matrix components and testicular peritubular cells influence the rate and pattern of Sertoli cell migration in vitro. *Dev Biol* 113:119-134
147. Tung PS, Fritz IB 1986 Cell-substratum and cell-cell interactions promote testicular peritubular myoid cell histotypic expression in vitro. *Dev Biol* 115:155-170
148. Skinner MK, Norton JN, Mullaney BP, Rosselli M, Whelley PD and Anthony CT 1991 Cell-cell interactions and the regulation of testis function. *Ann N Y Acad Sci* 637:354-363
149. Cooke PS, Porcelli J, Hess RA 1992 Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biol Reprod* 46:146-154
150. van Haaster LH, de Jong FH, Doctor R, de Rooij DG 1992 The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology* 131:1574-1576
151. Kahn SA, Keck C, Gudermann T and Neischlag E 1990 Isolation of a protein from human ovarian follicular fluid which exerts major stimulatory effects on in vitro steroid production of testicular, ovarian and adrenal cells. *Endocrinology* 126:3043-3052
152. Saez JM, Avallet O, Naville D, Perrard-Sapori MH and Chatelain PG 1989 Sertoli-Leydig cell communications *Ann N Y Acad Sci* 564:210-231
153. De Reviers H, De Reviers MM, Monet-Kuntz C, Perreau C, Fontaine Y and Viguier-Martinez C 1987 *Acta Endocrinol* 115:399-405
154. Naville D, Chatelain PG, Avallet O, Saez JM 1990 Control of production of insulin-like growth factor 1 by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. Cell-cell interactions. *Molec Cell Endocrinol* 70:217-224

155. Payne AH, Youngblood GL 1995 Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod* 52:217-225
156. Rivarola MA and Belgorosky A 1994 Enzyme deficiencies in testosterone biosynthesis in: *Textbook Intersexual States- Disorders of sex differentiation*. Martinez-Mora J. Doyma de., S.A., Spain, pp 215-217
157. Stocco DM, Clark BJ 1997 The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis. *Steroids* 62 :29-36
158. Clark BJ, Stocco DM 1994 Cloning and expression of the steroidogenic acute regulatory (STAR) protein. *Endocr Soc* 399 (Abstract 764)
159. Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM 1994 The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 269 :28314-28322
160. Papadopoulos V. 1993 Peripheral-type benzodiazepine/Diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 14(2) :222-240
161. Amri H, Drieu K, Papadopoulos V. 1997 Ex vivo regulation of adrenal cortical cell steroid and protein synthesis, in response to adrenocorticotrophic hormone stimulation, by the Ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolide B. *Endocrinology* 138(12):5415-5426
162. Nolan CJ, Payne AH 1990 Genotype at the P450_{scc} locus determines differences in the amount of P450_{scc} protein and maximal testosterone production in mouse Leydig cells. *Mol Endocrinol* 4:1459-1464
163. Voutilainen R, Miller WL 1986 Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450_{scc}(20,22-desmolase), P450_{c17}(17 α -hydroxylase/17,20-

- lyase), and P450_{c21} (21-hydroxylase) in the human fetus. *J Clin Endocrinol & Metab* 63:1145-1150
164. Orava M, Voutilainen R, Vihko R 1989 Interferon-gamma inhibits steroidogenesis and accumulation of mRNA of the steroidogenic enzymes P450_{scc} and P450₁₇ cultured porcine cells. *Mol Endocrinol* 3:887-894
165. Yanaihara T, Troen P 1972 Studies of the human testis. Biosynthetic pathways from androgen formation in human testicular tissue in vitro. *J Clin Endocrinol & Metab* 34:783-792
166. Ewing LL, Cochran C, Zirkin B, Chubb CE 1980 Steroid synthesis and secretion by in vivo perfused rat, rabbit, dog, guinea pig and hamster testes. In: Steinberger A., Steinberger E. (eds.) *Testicular Development, Structure and Function*. Raven press, New York, pp 117-127
167. Fevold HR, Lorence MC, Mc Carthy JL, Trant J, Kagimoto M, Waterman MR and Mason JI 1989 Rat P450-17 α from testis :characterization of a full lenght cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both $\Delta 4$ and $\Delta 5$ -steroid-17,20-lyase reaction. *Mol Endocrinol* 3:968-975
168. Labrie F Simard J, Luu-The V, Pelletier G, Bélanger A 1992 Cloning, expression and regulation of tissue-specific expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ - $\Delta 4$ isomerase in Cellular and Molecular Biology of the adrenal cortex. Eds J M Saez, A C Brownie, Acapponi, E M Chambaz, F Mantero. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext LTD, vol 222, pp 89-109
169. Rhéaume E, Lachance Y, Zhao H-F, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, Trudel C, Luu-The V, Simard J, Labrie F 1991 Structure and expression of a new complementary

