

Tesis Doctoral

Regulación de las variaciones estacionales en la sensibilidad testicular a la acción de los glucocorticoides en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Interrelación testículo-interrenal

Regueira, Eleonora

2012

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

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

Cita tipo APA:

Regueira, Eleonora. (2012). Regulación de las variaciones estacionales en la sensibilidad testicular a la acción de los glucocorticoides en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Interrelación testículo-interrenal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Regueira, Eleonora. "Regulación de las variaciones estacionales en la sensibilidad testicular a la acción de los glucocorticoides en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Interrelación testículo-interrenal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Regulación de las variaciones estacionales en la
sensibilidad testicular a la acción de los glucocorticoides
en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Interrelación
testículo-interrenal.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Eleonora Regueira

Director de Tesis: Dra. Nora R. Ceballos

Consejero de Estudios: Dra. Nora R. Ceballos

Lugar de trabajo: Laboratorio de Endocrinología Comparada,
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA, Buenos
Aires, Argentina

Buenos Aires, marzo de 2012

Regulación de las variaciones estacionales en la sensibilidad testicular a la acción de los glucocorticoides en *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Interrelación testículo-interrenal

Los anfibios anuros tienen variaciones estacionales en los andrógenos y glucocorticoides (GCs) plasmáticos. En *Rhinella arenarum* la concentración plasmática de GCs aumenta durante el período reproductivo provocando una disminución en la síntesis de andrógenos vía un receptor citosólico (GR). El objetivo de esta tesis fue evaluar las variaciones estacionales en la sensibilidad testicular a la acción de los GCs. Para ello se estudiaron los cambios en la cantidad de GR así como el efecto de los andrógenos, los GCs y la melatonina en la regulación de dichos cambios. Los estudios de la interrelación entre la glándula interrenal y el testículo indicaron que la cantidad de proteína GR testicular varía estacionalmente y que los GCs regulan de manera positiva su propio receptor mientras que melatonina disminuye la unión del GC al GR y antagoniza el efecto de los GCs. En cambio, melatonina no disminuye la síntesis de andrógenos de manera directa. En la glándula interrenal, una concentración de andrógenos alta (período prerreproductivo) disminuye la síntesis de GCs. El estudio histológico de la glándula mostró que hay dos tipos de células esteroideogénicas que podrían producir distinta cantidad de GCs y que ambas presentan una regionalización antero-posterior. Se infiere que las variaciones estacionales de andrógenos y GCs están determinadas, en parte, por la regulación recíproca entre ambas hormonas y que la sensibilidad del testículo a la acción de los GCs, cuando se considera la cantidad de GR, varía de manera estacional y está regulada por los mismos GCs y la melatonina.

Palabras clave: anuros, ciclo reproductivo, testículo, andrógenos, glándula interrenal, glucocorticoides, melatonina.

Regulation of seasonal variations in testicular sensitivity to glucocorticoids' action in *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura).
Interrelation between testis and interrenal

Anuran amphibians are characterized by having seasonal changes in plasma androgens and glucocorticoids (GCs). In *Rhinella arenarum*, plasma GCs concentration is highest during the reproductive season and GCs produce a decrease in androgen synthesis via a testicular cytosolic glucocorticoid receptor (GR). The aim of this thesis was to evaluate seasonal variations in testicular sensitivity to GCs' action by studying changes in the amount of testicular GR as well as the effect of androgens, GCs, and melatonin on its regulation. In addition, it was analyzed the interrelation between the interrenal gland and the testis. Results indicated that the amount of GR protein varies seasonally and GCs positively regulate its own receptor whereas melatonin decreases the binding of GC to the GR antagonizing GCs' effect. However, melatonin has no a direct effect on androgen synthesis. In the interrenal gland, high concentrations of androgens - corresponding to the pre-reproductive period - decrease the synthesis of GCs. Histological examination of the interrenal showed two anteroposterior regionalized steroidogenic cell types that could produce different amounts of GCs. Taking together, these results suggest that the seasonal variations of androgens and GCs are determined, at least in part, by the inter-regulation between these hormones. In addition, the GR-dependent sensitivity of the testis to the action of GCs varies seasonally and is regulated by GCs and melatonin.

Keywords: anurans, reproductive cycle, testis, androgens, interrenal gland, glucocorticoids, melatonin.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a su gente por mi formación como bióloga. A lo largo de estos años fui valorando cada vez más la manera en la cual me enseñaron a pensar, a estudiar y a entender la ciencia como la búsqueda interminable de respuestas.

También quiero agradecer a la ANPCyT, más conocida como la “Agencia”, y al CONICET por financiar mis estudios de postgrado.

Agradezco a mi directora de tesis, Nora Ceballos, por haberme dado un lugar en su laboratorio y por facilitarme todos los medios para llevar a cabo esta tesis. Al mismo tiempo le agradezco todo lo que me enseñó durante estos años de doctorado y el haberme permitido realizar y aprender una gran diversidad de técnicas.

Doy gracias por haberme encontrado con Flor, Clarita y Alina, que de manera azarosa terminamos compartiendo tantas horas juntas. Me han acompañado durante estos años en el laboratorio, aconsejándome, escuchándome y brindándome todo su apoyo y amistad. Son personas hermosas con las cuales el trabajo diario se hace mucho más llevadero. También agradezco a Cristina, con quien compartí menos tiempo, por traer buena onda al laboratorio y por aportar una “mirada maternal” de la vida.

Le agradezco a Juan Carlos Calvo y a Lucrecia Calvo por haber comprendido mi decisión de cambiarme de laboratorio y por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A Matías Pandolfi por haberme contagiado su amor por la histología y por los años que pasamos juntos haciendo docencia en la Facultad. Aprendí muchísimo a su lado y fue muy importante para mi formación. Le agradezco también su cariño, su sinceridad y las conversaciones en los pasillos del pabellón II.

Le agradezco infinitamente a Raúl por su apoyo incondicional, su amor, por tolerar mis vaivenes emocionales a lo largo del desarrollo de la tesis, por escucharme día a día y por haberme ayudado en todo lo que necesité. Porque fue una persona fundamental que me transmitió su experiencia y por ser además, la persona que amo y con quien quiero llevar adelante todos mis proyectos.

A mis papás les agradezco su apoyo y compañía durante estos años. A mi mamá por ayudarme en las pequeñas cosas que te solucionan la vida y a mi papá por revelarme siempre el lado positivo de las cosas y hacerme ver el vaso medio lleno.

Quiero agradecer también a mi tía Cecilia, a mi prima Julia, a Alejandra y a Miguel por su apoyo y por escucharme siempre. Los quiero mucho a todos.

No hubiera podido transitar estos años sin el amor y la ayuda de mis amigas de la Facultad. Les agradezco muchísimo a Mariana y a Agustina por haber estado siempre que necesité algo, por enseñarme, por escucharme y compartir tantos momentos juntas aprendiendo a hacer ciencia.

A Caro le agradezco su amistad incondicional, las meriendas de los viernes para dar el parte de la semana, los veranos al sol después del laboratorio, el cariño, el apoyo y los consejos que me da día a día para terminar la tesis.

Siempre les voy a estar agradecida a Ingrid y a Mechi porque son personas fundamentales en mi vida, mis amigas de la carrera con las cuales paso a paso nos fuimos “haciendo” biólogas.

Quiero dar gracias también a los integrantes del laboratorio de Biología del Desarrollo, principalmente a Dante, Andrea, Lucas, Tamara y Carola por todo lo que me han enseñado en estos años, por su ayuda desinteresada y por integrarme a la Facultad cuando recién entré al laboratorio hace algunos años. Realmente me hicieron sentir “como en casa” y siempre fueron muy afectuosos conmigo.

Les agradezco a Gladys y a Luquitas por acompañarnos en tantos almuerzos en las mesitas y por ayudarme ante cualquier cosa que necesitara.

Estoy muy agradecida con Carlos por haberme facilitado los papers más antiguos y que fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

A Diego Presman le agradezco haberme respondido siempre mis dudas sobre la parte más molecular del receptor de glucocorticoides y por prestarme tantas veces anticuerpos.

Finalmente, les agradezco a todas las personas de los departamentos de Biodiversidad y Biología Experimental, de Ecología, Genética y Evolución, de Química Biológica y de Química Orgánica, que me han ayudado, enseñado y prestado aparatos o insumos de manera desinteresada y que sin saberlo contribuyeron

a que pudiera terminar mi tesis. No nombro a cada una porque ¡afortunadamente fueron muchas!

Índice

Especies de anfibios y sinónimos	1
Capítulo I. Introducción, objetivos e hipótesis	2-31
I. Introducción	2
1. Los anuros	2
2. El sapo <i>Rhinella arenarum</i>	2
3. El ciclo reproductivo en los anuros: hormonas y espermatogénesis	3
4. Control hormonal de la reproducción	7
5. Los glucocorticoides y la reproducción	9
6. La glándula interrenal y la regulación de la síntesis de glucocorticoides en los anuros	13
7. Sitios de unión para glucocorticoides	17
8. El rol de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en la modulación del efecto de los glucocorticoides	23
9. La regulación del receptor de glucocorticoides	24
10. La melatonina y la reproducción	26
11. Resumiendo: el ciclo reproductivo y las variaciones estacionales de distintos parámetros en <i>R. arenarum</i>	28
I. Objetivos e hipótesis	30
Capítulo II. Estudios realizados en el testículo	32-90
II. Materiales y Métodos	32
1. Animales	32
2. Obtención del material biológico	32
3. Medios de incubación y soluciones buffer utilizadas	33
4. Validación del anticuerpo anti receptor de glucocorticoides (GR)	34
5. Obtención de la fracción subcelular enriquecida en membranas plasmáticas	35
6. Dispersión de células y separación de espermatozoides	35
7. Estudio de la variación estacional de la proteína GR	36
8. Incubaciones in vitro. Diseño experimental	36
8.1. Estudio del rol de los glucocorticoides (GC) en la regulación de la proteína citocromo P450 17 α -hidroxilasa-C ₁₇₋₂₀ liasa (cyp450c17)	36

8.2. Estudio de la regulación del GR	38
8.2.1. Rol de los andrógenos en la regulación del GR	39
8.2.2. Rol de los GC en la regulación del GR	40
8.2.3. Rol de la melatonina en la regulación del GR	41
8.2.4. Efecto de la melatonina sobre la constante de afinidad del GR	42
8.2.5. Efecto de la melatonina en la regulación del GR a tiempos cortos	42
8.3. Efecto de la melatonina en la síntesis basal de andrógenos	43
9. Procesamiento de los testículos incubados in vitro para la determinación del GR	43
10. Estimación del número de sitios de unión a Dexametasona	43
11. Estimación de la constante de disociación por ensayos de competencia	44
12. Análisis por Western blot	45
12.1. Proteína GR	45
12.2. Proteína cyp450c17	46
12.3. Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)	47
13. Radioinmunoensayo de testosterona	48
14. Medición de melatonina plasmática por ELISA	49
15. Análisis estadístico	50
II. Resultados	52
1. Efecto de los GC en la proteína cyp450c17	52
2. Validación del anticuerpo anti GR e isoformas del GR testicular	52
3. Proteína GR en la fracción subcelular enriquecida en membranas plasmáticas y en homogenato de células dispersas de testículo sin espermatozoides	56
4. Variación estacional de la proteína GR	57
5. Rol de los andrógenos en la regulación del GR	58
6. Rol de los GC en la regulación del GR	62
7. Rol de la melatonina en la regulación del GR	64
8. Ensayo de unión del GR a Dexametasona en presencia de melatonina y luzindole	69
9. Efecto de melatonina en la producción basal de testosterona	69
10. Concentraciones plasmáticas de melatonina en <i>R. arenarum</i>	70
II. Discusión	72
1. El efecto de los GCs en la función esteroideogénica	72

2. El GR	75
3. Variaciones estacionales del GR	78
4. Regulación hormonal del GR	81
5. Rol de la melatonina en la regulación de la síntesis de andrógenos	88
Capítulo III. Estudios realizados en la glándula interrenal	91-141
III. Materiales y Métodos	91
1. Animales	91
2. Obtención del material biológico	91
3. Medios de incubación, buffers, soluciones colorantes y fijadores	91
4. Incubaciones in vitro. Diseño experimental	93
4.1. Estudio del rol de los andrógenos en la regulación de la síntesis de corticosterona	93
4.1.1. Incubación por 24 h	94
4.1.2. Incubación por 48 h	94
4.2. Estudio de la variabilidad antero-posterior de la glándula interrenal en la síntesis de corticosterona	95
5. Procesamiento del material para histología e inmunohistoquímica	96
6. Procesamiento del material fijado para colorear con Sudan III	96
7. Procesamiento del material fijado para microscopía electrónica	97
8. Inmunohistoquímica de las enzimas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3 β -HSD/I) y tirosina hidroxilasa (TH)	97
9. Análisis por Western blot de las enzimas 3 β -HSD/I y TH	98
10. Radioinmunoensayo de corticosterona	99
11. Análisis estadístico	100
III. Resultados	101
1. Estudio del rol de los andrógenos en la regulación de la síntesis de corticosterona	101
2. Variación antero-posterior de la síntesis de corticosterona por la glándula interrenal	105
3. Estudio de la glándula interrenal con técnicas de histología clásicas	106
3.1. Coloraciones topográficas	106
3.2. Coloraciones histoquímicas de PAS y Alcian blue	109
3.3. Coloración de lípidos con Sudan III	110
4. Identificación de células esteroideogénicas y productoras de catecolaminas por técnicas de inmunohistoquímica	110

5. Estudio histológico de la organización y regionalización de las distintas células en la glándula interrenal	115
6. Estudio de la glándula interrenal y diferenciación de tipos celulares en cortes semifinos	117
7. Caracterización ultraestructural de los tipos celulares por microscopía electrónica de transmisión (MET)	120
III. Discusión	130
1. Regulación de la síntesis de corticoides en la glándula interrenal	130
2. Estudio histo-fisiológico de la regionalización y actividad de la glándula interrenal	133
Capítulo IV. Conclusiones	142-147
IV. Conclusiones	142
Bibliografía	148

Especies de anfibios y sinónimos

El conocimiento de la diversidad de los anfibios es cambiante debido a que día a día se realizan nuevas descripciones y revisiones. El parentesco entre las especies se encuentra en revisión constante y de allí surge que los nombres que se le otorgan a cada una sean muy variables. Dado que en esta tesis se utiliza la nomenclatura más actualizada, planteada por Frost (2011, *Amphibian Species of the World 5.5*, an Online Reference, AMNH), a continuación se mencionan los sinónimos más conocidos de las especies mencionadas:

Agalychnis dacnicolor = *Pachymedusa dacnicolor*

Anaxyrus terrestris = *Bufo terrestris*

Duttaphrynus melanostictus = *Bufo melanostictus*

Euphlyctis cyanophlyctis = *Rana cyanophlyctis*

Euphlyctis hexadactylus = *Rana hexadactyla*

Lithobates catesbeianus = *Rana catesbeiana*

Lithobates pipiens = *Rana pipiens*

Pelophylax esculentus = *Rana esculenta*

Pelophylax perezi = *Rana perezi*

Pelophylax ridibundus = *Rana ridibunda*

Pseudepidalea viridis = *Bufo viridis*

Rhinella arenarum = *Bufo arenarum*

Rhinella marina = *Bufo marinus*

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

I | Introducción

1. Los anuros

Los anuros, vulgarmente conocidos como ranas, sapos y escuerzos, constituyen el grupo de anfibios vivientes más numeroso (ca. 5900 especies vivientes; Frost, 2011) y más extendido geográficamente (Vitt y Caldwell, 2009). La mayoría de las especies del grupo se caracteriza por ser altamente dependiente de la presencia de cuerpos de agua para reproducirse y desarrollarse. En consecuencia, dichas especies tienen el típico ciclo de vida anfibio que se denomina bifásico por tener una fase acuática y una terrestre. Además, los anuros son modelos ideales para los estudios biológico-evolutivos (e.g., Handrigan y Wassersug, 2007) e importantes indicadores de la degradación ambiental. Los rápidos cambios climático-ambientales que ocurren a nivel global han provocado que existan numerosas poblaciones en declinación (Stuart y col., 2004).

Los anuros se han diversificado eco-morfológicamente en una gran disparidad de formas, ocupando una enorme variedad de hábitats y alcanzando una distribución geográfica casi cosmopolita (Vitt y Caldwell, 2009). Esta diversidad y disparidad eco-morfológica, en conjunción con los inusuales ciclos de vida, comportamiento y anatomía han conspirado contra la resolución de las relaciones de parentesco entre los anuros a partir de datos fenotípicos y/o fisiológicos (Ford y Canatella, 1993; Haas, 2003; Trueb, 1993).

2. El sapo *Rhinella arenarum*

Rhinella arenarum es una especie de bufónido sudamericano de gran abundancia y amplia distribución dentro de nuestro país. Los estudios de Gallardo (1965) indican que se extiende desde Bolivia (Departamento de Cochabamba) hasta la provincia de Chubut en Argentina y desde el estado brasileño de Río Grande do Sul hasta la Cordillera de los Andes. Sin embargo, a pesar de su amplia distribución presenta pocos indicios de diferenciación en subespecies. Se trata de una especie adaptada no sólo a la vida en distintas condiciones térmicas sino también a distintas

situaciones de humedad y altitud. Habita desde regiones de clima tropical a regiones de temperaturas cercanas a 0°C y zonas húmedas de más de 1000 mm anuales de precipitación a zonas secas con menos de 500 mm. Además, existen poblaciones que habitan regiones situadas a nivel del mar y otras a 2500 metros de altura (Incachaca, Bolivia).

