

## Tesis de Posgrado

# Influencia de las proteínas de la matriz extracelular sobre la morfología y funcionalidad de las células de Leydig de rata adulta

Díaz, Emilce Silvina

2003

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

**Cita tipo APA:**

Díaz, Emilce Silvina. (2003). Influencia de las proteínas de la matriz extracelular sobre la morfología y funcionalidad de las células de Leydig de rata adulta. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3555\\_Diaz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3555_Diaz.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Díaz, Emilce Silvina. "Influencia de las proteínas de la matriz extracelular sobre la morfología y funcionalidad de las células de Leydig de rata adulta". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3555\\_Diaz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3555_Diaz.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

*Tesis de doctorado*

**" INFLUENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE LA  
MATRIZ EXTRACELULAR SOBRE LA  
MORFOLOGÍA Y FUNCIONALIDAD DE LAS  
CÉLULAS DE LEYDIG DE RATA ADULTA "**

*Autora: Lic. Emilce Silvina Diaz*

*Directora: Dra. Berta Denduchis*

*Centro de Investigaciones en Reproducción  
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires  
- 2003 -*

No 355

*A mis padres*

*A Marco*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron a mi lado, y contribuyeron, de manera directa e indirecta, a que pueda culminar esta etapa de mi carrera. En especial, quiero agradecer:

A **Berta**, por haberme guiado y dado su apoyo en todo momento, por haberme transmitido generosamente sus conocimientos y experiencia. En especial, por que más allá de lo profesional, conocí a un ser humano con una gran calidez, que me aconsejó en los momentos difíciles como si fuera su hija.

A **Livia**, por su consejo desinteresado, por contestar todas mis preguntas y por su invaluable ayuda en la corrección de esta tesis.

A **Yoli**, mi mamá y amiga, por su amor, por compartir y contenerme en cada etapa de mi vida, por que sin su amor, su paciencia y sabiduría, se me hubiera hecho muchísimo más difícil alcanzar esta meta.

A **Marco**, por apoyarme y ayudarme a escribir esta tesis, por estar a mi lado, por el esfuerzo que significó estar separados durante 4 años con el fin de alcanzar nuestras metas profesionales.

A **Eliana y Selva**, por ayudarme a conocer mejor a las células de Leydig, por discutir protocolos y resultados.

A **Susana, Vanesa y Claudia**, por ser excelentes compañeras, discutir protocolos, resultados, compartir alegrías y frustraciones, por "aguantarme".

A **Graciela Veneras**, por enseñarme los secretos de la marcación radioactiva de hormonas, por su ayuda y consejos totalmente desinteresados.

A **Maca, Carla, Gabi, Maru, Ceci, Cristian, Mercedes, Beatriz, Adriana, Daniel**, por brindarme su cooperación siempre que la necesité, por su gran camaradería.

A **Andrea y Carolina** por su amistad, y por compartir todo este camino sin claudicar frente a los obstáculos. A mis queridísimas amigas les agradezco por todos los muy buenos momentos compartidos y por estar siempre.

A **Gustavo Doncel**, por su entusiasmo y su colaboración desinteresada.

A **mi familia**, por su amor incondicional, les agradezco por la confianza que depositan en mí y por inculcarme que con esfuerzo y trabajo se puede lograr todo lo que se desea.

A **todos los taxistas de Bs. As.**, por soportar mis indicaciones al transportar las placas de cultivos (con células dentro!!!).

## Resumen

Está ampliamente aceptado que las proteínas de la matriz extracelular (MEC) intervienen en la regulación de la diferenciación, morfogénesis, proliferación y migración celular. La mayor parte de las interacciones célula-MEC están mediadas por las integrinas, las cuales regulan a su vez, la reorganización del citoesqueleto, el transporte intracelular de iones, el metabolismo de los lípidos, la activación de quinasas y la expresión génica. Asimismo, en la última década se ha demostrado que las integrinas ejercen un papel importante en los procesos reproductivos, incluyendo la fertilización, implantación y embriogénesis.

En el testículo, la regulación de distintos procesos como el desarrollo, la diferenciación y la esteroidogénesis de las células de Leydig, depende de la acción concertada de las hormonas gonadotróficas y de una gran variedad de factores locales producidos de manera autocrina o paracrina. A pesar de lo mencionado en el párrafo anterior, son pocos los estudios realizados que intentan dilucidar el papel que ejercen las proteínas de la MEC sobre la funcionalidad de las células de Leydig. Estas células están rodeadas por proteínas de la MEC organizadas como una membrana basal continua o discontinua.

El objetivo de esta tesis fue estudiar la influencia de las proteínas de la MEC sobre la morfología, la adhesión celular, la expresión de integrinas y la esteroidogénesis de las células de Leydig. Como modelo experimental, se utilizó el cultivo de células de Leydig de rata adulta, utilizando como sustrato, la laminina-I, el colágeno tipo IV y la fibronectina.

Nosotros observamos que las células de Leydig cultivadas sobre laminina-I, colágeno tipo IV y fibronectina, presentan un mayor número de prolongaciones citoplasmáticas que las cultivadas sobre vidrio. Asimismo, demostramos que la adhesión de las células al sustrato es un fenómeno que ocurre rápidamente y que el grado de adhesión a las mismas varía según el sustrato al cual se adhieren.

Además, observamos que si bien las integrinas se expresan de manera constitutiva en las células de Leydig, su expresión aumenta en respuesta a la adhesión de las células a las proteínas de la MEC.

Con respecto al efecto de las proteínas de la MEC sobre la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig, demostramos que el colágeno tipo IV y la fibronectina inhiben la producción de testosterona de las células de Leydig de rata adulta, tanto en condiciones basales como estimuladas con hCG y que este fenómeno no se debe a un efecto citotóxico. En cambio, la laminina-1 utilizada como sustrato, no ejerció un efecto modulador sobre la producción de testosterona.

En relación al mecanismo de la esteroidogénesis, demostramos que el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV y la fibronectina ocurre en un paso posterior a la producción de AMPc y anterior a la entrada del colesterol a la membrana mitocondrial interna. Por otra parte, demostramos que el colágeno tipo IV es capaz de modular la expresión de la proteína StAR, involucrada en el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió analizar alguna de las vías de señalización intracelular activadas por el colágeno IV, capaces de regular negativamente la esteroidogénesis de las células de Leydig. Demostramos que la modulación negativa del colágeno tipo IV sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata está mediada por la activación de tirosina quinasas. En particular, detectamos que la interacción del colágeno tipo IV con las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$ , activa la cascada de Ras/MEK/ERK, siendo estas las responsables de la modulación negativa del colágeno tipo IV sobre la esteroidogénesis. Asimismo demostramos que las proteínas ERK 1-2 están involucradas en las adhesiones focales inducidas por la interacción de las integrinas de las células de Leydig con las proteínas de la MEC.

Las integrinas tienen la capacidad de activar la vía de señalización de las MAPK a través de distintos mecanismos. Uno de ellos, ocurre a través de la activación de las proteínas Ras, pudiendo ser dependiente o no de la proteína FAK. Nosotros demostramos que en las células de Leydig de rata, la activación de la cascada de las MEK, inducida por el colágeno tipo IV, se desencadena fundamentalmente, a través de un mecanismo FAK independiente. La activación de las proteínas ERK 1-2 independiente de FAK, podría estar mediada por una proteína denominada caveolina-1. Nosotros identificamos la proteína

caveolina-1 en las células de Leydig y detectamos que su fosforilación es modulada por la interacción del colágeno tipo IV con las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$ .

Por otro lado, observamos que la expresión de la proteína StAR (“steroidogenic acute regulatory”) no solo es modulada por la vía de señalización del receptor de LH/hCG, sino que en su regulación participan las MAPK, en particular las MEK 1-2. Asimismo, demostramos que si bien el colágeno tipo IV, a través de las integrinas, es el principal responsable de la activación de las proteínas ERK 1-2, PKA también interviene en la fosforilación de las mismas, siendo capaz de modular la cascada de señalización de las MAPK en las células de Leydig de rata estimuladas con hCG.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo, nos demuestran que las proteínas de la MEC, son capaces de modular la adhesión, la diferenciación celular y la expresión de integrinas. El colágeno tipo IV, a través de la interacción con las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$  y mediante un mecanismo FAK independiente, activa a las proteínas ERK 1-2, las cuales regulan negativamente la expresión de la proteína StAR, inhibiendo la producción de testosterona. Además, observamos que el estímulo de LH/hCG al aumentar la producción de AMPc, activa a la PKA, la cual interacciona con la cascada de señalización de las MAPK, ejerciendo una regulación dual sobre la esteroidogénesis en las células de Leydig de rata adulta

Los resultados presentados en esta tesis contribuyen a ampliar los conocimientos sobre la influencia que las proteínas de la matriz extracelular ejercen sobre la morfología y diferenciación de las células de Leydig. Demuestran además, que el colágeno tipo IV, es capaz de modular, in vitro, la esteroidogénesis de las células de Leydig de la rata adulta.

## Summary

It is well known that extracellular matrix (ECM) proteins are involved in the regulation of the differentiation, morphogenesis, proliferation and migration of cells. Most cell-ECM interactions are mediated by integrins, which in turn regulate the reorganization of the cytoskeleton, intracellular transport of ions, lipid metabolism, activation of kinases and gene expression. In the last decade, integrins have also been shown to have an important role in reproductive processes including fertilization, implantation and embryogenesis.

In the testis, the regulation of different processes as the development, differentiation and steroidogenesis of Leydig cells depends on the concerted action of gonadotrophic hormones and a large variety of local factors produced in an autocrine or paracrine way. In spite of the information in the paragraph above, few studies have attempted to elucidate the role of ECM proteins in the functioning of Leydig cells. These cells are surrounded by ECM proteins organized as a continuous or discontinuous basement membrane.

The objective of this thesis was to study the influence of ECM proteins on the morphology, cell adhesion, integrin expression and steroidogenesis of Leydig cells. The experimental model used was the culture of adult rat Leydig cells, using laminin-1, type IV collagen and fibronectin as substrates.

We observed that the Leydig cells cultured on laminin-1, type IV collagen and fibronectin present a larger number of cytoplasmic processes than those cultured on glass. We also demonstrated that the cells adhesion to the substrate occurs rapidly and that their degree of adhesion varies depending on the substrate to which they adhere.

We also observed that, although integrins are constitutively expressed in Leydig cells, their expression increases in response to the adhesion of the cells to ECM proteins.

In relation to the effect of ECM proteins on steroidogenesis, we demonstrated that type IV collagen and fibronectin inhibit the production of testosterone of the Leydig cells of adult rat, both in basal conditions and when stimulated with hCG, and that this phenomenon does not result from a cytotoxic



effect. On the other hand, laminin-1 used as substrate had no modulatory effect on testosterone production.

With respect to the mechanism of steroidogenesis, we demonstrated that the inhibitory effect of type IV collagen and fibronectin occurs after AMPc production step and before the entry of cholesterol into the internal mitochondrial membrane. We also demonstrated that type IV collagen is able to modulate the expression of the StAR (steroidogenic acute regulatory) protein, involved in the transport of cholesterol to the internal mitochondrial membrane.

In view of these results, we decided to analyze some of the intracellular signal pathways, activated by collagen IV and able to negatively regulate the steroidogenesis of Leydig cells. We demonstrated that the negative modulation of type IV collagen on the steroidogenesis of rat Leydig cells is mediated by the activation of tyrosine kinases. In particular, we found that the interaction of type IV collagen with  $\beta_1$  subfamily integrins activates the Ras/MEK/ERK cascade, these being responsible for the negative modulation of type IV collagen in steroidogenesis. We also demonstrated that ERK 1-2 proteins are involved in the focal adhesions induced by interaction between Leydig cell integrins and ECM proteins.

Integrins have the capacity to activate the MAPK signal pathway through different mechanisms. One of these occurs through the activation of Ras proteins, and may or may not depend on the FAK protein. We demonstrated that in rat Leydig cells, the activation of the MEK cascade induced by type IV collagen is triggered basically through an independent FAK mechanism. The activation of the ERK 1-2 proteins independent of FAK could be mediated by a protein: caveolin-1. We identified the caveolin-1 protein in the Leydig cells and found that its phosphorylation is modulated by the interaction of type IV collagen with  $\beta_1$  subfamily integrins.

We also observed that the expression of the StAR protein is not only modulated by the signal pathway of the LH/hCG receptor, but that the MAPK participate in its regulation, particularly MEK 1-2. We also demonstrated that although type IV collagen, through the integrins, is the main factor in the activation of ERK 1-2 proteins, PKA also intervenes in their fosforilation and is able to modulate the MAPK signal cascade in rat Leydig cells stimulated with hCG.

In conclusion, the results of this work demonstrate that ECM proteins are able to modulate adhesion, cell differentiation and integrin expression. Type IV collagen, through interaction with  $\beta_1$  subfamily integrins and by an independent FAK mechanism, activates the ERK 1-2 proteins that negatively regulate expression of the StAR protein, inhibiting testosterone production. We also observed that LH/hCG stimulation, by increasing AMPc production, activates PKA; interacting with the MPAK signal cascade, exerting dual regulation on the steroidogenesis of adult rat Leydig cells.

The results presented in this thesis contribute knowledge of the influence of extracellular matrix proteins on the morphology and differentiation of Leydig cells. They also show that type IV collagen is capable of modulating, in vitro, the steroidogenesis of adult rat Leydig cells.

**Los resultados presentados en esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones y distinciones:**

“Effect of extracellular matrix proteins on in vitro testosterone production by rat Leydig cells”. **Emilce S. Diaz**, Eliana Pellizari, Silvina Meroni, Selva Cigorraga, Livia Lustig and Berta Denduchis. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 61:493-503

“Type IV collagen regulate expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in adult rat Leydig cells, in vitro”. **Emilce S. Diaz**, Eliana Pellizari, Selva Cigorraga, Livia Lustig and Berta Denduchis. Enviado al *Mol. Reprod. Dev.*, 2003 (En prensa)

“Type IV collagen suppresses testosterone production by adult rat Leydig cells via cascade Ras/MEK/ERK”. **Emilce S. Diaz**, Eliana Pellizari, Marta Casanova, Selva Cigorraga, Livia Lustig and Berta Denduchis. En preparación.

**Premio al mejor trabajo de investigación básica**, otorgado por la Sociedad Argentina de Andrología al trabajo titulado “Extracellular matrix proteins modulate testosterone production by Leydig cells, *in vitro*”, 2001.

## Abreviaturas

8 Br-AMPC	8 bromo adenosina 3', 5' monofosfato cíclico
17 $\beta$ HSD	17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
17OHP4	17 $\alpha$ - hidroxiprogesterona
3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ isomerasa
A	androstenediona
AMP	adenosina 5' monofosfato
AMPC	adenosina 3', 5' monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina 5' trifosfato
bFGF	factor de crecimiento fibroblástico básico
BSA	albúmina de suero bovino
C-IV	colágeno tipo IV
Ca <sup>2+</sup>	ión calcio
CD44	"cluster" of differentiation" 44
ClNa	cloruro de sodio
CO <sub>2</sub>	anhidrido carbónico
CO <sub>3</sub> NaH	bicarbonato de sodio
DAX	"dosage reverse sex- adrenal hypoplasia X chromosome gen 1"
DHA	dehidroepiandrosterona
DHT	dihidrotosterona
DIOL	3 $\alpha$ - androstenediol
E <sub>2</sub>	estradiol
EDTA	ácido etilen-diamino tetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ERK 1-2	proteína quinasa reguladora extracelular 1 y 2
ES	error estándar
Fc	factor de crecimiento
Fn	fibronectina
FNa	fluoruro de sodio
FSH	hormona folículo estimulante
GDP	guanosina 5' difosfato
GMPC	guanosina 3', 5' monofosfato cíclico
Grb2	factor de crecimiento unido a receptor tipo 2
GTPasa	fosfatasa de GTP
GTP	guanosina 5 trifosfato
H <sup>+</sup>	ión hidronio
hCG	gonadotropina coriónica humana
HEPES	ácido sulfónico del N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2 etano
HMG-CoA	$\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil-glutaril-CoA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
IBMX	3 metil isobutil xantina
ICAM	molécula de adhesión celular intercelular
IGF-I	factor de crecimiento semejante a la insulina -1
Ig	inmunoglobulina

IgM	inmunoglobulina M
IL1	interleuquina 1
IL6	interleuquina 6
JNK	c-jun quinasas
Ln	laminina
LH	hormona luteinizante
MAC	moléculas de adhesión celular
MAPK	proteína quinasa activadora de mitógenos
MEC	matriz extracelular
MEK	MAPK quinasa
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
Na <sup>+</sup>	ión sodio
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NCAM	molécula de adhesión celular neural
P <sub>4</sub>	progesterona
P <sub>5</sub>	pregnenolona
P450c17	17 alfa hidroxilasa/17-20 liasa
P450scc	complejo enzimático que cliva la cadena lateral del colesterol
PDE	fosfodiesterasa
PI3K	fosfatidilinositol 3 hidroxil quinasa
PKA	proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	proteína quinasa C
RTK	receptores tirosina quinasa
SAP	polipéptido activador de la esteroidogénesis
SCP2	proteína transportadora de esteroides 2
SDS	sodio dodecil sulfato
SH2	secuencia de homología 2 con Src
SIP	proteína inductora de la esteroidogénesis
SOS	“son of sevenless”
Src	proteína del sarcoma de Rous
StAR	proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
TGF $\alpha$	factor de crecimiento de células transformadas alfa
TGF $\beta$	factor de crecimiento de células transformadas beta
TNF $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
VCAM	molécula de adhesión celular vascular
VO <sub>4</sub> Na	orto vanadato de sodio

### **Unidades**

Ci	Curie
mCi	milicurie
$\mu$ C	imicrocurie
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
$\mu$ m <sup>2</sup>	micrómetro cuadrado
°C	grados centígrados
g	gramos

---

hs .....	horas
kDa .....	kilo Dalton
l.....	litro
M .....	molar
mg.....	miligramo
ml.....	mililitro
mM .....	milimolar
UI.....	unidades internacionales
µg.....	microgramo
µl.....	microlitro
µM .....	micromolar
ng.....	nanogramo
nm.....	nanometro
p/v.....	peso en volumen
v/v.....	volumen en volumen
pg.....	picogramo
x g.....	veces la aceleración de la gravedad

### **Soluciones**

PBS.....	Buffer fosfato 0,1 M; pH: 7; NaCl 9 g/l.
PBS-suplementado .....	Buffer fosfato 0,1 M, pH: 7; NaCl 9 g/l; BSA 0,1 %; 100 UI/ml penicilina; 2,5 µg/ml anfotericina B.
GPBS .....	Buffer fosfato 0,1 M; pH 7; NaCl 9 g/l; gelatina 1 g/l; azida sodica 1 g/l.
Medio Base.....	Medio 199; BSA 0,1 %
Medio Completo.....	Medio Eagle modificado por Dulbecco y mezcla nutritiva de Ham F <sub>12</sub> (1:1); 15 mM CO <sub>3</sub> NaH; 20 mM HEPES; pH 7,4; 100 UI/ml penicilina; 2,5 µg/ml anfotericina B.
Medio de Cultivo.....	Medio Completo; 10 µg/ml transferrina; 5 µg/ml vitamina E.
TBS.....	Tris-HCl 100 mM; ClNa 9 g/l; Tween -20 0,1 %; pH: 7,5
Buffer de bloqueo .....	Tris-HCL 10 mM; ClNa 100 mM; Tween-20 0,1 %; pH: 7,5

# Indice

## Introducción

<b>Matriz extracelular</b> .....	2
<b>Moléculas de adhesión celular</b> .....	5
<i>a) Cadherinas</i> .....	6
<i>b) Superfamilia de las inmunoglobulinas</i> .....	6
<i>c) Selectinas</i> .....	7
<i>d) Integrinas</i> .....	7
<b>Adhesión focal</b> .....	11
<b>Señales intracelulares desencadenadas por integrinas</b> .....	13
1.- <i>Señales directas</i> .....	13
1.a.- <i>Activación de tirosina quinasas</i> .....	14
1.b.- <i>Activación directa de la cascada de MAPKs</i> .....	15
<i>a) Mecanismo dependiente de FAK y Ras</i> .....	15
<i>b) Mecanismo de activación independiente de FAK y dependiente de Ras</i> .....	16
<i>c) Mecanismo de activación independiente de Ras</i> .....	16
2.- <i>Señales de colaboración</i> .....	17
<b>Histología del testículo</b> .....	20
<b>Células de Leydig</b> .....	22
<b>Biosíntesis de esteroides testiculares</b> .....	23
1.- <i>El colesterol como precursor de hormonas esteroideas</i> .....	24
2.- <i>Conversión de colesterol a pregnenolona</i> .....	25
3.- <i>Conversión de pregnenolona a testosterona</i> .....	26
4.- <i>Metabolitos 5 <math>\alpha</math> reducidos de la testosterona</i> .....	29
<b>Mecanismo de acción de LH/hCG en células de Leydig</b> .....	29
1.- <i>Receptor para LH/hCG</i> .....	29
2.- <i>Proteína G – Adenilil ciclasas</i> .....	30
3.- <i>Proteína quinasa A</i> .....	30
4.- <i>Fosfodiesterasa</i> .....	31
5.- <i>Otros sistemas de transducción de señales que participan en la regulación de la esteroidogénesis</i> .....	31
<b>Regulación hormonal y paracrina de las células de Leydig</b> .....	32
1.- <i>Regulación hormonal</i> .....	32
2.- <i>Regulación paracrina</i> .....	36
<b>Interacción célula de Leydig / Matriz extracelular</b> .....	37

## Objetivo

<b>Objetivos específicos</b> .....	39
------------------------------------	----

## Materiales y Métodos

Reactivos.....	40
Animales.....	41
Aislamiento de células de Leydig.....	41
Condiciones experimentales.....	45
1.- Preparación de las proteínas de la MEC.....	45
2.- Condiciones básicas de cultivo.....	45
Determinación de la viabilidad celular.....	45
Detección histoquímica de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	46
Estudios de adhesión celular.....	46
Determinación de actividad celular.....	47
Radioinmunoensayo de testosterona.....	47
Determinación de AMPc.....	48
Estudios morfológicos.....	48
Estudios de Inmunofluorescencia.....	48
Western blot.....	49
Visualización de proteínas transferidas a membranas de PVDF.....	50
Unión específica de hCG al receptor de LH.....	51
1.- Iodinación de hCG.....	51
2.- Pruebas de actividad biológica para hCG marcada.....	52
2.1.- Preparación de la muestra.....	52
2.2.- Prueba de máxima capacidad de unión.....	53
2.3.- Desplazamiento con hCG fría.....	54
Análisis estadístico de los resultados.....	54

## Diseño experimental y Resultados

1.- Influencia de las proteínas de la MEC sobre las características morfológicas y las propiedades de adhesión de las células de Leydig.....	56
1.1.- Efecto de las proteínas de la MEC sobre la morfología de las células de Leydig.....	56
1.2.- Efecto de las proteínas de la MEC sobre la adhesión celular.....	58
2.- Análisis de la expresión de las subunidades $\alpha$ 3, $\alpha$ 5 y $\beta$ 1 de las integrinas en células de Leydig cultivadas sobre proteínas de la MEC.....	61
3.- Análisis de la participación de la subunidad $\beta$ 1 de las integrinas en la adhesión celular.....	61
4.- Efecto de las proteínas de la MEC sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig.....	63
4.1.- Curva dosis/respuesta de hCG.....	63
4.2.- Efecto del colágeno IV, la fibronectina y la laminina-1 sobre la producción de testosterona.....	65



4.3.- <i>Análisis del mecanismo de acción de las MEC sobre la producción de testosterona de las células de Leydig</i> .....	67
4.3.1.- <i>Papel de las proteínas de la MEC sobre la unión de hCG al receptor de LH/hCH</i> .....	68
4.3.2.- <i>Efecto de las proteínas de la MEC sobre la producción de AMPc extracelular</i> .....	69
4.3.3.- <i>Efecto de análogos de AMPc sobre la producción de testosterona</i> .....	70
4.3.4.- <i>Evaluación de la actividad de las enzimas esteroidogénicas</i> .....	71
4.3.5.- <i>Efecto del colágeno IV sobre la expresión de la proteína StAR</i> .....	72
<b>5.- Estudio de las vías de señalización intracelular activadas por el colágeno IV</b> .....	74
5.1.- <i>Análisis de la participación de proteínas tirosina quinasas</i> .....	74
5.2.- <i>Participación de las proteínas MEK en el proceso de esteroidogénesis</i> .....	78
5.3.- <i>Análisis de la participación de la proteína FAK</i> .....	83
5.4.- <i>Participación de la proteína caveolina-1</i> .....	85
<b>6.- Participación de las MEK activadas por el colágeno IV en la modulación de la esteroidogénesis</b> .....	87
6.1.- <i>Modulación de la expresión de la proteína StAR por la activación de las MEK</i> .....	87
6.2.- <i>Determinación del dialogo cruzado ("cross-talk") entre MEK y PKA</i> .....	89
<b>7.- Participación de las MEK en las adhesiones focales</b> .....	91
 <b>Discusión</b>	
➤ <i>Influencia de las proteínas de la MEC sobre la morfología y adhesión de las células de Leydig</i> .....	93
➤ <i>Expresión de las subunidades de integrinas en células de Leydig</i> .....	95
➤ <i>Influencia de las proteínas de la MEC sobre la función celular</i> .....	95
➤ <i>Análisis del mecanismo de acción de las proteínas de la MEC sobre la producción de testosterona de las células de Leydig</i> .....	98
➤ <i>Estudio de algunas de las vías de señalización intracelular activadas por el colágeno tipo IV</i> .....	103
➤ <i>Dialogo cruzado ("cross-talk") entre MEK y PKA</i> .....	111
 <b>Conclusiones</b> .....	115
 <b>Bibliografía</b> .....	117

# ***Introducción***

# INTRODUCCIÓN

Un evento crucial en la evolución de los organismos multicelulares es la capacidad de las células de interactuar con el medio extracelular y establecer contactos célula-célula. Esas interacciones, son llevadas a cabo a través de diferentes mecanismos de adhesión celular, los cuales son imprescindibles para mantener la estructura tridimensional y el funcionamiento normal de los tejidos [*Hynes y Zhao, 2000*].

Desde 1907, en que Wilson publicó el trabajo "On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges", es conocido el hecho que al disociar mecánicamente las células de dos especies diferentes de esponjas marinas y colocar en medio líquido una mezcla de ellas, éstas se agregan selectivamente formando las mismas esponjas originales. Se demostró así, que las células de un organismo multicelular se reconocen entre sí y se adhieren específicamente. Estudios posteriores realizados por Townes y Holtfreter [*1955*] demostraron que al disgregar las células de embriones de anfibios, las células endodérmicas se adhieren a otras endodérmicas, observándose lo mismo con las mesodérmicas y ectodérmicas.

En los siguientes 10-20 años, las investigaciones se enfocaron al estudio de la adhesión específica en los tejidos durante la embriogénesis y analizaron su papel en la morfogénesis [*Moscona, 1961; Roth y Weston, 1967*]. Si bien, esos estudios permitieron una primera caracterización de los mecanismos de la adhesión celular durante la embriogénesis y la morfogénesis, fueron los estudios realizados en células y tejidos adultos, desarrollados en las últimas décadas, los que han demostrado la importancia de los mecanismos de adhesión celular en la regulación del funcionamiento de los órganos adultos [*Joseph-Silverstein y Silverstein, 1998*].

Actualmente se sabe, que la adhesión celular, se desarrolla fundamentalmente a través de la expresión en la superficie celular, de una variedad de receptores específicos. Las señales que activan a esos receptores pueden ser desencadenadas por factores solubles (proteínas, carbohidratos, entre otros), ligandos unidos a otras células o a la propia matriz extracelular [*Uings y Farrow, 2000*].

## ***Matriz extracelular***

La matriz extracelular (MEC) se localiza en el tejido conectivo, que constituye el soporte estructural del cuerpo de los vertebrados, y en la membrana basal (figura 1), definida también, como una forma altamente especializada de MEC. La membrana basal rodea a las células musculares, nerviosas, adiposas y decíduales, entre otras y separa generalmente a las células epiteliales y endoteliales del tejido conectivo subyacente [Vracko, 1974; Timpl y Brown, 1996].

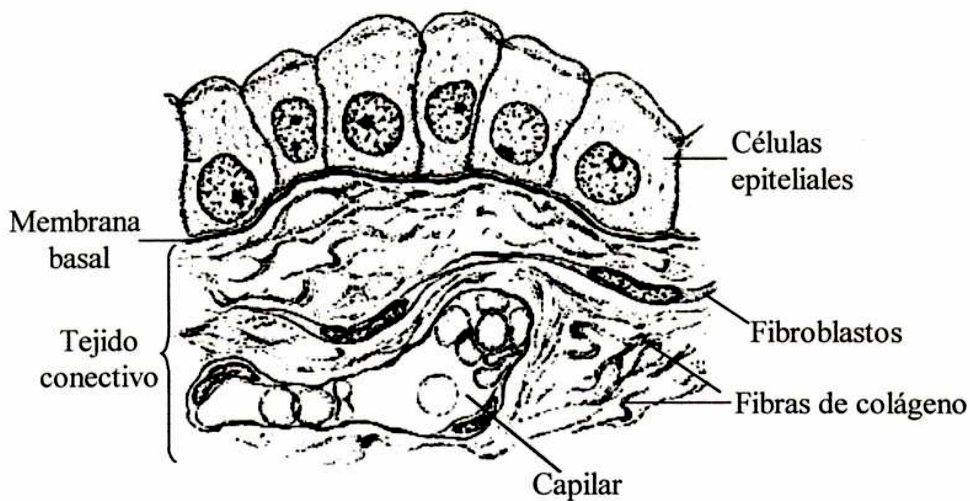


Figura 1.- Representación del tejido conectivo y de la membrana basal.

La MEC esta compuesta por una variedad de proteínas y polisacáridos que son secretados localmente y que se entrelazan en una red tridimensional en estrecha asociación con la superficie de la célula que las sintetizan [Alberts y col., 2002]. La MEC que forma parte del tejido conectivo es mucho más abundante que la que rodea a las células. Las variaciones en las cantidades relativas de los diferentes tipos de moléculas de la MEC y la forma en que se organizan determina el tipo de estructura del tejido. En la mayoría de los tejidos conectivos, las macromoléculas de la MEC son secretadas por los fibroblastos y son clasificadas en dos grupos: a) polisacáridos; del tipo de los glicosaminoglicanos, que usualmente se unen covalentemente con proteínas formando proteoglicanos, por ejemplo, el condroitin sulfato y b) proteínas

estructurales, como por ejemplo, el colágeno tipo I o adhesivas, como la fibronectina (Fn), laminina (Ln) y fibrilinas, entre otras [Aumailley y Gayraud, 1998, Alberts y col., 2002].

Por el contrario, la MEC que forma parte de la membrana basal de todos los tejidos está organizada en una delgada capa [Timpl y Dziadek, 1986; Miosge, 2001], compuesta principalmente por colágeno tipo IV [Kefalides y Denduchis, 1969; Timpl y Brown, 1996; Miosge y col., 1999], laminina (1-12) [Ekblom y Timpl, 1996; Erickson y Couchman, 2000], entactina / nidógeno [Mayer y col., 1995; Miosge y col. 1999] y perlecan [Iozzo y col. 1994; Hopf y col., 1999]. A nivel de la MEC, la membrana basal está compuesta por dos tipos de redes independientes, una, formada por colágeno tipo IV y otra formada por distintas isoformas de lamininas interconectadas por la entactina-1. La red formada por colágeno tipo IV es altamente entrecruzada y participaría en el mantenimiento de la estabilidad mecánica. Las uniones de la red formada por laminina son de naturaleza no covalente y probablemente son más dinámicas que las de colágeno tipo IV. Ambas redes están conectadas a través de nidógeno, el cual junto a otros componentes estabiliza dichas proteínas [Dziadek, 1995; Simon-Assmann y col., 1995]. Otros autores, describen a las fibulinas 1-2, osteonectina (BM40/SPARC), entactina-2 y a los proteoglicanos, agrina, colágeno XVIII y leprecan, como componentes menores de las membranas basales. La presencia de estos componentes, sería tejido-específica [Timpl, 1996; Aumailley y Gayraud., 1998; Erickson y Couchman, 2000]

Con el avance de las técnicas de biología molecular y el uso de anticuerpos monoclonales se ha determinado que la composición de la MEC es más compleja que lo que su estructura sugiere. Originalmente las moléculas que conformaban la MEC se clasificaban en cuatro grandes grupos: 1) glicoproteínas colágenas, 2) proteoglicanos, 3) glicoproteínas no colágenas y 4) elastina. Hoy en día, esa clasificación se ha ampliado incluyéndose moléculas funcionalmente asociadas a la MEC (Tabla I).

**Tabla I.- Principales componentes de la matriz extracelular.**

<b>Grupos</b>	<b>Subgrupos</b>	<b>Componentes</b>
<b>Colágenos</b>	Formadores de fibrillas	I, II, III, V, XI
	Membrana basal	IV
	Asociados a fibrillas con triple hélice interrumpida	IX, XII, XIV, XVI, XIX
	Multiplexos	XV, XVIII
	Otros	VI, VII, VIII, X, XIII, XVII
<b>Glicoproteínas no colágenas</b>		Fn, Proteínas Matricelulares (Tn, SPARC, Trombospondinas), Fibrilinas Vitronectina, Microfibrillas asociadas,
	Membrana basal	lamininas (1-12), fibulinas nidogen/entactina
<b>Proteoglicanos</b>	Glicosaminoglicanos	heparan sulfato, condroitin sulfato, dermatan sulfato,
	Proteínas de bajo peso molecular ricas en leucina	decorin, biglican, lumican fibromodulina, epifican
	Modulares (no unidos a ácido hialurónico)	perlecan, agrina,
	Modulares: hialectanos (unidos a ácido hialurónico)	agrecan, versican, neurocan, brevican, sindecan
<b>Ácido hialurónico</b>	Glicosaminoglicano no unido a proteína	
<b>MMPs</b> (metaloproteinasas de matriz)		MMP 1-2-3-5-6-V
<b>TIMPs</b> (inhibidor tisular de MMPs)		TIMPS 1 y 2
<b>Factores de crecimiento asociados</b>		TGF-β1, FGF-1/2, IFN-γ, PDGF-A/B

MMPs: metaloproteinasas de matriz; TIMPs: Inhibidor tisular de MMPs; Fn: fibronectina; Tn: tenascina; SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine.

Las proteínas de la MEC son relativamente jóvenes comparadas con las proteínas intracelulares dado que las primeras, evolucionaron con la aparición de los organismos multicelulares, aproximadamente hace 700 millones de años (explosión Cámbrica). Muchas de ellas han conservado su estructura en organismos tan diversos como el *C. elegans*, la *Drosophila* y el hombre. [Hutter y col., 2000; Hynes y Zhao 2000; Rubin y col., 2000]. Los principales componentes de las membranas basales: laminina, colágeno tipo IV, perlecan y nidogen están altamente conservados en estas especies [Hohenester y Engel, 2002].

Anteriormente se consideraba que la MEC era una especie de andamiaje inerte que estabilizaba la estructura de los tejidos. Hoy se reconoce que la MEC juega un papel mucho más activo y complejo en la regulación del funcionamiento de las células que interactúan con ella, modulando su expresión génica, capacidad de migración, ciclo celular y muerte celular programada.[Hynes, 1992; Yoshimura,, 2002]. Por otro lado, la actividad de varios factores de crecimiento y citoquinas depende de su capacidad para unirse a las moléculas de la MEC. Esto ha contribuido a comprender el papel de la MEC en el crecimiento tumoral y en la metástasis, en la modulación de estímulos paracrinos y autocrinos, así como también, en la reparación tisular ante una injuria. [Schuppan y col., 1994].

### ***Moléculas de adhesión celular***

La adhesión de las células entre si y de las células a la MEC está mediada por una serie de receptores conocidos como moléculas de adhesión celular (MAC). Las MACs son glicoproteínas localizadas en la superficie celular, que poseen un dominio extracelular (amino-terminal) a través del cual se unen sus respectivos ligandos, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (carboxilo-terminal). De acuerdo al número de cadenas, las MACs pueden ser clasificadas como monoméricas o diméricas. Las monoméricas, están formadas por una sola cadena glicoproteica, mientras que las diméricas están constituidas por dos cadenas idénticas (homodiméricas) o por dos cadenas diferentes (heterodiméricas) [Albelda y Buck, 1990].

Una determinada MAC puede unirse de forma homotípica, si lo hace con MACs que se expresan en el mismo tipo celular, o heterotípica si se une a MACs localizadas en otros tipos celulares. Algunas MACs se expresan constitutivamente en

una célula mientras que otras requieren una inducción previa para expresarse [Albelda y Buck, 1990]. Las MACs pueden establecer interacciones homofílicas o heterofílicas. Son homofílicas aquellas que se unen específicamente a otras MACs pertenecientes a la misma familia, y heterofílicas las que lo hacen con MACs pertenecientes a distintas familias. Las MACs son clasificadas principalmente en cuatro familias:

a) **Cadherinas:** son moléculas monoméricas, que se comportan como receptores homofílicos, que a su vez presentan interacciones homo o heterotípicas participando en contactos célula-célula. Su acción es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . La familia de las cadherinas clásicas comprende por lo menos 12 cadherinas diferentes, aunque las más estudiadas son: la E-cadherina, que está presente en diferentes tipos de epitelios, la N-cadherina, que se expresa principalmente en el tejido nervioso y la P-cadherina que se expresa en la placenta. Este tipo de proteínas se localiza en sitios especializados formando parte de las uniones adherentes. Existen otras familias descritas como las cadherinas asociadas a desmosomas y la familia de las protocadherinas. Las cadherinas participan en la organización de los tejidos, en la implantación embrionaria y en la morfogénesis [Takeichi, 1995; Aplin y col., 1998, Juliano, 2002].

b) **Superfamilia de las inmunoglobulinas:** (Ig-MACs) son proteínas transmembrana que se caracterizan por poseer una o más copias de dominios Ig. Las MACs de este grupo pueden ser monoméricas, homodiméricas o heterodiméricas, pudiendo establecer uniones homofílicas o heterofílicas, reaccionando de modo homotípico o heterotípico. Su acción es  $\text{Ca}^{2+}$  independiente. Integran esta familia: la NCAM, la VCAM-1, la ICAM 1 y 2 que se detectaron inicialmente a nivel neuronal, vascular e intercelular, respectivamente. Los miembros de esta familia se expresan en una gran variedad de células y están involucrados en casi todo los procesos biológicos, tanto en el desarrollo embrionario como en el organismo adulto, participando activamente en el desarrollo del sistema nervioso y en el tráfico de las células del sistema inmune [Edelman y Crossin, 1991; Aplin y col., 1998, Juliano, 2002].



c) **Selectinas:** constituyen una pequeña familia de receptores transmembrana monoméricos, tipo lectina, que está compuesta principalmente por tres miembros: L, E y P-selectina. Las mismas, median interacciones heterofílicas células-célula a través del reconocimiento, dependiente de  $\text{Ca}^{++}$ , de glicolípidos o glicoproteínas que poseen grupos de ácido siálico. El principal papel fisiológico de estos receptores está relacionado con la adhesión de los leucocitos (neutrófilos y monocitos) a las células endoteliales en los procesos inflamatorios. [Rosales y Juliano 1995; Springer, 1995].

d) **Integrinas** dicho nombre se refiere a la función de integrar el exterior celular (MEC) con el interior de la célula (citoesqueleto) [Hynes, 1987]. Median fundamentalmente la interacción células-MEC, aunque también pueden estar involucradas en la interacción célula-célula [Hynes, 1999]. Constituyen una familia de glicoproteínas compuestas por heterodímeros formados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  unidas de manera no covalente, que poseen un extenso dominio extracelular, un dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático, con excepción de la subunidad  $\beta_4$  (figura 2) [Hynes, 1992; Ruoslahti 1991; Juliano 2002]. Las integrinas están altamente conservadas en la evolución aún entre especies muy alejadas [Hynes y Zhao, 2000]. Actualmente, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se clasifican en subtipos que difieren en la composición aminoacídica de sus cadenas. Hasta el momento se describieron, en los vertebrados, 18 subtipos de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha_1$  -  $\alpha_{18}$ ) y 8 de la subunidad  $\beta$  ( $\beta_1$  -  $\beta_8$ ). La combinación de dichas subunidades define características individuales de los receptores. Hasta el momento se han identificado aproximadamente 24 integrinas distintas [Plow y col., 2000; Juliano, 2002] (figura 3)

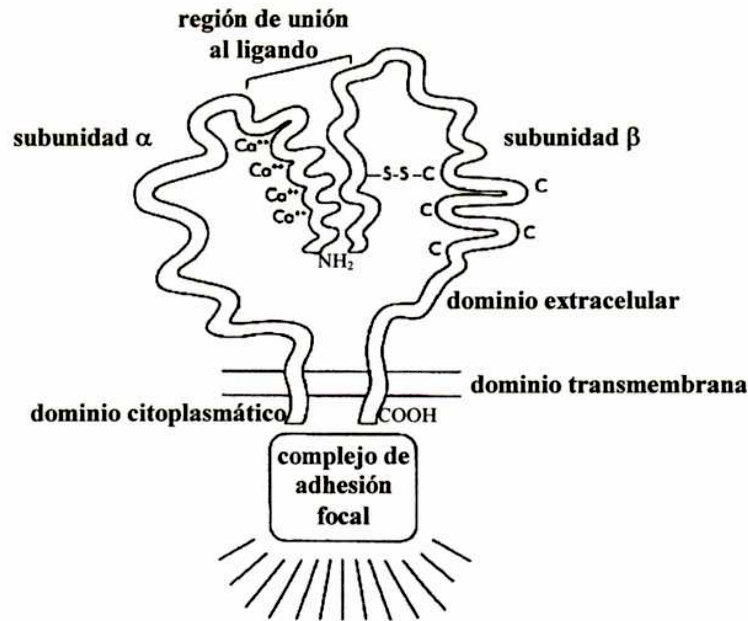


Figura 2.- Representación esquemática de la estructura de las integrinas

Un componente de la MEC puede ser reconocido por varias integrinas, así como también, una integrina puede reconocer distintos componentes de la MEC con diferente grado de afinidad, según la célula en la que se exprese (Tabla II) [Aplin y col., 1998; van der Flier y Sonnenberg, 2001]. Si bien ambas subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) contribuyen a la formación del sitio de unión al ligando, existen tres regiones particularmente importantes en la molécula: a) en la región amino-terminal de la cadena  $\alpha$ , una serie de 7 repeticiones de aproximadamente 60 aminoácidos cada una, que contiene sitios de unión al ión  $\text{Ca}^{2+}$  que se pliegan en una estructura tipo “ $\beta$  propeller”; b) el dominio-I, de aproximadamente 200 aminoácidos, insertado en las cadenas  $\alpha$  de varias integrinas ( $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$ ,  $\alpha_{11}\beta_1$ ,  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$ ,  $\alpha_D\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ) que contiene un sitio de unión a nucleótidos y c) una región tipo dominio-I de aproximadamente 250 aminoácidos en la porción amino-terminal de la cadena  $\beta$ , que sería crítica para la unión al ligando [Loftus y Liddington, 1997; Ivaska y Heino, 2000]. El sitio de unión al ligando de las integrinas es bastante heterogéneo y permite el reconocimiento de diversas secuencias específicas de aminoácidos, de las cuales se

han identificado catorce secuencias distintas, siendo la secuencia RGD (Arg, Gly, Asp) la más estudiada. [PLOW y col., 2000].