- DNA encoding the almost exclusive 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* 5:1147-1157
170. Kominami S, Shinzawa K, Takemori S 1982 Purification and some properties of cytochrome P-450 specific for steroid 17α -hydroxylation and C17-C20 bond cleavage from guinea pig adrenal microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 109:916- 921
171. Montminy MR 1993 Control of transcription and cellular proliferation by cAMP. In: Karin M(ed). *Gene Expression . General and Cell-Type Specific*. Boston: Birkhauser,pp 76-92
172. Youngblood GL, Payne AH 1992 Isolation and characterization of the mouse P450 17α -hydroxylase/C17-20 lyase gene (CYP 17): transcriptional regulation of the gene by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in MA-10 Leydig cells. *Mol Endocrinol* 6:927-934
173. Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan M-P, Parker KL 1993 Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 7:852-860
174. Lala DS, Rice DA, Parker KL 1992 Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor 1. *Mol Endocrinol* 6:1249-1258
175. Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White BA 1993 Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol* 7:776-786

176. Kagawa N, Ogo A, Takahashi Y, Iwamatsu A, Waterman MR 1994 A cAMP-regulatory sequence (CRS 1) of CYP17 is a cellular target for the homeodomain protein Pbx 1. *J Biol Chem* 269:18716-18719

177. Payne AH, Youngblood GL, Burgos-Trinidad M, Bain PA 1994 Characterization, regulation and tissue-specific expression of steroidogenic enzymes. In: Bartke A (de), *Function of Somatic Cells in the Testis*. New York:Springer-Verlag, pp 109-125

178. Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Bendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Anderson S 1994 Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nature Genet* 7:34-39

179. Wu L, Einstein M, Geissler WM, Chan HK, Elliston KO, Andersson S 1993 Expression, cloning and characterization of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 268:12964-12969

180. de Jong FH, Hey AH, van der Molen HJ 1974 Estradiol-17 and testosterone in rat testis tissue: effect of gonadotrophins, localization and production in vitro. *J Endocrinol* 60:409-418

181. Benhamed M., Bernier M., Ducharme J.R., Saez J.M. 1992 Steroidogenesis of cultured purified pig Leydig cells : secretion and effects of estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 28 (3) :705-716

182. Nozu K, Matsuura S, Catt KJ, Dufau ML 1981 Modulation of Leydig cell androgen biosynthesis and cytochrome P-450 levels during estrogen treatment and human chorionic gonadotropin-induced desensitization. *J Biol Chem* 256:10012-10017

183. Dufau M L, Miyagawa Y, Takada S, Khanum A, Miyagawa H, and Buczko E 1997
Regulation of androgen synthesis : The late steroidogenic pathway. *Steroids* 62:128-132

184. Tsai-Morris Ch-H, Knox G, Luna S, Dufau ML 1986 Acquisition of estradiol-mediated
regulatory mechanism of steroidogenesis in cultured fetal rat Leydig cells *J Biol Chem*
261(8):3471-3474

185. Wilson JD 1978 Sexual differentiation. *Annu Rev Physiol* 40:279-306

186. Payne AH, Chase DJ, O'Shaughnessy PJ 1982 Regulation of steroidogenesis in
Leydig cell. In: Conn PM (ed) *Cellular Regulation of Secretion and release*. Academic
Press, New York, pp 355-408