En cuanto a su reproducción, Gallardo (1965) describió para las poblaciones que habitan la provincia de La Pampa que la estación reproductiva abarca los meses que comprenden la primavera y principios del verano, lo cual coincide con la estación de lluvias en esa zona. El mismo autor, en otro trabajo, estableció que la etapa reproductiva de las poblaciones que habitan el Gran Buenos Aires y La Plata se extiende desde mediados de septiembre hasta principios de diciembre (Gallardo, 1974).

Con respecto al momento en que alcanza su capacidad reproductiva y teniendo en cuenta las características observadas en las células del testículo, Echeverría (1987) concluyó que los machos de *R. arenarum* llegan a la madurez sexual en el cuarto año de vida. En ese trabajo se observó que la cuarta onda espermatogénica marca el inicio de la etapa de vida adulta y que dicha onda comienza en la primavera del tercer año y finaliza en la primavera del cuarto año, época en que se reproduce por primera vez.

Una característica típica de esta especie y de los bufónidos en general es que en el extremo anterior del testículo de los machos adultos se suele encontrar una estructura similar a un ovario rudimentario que se denomina órgano de Bidder (Echeverría, 1990). Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que este órgano tiene capacidad esteroideogénica (Scaia y col., 2011).

3. El ciclo reproductivo en los anuros: hormonas y espermatogénesis

Respecto de la estacionalidad de la reproducción, los anuros muestran dos patrones que están relacionados con el ambiente que habitan. Por un lado, se observa que las especies tropicales pueden reproducirse durante todo el año y la lluvia es el factor extrínseco que más influye en promover la reproducción (Prado y col., 2005). Por otro lado, las especies de zonas templadas se reproducen de manera estacional y

dicha actividad depende de la combinación favorable de las condiciones de temperatura y de lluvia (Prado y col., 2005).

La actividad reproductiva que muestran las distintas especies, por otro lado, se puede clasificar en: 1) prolongada, cuando los individuos se reproducen por más de tres meses consecutivos, la llegada de las hembras al sitio de reproducción es asincrónica y los machos defienden el territorio (Wells, 1977); 2) explosiva, se observa en aquellas especies en las cuales los individuos tienen actividad reproductiva que dura uno o pocos días, la llegada de las hembras y los machos al sitio de reproducción es sincrónica y los machos adoptan distintas tácticas para buscar a las hembras (Wells, 1977).

En las regiones templadas, como fuera mencionado, la actividad reproductiva está asociada con la temperatura y las precipitaciones, determinándose que la mayoría de las especies se reproduce durante la época cálida y húmeda (Caldwell, 1987; Pombal, 1997; Wiest, 1982). Sumado a esto, la actividad reproductiva está vinculada con la disponibilidad de cuerpos de agua temporales, con lo cual las especies que habitan estas regiones tienen un período reproductivo de corta duración o lo que se definió previamente como reproducción explosiva. Sin embargo, se ha observado que distintas especies pueden modificar sus hábitos reproductivos frente a modificaciones de su hábitat, lo cual plantea una gran plasticidad fisiológica frente a los cambios ambientales (da Rosa y col., 2006).

Como fuera descripto, *R. arenarum* habita distintas zonas templadas y se reproduce de manera explosiva durante la primavera. Burgos y Mancini (1948) publicaron que durante ese período puede hacerlo más de una vez dado que luego de la expulsión de los espermatozoides durante el abrazo sexual o amplexo se reinicia una onda espermatogénica que repone los espermatozoides expulsados en aproximadamente 96 horas. Sin embargo, trabajos realizados en nuestro laboratorio sobre las variaciones estacionales en la liberación de espermatozoides ponen en duda los resultados de Burgos y Mancini (1948) y sugieren que *R. arenarum* sólo se reproduce una vez al año (Pozzi y Ceballos, 2000 y datos no publicados).

El testículo de los anuros, al igual que el de todos los vertebrados, está organizado en dos compartimentos separados, el germinal y el intersticial. En el compartimento germinal ocurre la espermatogénesis y, en los anfibios, está formado

por lóbulos que contienen a los cistos. Estos últimos son grupos de células germinales que se encuentran en el mismo estadio de la espermatogénesis y están rodeadas por las proyecciones citoplasmáticas de las células de Sertoli. El compartimento intersticial se encuentra entre los lóbulos seminíferos y está constituido por las células de Leydig, productoras de hormonas esteroideas sexuales, y también por tejido conectivo y vasos sanguíneos. Ambos compartimentos varían en forma cíclica y los cambios en el volumen testicular se encuentran estrechamente relacionados con su actividad. En la primavera, los testículos son gruesos, turgentes y están muy vascularizados, lo cual es debido a que poseen mayor número de espermatozoides listos para ser expulsados. La separación de los espermatozoides de las células de Sertoli y su liberación hacia el exterior se denomina espermiación (van Oordt y Klomp, 1946).

Los anfibios anuros tienen un ciclo espermatogénico anual que puede ser continuo o discontinuo (van Oordt, 1960). En el primer caso, la espermatogénesis se encuentra en actividad continua durante todo el año y, aunque ciertos estadios espermatogénicos predominan en algunas épocas, se pueden observar espermatozoides maduros en cualquier momento del año. Este es el caso de especies como *R. arenarum* (Burgos y Mancini, 1948) y *Pelophylax esculentus* (Galgano, 1934). En *R. arenarum*, se observa además que el número de espermátidas y espermatozoides se incrementa marcadamente cuando comienza el período reproductivo (Pozzi y Ceballos, 2000). En el ciclo discontinuo, la espermatogénesis comienza luego de la época reproductiva y se interrumpe durante los meses de invierno o de mucho frío. Este patrón anual se observa, entre otras especies, en *Rana temporaria* (Callard y col., 1978).

También se han descrito ciclos en el compartimento intersticial que están relacionados con los cambios estacionales en la producción de hormonas esteroideas. En *R. temporaria* y *P. esculentus* se estableció que durante la hibernación las células de Leydig no tienen lípidos ni actividad de la enzima esteroideogénica 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3β -HSD/I; Callard y col., 1978). A finales del invierno, las células comienzan a llenarse de lípidos y la actividad de la enzima 3β -HSD/I aumenta. Luego de la puesta de los huevos tanto los lípidos como la actividad de la enzima mencionada comienzan a disminuir, las células de Leydig ingresan en regresión y no se las diferencia de las células del tejido conectivo

intersticial. El significado endocrinológico de estas observaciones es incierto dado que en un trabajo posterior se estudiaron los niveles plasmáticos de los andrógenos en *P. esculentus* y se observó que los mismos aumentan durante el otoño e invierno y decrecen durante la primavera (Fasano y col., 1989, 1993).

Diversos estudios han demostrado que en los anuros existen variaciones estacionales en la síntesis de esteroides a nivel testicular así como cambios cíclicos en las concentraciones plasmáticas de distintos esteroides sexuales. Canosa y Ceballos (2002a) demostraron que en *R. arenarum* la biosíntesis de esteroides cambia durante el período reproductivo pasando de la producción de andrógenos a la de esteroides de 21 átomos de carbono (progesterona, 5 α -pregnan-3 α ,20 α -diol, 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona y 5 α -pregnan-3,20-diona). Se desconoce la función de estos últimos esteroides en los anfibios pero podrían actuar como esteroides neuroactivos, modulando el comportamiento reproductivo, al igual que ocurre en los mamíferos (Frye y Vongher, 1999; Frye y col., 1996, 1998). Unos años más tarde, Denari y Ceballos (2005) y Fernández Solari y col. (2002) corroboraron que los niveles plasmáticos de andrógenos disminuyen durante el período reproductivo y, además, subdividieron el período no reproductivo en un período prerreproductivo (mayo-agosto), con niveles plasmáticos de testosterona muy altos y un período postreproductivo (enero-abril), en el cual la concentración plasmática de testosterona es intermedia entre los otros dos. Estos resultados sugieren que *R. arenarum*, al igual que *P. esculentus*, tiene un patrón reproductivo disociado de andrógenos y que los esteroides reducidos de 21 átomos de carbono podrían cumplir un rol en el comportamiento reproductivo. En otros anuros, se postuló que los niveles altos de andrógenos previos a la reproducción inducirían la aparición de los caracteres sexuales secundarios característicos del macho (d'Istria y col., 1974; Itoh y col., 1990; Rastogi y col., 1976). Entre estos caracteres se encuentran el agrandamiento y endurecimiento del callo plantal, la modificación de los músculos de la laringe asociados a los sacos vocales y los cambios en la coloración (Sever y Staub, 2011).

En otras especies de anuros como *Pelophylax perezi*, *Lithobates catesbeianus*, *Agalychnis dacnicolor* y *Xenopus laevis*, la época reproductiva está asociada con niveles plasmáticos altos de andrógenos (Delgado y col., 1989; Mendonça y col., 1985; Rastogi y col., 1986; Wetzel y Kelley, 1983) y por lo tanto se denominan especies con un patrón reproductivo asociado a andrógenos.

De todo lo expuesto, resulta evidente que hay una gran variabilidad en la fisiología reproductiva de los anuros. Respecto de la interacción entre el ciclo esteroidogénico y el ciclo espermatogénico, diversos estudios han evaluado el rol de los andrógenos en la espermatogénesis. En *Lithobates pipiens* y en *Leptodactylus chaquensis* se observó que los andrógenos podían estimular o inhibir la espermatogénesis según el momento del ciclo (Callard y col., 1978). En *P. perezi* y *P. esculentus* se demostró que mientras que las gonadotrofinas hipofisarias estimulan la formación de los primeros estadios de la espermatogénesis, aumentando la mitosis de las espermatogonias y favoreciendo la formación de los espermatoцитos I y II, los andrógenos estimulan la formación de las espermátidas (Delgado y col. 1989; Rastogi y col., 1976).

4. Control hormonal de la reproducción

En los anfibios, como ocurre en todos los vertebrados, el control de la reproducción es ejercido por la glándula hipófisis. Los estudios que intentaron demostrar si el sistema se halla bajo el control de una o dos gonadotrofinas, como en mamíferos, se basaron en la administración exógena de dichas gonadotrofinas. Lofts (1961) demostró que la inyección de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) de mamíferos en individuos hipofisectomizados de *R. temporaria* estimulaba en el testículo tipos celulares específicos. Mientras que la inyección de LH indujo la espermiación y la hipertrofia de las células de Leydig, la inyección de FSH estimuló la división de las espermatogonias y de las células de Sertoli. Este autor propuso que en los anuros, al igual que ocurre en los mamíferos, la función testicular está regulada por dos gonadotrofinas. Sin embargo, los resultados de otros trabajos han sido ambiguos respecto de la especificidad de la respuesta de los anuros a LH y FSH (Callard y col., 1978). Por ejemplo, Licht (1973) demostró que utilizando preparaciones extremadamente puras de LH y FSH ovina, con niveles de contaminación cruzada indetectables, es posible inducir en forma equipotente el proceso de espermiación en *L. pipiens*, *Pseudacris regilla* y *Eleutherodactylus coqui*. Entonces, a pesar de que en los anfibios las gonadotrofinas pueden ser clasificadas como moléculas semejantes a FSH y LH de mamíferos (Licht y Papkoff, 1974;

Papkoff y col., 1976), no hay certeza sobre cuál es la célula blanco testicular de cada una y tampoco si existen uno o dos receptores diferentes. Esto se debe fundamentalmente a que en todos los trabajos se utilizaron hormonas heterólogas.

En *R. arenarum*, los primeros estudios experimentales sobre la regulación de la función testicular mostraron que la hipofisectomía provoca la regresión del testículo (Giusti y Houssay, 1923). Varios trabajos realizados en nuestro país describieron los efectos de las gonadotrofinas en los machos de dicha especie (Burgos, 1951; Burgos y Houssay, 1957; Burgos y Rufino, 1952; Iriarte y Burgos, 1958, Mancini y Burgos, 1947; Pisanó y Burgos, 1971; Pizarro y Burgos, 1963; Pozzi y Ceballos, 2000; Pozzi y col., 2006). En ellos, se observó que dichas hormonas estimulan y mantienen la espermatogénesis, el compartimento intersticial, la liberación de los espermatozoides y contribuyen a desarrollar y mantener los caracteres sexuales secundarios y el comportamiento sexual. Respecto del papel de cada gonadotrofina en la función testicular, en nuestro laboratorio se estudió el efecto *in vitro* de la LH y la FSH recombinante humana en la espermiación y en la síntesis de testosterona (Pozzi y col., 2006). Estos autores observaron que mientras que FSH estimula más eficientemente la espermiación, tanto LH como FSH estimulan de forma aguda la síntesis de andrógenos y postulan que la espermiación y la esteroidogénesis estarían inducidas por distintos receptores de gonadotrofinas.

Por otro lado, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se observó que tanto FSH como la gonadotrofina coriónica humana (hCG, con función similar a LH en mamíferos) inhiben la síntesis de andrógenos luego del tratamiento *in vitro* por períodos prolongados (Canosa y Ceballos, 2002b). La aparente discrepancia entre lo observado en este trabajo y el de Pozzi y col. (2006) se debe a que en un caso se evaluó el efecto de las gonadotropinas en forma crónica (48 h de tratamiento) mientras que en el otro se hizo en forma aguda (2 h). Canosa y Ceballos (2002a, b) postularon que en *R. arenarum* la FSH podría estar involucrada en la regulación de los cambios que se producen en la esteroidogénesis testicular durante el período reproductivo a través de la inhibición de la enzima esteroidogénica citocromo P450 17α -hidroxilasa-C₁₇₋₂₀ liasa (cyp450c17).

Aunque se desconocen los niveles plasmáticos de gonadotrofinas en *R. arenarum*, en otros anuros se observó que tanto los niveles de FSH como de LH aumentan durante el período reproductivo, aún en aquellas especies con un patrón

reproductivo disociado de andrógenos (Itoh y Ishii, 1990; Itoh y col., 1990; Kim y col., 1998; Licht y col., 1983; Polzonetti-Magni y col., 1998). Estas observaciones sugieren que la concentración plasmática de FSH en *R. arenarum* también podría aumentar durante el período reproductivo y redirigir la esteroidogénesis testicular hacia la síntesis de esteroides reducidos de progesterona.

Licht y col. (1983) estudiaron en *L. catesbeianus* las variaciones estacionales de los niveles plasmáticos de gonadotrofinas, esteroides sexuales y corticosterona, en condiciones basales y de estrés inducido por la captura. Estos autores observaron que, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, los niveles plasmáticos de gonadotrofinas y de andrógenos no muestran una relación recíproca simple de retroalimentación negativa entre la secreción de las gónadas y la hipófisis, ni tampoco una correlación positiva como se esperaría de una dependencia directa de la función gonadal de los niveles circulantes de las gonadotrofinas. Por lo tanto, sugieren que los cambios en la actividad testicular no se deben solamente a las variaciones estacionales de los niveles circulantes de LH y FSH. Cabe destacar que ese trabajo los niveles circulantes de estrógenos y de derivados reducidos de progesterona no se determinaron.

5. Los glucocorticoides y la reproducción

Los glucocorticoides (GCs) son mayormente conocidos por su función como mediadores hormonales de la respuesta al estrés. Durante el siglo pasado se describieron diversos efectos de los GCs sobre distintos tipos celulares, aunque dichos estudios parecen ser una sumatoria de efectos celulares, fisiológicos y farmacológicos poco relacionados que atentan contra una visión integrada del rol de estas hormonas (ver revisión en Munck y col., 1984; Sapolsky y col., 2000). Entre los efectos descritos se encuentran: la estimulación de la gluconeogénesis hepática, la inhibición del consumo de glucosa en los tejidos periféricos, la supresión de la inflamación, el aumento de la excreción de agua, la supresión de numerosas reacciones inmunes y la inhibición de la secreción de diversas hormonas y neuropéptidos. Se sugirió que todos estos efectos se pueden englobar en una función fisiológica global que es aumentar la resistencia al estrés y, además, que los efectos de los GCs se pueden dividir en tres clases (Munck y col., 1984; Sapolsky y col.,

2000). Por un lado, los niveles basales de GCs prepararían al organismo para responder al estrés. Por otro, la secreción de GCs inducida por una situación de estrés mediaría la respuesta a dicha situación y por último, los mismos GCs limitarían la respuesta al estrés y contribuirían a que el organismo se recupere de dicha experiencia negativa.

Diversos estudios han examinado la interacción entre los GCs y el funcionamiento gonadal, mostrando que en la mayoría de los casos los GCs inhiben la liberación de las hormonas gonadales y el comportamiento reproductivo (Sapolsky y col., 2000). En los mamíferos, por ejemplo, la liberación de GCs inducida por estrés inhibe directamente la producción de andrógenos en la célula de Leydig (Dong y col., 2004; Gao y col., 1996; Hu y col., 2008; Monder y col., 1994). Además, Dong y col. (2004) observaron que la disminución de la síntesis de andrógenos que se produce en una situación de estrés agudo es independiente del efecto de los GCs sobre la liberación de LH hipofisaria y que los GCs actúan rápidamente en la célula de Leydig por un mecanismo no genómico e independiente del receptor clásico de GCs y luego por un mecanismo genómico mediado por el receptor convencional.