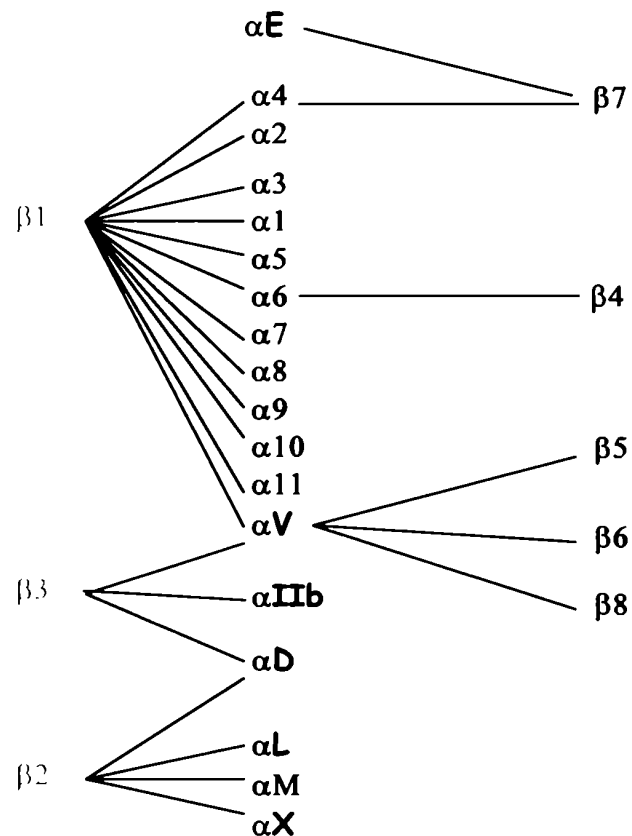


Figura 3.- Asociación descriptas entre las subunidades de la familia de las integrinas.

En base al subtipo de subunidad  $\beta$  se han clasificado ocho subfamilias de integrinas, siendo las más caracterizadas las subfamilias:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ . La subfamilia  $\beta 1$  media principalmente la unión de las proteínas de la MEC con el citoesqueleto. La subfamilia  $\beta 2$  se expresa en leucocitos, siendo sus ligandos otros receptores de la membrana celular y la subfamilia  $\beta 3$ , descrita en plaquetas y megacariocitos, posee la capacidad de unirse a distintos ligandos [Coppolino y Dedhar, 2000]. Otro factor que aumenta la complejidad de estos receptores, es la capacidad de sufrir corte y empalme alternativo del ARNm que codifica para los dominios citoplasmáticos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  [de Melker y Sonnenberg, 1999]. El resto de las subfamilias

( $\beta 5$  -  $\beta 8$ ) han sido recientemente descritas, por lo que no se dispone de suficiente información en la literatura.

**Tabla II.- Integrinas y sus principales ligandos.**

Integrina		Ligandos			
		MEC	Solubles	célula-célula	Virus
$\alpha 1\beta 1$		Col;Ln			
$\alpha 2\beta 1$		Col;Ln	MMP-1		
$\alpha 3\beta 1$		Ln;		$\alpha 3\beta 1$	invasina
$\alpha 4$	$\beta 1$	Fn;Op	pp-vWF; FXIII; angiotensina	VCAM-1	invasina
	$\beta 7$	Fn		VCAM-1	
$\alpha 5\beta 1$		Fn	tTG; endostatina	ADAM-15,17	
$\alpha 6$	$\beta 1$	Ln	mCTGF; Cyr61	ADAM-2,9	invasina
	$\beta 4$	Ln			
$\alpha 7\beta 1$		Ln			
$\alpha 8\beta 1$		Fn;Tn	TGF $\beta$ 1-LAP		
$\alpha 9\beta 1$		Tn;Op;Col;Ln	pp-vWF; FXIII;tTG angiotensina	VCAM-1 ADAM-12,15	
$\alpha 10\beta 1$		Col			
$\alpha 11\beta 1$		Col			
$\alpha v$	$\beta 1$	Fn;Vn	TGF $\beta$ 1-LAP		
	$\beta 3$	Vn;Fn;vWF;Op; Tn	Fg;Cyr61;mCTGF MMP-2; endostatina angiotensina	ADAM-15,23 CD-31	desintegrinas
	$\beta 5$	Vn	TGF $\beta$ 1-LAP, Cyr61 endostatina		
	$\beta 6$	Fn;Tn	TGF $\beta$ 1-LAP		
	$\beta 8$	Col;Ln;Fn	TGF $\beta$ 1-LAP		
$\alpha IIb\beta 3$		Vn;Fn;vWF	Fg;Cyr61;mCTGF protrombina		desintegrina;
$\alpha L\beta 2$				ICAM-1-5	
$\alpha M\beta 2$			Fg;iC3b;FX	ICAM-1; VCAM-1	
$\alpha X\beta 2$			Fg;iC3b		
$\alpha D\beta 2$				ICAM-3; VCAM-1	
$\alpha E\beta 7$				E-cadherina	

ADAM: metaloproteínasa y desintegrina A; Cyr61: proteína angiogénica rica en cisteína 61; Col: colágeno; Fg: fibrinógeno; Fn: fibronectina; FX: factor de coagulación X; FXIII: factor de coagulación XIII; iC3b: componente inactivado del complemento C3b; ICAM: molécula de adhesión intracelular; Ln: laminina; mCTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo de ratón; MMP: metaloproteinasas de matriz; Op: osteopontina; Rn: reelina; TGF $\beta$ -LAP: péptido latente asociado a TGF $\beta$ ; Tn: tenascina; Tsp: trombospondina; tTG: transglutaminasa de tejidos; VCAM: molécula de adhesión vascular; Vn: vitronectina; vWF: factor de von Willebrand.

## ***Adhesión Focal***

La adhesión de las células entre si o de las células a la MEC puede efectuarse a través de distintos mecanismos, los cuales incluyen adhesiones célula-célula mediadas por: cadherinas; proteoglicanos que incluyen un complejo de proteínas formado por ERM (erzina/radixina/moessina); uniones de tipo desmosómicas; hemidesmosómicas; estrechas y en hendidura [Staehelin y Hull, 1978; Adams, 2001].

En cultivos celulares, la adhesión de las células al sustrato se realiza a través de adhesiones focales o placas de adhesión. Estas adhesiones focales, también observadas in vivo [Pavalko y Otey, 1994], se describen como zonas especializadas donde las células se unen a la MEC a través de las integrinas [Burridge y Chrzanowska-wodnicka, 1996; Aplin y col., 1998]. Esta unión desencadena inicialmente, un desplazamiento de las integrinas en el plano de la membrana celular formando agregados. Estos inducen a las integrinas a interactuar con las proteínas asociadas al citoesqueleto, promoviendo la agregación de los filamentos de actina. De las proteínas asociadas al citoesqueleto capaces de interactuar con las integrinas podemos destacar a: talina [Burridge y Connell, 1983],  $\alpha$ -actinina [Noegel y col., 1987], tensina [Wilkins y Lin, 1986], vinculina [Molony y Burridge, 1985], paxilina [Glenney y Zokas, 1989], filamina [Gorlin y col., 1990], entre otras. En los contactos focales maduros, los filamentos de actina se extienden formando estructuras denominadas fibras de estrés [Aplin y col., 1998].

La reorganización de los filamentos de actina ejerce un mecanismo de retroalimentación positiva (“feedback” positivo) estimulando aún más, la agregación de las integrinas, modulando no sólo la avidéz sino también la afinidad de estas por sus ligandos. Esto da lugar a una unión de tipo dinámico, ya que confiere a las integrinas la capacidad de actuar como transductores de señales desde el compartimento extracelular al intracelular o viceversa (“inside-out” y “outside-in”), desencadenando procesos bioquímicos en el interior de la célula [Howe y col., 1998; Calderwood y col., 2000](figura 4).

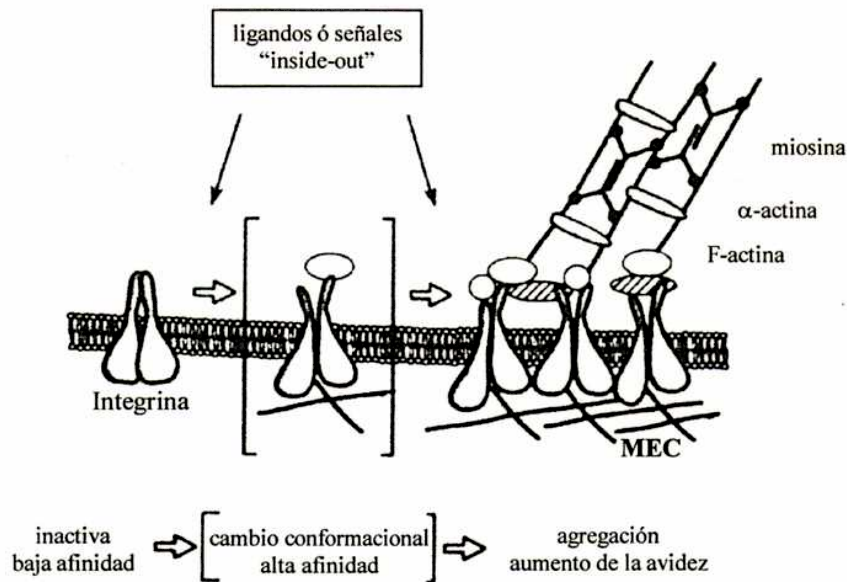
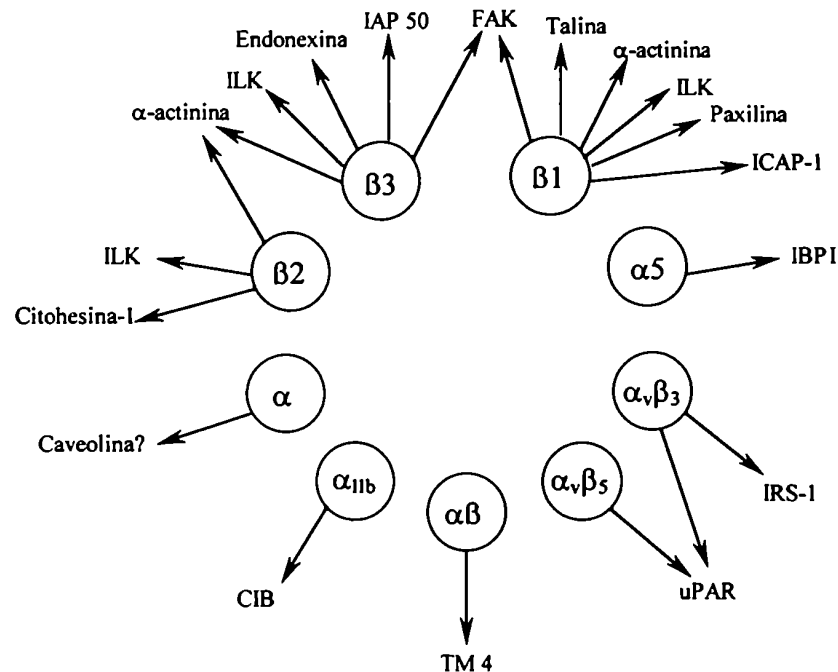


Figura 4.- Representación esquemática de la formación de las adhesiones focales.

Las adhesiones focales varían no sólo en tamaño y aspecto sino también en la composición y en el estado de activación, dependiendo de las proteínas que participen en su formación [Lee y Jacobson, 1997; Zamir y col, 1999 y 2000; Katz y col., 2000].

A través de experimentos *in vitro*, se ha demostrado que el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta$  puede interactuar con una gran variedad de proteínas, dentro de las cuales podemos destacar:  $\alpha$ -actinina [Otey y col., 1993], FAK ("focal adhesión kinase"),  $\beta 3$  endonexina [Shattil y col., 1995], ILK ("integrin-linked kinase") [Dedhar y Hannigan, 1996], citohesina-1 [Kolanus y col., 1996] o con ICAP1  $\alpha$  y  $\beta$  ("integrin cytoplasmic domin-associated protein 1"), entre otras. Recientemente, se ha descrito que el dominio citoplasmático de la subunidad  $\alpha$  también puede intervenir en la adhesión focal, uniéndose a calreticulina [Coppolino y col., 1995] o CIB ("calcium- and integrin-binding protein"), entre otras [Naik y col., 1997]. Del mismo modo, se ha demostrado que, a través de sus dominios transmembrana y extracelular, las integrinas pueden interactuar con proteínas de membrana, por ejemplo, la familia de proteínas TM4 (tetraspaninas) [Shaw y col., 1995], IAP 50 ("integrin-associated protein") [Lindberg y col., 1993] y caveolina

[Wary y col., 1996]. En los últimos años, se ha observado la existencia de proteínas que interaccionan con ambas subunidades, entre las que podemos citar a IRS-1 (“insulin receptor substrate 1”), a la familia de las MMPs (“matriz metaloproteasas”) [Brooks y col., 1996] y a uPAR (“urokinase-type plasminogen activator receptor”) [Wei, y col., 1996] (figura 5).



**Figura 5.-** Principales proteínas asociadas a las integrinas que forman parte de las adhesiones focales. El desarrollo de estas interacciones en un tipo celular, depende del ligando, de las integrinas y del estado fisiológico de las células.

### ***Señales intracelulares desencadenadas por las integrinas***

De la unión de las integrinas a sus ligandos resulta la activación de una variedad de señales intracelulares, que pueden agruparse en dos grandes categorías:

#### **1.-Señales directas**

Son las señales desencadenadas por la unión de las integrinas a la MEC. Estas activan principalmente proteínas tirosina quinasas [Kornberg y col., 1991], pudiendo activar también serina / treonina quinasas; el flujo transiente de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  /  $\text{H}^+$ ; el metabolismo de los fosfoinosítidos (fosfatidil inositol-4,5-bifosfato) y la

familia Rho-guanosina 5´trifosfatasa (Rho-GTPasa) [Howe y col., 1998, Juliano, 2002].

### 1.a. -Activación de tirosina quinasas

FAK es una de las primeras proteínas tirosina quinasas caracterizadas que interactúa con el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta_1$ . Hoy se sabe que esta proteína forma parte de una familia, compuesta además por PYK2 (“proline-rich tyrosine kinase 2”). La proteína FAK tiene la capacidad de interactuar con una variedad de proteínas, en particular se encuentra unida de forma constitutiva con paxilina y talina (proteínas del citoesqueleto). La agregación de las integrinas induce la autofosforilación de FAK en la tirosina 397, indispensable para la formación de la adhesión focal. Una vez activada FAK, se expone un sitio de unión al dominio SH2 (“Src homology region 2”) de otra proteína tirosina quinasa denominada Src (“Sarcoma Rous celular”) [Schaller y col., 1994], con lo que se induce la fosforilación adicional de las tirosinas 407, 576, 577, 861 y 925. Las tirosinas 576 y 577 se encuentran en el sitio catalítico de FAK siendo importante su fosforilación para una máxima actividad de la proteína [Calalb y col., 1995]. La tirosina 925 se encuentra dentro de una secuencia consenso Tyr-Glu-Asn-Val, y su fosforilación es importante para la unión con el dominio SH2 de Grb2 (“growth factor receptor-binding protein-2”) [Schlaepfer y col., 1994]. El papel de la fosforilación de las tirosinas 407 y 861 aún no está dilucidado [Aplin y col., 1998; Schaller, 2001].

FAK tiene la capacidad de unirse a una amplia gama de proteínas adaptadoras con lo cual puede desencadenar la activación de varias cascadas de señalización intracelular como la activación de la fosfatidilinositol 3-OH quinasa (PI3K), la activación de la vía de señalización de la proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK) y de la c-jun quinasas (JNK) [Aplin y col., 1998; Schaller, 2001, Juliano, 2002].

Otras proteínas tirosina quinasas que se activan por acción de la subunidad  $\beta$  de las integrinas forman parte de la familia Src, la cual esta compuesta por: Fyn, Yes, Fgr, Hck, entre otras. En particular Src, a través de sus dominios SH2 y SH3, puede interactuar con muchas proteínas involucradas en la adhesión focal como FAK, Paxilina y p130<sup>CAS</sup> [Abram y Courtneidge, 2000]. Por otro lado, se ha demostrado



que Fyn, interacciona con caveolina-1, pudiendo activar la cascada de MAPK [Warry y col., 1998; Wei y col., 1999].

Recientemente se han descrito otras proteínas quinasas activadas por integrinas: C-Abl, es una tirosina quinasa no citoplasmática que interactúa con F-actina [Wang, 1993] y SYK (“Spleen tyrosine kinase”) ha sido encontrada en células hematopoyéticas interviniendo en procesos inflamatorios [Qian y Weiss, 1997].

### **1.b. - Activación directa de la cascada de MAPKs**

La activación de la cascada de las MAPK es un evento común en la respuesta a diversos estímulos extracelulares. El concepto de que la activación es originada específicamente por la adhesión celular mediada por integrinas, más que por receptores celulares heterólogos o por uniones no específicas, fue confirmada por tres tipos de experimentos: 1) en células cultivadas sobre polilisina, se observó un aumento de la adhesión celular no específica, sin un incremento de la actividad de MAPK, [Chen y col., 1994; Mainiero y col., 1997; Miyamoto y col., 1995; Morino y col., 1995]. 2) en células cultivadas sobre placas o perlas cubiertas con anticuerpos específicos anti-integrinas, varios autores demostraron actividad de las MAPK, actividad que no está presente cuando las placas o las perlas son cubiertas con anticuerpos contra CD44 o MHC clase I [Chen y col., 1996, Lin y col., 1997; Wary y col., 1996]. 3) la adhesión de las células a fibronectina y la activación de MAPK fue inhibida por incubación de las células con fragmentos solubles de la secuencia RGD [Zhu y Assoian, 1995].

Estos antecedentes, han permitido proponer tres diferentes vías para la activación de la cascada de las MAPK a través de las integrinas:

#### **1) Mecanismo dependiente de FAK y Ras.**

La agregación de las integrinas induce la autofosforilación de FAK en la tirosina 397 a través de la unión de la integrina. Esto expone el sitio de unión al dominio SH2 de Src, esta quinasa se une a FAK e induce la fosforilación de tirosinas adicionales. En particular, la tirosina 925 provee un sitio de unión al dominio SH2 de Grb2 (“growth factor receptor bound-2”). Una vez activada, Grb2 se une y activa SOS (“son of sevenless”) a través de su dominio SH3. El complejo Grb2/SOS,

funciona como un factor intercambiador de nucleótidos para la proteína Ras ya que estas interacciones resultan en la activación de la GTPasa Ras que activa la serina/treonina Raf, la cual a su vez activa la serina/treonina/tirosina quinasa MEK (“MAPK kinase”). Esta última, es capaz de transducir la señal a sus moléculas efectoras: en este caso en particular por fosforilación en serina/treonina y tirosina, activa a ERK 1 y 2 (“Extracellular Regulated Kinase 1 y 2”). [*Aplin y col., 1998; Juliano, 2002*] (figura 6a).

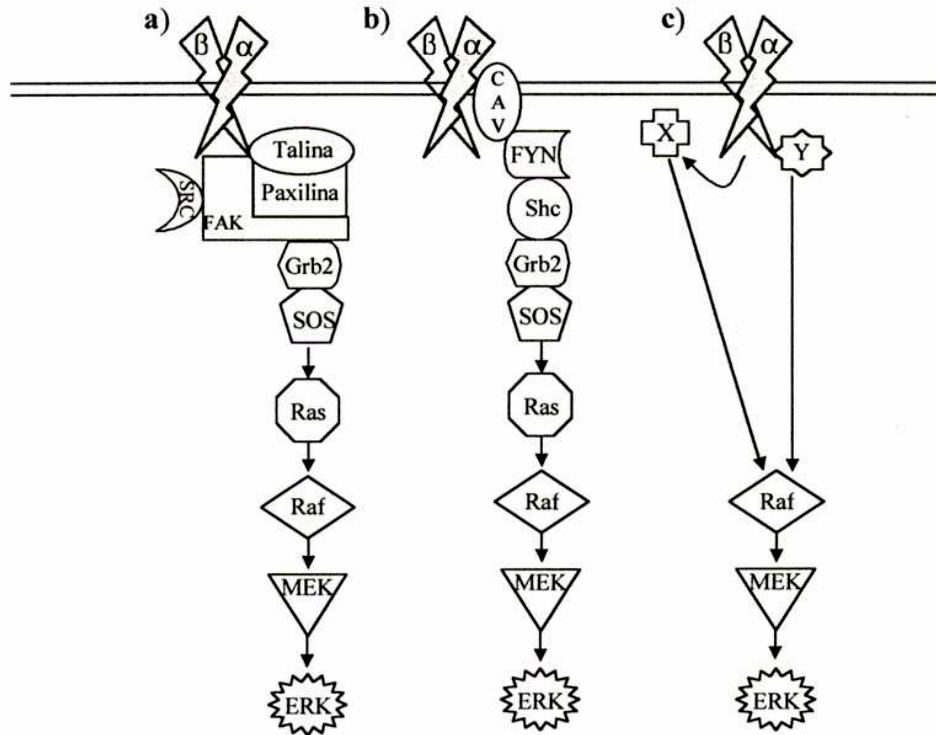
## **2) Mecanismo de activación independiente de FAK y dependiente de Ras**

Este modelo involucra a la proteína transmembrana caveolina-1, a la proteína tirosina quinasa Fyn y a la proteína adaptadora Shc. Como se puede observar en la figura 6b, la subunidad  $\alpha$  de las integrinas, a través de los dominios transmembrana y extracelular, interacciona con la caveolina-1, que se comporta como proteína adaptadora capaz de unirse al dominio SH2 de Fyn, activándola. En este estado, Fyn puede unirse a Shc fosforilándola en su dominio PTB (“phosphotyrosine binding”), pudiendo este reclutar al complejo Grb2/SOS. Este complejo, activa a Ras, la cual es capaz de fosforilar a Raf-1 con la consiguiente transducción de la señal a sus moléculas efectoras, MEK y ERK 1 y 2. [*Wary y col., 1996, Howe y col., 1998; Giancotti y Ruoslahti, 1999; Juliano, 2002*]

## **3) Mecanismo de activación independiente de Ras**

En los dos modelos descritos anteriormente, la activación de ERK es mediada por Ras. Sin embargo, existen evidencias de mecanismos de activación que son independientes de Ras, aunque éstos no están completamente dilucidados. Para uno de ellos se postula que, dada la proximidad de Raf a la membrana plasmática, las integrinas activarían efectores asociados a esta, como las fosfolipasas A<sub>2</sub>, C o D, las cuales a su vez pueden activar a PKC (representada en la figura 6c como X). Como esta descrito, algunas isoformas de PKC pueden activar directamente a Raf. [*Aplin y col., 1998; Juliano, 2002*], con la consiguiente transducción de la señal a sus moléculas efectoras (figura 6c). Otro modelo postula que ILK es capaz de activar a la proteína Raf directamente. Se ha demostrado que ILK se fosforila al interactuar con

el dominio citoplasmático de  $\beta 1$  ó  $\beta 3$ , pudiendo asociarse con Raf de una manera Ras independiente (representada en la figura 6c como Y) [Dedhar, 2000].



**Figura 6.-** Representación esquemática de las vías directas de activación de la cascada de MAPKs mediada por las integrinas. **a)** Mecanismo dependiente de FAK y Ras. **b)** Mecanismo FAK independiente y Ras dependiente. **c)** Mecanismo Ras independiente.

## 2.- Señales de colaboración:

Son aquellas en las cuales la adhesión celular mediada por integrinas modula eventos de señalización intracelular de otros receptores como por ejemplo: receptores tirosina quinasa (RTK) activados por factores de crecimiento [Giancotti y Ruoslahti, 1999].

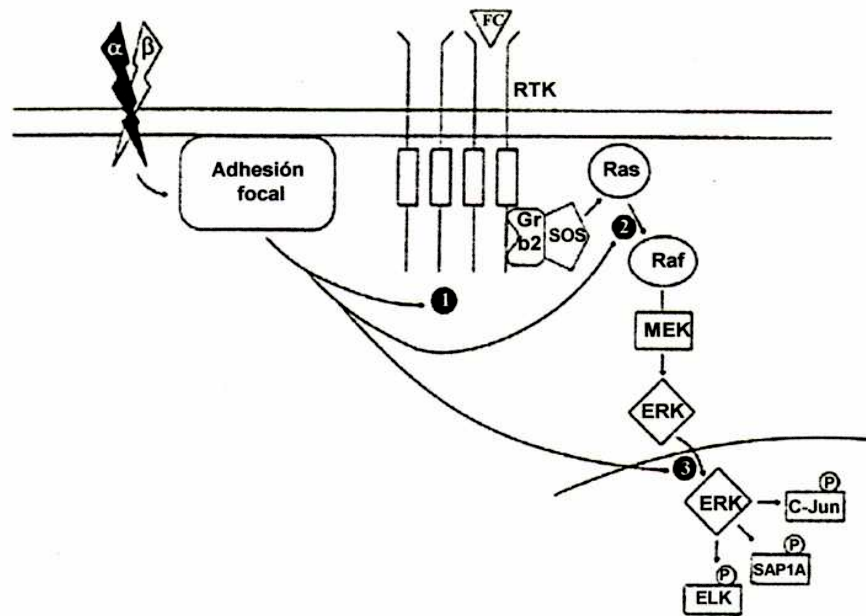
Uno de los procesos más estudiados ha sido el crecimiento celular dependiente de la adhesión. Se observó que RTKs, como el receptor de insulina, el

receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) entre otros, necesitan condiciones apropiadas de adhesión celular para ser activados en forma óptima. Si bien no está dilucidado el mecanismo por el cual las integrinas y los RTKs pueden interactuar, la similitud de las señales intracelulares activadas por ambos tipos de receptores sugiere un entrecruzamiento en los caminos de señalización (“cross-talk”). Actualmente, se han propuesto varios mecanismos para explicar la convergencia de la señalización entre ambos tipos de receptores, los cuales podrían ocurrir a diferentes niveles (figura 7). El más directo, descrito por Sundberg y Rubin [1996], involucra la agregación de las integrinas, fenómeno que induciría la fosforilación de los RTKs en forma independiente a la presencia de su ligando. Dicha agregación es inhibida por citocalasina D, molécula que inhibe la polimerización de los filamentos de actina. Esto sugiere que es necesaria una reorganización del citoesqueleto para la activación de los RTKs.

Se postula un segundo mecanismo por el cual la activación de RKTs no sólo se desencadena por la unión de éstos a su ligando, sino que la agregación de integrinas estimula la co-agregación de receptores tirosina quinasas. Dicho mecanismo incrementa la probabilidad de dimerización de los RTKs, sinergizando ambas respuestas intracelulares [Miyamoto y col., 1996]. En los dos ejemplos anteriores, las integrinas regulan la señalización desencadenada por los factores de crecimiento a nivel de RTK, ya sea en presencia o ausencia de su ligando. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la agregación de las integrinas puede afectar eventos posteriores a la activación de los RTKs. [Wary, y col., 1996]. En los últimos años, Lin y col., [1997] demostraron que la adhesión de fibroblastos al sustrato modula la transducción de señales entre RTKs y MAPK. Estos autores observaron que en dichas células cultivadas en suspensión, los RTKs, en presencia de sus ligandos, son capaces de fosforilarse y activar a la proteína Ras. Sin embargo, la activación de Raf, MEK y MAPK, necesita de la señal desencadenada por la adhesión de las células al sustrato.

Si bien está demostrado que la unión de la MEC a su receptor modula la respuesta desencadenada por los RTKs, es importante destacar que diferentes proteínas de la MEC pueden afectar selectivamente el tipo de respuesta intracelular, así por ejemplo, en la glándula mamaria las células epiteliales necesitan de la adhesión a la membrana basal para que la prolactina y la insulina desencadenen sus

respuestas intracelulares. Sin embargo, se demostró que mientras la adhesión de estas células a la laminina estimula dicha respuesta, la señal es inhibida si las células están adheridas al colágeno-I [Lee y Streuli., 1999].



**Figura 7.-** Esquema que representa los sitios en los cuales las integrinas pueden regular la cascada de señalización desencadenada por los RTKs. 1) Regulación a nivel de RTK en ausencia o presencia de factores de crecimiento (FC). 2) Regulación a nivel de la interacción Ras/Raf. 3) Regulación del transporte de la señal del citoplasma al núcleo. ELK/SAP1A: factores de transcripción.

## ***Histología del testículo***

Desde los primeros tiempos de la historia, se relaciona a los testículos con los caracteres sexuales secundarios y con el poder reproductivo de los individuos [Sáez, 1994]. Luego de muchos años de investigación, se sabe que la capacidad reproductiva de los machos sexualmente maduros, depende de una adecuada producción de andrógenos por parte de las células del tejido intersticial del testículo, lo que asegura un desarrollo apropiado del sistema reproductor y la producción de un número suficiente de espermatozoides viables.

El testículo de los mamíferos adultos, es una glándula estructurada por compartimentos compuestos por diferentes tipos celulares relacionados funcionalmente. Estos compartimentos están representados por los túbulos seminíferos y por el tejido intersticial. Los túbulos seminíferos están tapizados por el epitelio seminífero, que comprende a las células de Sertoli y a las células de la línea germinal. Las células de Sertoli constituyen el sostén y soporte nutritivo-trófico para todas las generaciones de células germinales. Estas darán origen a los espermatozoides a través de un complejo proceso de multiplicación y diferenciación celular conocido como espermatogénesis. La pared del tubo seminífero está formada por la membrana basal y por abundantes elementos fibrilares de la matriz extracelular. Entre estas fibras se localizan las células peritubulares o mioides que representan el elemento contráctil de la pared de los túbulos seminíferos. [Dym y Fawcett, 1970; de Kreiser y col., 1975; Christl 1990; Chan y col., 1993].

Entre los túbulos seminíferos se encuentra el tejido intersticial o intertubular, compuesto principalmente por las células de Leydig, que se presentan generalmente formando agregados celulares cerca de los vasos sanguíneos. Asimismo, en el tejido intersticial están presentes células propias del tejido conectivo y células inmunocompetentes como macrófagos [Russell, 1996].

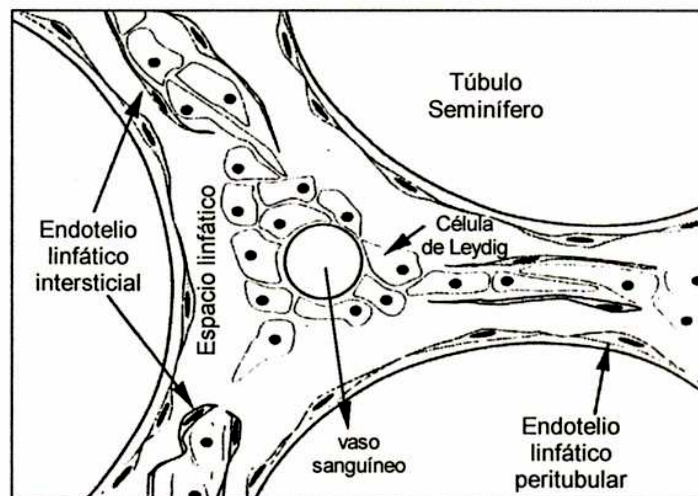
Todas las células presentes en el tejido intersticial están inmersas en una matriz conectiva laxa, en la que se observan vasos sanguíneos de distinto calibre, formando un núcleo central ("core") alrededor del cual se encuentran numerosas células de Leydig y vasos linfáticos, cuya organización y tamaño varía dependiendo de la especie [Fawcett, 1973].

A través de estudios comparativos, se han propuesto cuatro patrones de organización del tejido intersticial [Fawcett y col., 1973]. En los roedores (figura 8)



sólo una pequeña fracción del volumen testicular es ocupada por las células de Leydig, las cuales comúnmente están formando agregados alrededor de los vasos sanguíneos. La mayor parte del área intersticial está compuesta por sinusoides linfáticos peritubulares, cuya pared está formada por una delgada capa de endotelio. A diferencia de otros roedores, en la rata y en el ratón, las células de Leydig están expuestas a los fluidos provenientes de los sinusoides linfáticos, los que dada su estructura, permiten la comunicación directa entre el tejido conectivo laxo y el espacio linfático. Además, las células de Leydig de la rata y el ratón no están confinadas a una determinada localización dentro del intersticio; muchas veces, se observan en posición peritubular o alternativamente en regiones más centrales dentro del tejido intersticial, donde parece faltar una asociación con el tejido conectivo, estando casi totalmente bañadas por linfa [Fawcett, 1973; Fawcett y col., 1973; de Kretser y Kerr, 1994].

**Figura 8.-** Esquema de la organización del tejido intersticial en roedores



A través de estudios de microscopía electrónica de barrido, Clark [1976] describió la organización del compartimento intersticial de la rata. En estos estudios, observó que las células intersticiales localizadas entre dos túbulos seminíferos, presentan una capa de endotelio linfático intersticial (visceral), delimitando un canal linfático entre el endotelio linfático intersticial y el peritubular. Por otro lado observó, que los agregados de células de Leydig existentes en la intersección de tres túbulos seminíferos, se caracterizan porque el endotelio linfático intersticial está ausente. En estas regiones, las células de Leydig están en contacto directo con el fluido linfático, lo que facilita el intercambio de sustancias entre células, sangre y linfa.

## *Células de Leydig*

Las células de Leydig de mamíferos adultos presentan una forma y un tamaño variable. En la rata, alcanzan un diámetro de 8 a 12  $\mu\text{m}$  a diferencia de otras especies en las cuales el diámetro promedio es de 30  $\mu\text{m}$  [Belt y Cavazos, 1967]. Por lo general, su forma es poligonal, ovoide o esférica. Por microscopía electrónica se ha demostrado que el citoplasma de las células de Leydig presenta un gran desarrollo del retículo endoplásmico liso que se organiza como una malla de túbulos y cisternas [Russell, 1996]. La forma de éste varía considerablemente entre las especies, y no hay suficiente información que indique una correlación entre estructura y función para las diferentes formas de esta organela. Generalmente, cada especie tiene un patrón característico en cuanto a su forma: tubular en la rata y fenestrado en el cobayo. La abundancia relativa y la manera en la cual el retículo está organizado dentro de la célula de Leydig es una característica particular de cada especie. Varios autores han descrito una relación entre densidad y volumen del retículo endoplásmico y la capacidad de secretar esteroides [Russell, 1996]. Las mitocondrias son muy abundantes y tienen forma esférica, ovoide o elongada. Al igual que en otras células secretoras de esteroides, las mitocondrias de las células de Leydig presentan crestas tubulares [Russell y Bruget, 1977]. Se ha observado también la presencia de gotas lipídicas que están distribuidas irregularmente en el citoplasma de las células de Leydig. Estos depósitos de lípidos representan sitios de almacenamiento de grasas neutras y ésteres de colesterol [Schulze, 1984]. Estos últimos, al ser hidrolizados liberan colesterol, el que es utilizado en la biosíntesis de la testosterona.

La forma del núcleo de las células de Leydig varía considerablemente entre las especies, se lo ha descrito como grande, esférico, de localización excéntrica, con acúmulos de heterocromatina a lo largo de la envoltura nuclear y un nucléolo prominente. En la rata y en el ratón, el núcleo es de forma irregular, con heterocromatina que ocupa aproximadamente el 13% de su volumen [Russell y col., 1992]. En el citoplasma de las células de Leydig se observa además, un retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, lisosomas y peroxisomas [Schulze, 1984; Russell y col., 1992; Mendis-Handagama y col., 1990].

La superficie celular presenta proyecciones citoplasmáticas en forma de filopodios o microvellosidades [Kerr y col., 1979; Schulze, 1984]. Algunos de estos



pueden tomar contacto con los filopodios de células vecinas, mientras que otros aparecen libres en el espacio extracelular, sin contacto con otras células. Kerr y de Kretser [1981] demostraron que una célula de Leydig de rata con forma esférica tendría un área de superficie de  $500 \mu\text{m}^2$ , y que la presencia de procesos filopódicos incrementa, aproximadamente en tres veces, su área de superficie. En las células de Leydig también se observan irregularidades en su superficie celular que son producidas por la ingesta de material extracelular, ya sea a través de vesículas pinocíticas, micropinocíticas o por vesículas revestidas. Esto indicaría que las células de Leydig presentan una activa incorporación de moléculas extracelulares a través de interacciones específicas o inespecíficas con el ambiente que las rodea.

En la mayoría de las especies, las células de Leydig forman agregados cuyas células están interconectadas por uniones especializadas del tipo hendidura ("Gap junctions") y por uniones semejantes a desmosomas [Perez-Armendariz y col., 1994]. Las uniones en hendidura ocupan poco espacio de la superficie celular, siendo la conexina, la principal proteína que forma los conexones, que constituyen el canal comunicante en este tipo de uniones [Risley y col., 1992]. En las células de Leydig, el papel de las uniones en hendidura es poco conocido, sin embargo se ha observado que el AMPc puede atravesar el canal formado por estas uniones, sugiriendo la posibilidad de una secreción coordinada entre células de Leydig acopladas. Por otro lado, se ha propuesto que las uniones semejantes a desmosomas, participarían en la formación de los agregados de las células de Leydig [Miller y col., 1983; Hutson, 1992].

### ***Biosíntesis de esteroides testiculares***

El principal esteroide secretado por el testículo son los andrógenos, siendo la testosterona el más importante. La biosíntesis de los andrógenos a partir de pregnenolona, dependiendo de las especies y de la etapa del desarrollo, puede ocurrir a través de la vía  $\Delta^5$  y/o  $\Delta^4$ . En el hombre así como en los conejos, cerdos y perros la vía predominante es la  $\Delta^5$ , mientras que en la rata la principal vía es la  $\Delta^4$ .

## 1.- El colesterol como precursor de hormonas esteroideas

Las células esteroidogénicas del testículo, de la adrenal y del ovario, sintetizan las hormonas esteroideas a partir de colesterol, el cual puede provenir de las lipoproteínas plasmáticas y/o del que se origina por síntesis a partir de acetato. La contribución relativa de cada una de estas fuentes de colesterol a la producción de esteroides varía de acuerdo al tejido y a la especie animal. En la rata, el 40% del colesterol utilizado en la biosíntesis de esteroides testiculares proviene de las lipoproteínas plasmáticas, mientras que en la adrenal el 90% de los esteroides producidos es atribuible a dicha fuente. Por otro lado, en el cobayo el 60% del colesterol utilizado en la biosíntesis de esteroides adrenales proviene de las lipoproteínas plasmáticas y en el testículo, sólo el 13% proviene de dicha fuente [Morris y Chaikoff, 1959]. Si bien se ha demostrado la presencia de receptores para lipoproteínas en las células de Leydig de rata, de porcino y en línea de células de Leydig tumorales (MA-10) [Chen y col., 1980, Freeman y Ascoli 1982 y 3 Benhamed y col., 1983], existen otras evidencias que indican que la biosíntesis de andrógenos en el testículo es escasamente dependiente de las lipoproteínas plasmáticas [Andersen y Dietschy, 1978; Ascoli, 1981].

La síntesis de novo del colesterol se inicia a partir de la condensación de tres moléculas de acetyl-CoA. Esta reacción da como producto  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), que por acción de la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa es convertido a ácido mevalónico. Mediante una serie de fosforilaciones sucesivas, este último es convertido a isopentil-pirofosfato, el que es transformado a escualeno mediante una serie de condensaciones seguidas por una desfosforilación. A partir del escualeno se forma lanosterol, el que finalmente es convertido a colesterol (figura 9). En la biosíntesis de colesterol la conversión de HMG-CoA a ácido mevalónico está modulada por diversos factores hormonales que regulan la actividad de la enzima hidroximetilglutaril-CoA [Charreau y col., 1981].

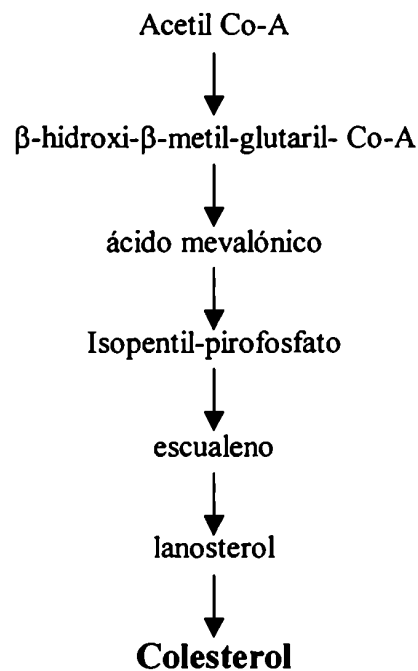


Figura 9.- Esquema de la conversión de acetil-CoA a colesterol.

El colesterol es un compuesto de 27 átomos de carbono, muy poco soluble en agua, que se almacena principalmente esterificado en gotas lipídicas, aunque también se lo encuentra como colesterol libre en las membranas celulares [Lange y Ramos 1983]. Para ser utilizado como sustrato en la biosíntesis de esteroides, los ésteres del colesterol son hidrolizados a colesterol libre. Como se discutirá más adelante, el colesterol libre es transportado a la membrana interna mitocondrial por un mecanismo aún no dilucidado en el que participarían una o más proteínas específicas [Freeman y Rommerts, 1996].