187. Jenkins EP, Hsieh CL, Milatovich A, Normington K, Berman DM, Francke U, Russell
DW 1991 Characterization and chromosomal mapping of human steroid 5 α -reductase
gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue. *Genomics* 11:1102-1112

188. Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G,
Durocher F, Paquet N 1992 Structure of human type II 5 α -reductase gene.
Endocrinology 131:1571-1573

189. Rivarola MA, Podestá EJ, Chemes HE 1972 *In vitro* testosterone ¹⁴C metabolism by rat
seminiferous tubules at different stages of development: formation of 5 α -androstenediol
at meiosis. *Endocrinology* 91:537-542

190. Dornington JH, Fritz IB 1975 Cellular localization of 5 α -reductase and 3 α -
hydroxysteroid dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testis. *Endocrinology*
96:879-889

191. Axelrod LR 1965 Metabolic patterns of steroid biosynthesis in young and aged human
testes. *Biochim biophys Acta* 97:551-556

192. Nayfeh SN, Coffey JC, Hansson V and French FS 1975 Maturational changes in testicular steroidogenesis: hormonal regulation of 5 α -reductase. *J Steroid Biochem* 6:329-335
193. Mather JP, Saez JM, Haour F 1981 Primary cultures of Leydig cells from rat, mouse and pig: advantages of porcine cells for the study of gonadotropin regulation of Leydig cells function. *Steroids* 38:35-44
194. Monet-Kuntz C, and Fontaine Y 1989 Age-dependent changes in the in-vitro response of a pig Sertoli cell-enriched population to FSH. *J Reprod Fert* 86:643-651
195. Lee BC, Pineda JL, Spiliotis BE, Brown TJ and Bercu BB 1983 Male sexual development in the nonhuman primate. III Sertoli cell culture and age-related differences. *Biol of Reprod* 28:1207-1215
196. Dorfman RI, Menon KMJ, Sharma DC, Joshi S and Forchielli E 1967 Steroid hormone biosynthesis in rat, rabbit and capuchine testis. In *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology of the Testis*. (edited by G.E.W. Wolstenholme and M.O'Connor). Little, Brown and Co., Boston, vol 16: 91
197. Preslock JP and Steinberger E 1976 Pathway of testosterone biosynthesis in the testis of the marmoset *Saguinus oedipus*. *Steroids* 28:775-784
198. Sharma DC, Joshi SG and Dorfman RI 1967 Biosynthesis of testosterone by monkey testis in vitro. *Endocrinology* 80:499-504
199. Hoschoian JC and Brownie AC 1967 Pathway for androgen synthesis in monkey testis. *Steroids* 10:49-69
200. Preslock JP and Steinberger E 1979 Testicular steroidogenesis of the Rhesus monkey *Macaca Mulatta*. *Steroids* 34:527-535

201. Preslock JP 1979 Testicular steroidogenesis in the orangutan *Pongo pygaeus*. Proc Annu Meet Soc Study of Reprod 12th, 95
202. Rey R, Campo S, Ayuso S, Nagle C and Chemes H 1995 Testicular steroidogenesis in the Cebus monkey throughout postnatal development. Biol Reprod 52:997-1002
203. Rey RA, Campo S, Bedecarras P, Nagle CA, Chemes H 1993 Is infancy a quiescent period of testicular development ? Histologic, morphometric and functional study of the seminiferous tubules of the Cebus monkey from birth to the end of puberty. J Clin Endocrinol & Metab 75:1325-1331
204. Preslock JP 1980 A review of *in vitro* testicular steroidogenesis in rodents, monkeys and humans. J Steroid Biochem 13:965-975
205. Chemes H, Cigorraga S, Bergadá C, Schteingart H, Rey R, and Pellizzari E 1992 Isolation of human Leydig cell mesenchymal precursors from patients with the Androgen Insensitivity Syndrome. Testosterone production and response to human chorionic gonadotropin stimulation in culture. Biol Reprod 46:793-801
206. Cigorraga SB, Chemes H, Pellizzari E 1994 Steroidogenic and morphogenic characteristics of human peritubular cells in culture. Biol Reprod (US) 51(6):1193-1205
207. Verhoeven G and Cailleau J 1987 A Leydig cell stimulatory factor produced by human testicular tubules. Mol and Cell Endocrinol 49:137-147
208. Lejeune H, Skalli M, Sanchez P, Avallet O, Saez JM 1993 Testosterone secretion by normal adult human Leydig cells is enhanced by coculture with normal adult human Sertoli cell-enriched preparations. Int J Androl 16(1):27-34
209. Ruukonen A, Laatikainen EA, Evihko R 1972 Free and sulfate-conjugated steroids in human testis tissue. Biochemistry 11:1411