En las aves, algunos estudios evaluaron la relación entre el eje adrenal y gonadal y en ellos se describió que, al igual que en los mamíferos, la disminución de los niveles plasmáticos de testosterona inducidos por el estrés agudo no está mediada por cambios en los niveles de LH (Deviche y col., 2010). Por otro lado, en estudios con un enfoque más comportamental, se analizó el efecto del implante de parches con testosterona sobre los niveles plasmáticos de corticosterona y se observó que los individuos a los que se les había aplicado el parche con testosterona tuvieron mayores concentraciones de corticosterona que los controles (Ketterson y col., 1991; Schoech y col., 1999). En dichos estudios se sugiere que los cambios fisiológicos que se desencadenan por los niveles plasmáticos elevados de andrógenos serían costosos para el individuo y que el aumento de la corticosterona plasmática ayudaría a enfrentar dichos costos. Asimismo, estos trabajos postulan que en las aves los GCs inhibirían la síntesis de testosterona a nivel gonadal mientras que los andrógenos estimularían la síntesis de GCs en la glándula adrenal (Deviche y col., 2010; Ketterson y col., 1991; Schoech y col., 1999). Se desconoce si el efecto de los

andrógenos es directo sobre la glándula adrenal o si está mediado por la activación del eje hipotálamo-hipofisario.

Por otra parte, diversos estudios realizados en lagartos y en el tritón *Taricha granulosa* demostraron que tanto el estrés como las inyecciones de corticosterona inhiben el comportamiento reproductivo de los machos (Greenberg y Wingfield, 1987; Guillette y col., 1995; Lance, 1990; Moore y Miller, 1984; Tyrrelland y Cree, 1998). Sin embargo, varios trabajos realizados en diversas especies de anfibios y reptiles señalaron que hay una relación positiva entre los niveles plasmáticos de corticosterona y la reproducción (ver revisión en Moore y Jessop, 2003; Romero, 2002). Esta relación positiva se puede dividir en dos categorías: la primera, es un aumento estacional en los niveles basales de corticosterona asociado con el inicio de la época reproductiva. En este caso los niveles de corticosterona permanecen elevados desde semanas a meses. La segunda categoría incluye aquellos casos en los cuales el aumento de los niveles de corticosterona coincide con un comportamiento reproductivo con demanda energética elevada. En este caso, la concentración plasmática de corticosterona aumenta sólo durante horas o a lo sumo durante días.

Según Moore y Jessop (2003), estos estudios contradicen la teoría de que el estrés inhibe la reproducción y plantean que los niveles elevados de GCs durante la época reproductiva facilitarían la movilización de las reservas energéticas necesarias para una etapa de gasto energético alto. Romero (2002) también plantea esta hipótesis y además sugiere otras dos que proponen que el aumento de los GCs durante el período reproductivo induciría cambios en el comportamiento y que podría preparar al animal para posibles encuentros con estímulos nocivos.

Hasta donde nosotros sabemos no hay estudios previos a los realizados en nuestro laboratorio que hayan evaluado el efecto directo de los GCs en la función gonadal de los anuros. A este respecto, Malamud (2005) y Tesone y col. (2012) evaluaron el efecto de la corticosterona, que es el GC que se sintetiza en *R. arenarum* (Ceballos y col., 1983), y de dexametasona (Dexa) y demostraron que en *R. arenarum* los GCs disminuyen la síntesis de andrógenos a nivel testicular de manera dependiente de la dosis y a través de la inhibición de la actividad de la enzima esteroideogénica *cyp450c17*. Las concentraciones de corticosterona que inducen dicha inhibición son las correspondientes a los niveles plasmáticos medidos en el período reproductivo (150 nM) y a los de una situación de estrés (1500 nM); en cambio la

concentración más baja (15 nM), cercana a la medida en el plasma durante el período prerreproductivo, no modifica la síntesis de andrógenos. Este hallazgo sugiere, por primera vez en los anuros, que los GCs junto con las gonadotropinas podrían modular las variaciones estacionales en la síntesis de testosterona y que los niveles elevados de corticosterona inducidos durante una situación de estrés inhibirían la síntesis de andrógenos independientemente del efecto del estrés sobre las hormonas hipofisarias. Además, Tesone y col. (2012) observaron que la enzima 5α -reductasa, que se localiza tanto en las células de Leydig como en las de Sertoli, reduce la corticosterona a 5α -dihidrocorticosterona (DHB) y que DHB se une al receptor de GCs testicular comportándose como un agonista con igual potencia que la corticosterona. Tanto la corticosterona como la DHB disminuyen la actividad de la enzima *cyp450c17* (Malamud, 2005; Tesone y col., 2012) aunque se desconoce si dicho efecto es a través de la inhibición de la síntesis de la proteína, del aumento de la degradación de la proteína o de modificaciones postraduccionales que modifiquen la actividad. En los mamíferos, se describió que estos tres mecanismos regulan la actividad de los citocromos en las células esteroideogénicas (Aguar y col., 2005; Payne, 1990).

Con respecto al efecto de los GCs sobre otras funciones del testículo, como la espermatogénesis y la espermiación, Malamud (2005) demostró que en los testículos de *R. arenarum* incubados con corticosterona durante 24 h la espermiación inducida por la hCG es mayor que en los testículos incubados con medio solo y que este efecto es mediado por el GR. Este resultado sugiere que los GCs tienen un rol fundamental ya sea manteniendo la unión de los espermatozoides a las células de Sertoli hasta el momento de la acción de hCG o manteniendo la capacidad de las células para responder al estímulo de hCG. Sin embargo, en esta especie se desconoce el efecto de los GCs en la espermatogénesis. En este sentido, Biswas y col. 2000 observaron que el tratamiento in vivo con corticosterona disminuye la cantidad de espermatogonias y espermatozoides en el testículo del anuro *Duttaphrynus melanostictus*, aunque se desconoce si este efecto es por la acción directa sobre el testículo o por una disminución en la concentración plasmática de gonadotropinas.

En aquellas especies de anuros, como *L. catesbeianus*, en las cuales coinciden los niveles plasmáticos elevados de andrógenos y corticosterona durante el período

reproductivo es probable que los GCs circulantes no inhiban la síntesis de andrógenos o que en todo caso haya otros mecanismos que disminuyan la acción biológica de la corticosterona sobre la esteroidogénesis (Mendonça y col., 1985). En tal sentido, se debe considerar que la sensibilidad de un órgano a la acción de los GCs está determinada por la cantidad y afinidad de sus receptores y por la presencia y actividad de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo II que inactiva GCs. La acción biológica de los GCs también depende de las variaciones plasmáticas de la proteína transportadora de corticosteroides que podrían modificar la biodisponibilidad de corticosterona libre. En los puntos 7 y 8 se introducirán con mayor detalle cada una de estas variables y los mecanismos que modulan la acción biológica de los GCs.

6. La glándula interrenal y la regulación de la síntesis de glucocorticoides en los anuros

En los vertebrados, los GCs (corticosterona o cortisol, según la especie) son sintetizados por la glándula adrenal/interrenal que se encuentra asociada a los riñones en menor o mayor medida según el grupo. En los anuros, la glándula interrenal es un órgano vermiforme de color anaranjado que se adhiere íntimamente a la cara ventral del riñón opistonéfrico y está formada por células esteroidogénicas, o corticales por su homología con la corteza adrenal de los mamíferos, y por células cromafines productoras de catecolaminas (Grassi Milano y Accordi, 1983). En algunas especies, además, se encuentran las células de verano o de Stilling similares a los mastocitos y cuya función hoy en día sigue siendo controversial (Kawamura, 1986; Lesouhaitier y col., 1996; Moorhouse, 1963; Sottovia-Filho, 1974).

En los neobatracios, que constituye el grupo de anuros con caracteres más derivados e incluye a *R. arenarum*, la glándula rodea a la vena renal eferente y está organizada en cordones celulares anastomosados de varias células de espesor separados por capilares sinusoides amplios (Grassi Milano y Accordi, 1983). Los cordones están mayormente formados por células esteroidogénicas alternadas con grupos pequeños de células cromafines que se integran al cordón y que no siempre se encuentran en contacto directo con capilares sinusoides. En todos los anuros analizados se observó que hay dos tipos de células cromafines, unas que sintetizan

mayormente adrenalina y otras noradrenalina y que algunas de las células cromafines se encuentran inervadas por fibras colinérgicas (Grassi Milano y Accordi, 1983). Sin embargo, trabajos más recientes demostraron que sólo en algunas especies de anuros se observan fibras colinérgicas asociadas a las células cromafines y que, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, las células cromafines no son estimuladas por acetilcolina sino que este neurotransmisor estimula las células esteroideogénicas (ver revisión en Lesouhaitier y col., 1995).

Los estudios histológicos de la glándula interrenal mostraron que no existe una regionalización precisa de los distintos tipos celulares (Hanke y Weber, 1965; Nonaka y col., 1995; Süren, 1999). En estos trabajos, realizados en *R. temporaria*, *L. catesbeianus* y *Pelophylax ridibundus*, se describió que las células cromafines se encuentran mayormente localizadas en la región central de la glándula y que en la zona periférica hay cordones de células esteroideogénicas y células de Stilling. Además, Hanke y Weber (1965) y Süren (1999) describieron que las células esteroideogénicas más periféricas muestran signos de mayor actividad que las células más centrales. Según Hanke y Weber (1965) los signos indicativos de mayor actividad fueron: mayores niveles de ARN, núcleos esféricos y nucleolo distintivo; además, las células esteroideogénicas centrales no se organizan de manera compacta tal como lo hacen las células más periféricas. Por su parte, Süren (1999) evaluó el grado de actividad de las células basándose en el criterio del tamaño nuclear y describió que las células más periféricas tenían un núcleo de mayor tamaño y por lo tanto eran las más activas. Los distintos autores interpretaron que las diferencias encontradas entre las células esteroideogénicas podían deberse al estado funcional de las células o a diferencias en sus productos de secreción. Relacionado con esto último, está bien establecido que en los mamíferos los esteroides producidos en la adrenal son sintetizados en tipos celulares diferentes que se localizan en regiones distintas de la glándula. La corticosterona se sintetiza en las células de la zona fasciculada y la aldosterona en las células de la zona glomerulosa (Geneser, 2000). Sin embargo, aún sigue siendo controversial si en los anuros los principales esteroides sintetizados por la glándula, aldosterona y corticosterona, son producidos por el mismo tipo celular.

Diversos trabajos han enfocado el estudio de este interrogante a través del análisis de la regulación diferencial de la síntesis de ambos esteroides (Carstensen y

col., 1961; Dupont y col., 1976; Hanke y Weber, 1964; Johnston y col., 1967; Laub y col., 1975; Maser y col., 1981; Netchitailo y col., 1984; Pozzi y col., 2002; Varma, 1977). Los resultados de estos estudios demostraron que la hormona hipofisaria adrenocorticotrofina (ACTH) regula positivamente y con igual magnitud la síntesis de aldosterona y de corticosterona y, además, que ambos esteroides regulan negativamente la secreción de ACTH actuando a nivel hipotalámico. Por otro lado, el sistema renina-angiotensina controla la secreción tanto de aldosterona como de corticosterona. Estas observaciones sugieren que en los anuros no habría un mecanismo de control dual para la síntesis de gluco y mineralocorticoides como existe en los mamíferos. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de las variaciones en las concentraciones salinas se obtuvieron resultados divergentes. Por un lado, Braverman y col. (1973) y Pozzi y col. (2002) informaron que en *L. catesbeianus* y en *R. arenarum*, respectivamente, las variaciones de los niveles de Na^+ modifican la concentración plasmática de aldosterona sin afectar los niveles de corticosterona. Por otro lado, Maser y col. (1981) observaron que en *R. temporaria* el aumento de la concentración de Na^+ produce una disminución dosis dependiente en la síntesis tanto de aldosterona como de corticosterona. Estos resultados hablan de una posible regulación diferencial de ambos esteroides en algunas especies pero no son concluyentes sobre si son sintetizados por un mismo tipo celular.

Solamente un trabajo realizado en *L. catesbeianus* sugiere que la aldosterona y la corticosterona son sintetizadas en distintas células (Varma, 1977). Este trabajo se basa en el estudio ultraestructural de la glándula interrenal luego del tratamiento in vivo con ACTH, agua destilada, un inhibidor de la síntesis de esteroides adrenales (metopirona) o un antagonista del receptor de aldosterona (espironolactona). Los resultados mostraron que todos los tratamientos produjeron un aumento de la actividad en la glándula pero que particularmente el agua destilada y la espironolactona indujeron un aumento en la cantidad de células con mitocondrias con crestas lamelares, mitocondrias que son características de las células de la zona glomerulosa (productora de aldosterona) de la glándula adrenal de los mamíferos. La conclusión del trabajo, por lo tanto, se basa en las observaciones realizadas en mamíferos y no es convincente respecto de si son dos tipos celulares diferentes dado que podrían ser células que cambian su vía biosintética frente al estímulo de bajo sodio o baja aldosterona.

Ahondando en el estudio de la regulación de la función interrenal, diversos autores describieron que distintas hormonas producidas por las células cromafines como arginina vasotocina, serotonina, dopamina, adrenalina y noradrenalina regulan de manera paracrina la síntesis de aldosterona y corticosterona (Kloas y Hanke, 1990, 1992; Lesouhaitier y col., 1995; Morra y col., 1990).

A pesar de los múltiples estudios que existen acerca de la glándula interrenal de anuros, poco se conoce en ellos sobre el rol de los esteroides gonadales en la regulación del funcionamiento de dicha glándula. En la mayoría de las especies estudiadas las concentraciones plasmáticas de corticosterona tienen variaciones estacionales (Romero, 2002) y dichas variaciones suelen estar asociadas con los períodos reproductivos. Además, en *P. perezii*, *Euphlyctis hexadactylus* y *R. arenarum* se demostró que las características histológicas de la glándula interrenal también varían estacionalmente pero se desconoce si dichas variaciones corresponden a células que sintetizan corticosterona, aldosterona o ambos esteroides (Álvarez, 1992; Kasinathan y Basu, 1971; Piezzi y Burgos, 1968). Hasta donde nosotros sabemos, sólo dos trabajos han investigado el rol de los andrógenos en la modulación de la actividad de la interrenal en los anuros. Por un lado, Kasinathan y Basu (1971) analizaron el efecto del tratamiento in vivo con pellets que contenían testosterona sobre la glándula interrenal de machos pertenecientes a la especie *E. hexadactylus* y observaron que en los animales tratados la cantidad de células esteroideogénicas disminuye respecto de los controles y que los núcleos son más pequeños y de forma irregular, lo cual implicaría una disminución en la actividad celular. Por otro lado, Yajurvedi y Hooli (1991) describieron que la administración de estradiol o progesterona en machos de la especie *Euphlyctis cyanophlyctis* induce la hipertrofia de la glándula interrenal, un aumento de la actividad de la enzima 3β -HSD/I y una disminución de las gotas de lípidos en las células. En cambio la inyección de testosterona no produjo las modificaciones mencionadas. Aunque no determinantes, estos trabajos muestran que algunos esteroides sexuales pueden modificar la actividad de la glándula interrenal en estas especies de anuros y plantean que existe una relación funcional estrecha entre las gónadas y la interrenal. De todas maneras, los autores no descartan que el efecto producido por las hormonas gonadales sea a través de la hipófisis.

La relación entre los ejes adrenal y gonadal también se investigó en otros grupos de vertebrados también se ha investigado. En la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), la 11 ceto-testosterona, el andrógeno activo mayoritario de los peces, atenúa el aumento de cortisol inducido por estrés y las glándulas interrenales de peces tratadas con pellets que contenían testosterona tienen menor capacidad biosintética que las de los controles (Pottinger y col., 1995; Young y col., 1996).

En la rata, varios estudios mostraron que los esteroides sexuales regulan el tamaño de la glándula adrenal y que mientras que los estrógenos inducen la hipertrofia de la glándula, los andrógenos disminuyen su tamaño (Carter, 1956; Gompertz, 1958). Años más tarde, se evaluó que el tratamiento in vivo con andrógenos inhibe la enzima 3β -HSD/I y que la zona fasciculada de la glándula (que sintetiza mayormente GCs) es la zona más afectada (Perry y Stalvey, 1992). Años después, Stalvey (2002) corroboró que el efecto de los andrógenos sobre la enzima 3β -HSD/I es directo y mediado por el receptor de andrógenos, el cual sólo se encuentra en las zonas fasciculada y reticular de la adrenal.

Estos antecedentes demuestran que existe una interacción entre los ejes adrenal y gonadal en los vertebrados y que dicha interacción sería independiente, al menos en parte, del hipotálamo y de la hipófisis.

7. Sitios de unión para glucocorticoides

En los mamíferos está bien establecido que los GCs interaccionan con distintos tipos de sitios de unión. Un sitio de unión está constituido por las proteínas o globulinas transportadoras de corticosteroides (CBG) que unen GCs en la sangre y los transportan a través del torrente sanguíneo hacia los distintos órganos (Henley y Lightman, 2011). Las CBGs regulan la vida media en el plasma y la biodisponibilidad de los GCs circulantes y algunos trabajos sugieren que también tendrían un rol activo en la distribución de los GCs a los sitios de acción, interactuando con sitios de unión a nivel de la membrana plasmática (Henley y Lightman, 2011).