## 2. - Conversión de colesterol a pregnenolona

La conversión de colesterol a pregnenolona (compuesto de 21 átomos de carbono) es catalizada por el complejo enzimático que cliva la cadena lateral del colesterol (P450<sub>scc</sub>). Esta reacción se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria, requiere de tres moléculas de oxígeno, de tres moléculas de NADPH y de un sistema transportador de electrones formado por proteínas que contienen hierro

en su estructura, tales como la adrenodoxina, la adrenodoxina reductasa y del citocromo P450 [Porter y Coon, 1991]. El complejo enzimático P450<sub>scc</sub> cataliza tres reacciones secuenciales de oxidación del colesterol, e hidroxilaciones de los carbonos 22 y 20, seguidas ambas por la ruptura del enlace C22-C20, dando como productos finales pregnenolona y un aldehído isocaproico [Bursteins y Gut, 1976] (figura 10)

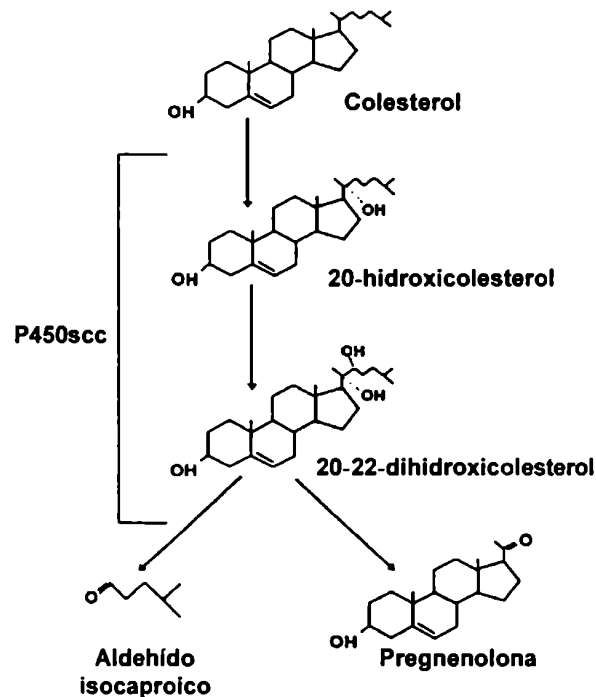


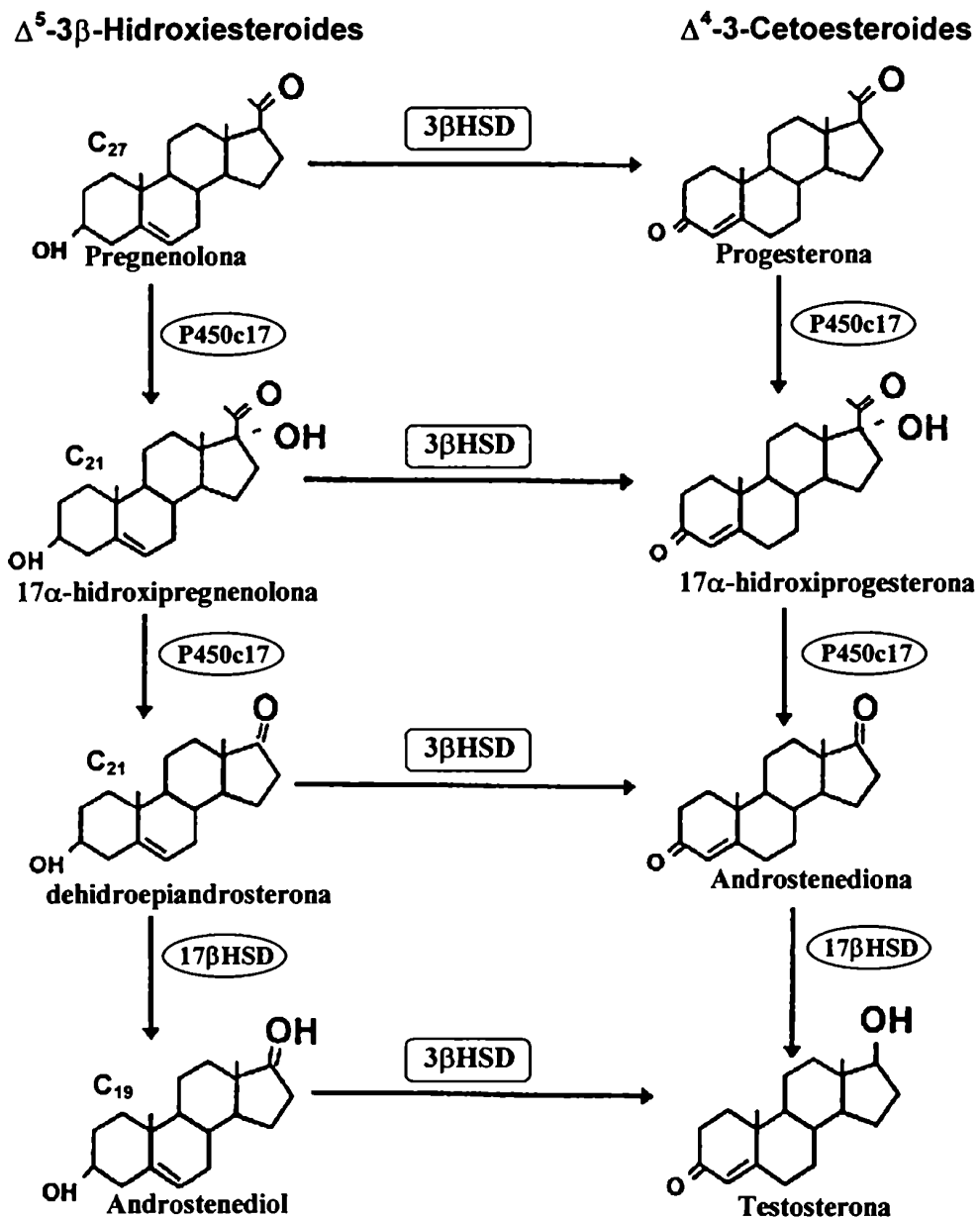
Figura 10.- Esquema de la conversión de colesterol a pregnenolona. P450<sub>scc</sub>: complejo enzimático que cliva la cadena lateral del colesterol.

### 3.- Conversión de pregnenolona a testosterona

La pregnenolona producida en la mitocondria pasa al retículo endoplásmico liso donde es convertida a testosterona (compuesto de 19 átomos de carbono) mediante una serie de reacciones catalizadas por las enzimas 3 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerasa (3 $\beta$ HSD), 17- $\alpha$  hidroxilasa/17-20 liasa (P450c17) y 17 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ HSD) (figura 11). La 3 $\beta$ HSD participa en la deshidrogenación del grupo 3 $\beta$ -hidroxi y en la isomerización del doble enlace de los carbonos 5-6 a los carbonos 4-5. Estas reacciones requieren de NAD<sup>+</sup> como

cofactor, habiéndose demostrado que ambas actividades enzimáticas se encuentran en el mismo polipéptido [Rheume y col., 1991]. La P450c17 participa en dos reacciones sucesivas, la hidroxilación del carbono 17 y la ruptura del enlace C17-C20, reacciones que además, requieren de la presencia de citocromo b5 y NADPH como cofactor. Las dos actividades enzimáticas se localizan en una sola proteína [Nakajin y Hall 1981; Nakajin y col., 1981]. La 17 $\beta$ HSD es la enzima que cataliza la conversión del grupo ceto a grupo hidroxilo en el carbono 17. Esta reacción es la única reversible en la biosíntesis de testosterona, por lo que la dirección de la misma va a depender tanto del sustrato como del cofactor [Martel y col., 1992].

Existen dos vías principales para la biosíntesis de testosterona a partir de pregnenolona, la vía  $\Delta^4$  y la vía  $\Delta^5$ . La rata y el cobayo utilizan preferentemente la vía  $\Delta^4$  [Kwan y col., 1988; Tremblay y col., 1994], mientras que el cerdo, el conejo, el perro, el mono y el humano utilizan predominantemente la vía  $\Delta^5$  [Hall, 1994; Rey y col., 1995]. La utilización de una u otra vía podría deberse a que la enzima P450c17 tiene diferente afinidad por los diversos sustratos. En el cerdo la P450c17 tiene mayor afinidad por la pregnenolona y por la 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona que por los derivados  $\Delta^4$  [Nakajin y col., 1981]. En la rata, la P450c17 puede convertir la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona en androstenediona o en dehidroepiandrosterona [Cigorruga y col., 1978; Kitamura y col., 1991]. En el humano y en el bovino la liasa de la P450c17 sólo puede utilizar como sustrato la 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona [Fevold y col., 1989; Perrin y col., 1991]. Se ha propuesto una hipótesis alternativa para explicar las diferentes vías en la biosíntesis de testosterona. Esta plantea que las enzimas esteroidogénicas presentes en el retículo endoplásmico se encuentran ordenadas de una manera específica y que la pregnenolona puede entrar al retículo endoplásmico liso por determinados puntos específicos [Hall 1994].



**Figura 11.-** Esquema de la conversión de pregnenolona a testosterona. 3 $\beta$ HSD: 3 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa /  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerasa, P450c17: 17 $\alpha$  hidroxilasa / 17-20 liasa;; 17 $\beta$ HSD: 17 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa.

#### **4.- Metabolitos (5 alfa reducidos) de la testosterona**

La acumulación y secreción de testosterona por parte del testículo resulta del balance entre la síntesis y la metabolización de la misma. Dos de las enzimas que están involucradas en la metabolización de testosterona son la 5  $\alpha/\beta$ -reductasa y la 3  $\alpha/\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. El primer paso en la metabolización de la testosterona es la reducción del doble enlace del anillo A, a través de la 5 $\alpha$ -reductasa. Los metabolitos producidos por esta enzima, son reducidos por la 3 $\alpha/\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa [Sundaram y Kumar, 1996].

#### ***Mecanismo de acción de LH/hCG en células de Leydig***

La función gonadal en los mamíferos, está principalmente controlada por las gonadotropinas secretadas por la glándula pituitaria. La LH, a través de receptores expresados en la membrana celular, regula la función de las células de Leydig, manteniendo la concentración local y periférica de andrógenos, los cuales son esenciales para la función reproductiva del macho.

##### **1.- Receptor de LH/hCG**

Durante los últimos veinticinco años se han realizado numerosos estudios con el objeto de dilucidar la estructura molecular del receptor para LH/hCG. Se ha podido establecer que dicho receptor es una glicoproteína rica en ácido siálico [Dufau, 1996]. Presenta una extensa región extracelular en la cual se encuentra el sitio de unión a la hormona que reconoce LH y hCG con la misma afinidad [Mc Farland y col., 1989; Tsai-Morris y col., 1991]. Asimismo, presenta una región con siete dominios transmembrana y una pequeña porción citoplasmática que contiene una zona rica en residuos de serina, treonina y tirosina, que constituye el sitio de fosforilación de la proteína [Remy y col., 1993; Zhang y col., 1995; Zhang y col., 1996]. Estas características, permiten clasificar al receptor de LH/hCG dentro de la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G [Mc Farland y col., 1989], aunque se diferencia de los otros miembros de la familia, en que su dominio extracelular es comparativamente de mayor tamaño. En el testículo, los receptores de LH/hCG de las células de Leydig son funcionalmente activos durante el desarrollo

fetal, sólo transitoriamente durante la vida postnatal temprana y durante toda la vida post-puberal [Dufau, 1988; Sáez, 1994]

## 2.- Proteína G-Adenilil ciclasas

El receptor de LH/hCG puede acoplarse, a través de la proteína G, a efectores intracelulares, principalmente a la adenilil ciclasa [Cooke, 1996; Hansson y col., 2000]. La proteína G es un heterodímero compuesto por tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Al formarse el complejo hormona-receptor se promueve el cambio de GDP a GTP en la subunidad  $\alpha$ , produciéndose la separación de las subunidades  $\beta$ - $\gamma$  del complejo subunidad  $\alpha$ -GTP. El complejo subunidad  $\alpha$ -GTP es un potente activador de la adenilil ciclasa. Esta, es una enzima asociada a la membrana plasmática con largos dominios transmembrana y cuyo sitio catalítico se localiza en el lado citoplasmático de la membrana. Esta enzima promueve la hidrólisis del ATP a AMPc. De esta manera, la unión de la LH al receptor induce un rápido incremento en los niveles del AMPc intracelular, constituyendo este compuesto el segundo mensajero en la acción de la LH [Dufau y col., 1977; Alberts y col., 2002].

## 3.- Proteína quinasa A

El AMPc activa a la enzima proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) fenómeno que promueve la fosforilación de diferentes proteínas intracelulares. En el estado inactivo, la PKA es un complejo proteico compuesto por dos subunidades catalíticas y dos subunidades regulatorias. En el proceso de activación de la PKA, el AMPc se une a las subunidades regulatorias, promoviendo la disociación del complejo [Hansson y col., 2000]. Las subunidades catalíticas liberadas fosforilan proteínas por un mecanismo en el cual se transfiere un fosfato del ATP a la proteína, regulando su actividad [Cooke y col., 1976, Podesta y col., 1976; Podesta y col., 1978; Alberts y col., 2002]. La respuesta de las células de Leydig a la acción gonadotrófica mediada por PKA se traduce en el incremento en la producción de testosterona. Sin embargo, no han sido totalmente determinados los sustratos de PKA que inducen esta respuesta,.

Distintas isoformas de PKA han sido descritas en la literatura, encontrándose en las células de Leydig de rata y de ratón las isoformas tipo I y tipo



II. Estudios realizados en células de Leydig incubadas con análogos selectivos para ambas isoformas de PKA han demostrado la inducción de un efecto sinérgico de ambas isoformas sobre la producción de andrógenos. Los niveles de expresión de las distintas subunidades de PKA son regulados por hormonas que actúan a través de receptores acoplados a proteína G, por señales mitogénicas desencadenadas por RTKs o por hormonas esteroideas [Hansson y col., 2000]. Los datos en la bibliografía son contradictorios, ciertos autores describen que el efecto de LH sobre las células de Leydig es potenciado sólo con análogos para PKA tipo I, indicando que esta isoforma tendría un acceso preferencial al AMPc intracelular [Sáez, 1994], mientras que otros autores, destacan que la fina regulación que sufre la isoforma PKA tipo II en los tejidos esteroidogénicos indicaría que esta isoforma, sería la candidata para mediar esta función [Hansson y col., 2000].

#### **4.- Fosfodiesterasa**

La fosfodiesterasa es una enzima que cataliza la degradación del AMPc a AMP. De esta manera, la acción biológica de la gonadotropina, que depende de los niveles de AMPc, estaría regulada por la actividad de la fosfodiesterasa. Desde los primeros estudios efectuados para caracterizar la actividad de esta enzima se demostró que en las células, ésta se expresa bajo múltiples isoformas [Thompson y Appleman 1971, Russell y col., 1973]. En los últimos años, se han presentado evidencias que indicarían que la actividad de la fosfodiesterasa es regulada por hormonas que modulan los niveles intracelulares de AMPc, GMPc y  $Ca^{2+}$ . Por otro lado, los factores de crecimiento que actúan a través de receptores tirosina quinasa, tienen la capacidad de regular la actividad de la fosfodiesterasa, sin embargo, no se conoce el significado fisiológico de tal regulación [Conti y col., 1991]

#### **5.- Otros sistemas de transducción de señales que participan en la regulación de la esteroidogénesis**

En los últimos años se ha descrito la participación de otros sistemas de transducción de señales que conjuntamente con el AMPc regularían la biosíntesis de esteroides. En células de ovario de rata y de bovino, y también en células transfectadas con el receptor para LH/hCG, se ha demostrado que este receptor puede

activar un mecanismo mediado por fosfolipasa C, que involucra la hidrólisis del fosfatidilinositol y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  [Davis y col., 1986; Davis y col., 1987; Guderman y col., 1992]. Sin embargo, los estudios realizados en células de Leydig han dado resultados contradictorios. Mientras algunos autores han presentado evidencias que indican que la LH y el AMPc pueden activar la hidrólisis del fosfatidilinositol y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  [Sullivan y Cooke, 1986; Kumar y col., 1994], otros no han logrado demostrar tales efectos [Ascoli y col., 1989; Tomic y col., 1995]. Por otro lado, se ha observado que el ácido araquidónico y los metabolitos producidos por la lipooxigenación del mismo, inhiben la producción de pregnenolona y testosterona estimulada por LH [Sullivan y Cooke 1985; Marinero y col., 1996]. Asimismo, se ha demostrado que el ácido araquidónico regula la actividad de la proteína quinasa C (PKC) en células de Leydig [López-Ruiz y col., 1992].

Algunos radicales libres como el óxido nítrico y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  tienen un efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis, actuando en un paso posterior a la síntesis de AMPc, y previo al clivaje del colesterol por la P450scc [Del punta y col, 1996]. Por otro lado, aunque el AMPc es capaz de regular los canales de cloro, el papel del ión cloro en la regulación de la esteroidogénesis no está aún dilucidado [Cooke, 1996].

Si bien está claro que el AMPc es el segundo mensajero en la acción de la LH, las evidencias indican que diversos sistemas de transducción de señales pueden participar en la regulación de la biosíntesis de testosterona en células de Leydig adultas. Existen evidencias que sugieren que estos sistemas complementan la acción del AMPc actuando directamente en la entrada de colesterol a la membrana interna mitocondrial, así como también, por acción indirecta, regulando la síntesis de proteínas que participan en esta etapa de la esteroidogénesis [Cooke, 1996]

## ***Regulación hormonal y paracrina de las células de Leydig.***

### **1. - Regulación hormonal**

La exposición de las células de Leydig a la LH/hCG promueve simultáneamente, dos tipos de respuesta; una respuesta aguda, rápida, que ocurre en los primeros minutos post-estimulación y una respuesta crónica o trófica, mucho más lenta, que se produce luego de varias horas.

Los primeros estudios relacionados al análisis del mecanismo por el cual la LH regula la biosíntesis de testosterona en forma aguda, indicaron que dicho control se ejerce en un paso posterior a la síntesis de colesterol, pero anterior a la producción de pregnenolona, lo que sugirió que la actividad de la P450<sub>scc</sub> es un paso limitante en la esteroidogénesis [Menon y col., 1967]. Del mismo modo, el hecho de que la acción de la LH sea ejercida a través del AMPc, de la activación de PKA y de la fosforilación de proteínas, sugirió que la enzima P450<sub>scc</sub> es uno de los sustratos que se fosforilan por acción de la PKA en respuesta al estímulo de la LH.

En posteriores estudios se demostró que la respuesta esteroidogénica aguda requiere de la síntesis de proteínas, dado que dicha respuesta es inhibida en presencia de cicloheximida [Simpson, 1979]. Algunos años más tarde, otros estudios indicaron que el paso limitante en la biosíntesis de esteroides regulada por gonadotrofinas, era el transporte del colesterol hacia la membrana interna de la mitocondria, donde se localiza la P450<sub>scc</sub> [Crivello y Jefcoate, 1980]. En este mecanismo intervienen proteínas de vida media muy corta [Simpson, 1979].

En los últimos años se han realizado innumerables estudios con el objeto de caracterizar la(s) proteína(s) involucrada(s) en la regulación de la respuesta aguda al estímulo gonadotrófico [Stocco, 1996]. Una de las proteínas que se propuso como mediadora del transporte de colesterol a la mitocondria es la SCP2 (“Steroid Carrier Protein 2”). Esta proteína tiene un peso molecular de 13 kDa y transfiere el colesterol desde las gotas de lípidos hacia las mitocondrias [Chanderbhan y col., 1986]. Si bien esta proteína es regulada por las gonadotrofinas, su activación ocurre luego de varias horas de producido el estímulo hormonal. Esto indicaría que la SCP2 no está involucrada en la regulación aguda de la esteroidogénesis en forma directa. [Trzeciak y col., 1987]

Otra proteína propuesta como mediadora en el transporte del colesterol, es la SAP (“Steroidogenesis Activator Polypeptide”), cuyo peso molecular es de 3,2 kDa, con una vida media de 5 a 7 minutos. Se ha descrito que los niveles intracelulares de SAP son regulados en forma aguda por hormonas tróficas [Pedersen, 1987; Mertz y Pedersen, 1989]. Si bien esta proteína puede estimular la transferencia de colesterol a la mitocondria, su efecto es insuficiente para explicar el incremento en los niveles de esteroides observados en las células de Leydig.

Se ha propuesto también a la SIP (“Steroidogenesis-Inducing Protein”) como factor involucrado en la respuesta aguda esteroidogénica. Esta proteína que tiene un

peso molecular de aproximadamente 60 kDa [Khan y col., 1990], estimula la actividad de una tirosina quinasa en forma independiente de la vía AMPc-PKA [Stocco y Khan 1992; Khan y col., 1993]. Sin embargo, aún no ha sido aclarado el mecanismo de acción de esta proteína en la respuesta aguda al estímulo gonadotrófico.

En los últimos años se estudiaron algunas proteínas que podrían estar involucradas en el mecanismo de transporte del colesterol. Una de ellas, es la PBR (“Peripheral Benzodiazepine Receptor”) localizada en la membrana externa de la mitocondria [Mukhin y col., 1989; Papadopoulos y col., 1990; Papadopoulos y col., 1991a]. Se demostró que el DBI (“Diazepam Binding Inhibitor”), inhibidor de la unión de benzodiazepinas a su receptor, estimula la producción de pregnenolona en las mitocondrias de las células adrenales, de Leydig y de las células de la glia [Papadopoulos y col., 1991b; Papadopoulos y col., 1992]. Sin embargo, la velocidad de síntesis y el tiempo de reciclaje del DBI no se modifican luego de un estímulo hormonal agudo en las líneas celulares tumorales Y-1 (adrenocortical) y MA-10 (células de Leydig). Por otra parte, la vida media del DBI es mayor de 3 horas, por lo que se duda que este mecanismo esté involucrado en el control de la respuesta aguda.

Una proteína que está siendo muy estudiada actualmente, relacionada con el transporte de colesterol a la membrana interna de la mitocondria, es la denominada StAR (“Steroidogenic Acute Regulatory”). La presencia de dicha proteína ha sido demostrada en células adrenales de rata y ratón, en células de cuerpo lúteo de rata y en células MA-10 y en células RC2, una línea tumoral de células de Leydig de rata [Krueger y Orme-Johnson, 1983; Pon y Orme-Johnson 1986; Pon y col., 1986a; Pon y col., 1986b; Stocco y Kilgore 1988; Stocco y col., 1995; Clark y col., 1994]. La forma madura de la proteína StAR tiene un peso molecular de 30 kDa, con una vida media de 3 a 5 minutos, y su presencia ha sido correlacionada con el rápido incremento en la producción de esteroides en respuesta al estímulo hormonal [Stocco y Soderman, 1991; Stocco y Chen, 1991]. Estudios realizados en pacientes con hiperplasia lipoide congénita (“LCAH”), una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la incapacidad de sintetizar esteroides, que conduce a la acumulación de colesterol en las células, revelaron que tales pacientes presentan una mutación puntual en el gen que codifica para la StAR. Esta mutación resulta en la expresión de una proteína truncada no funcional [Lin y col., 1995]. Los resultados obtenidos en el modelo estudiado para dilucidar la acción de StAR demuestran que,

en respuesta al estímulo hormonal se induce la síntesis de una proteína precursora de 37 kDa, la cual, asociada a chaperonas es dirigida hacia la mitocondria donde es procesada a una proteína de 30kDa, que corresponde a la forma madura de la proteína StAR. Paralelamente, el colesterol es transportado hacia la membrana interna de la mitocondria donde se localiza la P450scc [Stocco y Clark, 1996; Stocco 2000].

En resumen, independientemente del mecanismo molecular involucrado en el transporte del colesterol hacia la membrana interna de la mitocondria, éste es el paso limitante en la respuesta esteroideogénica aguda al estímulo de las gonadotrofinas.

Si bien la respuesta aguda a la LH depende del transporte del colesterol a la membrana interna de la mitocondria, dicha respuesta está condicionada por la expresión de las enzimas P450scc, 3 $\beta$ HSD, P450c17 y 17 $\beta$ HSD, que participan en las distintas etapas de la síntesis de testosterona. Los niveles de estas enzimas dependen de señales intra y extracelulares que regulan su expresión génica.

El efecto de la LH/hCG sobre la estructura y función de las células de Leydig ha sido estudiado utilizando modelos in vivo e in vitro. Los estudios in vivo han utilizado procedimientos tales como la hipofisectomía, la supresión de gonadotrofinas por administración de andrógenos y la neutralización de las mismas por administración de anticuerpos. Los resultados de dichos estudios, demostraron la existencia de atrofia de las células de Leydig con pérdida del volumen celular y del retículo endoplásmico liso y disminución de la actividad de las enzimas esteroideogénicas, particularmente de la P450scc y de la P450c17. Estos cambios, se acompañaron de una disminución en la secreción de testosterona, conjuntamente con una disminución en el número de receptores para LH/hCG [Wing y col., 1985; Keeney y col., 1988; O'Shaughnessy y Murphy, 1991]. Se demostró que estos efectos son revertidos por la administración de LH/hCG exógena, observándose que la actividad de las enzimas esteroideogénicas se restablece antes que los cambios morfológicos [Wing y col., 1985; Klinefelter y col., 1987].

Los estudios in vitro aportaron evidencias que indican que la hCG aumenta la síntesis de novo de la P450scc en células de Leydig de cerdo y de rata [Mason y col., 1984; Anderson y Mendelson 1985]. Por otra parte, en células de Leydig de rata y en la línea celular MA-10, el tratamiento con AMPc y forskolina induce un aumento similar en la síntesis de esta enzima [Mellon y Vaisse, 1989; Hales y col., 1990]. Asimismo, el AMPc regula los niveles de P450c17 en células de Leydig y en células

adrenales de roedores [*Anakwe y Payne, 1987; Payne y Sha 1991*]. En células de Leydig de rata se ha demostrado que la LH regula en forma positiva la expresión del ARNm para la  $3\beta$ HSD [*Keeney y Mason, 1992*]. Con respecto a la regulación de la  $17\beta$ HSD existen muy pocos estudios en la literatura. Sin embargo, en una línea celular de placenta (JEG-3) se ha observado que aquellos factores que inducen un aumento en los niveles de AMPc también promueven un incremento en el ARNm para esta enzima [*Ritvos y Voutilainen 1992*].

Todo los datos arriba mencionados apuntan a que las gonadotropinas ejercen un efecto regulatorio positivo sobre los niveles de las enzimas esteroidogénicas lo que contribuye a mantener el estado diferenciado de las células de Leydig.

## 2.- Regulación paracrina

La función de las células de Leydig depende primordialmente del estímulo de la LH. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que también es regulada por factores que se producen localmente dentro del testículo. Los primeros antecedentes provienen de estudios que demostraron la existencia de alteraciones morfológicas y funcionales en las células de Leydig de testículos con severo daño de los túbulos seminíferos [*Aoki y Fawcett, 1978*]. Del mismo modo, se demostró, que las células de Leydig presentan variaciones dependiendo del estadio del túbulo seminífero con el que están relacionadas [*Bergh, 1982; Vihko y Huhtaniemi, 1989*]. Esta regulación ha sido confirmada utilizando experimentos de co-cultivos, en los cuales se demostró que las células de Sertoli pueden modular la respuesta esteroidogénica de las células de Leydig [*Tabone y col., 1984; Verhoeven y Cailleau, 1990; Lejeune y col., 1993*]. Otros estudios, sugirieron que la funcionalidad de las células de Leydig puede ser modulada por FSH a través de un mecanismo indirecto, mediado por moléculas producidas por las células de Sertoli [*Lejeune y col., 1993*]. Bajo el estímulo de la FSH, la célula de Sertoli secreta factores de diversa naturaleza, que estimulan o inhiben la función esteroidogénica de las células de Leydig. Han sido propuestos numerosos péptidos con función reguladora, a saber: IGF-I; EGF;  $TGF\alpha$ ;  $TGF\beta$ ; bFGF;  $TNF\alpha$ ; IL1; IL6; endotelinas; arginina; vasopresina; inhibina; activina, entre otros [*Silverster, 1996*]. Algunos estudios sugieren que la función esteroidogénica de las células de Leydig es modulada por la acción de citoquinas liberadas por los macrófagos en procesos inflamatorios [*Calkins y col., 1988; Hales,*

1996]. Estos factores paracrinicos pueden actuar sobre las células de Leydig regulando la respuesta esteroideogénica aguda o bien modulando otras funciones celulares, que pueden influir sobre la capacidad de respuesta a la LH/hCG.

### ***Interacción célula de Leydig / Matriz extracelular***

Las células de Leydig de mamíferos adultos, presentan una membrana basal rodeando su superficie celular. En algunas especies, como en el perro, esta membrana se presenta de forma continua [Connell y Christensen; 1975], mientras que en otras, hombre, murciélagos [Schulze, 1984] se presenta de forma discontinua.

Por estudios de microscopía electrónica e inmunoelectromicroscopía, Kuopio y Pelliniemi [1989], describieron la presencia de laminina y de colágeno tipo IV en la superficie de las células de Leydig de la rata adulta, formando parte de una membrana basal discontinua. En otro estudio, Kuopio y col. [1989] describieron que las células de Leydig fetales de rata, que presentan una membrana basal continua, corresponden a poblaciones celulares morfológica y funcionalmente diferentes a las de la rata adulta. Otros autores, sugirieron que las proteínas de la MEC tendrían un papel en la formación inicial de los agregados de células de Leydig durante el desarrollo [Huhtaniemi y Pelliniemi, 1992].

Está ampliamente demostrado que los componentes de las membranas basales son sintetizados y secretados por sus propias células. Lian y col., [1992] demostraron que las células de Leydig TM3 (una línea celular de ratón), sintetizan laminina y entactina. Denduchis y col. [1996], demostraron por inmunohistoquímica, inmunoreactividad positiva para laminina y colágeno tipo IV en el citoplasma de células de Leydig de rata, estos resultados fueron corroborados por "Western blot". Otros autores, demostraron que las células de Leydig de rata inmaduras y adultas sintetizan, in vitro, heparan sulfato proteoglicano [Grudet y col.; 1996].

Está fehacientemente demostrado que los componentes de la MEC juegan un importante papel en la organización de la citoarquitectura tisular y en la regulación a través de sus receptores específicos, de diversas funciones de los mismos. Por técnicas inmunohistoquímicas y de Western blot, se han identificado integrinas de la familia  $\beta_1$  (tales como las subunidades  $\beta_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$ ) y moléculas de adhesión célula-célula (NCAM y N-cadherina) en células de Leydig adultas, in vitro [Denduchis y

col., 1996]. Por otra parte, Wu y col. [1996] detectaron la expresión de la integrina  $\alpha_5\beta_1$  (receptor de la fibronectina) en células de Leydig de ratas inmaduras.

Actualmente, hay estudios que otorgan a los componentes de la matriz extracelular la capacidad de modular la adhesión, la diferenciación celular y la expresión génica de las células de Leydig. Los primeros estudios fueron realizados por Vernon y col. [1991], quienes demostraron que la capacidad de proliferación, y de expresión de la enzima 3 $\beta$ HSD se modifica dependiendo del sustrato sobre el cual se cultivan las células de Leydig de ratón adulto. Del mismo modo, se describió la influencia de algunos proteoglicanos sobre la esteroidogénesis. Mc Farlane y col., [1996] demostraron que la adición de heparina (glicosaminoglicano soluble) a cultivos de células de Leydig, es capaz de inhibir la producción de testosterona estimulada con LH, de manera dosis-dependiente.

Está ampliamente documentado el papel de los factores de crecimiento sobre la regulación de la esteroidogénesis, tanto in vivo como in vitro [Verhoven y Cailleau, 1986; Lin y col., 1986; Saez y Lejeune, 1996]. A pesar de que existen algunas evidencias de la interrelación de estos factores de crecimiento con las proteínas de la MEC [Muroño y col., 1993a; Laslett y col., 1995; Nakamura y col., 2001], no está aún esclarecido el papel que dichas proteínas ejercen sobre la esteroidogénesis y su regulación.

Las evidencias presentadas indican que la LH es el requerimiento primordial de las células de Leydig para mantener sus funciones, aunque éstas también son moduladas por factores producidos localmente. Asimismo, se advierte que las proteínas de la MEC juegan un activo y complejo papel en la regulación del funcionamiento de las células que interactúan con ella.

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados, el objetivo de este trabajo es demostrar la influencia de las proteínas de la matriz extracelular sobre la función de las células de Leydig, estudiando en particular, la morfología, la adhesión celular y la esteroidogénesis.



***Objetivos***

## Objetivo General

En base a los trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros autores, podemos sugerir que las proteínas de la matriz extracelular participan en diversos eventos celulares relacionados con el control de la morfología y funcionalidad de las células. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis de doctorado fue:

**Investigar la influencia de las proteínas de la matriz extracelular sobre la adhesión, la diferenciación celular y la esteroidogénesis de células de Leydig de rata adulta, in vitro.**

## Objetivo específicos

En cultivos de células de Leydig de rata, en condiciones basales y estimuladas con hCG, nos propusimos:

**Estudiar las características morfológicas y la expresión de integrinas en las células de Leydig cultivadas sobre distintas proteínas de la matriz extracelular (laminina-1, colágeno tipo IV y fibronectina).**

**Analizar el grado de adhesión celular de las células de Leydig cultivadas sobre las proteínas de la MEC mencionadas anteriormente.**

**Estudiar el papel modulador de las proteínas de la matriz extracelular sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig en cultivo.**

**Identificar algunas de las vías de señalización intracelular activadas por las proteínas de la matriz extracelular, involucradas en la esteroidogénesis de las células de Leydig, in vitro.**

## ***Materiales y Métodos***

## Materiales y Métodos

### Reactivos

En todas las determinaciones efectuadas se utilizaron reactivos y solventes con grado de pureza p.a. adquiridos a los laboratorios Merck (Darmstadt, Alemania) y Mallinckrodt (NY, USA). Los medios de cultivo (medio Eagle modificado por Dulbecco, medio Ham F<sub>12</sub>, medio 199) y las proteínas de la matriz extracelular laminina-1, colágeno tipo IV purificadas a partir de un sarcoma murino (Engelbreth-Holm-Swarm) y la fibronectina obtenida de plasma de rata fueron adquiridos a Gibco BRL, Life Technologies (Grand Island, NY, USA). El 8 Br-AMPc, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), PD98059 y las demás drogas y reactivos utilizados en el aislamiento celular y en los cultivos fueron comprados a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Para los cultivos, se utilizó material plástico descartable Falcon adquirido a Thomas Scientific Co. (Swedsboro, NJ, USA).

Los isótopos radioactivos empleados: [<sup>3</sup>H]testosterona-NET-370 (actividad específica: 87,1 Ci/mmol) e <sup>125</sup>I-NEZ-033A (actividad específica: 17 Ci/mg) y las placas radiográficas, BioMax MS Film, Kodak fueron adquiridos a New England Nuclear Life Science Products (Boston, MA, USA). El anticuerpo específico (AS-0116), utilizado en el radioinmunoensayo de testosterona fue adquirido a ImmunoCorp (Montreal, Canadá). Los esteroides no radioactivos: 22(R)-hidroxicolesterol; pregnenolona; 17- $\alpha$  hidroxiprogesterona,  $\Delta^4$ -androstenediona y testosterona, fueron comprados a Steraloids (Wilton, NH, USA).

La gonadotropina coriónica humana (hCG-CR-127 y CR-125) fue provista por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIDDK), Bethesda, MD, USA. El Pregnyl fue adquirido de los Laboratorios Elea (Bs.As., Argentina).

Los anticuerpos policlonales dirigidos contra el COOH terminal (dominio citoplasmático) de las subunidades de integrinas  $\beta$ 1,  $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 5 fueron obtenidos de Chemicon International Inc. (Temecula, CA, USA). La IgG de conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína fue obtenida de Cappel Lab, (Cochranville, PA, USA). El anticuerpo anti-fosfotirosina fue obtenido de Usptate Biotechnology (Lake Placed, NY,

USA). Los anticuerpos dirigidos contra: FAK, paxilina, caveolina-1 y caveolina-1 fosforilada fueron obtenidos de BD Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA). Los anticuerpos dirigidos contra: FAK fosforilado, ERK1-2 y ERK 1-2 fosforilado y el patrón positivo para estas proteínas, provenientes de células Hela, fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo dirigido contra la proteína StAR, fue cedido gentilmente por el Dr. D. Stocco (Health Sciences Center, Texas Tech University, USA). Sephadex G-25 (AB, SE 751-84) fue obtenido de Amersham Biosciences (Upsala, Suecia). Las membranas de transferencia para Western blot (Immobilon-P) fueron obtenidas de Millipore Corporation (Bedford, MA, USA). La cuba de electroforesis, el aparato de transferencia, el patrón de peso molecular preteñido (7-206 kDa), el ensayo de proteínas (Bradford), la tetrametiletildiamina (TEMED) y el 2  $\beta$ -mercaptoetanol fueron obtenidos de BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). La genisteína (4',5,7-trihidroxi-isoflavina), el H89 (N[2-p-bromocinamilamino-2etil]-5-isoquinolina-sulfonamida-2HCl) fueron obtenidos de Biomol Research Laboratories (PA, USA).

## **Animales**

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley con un peso aproximado de 200-250 g (60-75 días) del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos con una dieta a base de alimento balanceado y agua *ad libitum*, bajo condiciones controladas de luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) a una temperatura entre 20 y 25 °C.

## **Aislamiento de células de Leydig**

Las células de Leydig fueron aisladas de acuerdo al método descrito por Dufau y col. [1974], obteniéndose fracciones crudas de células que luego se purificaron empleando un gradiente discontinuo de Percoll [Lèfevre y col., 1983]. Los procedimientos para aislar las células de Leydig en condiciones de esterilidad se esquematizan en la figura 12.

Los animales fueron sacrificados por decapitación, inmediatamente, los testículos fueron obtenidos en condiciones de esterilidad y colocados en tubos cónicos conteniendo PBS-suplementado. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos con PBS-suplementado y los testículos fueron decapsulados. El tejido testicular fue tratado con una solución de colagenasa tipo I (Clostridiumpeptidasa A; EC:3.4.24.3, Sigma C-0130) al 0,025 % (p/v) más un inhibidor de tripsina de soja al 0,0015 % (p/v) en Medio Base. La digestión enzimática se realizó en condiciones de agitación constante durante 10-15 min. a 34°C. Al cabo de este tiempo, la digestión fue detenida por dilución con cuatro volúmenes de Medio Base y el tejido fue disgregado por rotación manual de los tubos durante 3 min. Los túbulos seminíferos sin digerir se dejaron sedimentar durante 3 min., obteniéndose un sedimento (P1) y un sobrenadante (S1).

El sobrenadante S1 fue filtrado a través de Nytex y recogido en botellas de policarbonato estériles, obteniéndose una fracción de células crudas (C1). Los túbulos sin digerir (P1) fueron lavados con 40 ml de Medio Base por rotación manual durante 2 minutos, luego se dejaron sedimentar por 2 minutos, obteniéndose un sedimento (P2) que fue descartado y un sobrenadante (S2) el cual fue filtrado por Nytex, obteniéndose una fracción de células crudas (C2).

Las fracciones C1 y C2, fueron centrifugadas conjuntamente durante 15 minutos a 100xg a 4°C (figura 13). El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue resuspendido en 20 ml de Medio Completo conteniendo 30 µg/ml de desoxirribonucleasa I (EC:3.1.21.1, Sigma DN25). 1,7 ml de esta suspensión fueron sembrados sobre un gradiente discontinuo de Percoll, el que fue construido depositando cuidadosamente y en forma sucesiva, las siguientes soluciones de Percoll (% p/v) en Medio Completo: 2 ml de 60 %, 2,5 ml de 40 %, 2 ml de 26 % y 2,5 ml de 21 %, lo que corresponde respectivamente a densidades de 1,087; 1,067; 1,061; 1,053 y 1,048 g/ml.

Las células fueron centrifugadas en el gradiente de Percoll durante 30 min. a 800xg a 4°C. Las células presentes en la interfase 40-60 % fueron recolectadas por aspiración, lavadas con 5 volúmenes de Medio Base y centrifugadas durante 5 min. a 400xg a 4°C. Las células se resuspendieron en un volumen adecuado de Medio de Cultivo para obtener una suspensión celular de  $2,5 \times 10^6$  células/ml.