210. Czerwiec FS, Melner MH, Puett D 1989 Transiently elevated levels of c-fos and c-myc oncogene messenger ribonucleic acids in cultured murine Leydig tumor cells after addition of human chorionic gonadotropin. *Mol Endocrinol* 3:105-109

211. Bernier M, Clerget M, Berthelon MC, Saez JM 1987 Stimulatory and inhibitory effects of protein kinase C. Activation and calcium ionophore on cultured pig Leydig cells. *Eur J Biochem* 163 :181-188

212. Keeney DS, Ewing LL 1990 Effects of hypophysectomy and alterations in spermatogenic functions on Leydig cell volume, number, and proliferation in adult rats. *J Androl* 11:367-378

213. Bartke A, Hafiez AA, Bevilacqua FJ, Dalterio S 1978 Hormonal interactions in regulation of androgen secretion. *Biol Reprod* 18:44-54

214. Zipf WB, Payne AH, Kelch RP 1978 Prolactin, growth hormone and LH in the maintenance of testicular LH receptors. *Endocrinology* 103:595-600

215. Anderson CM, Mendelson CR 1985 Regulation of steroidogenesis in rat Leydig cells in culture: effects of human chorionic gonadotropin and dibutyryl cyclic AMP on the synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 and adrenodoxin. *Arch Biochem Biophys* 238:378-387

216. Mason IJ, MacDonald AA, Laptook A 1984 The activity and biosynthesis of cholesterol side-chain cleavage enzyme in cultured immature pig testis cells. *Biochim Biophys Acta* 795:504-512

217. Nakajin S, Shively J, Yuan PM, Hall PF 1981 Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 α -hydroxylase and C17-20-lyase) associated with one protein. *Biochemistry* 20:4037-4042

218. Nakajin S, Shinoda M, Hanui M, Shively JE, Hall PF 1984 The C21 steroid side-chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsome: purification and characterization of the 17 α -hydroxylase C17-20 lyase cytochrome P-450. J Biol Chem 259:3971-3976
219. Nishihara M, Winters CA, Buczko M, Waterman MR, Dufau ML 1988 Hormonal regulation of rat Leydig cell cytochrome P-450 17 α mRNA levels and characterization of a partial length rat P-450 17 α mRNA. Biochem Biophys Res Commun 154:151-158
220. Keeney DS, Mason JI 1992 Expression of testicular 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5-4 isomerase regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats. Endocrinology 130:2007-2015
221. Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PBC and Welsh TH Jr 1984 Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells . Endocrine Reviews 5(1):76-127
222. Garzo VG and Dorrington JH 1984 Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. Am J Obstet Gynecol 148:657-662
223. Barteltt JMS, Charlton HM, Robinson ICAF and Nieschlag E 1990 Pubertal development and testicular function in the male growth hormone deficient rat. Journal of Endocrinol 123:193-201
224. Wilson ME and Tanner JM Somatostatin analog treatment slow the growth and the tempo of reproductive maturation in female rhesus monkeys. J. Clin Endocrinol & Metab
225. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1989 Molecular Biology of The Cell. 2nd Edition, Garland Publishing, Inc. New York. USA
226. Barness LA 1994 Nutritional requirements of infants and children with respect to cholesterol and related compounds Am J Med Genet 50:353-354