Una vez que los GCs llegan a las células se pueden unir a otro tipo de sitio, el receptor de membrana plasmática, que se encuentra en algunos órganos blancos

como el hígado, el cerebro y la hipófisis (Orchinik y col., 1991; Suyemitsu y Terayama, 1975). Este tipo de receptores está acoplado a proteínas G y cuando se activa desencadena una cascada de señales intracelulares, señales que concluyen en las distintas respuestas celulares (Gasser y Orchinik, 2000). Además, los GCs se unen a receptores solubles intracelulares que pueden ser de dos tipos, el receptor de tipo I o receptor de mineralocorticoides (MR) y el de tipo II o receptor de glucocorticoides (GR), aunque la mayoría de los efectos de los GCs ocurre a través del GR (Funder, 1997).

La estructura y la función del GR están bien establecidas en los mamíferos y están conservadas en todas las especies de vertebrados analizadas hasta el momento (Stolte y col., 2006). El GR pertenece a la superfamilia de receptores nucleares cuyos miembros actúan como factores de transcripción dependientes de la unión del ligando (Evans, 2005; Fuller, 1991; Kumar y Thompson, 1999; Mangelsdorf y col., 1995). Todos los receptores de esta superfamilia, que incluye los de todas las hormonas esteroideas, las hormonas tiroideas, el ácido retinoico y la vitamina D₃, comparten dominios estructurales que fueron descritos primeramente para el GR (Figura I. 1; Guiguere y col., 1986). La región amino terminal, denominada dominio de transactivación, es la más variable entre los miembros de la superfamilia tanto en tamaño como en composición aminoacídica y está involucrada en la activación de los genes blanco del GR (Figura I. 2). El dominio central es el involucrado en la unión al ADN y reconoce los elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs, por sus siglas en inglés) que se encuentran en la región promotora de los genes regulados por los GCs. La secuencia aminoacídica de esta región está estrictamente conservada entre los distintos miembros de la superfamilia y entre todas las especies de vertebrados analizados. La región bisagra está involucrada en los cambios conformacionales que se producen en el GR cuando se une al ligando y tanto su tamaño como su secuencia son bastante variables. Finalmente, el dominio ubicado en el extremo carboxi terminal es la región que se une al ligando y es muy conservado entre los distintos receptores de la superfamilia, lo cual explica porque varios receptores se pueden unir al mismo ligando y activar los genes que se encuentran río abajo de la cascada de señalización.

	AB	C	D	E
GR humano	420 aa	66	41	250 aa
GR ratón	84%	98%	81	94%
GR pollo	60%	100%	63	88%
GR <i>Xenopus</i>	47%	100%	56	75%
GR 1a Tetraodon	17%	85%	34	70%
GR 1b Tetraodon	17%	96%	34	70%
GR 2 Tetraodon	21%	95%	39	74%
MR humano	14%	93%	26	55%
AR humano	14%	78%	17	47%

Figura I. 1. Porcentaje de identidad aminoacídica de diferentes regiones de varios miembros de la superfamilia de receptores nucleares de algunas especies de vertebrados. El tamaño de cada bloque representa el largo particular de cada región. MR: receptor de mineralocorticoides; AR: receptor de andrógenos; AB: región amino terminal; C: región de unión al ADN; D: región bisagra; E: región de unión al ligando. Adaptado de Stolte y col. (2006).

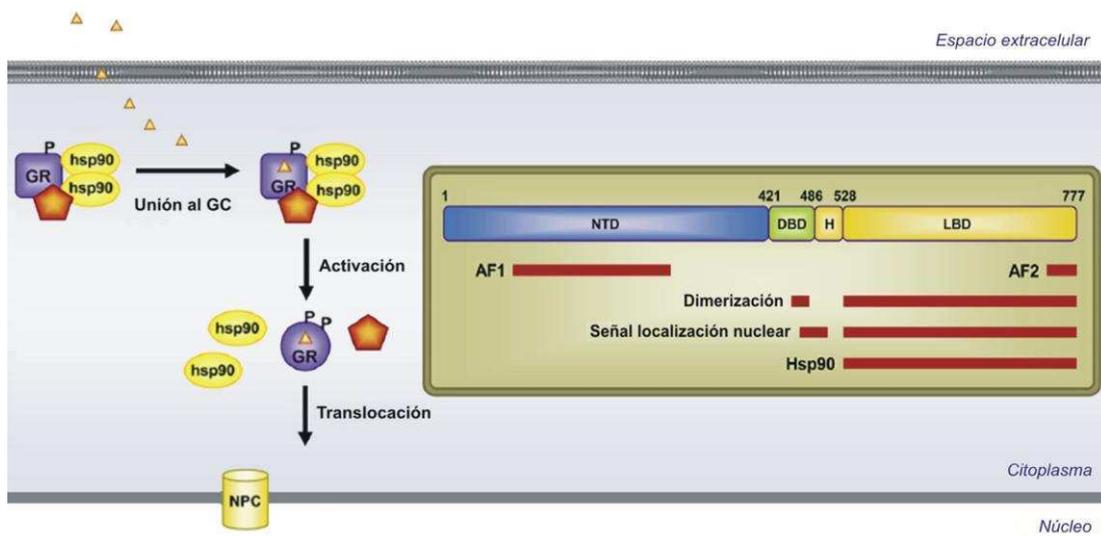


Figura I. 2. Camino de señalización del GR. Cuando el GC se une al receptor se producen cambios conformacionales en el GR citoplasmático (activación), se hiperfosforila (P), se disocia de las proteínas accesorias y se transloca al núcleo, donde regula la expresión génica. En el recuadro se muestran las distintas regiones del GR. NTD: región amino terminal; DBD: región de unión al ADN; H: región bisagra; LBD: región de unión al ligando. Los bloques rojos indican las regiones involucradas en la activación transcripcional (AF1 y AF2), la dimerización, la señal de localización nuclear y la región de unión a la hsp90. Adaptado de Oakley y Cidlowski (2011).

En ausencia de ligando, el GR se encuentra mayormente en el citoplasma de las células formando parte de un complejo multiproteico que incluye varias proteínas chaperonas como las heat shock protein (hsp) 70 y 90. La unión al GC induce cambios conformacionales en el GR que resultan en la disociación del heterocomplejo, la hiperfosforilación del GR, la exposición de las señales de localización nuclear y la entrada al núcleo celular mediada por la proteína importina (Figura I. 2, Oakley y Cidlowski, 2011). Una vez en el núcleo, el GR forma homodímeros que se unen directamente a los sitios GREs y en algunos casos estimula la expresión de los genes a través del reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina que influyen en la actividad de la ARN polimerasa tipo II (Oakley y Cidlowski, 2011). En otros casos, el GR se puede unir a GREs negativos y suprimir la expresión de ciertos genes, aunque hoy en día este mecanismo no ha sido bien definido. Algunos de los efectos rápidos no genómicos de los GCs también son mediados por el GR. Por ejemplo, cuando se unen los GCs al

heterocomplejo se libera la quinasa Src que fosforila la lipocortina-1 disminuyendo el proceso inflamatorio (Song y Buttgereit, 2006).

Más recientemente, se descubrió que existen distintas isoformas del GR que se generan por splicing alternativo o por inicio alternativo de la traducción de un mismo ARNm y que dichas isoformas son específicas de cada tejido. Esta variedad en los GRs confiere a los GCs la capacidad de inducir respuestas muy diferentes en los distintos órganos (Oakley y Cidlowski, 2011).

En los anfibios, particularmente en el tritón *T. granulosa* y en la salamandra *Ambystoma tigrinum*, se ha identificado y caracterizado en el cerebro un GR de membrana plasmática que mediaría los efectos rápidos no genómicos de los GCs en el comportamiento reproductivo (Evans y col., 1998; Orchinik y col., 2000). En los anuros, en cambio, aún no se ha descubierto un GR de membrana pero se han descrito sitios de unión intracelulares para GCs en diversos órganos, incluyendo testículo, hígado, riñón, piel y cerebro en los adultos de las especies *R. arenaum*, *L. catesbeianus* y *X. laevis* (Denari y Ceballos, 2006; Lange y Hanke, 1988; Woody y Jafe, 1982; Yao y col., 2008). Solamente se conoce la secuencia del GR citosólico de *X. laevis* y la misma presenta una similitud aminoacídica del 62% con el GR humano. El GR secuenciado fue aislado de una librería de ADNc de larvas de *X. laevis* y su expresión en células COS mostró que tiene la capacidad de activar los sitios GRE de manera dependiente del ligando y que lo hace con la misma eficiencia que el GR de rata (Gao y col., 1994). El análisis por Northern blot mostró que a partir del gen del GR de *X. laevis* se transcriben dos ARNm de 4 y 6 kb, respectivamente y que ambos ARNm son regulados durante el desarrollo embrionario. En este sentido, Krain y Denver (2004) observaron que los embriones de *X. laevis* expresan dos ARNm de 4 y 8 kb y que las larvas expresan tres ARNm de 2, 4 y 8 kb.

En el testículo de *R. arenaum*, Denari y Ceballos (2006) demostraron la presencia de un GR citosólico que se une con afinidad similar a Dexa y a corticosterona, siendo los valores de las respectivas constantes de disociación de $13,68 \pm 3,01$ y $31,33 \pm 2,68$ nM. Además, informaron que existe un solo sitio de unión al que se unen ambas hormonas. Como fuera mencionado anteriormente, los cambios estacionales en la expresión del GR o de alguno de los componentes que

forman el heterocomplejo modifican la sensibilidad de un órgano al efecto de los GCs. Por lo tanto, otro objetivo del trabajo de Denari y Ceballos (2006) fue evaluar las variaciones estacionales de los parámetros de unión del GR testicular. Estos autores observaron que la afinidad del GR no varía a lo largo del año pero que durante el período postreproductivo el número de sitios de unión es mayor que en los otros períodos. Sin embargo, dado que el ensayo de unión sólo mide receptores libres y que en los anuros la adrenalectomía es técnicamente imposible, la medición del número de sitios de unión está supeditada a la concentración plasmática de corticosterona. Este inconveniente metodológico sugiere que en los períodos en los cuales los niveles plasmáticos de corticosterona son más elevados, el número de sitios de unión calculado subestima en mayor medida la cantidad total de receptores. Dado que en *R. arenarum* la concentración plasmática de corticosterona aumenta durante el período reproductivo es probable que el número de sitios de unión en esta época sea aún mayor al obtenido en el ensayo de unión.

En dicho trabajo, además, se describió que el GR se encuentra en las células de Leydig y en las de Sertoli, lo cual sugiere que los GCs actúan en ambos tipos celulares. Se desconoce si hay GR en las células germinales como ocurre en algunos mamíferos (Kaufmann y col., 1992; Schultz y col., 1993).

El rol de las CBGs como reguladoras del efecto de los GCs es aún discutido. Por un lado, la hipótesis de la hormona libre postula que mientras que la hormona está unida a la CBG no está biológicamente disponible (Breuner y col., 2006; Mendel, 1989). Por otro lado, hay evidencias de que las CBGs llevan a los GCs a tejidos específicos (Mendel, 1989) o tienen su propia actividad biológica (Rosner, 1990).

En al menos cuatro especies de anuros, *X. laevis*, *Discoglossus pictus*, *Anaxyrus terrestris* y *R. temporaria*, además de en cuatro especies de salamandras, se caracterizaron las propiedades de las CBGs (Jolivet-Jaudet y Leloup-Hatey, 1986; Martín y Ozon, 1975; Orchinik y col., 2000; Ward y col., 2007). Sin embargo, en ninguna de estas especies se conocen las variaciones estacionales de estas proteínas en el plasma ni el rol concreto que cumplen en la regulación de la función de los GCs. Ward y col. (2007) evaluaron en *A. terrestris* el papel de las CBGs en el estrés inducido por contaminantes producidos por combustibles y observaron que el aumento de la concentración plasmática de corticosterona inducido por el

contaminante no fue paralelo al aumento de la CBG en plasma, resultando en un incremento de la hormona libre. Los autores concluyen que en esta especie, la CBG no parece cumplir un rol protector frente al aumento de GCs durante una situación de estrés prolongado. Por otro lado, Jolivet-Jaudet y Leloup-Hatey (1986) estudiaron las modificaciones de las CBGs durante la metamorfosis y el crecimiento de *X. laevis*. Estos autores observaron que los parámetros afinidad y capacidad de estas proteínas varían durante el crecimiento y que en el clímax de la metamorfosis se produce un aumento en la concentración de corticosterona libre.

En *R. arenarum* no hay registro de las características de las CBGs y por lo tanto se desconoce su rol en la modulación de las variaciones estacionales de GCs.

8. El rol de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en la modulación del efecto de los glucocorticoides

La función biológica de los GCs en los distintos tejidos también depende de la presencia intracelular de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD). En los mamíferos, dicha enzima cataliza la conversión reversible de los GCs en su metabolito deshidrogenado en el carbono 11 que no se une al GR (Monder y White, 1993). La actividad de esta enzima reside en al menos dos isoenzimas que difieren en su distribución tisular, en los cofactores de los cuales dependen y en el equilibrio entre las actividades de oxidasa y de reductasa. La 11 β -HSD tipo I, purificada primeramente del hígado de rata, es una enzima con actividad oxidoreductasa que utiliza el NADP⁺ como cofactor. Sin embargo, se ha observado que in vivo esta isoenzima actúa principalmente como una reductasa. Por otro lado, la tipo II es una enzima dependiente de NAD⁺ que actúa como una oxidasa, inactivando a los GCs y fue localizada primeramente en el riñón (Best y col., 1997).

El rol de la 11 β -HSD fue ampliamente estudiado en el testículo de los mamíferos donde se observó que las células de Leydig expresan un tipo de enzima con actividad predominantemente oxidativa. Se postuló que esta enzima protege a dichas células del efecto negativo de las concentraciones basales de GCs en la síntesis de testosterona y que la respuesta de las células de Leydig a una situación de estrés depende de que la concentración de GCs circulante supere la capacidad oxidativa de la enzima 11 β -HSD (Funder, 1993; Hardy y Ganjam, 1997).

En los anfibios se ha descrito la presencia de la enzima 11β -HSD en la vejiga de *Rhinella marina* (Brem y col., 1989) y en el testículo de *R. arenarum* (Denari y Ceballos, 2005) y en ambos casos la enzima tiene características similares a la enzima tipo II de mamíferos. En *R. arenarum*, la enzima testicular tiene una constante de disociación (K_m) cuyo valor se encuentra alrededor de 200 nM y es constante durante el año. Sin embargo, la cantidad total de enzima activa aumenta notoriamente durante el período postreproductivo. Dado que los valores plasmáticos de corticosterona basal durante los tres períodos reproductivos son cercanos al K_m de la enzima 11β -HSD, esta enzima podría jugar un rol fundamental en la inactivación de los GCs circulantes disminuyendo el efecto de la corticosterona en el testículo. La observación de que existen variaciones estacionales de la actividad enzimática sugiere que la expresión de esta enzima está regulada por factores que también fluctúan estacionalmente y que modularían el rol de la 11β -HSD en el testículo. En este sentido, se ha observado que las hormonas tiroideas T_3 y T_4 y los estrógenos regulan la enzima 11β -HSD en el testículo de mamíferos (ver revisión en Hardy y Ganjam, 1997).

9. La regulación del receptor de glucocorticoides

Como se mencionó en el punto 7, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que en el sapo el GR testicular varía de manera estacional (Denari y Ceballos, 2006). Sin embargo, en este estudio sólo se midió la cantidad de sitios de unión con lo cual se desconoce si las variaciones en dicho parámetro se corresponden con variaciones de la proteína GR o con variaciones de algún otro componente del complejo multiproteico que forma el GR y que podría modificar la capacidad de unirse al ligando.

La bibliografía que comprende el estudio de la regulación y de la modulación de la función del GR es muy variada y en principio parece ser una sumatoria de resultados dispares. Sin embargo, la diversidad en los resultados reportados se debe a que la regulación del GR varía considerablemente entre los órganos e inclusive entre distintas zonas de un mismo órgano, así como también según el desarrollo ontogenético del animal. McCormick y col. (2000) postularon que la regulación

diferencial del GR en distintos tejidos se produce por la programación epigenética de promotores específicos de tejido.

El ejemplo más claro de la disparidad de resultados observados en la regulación del GR es la autorregulación de este receptor. Se han realizado diversos estudios, tanto en mamíferos como en anfibios, que muestran que los GCs regulan positiva o negativamente la expresión del ARNm y/o de la proteína correspondiente al GR en distintos órganos y demostraron que la autorregulación del GR ocurre tanto a nivel transcripcional como postraduccional (Antakly y col., 1989; Dong y col., 1988; Eisen y col., 1988; Kalinyak y col., 1987; Krain y Denver, 2004; Silva y col., 2011; Swezey y col., 1998; Yao y col., 2008). Debe aclararse que ninguno de estos trabajos fue realizado en el testículo.