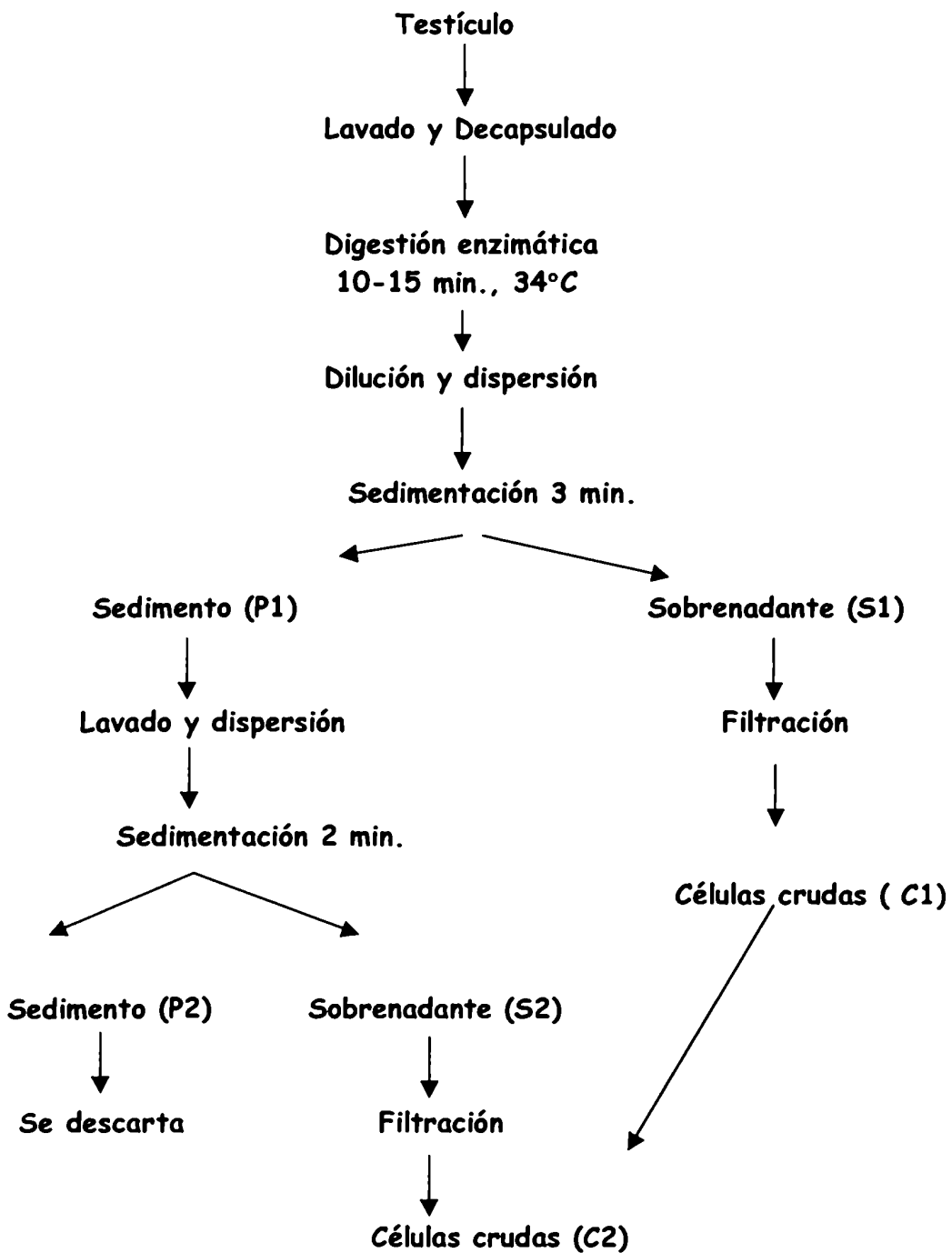
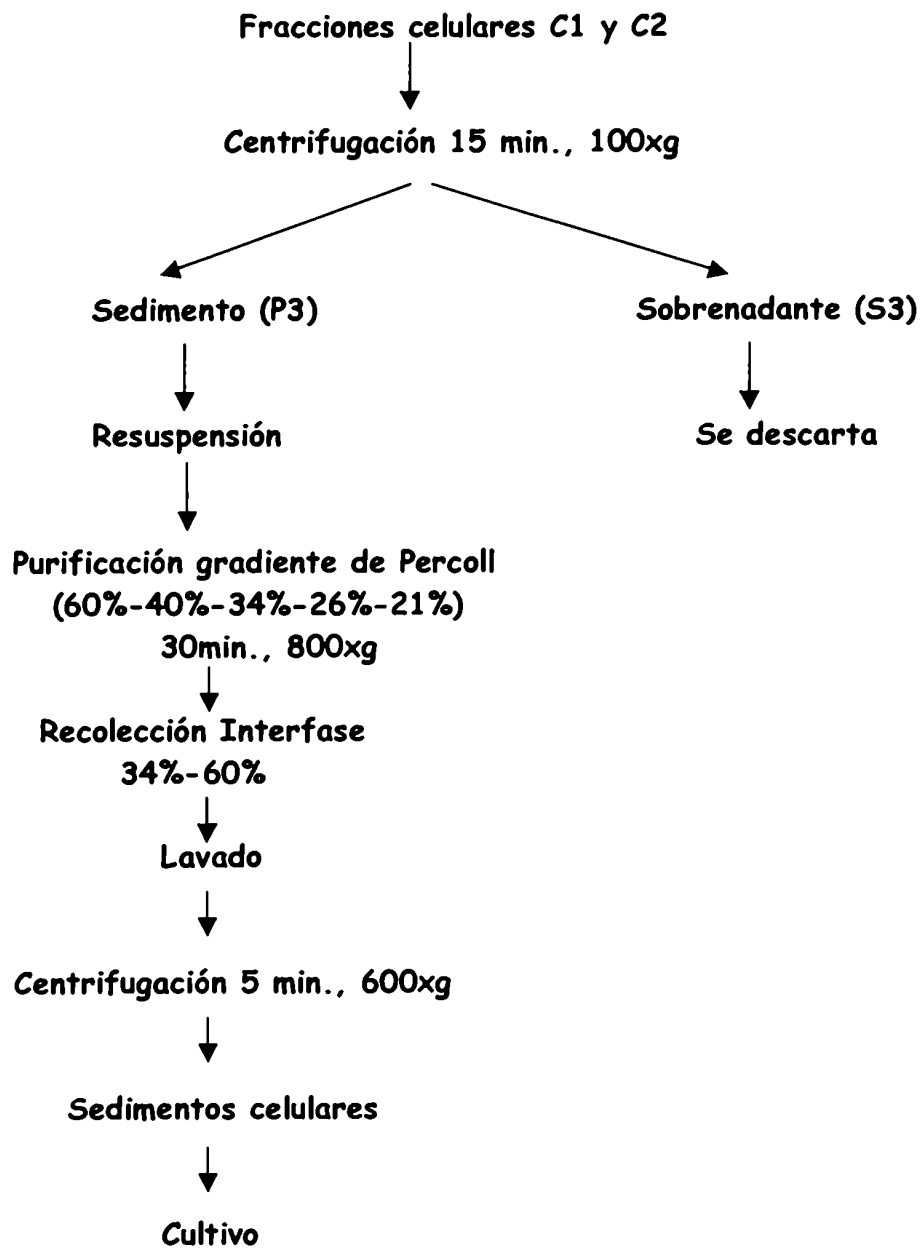


Figura 12.- Esquema del procedimiento utilizado para aislar las fracciones crudas de las células de Leydig.



**Figura 13.-** Esquema del procedimiento para la obtención de células de Leydig purificadas.



## **Detección citoquímica de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa**

La pureza de las células de Leydig obtenidas fue determinada por la presencia de la enzima 3  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa a través de un método citoquímico descrito por Levy y col. [1959], con algunas modificaciones. Brevemente, las células fueron incubadas en Medio Completo conteniendo 0,8 mg/ml de azul de nitrotetrazolio, 1,5 mg/ml de  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> en presencia o ausencia (blanco de reacción) de 40  $\mu$ g/ml de dehidroepiandrosterona durante 60 minutos (34°C, 5 % CO<sub>2</sub> en aire). La reacción enzimática fue detenida enfriando las placas de cultivo sobre hielo. El medio de incubación fue eliminado rápidamente y las células fueron lavadas tres veces con 1 ml de Medio Base. La observación fue realizada en un microscopio de contraste de fase.

## **Estudios de adhesión celular**

Los ensayos de adhesión celular fueron realizados en microplacas de 96 hoyos cubiertas o no con proteínas de la MEC, en presencia o ausencia de hCG (10 ng/ml) durante 3 ó 24 hs (34°C, 5 % CO<sub>2</sub> en aire). La adhesión celular fue determinada cuantitativamente por un método colorimétrico. Brevemente, las células fueron lavadas con PBS-BSA 0,1 % y fijadas con paraformaldehído al 3,7 % en PBS durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Las células fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 0,5 % durante 10 min. Luego, fueron efectuados sucesivos lavados con agua destilada hasta eliminar el colorante no fijado. Las células coloreadas fueron solubilizadas con 1 % de SDS y se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de microplacas ( $\Sigma$ 960, Metertech, Inc). Previamente, fue determinada la existencia de una correlación lineal entre el número de células y la densidad óptica.

## Determinación de la actividad celular

La actividad celular fue evaluada por el método colorimétrico MTS (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-yl] -5- [3-carboximetoxifenil] -2- [4-sulfofenil]-2H-tetrazolium). Este método se basa en la reducción de una sal de tetrazolium (MTS) a formazán por la actividad deshidrogenasa de varias enzimas mitocondriales. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 96 hoyos y cultivadas por 3 ó 24 hs (34°C, 5 % CO<sub>2</sub> en aire). Luego del período de incubación, el reactivo MTS fue agregado al medio incubándose la mezcla durante 2 hs (34°C, 5 % CO<sub>2</sub> en aire). Inmediatamente después, la densidad óptica (DO) fue leída a 490 nm en un espectrofotómetro de placa (Σ960, Metertech, Inc).

## Radioinmunoensayo de Testosterona

Los medios fueron diluidos en buffer GPBS. Luego, fue agregado el anticuerpo anti-testosterona y la <sup>3</sup>H-testosterona (5.600 cpm/tubo). Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 4°C durante toda la noche y al día siguiente la reacción fue detenida agregando 0,625 % de carbón activado en buffer GPBS. Inmediatamente después, las muestras fueron centrifugadas a 2000xg a 4°C por 10 minutos y la radioactividad del precipitado fue medida en un contador beta (Beckman, LS 1801, USA). La concentración de testosterona fue determinada por triplicado. Todas las muestras analizadas bajo un mismo paradigma experimental fueron medidas en el mismo radioinmunoensayo para evitar variaciones interensayo. La sensibilidad del método fue de 6,25 pg por tubo con un coeficiente de variación intraensayo de 4 %. En todos los casos los coeficientes interensayo fueron menores de 12 % y las reacciones cruzadas del anticuerpo anti-testosterona utilizado fueron menores del 0,01 % para P<sub>5</sub>; P<sub>4</sub>; 17OHP<sub>4</sub>; DHA; A5,3βDIOL y E<sub>2</sub>; de 0,05 % para A; de 0,04 % para DIOL, de 0,02 % para 3βDIOL y de 35 % para DHT. Todos los resultados fueron corregidos según el número de células vivas, para ser expresados en ng de testosterona/10<sup>6</sup> células/tiempo.

## **Determinación de AMPc**

Para cuantificar los niveles de AMPc extracelular, fue empleado un método inmunoenzimático (ELISA) utilizando un ensayo comercial (Kit) de Amersham Pharmacia, según las instrucciones del fabricante. Los medios condicionados de las células de Leydig cultivadas en presencia de IBMX (0,25 mg/ml) durante 3 hs fueron previamente acetilados. Para ello, a 400 µl de medio condicionado se les agregó 10 µl de una mezcla de trietilamina y anhídrido acético en una proporción 2:1 (v/v) agitando en frío durante 5 minutos, intermitentemente. El método utilizado posee una sensibilidad de 2-128 fmol/hoyo.

## **Estudios morfológicos**

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio en microplacas de 24 hoyos por 3 ó 24 hs. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y fijadas en paraformaldehído al 2 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y teñidas con hematoxilina-eosina. Las observaciones se realizaron por microscopía óptica.

## **Estudios de inmunofluorescencia**

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio en microplacas de 24 hoyos durante 24 hs (34°C, 5 % CO<sub>2</sub> en aire). Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS, fijadas en acetona -20°C durante 7 min. y lavadas con una solución de Triton X-100 al 0,2 % en PBS. Las células fueron incubadas con el primer anticuerpo, monoclonal o policlonal (ver tabla III\*), durante 1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Luego las células fueron lavadas con PBS y posteriormente incubadas con el segundo anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína o con rodamina durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células fueron lavadas y montadas en glicerina al 90 % en PBS y observadas en un microscopio de epi-fluorescencia (Axiophot D-7082, Carl Zeiss, Alemania). Como control negativo, las células fueron incubadas sin el primer anticuerpo.

## “Western blot”

Las células se cultivaron en placas de 6 hoyos durante 90 minutos (34°C, 5 % CO<sub>2</sub> en aire). Al término del período, se las lavó con PBS conteniendo VO<sub>4</sub>Na 1 mM y FNa 25 mM. Luego las células fueron lisadas en buffer RIPA pH: 7,4 (ClNa 150 mM; Tris 50 mM; SDS 1 %; VO<sub>4</sub>Na 2 mM; FNa 50 mM; EDTA 2 mM; desoxicolato de Na 1 %; NP-40 1 %; fenilmetilsulfonil fluoruro 1 mM; leupeptina 10 µg/ml; pestatina-A 10 µg/ml y aprotinin 10 µg/ml) y levantadas por acción mecánica con un rastrillo de plástico o goma. El lisado fue sometido a vibraciones ultrasónicas durante 5 segundos y los componentes insolubles fueron removidos por centrifugación a 14000xg durante 15 min. La concentración de proteínas de los lisados fue medida por el método de Bradford (DC protein assay Bio-Rad), usando como patrón una solución de BSA. Alícuotas de 20 µg de proteínas fueron diluídas, en una proporción 1:1 (v/v), en buffer pH 6,8 (Tris 0,5 M; glicerina 25 %; SDS 10 %; azul de bromofenol 0,5 %; β-mercaptoetanol 0,5 %) y sometidas a ebullición durante 5 minutos. El patrón de peso molecular preteñido fue sometido a ebullición durante 3 minutos. Posteriormente, los lisados obtenidos se sembraron y fueron corridos en geles de poliacrilamida de 7,5 %; 10 % ó 12 % en presencia de SDS (120 V durante 90 minutos). Las bandas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) a 150V durante 60 minutos. La eficiencia de la transferencia fue visualizada por tinción con Rojo Ponceau S de las proteínas transferidas a la membrana y el gel fue analizado utilizando la coloración de azul de Comassie. Los sitios inespecíficos en las membranas fueron bloqueados con distintos buffers de bloqueo (ver tabla III), según el protocolo de las casas comerciales. Luego, se incubó con el primer anticuerpo (ver tabla III) durante toda la noche a 4°C, mientras que la incubación con el segundo anticuerpo biotinilado (ver tabla) y posteriormente con el conjugado estreptoavidina-peroxidasa se realizó durante 1 h, a temperatura ambiente. Finalmente, las corridas se revelaron con reactivo para quimioluminiscencia. La intensidad de las bandas obtenidas en las distintas calles, se cuantificó por densitometría utilizando el programa SionImage 4.0.2. Los resultados de densidad óptica se expresan como unidades arbitrarias ± ES.

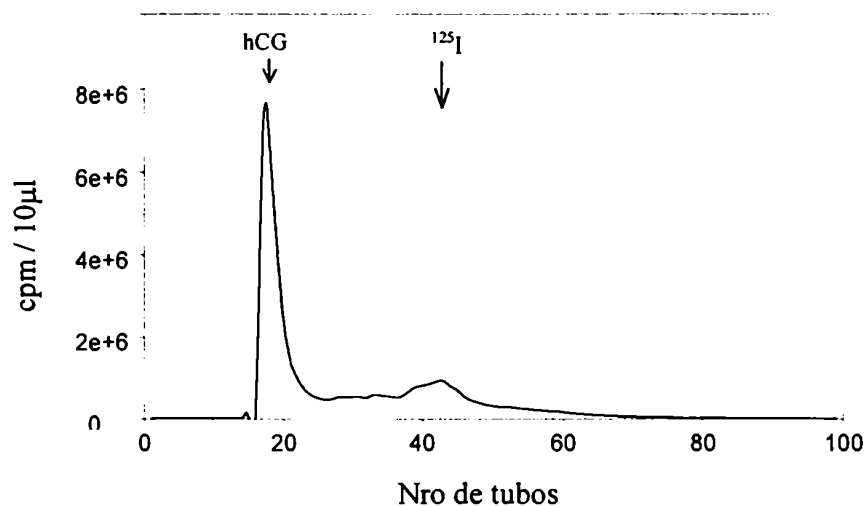
## Unión específica de la hCG al receptor de LH

Las células de Leydig fueron incubadas con  $^{125}\text{I}$ -hCG (150.000 cpm/hoyo) durante 3 hs (34°C, 5 %  $\text{CO}_2$  en aire). Para la determinación de la unión inespecífica fue adicionado al medio de cultivo 30 UI de Pregnyl. Luego del período de incubación, las células fueron lavadas con PBS frío para remover la  $^{125}\text{I}$  hCG no unida. Posteriormente, las células fueron solubilizadas con OHNa 0,1 M. La radioactividad fue cuantificada en un contador gamma marca Wallac (Wallac Oy, Finlandia) y la unión específica de hCG fue calculada como la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica.

### 1. - Iodinación de hCG

La hCG purificada (CR 125, NIH) fue iodada con  $^{125}\text{I}$  por el método de cloramina T de acuerdo al procedimiento previamente descrito por Catt y col. [1971]. Brevemente, 0,5 mCi de  $^{125}\text{I}$  fue agregado a 15  $\mu\text{l}$  de hCG (1mg/ml) en 50  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 10 mM pH 7,4. Luego, se adicionaron 24  $\mu\text{l}$  de una solución de cloramina T (1mg/ml), en 3 alícuotas de 8  $\mu\text{l}$  cada una. La mezcla fue agitada 15 segundos. La reacción de marcación fue monitoreada mediante la precipitación con ácido tricloroacético al 10 %. Se agregó cloramina T hasta obtener una incorporación del 50-70 %. Finalmente, la reacción fue detenida con el agregado de 500  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 10 mM pH 7,4. En estas condiciones se obtuvieron hormonas marcadas con actividades específicas de 60-120  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

La hormona marcada se separó de los demás componentes de la mezcla de reacción en una columna de Sephadex G 25 de aproximadamente 80 cm, la cual fue previamente equilibrada con buffer fosfato 10 mM pH 7,4. La elución se realizó con buffer fosfato 100 mM conteniendo 0,1 % de BSA. La muestra eluída fue recolectada en alícuotas de 1ml en un colector automático (Gilson). De cada alícuota se extrajeron 10  $\mu\text{l}$  para realizar el perfil de elución en un contador de centelleo sólido (Alfanuclear) (figura 14). Posteriormente se realizaron pruebas de actividad biológica: prueba de máxima capacidad de unión y desplazamiento con hCG fría. La hCG radiactiva se utilizó durante las tres semanas posteriores a su marcación.



**Figura 14.-** Diagrama de elución de los productos de marcación de la hCG con  $^{125}\text{I}$ . Las flechas indican los volúmenes de elución de la hCG y el  $^{125}\text{I}$ .

## 2.- Pruebas de actividad biológica para hCG marcada.

### 2. 1.- Preparación de la muestra

Ratas adultas fueron sacrificadas por decapitación, posteriormente el tejido testicular fue colocado en una cápsula de Petri y lavado con PBS conteniendo 0,1 % BSA. Luego de remover la túnica albugínea el tejido fue lavado nuevamente y traspasado a un tubo Corex de 15 ml. El tejido fue homogenizado en frío con 3 ml de PBS conteniendo 0,1 BSA en un Politrón /Ultraturax a 160 rpm durante 30 segundos. El homogenizado fue centrifugado a 20.000xg durante 20 minutos y el sobrenadante obtenido fue descartado. El precipitado fue lavado con PBS conteniendo 0,1 % BSA y nuevamente centrifugado a 20.000xg durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado pesado y resuspendido a 400 mg/ml en buffer PBS conteniendo 0,1 % BSA.

## 2. 2.-Prueba de máxima capacidad de unión

Distintas concentraciones de homogenato (5-100  $\mu$ l) por duplicado fueron incubadas con igual cantidad de  $^{125}$ I-hCG. Se agregó a uno de los grupos, 30 UI de Pregnyl, luego, se llevaron todas las muestras a igual volumen final con PBS conteniendo 0,1 % BSA y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Luego del período de incubación, la reacción fue detenida agregando 3 ml de PBS frío conteniendo 0,1 % BSA. Los tubos fueron centrifugados a 700xg durante 20 minutos, el sobrenadante fue descartado y la radioactividad del precipitado cuantificada en un contador gamma marca Wallac (figura 15). La unión específica de la hCG fue calculada como la diferencia entre las cuentas unidas totales y la unión inespecífica. Los resultados se expresan como porcentaje de  $^{125}$ I-hCG unida. Todas las determinaciones fueron realizados por triplicado.

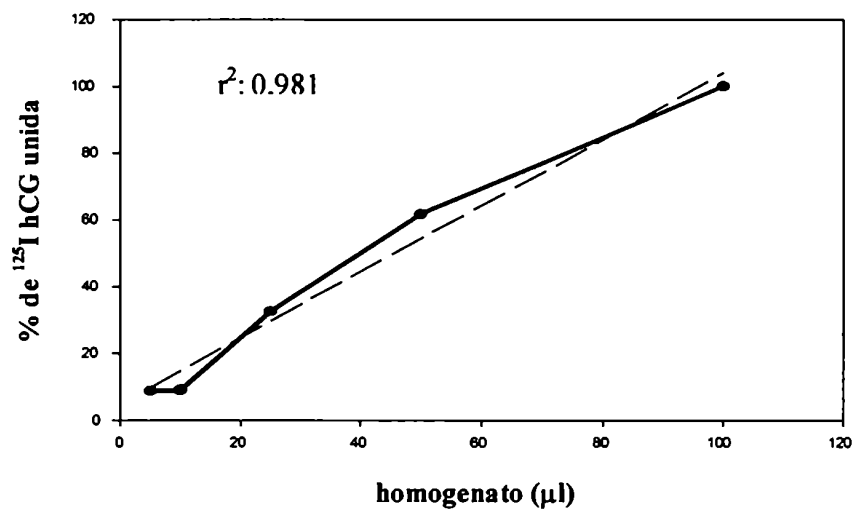


Figura 15.- Máxima capacidad de unión de la hCG radioactiva.

### 2.3.- Desplazamiento con hCG fría

Cantidades iguales de homogenato y de  $^{125}\text{I}$ -hCG fueron incubadas con cantidades crecientes de Pregnyl. Todas las muestras se llevaron a igual volumen final con PBS conteniendo 0,1 % BSA. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente toda la noche y terminado el período de incubación, se les agregó 3 ml de buffer PBS conteniendo 0,1 % BSA frío. Los tubos fueron centrifugados a 700xg durante 20 minutos, el sobrenadante fue descartado y la radioactividad del precipitado cuantificada en un contador gamma marca Wallac (figura 16). La unión específica de hCG fue calculada como la diferencia entre las cuentas unidas totales y la unión inespecífica. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado

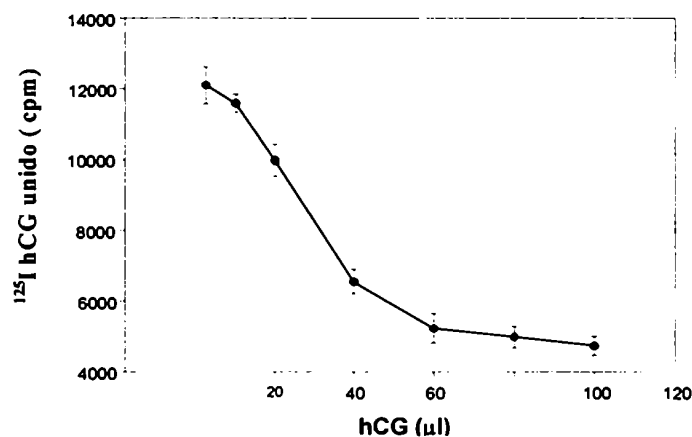


Figura 16.- Prueba de desplazamiento de la hCG radioactiva con la hCG sin marcar.

### Análisis estadístico de los resultados

Todos los valores fueron expresados como la media  $\pm$  E.S. El análisis estadístico fue realizado utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguido por la prueba de Student-Newman-Keuls. Los datos fueron analizados para verificar su distribución por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas,



por la prueba de Bartlett. Con el fin de normalizar los datos, se calculó el cuadrado del logaritmo decimal. Se utilizó el análisis de regresión lineal y correlación para estudios de una variable en función de otra (grado de adhesión celular en función de concentración de proteínas de la matriz extracelular). Las diferencias fueron consideradas significativas si  $p < 0,05$ .

***Diseño experimental y  
Resultados***

## Diseño experimental y Resultados

### 1.- Influencia de las proteínas de la MEC sobre las características morfológicas y las propiedades de adhesión de las células de Leydig

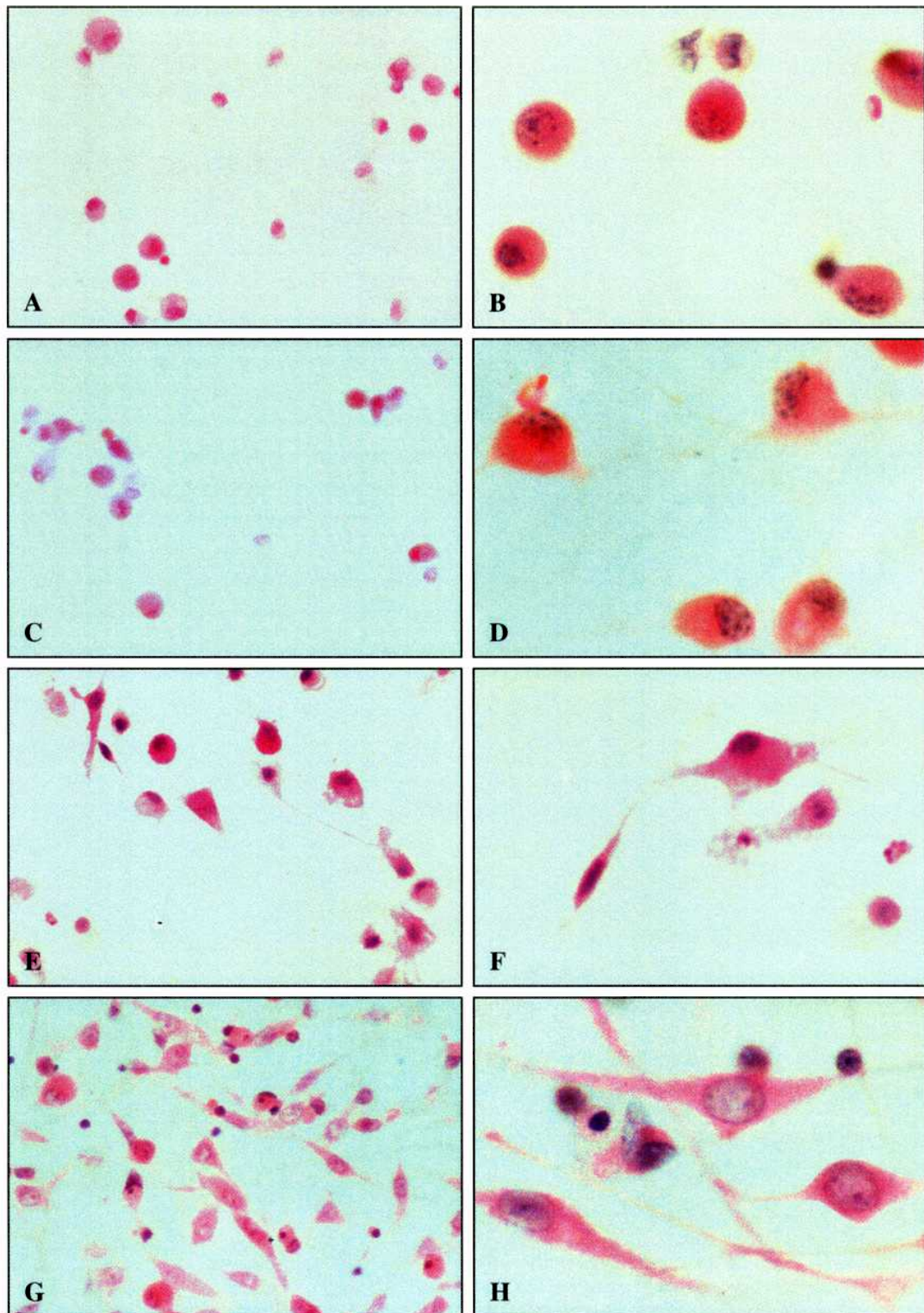
Está demostrado que la adhesión de las células a ciertos sustratos induce cambios en la morfología celular. En particular, en la adhesión de las células a la MEC es esencial la interacción de las integrinas con los filamentos de actina para la organización del citoesqueleto. Estos cambios, no sólo influyen la estructura celular, sino también la funcionalidad celular y la capacidad de sintetizar hormonas [Murphy-Ullrich, 2001].

Las células de Leydig necesitan anclarse al sustrato para sobrevivir. Si bien existen algunos antecedentes que demuestran la influencia de ciertos componentes de la MEC sobre la diferenciación y expresión génica de las células de Leydig de ratón cultivadas durante tiempos prolongados [Vernon y col., 1991], no han sido descritos los cambios morfológicos tempranos, inducidos por las proteínas de la MEC sobre las células de Leydig.

Con el objetivo de determinar el sustrato más adecuado para inducir la diferenciación de las células de Leydig de rata, éstas se cultivaron por períodos cortos de tiempo sobre cubreobjetos de vidrio sin cubrir o cubiertos con distintas concentraciones de laminina-1, colágeno tipo IV o fibronectina, durante 3 ó 24 hs.

#### 1.1.- Efecto de las proteínas de la MEC sobre la morfología de las células de Leydig

Las células de Leydig cultivadas durante 3 hs sobre cubreobjetos de vidrio presentan una forma esférica o levemente ovoide, de bordes lisos y bien definidos (figura 17 A, B). Las células cultivadas durante el mismo período de tiempo, sobre cubreobjetos cubiertos con laminina-1, muestran una forma levemente poligonal, con bordes irregulares y en las cuales se observa el comienzo de prolongaciones citoplasmáticas “spreading” (figura 17 C, D).

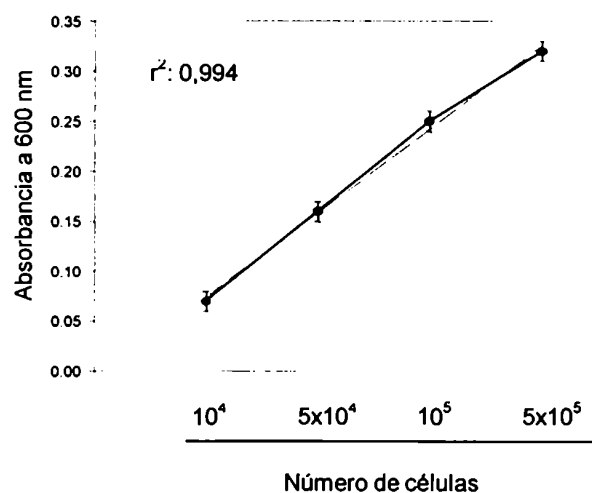


**Figura 17.-** Microfotografía de células de Leydig cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio sólo o cubiertos con proteínas de la MEC durante 3 ó 24 hs. Células de Leydig cultivadas sobre cubreobjetos durante 3 hs (A y B). Células de Leydig cultivadas sobre laminina-1 durante 3 hs (C y D). Células de Leydig cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio durante 24 hs (E y F). Células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV durante 24 hs (G y H). X 320 A, C, E, G; X 900 B, D, F, H.

Cuando las células de Leydig fueron cultivadas durante 24 hs. sobre cubreobjetos cubiertos con colágeno tipo IV, su forma se hace claramente poligonal o en algunos casos fusiforme, presentando bordes angulosos, observándose abundantes prolongaciones citoplasmáticas (“spreading”) que se extienden por la superficie de cultivo (figura 17 G, H) a diferencia de las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio que presentan una forma, por lo general, esférica y donde algunos elementos aislados muestran la formación de prolongaciones citoplasmáticas (figura 17 E, F). Idénticos resultados se obtuvieron con células de Leydig cultivadas sobre fibronectina en ambos tiempos de cultivo. Estos resultados demuestran que las proteínas de la MEC son capaces de inducir diferenciación temprana de las células de Leydig en cultivo primario y que existe una correlación entre la concentración de las proteínas de la MEC utilizadas y el grado de diferenciación celular.

## 1.2.- Efecto de las proteínas de la MEC sobre la adhesión celular

Con el fin de determinar el grado de adhesión de las células de Leydig a distintos sustratos, se utilizó un método colorimétrico descrito en materiales y métodos. Previamente, se determinó la existencia de una cierta correlación lineal entre la absorbancia leída a 600nm y la concentración de células sembradas (figura 18).



**Figura 18.-** Correlación entre la absorbancia y el número de células. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES, n=5 de 3 experimentos.

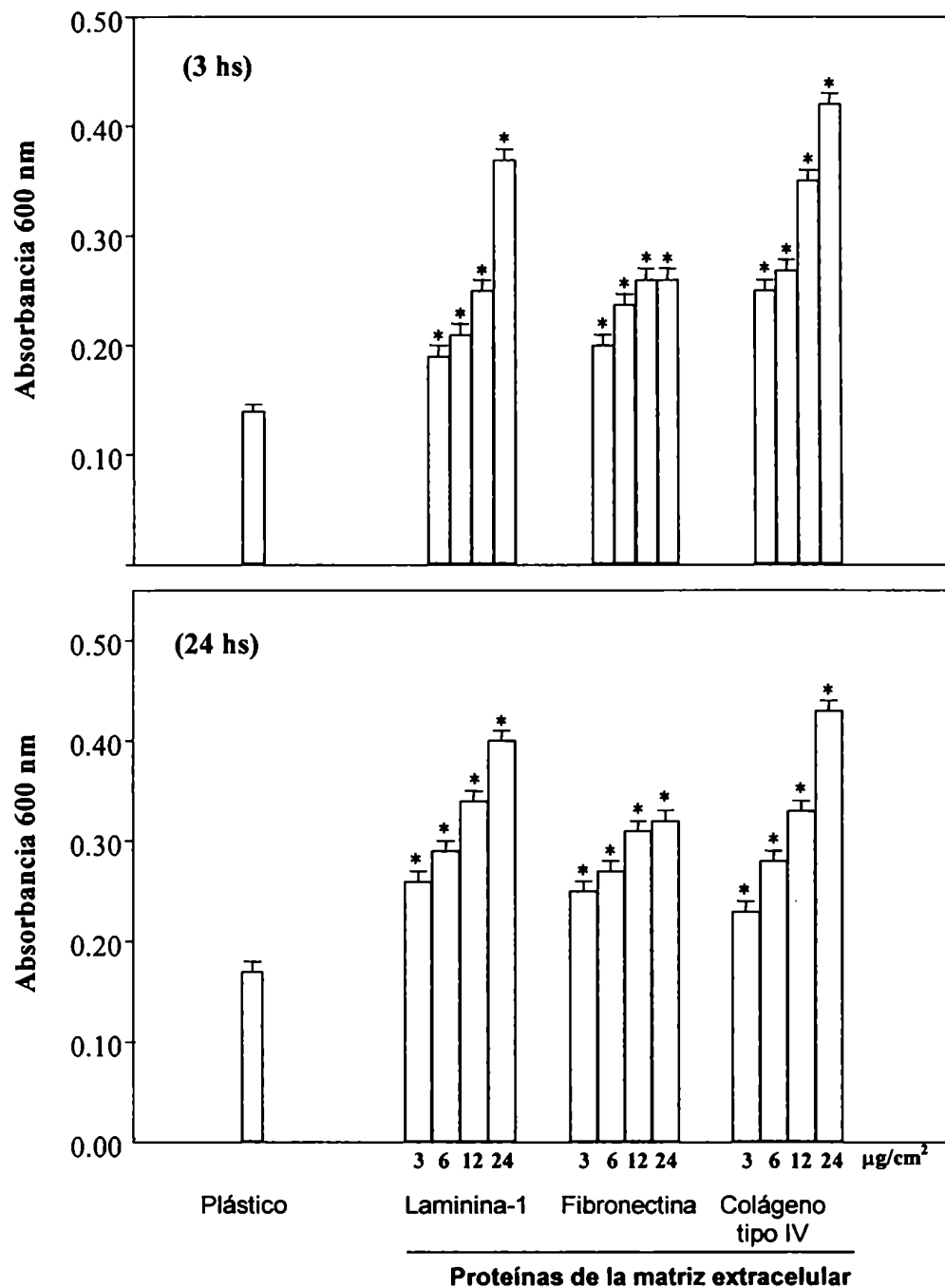
Debido a que la densidad óptica se correlaciona linealmente con el número de células ( $r^2: 0,994$ ), utilizamos este método para analizar el grado de adhesión celular.

Las células de Leydig cultivadas durante 3 hs (figura 19 A) y 24 hs (figura 19 B) sobre microplacas cubiertas con proteínas de la MEC, presentaron un mayor grado de adhesión al sustrato que las cultivadas sobre microplacas sin cubrir ( $p<0,001$ ). Sin embargo, no todas las proteínas de la MEC utilizadas inducen el mismo tipo de respuesta. En la figura 19 A, se puede observar que la adhesión de las células, aumenta en relación directa al incremento de las concentraciones de laminina-1 o colágeno tipo IV, obteniéndose valores de  $r^2:0,9407$  y  $r^2:0,9638$ , respectivamente, para estas proteínas.

Las células de Leydig cultivadas sobre fibronectina, presentaron un mayor grado de adhesión celular que las cultivadas sobre microplacas sin cubrir (control). Sin embargo, no hay una correlación lineal con el incremento de la concentración de fibronectina ( $r^2: 0,7611$ ) (figura 19 A).

A las 24 hs de cultivo (figura 19 B), se observa un leve aumento en el número de células adheridas en todas las condiciones experimentales, hecho que no es estadísticamente significativo respecto de los valores obtenidos a 3 hs. La respuesta de las células cultivadas durante 24 hs sobre las diferentes concentraciones de las proteínas de la MEC, es similar a la observada en los cultivos de 3 hs. En los dos períodos de tiempo estudiados, la adición de hCG al medio de cultivo no modificó la adhesión de las células de Leydig a las proteínas de la MEC en.

Los resultados obtenidos nos sugieren que las tres proteínas de la MEC utilizadas, inducen similares cambios morfológicos en las células de Leydig de rata adulta. Asimismo, observamos que la adhesión de las células de Leydig al sustrato es un fenómeno que ocurre rápidamente y que el comportamiento de las células de Leydig de rata adultas varía según el sustrato al cual se adhieren.



**Figura 19.-** Efecto de diferentes concentraciones de las proteínas de la MEC sobre la adhesión celular. Las células de Leydig fueron cultivadas sobre plástico (control) o sobre diferentes concentraciones (3-24 µg/cm<sup>2</sup>) de laminina-1, fibronectina o colágeno tipo IV durante 3 hs ó 24 hs. Las barras representan la media ± ES, n=8, gráfico representativo de 5 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*P<0,001 vs. células de Leydig cultivadas sobre plástico.

## **2.- Análisis de la expresión de las subunidades de integrinas $\alpha_3$ , $\alpha_5$ y $\beta_1$ en células de Leydig.**

Con el fin de detectar cambios en la expresión de las subunidades de integrinas  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  y  $\beta_1$  las células de Leydig se cultivaron sobre cubreobjetos sin cubrir o cubiertos con laminina-1, colágeno tipo IV o fibronectina, durante 24 hs (figura 20).

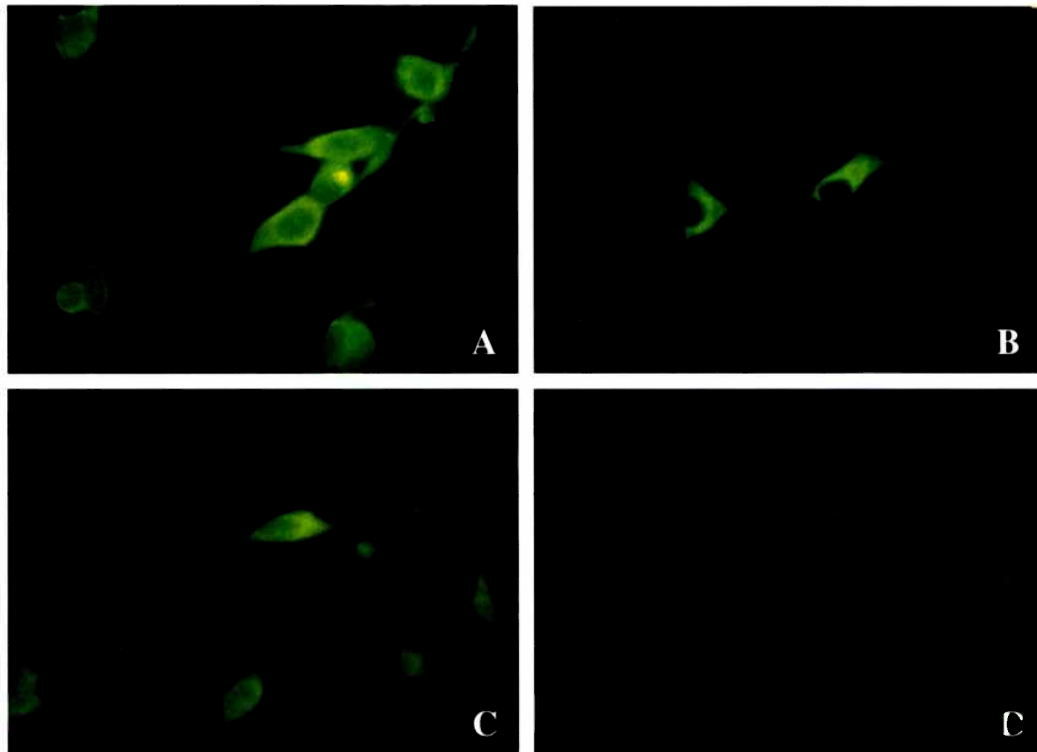
Las células de Leydig cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio, e incubadas con anticuerpos dirigidos contra las subunidades de integrinas  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  y  $\beta_1$ , presentaron una inmunofluorescencia débil. Sin embargo, cuando las células de Leydig son cultivadas sobre cubreobjetos cubiertos con laminina-1 y colágeno tipo IV presentan un marcado aumento en la expresión de  $\alpha_3$  (figura 20 A) y  $\beta_1$  (figura 20 B). Dicha inmunofluorescencia fue mayor en el citoplasma celular y menor en las prolongaciones citoplasmáticas. La expresión de  $\alpha_5$  sólo fue observada en células de Leydig cultivadas sobre fibronectina, siendo esta proteína de la MEC el sustrato específico para la integrina  $\alpha_5\beta_1$  (figura 20 C). Como control negativo se realizó la reacción sustituyendo el primer anticuerpo por un suero normal de conejo o PBS (figura 20 D)

Estos resultados sugieren que si bien las integrinas se expresan de manera constitutiva en las células de Leydig, su expresión aumenta en respuesta a la adhesión de las células a las proteínas de la MEC.

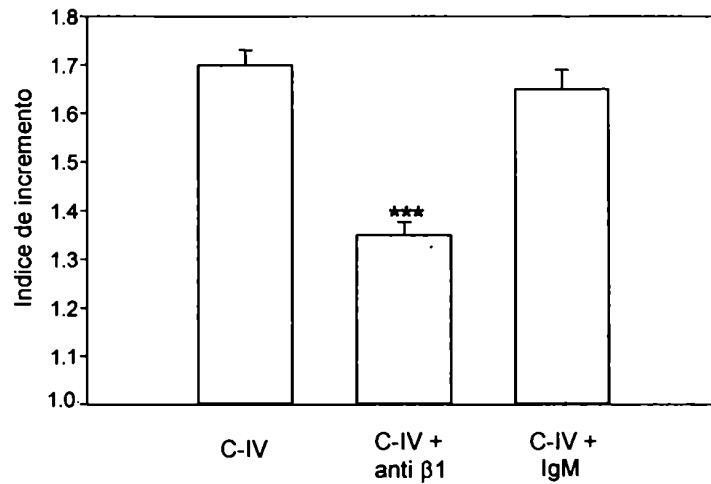
## **3.- Análisis de la participación de la subunidad $\beta_1$ de las integrinas en la adhesión celular.**

Con el fin de comprobar que en nuestro sistema, las proteínas de la MEC ejercen sus efectos a través de las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$ , las células de Leydig fueron preincubadas con un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta_1$  de la integrina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) o con su isotipo control (IgM) (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y cultivadas sobre laminina-1 (6  $\mu\text{g/cm}^2$ ) o colágeno tipo IV (24  $\mu\text{g/cm}^2$ ) durante 3 hs. Luego de la incubación, se determinó el grado de adhesión de las células de Leydig a las diferentes proteínas de la MEC en las distintas condiciones estudiadas.





**Figura 20.-** Microfotografías de la inmunolocalización de receptores de las proteínas de la MEC (integrinas) en células de Leydig cultivadas durante 24 hs. Expresión de la subunidad de integrinas  $\alpha 3$  (A) y  $\beta 1$  (B) en células de Leydig cultivadas sobre cubreobjetos cubiertos con colágeno IV. Expresión de la subunidad de integrinas  $\alpha 5$  en células de Leydig cultivadas sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina. Células de Leydig incubadas con un suero normal de conejo (D) (X 700).