227. Tint GS, Irons M, Roy Elias E, Batta Ak, Frieden R, Chen TS, Salen G 1994 Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Engl J Med* 330:107-113.
228. Pill J, Stegmeier K, Schmidt FH 1990 Effects of drugs affecting cholesterol biosynthesis pathway on BM15766-induced 7-dehydrocholesterol accumulation in rats : an animal model for testing compounds reducing cholesterol synthesis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 12:167-174
229. Smith ME, Hasinoff CM 1970 Inhibitors of cholesterol synthesis and myelin formation. *Lipids* 5:665-671
230. Igarashi M, Suzuki K, Chen SM 1975 Changes in brain hydrolytic enzyme activities in rats treated with cholesterol biosynthesis inhibitor, AY9944. *Brain Res* 90:97-114
231. Roux C, Aubry M 1966 Action tératogène chez le rat d'un inhibiteur de la synthèse du cholestérol, le AY 9944. *C R Soc Biol* 160:1353-1357
232. Chevallier F 1967 Dynamics of cholesterol in rats studied by the isotopic equilibrium method. *Adv Lipid Res* 5:209-239
233. Hamilton JJ, Synnes A, Innis SM 1992 Plasma cholesterol and lanosterol levels in term infants in the early neonatal period. *Pediatr Res* 31:396-400
234. Ness GC 1994 Developmental regulation of the expression of genes encoding proteins involved in cholesterol homeostasis *Am J Med Genet* 50:355-357
235. Niazan SJ, Brewer LD, Ness GC 1991 Pituitary regulation of the expression of the farnesyl pyrophosphate synthetase gene in the testes of the sexually maturing rat. *J Androl* 12:264-272

236. Smith DW, Lemli O, Opitz JM 1964 A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr* 64:210-217
237. Martinez-Mora J. 1994 Androgen insensitivity syndrome in: *Textbook Intersexual states. Disorders of sex differentiation*. Martinez-Mora J Doyma ed, SA, Spain, pp 240-246
238. Proppe KA, Scully RE 1980 Large cell calcifying Sertoli cell tumor of the testis. *Am J Clin Pathol* 74:607-619
239. Waxman M., Damjanov Y., Khapra A., Landau S.J. Large cell calcifying Sertoli tumor of the testis. Light microscopic and ultrastructural study. *Cancer* 1984, 54:1574-1581
240. Fligiel Z, Kaneko M, Leiter E 1976 Bilateral Sertoli cell tumor of testis with feminizing and masculinizing activity occurring in a child. *Cancer* 38:1853-1858
241. Carney A, Gordon H, Carpenter P, Shenoy BV, Go VLW 1985 The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)* 64:270-283
242. Steinberger E 1966 Cytochemical study of delta5-3beta hydroxysteroid dehydrogenase in testicular cells grown in vitro. *Endocrinology* 79: 406-410
243. Palombi F 1988. Characterization of peritubular myoid cell in highly-enriched in vitro cultures. In: Cooke B.A. Sharpe R.M. eds. *Serono Symposia Publication*. vol 50. NY Raven Press: 311-317
244. Tananis AC 1989 Cytochemical and biochemical characterization of testicular peritubular myoid cells. *Biol Reprod* 40: 811-823
245. Ausmuller G, Schulze C, Viebahn C 1992 Intermediate filaments in Sertoli cells. *Microsc Res Tech* 20: 50-72