Particularmente, Krain y Denver (2004) y Yao y col. (2008) analizaron la autorregulación del GR en larvas y adultos de la especie *X. laevis*, respectivamente, y observaron que los GCs regulan positivamente su receptor en el intestino de las larvas pero no afectan los niveles del GR en el cerebro y en la cola. En este trabajo también se analizó el rol de la hormona T_3 en la regulación del GR y se observó que en el cerebro lo regula negativamente pero que en la cola produce un aumento de dicho receptor. En el adulto de *X. laevis*, los niveles plasmáticos basales de GCs son necesarios para la expresión basal del GR en el cerebro pero que el aumento de GCs inducido por estrés produce una disminución de su receptor en ese órgano.

Por otro lado, los andrógenos también parecen estar involucrados en la regulación de los niveles del GR. Este fenómeno fue estudiado principalmente en el epidídimo y en el pulmón de rata (ver revisión en Silva y col., 2011; Swezey y col., 1998). En ambos órganos, los andrógenos disminuyen la expresión del ARNm del GR pero este efecto depende de la zona del epidídimo y del grado de desarrollo del pulmón en los fetos. Otros trabajos propusieron que en la hipófisis de rata y en una línea celular de cáncer de mama los estrógenos inhiben la expresión del GR y producen un aumento de la degradación de la proteína GR por el proteosoma (Kinyamu y Archer, 2003; Peiffer y Barden, 1987).

El rol de la melatonina como antagonista del efecto de los GCs fue reportado por algunos trabajos realizados en mamíferos (Brotto y col., 2001; Kopp y col., 1999). De hecho, se sugirió que la melatonina modula de manera estacional el sistema inmune de los mamíferos a través de su efecto inhibitorio sobre la acción de

los GCs (Blackhurst y col., 2001; Nelson y Drazen, 1999). El mecanismo molecular a través del cual la melatonina inhibe el efecto de los GCs aún no es del todo claro pero diversos estudios sugieren que actuaría a distintos niveles. Por un lado, la melatonina inhibe la expresión del ARNm del GR en el timo (Sainz y col., 1999) y modula la interacción con el ligando en los leucocitos (Blackhurst y col., 2001). Por otro lado, dicha hormona previene la expresión de genes inducida por Dexa (Persengiev, 1999), sugiriendo que puede regular la capacidad del GR para alcanzar los genes blanco. En este sentido, Presman y col. (2006) observaron que en los timocitos la melatonina disminuye la translocación del GR al núcleo porque impide la disociación de la chaperona hsp90. En un trabajo más reciente, Presman y col. (2012) hallaron, en una línea celular de riñón, otro mecanismo a través del cual la melatonina impide la expresión de genes inducidos por los GCs. En estas células la melatonina reduce la interacción del GR con el coactivador TIF2 disminuyendo de esta manera la expresión de los genes regulados por el GR.

Sin embargo, en la actualidad se desconoce el rol de la melatonina en la modulación del GR en el testículo.

10. La melatonina y la reproducción

La melatonina es una hormona cuya concentración en plasma varía estacionalmente en todos los vertebrados estudiados (Binley, 1993; Gern y col., 1986; Reiter, 1993). Los ritmos circadianos de esta hormona comunican al organismo los cambios diarios y estacionales, funcionando “como un reloj y un calendario” (Reiter, 1993). Es sintetizada principalmente por la glándula pineal y por la retina, siendo la retina en los anfibios la principal fuente de melatonina plasmática (Delgado y Vivien-Roels, 1989; Delgado y col., 1993; d’Istria y col., 1994; Serino y col., 1993). La síntesis de melatonina está dirigida por un “reloj interno”, que en los mamíferos es el núcleo supraquiasmático, que es modulado por los cambios ambientales de luz y temperatura (Reiter, 1993). En la mayoría de los vertebrados, la concentración plasmática de melatonina aumenta durante la noche y particularmente en los anfibios y reptiles no avianos la temperatura modula la amplitud de dicho aumento (Delgado y Vivien-Roels, 1989; Firth y col., 1989, 1999; Gern y col., 1983).

La secreción rítmica de melatonina es responsable de numerosos ritmos biológicos en los animales (Filadelfi y Castrucci, 1996). En los mamíferos está bien establecido que media la influencia del fotoperíodo en la reproducción, siendo una hormona estimulante en aquellas especies en las cuales los días cortos promueven la reproducción (Bittman y col., 1983) e inhibitoria en las especies en las que los días cortos inhiben la reproducción (Carter y Goldman, 1983). Se pudo observar que la melatonina tiene efecto en la reproducción de los mamíferos actuando tanto a nivel del sistema nervioso central como de la hipófisis y/o las gónadas (Frungeri y col., 1999, 2005; Lincoln, 2002; Reiter, 1991). Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de estudios realizados, el rol de la melatonina en la reproducción de los vertebrados no mamíferos es controversial (ver revisión en Mayer y col., 1997). Particularmente en los anuros, la variedad de diseños experimentales utilizados para encarar los estudios y el rango de concentraciones de melatonina evaluadas, que van desde concentraciones fisiológicas en el orden de pg/ml a concentraciones altísimas en el orden de los mg/ml, dificultan la comprensión del efecto de esta hormona en la reproducción.

Los primeros trabajos evaluaron el efecto de la pinealectomía, tanto de machos como de hembras y en distintas épocas del año, sobre el desarrollo gonadal pero los resultados no fueron consistentes (Mayer y col., 1997). Por otro lado, en la mayoría de los casos la inyección de melatonina inhibió la reproducción a través de la disminución del índice gonadosomático, de la espermatogénesis o de la síntesis de andrógenos (Alonso-Bedate y col., 1988; d'Istria y col., 2003, 2004; Mayer y col., 1997). Finalmente, en los trabajos que evaluaron el efecto de la melatonina a nivel gonadal se incubaron testículos *in vitro* con concentraciones variadas de melatonina que se encontraban entre los 200 pg/ml y los 200 ng/ml (Gancedo y col., 1991; Pierantoni y col., 1986). En estos últimos trabajos, se describió que la melatonina no modifica la síntesis de andrógenos basal ni la estimulada por hCG aunque no consideraron el efecto directo de la melatonina en la espermatogénesis.

En concordancia con los hallazgos que demuestran que en los vertebrados la melatonina tiene un efecto directo a nivel gonadal, en numerosas especies se describieron sitios de unión a melatonina en las gónadas (Ayre y col., 1992, 1994; Fischer y col., 1996; Valenti y col., 1997). Particularmente en los anfibios, Serino y col. (2011) demostraron recientemente que en el testículo de *P. esculentus* hay al

menos un tipo de receptor de melatonina que sería el mel1b y sugieren que este receptor podría estar involucrado en el efecto de la melatonina en las espermatogonias y células de Leydig previamente descrito en esta especie (d'Istria y col., 2003, 2004). Sin embargo, no pueden descartarse los efectos de la melatonina que no son mediados por su receptor y que están relacionados con su función como reclutador de radicales libres (Reiter, 1993). En este sentido, de Atenor y col. (1994) demostraron que la melatonina modifica el estado metabólico de los oocitos de *R. arenarum* estimulando la oxidación del citrato e inhibiendo la tasa de oxidación del fumarato. Los autores concluyen que la tasa de oxidación que relaciona ambos parámetros (citrato oxidado/fumarato oxidado) aumenta, acercándose a 1 y que dicha tasa es similar a la que caracteriza a los oocitos durante el invierno. Se debe tener en cuenta que en dicho trabajo la concentración de melatonina utilizada supera ampliamente las concentraciones fisiológicas medidas en otras especies.

En *R. arenarum* se desconocen las variaciones estacionales de las concentraciones plasmáticas de melatonina y su rol en la reproducción de los machos.

11. Resumiendo: el ciclo reproductivo y las variaciones estacionales de distintos parámetros en *R. arenarum*

Todos los datos recopilados sobre la especie en estudio en esta tesis a lo largo de varios años permitieron a Denari y Ceballos (2005) y Fernández Solari y col. (2002) postular que *R. arenarum* tiene un ciclo reproductivo anual que puede dividirse en tres períodos: reproductivo, que abarca los meses de septiembre a diciembre y es la época en la cual la especie se reproduce; postreproductivo, que abarca los meses de enero a abril y prerreproductivo que va desde mayo a agosto.

En la Tabla I. 1 se resumen los datos sobre las variaciones estacionales en varios parámetros de esta especie que ya han sido mencionados a lo largo de esta Introducción.

Tabla I. 1. Variaciones estacionales relacionadas con el ciclo reproductivo en *R. arenarum*.

	Período		
	No reproductivo		Reproductivo
Esteroidogénesis testicular	Mayormente andrógenos		Mayormente esteroides C ₂₁
	Postreproductivo	Prerreproductivo	Reproductivo
[andrógenos] plasma	Media	Alta	Baja
[corticosterona] plasma	Media	Baja	Alta
n° sitios GR testicular	Alto	Bajo	Medio
Actividad 11 β -HSD testicular	Alta	Baja	Baja

Adaptado de Canosa y col. (2003), Denari y Ceballos (2005, 2006) y Fernández Solari y col. (2002).

I | Objetivos e hipótesis

A partir de los antecedentes previamente comentados en los anuros en general y en *R. arenarum* en particular, el objetivo general de esta tesis es esclarecer la relación entre las diversas vías hormonales que regulan el ciclo reproductivo en los machos de los anuros.

La hipótesis general de trabajo que se plantea es que en los machos de *R. arenarum* existe una interregulación negativa entre los andrógenos gonadales y los GCs interrenales que es independiente, por lo menos en parte, del eje hipotálamo-hipofisario.

La tesis está organizada en dos partes:

En el Capítulo II se aborda el estudio del efecto directo de los GCs en el testículo y la regulación de los cambios estacionales en la sensibilidad de este órgano a la acción de los GCs, relacionados con el GR. Los objetivos específicos de esta parte son:

- Evaluar el efecto de los GCs en los niveles de la proteína de la enzima esteroidogénica *cyp450c17* testicular.
- Obtener el patrón estacional de la cantidad de proteína del GR en el testículo.
- Estudiar el rol de los andrógenos, los glucocorticoides y la melatonina en las variaciones estacionales del GR.
- Conocer los niveles plasmáticos de melatonina y sus variaciones anuales.
- Evaluar el efecto directo de la melatonina en la síntesis de andrógenos.

Teniendo en cuenta las variaciones estacionales en *R. arenarum* resumidas en el punto 11 de la Introducción y los antecedentes en otras especies, las hipótesis de trabajo vinculadas a estos objetivos y que se ponen a prueba en esta tesis son:

- Los GCs regulan negativamente la actividad de la enzima esteroidogénica *cyp450c17* testicular durante el período reproductivo disminuyendo los niveles de la proteína *cyp450c17*.

- La sensibilidad del testículo a la acción de los GCs varía estacionalmente debido en parte a los cambios en la proteína del GR testicular.
- El patrón estacional del número de sitios de unión del GR y de la proteína GR son diferentes.
- Durante el período prerreproductivo, cuando la síntesis de andrógenos es máxima, los niveles bajos del GR protegen al testículo de la acción de los GCs.
- Los andrógenos son responsables de regular negativamente al GR durante el período reproductivo.
- Los GCs regulan su propio receptor de manera positiva.
- La melatonina antagoniza el efecto de los GCs en el testículo.
- La concentración plasmática de melatonina fluctúa a lo largo del año, siendo mayor durante la época de fotoperíodo corto (otoño-invierno).
- La melatonina inhibe en forma directa la síntesis de andrógenos en el testículo.

En el Capítulo III se estudia el efecto directo de los andrógenos en la glándula interrenal y la regionalización de los tipos celulares en la misma. Los objetivos específicos de esta parte son:

- Evaluar el efecto de los andrógenos en la síntesis de corticosterona en la glándula interrenal.
- Esclarecer si en la glándula hay distintos tipos de células esteroideogénicas.
- Estudiar la regionalización de los tipos celulares y de la síntesis de corticosterona.

Las hipótesis de trabajo vinculadas a estos objetivos y que se ponen a prueba en esta tesis son:

- Los andrógenos plasmáticos regulan en forma directa y negativamente la síntesis de corticosterona en la glándula interrenal durante el período prerreproductivo.
- La glándula está compuesta por distintos tipos de células esteroideogénicas con actividad biosintética diferente.
- Las distintas células tienen una localización específica en la glándula.

CAPÍTULO II

ESTUDIOS EN EL TESTÍCULO

II | Materiales y Métodos

1. Animales

Para todos los estudios se utilizaron sapos machos adultos de la especie *R. arenarum* cuyo peso variaba entre los 130-180 gramos. Los animales fueron recolectados en la provincia de Buenos Aires, principalmente en zonas cercanas al Gran Buenos Aires y se mantuvieron en un jardín acondicionado con plantas, con libre acceso al agua y en condiciones naturales de luz y temperatura. Los animales se alimentaron con insectos del jardín y semana por medio la dieta se suplementó con grillos y zofobas. El día previo a la realización de cada experimento los animales fueron llevados al laboratorio y se los acondicionó en un cubil con libre acceso al agua, sin comida y expuestos a un fotoperíodo natural.

Se cumplió en todo momento con los principios de cuidado de animales de laboratorio (NIH publicación No. 86-23, revisado en 1985) y con las leyes argentinas. Dado que la especie utilizada no se obtiene de criaderos sino de su hábitat natural y que los machos tardan aproximadamente 3 años en llegar a adultos se minimizó el número de animales utilizados.

2. Obtención del material biológico

Los animales fueron anestesiados profundamente por inmersión en una solución acuosa de tricain-metano-sulfonato 1% p/v (MS222, Sigma-Aldrich, EEUU) y su muerte se produjo como consecuencia del procedimiento quirúrgico mientras los animales se hallaban bajo los efectos del anestésico. Los testículos fueron rápidamente extraídos por disección ventral y luego separados cuidadosamente del órgano de Bidder y de restos de mesorquio.

Además, se extrajo sangre por punción cardiaca con jeringas heparinizadas, se centrifugó a 2700 xg y el plasma se guardó envuelto en papel aluminio a -75 °C hasta el momento de la determinación de la concentración de melatonina por ELISA.

3. Medios de incubación y soluciones buffer utilizadas

Medio DMEM (Invitrogen-GIBCO, EEUU) estéril con el agregado de 10 mM Hepes, 10% suero fetal bovino, antibióticos (100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina) y antimicótico (0,25 mg/ml de anfotericina B), pH 7,4. El suero fetal bovino utilizado fue previamente inactivado a 55 °C durante una hora y tratado con una mezcla de carbón:dextrano (2%:0,2%, p/v) en PBS, para extraer los esteroides.

Medio L-15 (de Leibovitz, Sigma-Aldrich, EEUU) estéril con el agregado de 10 mM Hepes, 10% suero fetal bovino, antibióticos (100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina) y antimicótico (0,25 mg/ml de anfotericina B), pH 7,4. El suero fetal bovino se procesó como fuera descrito en el párrafo anterior.

Buffer de ensayo para el GR: 10 mM Hepes, 5 mM EDTA, 10% v/v glicerol, 20 mM Na₂MoO₄ y 0,1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pH 7,4.

Buffer de homogenización: 0,25 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl, 0,4 mM β-mercaptoetanol, 0,1 mM EDTA, pH 7,4.

Buffer para radioinmunoensayo (RIA) de testosterona: buffer fosfato salino (PBS) 10 mM, 0,1% gelatina, 20 mM EDTA, 0,1% azida sódica, pH 7,4.

Buffer de siembra: 40 mM Tris-HCl, 2% p/v dodecilsulfato sódico, 4% v/v glicerol, 0,001% p/v azul de bromofenol, 2 mM β-mercaptoetanol, pH 6,8.

PBS-T: buffer fosfato salino con 0,5% v/v tween-20.

Buffer de revelado: 1,25 mM luminol, 0,198 mM ácido cumárico, 0,038% v/v peróxido de hidrógeno (100 volúmenes) en 100 mM de buffer Tris-HCl, pH 8,0.

4. Validación del anticuerpo anti GR

Como se planteó en la sección correspondiente, uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar la regulación de la proteína del GR. Dado que no se encuentran disponibles anticuerpos comerciales anti GR de anfibios para semicuantificar la proteína GR en el testículo de la especie en estudio se debió utilizar un anticuerpo heterólogo, el GRm-20 (Santa Cruz Biotechnology, EEUU). Dicho anticuerpo está dirigido contra una porción de 20 aminoácidos del extremo amino terminal del GR de ratón y fue elegido dado que reveló bandas inmunoreactivas reproducibles en diferentes pruebas. Para corroborar la identidad de dichas bandas se realizaron dos aproximaciones experimentales:

- 1) Preincubación del anticuerpo con 200 $\mu\text{g/ml}$ del correspondiente péptido bloqueante (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) por 2 h previo a la incubación con la membrana.

- 2) Incubación de fragmentos de testículos con Dexa 500 nM por 1 h para evaluar la translocación del GR a la fracción nuclear. Este experimento está basado en el hecho de que la Dexa, agonista del GR, se une al GR en el citoplasma e induce su translocación al núcleo, por lo tanto si el anticuerpo detecta este cambio sería específico para el GR. Luego de la incubación con el agonista se homogeneizaron los fragmentos de testículos y se obtuvieron las fracciones nuclear y postnuclear por centrifugación diferencial, como se menciona en el punto 9. La fracción nuclear sedimentada se resuspendió en 100 μl del buffer de ensayo para el GR y ambas fracciones fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis por Western blot. La translocación del receptor se expresó como la relación postnuclear/nuclear, relativizando previamente cada banda a la correspondiente banda de α -tubulina. Se comparó el resultado de la translocación de los testículos tratados con Dexa con aquel correspondiente a los incubados con medio solo durante 1 h (control). Para comparar el patrón de translocación revelado por el GRm-20 en *R. arenarum* con el patrón de translocación en la especie homóloga se realizaron los mismos experimentos con testículos de ratón.