**Figura 21.-** Efecto sobre la adhesión de las células de Leydig al colágeno tipo IV (C-IV,  $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) del anticuerpo con función bloqueante de la subunidad  $\beta 1$  de la integrina. Las células de Leydig fueron preincubadas con dicho anticuerpo ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) o con su isotipo control (IgM) ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los resultados son expresados como veces de incremento de la adhesión respecto a la adhesión de las células cultivadas sobre plástico, considerando la adhesión de las células al plástico con un valor = 1. Las barras representan la media  $\pm$  ES,  $n=6$ , de 3 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*\*\* $p < 0,001$  vs células adheridas al C-IV

En la figura 21 se observa que las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV presentaron un aumento en la adhesión celular de aproximadamente el 70 % respecto de las células cultivadas sobre plástico (basal). Este aumento, disminuyó aproximadamente un 50 % cuando las células fueron preincubadas con un anticuerpo bloqueante dirigido contra la subunidad  $\beta 1$  de la integrina. El isotipo utilizado como control, no modificó el grado de adhesión de las células de Leydig al colágeno tipo IV. Similares resultados se obtuvieron cuando las células fueron cultivadas sobre laminina-1.

#### 4.- Efecto de las proteínas de la MEC sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig

##### 4.1.- Curva dosis/respuesta de hCG

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de hCG, capaz de inducir una estimulación máxima de la producción de testosterona, se realizó un experimento dosis-respuesta, en el cual las células de Leydig fueron cultivadas en microplacas de plástico, en presencia de dosis crecientes de hCG (0.01-100 ng/ml) durante 3 hs.

**Tabla IV.-** Curva dosis respuesta de hCG en células de Leydig

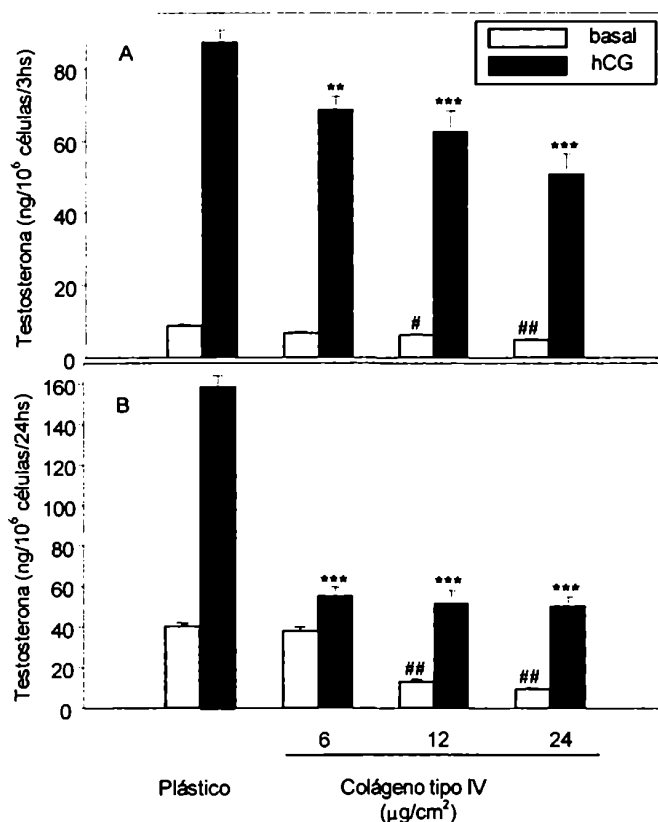
hCG (ng/ml)	Producción de testosterona (ng/10 <sup>6</sup> células/3 hs)
0	9,0 ± 0,38
0,01	8,3 ± 0,27
0,1	8,2 ± 0,34
1	29,8 ± 2,14*
10	88,5 ± 3,82*
100	83,6 ± 1,84*

Producción de testosterona por células de Leydig cultivadas sobre plástico estimuladas con concentraciones crecientes de hCG (0-100 ng/ml) durante 3 hs. Los resultados son expresados como la media ± ES, n=8, datos representativos de 3 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*p<0,001 vs células cultivadas en ausencia de hCG.

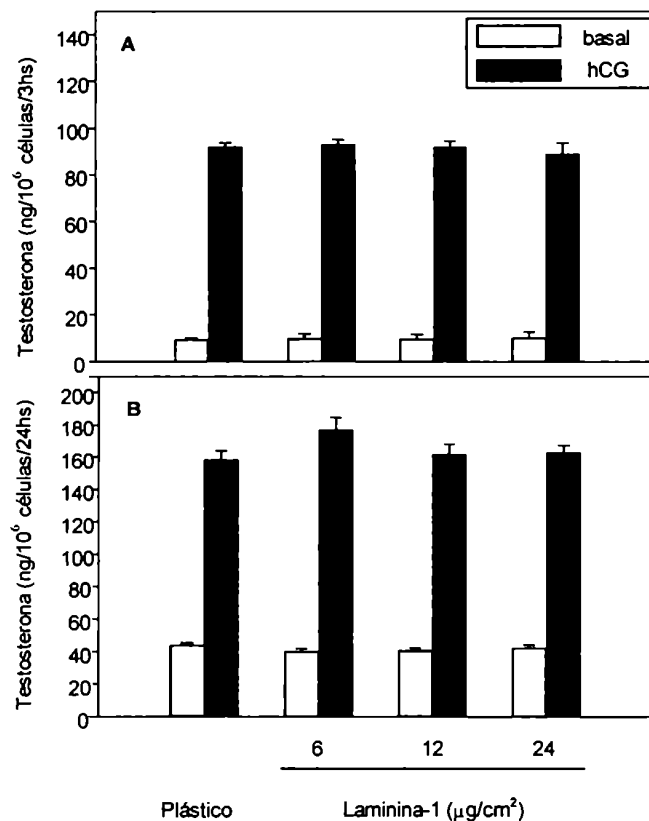
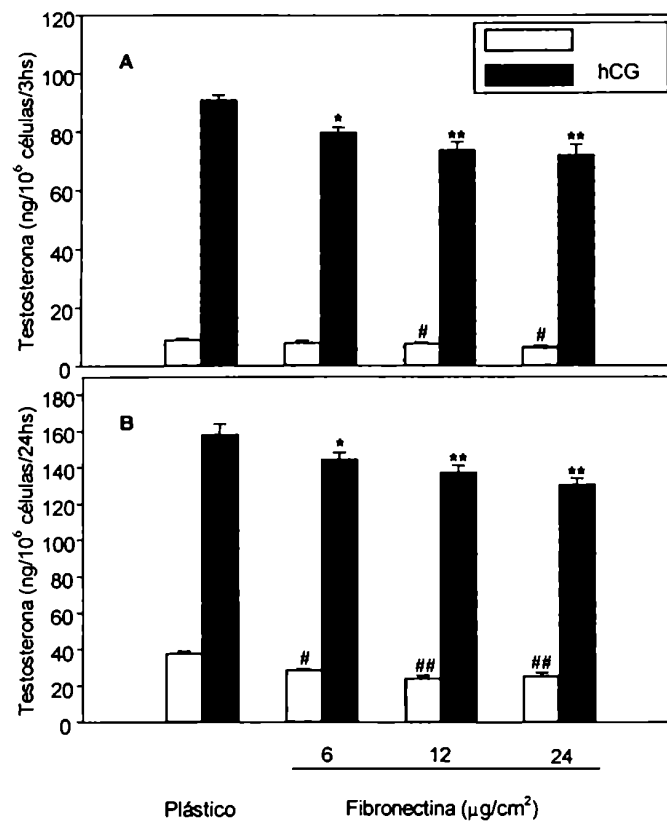
La hCG estimuló la producción de testosterona de manera dosis dependiente, presentando una meseta a la concentración de 10 ng/ml, siendo el aumento en la producción de testosterona de aproximadamente 10 veces, respecto a la respuesta basal. La estimulación máxima de testosterona se obtuvo a una concentración de hCG de 10 ng/ml (ver tabla IV). La misma, está en concordancia con la literatura, que describe que las células de Leydig de rata responden al estímulo de LH/hCG aumentando entre 5 y 20 veces la producción de testosterona [Lèfevre y col., 1983]. Esta concentración, fue utilizada en todos los experimentos desarrollados con células de Leydig estimuladas con hCG.

#### 4.2.- Efecto del colágeno tipo IV, la fibronectina y la laminina-1 sobre la producción de testosterona

Las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV (figura 22) o sobre fibronectina (figura 23) a concentraciones de 12 a 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , en ausencia o presencia de hCG, mostraron una disminución significativa en la producción de testosterona, ésta se detecta tanto a las 3 hs (A) como también a las 24 hs de cultivo (B). A estas concentraciones el colágeno tipo IV y la fibronectina inducen una marcada disminución en la producción de testosterona con respecto a las células cultivadas sobre plástico y la misma respuesta se observa al comparar los cultivos estimulados con hCG. A la concentración de 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  tanto el colágeno tipo IV como la fibronectina sólo mostraron un efecto inhibitorio cuando las células fueron estimuladas con hCG. Por otra parte, la laminina-1 no modificó la producción de testosterona a ninguna de las concentraciones utilizadas y en ninguna de las condiciones empleadas en estos estudios (figura 24).

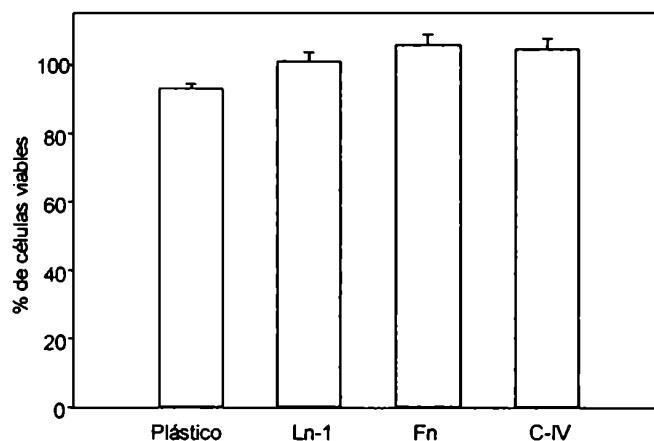


**Figura 22.-** Producción de testosterona de células de Leydig cultivadas sobre plástico (control) o sobre diferentes concentraciones de colágeno tipo IV en presencia o ausencia de hCG (10 ng/ml) durante 3 hs (A) ó 24 hs (B). Las barras representan la media  $\pm$  ES, n=8; gráfico representativo de seis experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs células cultivadas sobre plástico y estimuladas con hCG. #p<0,05; ##p<0,01 vs células cultivadas sobre plástico.



A fin de determinar si la inhibición en la producción de testosterona de las células cultivadas sobre fibronectina o colágeno tipo IV ( $12\text{-}24\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) se debía a un efecto citotóxico de estas proteínas, se determinó la viabilidad celular por un método colorimétrico usando un compuesto de tetrazolium (MTS)

En la figura 25 podemos observar que las proteínas de la MEC no modificaron la actividad celular de las células de Leydig, por lo que se deduce que el efecto de la fibronectina y del colágeno tipo IV sobre la producción de testosterona no se debe a una acción citotóxica sino a un efecto inherente a tales proteínas.



**Figura 25.-** Viabilidad de las células de Leydig cultivadas sobre plástico (control) o sobre laminina-1 (Ln-1,  $6\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), fibronectina (Fn,  $12\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) o colágeno tipo IV (C-IV,  $24\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) durante 3 hs. Los resultados son expresados como porcentaje de células viables, considerando la viabilidad de las células recién aisladas como 100 %. Los datos son expresados como la media  $\pm$  ES,  $n=18$ , de 3 experimentos independientes.

#### **4.3- Análisis del mecanismo de acción de las MEC sobre la producción de testosterona de las células de Leydig.**

En base a los resultados obtenidos, nos preguntamos a que nivel de la producción de testosterona, el colágeno tipo IV y la fibronectina ejercen su efecto inhibitorio. Para responder esta pregunta analizamos distintos pasos en la vía de la síntesis de la testosterona.

#### 4.3.1.- Papel de las proteínas de la MEC sobre la unión de hCG al receptor de LH/hCG.

En las condiciones estudiadas no observamos diferencias significativas en la unión de hCG a su receptor, lo que indica que la inhibición en la producción de testosterona inducida por el colágeno tipo IV y la fibronectina, no se debe a que estas proteínas, interfieren con la unión de hCG a su receptor específico (Tabla V).

**Tabla V.- Unión específica de  $^{125}\text{I}$  hCG al receptor de LH/hCG**

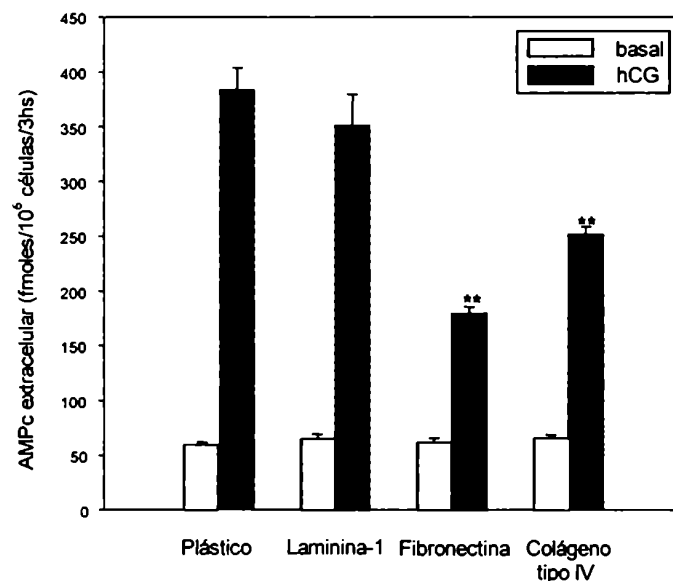
Células de Leydig cultivadas sobre:	Unión Específica (cpm/ $10^6$ células)
<b>Plástico</b>	1.462 ± 45
<b>Laminina-1</b>	1.445 ± 92
<b>Fibronectina</b>	1.440 ± 87
<b>Colágeno tipo IV</b>	1.450 ± 42

Células de Leydig cultivadas sobre plástico, laminina-1 ( $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), fibronectina ( $12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) o colágeno tipo IV ( $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en presencia de  $^{125}\text{I}$  hCG (150.000 cpm) durante 3 hs. La unión específica de hCG fue calculada como la diferencia entre las cuentas totales unidas y la unión inespecífica. Los resultados son expresados como la media ± ES, n=4, gráfico representativo de 3 experimentos.

#### 4.3.2.- Efecto de las proteínas de la MEC sobre la producción de AMPc extracelular

A fin de determinar si las proteínas de la MEC alteran la producción de AMPc, las células de Leydig fueron cultivadas en presencia de un inhibidor de la PDE (IBMX, 0,125 mM), en presencia o ausencia de hCG (10 ng/ml).

En las células de Leydig estimuladas con hCG y cultivadas sobre colágeno tipo IV y fibronectina se observó una inhibición de la producción de AMPc extracelular si comparamos con los resultados obtenidos con células cultivadas sobre plástico ( $p < 0,01$ ). En condiciones basales, no se observaron diferencias significativas en la producción de AMPc extracelular. Por otro lado, la laminina-1 no modificó los niveles de este segundo mensajero (figura 26).



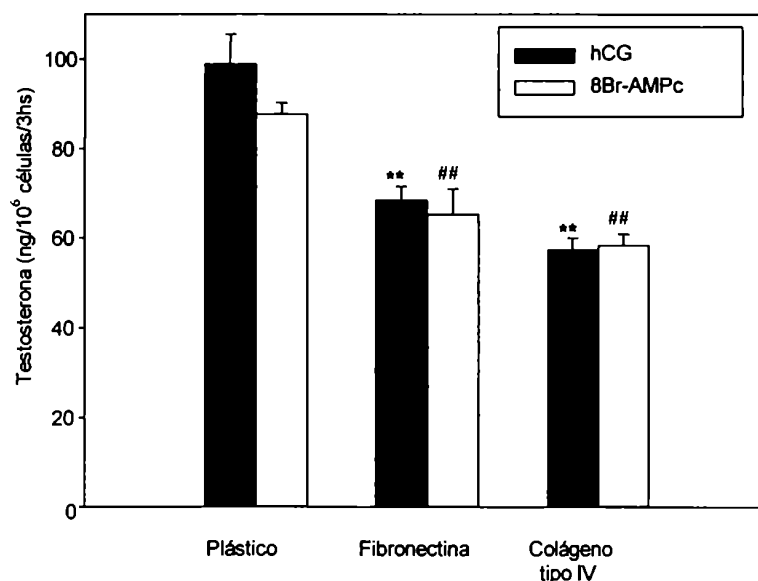
**Figura 26.-** Producción de AMPc extracelular en células de Leydig cultivadas sobre plástico (control), laminina-1 ( $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), fibronectina ( $12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) o colágeno tipo IV ( $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en presencia de IBMX (0,125 mM) y en presencia o ausencia de hCG (10 ng/ml) durante 3 hs. Las barras representan la media  $\pm$  ES,  $n=12$  de 3 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*\* $p < 0,01$  vs células cultivadas sobre plástico y estimuladas con hCG.



### 4.3.3- Efecto de análogos de AMPc sobre la producción de testosterona

A fin de determinar si la inhibición en la producción de testosterona inducida por la fibronectina y el colágeno tipo IV, se debe a un efecto posterior a la formación de AMPc, las células de Leydig se incubaron en presencia de un análogo permeable y no hidrolizable de AMPc: 8Br-AMPc (0,5  $\mu$ M).

En la figura 27 se observa que el 8Br-AMPc estimuló la producción de testosterona en las células de Leydig cultivadas sobre plástico (control). Sin embargo, dicho agente no revirtió el efecto inhibitorio de la fibronectina y del colágeno tipo IV sobre la producción de testosterona ( $p < 0,01$ ). Cabe destacar, que la dosis de 8Br-AMPc utilizada indujo una respuesta de similar magnitud que la producida por la hCG.



**Figura 27.-** Producción de testosterona por células de Leydig cultivadas sobre plástico (control), fibronectina (12  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) o colágeno tipo IV (24  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) en presencia de hCG (10 ng/ml) o de 8Br-AMPc (0,5  $\mu$ M) durante 3 hs. Las barras representan la media  $\pm$  ES, n=8; gráfico representativo de 3 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*\* $p < 0,01$  vs células cultivadas sobre plástico y estimuladas con hCG. ## $p < 0,01$  vs células cultivadas sobre plástico e incubadas con 8Br-AMPc

#### 4.3.4. - Evaluación de la actividad de las enzimas esteroidogénicas.

Para evaluar si el efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona inducido por la fibronectina y el colágeno tipo IV, se debía a una alteración en la función de las enzimas esteroidogénicas, las células de Leydig fueron incubadas con distintos sustratos como 22(R) hidroxicolesterol (20  $\mu$ M), pregnenolona (2  $\mu$ M), 17- $\alpha$  hidroxiprogesterona (2  $\mu$ M) o  $\Delta^4$  androstenediona (2  $\mu$ M).

**Tabla VI.-** Evaluación de la actividad de las enzimas esteroidogénicas

	Testosterona (ng / 10 <sup>6</sup> células / 3 hs.)		
	Plástico	Fibronectina	Colágeno IV
Basal	16,5 $\pm$ 0,8	10,2 $\pm$ 0,9*	9,3 $\pm$ 0,7*
hCG	99,0 $\pm$ 6,5	57,5 $\pm$ 2,3 <sup>#</sup>	68,5 $\pm$ 3 <sup>#</sup>
22(R)-hidroxicolesterol	313,1 $\pm$ 15	297,4 $\pm$ 9,45	298,4 $\pm$ 10,4
Progesterona	244,3 $\pm$ 2,6	238,1 $\pm$ 12,5	232,7 $\pm$ 16,5
17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona	373,9 $\pm$ 15	425,1 $\pm$ 14	347,5 $\pm$ 13,5
$\Delta^4$ Androstenediona	373,2 $\pm$ 14,1	273,6 $\pm$ 22,7	434,3 $\pm$ 3,8

Producción de testosterona por células de Leydig cultivadas sobre plástico, fibronectina (12  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) o colágeno tipo IV (24  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) en presencia o ausencia de hCG (10 ng/ml), 22(R)-hidroxicolesterol (20  $\mu$ M), progesterona (2  $\mu$ M), 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (2  $\mu$ M) o  $\Delta^4$  androstenediona (2  $\mu$ M) durante 3 hs. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ES, n=8; gráfico representativo de 3 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*p<0,01 vs basal. <sup>#</sup>p<0,001 vs hCG.

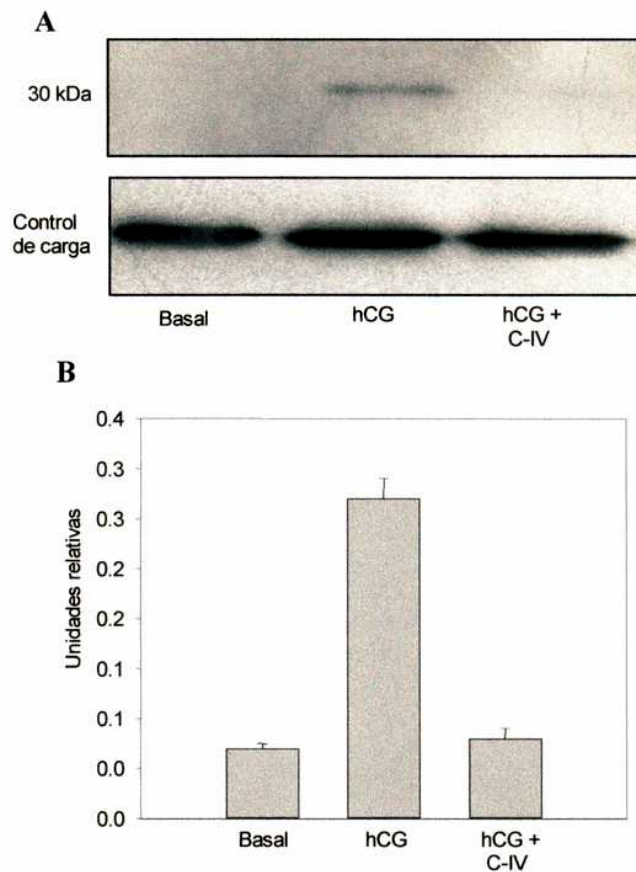
Las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV o fibronectina no presentaron diferencias significativas en la producción de testosterona cuando se las compara con las células cultivadas sobre plástico (Tabla VI).

Estos resultados indican que el efecto inhibitorio en la producción de testosterona inducido por la fibronectina y el colágeno tipo IV estaría localizado en un paso posterior a la producción de AMPc y anterior a la entrada de colesterol a la membrana interna mitocondrial.

#### **4.3.5.-Efecto del colágeno tipo IV sobre la expresión de la proteína StAR**

Los resultados obtenidos hasta aquí nos demuestran que la fibronectina y el colágeno tipo IV inhiben la producción de testosterona de las células de Leydig. Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que el colágeno tipo IV es uno de los principales componentes de la membrana basal que rodea a las células de Leydig, se decidió continuar los estudios analizando el efecto del colágeno tipo IV sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata.

La esteroidogénesis es estimulada por las gonadotrofinas, a través del AMPc, vía PKA. Esta última es capaz de activar de manera directa o indirecta una gran variedad de moléculas, entre ellas, la proteína StAR, involucrada en el transporte del colesterol a la membrana interna mitocondrial. Debido a que hemos demostrado que el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV sobre la producción de testosterona se localizaría en un paso posterior a la producción de AMPc pero anterior a la entrada de colesterol a la membrana interna mitocondrial, nos propusimos determinar si el colágeno tipo IV es capaz de modular la expresión de la proteína StAR. Con este objetivo, las células de Leydig fueron cultivadas en ausencia o presencia de hCG (10 ng/ml) durante 90 minutos. Luego, las células fueron lisadas y determinada, por "Western blot", la expresión de la forma madura de la proteína StAR



**Figura 28.-** Análisis de la expresión de la proteína StAR en células de Leydig cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV ( $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en ausencia (basal) o presencia de hCG ( $10\text{ng}/\text{ml}$ ) durante 90 minutos. Panel A: “Inmunoblot” revelado con un anticuerpo dirigido contra la forma madura de la proteína StAR (30 kDa). Panel B: Análisis densitométrico del “inmunoblot”. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias  $\pm$  ES ( $n=3$ ).

En la figura 28 A se muestra que los extractos solubles correspondientes a las células de Leydig cultivadas sobre plástico en condiciones basales, no presentan expresión de la proteína StAR, mientras que la estimulación con hCG, induce la expresión de la misma. Cuando las células son cultivadas sobre colágeno tipo IV y estimuladas con hCG muestran una disminución de aproximadamente el 80 % en la expresión de StAR, respecto a la expresión observada en las células cultivadas sobre plástico y estimuladas con esta hormona, siendo similar al nivel de expresión observado en las células cultivadas sobre plástico, sin estímulo de hCG (figura 28 B).

Estos resultados demuestran que el colágeno tipo IV, es capaz de modular negativamente la expresión de StAR, sugiriendo que las señales intracelulares

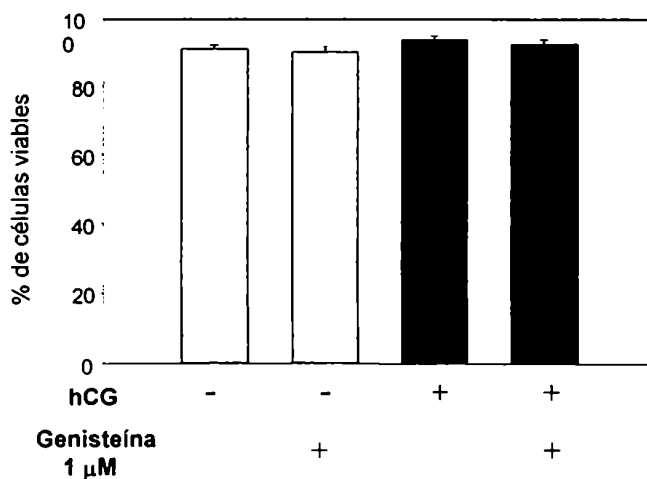
desencadenadas por componentes extracelulares, también participarían en la regulación de la expresión de la proteína StAR.

## 5.- Estudio de las vías de señalización intracelular activadas por el colágeno tipo IV

Los resultados obtenidos hasta aquí nos demuestran que el colágeno tipo IV inhibe la producción de testosterona de las células de Leydig, siendo capaz de modular la expresión de la proteína StAR. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió analizar la(s) vía(s) de señalización intracelular activadas por el colágeno tipo IV, capaces de regular negativamente la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata.

### 5.1.- Análisis de la participación de proteínas tirosina quinasas

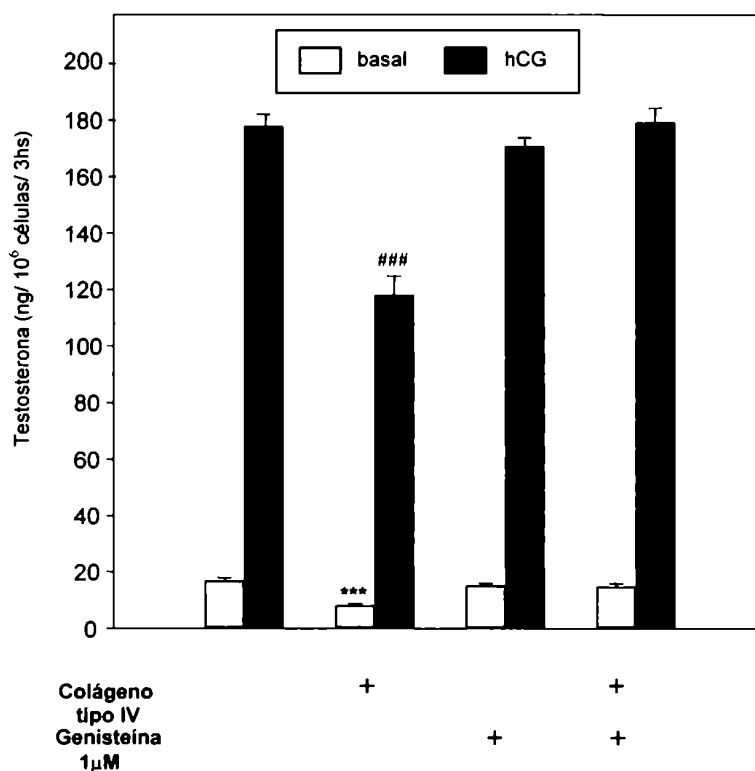
Es ampliamente aceptado que la genisteína es un potente inhibidor de la fosforilación de tirosinas y que altas dosis de esta droga inducen muerte celular [Kumi-Diaka y col, 1998]. Por este motivo, se determinó en los cultivos, la concentración de genisteína que no resultase citotóxica para las células de Leydig. En la figura 29, se muestra que la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , no afectó la actividad celular tanto en condiciones basales como estimuladas con hCG.



**Figura 29.-** Efecto de la genisteína (1  $\mu\text{M}$ ) sobre la viabilidad de las células de Leydig cultivadas sobre plástico en ausencia o presencia de hCG (10 ng/ml) durante 3 hs. Los resultados son expresados como porcentaje de células viables, considerando la viabilidad de las células recién aisladas, como 100 %. Los datos son expresados como la media  $\pm$  ES,  $n=21$ , de 3 experimentos independientes.

Una vez determinada la concentración de genisteína, las células de Leydig fueron cultivadas sobre microplacas sin cubrir o cubiertas con colágeno tipo IV en presencia o ausencia de genisteína (1  $\mu\text{M}$ ) y de hCG (10 ng/ml) durante 90 minutos ó 3 hs. En los medios condicionados de las células cultivadas durante 3 hs se determinó la producción de testosterona. Las células incubadas durante 90 minutos fueron lisadas y se detectaron por “Western blot” las proteínas fosforiladas en tirosina.

La genisteína *per se*, no altera la producción de testosterona por las células de Leydig cultivadas sobre plástico, mientras que el agregado de 1  $\mu\text{M}$  de genisteína al medio de cultivo, revierte el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV sobre la producción de testosterona, tanto en condiciones basales como estimuladas con hCG (figura 30).

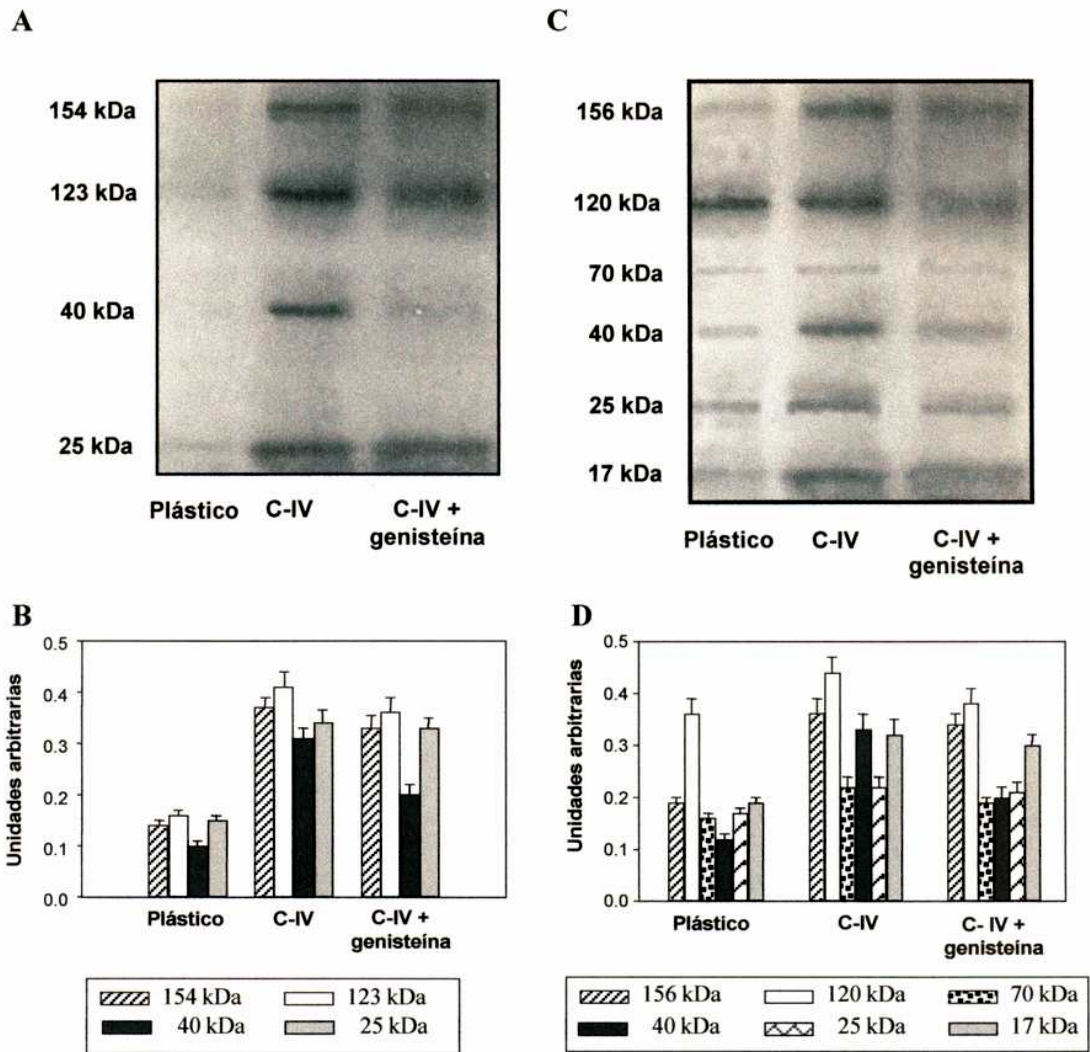


**Figura 30.-** Producción de testosterona por células de Leydig cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV (24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en ausencia o presencia de hCG (10 ng/ml) y genisteína (1  $\mu\text{M}$ ) durante 3 hs. Las barras representan la media  $\pm$  ES, n=8; gráfico representativo de 3 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*\*\*p<0,001 vs control sin hCG. ##p<0,01 vs control con hCG.

En el “Inmunoblot” realizado a partir de extractos solubles de células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV se observan cuatro bandas de proteínas fosforiladas en tirosina, cuyos pesos moleculares aproximados son de 154 kDa, 123 kDa, 40 kDa y 25 kDa (figura 31 A). Este patrón de fosforilación no se observó cuando las células fueron cultivadas sobre plástico. El análisis densitométrico de las bandas correspondientes a las células cultivadas sobre colágeno tipo IV reveló un incremento en el grado de fosforilación de las bandas que varía entre 2,3 y 3,1 veces, al compararlas con las bandas correspondientes a las células cultivadas sobre plástico. Cuando las células son cultivadas sobre colágeno tipo IV en presencia de genisteína (1  $\mu$ M), se observa una disminución en el nivel de fosforilación de las cuatro bandas de proteínas anteriormente mencionadas (figura 31 A). El análisis densitométrico reveló una disminución de aproximadamente 35 % de la banda fosforilada correspondiente a un peso molecular aproximado de 40 kDa (figura 31 B).

La figura 31 C muestra el “Inmunoblot” correspondiente a extractos solubles de células de Leydig estimuladas con hCG y cultivadas sobre plástico, colágeno tipo IV o colágeno tipo IV en presencia de genisteína (1  $\mu$ M). En estas condiciones de cultivo, se observan seis bandas de proteínas fosforiladas cuyos pesos moleculares son aproximadamente de 156 kDa, 120 kDa, 70 kDa, 40 kDa, 25 kDa y 17 kDa. Este resultado demuestra que la hCG induce un aumento en el número de proteínas fosforiladas en tirosina.

En el análisis densitométrico (figura 31 D) se observa que el colágeno tipo IV induce un aumento en el grado de fosforilación de estas bandas, que varía entre 1,3 y 2,8 veces, con respecto a las bandas obtenidas de extractos solubles de células cultivadas sobre plástico. Cuando las células son cultivadas sobre colágeno tipo IV en presencia de genisteína, se observa una disminución en la fosforilación de todas las bandas, al igual que lo observado en las células de Leydig cultivadas en condiciones basales (figura 31 A)



**Figura 31.-** Análisis de la actividad tirosina quinasa de los extractos solubles correspondientes a las células de Leydig cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV ( $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en ausencia o presencia de  $1 \mu\text{M}$  de genisteína durante 90 minutos. **A** y **B**: células cultivadas en condiciones basales; **C** y **D**: células estimuladas con  $10\text{ng}/\text{ml}$  de hCG. Paneles **A** y **C**: "Inmunoblot" de las proteínas fosforiladas en tirosina, revelado con un anticuerpo dirigido contra fosfotirosinas. Paneles **B** y **D**: Análisis densitométrico del "inmunoblot". La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias  $\pm$  ES ( $n=3$ ).

En resumen, estos resultados sugieren que la modulación negativa del colágeno tipo IV sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata, está mediada a través de la activación de tirosina quinasas.



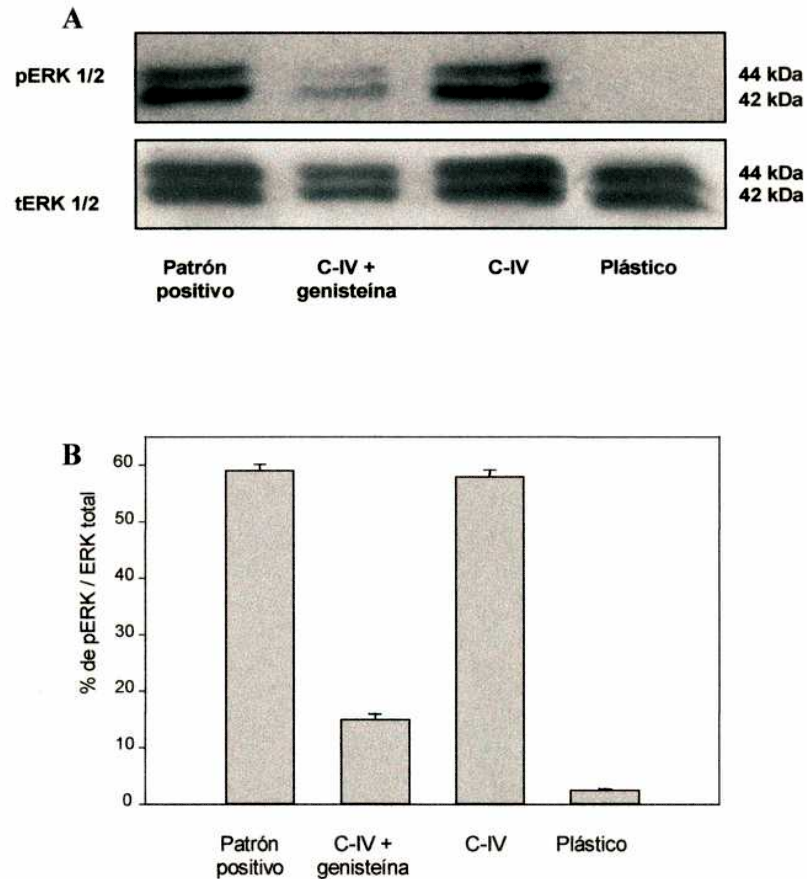
## 5. 2.- Participación de las proteínas MEK en el proceso de esteroidogénesis

Está ampliamente descrito que las proteínas de la MEC, a través de las integrinas son capaces de activar la vía de señalización de las MAPK. Dentro de esta cascada de señalización participan como últimos efectores las proteínas ERK 1-2, cuyo peso molecular es aproximadamente de 42 y 44 kDa, respectivamente. Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando que las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV presentan un aumento en la fosforilación de una banda de proteína(s) correspondiente(s) a un peso molecular aproximado de 40 kDa, estudiamos si el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV sobre la producción de testosterona está mediado por las proteínas ERK 1-2.

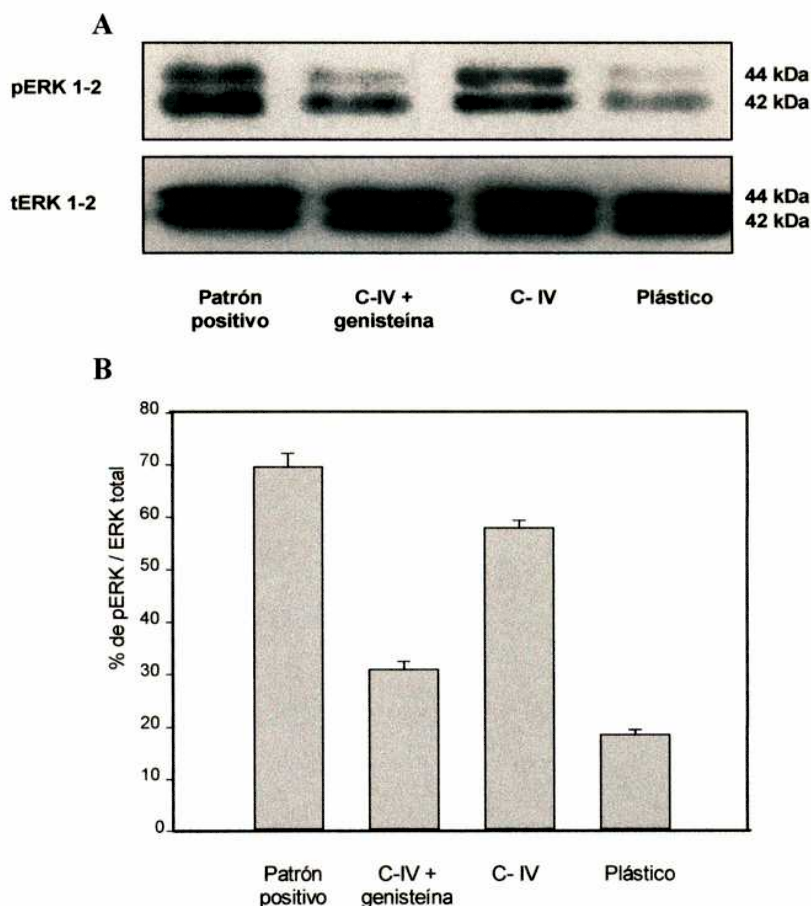
Primero se estudió el patrón de fosforilación de las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV con el propósito de determinar si había diferencias con el patrón obtenido de las células cultivadas sobre plástico, en condiciones basales y estimuladas con hCG. Para ello, las células de Leydig fueron cultivadas en ausencia o presencia de genisteína (1  $\mu$ M) durante 90 minutos. Luego las células fueron solubilizadas, determinándose el grado de fosforilación de las proteínas ERK 1-2 con anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína total y contra la isoforma fosforilada. Además se utilizó un control de expresión y fosforilación (patrón positivo) correspondiente a células Hela.