246. De Bobertis, De Robertis (h)1986 *Biología Celular y Molecular*. El Ateneo de.6 :134-172
247. Krauth J.1990 *Distribution-free statistics*. Amsterdam.Elsevier
248. Berensztein EB, Belgorosky A, and Rivarola MA 1992 Primary culture of prepubertal human testicular cells isolated from testes collected at necropsy. *Acta Endocrinol* 127:66-71
249. Berensztein E, Belgorosky A, Davila MTG de, Rivarola MA 1995 Basal testosterone secretion and response to human luteinizing, follicle-stimulating, and growth hormone in culture of cells isolated from testes of infants and children. *Ped Research*, 38 (4):592-597
250. Brodie A., Inkster S. 1993 Aromatase in the human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:549-555
251. Vilar O. 1970 Histology of the human testis from neonatal period to adolescence. In Roschberg E., Paulsen C.A. eds. *The Human Testes*. Advances in experimental medicine and biology. vol 10 N.Y. Raven Press: 95-111
252. Van der Molen HJ, Brinkmann AO, de Jong FH, Rommerts FFG. 1981 Testicular oestrogens. *J Endocrinol* 89:338-339
253. Rigaudiere N, Grizard G, Boucher D. 1989 Aromatase activity in purified Leydig cells from adult rat. Comparative effects of insulin, IGF-1 and hCG. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121:677-685
254. Weniger JP. 1989 Aromatase activity in fetal rat gonads *J Reprod Fertil* 87:355-357
255. Chemes HE, Gottlieb SE, Pasqualini T, Domenichini E, Rivarola MA, Bergadá C. 1985 Response to acute hCG stimulation and steroidogenic potential of Leydig cell fibroblastic precursors in humans. *J Androl* 6:102-112

256. Mellon SH 1994 Neurosteroids : biochemistry, modes of action, and clinical relevance. J Clin Endocrinol Metab 78 :1003-1008
257. Pasqualini T, Chemes H, Rivarola MA 1981 Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism. Clin Endocrinol 15:545-554
258. Rivarola MA, Pasqualini T, Chemes HE 1983 Testicular testosterone and dihydrotestosterone during sexual development in humans. J Steroid Biochem 19:961-964
259. Forest MG 1989 Physiological changes in circulating androgens. In : Forest MG de. Androgens in Childhood. Pediatr Adolesc Endocrinol. Basel :Karger, 19 :104-129
260. Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA 1973 Evidence of testicular activity in early infancy J Clin Endocrinol Metab 37:148-151
261. Winter JSD, Faiman C, Hobson WC, Prasad AV, Reyes FI 1975 Pituitary gonadal relations in infancy.I. Pattern of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and chimpanzee J Clin Endocrinol Metab 40:545-551
262. Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L. 1986 Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. Endocrinology 119:1641-1647
263. Kelly PA, Djiane J, Postel-Viney MC, Edery M 1991 The prolactin/growth hormone receptor family. Endocr Rev 12:235-251
264. Lobie PE, Breipohl W, Aragon AG, Waters MJ 1990 Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. Endocrinology 126:2214-2221

265. Tiong TS, Herington AC 1991 Tissue distribution, characterization and regulation of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor and serum binding protein in rat. *Endocrinology* 129:1628-1634

266. Mercado M, Davila N, McLeod JF, Baumann G 1994 Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues *J Clin Endocrinol Metab* 78 :731-735

267. Morris PL, Saxena BB 1980 Dose- and age-dependent effects of prolactin (PRL) on luteinizing hormone- and PRL-binding sites in rat Leydig cell homogenates *Endocrinology* 107:1639-1645

268. Kies W, Butenandt O 1995 Specific growth hormone receptors on human peripheral mononuclear cells : reexpression and characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 60:740-746

269. Keeney D, Murry BA, Bartke A, Wagner TE, Mason JI 1993 Growth hormone transgenes regulate the expression of sex-specific isoforms of 3- β hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5-4 isomerase in mouse liver and gonads. *Endocrinology* 133:1131-1138

270. Bourguignon JP, Vandeweghe M, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Malvaux P, Wolter R, Du Caju M, Emoult C 1985 Pubertal growth and final height in hypopituitary boys : a minor role of bone age at onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 63:376-382

271. Savage MO, Blum WF, Ranke MB, Postel-Vinay MC, Cotterill AM, Hall K, Chatelain PG, Preece MA, Rosenfeld RG 1993 Clinical features and endocrine status in patients with growth hormone insensitivity (Laron syndrome) *J Clin Endocrinol Metab* 77:1465-1471