5. Obtención de la fracción subcelular enriquecida en membranas plasmáticas

Para evaluar si alguna de las bandas inmunoreactivas reveladas con el anticuerpo GRm-20 corresponde a un receptor de membrana plasmática se realizó una centrifugación diferencial para obtener una fracción subcelular enriquecida en dichas membranas. Para ello, se hizo un homogenato de testículos con el buffer de ensayo para el GR en una proporción de 250 mg de órgano por ml de buffer. Este homogenato se centrifugó a 400 xg por 10 min para sedimentar las células que no se rompieron (debris) y luego se centrifugó a 800 xg por 10 min para sedimentar la fracción nuclear. La fracción nuclear se resuspendió en 100 µl de buffer de ensayo para el GR y el sobrenadante se centrifugó a 12.000 xg por 10 min para obtener un pellet enriquecido en membranas plasmáticas y que además contiene mitocondrias. El pellet se resuspendió en 70 µl de buffer y el sobrenadante se consideró fracción citoplasmática aunque carece de mitocondrias. Todos los pasos descritos fueron realizados a 4 °C y las fracciones se congelaron a -20 °C hasta el momento del análisis por Western blot.

6. Dispersión de células y separación de espermatozoides

Debido a que se han descrito GRs en espermatozoides de mamíferos (Kaufmann y col., 1992), se evaluó si alguna de las bandas reveladas por el anticuerpo GRm-20 se encontraba sólo en los espermatozoides. Para ello, se estudió la presencia de bandas inmunoreactivas para el GR en un homogenato de células testiculares sin espermatozoides. Las células se dispersaron según Pozzi y col. (2001): se incubaron fragmentos de testículos en medio L-15 conteniendo 0,5 mg de albúmina sérica bovina/ml, 0,5 mg de colagenasa/ml y 0,02 mg de DNAsa/ml en un baño de agua a 37 °C con agitación durante 30 min. Luego, el tejido y el medio fueron filtrados con una malla de nylon y se realizó una segunda incubación del tejido remanente no dispersado con medio fresco. Transcurrida la mitad del tiempo de las incubaciones con colagenasa se recurrió a la dispersión mecánica de las células con el fin de optimizar los resultados de la digestión enzimática. Las células filtradas se centrifugaron a 200 xg por 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con medio

L-15 y se centrifugaron nuevamente. Luego del lavado, las células se resuspendieron en 1 ml de medio y se separaron en dos partes. Una de ellas se reservó para homogeneizar las células dispersas y la otra parte se sembró en una solución de Percoll 80% que fue centrifugado a 800 xg por 25 min a temperatura ambiente. Este último procedimiento se realizó para separar los glóbulos rojos y los espermatozoides presentes en la preparación del resto de las células. Luego de un lavado con medio de cultivo, la fracción celular libre de espermatozoides y de glóbulos rojos se resuspendió en 250 µl de buffer de ensayo para el GR. Esta última fracción y la fracción celular con espermatozoides y glóbulos rojos se homogeneizaron con micropistillo y se centrifugaron a 400 xg para sedimentar el debris. Los homogenatos se analizaron por Western blot.

7. Estudio de la variación estacional de la proteína GR

Se obtuvieron testículos de sapos en los tres períodos reproductivos descritos para *R. arenarum* (Denari y Ceballos, 2005): postreproductivo, prerreproductivo y reproductivo. Los órganos fueron homogeneizados en el buffer de ensayo para el GR en una proporción de 250 mg de órgano por ml de buffer con un homogenizador de tejido “Ultraturrax”. Luego se centrifugaron los homogenatos a 400 xg por 10 min para sedimentar el debris y los sobrenadantes se congelaron a -20 °C hasta el momento de su utilización. La concentración de proteínas de cada homogenato se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Posteriormente, los homogenatos se analizaron por la técnica de Western blot y se semicuantificaron las bandas inmunoreactivas para GR como se describe más adelante (punto 12.1).

8. Incubaciones in vitro. Diseño experimental

8.1. Estudio del rol de los GC en la regulación de la proteína cyp450c17

Se evaluó si Dexa o el derivado reducido de corticosterona, 5 α -dihidrocorticosterona (DHB) regulan la actividad de la enzima cyp450c17, como fue descrito por Malamud (2005) y Tesone y col. (2012), a través de la regulación de la síntesis proteica de dicha enzima. Para ello, se estudió el efecto del tratamiento con

Dexa y DHB sobre la proteína cyp450c17 en testículos obtenidos de animales recolectados durante el período prerreproductivo y reproductivo. Para cada réplica, se cortaron los testículos de 1 animal en rodajas de 2 mm, esas rodajas se dividieron en cuatro grupos al azar y los tratamientos se asignaron aleatoriamente a cada uno de dichos grupos. Las rodajas fueron incubadas en medio L-15 por 24 h a 28 °C como fue descrito por Malamud (2005) y Tesone y col. (2012). Los tratamientos fueron:

- control (medio L-15 solo)
- Dexa o DHB 15 nM
- Dexa o DHB 150 nM
- Dexa o DHB 1500 nM.

Las concentraciones de Dexa y DHB utilizadas corresponden a los valores plasmáticos de corticosterona medidos en *R. arenarum* durante los períodos prerreproductivo (15 nM) y reproductivo (150 nM) por Denari y Ceballos (2005). Para evitar la incidencia de las variaciones estacionales de la enzima inactivante de GC, la 11 β -HSD (Denari y Ceballos, 2005), se utilizó Dexa en lugar de corticosterona dado que la 11 β -HSD posee muy baja afinidad por dicho agonista (Diederich y col., 1997). Por otra parte, las concentraciones de Dexa y DHB fueron similares a las de corticosterona debido a que en *R. arenarum* los tres esteroides se unen con similar afinidad al GR. Los valores de las constantes de disociación (Kd) son 31,3 nM y 13,7 nM para corticosterona y Dexa, respectivamente (Denari y Ceballos, 2006) y 35,2 nM para DHB (Tesone y col., 2012). La mayor concentración de Dexa y DHB utilizada (1500 nM) podría corresponder a aquella alcanzada en una situación extrema de estrés.

Finalizados los tratamientos, las rodajas de testículo se homogeneizaron en buffer de homogeneización en una proporción de 250 mg de órgano por ml de buffer con un homogenizador de tejido “Ultraturrax”. Luego, los homogenatos se centrifugaron a 400 xg por 10 min para sedimentar el debris y los sobrenadantes se congelaron a -20 °C hasta el momento de su utilización. La concentración de proteínas de cada homogenato se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Posteriormente, los homogenatos se analizaron por la técnica de Western blot y se semicuantificó la banda inmunoreactiva del cyp450c17 como se describe en el punto 12.2.

8.2. Estudio de la regulación del GR

Se evaluó el rol de los andrógenos, la melatonina y los GC en la regulación del GR, dado que son hormonas que varían en forma estacional y circadiana y, como se mencionara en la Introducción, pueden regular al complejo GR en diversos modelos experimentales. El efecto de los andrógenos y la melatonina se estudió sobre dos parámetros: 1) número de sitios de unión al ligando (B_{max}) y 2) cantidad relativa de proteína GR. La acción de los GC sobre la regulación de su propio receptor sólo pudo evaluarse midiendo la proteína GR dado que el ensayo para medir el B_{max} se realiza incubando homogenatos de testículos con Dexa (ver el punto 10) y requiere que los sitios de unión al ligando se encuentren desocupados. Para evaluar el papel de cada una de las hormonas mencionadas se realizaron incubaciones de testículos in vitro durante 24 h en medio DMEM con el agregado de los tratamientos correspondientes (ver más adelante) a 28 °C. Cada experimento se llevó a cabo en distintos meses de los años 2007-2011 y cada ensayo (o réplica) se realizó con testículos de entre 1-6 sapos. El número de réplicas para cada experimento se especifica en cada figura de la sección II. Resultados.

Los experimentos en los cuales se debía medir el B_{max} o el K_d se realizaron con un pool de testículos de varios animales dado que para realizar estas mediciones se requiere una gran cantidad de proteínas que es imposible obtener a partir de un solo animal. La cantidad de sapos utilizados se especifica para cada experimento.

El esquema general de trabajo fue el siguiente:



El tiempo de incubación de 24 h se eligió con el siguiente criterio: dado que la vida media descrita para la proteína GR en otros modelos experimentales se encuentra entre las 8-20 h (Hoeck y col., 1989; Webster y col., 1997), a las 24 h se podría detectar un decrecimiento en la síntesis de la proteína. Para elegir el medio de incubación se realizaron experimentos preliminares en los cuales se evaluó el Bmax inicial de testículos recién disecados y luego se evaluó el Bmax en testículos incubados durante 24 h a 28 °C con medio L-15 o DMEM. El medio de incubación elegido fue el DMEM, que produjo la menor caída en el Bmax luego de 24 h de incubación a 28 °C.

También se evaluó el efecto de la incubación con melatonina durante 24 h sobre la afinidad del GR y el efecto de la incubación con melatonina durante 3 h sobre el Bmax. Estos experimentos fueron realizados solamente con melatonina debido a que existen antecedentes que muestran que la melatonina modifica la constante de disociación del GR (Blackhurst y col., 2001). Además, la incubación de 3 h se realizó para evaluar si el efecto de la melatonina en el Bmax del GR se debe a modificaciones postraduccionales que afectan la capacidad de unión del receptor y que podrían detectarse en tiempos de incubación cortos (Duma y col., 2006; Faus y Haendler, 2006).

8.2.1. Rol de los andrógenos en la regulación del GR

En esta serie de experimentos se evaluó el efecto de la adición de andrógenos exógenos al medio de incubación (testosterona y 5 α -dihidrotestosterona, DHT); la inhibición de la síntesis de andrógenos endógenos con cianocetona (CNK), inhibidor de la enzima esteroideogénica 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa; y la inhibición de la acción de los andrógenos endógenos con casodex, antagonista del receptor de andrógenos.

Para realizar cada réplica se utilizaron testículos de 4 animales que fueron cortados en rodajas de 2 mm y divididos en tres grupos al azar. Uno de los grupos fue procesado inmediatamente para evaluar el contenido inicial de receptores de GC. Los otros fueron incubados con medio DMEM (control) o con alguno de los

siguientes tratamientos: 100 nM testosterona, 100 nM DHT, 10 μ M casodex o 10 μ M CNK.

La concentración de CNK utilizada es la que garantiza la máxima inhibición de la enzima testicular (Pozzi y Ceballos, 2000) y la de casodex es la que desplaza el 95% de la unión de testosterona a su receptor (resultados de nuestro laboratorio no publicados). La cantidad de testosterona y DHT utilizadas corresponden a las mayores concentraciones halladas en plasma de *R. arenarum* (período prerreproductivo, Denari y Ceballos, 2005).

Luego de la incubación, se guardaron los medios de los tratamientos con CNK y los controles a -20 °C para luego verificar por radioinmunoensayo la inhibición de la síntesis de testosterona. Las rodajas de testículos fueron procesadas para el ensayo de estimación del número de sitios de unión al ligando y para el Western blot.

8.2.2. Rol de los GC en la regulación del GR

Se evaluó el efecto de dos concentraciones de Dexametasona (Dexa), 15 nM y 150 nM, y de un antagonista del GR (RU486). Las concentraciones de Dexa fueron elegidas de acuerdo con los criterios especificados en el punto 8.1. Las incubaciones con RU486 se realizaron para discriminar si el efecto de Dexa es mediado por el GR y para descartar que un aumento en la proteína GR al incubarse con Dexa se deba a la estabilización del complejo receptor por unión del ligando y no a un aumento de la síntesis de la proteína receptora.

Para realizar cada réplica se obtuvieron los testículos de 1 animal y se cortaron en rodajas de 2 mm. Luego, los fragmentos de los dos testículos se dividieron en 6 grupos al azar y se asignaron los tratamientos aleatoriamente a cada uno de los grupos. Los tratamientos fueron:

- control (medio DMEM solo)
- 1 μ M RU486
- Dexa 15 nM
- Dexa 150 nM
- Dexa 15 nM en presencia de 1 μ M RU486
- Dexa 150 nM en presencia de 1 μ M RU486.

La concentración de RU486, 1 μ M, corresponde a la concentración que desplaza la totalidad de la unión de Dexa al GR (Denari y Ceballos, 2006). Luego de la incubación, las rodajas de testículos fueron procesados para analizar la cantidad de proteína receptora por Western blot.

8.2.3. Rol de la melatonina en la regulación del GR

Se evaluó el efecto de dos concentraciones de melatonina, 40 pg/ml y 200 pg/ml. Dichas concentraciones corresponden a la menor y mayor concentración de melatonina medida en el plasma de *P. perzi* durante un período de alta temperatura y fotoperíodo largo correspondiente al verano (Delgado y Vivien-Roels, 1989). La menor concentración de melatonina evaluada (40 pg/ml) también se encuentra durante el invierno, cuando el ritmo circadiano de melatonina plasmática desaparece y la concentración de la hormona es constantemente baja (Delgado y Vivien-Roels, 1989; Delgado y col., 1993). También se evaluó el efecto del luzindole, un antagonista no específico de receptores de membrana de melatonina (Dubocovich, 1988), para discriminar si el efecto de melatonina sobre el GR testicular ocurre por un mecanismo mediado o no por receptor (Reiter y col., 2000).

En cada una de las réplicas se utilizaron testículos de 5 animales que fueron cortados en rodajas de 2 mm y divididos en 4 ó 5 grupos al azar dependiendo si el experimento se realizaba sin o con luzindole. Uno de los grupos fue procesado inmediatamente para evaluar el contenido inicial de receptores para GC; los otros fueron incubados con alguno de los siguientes tratamientos:

- control (medio DMEM solo)
- 40 pg/ml de melatonina
- 200 pg/ml de melatonina.

En los experimentos con luzindole se utilizaron las mismas condiciones de incubación que para los tratamientos anteriores pero con el agregado del luzindole (1 μ M) y se incluyó un segundo control con 1 μ M luzindole únicamente. La concentración de luzindole utilizada corresponde a la empleada en células de testículo de hámster por Frungieri y col. (2005).

Las rodajas de testículos fueron procesadas para el ensayo de estimación del número de sitios de unión al ligando y para el Western blot.

Los medios de incubación se congelaron a -20 °C hasta su utilización para la determinación de la concentración de andrógenos por radioinmunoensayo.

8.2.4. Efecto de la melatonina sobre la constante de afinidad del GR

Se evaluó solamente el efecto de la menor concentración de melatonina (40 pg/ml) dado que fue la que produjo diferencias en el Bmax y para minimizar el número de animales sacrificados dado que para cada experimento se necesitaban testículos de 6 animales. En cada una de las réplicas del experimento se utilizaron 12 testículos que fueron cortados en rodajas de 2 mm y divididos en dos grupos al azar. Se incubaron las rodajas con medio DMEM solo (control) o con 40 pg/ml de melatonina. Luego de la incubación, se procesaron las rodajas para realizar el ensayo de competencia que permite determinar la constante de disociación del GR en el tejido control y en los tratados con melatonina (ver punto 11).

8.2.5. Efecto de la melatonina en la regulación del GR a tiempos cortos

Se evaluó el efecto de 40 pg/ml y 200 pg/ml de melatonina. En cada una de las réplicas se utilizaron testículos de 3 animales que fueron cortados en rodajas de 2 mm y divididos en tres grupos al azar. Se incubaron las rodajas durante 3 h con medio DMEM solo (control) o con el agregado de 40 o 200 pg/ml de melatonina. Luego de la incubación las rodajas se procesaron para el ensayo de estimación del número de sitios de unión al ligando.

Todas las hormonas y antagonistas mencionados fueron compradas en Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EEUU). CNK fue donada por el Laboratorio Sterling-Winthrop (Guilford, Gran Bretaña). Los esteroides, CNK, casodex, melatonina y luzindole fueron disueltos en etanol 100% y diluidos con el medio de incubación a una concentración final de 1%. A los controles también se les agregó 1% de etanol. La melatonina y el luzindole fueron preparados inmediatamente antes de su utilización.

8.3. Efecto de la melatonina en la síntesis basal de andrógenos

Además, se estudió si la melatonina regula la síntesis de andrógenos a nivel testicular. Para ello, se utilizaron los medios de incubación de los experimentos descritos en el punto 8.2.3, que fueron los medios de los tratamientos durante 24 h con 40 o 200 pg/ml de melatonina y/o con luzindole 1 μ M más el agregado de otras réplicas. En estos medios, se midió la cantidad de andrógenos acumulados durante las 24 h de incubación y los resultados se expresaron como los pg andrógenos/ml de medio relativo a la cantidad total de proteínas de los fragmentos incubados.