En el "Inmunoblot" revelado con un anticuerpo dirigido contra las isoformas fosforiladas de las proteínas ERK 1-2 se detectó una marcada fosforilación de proteínas en la banda correspondiente a extractos solubles de células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV. Esta banda disminuye en presencia de genisteína y está ausente en la muestra correspondiente a los extractos solubles de células cultivadas sobre plástico (figura 32 A). Este mismo patrón de fosforilación fue observado en el "Inmunoblot" correspondiente a los extractos solubles de células de Leydig cultivadas en presencia de hCG (figura 33 A y B). Cabe destacar, que en las bandas correspondientes a los extractos solubles de las células de Leydig cultivadas sobre plástico en presencia de hCG, se detectó un bajo grado de fosforilación, que no es observada en los extractos solubles de las células de Leydig cultivadas sobre plástico, en condiciones basales. Esta respuesta a la hCG confirma los resultados

mostrados en la figura 31 A, indicando que la hCG *per se*, es capaz de estimular la activación de la cascada de señalización de las MEK 1-2, siendo las proteínas ERK 1-2 sus últimas efectoras.



**Figura 32.-** Análisis de la fosforilación de las proteínas ERK 1-2 en células de Leydig cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV (C-IV, 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en ausencia o presencia de genisteína (1  $\mu\text{M}$ ) durante 90 minutos. Panel A: “Inmunoblot” de las proteínas ERK 1-2, revelado con un anticuerpo dirigido contra la proteína ERK 1-2 fosforilada (pERK) y total (tERK). Panel B: Análisis densitométrico del “Inmunoblot”. La densidad óptica se expresa como % de ERK fosforilada / ERK total  $\pm$  ES (n=3).

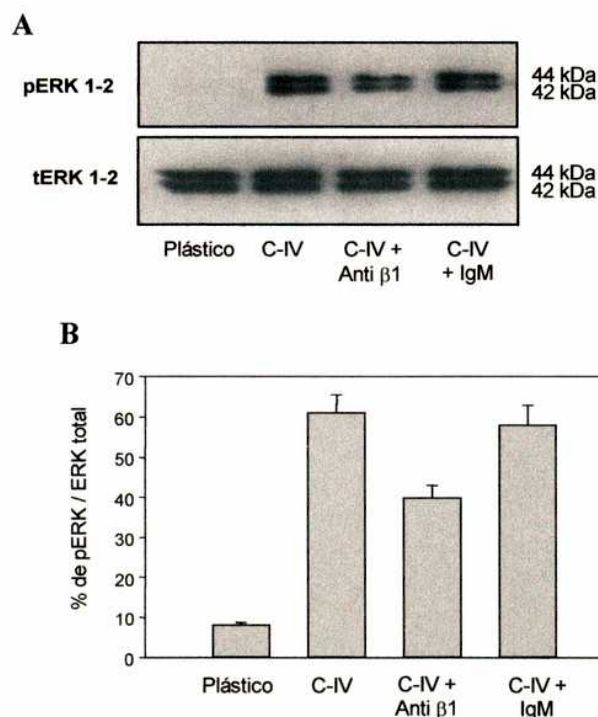


**Figura 33.-** Análisis de la fosforilación de las proteínas ERK 1-2 en células de Leydig cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV (C-IV,  $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en ausencia o presencia de genisteína ( $1 \mu\text{M}$ ) y en presencia de hCG ( $10 \text{ ng}/\text{ml}$ ) durante 90 minutos. Panel A: Inmunoblot de las proteínas ERK 1-2, revelado con un anticuerpo dirigido contra las proteína ERK 1-2 fosforilada (pERK) y total (tERK). Panel B: Análisis densitométrico del Inmunoblot. La densidad óptica se expresa como % de ERK fosforilada / ERK total  $\pm$  ES (n=3).

En base a estos resultados, nos propusimos determinar si la activación de las proteínas ERK 1-2 inducida por el colágeno tipo IV, está mediada por su receptor específico, las integrinas.

Para ello, las células de Leydig fueron incubadas en ausencia o en presencia de un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta_1$  de las integrinas o con su isotipo control. Luego se analizó por “Western blot” el nivel de fosforilación de las proteínas ERK 1-2.

En concordancia con los resultados observados en la figura 32 A, los extractos solubles de células de Leydig cultivadas sobre plástico en condiciones basales, no presentaron fosforilación de las proteínas ERK 1-2, mientras que en los extractos solubles de células de Leydig cultivadas en presencia de colágeno tipo IV se detectó un importante grado de fosforilación de estas proteínas. Cuando las células fueron cultivadas sobre colágeno tipo IV en presencia de un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta_1$ , se observó por "Inmunoblot", una disminución de alrededor del 33 % en el grado de fosforilación de las proteínas ERK 1-2 con respecto a la banda obtenida cuando las células fueron cultivadas sobre colágeno tipo IV (figura 34 B). El control con el isotipo mostró un grado similar de fosforilación de las proteínas ERK 1-2, que el observado en las células cultivadas sobre colágeno tipo IV.



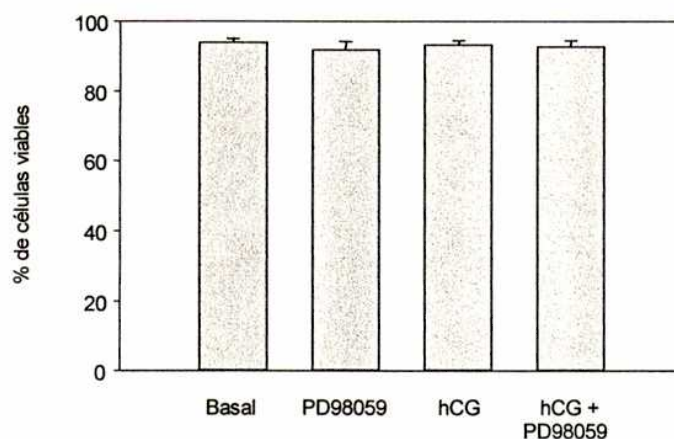
**Figura 34.-** Análisis de la fosforilación de las proteínas ERK 1-2 en células de Leydig preincubadas durante 30 minutos con anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta_1$  de integrina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) o su control de isotipo (IgM) y cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV (C-IV, 24  $\mu\text{g/cm}^2$ ) en presencia o ausencia de genisteína (1  $\mu\text{M}$ ) durante 90 minutos. Panel A: Inmunoblot de las proteínas ERK 1-2, revelado con un anticuerpo dirigido contra la proteína ERK 1-2 fosforilada (pERK) y total (tERK). Panel B: Análisis densitométrico del Inmunoblot. La densidad óptica se expresa como % de ERK fosforilada / ERK total  $\pm$  ES (n=3).



Estos resultados sugieren que el colágeno tipo IV, a través de su receptor específico, puede activar la cascada de señalización de las MEK, modulando el grado de fosforilación de las proteínas ERK 1-2.

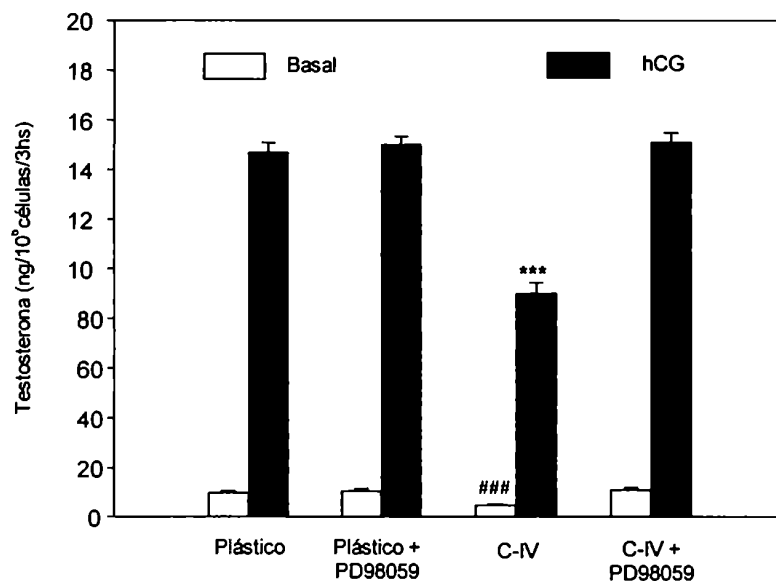
Ante los resultados obtenidos, el siguiente paso fue analizar el efecto de las MEK sobre la producción de testosterona. Para ello, las células de Leydig fueron cultivadas durante 3 hs, en ausencia o en presencia de PD98059, un inhibidor de la actividad de las proteínas MEK. En los medios condicionados de las células cultivadas se determinó la producción de testosterona.

Previamente, se determinó la concentración de PD98059 que no afectara la viabilidad celular. Según datos descriptos en la bibliografía, se utilizaron las siguientes concentraciones de 0,5; 1; 5; 10; 15 y 30  $\mu\text{M}$ . Las concentraciones de 5 a 30  $\mu\text{M}$  afectaron considerablemente la viabilidad de las células. Dado que la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , mostró resultados variables, se eligió la concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  de PD98059, ya que la misma, no afectó la viabilidad de la células de Leydig cultivadas en condiciones basales o estimuladas con hCG (figura 35).



**Figura 35.-** Viabilidad de las células de Leydig cultivadas sobre plástico en ausencia (basal) o presencia de hCG (10 ng/ml) o PD98059 (0,5  $\mu\text{M}$ ) durante 3 hs. Los resultados son expresados como porcentaje de células viables, considerando la viabilidad de las células recién aisladas como 100 %. Los datos son expresados como la media  $\pm$  ES, n=18; gráfico de 3 experimentos independientes.

En la figura 36, se observa que la producción de testosterona de las células de Leydig cultivadas sobre plástico en condiciones basales y estimuladas con hCG no fue afectada por el uso de PD98059, el cual inhibe a las proteínas MEK. Sin embargo, dicho agente fue capaz de revertir el efecto inhibitorio inducido por el colágeno tipo IV sobre la producción de testosterona, tanto en condiciones basales como estimuladas con hCG ( $p < 0,001$ ).



**Figura 36.-** Producción de testosterona de células de Leydig cultivadas sobre plástico (control) o colágeno tipo IV (C-IV, 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en presencia o ausencia de hCG (10 ng/ml) o de PD98059 (0,5  $\mu\text{M}$ ) durante 3 hs. Las barras representan la media  $\pm$  ES,  $n=8$ , gráfico representativo de 3 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*\*\* $p < 0,001$  vs células cultivadas sobre plástico. ## $p < 0,01$  vs células cultivadas sobre plástico y estimuladas con hCG.

### 5.3.- Análisis de la participación de la proteína FAK

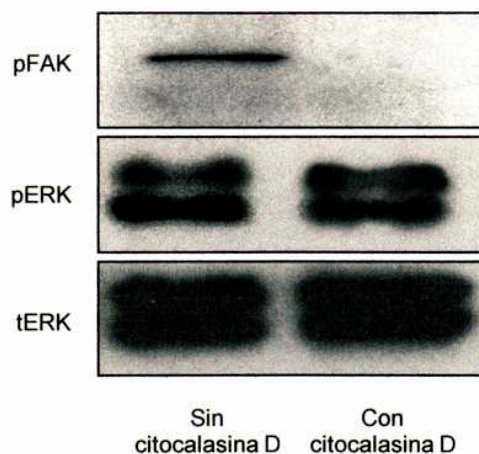
Las integrinas tienen la capacidad de activar la vía de señalización de las MAPK a través de varios mecanismos. Uno de estos, se desarrolla a través de la activación de la proteína Ras, pudiendo ser dependiente o no de la proteína FAK. La activación de estos mecanismos, depende a su vez del tipo celular en el cual se

desencadena la respuesta. Aún no está dilucidado el mecanismo por el cual el colágeno tipo IV activa la cascada de las MAPK en las células de Leydig.

Debido a lo anteriormente mencionado, nuestro propósito fue determinar si el colágeno tipo IV activa la cascadas de las MAPK por un mecanismo dependiente o independiente de la proteína FAK.

Para ello y con el fin de inhibir a las proteínas del citoesqueleto involucradas en la activación de las proteínas ERK 1-2, se utilizó un inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina (citocalasina D). La concentración de citocalasina D utilizada fue de 1  $\mu\text{M}$  [Barberis y col., 2000].

El "Inmunoblot" de los extractos solubles correspondientes a las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV en ausencia o en presencia de citocalasina D, fue revelado con anticuerpos dirigidos contra la isoforma fosforilada de FAK y las isoformas fosforiladas y total de las proteínas ERK 1-2. Las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV muestran fosforilación de la proteína FAK, mientras que en presencia de citocalasina D, no se observa fosforilación de esta proteína. Cabe destacar que la presencia de la citocalasina D, no afectó la fosforilación de las proteínas ERK 1-2 (figura 37). Estos resultados sugieren que en las células de Leydig de rata adulta, la activación de la cascada de las MEK, inducida por el colágeno tipo IV, se desencadena fundamentalmente, a través de un mecanismo FAK independiente.



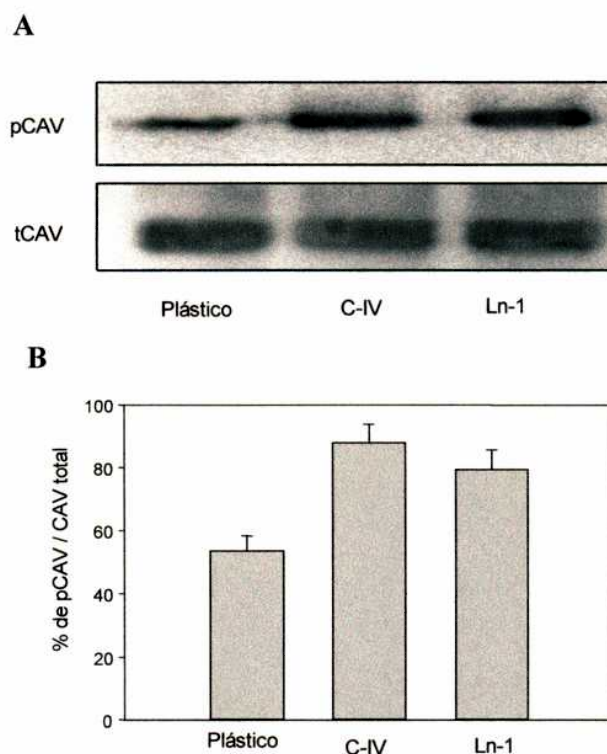
**Figura 37.-** Efecto de la citocalasina D sobre la fosforilación de quinasas activadas por integrinas. Inmunoblot de células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV ( $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en presencia o ausencia de citocalasina D (1  $\mu\text{M}$ ) durante 90 minutos, revelado con anticuerpos dirigidos contra la isoforma fosforilada de FAK (pFAK), y las isoformas fosforiladas (pERK) y total (tERK) de las proteínas ERK1-2.



#### 5.4.- Participación de la proteína caveolina-1

La activación de las proteínas ERK 1-2 independiente de FAK, puede ser mediada por una proteína denominada caveolina [Giancotti y Ruoslahti, 1999]. Considerando que en nuestro sistema, el colágeno tipo IV activa a las proteínas ERK 1-2 de manera FAK independiente, nos propusimos estudiar si la caveolina-1 participa en la vía de señalización activada por el colágeno tipo IV, en las células de Leydig.

Por "Inmunoblot" se detectó en las células de Leydig cultivadas sobre plástico, laminina-1 o colágeno tipo IV, la expresión de la proteína caveolina-1, determinándose que esta proteína se encuentra fosforilada. Sin embargo, el análisis densitométrico de las bandas reveló un mayor grado de fosforilación de las células cultivadas sobre colágeno tipo IV y laminina-1 con respecto a las cultivadas sobre plástico (figura 38).

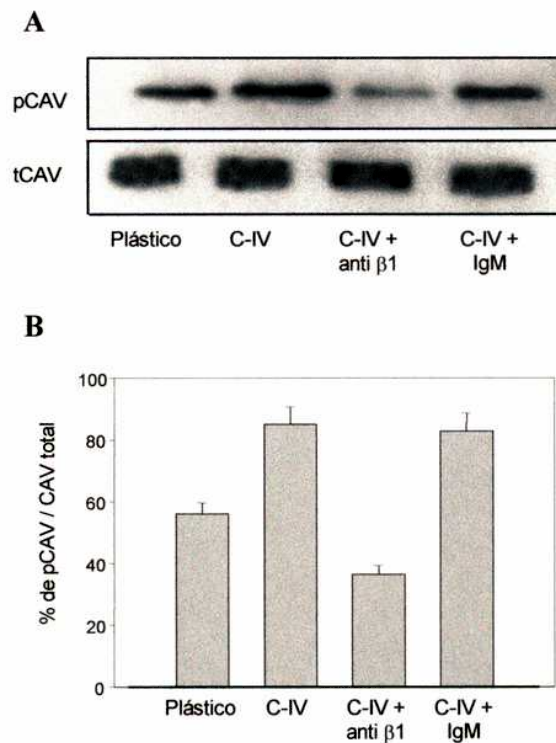


**Figura 38.-** Análisis de la fosforilación de la proteína caveolina-1 en células de Leydig cultivadas sobre plástico, colágeno tipo IV (C-IV,  $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) o laminina-1 (Ln-1,  $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) durante 90 minutos. Panel A: Inmunoblot de la proteína caveolina-1, revelado con un anticuerpo dirigido contra la proteína caveolina-1 fosforilada (pCAV) y total (tCAV). Panel B: Análisis densitométrico del Inmunoblot. La densidad óptica se expresa como % de caveolina-1 fosforilada / caveolina-1 total  $\pm$  ES. (n=3).



Teniendo en cuenta que las células de Leydig expresan la proteína caveolina-1 y las proteínas de la MEC son capaces de incrementar su grado de fosforilación, nos propusimos estudiar si dicho incremento es mediado por la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas. Para ello, las células de Leydig fueron incubadas en ausencia o en presencia de un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas o con su isotipo control. Luego se analizó por "Western blot" el nivel de fosforilación de la proteína caveolina-1.

La fosforilación de caveolina-1 disminuye en las células de Leydig incubadas con un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas. En cambio, la incubación de las células, con el isotipo control no modificó el grado de fosforilación de esta proteína (figura 39 A y B).



**Figura 39.-** Análisis de la fosforilación de la proteína caveolina-1 en células de Leydig preincubadas con un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta 1$  de la integrina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) o con su isotipo control (IgM) (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV (C-IV, 24  $\mu\text{g/cm}^2$ ) durante 90 minutos. Panel A: Inmunoblot de la proteína caveolina-1, revelado con un anticuerpo dirigido contra la proteína caveolina-1 fosforilada (pCAV) y total (tCAV). Panel B: Análisis densitométrico del Inmunoblot. La densidad óptica se expresa como % de caveolina-1 fosforilada / caveolina total  $\pm$  ES. (n=3).

Estos resultados sugieren que las células de Leydig expresan caveolina-1 y que su fosforilación también puede ser modulada a través de la activación de las integrinas de la subfamilia  $\beta 1$ .

## **6.- Participación de las MEK activadas por el colágeno tipo IV en la modulación de la esteroidogénesis.**

Las evidencias indican que la familia de las proteínas MAPK son un importante punto de convergencia de diversas cascadas de señalización intracelular. En particular, la convergencia entre la vía activada por el AMPc y la vía de señalización de las MAPK no está aún bien dilucidada, pues no se conoce el mecanismo de entrecruzamiento de ambas vías.

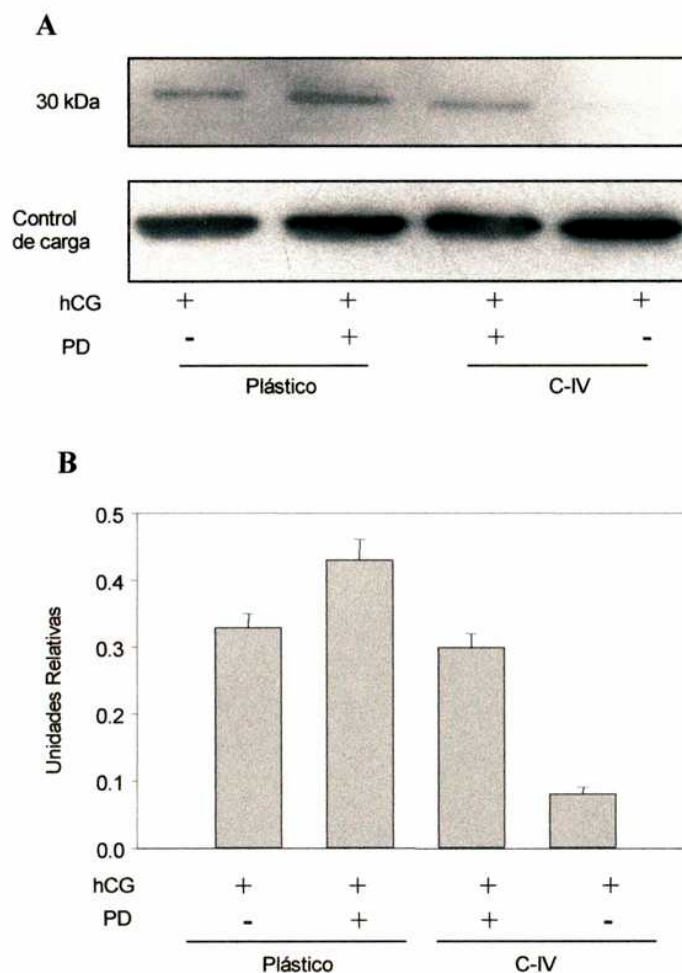
Debido a que hemos demostrado que el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV sobre la producción de testosterona se localizaría en un paso posterior a la producción de AMPc pero anterior a la entrada de colesterol a la membrana interna mitocondrial y que además, el colágeno tipo IV activaría a las proteínas ERK 1-2, nos propusimos determinar la capacidad de las MEK de modular la esteroidogénesis regulando la expresión de la proteína StAR.

### **6.1.- Modulación de la expresión de la proteína StAR por la activación de las MEK**

Con este objetivo, las células de Leydig fueron cultivadas en presencia de hCG (10 ng/ml) o de PD98059 (0,5  $\mu$ M) durante 90 minutos. Luego las células fueron lisadas y determinada por "Western blot", la expresión de la forma madura de la proteína StAR.

En concordancia con los resultados obtenidos en la figura 28, los extractos solubles correspondientes a las células de Leydig cultivadas sobre plástico y estimuladas con hCG, expresan de la proteína StAR. Asimismo, se observa que el grado de expresión de esta proteína, aumenta si el cultivo estimulado con hCG es incubado en presencia de PD98059. El análisis densitométrico indica que el aumento

es aproximadamente del 30 % (figura 40 B). Por otro lado, en el “inmunoblot” correspondiente a los extractos solubles de células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV y estimuladas con hCG muestran una disminución en la expresión de StAR, si se compara con las células cultivadas sobre plástico y estimuladas con esta hormona. El análisis densitométrico indica que esta disminución es de aproximadamente del 80 %, siendo similar el nivel de expresión al observado en las células cultivadas sobre plástico, sin estímulo de hCG. Asimismo, este efecto inhibitorio en la expresión de la proteína StAR, es revertido cuando las células son incubadas en presencia de PD98059 (figura 40 A). En efecto, el análisis densitométrico indica que en estas condiciones, el nivel de expresión es similar al de las células cultivadas sobre plástico y estimuladas con hCG.



**Figura 40.-** Análisis de la expresión de la proteína StAR en células de Leydig cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV ( $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en presencia de hCG ( $10 \text{ ng}/\text{ml}$ ) y/o de PD98059 ( $0,5 \mu\text{M}$ ) durante 90 minutos. Panel A: inmunoblot revelado con un anticuerpo dirigido contra la forma madura de la proteína StAR (30 kDa). Panel B: Análisis densitométrico del inmunoblot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias  $\pm$  ES (n=3).

Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína StAR no sólo es regulada por la vía de señalización del receptor de LH/hCG, sino que en su regulación participan las MAPK, en particular las MEK 1-2. Asimismo, estos resultados nos indican que el colágeno tipo IV es capaz de modular negativamente la expresión de la proteína StAR, a través de la activación de las MEK.

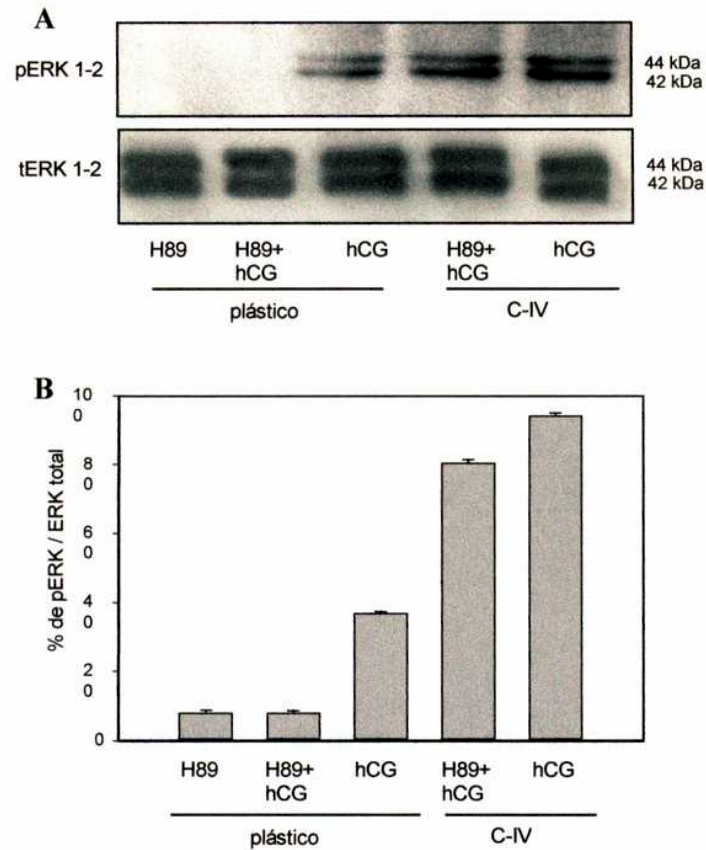
## **6.2.- Determinación del dialogo cruzado ("cross-talk") entre MEK y PKA**

En base a los resultados obtenidos en la figura 33, que muestran que la hCG *per se*, es capaz de estimular la activación de la cascada de señalización de las MEK 1-2, nuestro próximo objetivo fue determinar si PKA sería capaz de activar a la cascada de señalización de las proteínas MEK 1-2.

Para ello, las células de Leydig cultivadas en presencia o ausencia de hCG (10 ng/ml) y de un inhibidor de la actividad de PKA (H89, 10  $\mu$ M) durante 90 minutos, fueron solubilizadas, determinándose por inmunoblot el grado de fosforilación de las proteínas ERK 1-2.

Las células cultivadas sobre plástico e incubadas con H89 no presentaron fosforilación de las proteínas ERK 1-2 (figura 41 A). La estimulación de las células con hCG, induce fosforilación de estas proteínas, la cual es inhibida cuando las células son incubadas en presencia de H89. Por otro lado, las células cultivadas sobre colágeno tipo IV y estimuladas con hCG presentan un importante grado de fosforilación de las proteínas ERK 1-2, el cual disminuye aproximadamente en un 17 %, en presencia de H89 (figura 41 B).





**Figura 41.-** Análisis de la fosforilación de las proteínas ERK 1-2 en células de Leydig cultivadas sobre plástico o colágeno tipo IV (C-IV, 24  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en presencia de hCG (10 ng/ml) y/o de H89 (10  $\mu\text{M}$ ) durante 90 minutos. Panel A: “Inmunoblot” de las proteínas ERK 1-2, revelado con un anticuerpo dirigido contra la proteína ERK 1-2 fosforilada (pERK) y total (tERK). Panel B: Análisis densitométrico del “inmunoblot”. La densidad óptica se expresa como % de ERK fosforilada / ERK total  $\pm$  ES (n=3).

Estos resultados sugieren que si bien el colágeno tipo IV, a través de las integrinas, es el principal responsable de la activación de las proteínas ERK1-2, PKA también interviene en la fosforilación de las mismas, siendo capaz de modular la cascada de señalización de las MAPK en las células de Leydig de rata estimuladas con hCG.

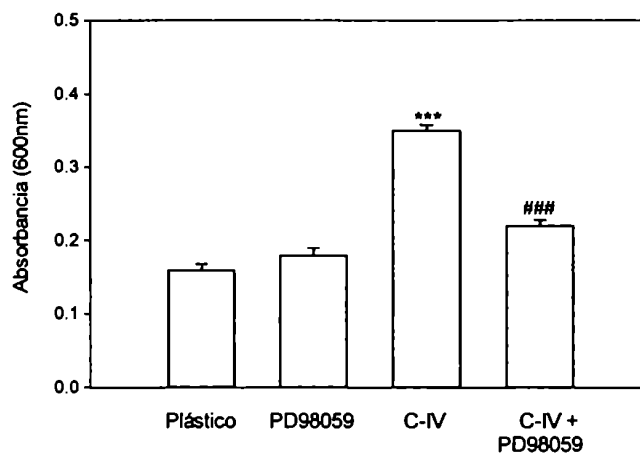
## 7.- Participación de las MEK en las adhesiones focales

Las adhesiones focales son estructuras dinámicas de duración transiente, que se originan por la unión de las integrinas a sus ligandos. Las mismas, tienen la capacidad de desencadenar numerosas señales intracelulares. Más aún, la organización del citoesqueleto es modulada por señales intracelulares como por ejemplo, las activadas por las MAPK.

En base a estos antecedentes y a que en nuestro sistema, el efecto del colágeno tipo IV es independiente de la proteína FAK, aunque dependiente de las proteínas ERK, nos pareció interesante estudiar el efecto de estas proteínas sobre la adhesión de las células de Leydig al colágeno tipo IV.

Para ello, las células de Leydig fueron cultivadas en presencia o ausencia de PD98059 (0,5  $\mu$ M) durante 3 hs. Luego se determinó el grado de adhesión celular.

Cuando las células de Leydig fueron cultivadas sobre colágeno tipo IV se observó un aumento del grado de la adhesión celular que se corresponde con el mostrado en la figura 19 A, el cual fue revertido parcialmente en presencia de PD98059 ( $p < 0,001$ ). La presencia de este inhibidor, no afectó la adhesión de las células de Leydig al plástico (figura 42)



**Figura 42.-** Efecto del PD98059 (0,5  $\mu$ M) sobre la adhesión celular. Las células de Leydig fueron cultivadas sobre plástico (control) o sobre colágeno tipo IV (C-IV, 24  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) durante 3 hs. Las barras representan la media  $\pm$  ES, n=21, de 3 experimentos. Los datos fueron evaluados por ANOVA de un factor, seguido del test de Student-Newman-Keuls. \*\*\* $p < 0,001$  vs células de Leydig cultivadas sobre plástico, ###  $p < 0,001$  vs células cultivadas sobre colágeno tipo IV.

Estos resultados sugieren que las proteínas ERK 1-2 estarían participando en la adhesión celular desencadenada por las integrinas.

***Discusión***



## Discusión

Está ampliamente aceptado que las proteínas de la MEC intervienen en la regulación de la diferenciación, morfogénesis, proliferación y migración celular. La mayor parte de las interacciones célula-MEC están mediadas por las integrinas, las cuales regulan a su vez, la reorganización del citoesqueleto, el transporte intracelular de iones, el metabolismo de los lípidos, la activación de quinasas y la expresión génica. Asimismo, en la última década se ha demostrado que las integrinas ejercen un papel importante en los procesos reproductivos, incluyendo la fertilización, implantación y embriogénesis.

En el testículo, la regulación de distintos procesos como el desarrollo, la diferenciación y la esteroidogénesis de las células de Leydig, depende de la acción concertada de las hormonas gonadotróficas y de una gran variedad de factores producidos de manera autocrina o paracrina. A pesar de lo mencionado en el párrafo anterior, son pocos los estudios realizados que intentan dilucidar el papel que ejercen las proteínas de la MEC sobre la funcionalidad de las células de Leydig. Por este motivo, el objetivo de esta tesis fue estudiar la influencia de las proteínas de la MEC sobre la adhesión y la morfología celular, la expresión de integrinas y la esteroidogénesis de las células de Leydig de la rata adulta.

➤ **Influencia de las proteínas de la MEC sobre la morfología y adhesión de las células de Leydig**

Nuestros resultados demuestran que las células de Leydig presentan un mayor grado de adhesión celular cuando son cultivadas sobre fibronectina, laminina-1 y colágeno tipo IV que cuando son cultivadas sobre plástico. Este fenómeno, ocurre en condiciones basales o post-estimulación con hCG. Estos resultados coinciden con los descritos por Kmicikiewicz y col. [1998], quienes observaron que las células de Leydig de ratón cultivadas sobre perlas recubiertas con fibronectina o colágeno tipo IV, presentaban un aumento en la adhesión celular respecto de las células cultivadas sobre

perlas sin recubrir. Dichos autores, observaron a su vez, un mayor grado de adhesión de las células de Leydig estimuladas con LH, respecto a las células cultivadas en condiciones basales. Sin embargo, esas conclusiones fueron alcanzadas a través de estudios cualitativos y no cuantitativos. Además, debemos considerar que el estudio desarrollado por estos autores fue realizado en otra especie y utilizando tiempos de cultivo diferentes a los empleados en nuestros estudios. Vernon y col. [1991] estudiaron algunas características de la adhesión de las células de Leydig de ratón a varias proteínas de la MEC. Dichos autores enfocaron sus estudios a determinar la “fuerza” de la adhesión de las células al sustrato, definida como la resistencia de las células al desplazamiento inducido por un flujo y concluyeron que las células se adhieren con mayor firmeza al colágeno tipo IV, a la fibronectina o a la laminina-1. En nuestras condiciones experimentales y utilizando métodos cuantitativos, observamos que el comportamiento de las células de Leydig varía según el sustrato al que se adhieren. En este trabajo, demostramos que el grado de adhesión de las células cultivadas sobre laminina-1 o colágeno tipo IV correlaciona en forma lineal con la concentración creciente de estas proteínas, mientras que esta relación no se observó en las células de Leydig cultivadas sobre fibronectina (figura 19).

Por otro lado, observamos que la laminina-1, la fibronectina y el colágeno tipo IV, utilizados como sustrato, inducen cambios en la morfología de las células de Leydig, estimulando la formación de prolongaciones citoplasmáticas, siendo escasas a las 3 hs y mucho más abundantes a las 24 hs. Este fenómeno llamado “spreading” es casi inexistente en las células cultivadas sobre microplacas de plástico (sin recubrir) a las 3 hs de cultivo y es escaso a las 24 hs. (figura 17). Esos resultados son similares a los obtenidos por Vernon y col. [1991] quienes describen un menor grado prolongaciones citoplasmáticas (“spreading”) en las células cultivadas sobre plástico que en aquellas cultivadas sobre finas capas de colágeno tipo IV.

**Estos resultados nos permiten concluir que las proteínas de la MEC pueden modular la adhesión y la diferenciación de las células de Leydig de rata in vitro.** El mecanismo por el cual las proteínas de la MEC modifican la forma celular e inducen una unión más firme al sustrato, involucra la reorganización del citoesqueleto a

través de la subfamilia  $\beta_1$  de las integrinas, receptores específicos de las proteínas de la MEC. [Hynes, 1992; Aumailley y Garuad, 1998].

➤ **Expresión de las subunidades de integrinas en células de Leydig**

Nosotros demostramos que las células de Leydig cultivadas sobre laminina-1 presentan una alta expresión de la subunidad  $\alpha_3$  de la integrina  $\alpha_3\beta_1$  comparada con las células de Leydig cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio sin cubrir, confirmando resultados previos Denduchis y col. [1996]. Por otra parte, en el presente trabajo, también demostramos que las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV o fibronectina presentan un aumento en la expresión de las subunidades  $\alpha_3$  y  $\beta_1$  de la integrina comparada con las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio sin cubrir. Kikkawa y col., [2000] demostraron que la integrina  $\alpha_3\beta_1$  se une con mayor afinidad a la cadena  $\alpha_5$  de la laminina, componente de las lamininas 10 y 11. Por otra parte, Frojzman y col. [1999] detectaron la presencia de la cadena  $\alpha_5$  de la laminina en la membrana basal de los túbulos seminíferos del testículo de rata. La intensa expresión de la subunidad  $\alpha_3$  de la integrina en las células de Leydig observada en este estudio, sugiere que la cadena  $\alpha_5$  de la laminina puede estar formando parte de la MEC que rodea a las células de Leydig de rata. Además, demostramos que las células de Leydig de rata adulta cultivadas sobre fibronectina, expresan la subunidad  $\alpha_5$  de las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$ . Similares resultados fueron observados en células de Leydig de rata inmaduras cultivadas sobre fibronectina [Wu y col., 1996].

**Estos resultados sugieren que las distintas proteínas de la MEC son capaces de inducir la expresión de diferentes integrinas sobre la superficie celular.**

➤ **Influencia de las proteínas de la MEC sobre la función celular**

La influencia de las proteínas de la MEC sobre la función celular ha sido ampliamente descrita [Getzenberg y col., 1990]. En el testículo, Dym [1994] demostró que los componentes de la membrana basal, junto con factores de crecimiento y hormonas, modulan la funcionalidad de las células de Sertoli, evaluando el contenido de

AMPC. Otros trabajos han descripto que las proteínas de la MEC, utilizadas como sustrato, estimulan la secreción de la ABP (“androgen binding protein”) y de la transferrina en las células de Sertoli de rata prepuberes. [Mather y col., 1984; Hadley y col., 1985].

Por otro lado, también ha sido demostrado que varias hormonas pueden modular la síntesis de diferentes componentes de la MEC. En cultivos de células de Sertoli de rata prepuberales, se observó que la hormona tiroidea estimula la producción de entactina e inhibe la síntesis de colágeno tipo IV [Ulisse y col., 1994]. A su vez, ratas hipotiroideas, tratadas con propiltiouracilo, muestran un retraso en la maduración de la membrana basal de los túbulos seminíferos [Loveland y col., 1998]. De modo similar, Salanova y col. [1998] demostraron que las células de Sertoli de ratas prepuberes, necesitan el estímulo de FSH para desarrollar sus especializaciones ectoplasmáticas y expresar la integrina  $\alpha_6\beta_1$  en su superficie celular.

También ha sido demostrado, el efecto de las proteínas de la MEC sobre la función endocrina en diferentes tejido. Fujiwara y col. [1997] observaron una inhibición en la producción de progesterona cuando las células de la granulosa humanas eran cultivadas sobre laminina, tanto en condiciones basales como estimuladas con hCG. Además, describieron que la incubación de las células de la granulosa con un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\alpha_6$  de la integrina  $\alpha_6\beta_1$  es capaz de revertir el efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona, por lo cual, los autores han concluido que esa inhibición es inducida a través de la integrina  $\alpha_6\beta_1$ . Por otro lado, Tam y col. [1998] estudiaron el efecto de la interacción célula-MEC sobre la unión de la hormona paratiroidea a su receptor en líneas celulares obtenidas del túbulo renal proximal y de osteoblastos. Los autores demuestran que en ambos tipos celulares, el colágeno tipo IV induce un efecto inhibitorio sobre dicha unión. Nosotros hemos descripto previamente, en células de la pituitaria de rata, el efecto inhibitorio de la laminina-1 sobre la producción de prolactina [Denduchis y col., 1994] y del colágeno tipo IV [Diaz y col., 2002].

En cuanto a las células de Leydig, existen pocos trabajos previos en los que se ha demostrado el efecto que las proteínas de la MEC tienen sobre la función esteroideogénica. McFarlane y col. [1996], demostraron que la adición de heparina (un

glicosaminoglicano soluble) a cultivos de células de Leydig de rata, es capaz de inhibir la producción de testosterona de manera dosis dependiente cuando son estimuladas con LH. En este mismo trabajo, los autores demuestran que la inhibición de la sulfatación de los glicosaminoglicanos, induce una inhibición en la producción de testosterona, sugiriendo que el heparan sulfato proteoglicano modula la producción de esta hormona en dichas células. Grudet y col. [1999] también estudiaron el efecto de los proteoglicanos sobre la síntesis de testosterona en cultivos de células de Leydig de ratas adultas, describiendo que la inhibición de la síntesis de proteoglicanos induce un aumento de la esteroidogénesis de células de Leydig maduras cuando son estimuladas con concentraciones subsaturantes de hCG, sugiriendo que los proteoglicanos ejercen una regulación autocrina negativa sobre la síntesis de testosterona.

**En el presente trabajo, demostramos que el colágeno tipo IV y la fibronectina inhiben la producción de testosterona de las células de Leydig de rata adulta, tanto en condiciones basales como estimuladas con hCG.** Asimismo, observamos que este fenómeno no se debe a un efecto citotóxico de las proteínas de la MEC, ya que las células de Leydig cultivadas sobre dichas proteínas no presentan diferencias significativas en la viabilidad celular comparándolas con las células cultivadas sobre plástico. Contrariamente, Kmicikiewicz y col. [1998], observaron un leve aumento en la producción de testosterona, por parte de las células de Leydig cultivadas sobre perlas (“microcarriers”) cubiertas con colágeno tipo IV o fibronectina, en condiciones basales y estimuladas con LH. Sin embargo, es destacable la baja respuesta en la producción de testosterona al estímulo de LH que presentan las células de Leydig cultivadas sobre las perlas sin recubrir. Esto, nos plantea la duda del estado fisiológico de las células cultivadas en estas condiciones.

En base a estudios previos, se ha sugerido que existe una relación entre la forma celular y la capacidad esteroidogénica. Gutierrez y col. [1997] han demostrado que las células de la granulosa bovina, cultivadas en medio libre de suero, presentan una forma redondeada. En esta condición las células secretan más estradiol que las cultivadas en un medio con suero, hecho que coincide con las formas que tienen las células de la granulosa bovina, las cuales son claramente aplanadas. Además, Ben-Rafael [1988] y Bussenot y col. [1993] observaron que las células de la granulosa

cultivadas sobre una matriz de colágeno presentan una forma redondeada y secretan más estradiol. En otros tipos celulares, también se ha estudiado la participación de los elementos del citoesqueleto en la producción de hormonas esteroideas [Almahbobi, 1995 y Hall y Almahbobi, 1997]. En este último trabajo, los autores sugieren que el citoesqueleto está principalmente involucrado en el proceso de translocación de moléculas entre las organelas celulares. En particular, en las células de Leydig, también se han realizado varias observaciones al respecto. Más recientemente, Bilinska y col. [1999] demostraron la participación del citoesqueleto en la biosíntesis de andrógenos en células de Leydig de ratones campestres. Ellos observaron que el tratamiento con hCG, induce un reordenamiento de los microtúbulos y de los filamentos de actina, fenómeno que es acompañado por un aumento en la secreción de andrógenos.