272. Arnold AP, Gorski RA 1984 Gonadal steroid induction of sex differences in the central nervous system *Annu Rev Neurosci* 7:413-442
273. Rhee RW, Shryne JE, Gorski RA 1990 Termination of the hormone-sensitive period for differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Dev Brain Res* 52:17-23
274. Merchenthaler I, Lennard DE, Lopez FJ, Negro-Vilar A 1993 Neonatal imprinting predetermines the sexually dimorphic estrogen-dependent expression of galanin in luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 90:10479-10483
275. Benahmed M, Morera Am Chauvin M, de Peetti E. 1987 Somatomedin C/insulin-like growth factor I as a possible intratesticular regulator of Leydig cell activity. *Mol Cell Endocrinol* 50:69-77
276. Tajima Y, Watanabe D, Koshimizu U, Matsuzawa T, Nishimune Y. 1995 Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- α stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. *Int J Androl* 18:8-12
277. Bemier M, Chatelain PG, Mather JP, Saez JM. 1986 Regulation of gonadotropin responsiveness, and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured pig Leydig cells. *J Cell Physiol* 129: 257-263
278. Chatelain PG, Sanchez P, Saez JM. 1991 Growth hormone and insulin-like growth factor-I treatment increase testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice. *Endocrinology* 128 :1857-1862
279. De Chiara TM, Efsfratiadis A, Robertson EJ 1990 A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345 :78-80

280. Baker J, Liu J-P, Robertson EJ, Efsfratiadis A. 1993 Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75 :73-82
281. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efsfratiadis A. 1996 Effects of an *igf-1* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10:903-916
282. Mathews LS, Enberg B, Norstedt G 1989 Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J Biol Chem* 264 :9905-9910
283. Bergadá I, Rojas G, Ropelato G, Ayuso S, Groome N, Bergadá C, Campo S. 1997 Serum Concentrations of Inhibin A, B and Pro- α C in Normal Children from Birth to Puberty *Horm Res* 48 (Suppl 2) , 5th Joint Meeting of the ESPE and LWPES
284. Majumdar SS, Winters SJ, Plant TM 1997 A Study of the Relative Roles of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in the Regulation of Testicular Inhibin Secretion in the Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) *Endocrinology* 138 :1363-1373
285. Toppari J, Kaipia A, Kaleva M, Laato M, de Krester DM, Knummen LA, Mather JP, Salmi TT. 1997 Inhibin Expression in a Large Cell Calcifying Sertoli Cell Tumor *Horm Res* 48 (Suppl 2) , 5th Joint Meeting of the ESPE and LWPES
286. Brennemann W, Klingmüller D, Eter N, Bidlingmaier F. 1995 Immunoreactive Inhibin Concentrations in Human Gonads and Adrenals during the First Years of Life *Hormone Research* 44 :115-120
287. Chemes H., Pasqualini T., Rivarola M.A., Bergadá C. Is testosterone involved in the initiation of spermatogenesis in humans? A clinicopathological presentation and physiological considerations in four patients with Leydig cell tumors or secondary Leydig cell hyperplasia. *Int J Androl* 1982, 5: 229-245

288. Berensztein EB, Belgorosky A, Dávila MTG de, and Rivarola MA 1995 Testicular steroid biosynthesis in a boy with a large cell calcifying Sertoli cell tumor producing prepubertal gynecomastia. *Steroids* 60:220-225
289. Lin Y.X., Hsueh A.J.W. Synergism between granulosa and theca-interstitial cells on estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: studies in the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera. *Biol Reprod* 1986, 35: 27-36
290. Grassi L, Fabbri A, Spera G 1997 Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 18:541-609
291. Chedrese JM, Luu The V, Labrie F, Juorio AV, Murphy BD. Evidence for the regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA by human chorionic gonadotrophin in luteinizing porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1990, 128:2228-2230
292. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Robert J 1995 Molecular and cellular aspects of the insulin like growth factor receptor. *Endocrine Rev* 16:143-163
293. Cohick W, Clemmons DR 1993 The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 55:131-153
294. Simpson ER 1979 Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450 and the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 13:213-217
295. Burstein S, Gut M 1976 Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone : kinetics and mechanism. *Steroids* 28:115-131
296. Cigorruga S, Dufau M, Catt K 1978 Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells. *J Biol Chem* 253: 4297-4304