9. Procesamiento de los testículos incubados in vitro para la determinación del GR

Luego de las incubaciones, los testículos fueron homogeneizados en frío con el buffer de ensayo para el GR en una proporción de 250 mg de órgano por ml de buffer, empleando un homogeneizador manual de teflón y vidrio (Potter-Elvehjem). Los homogenatos se centrifugaron a 400 xg por 10 min a 4 °C para sedimentar el debris y una alícuota de cada homogenato se congeló a -20 °C hasta el momento de su análisis por Western blot. El resto del homogenato fue centrifugado a 800 xg por 10 min a 4 °C para sedimentar la fracción nuclear. La fracción postnuclear se mantuvo en hielo y fue inmediatamente utilizada en el ensayo de estimación del número de sitios de unión al ligando o en el ensayo de competencia, según el experimento. La concentración de proteínas en cada homogenato se determinó por el método de Bradford (1976).

10. Estimación del número de sitios de unión a Dexa

Dado que este ensayo sólo mide GRs que no han sido activados, es decir receptores libres que se encuentran en el citosol (Spencer y col., 1990), se utilizó la fracción postnuclear de los homogenatos de testículos para minimizar la unión no específica. La determinación del número de sitios de unión en cada homogenato se realizó por triplicado incubando 1000-1600 μ g de proteínas postnucleares en condiciones de saturación utilizando Dexa- 3 H] (40 Ci/mmol, Perkin-Elmer,

Massachussets, EEUU). Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 0,5 ml, durante 18-22 h a 4 °C, tiempo en el cual el sistema llega a un estado de equilibrio (Denari y Ceballos, 2006). Luego de transcurrido el tiempo, las muestras se incubaron con 0,5 ml de carbón:dextrano (2%:0,2%, en buffer PBS, pH 7,4) durante 20 min a 4 °C y se centrifugaron por 30 min a 2700 xg (4 °C), para separar la Dexa-[³H] no unida. Para calcular la unión específica se restó el valor del unido no específico evaluado por triplicado en tubos con las muestras y un exceso de 1000 veces de Dexa radioinerte. El número de sitios de unión se expresó como fmoles/mg de proteína.

Se determinó, además, si la melatonina interfiere con la unión de Dexa al GR. Para ello, se realizaron ensayos de unión al ligando incubando fracciones postnucleares de testículos no tratados con 5 nM Dexa-[³H] en presencia de melatonina (0,17, 0,52, 0,86 nM) o luzindole (0,1, 1, 10 µM). Las concentraciones evaluadas corresponden a aquellas empleadas en las incubaciones in vitro y a concentraciones cercanas a las mismas.

11. Estimación de la constante de disociación por ensayos de competencia

Los valores de Kd fueron calculadas por el método de competencia utilizando Dexa-[³H] y diferentes concentraciones de Dexa radioinerte (2,5-200 nM). Cada concentración de Dexa no marcada fue ensayada por triplicado incubando 1000-1600 µg de proteínas postnucleares de testículos incubados con medio solo (control) o con 40 pg/ml de melatonina durante 24 h. Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 0,5 ml a 4 °C durante 18-22 h y se procesaron como fuera descrito en el punto anterior. El Kd para cada condición fue calculado con el programa Ligand (Ligand Software, David Rodbard, NIH). Este programa calcula el valor del Kd, su error y analiza si la diferencia entre los Kd es o no significativa.

12. Análisis por Western blot

12.1. Proteína GR

Para evaluar cambios en la cantidad total de la proteína GR en los testículos a lo largo del año o en aquellos sometidos a distintos tratamientos se realizó el Western blot con el homogenato completo. Se mezclaron 100 μ g de proteínas con el buffer de siembra, se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron a 12.000 xg por 2 min. Las muestras se sembraron en un gel 10% de sodio dodecilsulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) junto con una mezcla de marcadores de peso molecular coloreados (SeeBlue, Invitrogen, EEUU) y se corrieron durante 140 min a 130 V. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron utilizando un sistema de transferencia húmedo durante 90 min a 300 mA a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Hybond LFP, Amersham, EEUU). Luego de la transferencia las membranas se incubaron en una solución de buffer PBS-T con 3% de peróxido de hidrógeno durante 10 min y los sitios inespecíficos se bloquearon con 5% de leche en polvo descremada en PBS-T durante 1 h. Las membranas se cortaron según el peso molecular esperado para el GR y la α -tubulina (utilizada como control de carga) y se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo anti GR se diluyó en PBS-T a una concentración de 0,4 μ g/ml y el anticuerpo monoclonal anti α -tubulina se diluyó en PBS-T con 2% leche en polvo descremada a una concentración de 4 μ g/ml. Como ya se mencionara, el anticuerpo anti GR utilizado fue el GRm-20 hecho en conejo en tanto que el anticuerpo monoclonal anti α -tubulina fue obtenido en el Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biology, University of Iowa, EEUU. Luego de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente. Ambos anticuerpos, anti IgG de conejo y anti IgG de ratón se diluyeron en PBS-T a una concentración de 0,2 μ g/ml y 0,08 μ g/ml, respectivamente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti IgG de conejo hecho en cabra (Chemicon International, EEUU) y anti IgG de ratón hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology, EEUU).

En todos los casos se realizó un control negativo omitiendo la incubación con el anticuerpo primario.

Las bandas correspondientes al GR y a la α -tubulina fueron visualizadas por un sistema de detección de quimioluminiscencia utilizando el buffer de revelado en un detector de quimioluminiscencia Fujifilm LAS-1000. Los pesos moleculares de cada banda fueron estimados con el programa Sigma Gel Software (SPSS Science Software, Gran Bretaña). El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa ImageGauge (Fuji photo film CO., LTD, Altura Software, Inc, EEUU).

Considerando que existen diferencias de carga entre las calles, las bandas inmunoreactivas del GR fueron relativizadas a las respectivas bandas de α -tubulina.

El método de semicuantificación fue validado analizando la relación entre la cantidad de proteína sembrada y la densidad óptica de las bandas. Esta relación fue lineal y el valor de la pendiente fue cercano a 1 en el rango de 30-100 μ g de proteínas (datos no mostrados).

Cada homogenato fue analizado en 3 ensayos de Western blot diferentes y el promedio de estos valores fue evaluado en el análisis estadístico.

12.2. Proteína cyp450c17

Una alícuota de los homogenatos de testículos obtenidos en el experimento descrito en 8.1, conteniendo 100 μ g de proteínas, se mezcló con el buffer de siembra y se procedió como fuera descrito en 12.1 excepto por las diferencias que se mencionan a continuación. Para la SDS-PAGE se utilizó un gel de 12,5%, la electroforesis se realizó durante 120 min y las membranas no se cortaron por la cercanía de las bandas del cyp450c17 y de actina, esta última utilizada como control de carga. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con 0,4 μ g/ml de anticuerpo anti cyp450c17 de ratón diluido en PBS-T y luego con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo descrito en 11.1. Después del revelado por quimioluminiscencia, las membranas se lavaron con una solución 30% de peróxido de hidrógeno en PBS-T durante 30 min para bloquear las peroxidasas del anticuerpo secundario después de lo cual se procedió a bloquear con leche e incubar con el anticuerpo anti actina de ratón en una dilución 0,4 μ g/ml en PBS-T con 2% de leche en polvo descremada durante toda la noche a 4 °C. Luego se incubó con el anticuerpo

12.3. Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)

Se evaluó la separación correcta de las fracciones nuclear y postnuclear analizando la proteína nuclear PCNA en ambas fracciones. Para ello, se incubaron las membranas, en las cuales se evaluó previamente el GR, con el anticuerpo anti PCNA (Chemicon, EEUU) diluido en PBS-T en una concentración de 1 µg/ml durante toda la noche a 4 °C. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón ya descrito y se reveló por quimioluminiscencia. Se realizó un control negativo omitiendo la incubación con el anticuerpo primario.

13. Radioinmunoensayo de testosterona

Los medios de incubación obtenidos en los experimentos descritos en 8.2.1 y en 8.3 fueron analizados por radioinmunoensayo sin previa extracción y dependiendo del tratamiento, control, CNK o melatonina, se utilizaron entre 20-100 µl de medio. La curva patrón con corticosterona radioinerte (15,6-2000 pg/ml), el unido no específico y el unido máximo se realizaron por triplicado en tanto que las muestras se realizaron por duplicado. Todas las incubaciones se realizaron con una cantidad fija del marcador radioactivo, 10.000 dpm de 1,2,6,7-³H(N)-testosterona, que poseía una actividad específica de 80,4 µCi/mmol (Perkin-Elmer, EEUU) en un volumen final de 0,5 ml del buffer correspondiente. El esteroide radioinerte y el radioactivo se hallaban disueltos en el buffer RIA previamente descrito. El anticuerpo anti testosterona se obtuvo en la Colorado State University (Colorado, EEUU) y fue utilizado en una dilución 1:125.000. La reacción se llevó a cabo durante 18-22 h a 4°C y se interrumpió por el agregado de carbón:dextrano (0,5:0,05 % en PBS). Luego de 20 min de incubación, los tubos se centrifugaron a 2700 xg durante 20 min a 4 °C. De los sobrenadantes obtenidos, que contenían el esteroide unido al anticuerpo, se tomaron 500 µl que se colocaron en viales con 1,5 ml de líquido de centelleo (OptiPhase-Hi safe 3, Wallac Co, Finlandia) y se contó la radioactividad en un equipo Wallac 1409 DSA (Wallac Co, Finlandia). La reacción cruzada del anticuerpo utilizado con DHT es del 15% por lo cual los valores se expresan como pg de andrógenos y no como pg de testosterona. Esto último no afecta la determinación dado que lo que se busca confirmar es una disminución en la síntesis de andrógenos

por inhibición de la enzima 3β HSD/I o por la acción de melatonina y no la cuantificación de la producción absoluta de testosterona.

La sensibilidad del ensayo fue de 15,6 pg/ml. La variación media intraensayo fue de 7,1% y la variación media ínterensayo fue de 12,6%.

14. Medición de melatonina plasmática por ELISA

Para corroborar si en *R. arenarum* existen variaciones estacionales en la concentración plasmática de melatonina y para evaluar cuales son los valores de la misma, se extrajo el plasma de animales a lo largo del año (2010 y 2011) entre las 11 y las 12 h. Además, se evaluó si la concentración de melatonina varía circadianamente, para lo cual se extrajo el plasma de animales durante la escotofase (fase oscura del ciclo luz-oscuridad) de la primavera de 2011 entre las 22 y 23 h.

Para la determinación de melatonina se utilizó un kit comercial de ELISA (IBL, Alemania) utilizado en varias especies de vertebrados (Bayarri y col., 2003; Guerrero y col., 2008; Martínez-Chavez y col., 2008). Se siguieron las instrucciones y recomendaciones del kit: los plasmas, la curva estándar y los controles fueron descongelados y purificados inmediatamente con una columna de extracción de C_{18} . Luego, los eluidos se evaporaron a sequedad en una centrífuga de vacío Speed-Vac y se resuspendieron en 150 μ l de agua bidestilada. Las muestras se incubaron en los pocillos de la placa de ELISA, precubiertos con el anticuerpo de captura, con melatonina biotinilada y antisuero anti melatonina durante 18 h a 4 °C. Luego, se incubaron con antisuero anti biotina conjugado con fosfatasa alcalina durante 120 min a temperatura ambiente en agitación. Finalizado dicho tiempo, las placas de ELISA se incubaron con el sustrato de la fosfatasa alcalina (p-nitrofenil fosfato) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación, después de lo cual se agregó la solución que frena la reacción. Se midió la densidad óptica a 415 nm con un filtro de referencia a 620 nm en un lector de ELISA modelo 680 (s/n 15503, Biorad, EEUU).

Todas las muestras, la curva estándar y los controles positivos del kit fueron realizados por duplicado. Se validó el método evaluando la concentración de melatonina en diluciones seriadas de un plasma de *R. arenarum* y se calculó el

rendimiento de la extracción con un plasma tratado con carbón:dextrano, 2%:0,2% p/v, adicionado con melatonina exógena en una concentración de 200 pg/ml.

El kit informa un rendimiento de extracción del 90-100 % y el calculado en esta tesis fue el mismo. La sensibilidad del ensayo es de 1,6 pg/ml plasma. La reacción cruzada del anticuerpo con otras sustancias derivadas del triptofano es $< 2,5\%$. La variación media intraensayo fue de 2,3% y la variación media ínterensayo fue de 11,5%.

15. Análisis estadístico

Para analizar los resultados de los experimentos in vitro y los de validación del anticuerpo anti GR se eligió un diseño de bloques aleatorizados, equivalente a un ANOVA de dos factores con una sola muestra por grupo. En este diseño se analiza por separado el efecto del tratamiento y del bloque. Este último corresponde a cada réplica realizada en distintos momentos del año. La ventaja de este diseño es que permite detectar efectos de los tratamientos aún en los casos en que existan diferencias grandes en los valores correspondientes a las distintas réplicas. Además de tener que cumplir con los supuestos de homocedasticidad y normalidad, como cualquier ANOVA, este modelo tiene que cumplir con el supuesto de no interacción entre los factores, que se verifica realizando un gráfico de perfiles. El mismo se realiza con un gráfico de líneas, colocando los tratamientos en el eje X y la variable aleatoria en el eje Y. En aquellos experimentos en que los gráficos muestran que las líneas correspondientes a cada réplica son paralelas se puede inferir que no existe interacción entre los bloques y los tratamientos (Quinn y Keough, 2002) y en el caso de esta tesis se puede concluir que las réplicas realizadas en distintos momentos del año respondieron al tratamiento de manera similar. Las diferencias entre las réplicas, que justifican realizar un análisis por bloques aleatorizados, se deben a que la cantidad de GR testicular varía entre los animales y a lo largo del año; sin embargo la respuesta a los tratamientos fue siempre la misma. En estos casos, los datos se analizaron con un ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para detectar diferencias significativas entre los tratamientos.

Los datos de los siguientes experimentos no se pudieron analizar con un diseño de bloques aleatorizados: 1) efecto de melatonina en la síntesis basal de testosterona,

2) efecto de melatonina durante 3h en el Bmax, 3) efecto de melatonina durante 24 h en la proteína GR, 4) efecto de los GC en la proteína GR. Esto fue debido a que en el primer, segundo y tercer caso se detectó interacción entre el tratamiento y el bloque, es decir que la respuesta al tratamiento fue distinta en cada réplica. En el cuarto caso se debió a que cada tratamiento tuvo distinta cantidad de réplicas.

Las variaciones estacionales de la proteína GR, así como aquellos experimentos en los cuales no se pudo aplicar un diseño de bloques aleatorizados, se analizaron con un ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Previo al análisis estadístico se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad utilizando las pruebas de Lilliefors y Bartlett, respectivamente. Los datos de sitios de unión y los valores de densidad óptica de las bandas relativizados a sus respectivos controles de carga fueron transformados aplicando el $\ln(X)$ para corregir la heterocedasticidad.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., Oklahoma, EEUU) y se consideraron diferencias significativas con $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar.

II | Resultados

Como ha sido mencionado en la Introducción, en *R. arenarum* los GC producen una disminución de la síntesis de andrógenos por una inhibición de la actividad del *cyp450c17*. Por otro lado, se han medido variaciones estacionales del número de sitios libres de unión del GR, lo cual plantea que la cantidad de receptor biológicamente activo podría no ser la misma en los distintos períodos reproductivos descritos para la especie en estudio. A continuación se detallan los resultados obtenidos en la primera parte de esta Tesis que consistió en evaluar a través de ensayos *in vitro* el efecto de los GC sobre la proteína *cyp450c17*, las variaciones estacionales de la proteína GR, la regulación del GR por distintas hormonas que varían estacionalmente y, finalmente, evaluar si la melatonina regula la síntesis de andrógenos directamente a nivel testicular.

1. Efecto de los GC en la proteína *cyp450c17*

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar si en *R. arenarum* los GC disminuyen la actividad de la enzima *cyp450c17* a través de la inhibición de la síntesis proteica de dicha enzima. Como se observa en la Figura II. 2A,B, la incubación de fragmentos de testículos durante 24 h con Dexa produjo una disminución significativa de la proteína *cyp450c17* sólo cuando se utilizó la mayor concentración (1500 nM, $F_{3,12}=3,95$; $p=0,03$, ANOVA de dos factores). En cambio, la incubación con DHB disminuyó significativamente la proteína tanto cuando se aplicó el tratamiento de 150 nM como de 1500 nM ($F_{3,9}=5,80$; $p=0,01$, ANOVA de dos factores).

2. Validación del anticuerpo anti GR e isoformas del GR testicular

Para el análisis de las variaciones estacionales en el GR así como para el estudio de su regulación se utilizó el anticuerpo GRm-20 dirigido, como ya se mencionara, contra el extremo amino terminal de la proteína receptora de ratón. El anticuerpo GRm-20 permitió detectar en el homogenato, en la fracción postnuclear y en la fracción nuclear dos bandas inmunoreactivas de 55 y 82 Kda (Figura II. 3A).