**En base a estos antecedentes, el efecto de las proteínas de la MEC sobre la producción de testosterona, demostrado en el presente trabajo, podría estar relacionado a cambios en el citoesqueleto, ya que nosotros observamos la formación de numerosas prolongaciones citoplasmáticas (“spreading”) en la mayor parte de las células de Leydig cultivadas sobre proteínas de la MEC. Dicho fenómeno fue similar en las células de Leydig cultivadas sobre laminina-1, colágeno tipo IV o fibronectina. Sin embargo, las distintas proteínas de la MEC regulan la producción de testosterona de manera diferente, sugiriendo una disociación entre los efectos inducidos sobre la forma celular y la capacidad esteroidogénica. Similares observaciones han sido descritas por Huet y col. [2001] en células de la granulosa ovina. Ha sido sugerido que algunas integrinas están involucradas en forma directa en la activación de señales intracelulares, mientras que otras como la  $\alpha 3\beta 1$ , necesitan asociarse a otras integrinas formando complejos con capacidad de transducir señales [Kreidberg, 2000]. Los diferentes patrones de expresión de las subunidades de integrinas observados en las células de Leydig cultivadas sobre laminina-1, colágeno tipo IV o fibronectina, podrían explicar los diferentes comportamientos observados.**

➤ **Análisis del mecanismo de acción de las proteínas de la MEC sobre la producción de testosterona de las células de Leydig**

Nuestros resultados demuestran que el colágeno tipo IV y la fibronectina ejercen un efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona en las células de Leydig de rata; por tal motivo, decidimos estudiar a que nivel de la esteroidogénesis estas proteínas inducen dicho efecto.

Lo primero que analizamos fue el efecto de laminina-1, colágeno tipo IV o fibronectina sobre la unión específica de la hCG al receptor de LH/hCG. En líneas celulares del túbulo renal proximal y de osteoblastos, se ha demostrado que el colágeno tipo IV inhibe la respuesta biológica de la hormona paratiroidea, interfiriendo con la unión de ésta a su receptor [Tam y col., 1998]. Si bien, el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV y la fibronectina, lo observamos en células de Leydig cultivadas en condiciones basales y estimuladas con hCG, no descartamos la posibilidad de que en condiciones de estimulación con hCG, la inhibición de la esteroidogénesis, se indujera a distinto nivel que en las células cultivadas en condiciones basales. No observamos cambios significativos en la unión de la hCG al receptor de LH/hCG tanto en células cultivadas sobre proteínas de la MEC como en las cultivadas sobre plástico. **Estos resultados demuestran que la inhibición de la producción de testosterona en las células cultivadas sobre colágeno tipo IV o fibronectina y estimuladas con hCG, no ocurriría por una reducción en el número de receptores ni por la interferencia en la unión de la hCG al receptor de LH/hCG.** Estos datos están en concordancia con los descritos por Mc Farlane y col. [1996] quienes estudiaron el efecto del heparan sulfato proteoglicano, sobre la modulación de la producción de testosterona en células de Leydig de rata adulta. Demostraron que al bloquear la sulfatación de los glicosaminoglicanos recién sintetizados, se inhibe la producción de testosterona, y que este efecto no se debe a una falla en la unión de la LH a su receptor.

Dado que el AMPc es el segundo mensajero en la transducción de la señal generada por la LH, decidimos estudiar el efecto de las proteínas de la MEC sobre la producción de AMPc, analizando los niveles de AMPc extracelular. **Nuestros resultados muestran que en las células de Leydig estimuladas con hCG, la**

**inhibición en la producción de testosterona está acompañada de una disminución en la liberación de AMPc.** Esta reducción, podría deberse a un aumento del catabolismo del AMPc. Phamantu y col. [1999], han demostrado en células de Sertoli provenientes de ratas inmaduras que los proteoglicanos ejercen una acción inhibitoria sobre la producción de estradiol, regulando la actividad de la fosfodiesterasa. En nuestro sistema, esta posibilidad fue descartada, pues la inhibición inducida por el colágeno tipo IV se observa aún en presencia de IBMX, un potente inhibidor de la actividad de la fosfodiesterasa. Nuestros resultados están en concordancia con los presentados por Marinero y col. [1996], quienes demostraron que el ácido araquidónico induce un efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona en las células de Leydig, y que el mismo no es debido a un aumento en la actividad de la fosfodiesterasa.

Nosotros no observamos diferencias significativas en los niveles de AMPc extracelular en las células de Leydig cultivadas en condiciones basales con respecto a las estimuladas con hCG. Este resultado, puede deberse a que el método utilizado para medir AMPc no posea la sensibilidad suficiente, o a que en condiciones experimentales, la disminución de los niveles de AMPc son transcientes. En células vasculares de músculo liso incubadas con colágeno I soluble, ha sido demostrada una disminución transciente de la producción de AMPc a los 10 minutos de incubación, fenómeno que se revierte a los 40 minutos. Sin embargo, esta disminución transciente de AMPc es capaz de inducir inhibición en la producción de testosterona [Wang y col., 1999]. Es posible que, en nuestro modelo, esté operando un mecanismo similar, no detectándose ningún cambio en la producción de AMPc, pero si, una inhibición en la producción de testosterona. Faucheux y col, [2000], estudiaron la producción de AMPc en células 3T3 (línea celular de fibroblastos de ratón) adheridas a vitronectina o fibronectina, y observaron una inhibición en la producción de AMPc acompañada de una disminución de la agregación celular. Contrariamente, Dym y col, [1991] han demostrado en células de Sertoli estimuladas con FSH, que la laminina-1 y el Matrigel ( extracto de membrana basal), inducen un aumento en la producción de AMPc.

Considerando que el colágeno tipo IV y la fibronectina inhiben la producción de AMPc, y teniendo como objetivo determinar a que nivel de la esteroidogénesis estas proteínas ejercen su efecto inhibitorio, se estimuló a las células de Leydig con 8 Br-



AMP, un análogo permeable y no hidrolizable del AMPc. En nuestro sistema, el 8 Br AMPc no fue capaz de revertir la inhibición de la producción de testosterona, sugiriendo que el efecto del colágeno tipo IV y la fibronectina ocurre en una etapa posterior a la síntesis del AMPc. Mc Farlane y col, [1996], describieron un fenómeno similar cuando bloquean la sulfatación de la nueva síntesis de glicosaminoglicanos en cultivo de células de Leydig. En otros tipos celulares se han descrito efectos similares, en células del estroma de endometrio humano, por ejemplo, se demostró que tanto la IL-1 como la laminina son capaces de inhibir la producción de prolactina y que este efecto es posterior a la producción de AMPc [Mizuno y col., 1999]. En células de la teca de bovinos cultivadas sobre colágeno I en presencia de 8 Br-AMPc, también se observó una inhibición en la producción de estradiol [Ikeda y col., 1990].

Teniendo en cuenta que el efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona inducido por el colágeno tipo IV o la fibronectina es posterior a la producción de AMPc, evaluamos si la conversión de colesterol a testosterona podría ser afectada, por las proteínas de la MEC. En las células de Leydig de rata, la conversión de colesterol a testosterona involucra 4 pasos enzimáticos: 1) P450<sub>scc</sub>, que convierte el colesterol en pregnenolona; 2) 3 $\beta$ -HSD, que convierte pregnenolona en progesterona; 3) P450<sub>c17</sub>, que convierte progesterona en androstenediona y 4) la 17 $\beta$ -HSD, que convierte androstenediona en testosterona. En nuestro modelo, demostramos que en las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV o fibronectina no se modifica la producción de testosterona en presencia de los distintos sustratos específicos para cada paso enzimático: 22(R)-OH-colesterol, pregnenolona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona o  $\Delta^4$  androstenediona. Estos resultados sugieren que las proteínas de la MEC ejercen su efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona a través de un mecanismo que no involucra la alteración de la actividad de las enzimas esteroideogénicas. Contrariamente, Vernon y col. [1991] y Kmicikiewicz y col [1998] observaron en células de Leydig de ratón, que las proteínas de la MEC inducen un aumento en la actividad de las enzimas 3 $\beta$ -HSD. La discrepancia entre nuestros resultados y los obtenidos por estos autores, puede deberse a que, los estudios fueron realizados en distintas condiciones experimentales y en otra especie animal.

Nuestros resultados demuestran que el efecto inhibitorio de la esteroidogénesis inducido por el colágeno tipo IV y la fibronectina ocurre en una etapa posterior a la producción de AMPc y anterior a la entrada de colesterol a la membrana mitocondrial interna. Esto nos sugirió que la interacción proteínas de la MEC-integrinas, sería capaz de modular la fosforilación o desfosforilación de proteínas regulando, de esa manera, la esteroidogénesis de las células de Leydig.

El estímulo de las células esteroidogénicas es dependiente de la activación, de la adenilil ciclasa, a través de su receptor, con el consiguiente incremento en la producción de AMPc intracelular, que induce la activación de la PKA [Stocco y Clark, 1996]. La activación de PKA estimula a su vez, una rápida movilización del colesterol almacenado en la membrana mitocondrial externa promoviendo su transporte a la membrana interna de la mitocondria. Este último transporte es la etapa limitante en la síntesis de esteroides, y por lo tanto regula la secreción de hormonas esteroideas [Christenson y Strauss, 2000]. Está claramente aceptado que la proteína StAR es esencial para el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna y que la expresión de dicha proteína es la llave reguladora en el proceso de síntesis de esteroides [Stocco y Clark, 1996; Stocco, 2000]. Si bien, no hay evidencias en la bibliografía que demuestren que una proteína de la MEC, utilizada como sustrato, sea capaz de regular la expresión de la proteína StAR, de manera directa o indirecta, nuestros resultados demuestran que las células de Leydig cultivadas sobre plástico y estimuladas con hCG, expresan la proteína StAR, mientras que dicha expresión está inhibida si las células de Leydig son cultivadas sobre colágeno tipo IV (figura 40). Demostramos que el colágeno tipo IV es capaz de modular negativamente la expresión de la proteína StAR, lo que sugiere que las señales intracelulares gatilladas por estímulos extracelulares, también participarían en la regulación de dicha proteína. Nuestros resultados también demuestran que la laminina-1 no modula la producción de testosterona. Esto sugeriría que la laminina-1 no es capaz de regular la expresión de la proteína StAR al interactuar con integrinas diferentes a las involucradas en la unión al colágeno tipo IV, lo que activaría distintas señales intracelulares. Esta es sólo una hipótesis de trabajo que será desarrollada en el futuro. Hemos observado que las células de Leydig cultivadas sobre plástico, en condiciones basales, expresaron la proteína StAR. Este resultado nos hace

suponer que la técnica de “Western blot” no es lo suficientemente sensible para detectar expresiones muy bajas de la proteína StAR., como las que se encontrarían en las condiciones mencionadas anteriormente.

Los resultados obtenidos hasta aquí nos demuestran que **el colágeno tipo IV, utilizado como sustrato, es capaz de modular la expresión de la proteína StAR, pudiendo ser éste, el mecanismo por el cual el colágeno tipo IV inhibe la producción de testosterona de las células de Leydig.**

➤ **Estudio de algunas de las vías de señalización intracelular activadas por el colágeno tipo IV**

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió analizar alguna de las vías de señalización intracelular activadas por el colágeno tipo IV, que pudiesen regular negativamente la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata. Es sabido que las integrinas desencadenan señales intracelulares a través de la activación de proteínas tirosina quinasas [Aplin y col., 1998]. En nuestro sistema, observamos que el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata es revertido cuando las células son cultivadas en presencia de 0,5 $\mu$ M de genisteína, un potente inhibidor de la actividad tirosina quinasa. Esto indica que el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV estaría mediado por tirosina quinasas. En la literatura, existen evidencias de la participación de las proteínas tirosina quinasas en la regulación de la esteroidogénesis. Ha sido demostrado que la prolactina ejerce una acción inhibitoria sobre la aromatización de las células de la granulosa inducida por FSH y que esta acción está mediada por tirosina quinasas, ya que la incubación de estas células con genisteína revierte el efecto inhibitorio de la prolactina [Villanueva y col., 1996]. Más aún, Makarevich y col. [1997] demostraron que en animales domésticos la inhibición de las proteínas tirosina quinasas induce un efecto estimulador en los procesos endocrinos, de maduración y diferenciación celular. Estos autores demostraron que la genisteína estimula la secreción de progesterona en células de la granulosa bovina, así como también la liberación de estradiol en folículos ováricos de porcino y en células de la granulosa de conejo. En contraste, otros autores han descrito un efecto inhibitorio de la

genisteína sobre la esteroidogénesis. Whitehead y Lacey [2000], observaron que la genisteína y la lavendustina A ejercen un efecto inhibitorio sobre la respuesta esteroidogénica de las células de la granulosa de rata inducida por FSH y forskolina (un estimulador de la adenilil ciclasa). En las células de la granulosa de rata inmaduras y estimuladas con FSH, se observó que la genisteína y RG 50810 (otro inhibidor de las proteínas tirosina quinasas) inhiben la producción de progesterona y estradiol. Estos efectos fueron obtenidos sólo con concentraciones mayores a 10  $\mu\text{M}$ , pues a las concentraciones de 0,1-3  $\mu\text{M}$ , la respuesta de progesterona fue estimulada [Haynes-Johnson y col., 1999]. Los efectos contrastantes descritos para los inhibidores de las proteínas tirosina quinasas, pueden deberse a diferencias en las concentraciones de genisteína utilizadas, al grado de maduración y diferenciación de las células y a la variedad de especies estudiadas.

En nuestro modelo, analizamos la actividad tirosina quinasa en las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV en condiciones basales y estimuladas con hCG. **Nuestros resultados demuestran que el colágeno tipo IV estimula la fosforilación de proteínas en tirosina y que la hCG per se, también estimula dicha fosforilación.** El efecto de la genisteína sobre la fosforilación de las proteínas en tirosina, no fue total, debido quizás, a que la concentración de genisteína utilizada fue insuficiente para bloquear completamente la actividad de las tirosina quinasas, aunque suficiente para bloquear la acción de las mismas sobre la esteroidogénesis.

Las integrinas a través de las proteínas tirosina quinasas, activan una gran variedad de señales intracelulares; una de las principales, es la activación de la cascada Raf/MEK/ERK, perteneciente a la vía de las MAPK. En nuestro sistema, **demostramos que el colágeno tipo IV utilizado como sustrato, estimula la fosforilación de las proteínas ERK 1-2 en las células de Leydig en condiciones basales y estimuladas con hCG.** En ambas condiciones, dicha estimulación es inhibida en presencia de genisteína. Estos resultados están en concordancia con los datos descritos en la literatura, que indican que la cascada de las proteínas Raf/MEK/ERK puede activarse tanto por serina/treonina quinasas como por tirosina quinasas [Kolch, 2000, Peyssonnaud y Eychene, 2001].

Existen evidencias que sugieren que la cascada de las MAPK está involucrada en la regulación de la esteroidogénesis, aunque también, se han descrito algunos resultados contradictorios. Se ha demostrado que en células de la granulosa porcina, las hormonas LH y FSH activan a las proteínas ERK1-2 aumentando la producción de esteroides [Cameron y col., 1996]. Del mismo modo Dewi y col. [2002] observaron en células de la granulosa humanas, que la activación de las proteínas ERK 1-2 está asociada a un aumento en la producción de esteroides. Por otro lado, en cultivos de células de Sertoli sobre plástico, se demostró que la FSH es capaz de inhibir la expresión de ERK 1-2 de manera dependiente de AMPc, por lo que dicha inhibición requiere de la actividad de tirosina fosfatasas [Crepieux y col., 2002]. Sin embargo, en 2 líneas de células de la granulosa de rata (rLHR-4 y rFSHR-17), la activación de las proteínas ERK 1-2 ha sido asociada con la inhibición de la esteroidogénesis inducida por gonadotrofinas [Seger y col., 2001]. Nuestros resultados demuestran que el efecto inhibitorio del colágeno tipo IV sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig se revierte cuando las mismas son incubadas en presencia de PD98059, un inhibidor de la actividad de las proteínas MEK 1-2, y por lo tanto inactivador de las proteínas ERK 1-2. **Estos resultados nos sugieren que en las células de Leydig de rata, el colágeno tipo IV ejerce su acción inhibitoria sobre la esteroidogénesis a través de la activación de la cascada Raf/MEK/ERK.** Las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores, puede deberse a la existencia de múltiples cascadas de transducción de señales acopladas a los receptores celulares, como así también a que las respuestas pueden ser diferentes en distintas especies o entre líneas celulares y cultivos primarios.

Asimismo, **demostramos que la activación de las proteínas ERK 1-2, inducida por el colágeno tipo IV se desencadena a través de las integrinas,** debido a que cuando incubamos a las células de Leydig en presencia de un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas, observamos una reversión parcial en el grado de fosforilación de estas proteínas. Actualmente hay descritas 5 integrinas que interaccionan con el colágeno, las  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  son las más caracterizadas hasta el momento, poco se sabe de las  $\alpha 10\beta 1$  y  $\alpha 11\beta 11$ , las cuales fueron descritas originalmente en condrocitos y en células musculares fetales, respectivamente y la  $\alpha 3\beta 1$  que puede funcionar como un receptor de colaboración [Tulla y col., 2001]. Existen

evidencias de que las integrinas receptoras de colágeno modulan la activación de las proteínas ERK 1-2. Kagami y col. [2001] demostraron que la remodelación de la matriz de colágeno I en las células del mesangio de rata, está mediada por la integrina  $\alpha 1\beta 1$ , la cual ejerce su acción, a través de las proteínas ERK 1-2. En contraste, Paine y col. [2000], demostraron en una línea de carcinoma mamario humano, que la adhesión de estas células al colágeno tipo IV activa a la proteína p38, otra vía de la cascada de las MAPKs. Estos autores no detectan la integrina a través de la cual ocurre la interacción con el colágeno tipo IV. Estas distintas vías de señalización pueden deberse a los distintos tipos celulares o líneas celulares estudiadas y a los distintos tipos de colágenos y receptores específicos. Datos de la bibliografía sugieren que la integrina  $\alpha 1\beta 1$  es el principal receptor del colágeno tipo IV, mientras que la integrina  $\alpha 2\beta 1$  sería el receptor más específico para el colágeno I [Kern y col., 1993; Kern y Marcantonio, 1998]; demostrándose que dichas integrinas desencadenan señales intracelulares distintas. Wary y col. [1998] demostraron que la integrina  $\alpha 1\beta 1$  regula la actividad de las proteínas ERK, mientras que la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , no es capaz de activar esa cascada, pero si en cambio, la cascada de la p38 $\alpha$  ( isoforma de la proteína p38) [Ivaska y col., 1999]. **Nuestros datos y los obtenidos por otros autores nos sugieren que el colágeno tipo IV podría ejercer su efecto inhibitorio interaccionando con la integrina  $\alpha 1\beta 1$ .**

Las integrinas tienen la capacidad de activar, la vía de señalización de las MAPK a través de varios mecanismos [Juliano, 2002]. La activación de estos mecanismos dependería del tipo celular en el cual se desencadena la respuesta. En este trabajo, observamos que en las células de Leydig de rata adulta cultivadas sobre colágeno tipo IV está estimulada la fosforilación de FAK y la activación de las proteínas ERK1-2. Por otra parte, demostramos que la activación de la cascada de Raf/MEK/ERK se desencadena de manera independiente de la fosforilación de la proteína FAK. Es posible que la activación de la proteína FAK y la cascada de las MAPKs, mediada por las integrinas, ocurra por distintos caminos. Uno de ellos sería a través de la activación de la proteína Ras, en forma dependiente o independiente de la proteína FAK. [Mainiero, y col., 1995; Wary y col., 1996; Lin y col.,1997]. Si bien Barberis y col [2000] sugirieron que en las líneas celulares el mecanismo que predomina en la activación de las proteínas ERK 1-2 es el dependiente de la proteína FAK, y que en

cultivos primarios de células, la activación de estas proteínas se desarrolla principalmente a través de un mecanismo independiente FAK, aunque los resultados en la bibliografía no son aún concluyentes. Lin y col. [1997], demostraron que en la línea celular de fibroblastos, NIH 3T3, las integrinas activan a las MAPKs a través de un mecanismo independiente de FAK. Más aún, se ha demostrado que la adhesión de condrocitos humanos a un fragmento amino-terminal de la fibronectina, utilizada como sustrato, es mediada por la activación de FAK y MAPK [Gemba y col., 2002].

Otra posibilidad es que el sustrato al cual se adhieren las células, sea el que induce el mecanismo de activación de las MAPK. Sanders y Basson, [2000], demostraron que en las células Caco-2, una línea celular del epitelio intestinal humano, cultivada sobre colágeno tipo IV, se activan las proteínas ERK 1-2, fenómeno que no ocurre si las mismas células son cultivadas sobre fibronectina. No podemos descartar que en nuestro modelo en el cual la esteroidogénesis es modulada de manera diferente según el sustrato sobre el cual se adhieran las células de Leydig de rata no ocurra un mecanismo similar.

Otra causa posible es que la activación de las MAPK sea un evento que preceda la activación de FAK. Ha sido sugerido que la activación de la cascada de las MAPK es un evento temprano y transiente, mientras que la activación de FAK ocurre concomitantemente con el comienzo de la formación de las prolongaciones citoplasmáticas (“spreading”), y que es un fenómeno más persistente [Lin y col., 1997; Aplin y col., 1998]. Recientemente ha sido demostrado que la dimerización de FAK es suficiente para la fosforilación de esta proteína, pero que se necesita un alto grado de agregación y organización de las proteínas del citoesqueleto, a nivel de la membrana celular, para que esta proteína desencadene eventos intracelulares [Katz y col., 2002]. En nuestros estudios, detectamos las isoformas fosforiladas de las proteínas FAK y ERK 1-2 a los 90 minutos de incubación. Se debería estudiar el curso temporal de la fosforilación de estas proteínas para comprobar si el fenómeno mencionado ocurre en nuestro modelo. Cabe destacar que si bien ambas proteínas pueden ser activadas por las proteínas de la MEC, interactuando con la misma integrina, no necesariamente tienen que activar los mismos eventos intracelulares.

Se ha sugerido que la interacción de la proteína caveolina con las integrinas, sería la responsable de desencadenar el mecanismo de activación de la cascada de las MAPK independiente de la proteína FAK [Wary y col., 1996; Park y col., 2000]. Existen evidencias que indican que la proteína caveolina-1 se expresa en células germinales y espermatozoides de ratón y cobayo [Travis y col., 2001]. Nosotros demostramos que la proteína caveolina-1 se expresa en las células de Leydig de rata adulta, que se encuentra fosforilada y que el grado de fosforilación de la misma aumenta cuando las células son cultivadas sobre proteínas de la matriz extracelular. **Más aún, demostramos que la fosforilación de la proteína caveolina-1 inducida por el colágeno tipo IV, es modulada por las integrinas de la subfamilia  $\beta 1$ . Este hallazgo, sumado al hecho de que la activación de las proteínas ERK 1-2 es independiente de la activación de FAK, nos permite sugerir que la activación de la cascada RAF/MEK/ERK inducida por el colágeno tipo IV, estaría mediada por la interacción de las integrinas de la subfamilia  $\beta 1$  y la caveolina-1 en las células de Leydig de rata adulta.** Actualmente no está completamente dilucidado con cual de las subunidades de las integrinas interacciona la proteína caveolina. Existen evidencias que sugieren que la caveolina interaccionaría con la subunidad  $\alpha$ . Wary y col. [1998] demostraron que es necesario el dominio transmembrana de la subunidad  $\alpha 5$  de la integrina para coinmunoprecipitar la caveolina con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Sin embargo, ha sido demostrado en células del músculo liso que la caveolina colocaliza y forma agregados con la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas [Wei y col., 1999].

Por otro lado, ha sido analizado el papel modulador de la caveolina sobre los efectos intracelulares desencadenados por los receptores de hormonas esteroideas. Razandi y col. [2002]. Estos autores han observado que los receptores de membrana de los estrógenos se asocian con la proteína caveolina en forma diferente según el tipo celular, sugiriendo que esto podría ser una de las causas de las distintas acciones de los estrógenos en los diferentes tipos celulares. Los mismos autores, demostraron que el receptor de estrógenos coinmunoprecipita con las proteínas caveolina -1 y 2 en células de músculo liso provenientes de la pared vascular humana y en una línea celular de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7). Sin embargo, observaron que los estrógenos inducen la síntesis de caveolina-1 y la estimulan en las células de músculo



liso pero no en la línea celular MFC-7. Lu y col. [2001] demostraron que la caveolina-1 interacciona, con el receptor de andrógenos y que esta interacción es dependiente de los andrógenos. Asimismo, demostraron que la sobreexpresión de caveolina-1 induce un aumento en la transcripción del receptor, con la consiguiente desensibilización de la señal del receptor de andrógenos, ya que disminuye la concentración de andrógenos mínima requerida para la activación de éste.

Si bien está demostrado, que la agregación de las integrinas, inducida por la interacción de éstas con las proteínas de la MEC, desencadena la formación de adhesiones focales, no está dilucidado cómo las adhesiones focales se organizan en respuesta a la agregación de las integrinas. Tampoco está establecido el mecanismo por el cual las señales intracelulares (“inside-out”) modulan la formación de las adhesiones focales. Se acepta que la fosforilación de proteínas en tirosina, media la formación de las adhesiones focales, siendo la proteína FAK, la principal proteína involucrada en la organización del citoesqueleto. Sin embargo, se ha descrito la formación de adhesiones focales en ausencia de fosforilación en tirosina de los componentes que contribuyen a la formación de estas estructuras [Fincham y col., 1995; Gilmore y Romer, 1996]. Actualmente existen evidencias que indican que las proteínas ERK, activadas por la agregación de las integrinas, contribuyen también en la formación de las adhesiones focales [Chen y col., 1994, Morino y col., 1995; Zhu y Assoian, 1995; Miyamoto y col., 1996] y en la migración celular [Klemke y col., 1997; Nguyen y col., 1999]. Esto sugiere que las proteínas ERK están involucradas en la organización del citoesqueleto desencadenada por la adhesión celular dependiente de integrinas. En este trabajo, demostramos que las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV, presentan un aumento en el grado de adhesión celular, el cual es revertido, parcialmente, en presencia de PD98059, un inhibidor de la actividad de las proteínas MEK. **Estos resultados nos sugieren que las proteínas ERK 1-2 podrían estar involucradas en el mecanismo de formación de las adhesiones focales.** Ha sido demostrado que la inhibición de las adhesiones focales por citocalasina D previene la activación, mediada por las integrinas, de las proteínas FAK y MAPK [Zhu y Assoian, 1995; Miyamoto y col., 1995]. Esto sugiere que cierto grado de agregación y reorganización de los filamentos de actina es vital para la activación de las MAPK mediada por las integrinas. Sin embargo, el alto

grado de organización, necesario para una adhesión focal estable, no es necesario para la activación de las MAPK. Recientemente, Fincham y col., [2000], demostraron en células embrionarias de fibroblastos de rata (REF52), que la formación de los primeros contactos focales requiere de la fosforilación de las proteínas en tirosina, mientras que en la formación de nuevos contactos focales y en la formación de prolongaciones citoplasmáticas están involucradas las proteínas ERKs

En nuestro modelo observamos que las células de Leydig cultivadas sobre colágeno tipo IV en presencia de citocalasina D la fosforilación de las proteínas ERK 1-2 no se inhibe. **En base a esto y a lo expuesto anteriormente en relación a la caveolina -1, nuestra hipótesis es que el colágeno tipo IV al inducir la agregación de las integrinas, activaría a la proteína caveolina-1, la cual, a través de la activación de otras proteínas asociadas, sería la responsable de desencadenar la cascada de las MAPK.**

Está demostrado que los contactos focales se desencadenan tempranamente y son estructuras transcientes. Como se muestra en la figura 17, a 3 hs de cultivo, las células de Leydig presentan un comienzo de formación de prolongaciones citoplasmáticas. La disminución de la adhesión celular observada luego de la incubación con un inhibidor de la actividad de las ERK 1-2, por 3 hs, indicaría que la formación de nuevos contactos focales se vería inhibida, con la consiguiente disminución de la adhesión de las células al sustrato. Fincham y col. [2000], observaron en células REF52 cultivadas sobre fibronectina e incubadas con U0126, otro inhibidor de las MEK, una disminución de la formación de nuevos contactos focales.

Nuestros resultados demuestran que el colágeno tipo IV inhibe la esteroidogénesis de las células de Leydig, regulando la expresión de la proteína StAR. Asimismo demostramos que la interacción del colágeno tipo IV con la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas activa la cascada Raf/MEK/ERK, a través de un mecanismo independiente de FAK.

Existen evidencias que indican que las MAPK tienen la capacidad de regular la expresión de la proteína StAR [Stocco, 1998; Stocco, 2000], aunque los datos de la literatura son contradictorios. Svechnikov y col. [2003], demostraron en células de Leydig de ratas prepuberales y no en las adultas, que la IL-1 $\alpha$  estimula la producción de

andrógenos y la expresión de la proteína StAR de manera dosis y tiempo dependiente. Los autores también observaron que el efecto de la IL-1 $\alpha$  es revertido cuando las células son tratadas con un inhibidor de la proteína p38, perteneciente a la cascada de las MAPK. Johnson y Bridgham [2002], demostraron en células de la granulosa de gallina que las MAPK inducidas por TGF $\alpha$ , inhiben la expresión de la proteína StAR, y que inhibidores de las MAPK revierten este efecto inhibitorio. **En nuestro sistema, demostramos que en las células de Leydig estimuladas con hCG y cultivadas sobre colágeno tipo IV, se inhibe la expresión de la proteína StAR, sin embargo, este efecto inhibitorio es revertido si las células de Leydig son incubadas en presencia de un inhibidor de la actividad de las MEK.** Aún no está dilucidado como las proteínas ERK pueden regular la expresión de la proteína StAR. Varios factores de transcripción como: el SF-1 (“steroidogenic factor 1”), CCAAT (“enhancer-binding protein”) o el regulador negativo DAX-1 (“dosage sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia X chromosome gen 1”) participan en la regulación transcripcional del gen de la proteína StAR. Una posibilidad sería que las proteínas ERK regulen la transcripción de SF-1 o CCAAT, pero existen evidencias de que estas proteínas estimulan la transcripción de estos factores de transcripción [Gyles y col., 2001]. Respecto de la regulación de la transcripción de DAX-1, Osman y col. [2002] demostraron que las proteínas ERK 1-2 inhiben la transcripción de éste. Por lo que es posible que la regulación negativa de la proteína StAR ocurra a nivel de la regulación de la transcripción de DAX-1 o de algún otro factor aún no identificado. Una segunda posibilidad sería que las proteínas ERK induzcan la activación de algún sistema proteolítico que reduzca la vida media de la proteína StAR.

➤ **Dialogo cruzado (“cross-talk”) entre MEK y PKA**

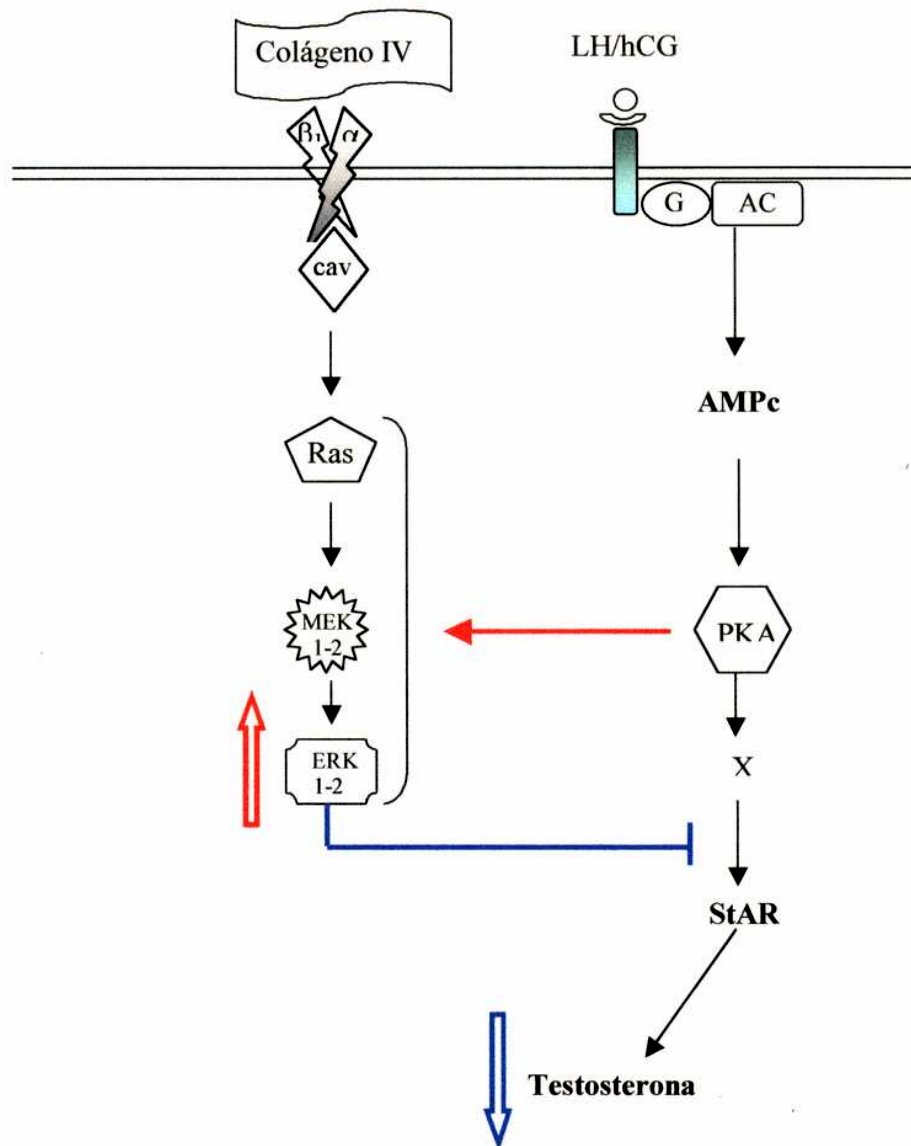
En este trabajo también demostramos que si bien las células de Leydig cultivadas sobre plástico y estimuladas con hCG expresan la proteína StAR, ésta aumenta, si a cultivos de células de Leydig estimulados con hCG se les agrega PD98059, un inhibidor de las MEK. Estos resultados nos sugieren que en las células de Leydig de rata, la cascada Raf/MEK/ERK es capaz de modular la esteroidogénesis a

través de la regulación de la expresión de la proteína StAR de manera dependiente o independiente de la acción del colágeno tipo IV. Más aún, **demostramos en células de Leydig de rata cultivadas sobre plástico, que la PKA, si bien estimula la expresión de la proteína StAR, activa a las proteínas ERK 1-2, ejerciendo de esta manera una regulación negativa sobre la esteroidogénesis.** Estos resultados se correlacionan con los descritos por Seger y col. [2001] en líneas celulares de células de la granulosa, donde demuestran que la activación de la PKA por las gonadotrofinas no sólo induce una estimulación de la esteroidogénesis sino que activa a la cascada de las proteínas ERK. Estos autores, sugieren que esta regulación dual de PKA evitaría la sobreestimulación de las células gonadales, y que sería uno de los mecanismos responsables de la desensibilización de los receptores de gonadotrofinas, en particular, durante la luteólisis, un proceso en el cual las células de la granulosa luteinizadas muestran una sensibilidad reducida a la LH [Ámsterdam y col., 2002]. En resumen, en nuestro trabajo demostramos que en las células de Leydig de rata, la cascada Raf/MEK/ERK pueden activarse por la interacción del colágeno tipo IV con las integrinas o también por la estimulación de la esteroidogénesis, a través de gonadotrofinas, de manera dependiente de la PKA. Esta cascada, induce un efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis ya que es capaz de regular la expresión de la proteína StAR.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo, nos demuestran que las proteínas de la MEC, son capaces de modular la adhesión, la diferenciación celular y la expresión de integrinas. Según lo demostrado por Dickson y col. [2002], en la maduración de las células de Leydig, el TGF $\beta$  participa en la diferenciación de las células de Leydig inmaduras a adultas induciendo la síntesis de las proteínas de la MEC. Si bien la esteroidogénesis de las células de Leydig depende primordialmente de la acción de LH también está regulada por factores autocrinos y/o paracrinos. En base a los resultados obtenidos en este estudio, podemos sugerir que las proteínas de la MEC modulan la esteroidogénesis. El colágeno tipo IV, a través de la interacción con las integrinas de la subfamilia  $\beta$ 1 por un mecanismo FAK independiente, activa a las proteínas ERK 1-2. Estas regulan negativamente la expresión de StAR, con la

consiguiente inhibición de la producción de testosterona. Por otro lado, el estímulo de LH/hCG aumenta la producción de AMPc, que activa a PKA, la cual interacciona con la cascada de señales de las MAPK, estableciendo una regulación dual sobre la esteroidogénesis, siendo este otro de los mecanismos descritos, por el cual podría regularse la esteroidogénesis en las células de Leydig (figura 42).

**Los resultados presentados en esta tesis contribuyen a ampliar los conocimientos sobre la influencia de las proteínas de la matriz extracelular sobre la morfología y diferenciación de las células de Leydig. Demuestran además, que el colágeno tipo IV, es capaz de modular, in vitro, la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata adulta.**



**Figura 42.-** Efecto del colágeno tipo IV sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata adulta y el diálogo cruzado establecido por PKA, entre la señalización intracelular del AMPc y la cascada Ras/MEK/ERK. cav: caveolina-1; G: proteína G; AC: adenilil ciclasa

Lic. Emflee Silvina Diaz

Dra. Berta Denduchis

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que proteínas de la matriz extracelular como, la laminina-1, el colágeno tipo IV y la fibronectina, modulan la diferenciación y adhesión celular, la expresión de las integrinas, como así también la esteroidogénesis de las células de Leydig de rata adulta, in vitro.

En particular, observamos que:

- 1) La laminina-1, la fibronectina y el colágeno tipo IV utilizadas como sustrato, inducen en las células de Leydig:
  - a) cambios en la morfología celular, estimulando la formación de prolongaciones citoplasmáticas
  - b) un mayor grado de adhesión celular, aunque el comportamiento de las células varía según el sustrato al que se adhieren
  - c) un aumento en la expresión de las subunidades  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  y  $\beta_1$  de las integrinas, sobre la superficie celular
  
- 2) El colágeno tipo IV y la fibronectina ejercen un efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona.

Estudiando, en particular, la acción del colágeno tipo IV, concluimos que:

- 3) El colágeno tipo IV, activa a la cascada Ras/MEK/ERK, a través de la interacción con las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$ , por un mecanismo FAK independiente
- 4) Las células de Leydig expresan la proteína caveolina-1 y su fosforilación es modulada por la subunidad  $\beta_1$  de las integrinas. Esto sugiere que la activación de la cascada Ras/MEK/ERK, podría estar mediada por la interacción de las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$  con la caveolina –1

- 5) Las proteínas ERK 1-2, activadas por la interacción del colágeno tipo IV con las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$ , regulan negativamente la expresión de la proteína StAR, inhibiendo la esteroidogénesis.
  
- 6) La PKA, es capaz de estimular la activación de la cascada de señales de las MAPK, estableciendo una regulación dual sobre la esteroidogénesis.

En el testículo normal, las células de Leydig están rodeadas por proteínas de la matriz extracelular, dispuestas en forma continua o discontinua, según el grado de maduración celular. Los datos presentados, aunque provienen, todos, de experimentos in vitro, podrían estar sugiriendo que el colágeno tipo IV se comporta, fisiológicamente, como un factor local que modula negativamente el proceso de la esteroidogénesis.



## ***Bibliografía***

**Abram CL, Courtneidge SA.** (2000) Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res.* 254:1-13.

**Adams JC.** (2001) Cell-matrix contact structures. *Cell Mol Life Sci.* 58: 371-92.

**Albelda SM, Buck CA.** (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4: 2868-80.

**Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** (2002) Molecular cell Biology. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.(eds) Garland Science, Taylor & Francis Group. NY. USA.

**Almahbobi G.** (1995) Adhesion of intermediate filaments and lipid droplets in adrenal cells studied by field emission scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 281:387-90.

**Amsterdam A, Hanoch T, Dantes A, Tajima K, Strauss JF, Seger R.** (2002) Mechanisms of gonadotropin desensitization. *Mol Cell Endocrinol.* 187:69-74.

**Anakwe OO, Payne AH.** (1987) Noncoordinate regulation of de novo synthesis of cytochrome P-450 cholesterol side-chain cleavage and cytochrome P-450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in mouse Leydig cell cultures: relation to steroid production. *Mol Endocrinol.* 1: 595-603.

**Andersen JM, Dietschy JM.** (1978) Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary, and testis of the rat. *J Biol Chem.* 253:9024-32.

**Anderson CM, Mendelson CR.** (1985) Regulation of steroidogenesis in rat Leydig cells in culture: effect of human chorionic gonadotropin and dibutyl cyclic AMP on the synthesis of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin. *Arch Biochem Biophys.* 238: 378-87.

**Aoki A, Fawcett DW.** (1978) Is there a local feedback from the seminiferous tubules affecting activity of the Leydig cells? *Biol Reprod.* 19: 144-58.

**Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL.** (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 50: 197-263.

**Ascoli M.** (1981) Effects of hypocholesterolemia and chronic hormonal stimulation on sterol and steroid metabolism in a Leydig cell tumor. *J Lipid Res.* 22:1247-53.

- Ascoli M, Pignataro OP, Segaloff DL.** (1989) The inositol phosphate/diacylglycerol pathway in MA-10 Leydig tumor cells. Activation by arginine vasopressin and lack of effect of epidermal growth factor and human choriogonadotropin. *J Biol Chem.* 264: 6674-81.
- Aumailley M, Gayraud B.** (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med.* 76: 253-65.
- Barberis L, Wary KK, Fiucci G, Liu F, Hirsch E, Brancaccio M, Altruda F, Tarone G, Giancotti FG.** (2000) Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem.* 275: 36532-40.
- Belt WD, Cavazos LF.** (1967) Fine structure of the interstitial cells of Leydig in the boar. *Anat Rec.* 158: 333-49.
- Benahmed M, Reventos J, Saez JM.** (1983) Steroidogenesis of cultured purified pig Leydig cells: effects of lipoproteins and human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 112:1952-7.
- Ben-Rafael Z, Benadiva CA, Mastroianni L Jr, Garcia CJ, Minda JM, Iozzo RV, Flickinger GL.** (1988) Collagen matrix influences the morphologic features and steroid secretion of human granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol.* 159:1570-4.
- Bergh A.** (1982) Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules. *Int J Androl.* 5: 325-30.
- Bilinska B, Kmicikiewicz I, Pierscinski A, Sadowska J.** (1999) The effect of testicular macrophages, macrophage-conditioned medium and interleukin-1alpha on the cytoskeleton of bank vole Leydig cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 107:281-7.
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA.** (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* 85: 683-93.
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M.** (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12: 463-518.
- Burridge K, Connell L.** (1983) A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J Cell Biol.* 97: 359-67.
- Burstein S, Gut M.** (1976) Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone: kinetics and mechanism. *Steroids.* 28: 115-31.

- Bussenot I, Ferre G, Azoulay-Barjonet C, Murgo C, Vieitez G, Parinaud J.** (1993) Culture of human preovulatory granulosa cells: effect of extracellular matrix on steroidogenesis. *Biol Cell*. 77:181-6
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK.** (1995) Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*. 15: 954-63.
- Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH.** (2000) Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*. 275: 22607-10.
- Calkins JH, Sigel MM, Nankin HR, Lin T.** (1988) Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology*. 123: 1605-10.
- Cameron MR, Foster JS, Bukovsky A, Wimalasena J.** (1996) Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells. *Biol Reprod*. 55:111-9.
- Catt KJ, Dufau ML, Tsuruhara T.** (1971) Studies on a radioligand-receptor assay system for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab*. 32:860-3.
- Chan FL, Inoue S, Leblond CP.** (1993) Cryofixation of basement membranes followed by freeze substitution or freeze drying demonstrates that they are composed of a tridimensional network of irregular cords. *Anat Rec*. 235: 191-205.
- Chanderbhan RF, Kharroubi AT, Noland BJ, Scallen TJ, Vahouny GV.** (1986) Sterol carrier protein2: further evidence for its role in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res*. 12: 351-70.
- Charreau EH, Calvo JC, Nozu K, Pignataro O, Catt KJ, Dufau ML.** (1981) Hormonal modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in gonadotropin-stimulated and -desensitized testicular Leydig cells. *J Biol Chem*. 256:12719-24.
- Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burrridge K, Juliano RL.** (1994) Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 269: 26602-5.
- Chen YD, Kraemer FB, Reaven GM.** (1980) Identification of specific high density lipoprotein-binding sites in rat testis and regulation of binding by human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem*. 255: 9162-7.
- Christenson LK, Strauss JF 3rd.** (2000) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta*. 1529:175-87.

**Christl HW.** (1990) The lamina propria of vertebrate seminiferous tubules: a comparative light and electron microscopic investigation. *Andrologia*. 22: 85-94.

**Cigorruga SB, Dufau ML, Catt KJ.** (1978) Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized leydig cells. *J Biol Chem*. 253: 4297-304.

**Clark RV.** (1976) Three-dimensional organization of testicular interstitial tissue and lymphatic space in the rat. *Anat Rec*. 184: 203-25.

**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. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*. 269:28314-22.

**Connell CJ, Christensen K.** (1975) The ultrastructure of the canine testicular interstitial tissue. *Biol Reprod*. 12:368-82.

**Conti M, Jin SL, Monaco L, Repaske DR, Swinnen JV.** (1991) Hormonal regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Endocr Rev*. 12: 218-34.

**Cooke BA, Lindh ML, Janszen FH.** (1976) Correlation of protein kinase activation and testosterone production after stimulation of Leydig cells with luteinizing hormone. *Biochem J*. 160: 439-46.

**Cooke BA.** (1996) Transduction of the luteinizing hormone signal within the Leydig cell. En: *The Leydig cell*. Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 351 – 364.

**Coppolino M, Leung-Hagesteijn C, Dedhar S, Wilkins J.** (1995) Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem*. 270: 23132-8.

**Coppolino MG, Dedhar S.** (2000) Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol*. 32: 171-88.

**Crepieux P, Martinat N, Marion S, Guillou F, Reiter E.** (2002) Cellular adhesion of primary Sertoli cells affects responsiveness of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 to follicle-stimulating hormone but not to epidermal growth factor. *Arch Biochem Biophys*. 399:245-50.

**Crivello JF, Jefcoate CR.** (1980) Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells. Kinetics and effects of inhibitors. *J Biol Chem*. 255: 8144-51.

**Davis JS, Weakland LL, West LA, Farese RV.** (1986) Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol trisphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. Evidence

for phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone. *Biochem J.* 238: 597-604.

**Davis JS, Weakland LL, Farese RV, West LA.** (1987) Luteinizing hormone increases inositol trisphosphate and cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in isolated bovine luteal cells. *J Biol Chem.* 262: 8515-21.

**de Kretser DM, Kerr JB, Paulsen CA.** (1975) The peritubular tissue in the normal and pathological human testis. An ultrastructural study. *Biol Reprod.* 12: 317-24.

**de Kretser DM, Kerr JB.** (1994) The cytology of the testis. En: *The Physiology of Reproduction.* Knobil E. y Neill JD. (eds). Raven Press. Ltd., NY, USA. pp 1177 – 1290

**de Melker AA, Sonnenberg A.** (1999) Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays.* 21: 499-509.

**Dedhar S, Hannigan GE.** (1996) Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 8: 657-69.

**Dedhar S.** (2000) Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 250-6.

**Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP.** (1996) Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology.* 137:5337-43.

**Denduchis B, Rettori V, McCann SM.** (1994) Role of laminin on prolactin and gonadotrophin release from anterior pituitaries of male rats. *Life Sci.* 55:1757-65.

**Denduchis B, Schteingart H, Cigorruga S, Vianello SE, Casanova MB, Lustig L.** (1996) Immunodetection of cell adhesion molecules and extracellular matrix proteins in rat Leydig cell cultures. *Int J Androl.* 19: 353-61.

**Dewi DA, Abayasekara DR, Wheeler-Jones CP.** (2002) Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific. *Endocrinology.* 43:877-88.

**Diaz ES, Rettori V, Suescun MO, Lustig L, McCann SM, Denduchis B.** (2002) Role of type IV collagen in prolactin release from anterior pituitaries of male rats. *Endocrine.* 18:185-9.

**Dickson C, Webster DR, Johnson H, Cecilia Millena A, Khan SA.** (2002) Transforming growth factor-beta effects on morphology of immature rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 195:65-77

- Dufau ML, Mendelson CR, Catt KJ.** (1974) A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin: testosterone production by dispersed Leydig cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 39: 610-3.
- Dufau ML, Tsuruhara T, Horner KA, Podesta E, Catt KJ.** (1977) Intermediate role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 3419-23.
- Dufau ML.** (1988) Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu Rev Physiol.* 50:483-508.
- Dufau ML.** (1996) The luteinizing hormone receptor. En: *The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 333 – 350.
- Dym M, Fawcett DW.** (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* 3: 308-26.
- Dym M, Lamsam-Casalotti S, Jia MC, Kleinman HK, Papadopoulos V.** (1991) Basement membrane increases G-protein levels and follicle-stimulating hormone responsiveness of Sertoli cell adenylyl cyclase activity. *Endocrinology.* 128:1167-76.
- Dym M.** (1994) Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev.* 15:102-15.
- Dziadek M.** (1995) Role of laminin-nidogen complexes in basement membrane formation during embryonic development. *Experientia.* 51: 901-13.
- Edelman GM, Crossin KL.** (1991) Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem.* 60: 155-90.
- Eklom P, Timpl R.** (1996) Cell-to-cell contact and extracellular matrix. A multifaceted approach emerging. *Curr Opin Cell Biol.* 8: 599-601.
- Erickson AC, Couchman JR.** (2000) Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem.* 48: 1291-306.
- Faucheux N, Haye B, Nagel MD.** (2000) Activation of the cyclic AMP pathway in cells adhering to biomaterials: regulation by vitronectin- and fibronectin-integrin binding. *Biomaterials.* 21: 1031-8.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN.** (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod.* 9: 500-32.
- Fawcett DW.** (1973) Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Adv Biosci.* 10: 83-99.

**Fevold HR, Lorence MC, McCarthy JL, Trant JM, Kagimoto M, Waterman MR, Mason JI.** (1989) Rat P450(17 alpha) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions. *Mol Endocrinol.* 3: 968-75.

**Fincham VJ, Wyke JA, Frame MC.** (1995) v-Src-induced degradation of focal adhesion kinase during morphological transformation of chicken embryo fibroblasts. *Oncogene.* 10:2247-52.

**Fincham VJ, James M, Frame MC, Winder SJ.** (2000) Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J.* 19: 2911-23.

**Freeman DA, Ascoli M.** (1982) Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells. *J Biol Chem.* 257:14231-8.

**Freeman DA, Ascoli M.** (1983) The low-density lipoprotein pathway of cultured Leydig tumor cells. Utilization of low-density lipoprotein-derived cholesterol for steroidogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 754:72-81.

**Freeman DA, Rommerts FFG.** (1996) Regulation of Leydig cell cholesterol transport. En: *The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 231 – 240.

**Frojdman K, Pelliniemi LJ, Rey R, Virtanen I.** (1999) Presence of anti-Mullerian hormone correlates with absence of laminin alpha5 chain in differentiating rat testis and ovary. *Histochem Cell Biol.* 111: 367-73.

**Fujiwara H, Honda T, Ueda M, Nakamura K, Yamada S, Maeda M, Mori T.** (1997) Laminin suppresses progesterone production by human luteinizing granulosa cells via interaction with integrin alpha 6 beta 1. *J Clin Endocrinol Metab.*;82:2122-8.

**Gemba T, Valbracht J, Alsalameh S, Lotz M.** (2002) Focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinases are involved in chondrocyte activation by the 29-kDa amino-terminal fibronectin fragment. *J Biol Chem.* 277:907-11.

**Getzenberg RH, Pienta KJ, Coffey DS.** (1990) The tissue matrix: cell dynamics and hormone action. *Endocr Rev.* 11:399-417.

**Giancotti FG, Ruoslahti E.** (1999) Integrin signaling. *Science.* 285: 1028-32.

**Gilmore AP, Romer LH.** (1996) Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Mol Biol Cell.* 7:1209-24.

**Glenney JR Jr, Zokas L.** (1989) Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol.* 108: 2401-8.



- Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH.** (1990) Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol.* 111: 1089-105.
- Grudet N, Bonnamy PJ, Bocquet J, Carreau S.** (1996) Synthesis of proteoglycans by purified Leydig cells in immature rats and mature rats. *C R Acad Sci III.* 319:1101-5.
- Grudet N, Bonnamy PJ, Le Goff D, Carreau S.** (1999) Role of proteoglycans on testosterone synthesis by purified Leydig cells from immature and mature rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 68: 153-62.
- Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L.** (1992) Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem.* 267: 4479-88.
- Gutierrez CG, Glazyrin AL, Robertson GW, Campbell BK, Gong JG, Bramley TA, Webb R.** (1997) Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of oestradiol production in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 134:51-8.
- Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM.** (2001) ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. *J Biol Chem.* 276:34888-95.
- Hadley MA, Djakiew D, Byers SW, Dym M.** (1987) Polarized secretion of androgen-binding protein and transferrin by Sertoli cells grown in a bicameral culture system. *Endocrinology.* 120:1097-103.
- Hales DB, Sha L, Payne AH.** (1990) Glucocorticoid and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-mediated induction of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450<sub>scc</sub>) in MA-10 tumor Leydig cells. Increases in mRNA are cycloheximide sensitive. *Endocrinology.* 126: 2800-8.
- Hales DB.** (1996) Leydig cell-macrophage interactions: An overview. En: *The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 452 – 465.
- Hall PF.** (1994) Testicular steroid synthesis: organization and regulation. En: *The Physiology of Reproduction.* Knobil E. y Neill JD. (eds). Raven Press. Ltd., NY, USA. pp 1335 – 1362
- Hall PF, Almahbobi G.** (1997) Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microsc Res Tech.* 36:463-79
- Hansson V, Skalhegg BS, Tasken K.** (2000) Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 73:81-92.

- Haynes-Johnson D, Lai MT, Campen C, Palmer S.** (1999) Diverse effects of tyrosine kinase inhibitors on follicle-stimulating hormone-stimulated estradiol and progesterone production from rat granulosa cells in serum-containing medium and serum-free medium containing epidermal growth factor. *Biol Reprod.* 61:147-53
- Hohenester E, Engel J.** (2002) Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 21: 115-28.
- Hopf M, Gohring W, Kohfeldt E, Yamada Y, Timpl R.** (1999) Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem.* Feb;259(3):917-25.
- Howe A, Aplin AE, Alahari SK, Juliano RL.** (1998) Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol.* 10: 220-31.
- Huet C, Pisselet C, Mandon-Pepin B, Monget P, Monniaux D.** (2001) Extracellular matrix regulates ovine granulosa cell survival, proliferation and steroidogenesis: relationships between cell shape and function. *J Endocrinol.* 169: 347-60.
- Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ.** (1992) Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med.* 201:125-40.
- Hutson JC.** (1992) Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell Tissue Res.* 267: 385-9.
- Hutter H, Vogel BE, Plenefisch JD, Norris CR, Proenca RB, Spieth J, Guo C, Mastwal S, Zhu X, Scheel J, Hedgecock EM.** (2000) Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science.* 287: 989-94.
- Hynes RO.** (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48: 549-54.
- Hynes RO.** (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69: 11-25.
- Hynes RO.** (1999) Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9: M33-7.
- Hynes RO, Zhao Q.** (2000) The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol.* 150: F89-96.
- Ikeda H.** (1990) Serum-free medium conditions for steroidogenesis of bovine follicular thecal cells cultured on collagen gel matrix. *In Vitro Cell Dev Biol.* 26:193-200
- Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD.** (1994) The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J.* 302 ( Pt 3): 625-39.
- Ivaska J, Heino J.** (2000) Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 57: 16-24.

- Ivaska J, Reunanen H, Westermarck J, Koivisto L, Kahari VM, Heino J. (1999)** Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail. *J Cell Biol.* 147: 401-16.
- Johnson AL, Solovieva EV, Bridgham JT. (2002)** Relationship between steroidogenic acute regulatory protein expression and progesterone production in hen granulosa cells during follicle development. *Biol Reprod.* 67:1313-20.
- Joseph-Silverstein J, Silverstein RL. (1998)** Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest.*16: 176-82.
- Juliano RL. (2002)** Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42: 283-323.
- Kagami S, Urushihara M, Kondo S, Loster K, Reutter W, Tamaki T, Yoshizumi M, Kuroda Y. (2001)** Requirement for tyrosine kinase-ERK1/2 signaling in alpha 1 beta 1 integrin-mediated collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. *Exp Cell Res.* 268: 274-83.
- Katz BZ, Zamir E, Bershadsky A, Kam Z, Yamada KM, Geiger B. (2000)** Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell.* 11:1047-60.
- Katz BZ, Miyamoto S, Teramoto H, Zohar M, Krylov D, Vinson C, Gutkind JS, Yamada KM. (2002)** Direct transmembrane clustering and cytoplasmic dimerization of focal adhesion kinase initiates its tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 1592: 141-52.
- Keeney DS, Mendis-Handagama SM, Zirkin BR, Ewing LL. (1988)** Effect of long term deprivation of luteinizing hormone on Leydig cell volume, Leydig cell number, and steroidogenic capacity of the rat testis. *Endocrinology.* 123: 2906-15.
- Keeney DS, Mason JI. (1992)** Expression of testicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4-isomerase: regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats. *Endocrinology.* 130: 2007-15.
- Kefalides NA, Denduchis B. (1969)** Structural components of epithelial and endothelial basement membranes. *Biochemistry.* 8: 4613-4621.
- Kern A, Eble J, Golbik R, Kuhn K. (1993)** Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1. *Eur J Biochem.* 215:151-9.
- Kern A, Marcantonio EE. (1998)** Role of the I-domain in collagen binding specificity and activation of the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. *J Cell Physiol.* 176:634-41.

- Kerr JB, Rich KA, de Kretser DM.** (1979) Alterations of the fine structure and androgen secretion of interstitial cells in the experimentally cryptorchid rat testis. *Biol Reprod.* 20: 409-22.
- Kerr JB, de Kretser DM.** (1981) The cytology of the human testis. En *The testis*. Burger H. Y de Kretser DM. (eds) Raven Press. Ltd., NY, USA. pp 141 – 170.
- Khan SA, Keck C, Gudermann T, Nieschlag 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: 3043-52.
- Khan SA, Dorrington JH, Moran MF.** (1993) Steroidogenesis-inducing protein stimulates protein-tyrosine kinase activity in rat Leydig cells. *Endocrinology.* 132: 109-14.
- Kikkawa Y, Sanzen N, Fujiwara H, Sonnenberg A, Sekiguchi K.** (2000) Integrin binding specificity of laminin-10/11: laminin-10/11 are recognized by alpha 3 beta 1, alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins. *J Cell Sci.* 113:869-76
- Kitamura M, Buczko E, Dufau ML.** (1991) Dissociation of hydroxylase and lyase activities by site-directed mutagenesis of the rat P45017 alpha. *Mol Endocrinol.* 5: 1373-80.
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresh DA.** (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol.* 137:481-92.
- Klinefelter GR, Hall PF, Ewing LL.** (1987) Effect of luteinizing hormone deprivation in situ on steroidogenesis of rat Leydig cells purified by a multistep procedure. *Biol Reprod.* 36: 769-83.
- Kmicikiewicz I, Koziel E, Pelczar U, Pierscinski A, Bilinska B.** (1998) Mouse Leydig cell culture on microcarriers. *Acta Histochem.* 100:297-307
- Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H, Seed B.** (1996) Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell.* 86: 233-42.
- Kolch W.** (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351: 289-305.
- Kornberg LJ, Earp HS, Turner CE, Prockop C, Juliano RL.** (1991) Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 8392-6.
- Kreidberg JA.** (2000) Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol.* 12:548-53.

- Krueger RJ, Orme-Johnson NR.** (1983) Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. Discovery of a rapidly induced protein. *J Biol Chem.* 258: 10159-67.
- Kumar S, Blumberg DL, Canas JA, Maddaiah VT.** (1994) Human chorionic gonadotropin (hCG) increases cytosolic free calcium in adult rat Leydig cells. *Cell Calcium.* 15: 349-55.
- Kumi-Diaka J, Rodriguez R, Goudaze G.** (1998) Influence of genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. *Biol Cell.* 90:349-354.
- 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.
- Kuopio T, Pelliniemi LJ.** (1989) Patchy basement membrane of rat Leydig cells shown by ultrastructural immunolabeling. *Cell Tissue Res.* 256:45-51.
- Kwan TK, Pertiwi AK, Taylor NF, Gower DB.** (1988) Steroid profiling in the study of rat testicular steroidogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 962: 214-9.
- Lange Y, Ramos BV.** (1983) Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell. *J Biol Chem.* 258:15130-4.
- Laslett AL, McFarlane JR, Hearn MT, Risbridger GP.** (1995) Requirement for heparan sulphate proteoglycans to mediate basic fibroblast growth factor (FGF-2)-induced stimulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 54:245-50.
- Lee J, Jacobson K.** (1997) The composition and dynamics of cell-substratum adhesions in locomoting fish keratocytes. *J Cell Sci.* 110:2833-44.
- Lee YJ, Streuli CH.** (1999) Extracellular matrix selectively modulates the response of mammary epithelial cells to different soluble signaling ligands. *J Biol Chem.* 274:22401-8.
- Lèfevre A, Saez JM, Finaz C.** (1983) hCG responsiveness of purified Leydig cells from immature and mature rats. *Horm Res.* 17: 114-20.
- 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 Androl.* 16: 27-34.
- Levy H, Deane HW, Rubin BI** (1959) Visualization of steroid 3beta-ol-dehydrogenase activity in the tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology.* 65: 932-943.

- Lian G, Miller KA, Enders GC.** (1992) Localization and synthesis of entactin in seminiferous tubules of the mouse. *Biol Reprod.* 47:316-25.
- Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L** (1986) Direct stimulating effects of insulin-like growth factor-I on Leydig cells steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 137:950-958.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL.** (1995) Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science.* 267: 1828-31.
- Lin TH, Aplin AE, Shen Y, Chen Q, Schaller M, Romer L, Aukhil I, Juliano RL.** (1997) Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *J Cell Biol.* 136: 1385-95.
- Lindberg FP, Gresham HD, Schwarz E, Brown EJ.** (1993) Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol.* 123: 485-96.
- Loftus JC, Liddington RC.** (1997) New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest.* 100(11 Suppl): S77-81.
- Lopez-Ruiz MP, Choi MS, Rose MP, West AP, Cooke BA.** (1992) Direct effect of arachidonic acid on protein kinase C and LH-stimulated steroidogenesis in rat Leydig cells; evidence for tonic inhibitory control of steroidogenesis by protein kinase C. *Endocrinology.* 130: 1122-30.
- Loveland K, Schlatt S, Sasaki T, Chu ML, Timpl R, Dziadek M.** (1998) Developmental changes in the basement membrane of the normal and hypothyroid postnatal rat testis: segmental localization of fibulin-2 and fibronectin. *Biol Reprod.* 58: 1123-30.
- Lu ML, Schneider MC, Zheng Y, Zhang X, Richie JP.** (2001) Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. *J Biol Chem.* 276:13442-51.
- Mainiero F, Pepe A, Wary KK, Spinardi L, Mohammadi M, Schlessinger J, Giancotti FG.** (1995) Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J.* 14:4470-81.
- Mainiero F, Murgia C, Wary KK, Curatola AM, Pepe A, Blumberg M, Westwick JK, Der CJ, Giancotti FG.** (1997) The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO J.* 16: 2365-75.

- Makarevich A, Sirotkin A, Taradajnik T, Chrenek P.** (1997) Effects of genistein and lavendustin on reproductive processes in domestic animals in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.*63:329-37.
- Marinero MJ, Colas B, Prieto JC, Lopez-Ruiz MP.** (1996) Different sites of action of arachidonic acid on steroidogenesis in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 118: 193-200.
- Martel C, Rheaume E, Takahashi M, Trudel C, Couet J, Luu-The V, Simard J, Labrie F.** (1992) Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 41: 597-603.
- Mason JI, 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: 504-12.
- Mather JP, Wolpe SD, Gunsalus GL, Bardin CW, Phillips DM.** (1984) Effect of purified and cell-produced extracellular matrix components on Sertoli cell function. *Ann N Y Acad Sci.*438:572-5.
- Mayer U, Zimmermann K, Mann K, Reinhardt D, Timpl R, Nischt R.** (1995) Binding properties and protease stability of recombinant human nidogen. *Eur J Biochem.* 227: 681-6.
- McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Rosemblyt N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH.** (1989) Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 245: 494-9.
- McFarlane JR, Laslett A, de Kretser DM, Risbridger GP.** (1996) Evidence that heparin binding autocrine factors modulate testosterone production by the adult rat Leydig cell. *Mol Cell Endocrinol.*118: 57-63.
- Mellon SH, Vaisse C.** (1989) cAMP regulates P450<sub>scc</sub> gene expression by a cycloheximide-insensitive mechanism in cultured mouse Leydig MA-10 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 7775-9.
- Mendis-Handagama SM, Zirkin BR, Scallen TJ, Ewing LL.** (1990) Studies on peroxisomes of the adult rat Leydig cell. *J Androl.* 11: 270-8.
- Menon KM, Dorfman RI, Forchielli E.** (1967) Influence of gonadotrophins on the cholesterol-sidechain cleavage reaction by rat-testis mitochondrial preparations. *Biochim Biophys Acta.* 148:486-94.
- Mertz LM, Pedersen RC.** (1989) The kinetics of steroidogenesis activator polypeptide in the rat adrenal cortex. Effects of adrenocorticotropin, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, cycloheximide, and circadian rhythm. *J Biol Chem.* 264: 15274-9.

- Miller SC, Bowman BM, Rowland HG.** (1983) Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *Am J Anat.* 168: 1-13.
- Miosge N, Heinemann S, Leissling A, Klenczar C, Herken R.** (1999) Ultrastructural triple localization of laminin-1, nidogen-1, and collagen type IV helps elucidate basement membrane structure in vivo. *Anat Rec.* 254: 382-8.
- Miosge N.** (2001) The ultrastructural composition of basement membranes in vivo. *Histol Histopathol.* 16: 1239-48.
- Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM.** (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.* 131: 791-805.
- Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM.** (1996) Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol.* 135: 1633-42.
- Mizuno K, Tanaka T, Umesaki N, Ogita S.** (1999) Inhibition of cAMP-mediated decidualization in human endometrial stromal cells by IL-1beta and laminin. *Horm Metab Res.* 31:307-10
- Molony L, Burridge K.** (1985) Molecular shape and self-association of vinculin and metavinculin. *J Cell Biochem.* 29: 31-6.
- Morino N, Mimura T, Hamasaki K, Tobe K, Ueki K, Kikuchi K, Takehara K, Kadowaki T, Yazaki Y, Nojima Y.** (1995) Matrix/integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44erk-1 and p42erk-2. *J Biol Chem.* 270: 269-73.
- Morris MD, Chaikoff IL.** (1959) The origin of cholesterol in liver, adrenal gland and testis of the rat. *J Biol Chem.* 234: 1095-1099.
- Moscona AA.** (1961) Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: A quantifiable approach to cell interaction in vitro. *Exp Cell Res.* 22: 455-475.
- Mukhin AG, Papadopoulos V, Costa E, Krueger KE.** (1989) Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 9813-6.
- Murono EP, Washburn AL, Goforth DP, Wu N.** (1993) Evidence that both receptor- and heparan sulfate proteoglycan-bound basic fibroblast growth factor are internalized by cultured immature Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 98: 81-90.
- Murono EP, Washburn AL, Goforth DP, Wu N.** (1993a) Biphasic effect of basic fibroblast growth factor on <sup>125</sup>I-human chorionic gonadotropin binding to cultured immature Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 92:121-6.



- Murphy-Ullrich JE.** (2001) The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest.* 107: 785-90.
- Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, Sankovic M, Walker LA, Somlyo AV, Weber MJ, Gonias SL.** (1999) Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol.* 146:149-64.
- Naik UP, Patel PM, Parise LV.** (1997) Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin  $\alpha$ IIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 272: 4651-4.
- Nakajin S, Hall PF.** (1981) Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis. Purification and properties of A C21 steroid side-chain cleavage system (17  $\alpha$ -hydroxylase-C17,20 lyase). *J Biol Chem.* 256: 3871-6.
- Nakajin S, Shively JE, Yuan PM, Hall PF.** (1981) Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17  $\alpha$ -hydroxylase and c17,20-lyase) associated with one protein. *Biochemistry.* 20: 4037-42.
- Nakamura Y, Handa K, Iwamoto R, Tsukamoto T, Takahasi M, Mekada E.** (2001) Immunohistochemical distribution of CD9, heparin binding epidermal growth factor-like growth factor, and integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 49:439-44.
- Noegel A, Witke W, Schleicher M.** (1987) Calcium-sensitive non-muscle  $\alpha$ -actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. *FEBS Lett.* 221: 391-6.
- O'Shaughnessy PJ, Murphy L.** (1991) Steroidogenic enzyme activity in the rat testis following Leydig cell destruction by ethylene-1,2-dimethanesulphonate and during subsequent Leydig cell regeneration. *J Endocrinol.* 131: 451-7.
- Osman H, Murigande C, Nadakal A, Capponi AM.** (2002) Repression of DAX-1 and induction of SF-1 expression. Two mechanisms contributing to the activation of aldosterone biosynthesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem.* 277:41259-67.
- Otey CA, Vasquez GB, Burrige K, Erickson BW.** (1993) Mapping of the  $\alpha$ -actinin binding site within the  $\beta$ 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 268:21193-7.
- Paine E, Palmantier R, Akiyama SK, Olden K, Roberts JD.** (2000) Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 275: 11284-90.

**Papadopoulos V, Mukhin AG, Costa E, Krueger KE.** (1990) The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J Biol Chem.* 265: 3772-9.

**Papadopoulos V, Nowzari FB, Krueger KE.** (1991a) Hormone-stimulated steroidogenesis is coupled to mitochondrial benzodiazepine receptors. Tropic hormone action on steroid biosynthesis is inhibited by flunitrazepam. *J Biol Chem.* 266: 3682-7.

**Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A.** (1991b) Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology.* 129: 1481-8.

**Papadopoulos V, Guarneri P, Krueger KE, Guidotti A, Costa E.** (1992) Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 5113-7.

**Park H, Go YM, Darji R, Choi JW, Lisanti MP, Maland MC, Jo H.** (2000) Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278: H1285-93.

**Pavalko FM, Otey CA.** (1994) Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton. *Proc Soc Exp Biol Med;* 205:282-93.

**Payne AH, Sha LL.** (1991) Multiple mechanisms for regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase, 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinology.* 129: 1429-35

**Pedersen RC.** (1987) Steroidogenesis activator polypeptide (SAP) in the rat ovary and testis. *J Steroid Biochem.* 27: 731-5.

**Perez-Armendariz EM, Romano MC, Luna J, Miranda C, Bennett MV, Moreno AP.** (1994) Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis. *Am J Physiol.* 267:C570-80.

**Perrin A, Defaye G, Guidicelli C, Chambaz EM.** (1991) Purification and properties of steroid 17 alpha-hydroxylase from calf testis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40: 431-5.

**Peyssonnaud C, Eychene A.** (2001) The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell.* 93: 53-62.

**Phamantu NT, Fagnen G, Godard F, Bocquet J, Bonnamy PJ.** (1999) Sodium chlorate induces undersulfation of cellular proteoglycans and increases in FSH-stimulated estradiol production in immature rat Sertoli cells. *J Androl.* 20: 241-50.

- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW.** (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 275: 21785-8
- Podesta EJ, Dufau ML, Catt KJ.** (1976) Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase of Leydig cells: in vitro activation and relationship to gonadotropin action upon cyclic AMP and steroidogenesis. *FEBS Lett.* 70: 212-6.
- Podesta EJ, Dufau ML, Solano AR, Catt KJ.** (1978) Hormonal activation of protein kinase in isolated Leydig cells. Electrophoretic analysis of cyclic AMP receptors. *J Biol Chem.* 253: 8994-9001.
- Pon LA, Orme-Johnson NR.** (1986) Acute stimulation of steroidogenesis in corpus luteum and adrenal cortex by peptide hormones. Rapid induction of a similar protein in both tissues. *J Biol Chem.* 261: 6594-9.
- Pon LA, Epstein LF, Orme-Johnson NR.** (1986a) Acute cAMP stimulation in Leydig cells: rapid accumulation of a protein similar to that detected in adrenal cortex and corpus luteum. *Endocr Res.* 12: 429-46.
- Pon LA, Hartigan JA, Orme-Johnson NR.** (1986b) Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis. Rapid accumulation of a phosphoprotein. *J Biol Chem.* 261: 13309-16.
- Porter TD, Coon MJ.** (1991) Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* 266: 13469-72.
- Qian D, Weiss A.** (1997) T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 205-12.
- Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER.** (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol.* 16:100-15.
- Remy JJ, Bozon V, Couture L, Goxe B, Salesse R, Garnier J.** (1993) Reconstitution of a high-affinity functional lutropin receptor by coexpression of its extracellular and membrane domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 193: 1023-30.
- Rey R, Campo S, Ayuso S, Nagle C, Chemes H.** (1995) Testicular steroidogenesis in the Cebus monkey throughout postnatal development. *Biol Reprod.* 52: 997-1002.
- Rheaume E, Lachance Y, Zhao HF, 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 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol.* 5: 1147-57.

- Risley MS, Tan IP, Roy C, Saez JC.** (1992) Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci.* 103: 81-96.
- Ritvos O, Voutilainen R.** (1992) Regulation of the cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin mRNAs in cultured choriocarcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol.* 84:195-202.
- Rosales C, Juliano RL.** (1995) Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol.* 57: 189-98.
- Roth SA, Weston JA.** (1967) The measurement of intercellular adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 58: 974-980.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LS, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJ, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Vossell LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Lewis S.** (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science.* 287: 2204-15.
- Ruoslahti E.** (1991) Integrins. *J Clin Invest.* 87: 1-5.
- Russell TR, Terasaki WL, Appleman MM.** (1973) Separate phosphodiesterases for the hydrolysis of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in rat liver. *J Biol Chem.* 248:1334-40.
- Russell L, Burguet S.** (1977) Ultrastructure of Leydig cells as revealed by secondary tissue treatment with a ferrocyanide-osmium mixture. *Tissue Cell.*;9(4):751-66.
- Russell LD, Corbin TJ, Ren HP, Amador A, Bartke A, Ghosh S.** (1992) Structural changes in rat Leydig cells posthypophysectomy: a morphometric and endocrine study. *Endocrinology.* 131: 498-508.
- Russell LD.** (1996) Mammalian Leydig cell structure. En: *The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 43 – 96.
- Saez JM.** (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev.* 15: 574-626.
- Saez JM, Lejeune H.** (1996) Regulation of Leydig cells functions by hormones and growth factors other than LH and IGF-1. En: *The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 384 – 406.

- Salanova M, Ricci G, Boitani C, Stefanini M, De Grossi S, Palombi F.** (1998) Junctional contacts between Sertoli cells in normal and aspermatogenic rat seminiferous epithelium contain alpha6beta1 integrins, and their formation is controlled by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod.* 58: 371-8.
- Sanders MA, Basson MD.** (2000) Collagen IV-dependent ERK activation in human Caco-2 intestinal epithelial cells requires focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 275: 38040-7.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT.** (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* 14: 1680-8.
- Schaller MD.** (2001) Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1540:1-21.
- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P.** (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 372: 786-91.
- Schulze C.** (1984) Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 88: 1-104.
- Schuppan D, Ruhl M.** (1994) Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz J Med Biol Res.* 27: 2125-41.
- Schuppan D, Somasundaram R, Dieterich W, Ehnis T, Bauer M.** (1994) The extracellular matrix in cellular proliferation and differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 733: 87-102.
- Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss JF 3rd, Amsterdam A.** (2001) The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem.* 276:13957-64.
- Shattil SJ, O'Toole T, Eigenthaler M, Thon V, Williams M, Babor BM, Ginsberg MH.** (1995) Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol.* 131: 807-16.
- Shaw AR, Domanska A, Mak A, Gilchrist A, Dobler K, Visser L, Poppema S, Fliegel L, Letarte M, Willett BJ.** (1995) Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers beta 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 270: 24092-9.
- Simon-Assmann P, Kedinger M, De Arcangelis A, Rousseau V, Simo P.** (1995) Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia.* 51: 883-900.

- Simpson ER.** (1979) Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450, and the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 13: 213-27.
- Springer TA.** (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 57: 827-72.
- Stahelin LA, Hull BE.** (1978) Junctions between living cells. *Sci Am.* 238:140-52.
- Stocco DM, Kilgore MW.** (1988) Induction of mitochondrial proteins in MA-10 Leydig tumour cells with human choriogonadotropin. *Biochem J.* 249: 95-103.
- Stocco DM, Sodeman TC.** (1991) The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem.* 266:19731-8.
- Stocco DM, Chen W.** (1991) Presence of identical mitochondrial proteins in unstimulated constitutive steroid-producing R2C rat Leydig tumor and stimulated nonconstitutive steroid-producing MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology.* 128:1918-26.
- Stocco DM, Khan SA.** (1992) Effects of steroidogenesis inducing protein (SIP) on steroid production in MA-10 mouse Leydig tumor cells: utilization of a non-cAMP second messenger pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 84: 185-94.
- Stocco DM, King S, Clark BJ.** (1995) Differential effects of dimethylsulfoxide on steroidogenesis in mouse MA-10 and rat R2C Leydig tumor cells. *Endocrinology.* 136:2993-9.
- Stocco DM, Clark BJ.** (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev.* 17: 221-44.
- Stocco DM.** (1996) Acute regulation of Leydig cell steroidogenesis. En: *The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 241 – 258.
- Stocco DM.** (1998) A review of the characteristics of the protein required for the acute regulation of steroid hormone biosynthesis: the case for the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *Proc Soc Exp Biol Med.* 217:123-9.
- Stocco DM.** (2000) The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol.* 164:247-53.
- Sullivan MH, Cooke BA.** (1985) Effects of calmodulin and lipoxygenase inhibitors on LH (lutropin)- and LHRH (luliberin)-agonist-stimulated steroidogenesis in rat Leydig cells. *Biochem J.* 232: 55-9.

- Sullivan MH, Cooke BA.** (1986) The role of Ca<sup>2+</sup> in steroidogenesis in Leydig cells. Stimulation of intracellular free Ca<sup>2+</sup> by lutropin (LH), luteal releasing hormone (LHRH) agonist and cyclic AMP. *Biochem J.* 236: 45-51.
- Sundaram K, Kumar N.** (1996) Metabolism of testosterone in Leydig cell and peripheral tissues. En: *The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 287 – 306.
- Sundberg C, Rubin K.** (1996) Stimulation of beta1 integrins on fibroblasts induces PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptors. *J Cell Biol.* 132: 741-52.
- Svechnikov K, Stocco DM, Soder O.** (2003) Interleukin-1alpha stimulates steroidogenic acute regulatory protein expression via p38 MAP kinase in immature rat Leydig cells. *J Mol Endocrinol.* 30:59-67
- Sylvester SR.** (1996) Leydig cell – Sertoli cell interaction. En: *The Leydig cell.* Payne AH, Hardy MP, Russell LD. (eds). Cache Riven Press. Vienna, IL, USA. pp 467 – 476.
- Tabone E, Benahmed M, Reventos J, Saez JM.** (1984) Interactions between immature porcine Leydig and Sertoli cells in vitro. An ultrastructural and biochemical study. *Cell Tissue Res.* 237: 357-62.
- Takeichi M.** (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 619-27.
- Tam VK, Clemens TL, Green J.** (1998) The effect of cell-matrix interaction on parathyroid hormone (PTH) receptor binding and PTH responsiveness in proximal renal tubular cells and osteoblast-like cells. *Endocrinology.* 139: 3072-80.
- Thompson WJ, Appleman MM.** (1971) Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry.* 10: 311-6.
- Timpl R, Dziadek M** (1986) Structure, development and molecular pathology of basement membranes. *Int Rev Exp Pathol.* 29: 1-112.
- Timpl R, Brown JC.** (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays.* 18: 123-32.
- Timpl R.** (1996) Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* 8: 618-24.
- Tomic M, Dufau ML, Catt KJ, Stojilkovic SS.** (1995) Calcium signaling in single rat Leydig cells. *Endocrinology.* 136: 3422-9.
- Townes PL, Holtfreter J.** (1955) Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J Exp Zool.* 128: 53-120.

- Travis AJ, Merdiushev T, Vargas LA, Jones BH, Purdon MA, Nipper RW, Galatioto J, Moss SB, Hunnicutt GR, Kopf GS.** (2001) Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev Biol.* 240:599-610.
- Tremblay Y, Fleury A, Beaudoin C, Vallee M, Belanger A.** (1994) Molecular cloning and expression of guinea pig cytochrome P450c17 cDNA (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): tissue distribution, regulation, and substrate specificity of the expressed enzyme. *DNA Cell Biol.* 13: 1199-212.
- Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV, Waterman MR.** (1987) Studies on the synthesis of sterol carrier protein-2 in rat adrenocortical cells in monolayer culture. Regulation by ACTH and dibutyryl cyclic 3',5'-AMP. *J Biol Chem.* 262:3713-7.
- Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Xie XZ, Dufau ML.** (1991) Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene. *J Biol Chem.* 266: 11355-9.
- Tulla M, Pentikainen OT, Viitasalo T, Kapyla J, Impola U, Nykvist P, Nissinen L, Johnson MS, Heino J.** (2001) Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem.* 276: 48206-12.
- Uings IJ, Farrow SN.** (2000) Cell receptors and cell signalling. *Mol Pathol.* 53: 295-9.
- Ulisse S, Rucci N, Piersanti D, Carosa E, Graziano FM, Pavan A, Ceddia P, Arizzi M, Muzi P, Cironi L, Gnessi L, D'Armiento M, Jannini EA.** (1998) Regulation by thyroid hormone of the expression of basement membrane components in rat prepubertal Sertoli cells. *Endocrinology.* 139: 741-7.
- van der Flier A, Sonnenberg A.** (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305: 285-98.
- Verhoeven G, Cailleau J.** (1986) Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 47: 99-106.
- Verhoeven G, Cailleau J.** (1990) Influence of coculture with Sertoli cells on steroidogenesis in immature rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 71: 239-51.
- Vernon RB, Lane TF, Angello JC, Sage H.** (1991) Adhesion, shape, proliferation, and gene expression of mouse Leydig cells are influenced by extracellular matrix in vitro. *Biol Reprod.* 44: 157-70.
- Vihko KK, Huhtaniemi I.** (1989) A rat seminiferous epithelial factor that inhibits Leydig cell cAMP and testosterone production: mechanism of action, stage-specific secretion, and partial characterization. *Mol Cell Endocrinol.* 65: 119-27.



- Villanueva LA, Mendez I, Ampuero S, Larrea F.** (1996) The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol Hum Reprod.* 2:725-31.
- Vracko R.** (1974) Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am J Pathol.* 77: 314-46.
- Wang JY.** (1993) Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 3: 35-43.
- Wang XQ, Lindberg FP, Frazier WA.** (1999) Integrin-associated protein stimulates alpha2beta1-dependent chemotaxis via Gi-mediated inhibition of adenylate cyclase and extracellular-regulated kinases. *J Cell Biol.* 147: 389-400.
- Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG.** (1996) The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell.* 87: 733-43.
- Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG.** (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell.* 94:625-34.
- Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Chapman HA.** (1996) Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science.* 273: 1551-5.
- Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA.** (1999) A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol.* 144: 1285-94.
- Whitehead SA, Lacey M.** (2000) Protein tyrosine kinase activity of lavendustin A and the phytoestrogen genistein on progesterone synthesis in cultured rat ovarian cells. *Fertil Steril.* 73: 613-9.
- Wilkins JA, Lin S.** (1986) A re-examination of the interaction of vinculin with actin. *J Cell Biol.* 102:1085-92.
- Wilson HV.** (1907) On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J Exp Zool.* 5: 245-258.
- Wing TY, Ewing LL, Zegeye B, Zirkin BR.** (1985) Restoration effects of exogenous luteinizing hormone on the testicular steroidogenesis and Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology.* 117: 1779-87.
- Wu N, Murono EP, Carver WE, Terracio L, Bacro T.** (1996) Evidence that alpha 5 beta 1 integrins mediate Leydig cell binding to fibronectin and enhance Leydig cell

proliferation stimulated by a Sertoli cell-secreted mitogenic factor in vitro. *Endocrine* 5: 75-83.

**Yoshimura Y.** (2002) The role of integrins in the human reproductive process. *J. Reprod. Dev.* 48: 215-232.

**Zhang R, Cai H, Fatima N, Buczko E, Dufau ML.** (1995) Functional glycosylation sites of the rat luteinizing hormone receptor required for ligand binding. *J Biol Chem.* 270: 21722-8.

**Zhang R, Buczko E, Dufau ML.** (1996) Requirement of cysteine residues in exons 1-6 of the extracellular domain of the luteinizing hormone receptor for gonadotropin binding. *J Biol Chem.* 271: 5755-60.

**Zamir E, Katz BZ, Aota S, Yamada KM, Geiger B, Kam Z.** (1999) Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 112 :1655-69.

**Zamir E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Katz BZ, Lin S, Lin DC, Bershadsky A, Kam Z, Geiger B.** (2000) Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2:191-6.

**Zhu X, Assoian RK.** (1995) Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell.* 6: 273-82.