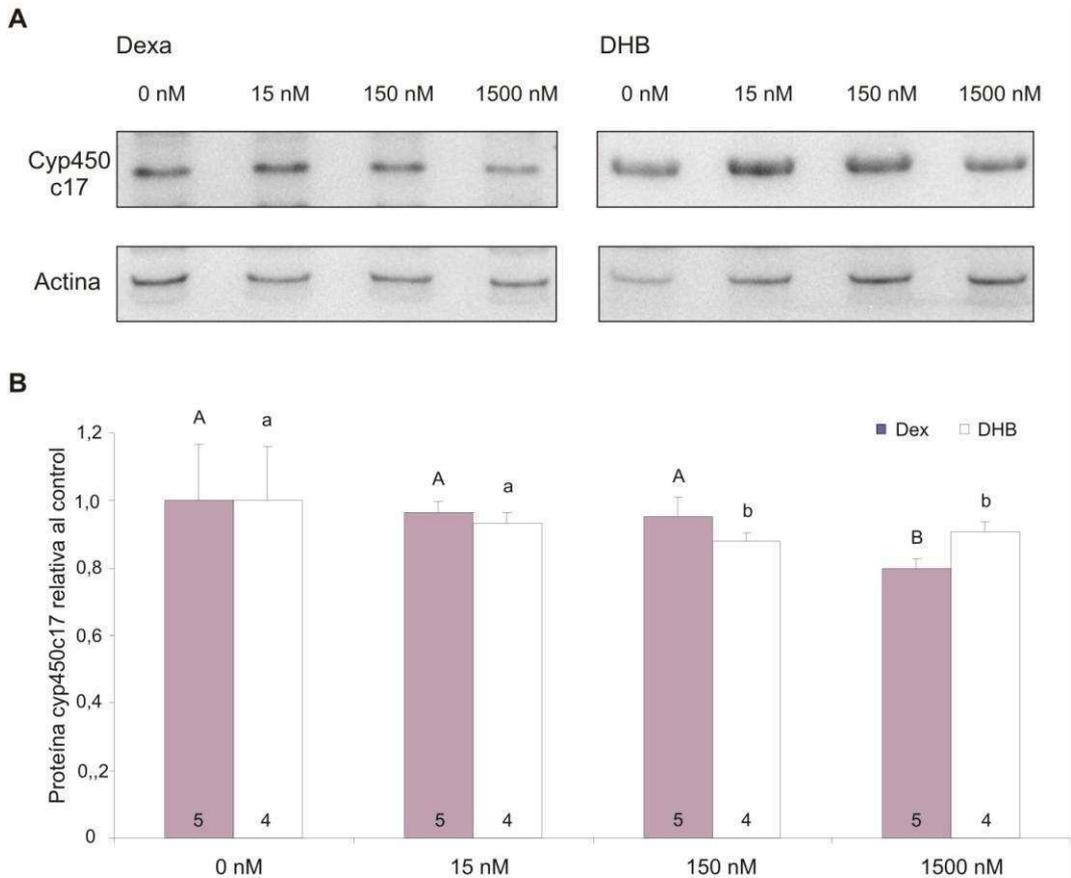


Figura II. 2. Efecto in vitro de Dexa y 5 α -dihidro corticosterona (DHB) sobre la proteína cyp450c17. El panel **A** muestra una foto de un Western blot de un experimento representativo. El panel **B** muestra los valores de la banda correspondiente a la proteína cyp450c17 relativizados a los correspondientes niveles de actina. Los resultados se expresan como el valor promedio referido al control (0 nM). El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes mayúsculas (para los tratamientos con Dexa) o minúsculas (para los tratamientos con DHB) sobre cada barra de error estándar.

La preincubación del anticuerpo con el péptido bloqueante mostró que ninguna de las bandas se revela de manera inespecífica (Figura II. 3B). En los 5 ensayos realizados incubando fragmentos de testículos con medio solo (control) o con el agregado de Dexa 500 nM se observó que para ambas bandas la relación fracción postnuclear/fracción nuclear fue menor en los fragmentos tratados con Dexa que en los controles (Figura II. 4). Sin embargo, el análisis estadístico de los datos mediante un ANOVA de dos factores detectó diferencias significativas sólo en la banda de 82 Kda ($F_{1,4}=10,6$; $p=0,03$ para la banda de 82 Kda y $F_{1,4}=0,7$; $p=0,3$ para la banda de 55 Kda). Como se mencionara en la Introducción, el tratamiento con Dexa, agonista

del GR, provoca la translocación del receptor desde el citoplasma al núcleo. Por lo tanto, si esta translocación es detectada por un dado anticuerpo esto indica reconocimiento específico por parte del mismo.

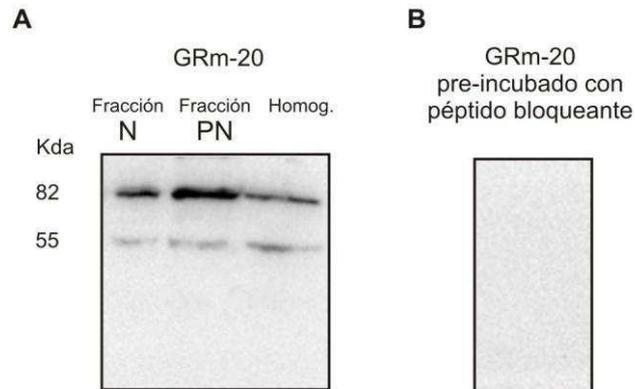


Figura II. 3. Bandas inmunoreactivas detectadas por Western blot con el anticuerpo GRm-20 en la fracción nuclear (N), postnuclear (PN) y homogenato de testículo de *R. arenarum*. El panel **A** muestra una foto de una membrana representativa en la cual se observan las bandas de 55 y 82 Kda reveladas por el anticuerpo. El panel **B** muestra una foto de una membrana incubada con el GRm-20 pretratado con el péptido bloqueante.

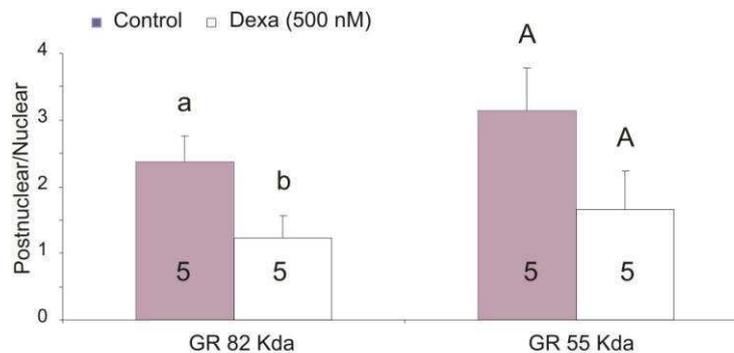


Figura II. 4. Translocación de las bandas del GR a la fracción nuclear en testículos de *R. arenarum* control y tratados con Dexa. Los valores de cada banda fueron relativizados a los correspondientes niveles de α -tubulina y los resultados se expresaron como el valor promedio de la relación fracción postnuclear/fracción nuclear. El número de réplicas se muestra dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes minúsculas (banda 82 Kda) o mayúsculas (banda 55 Kda) sobre cada barra de error estándar.

Como control de la metodología empleada se utilizaron testículos de ratón. El anticuerpo GRm-20 reveló una única banda de 96 Kda en el homogenato mencionado (Figura II. 5A) que no se observó cuando el anticuerpo fue preincubado con el péptido bloqueante (gel no mostrado). El experimento de incubación con Dexa 500 nM mostró resultados cualitativamente similares a los observados en *R. arenarum* (Figura II. 5B); la proporción de la banda de 96 Kda en la fracción postnuclear/fracción nuclear es menor en los testículos tratados con Dexa que en los controles. Además, este control mostró que en el ratón la translocación de la banda del GR a la fracción nuclear tampoco es completa, por lo menos en las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis.

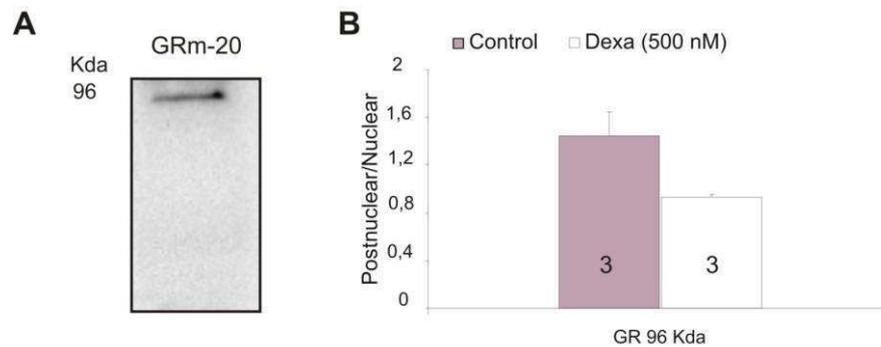


Figura II. 5. Translocación de las bandas del GR a la fracción nuclear en testículos de ratón control y tratados con Dexa. El panel **A** muestra una foto de una membrana representativa en la que se observa la banda de 96 Kda revelada por el anticuerpo. El panel **B** muestra el resultado del experimento de translocación. Las bandas del GR fueron relativizadas a las correspondientes bandas de α -tubulina y los resultados se expresaron como el valor promedio de la relación entre la fracción postnuclear/fracción nuclear. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento.

Para evaluar la separación de las fracciones nuclear y postnuclear, algunas de las membranas que contenían proteínas de ambas fracciones de sapo fueron incubadas con un anticuerpo específico contra el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). El anticuerpo mostró que en la denominada fracción nuclear la banda inmunoreactiva de PCNA tiene mayor densidad óptica que en la fracción postnuclear (Figura II. 6), lo cual verifica el enriquecimiento en núcleos de la fracción mencionada.

A partir de estos resultados se decidió que en los experimentos de variaciones estacionales de la proteína GR y en los experimentos in vitro, se evaluarían de manera separada las dos bandas inmunoreactivas detectas con el anticuerpo.

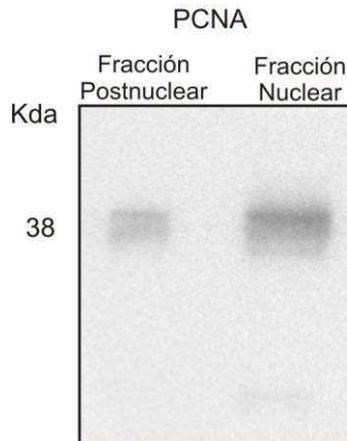


Figura II. 6. Western blot de la proteína PCNA. Las fracciones nuclear y postnuclear se obtuvieron por fraccionamiento subcelular. La figura muestra una foto de un experimento representativo en el cual se observan ambas fracciones reveladas con el anticuerpo anti PCNA.

3. Proteína GR en la fracción subcelular enriquecida en membranas plasmáticas y en homogenato de células dispersas de testículo sin espermatozoides

Se evaluó si alguna de las bandas inmunoreactivas reveladas con el anticuerpo GRm-20 correspondía a un receptor de membrana plasmática. Para ello se obtuvo una fracción enriquecida en membranas plasmáticas en la cual el anticuerpo GRm-20 no reveló bandas inmunoreactivas (Figura II. 7A).

Por otra parte, se evaluó si alguna de las bandas reveladas por el anticuerpo GRm-20 se encontraba sólo en los espermatozoides. El Western blot realizado para evaluar la proteína GR en homogenatos de células dispersas de testículo con espermatozoides o separadas de los mismos mostró las mismas bandas ya descritas en el punto 2, de 55 y 82 Kda (Figura II. 7B).

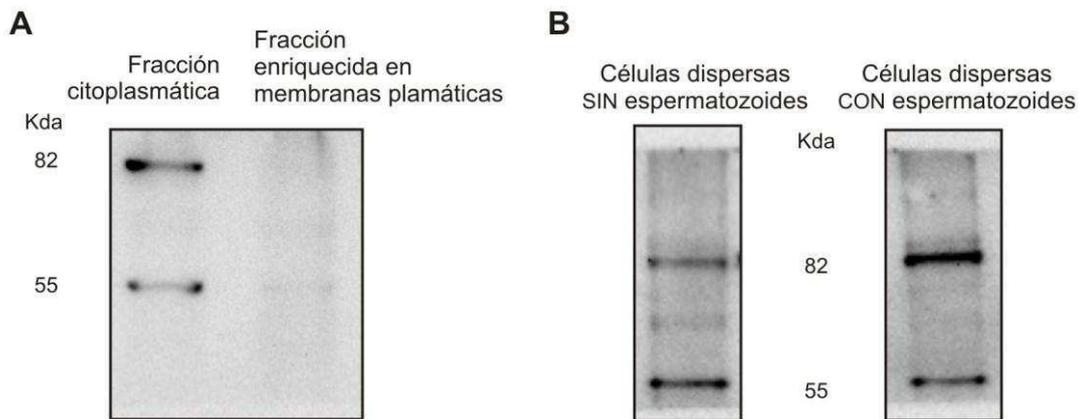


Figura II. 7. Bandas inmunoreactivas detectadas por Western blot con el anticuerpo GRm-20 en la fracción enriquecida en membranas plasmáticas y en células aisladas con o sin espermatozoides. El panel **A** muestra la foto de una membrana representativa en la cual se observan las bandas inmunoreactivas obtenidas en la fracción citoplasmática y en la fracción enriquecida en membranas plasmáticas. El panel **B** muestra la foto de una membrana en la cual se indican las bandas inmunoreactivas obtenidas a partir de homogenatos de células dispersas de testículo. Las células fueron separadas (SIN) o no (CON) de los espermatozoides.

4. Variación estacional de la proteína GR

Dado que en *R. arenarum* se han determinado variaciones estacionales en el número aparente de receptores libre (B_{max}) (Denari y Ceballos, 2006), en esta tesis se evaluó si existen también variaciones estacionales en la proteína receptora y si dichas variaciones coinciden con las del B_{max} . La Figura II. 8 muestra que ambas bandas del GR varían estacionalmente. La banda de 55 Kda aumenta significativamente durante el período postreproductivo y disminuye durante el prerreproductivo ($F_{2,16}=4,89$; $p=0,02$). En cambio, la banda de 82 Kda disminuye tanto durante el período prerreproductivo como el reproductivo ($F_{2,22}=15,12$; $p<0,001$). La variación estacional de la suma de ambas bandas tuvo un patrón similar a la banda de 55 Kda, dado que es la banda mayoritaria ($F_{2,22}=4,58$; $p=0,02$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de un factor.

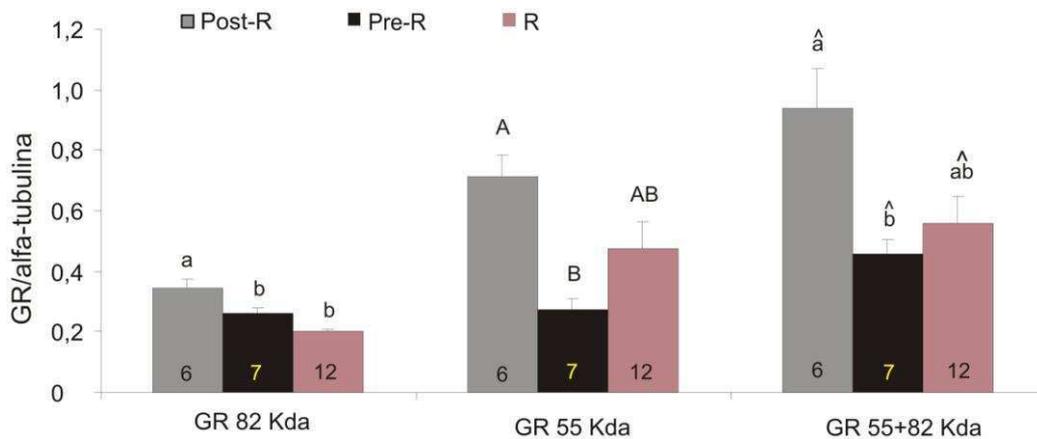


Figura II. 8. Patrón estacional de la proteína GR medida por Western blot. Las bandas inmunoreactivas de 55 y 82 Kda fueron semicuantificadas en el homogenato completo de testículo de sapos obtenidos durante los períodos postreproductivo (Post-R), prerreproductivo (Pre-R) y reproductivo (R). Los valores de la banda de la proteína GR fueron relativizados a los correspondientes niveles de α -tubulina. Los resultados se expresan como el valor promedio de la proteína GR en cada período. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente. Las diferencias estadísticamente significativas entre los períodos se indican con letras diferentes minúsculas (banda 82 Kda), mayúsculas (banda 55 Kda) o con acento circunflejo (suma de ambas bandas) sobre cada barra de error estándar.

5. Rol de los andrógenos en la regulación del GR

Estos estudios se realizaron con el fin de establecer si los andrógenos, cuya concentración varía estacionalmente, regulan la sensibilidad del testículo a la acción de los GC a través de la regulación del GR. Dado que los testículos son los órganos productores de andrógenos, en estos experimentos fue necesario utilizar distintas aproximaciones experimentales. Con este propósito, se evaluó el efecto del agregado de andrógenos exógenos (testosterona y DHT), de la inhibición de la acción de los andrógenos endógenos mediante el agregado de un antagonista de su receptor, casodex, o por la inhibición de su síntesis por la incorporación de CNK. La Figura II. 9A muestra que ni el agregado de testosterona 100 nM, ni de DHT 100 nM produjeron diferencias significativas en el Bmax del GR testicular luego de 24 h de tratamiento. Además, se evaluó con un gráfico de perfiles si se observaban

diferencias cualitativas entre los ensayos realizados en distintas épocas del año. Como muestra la Figura II. 9B, los distintos ensayos mostraron una tendencia similar, lo cual permitió analizar los resultados con un modelo de bloques aleatorizados.

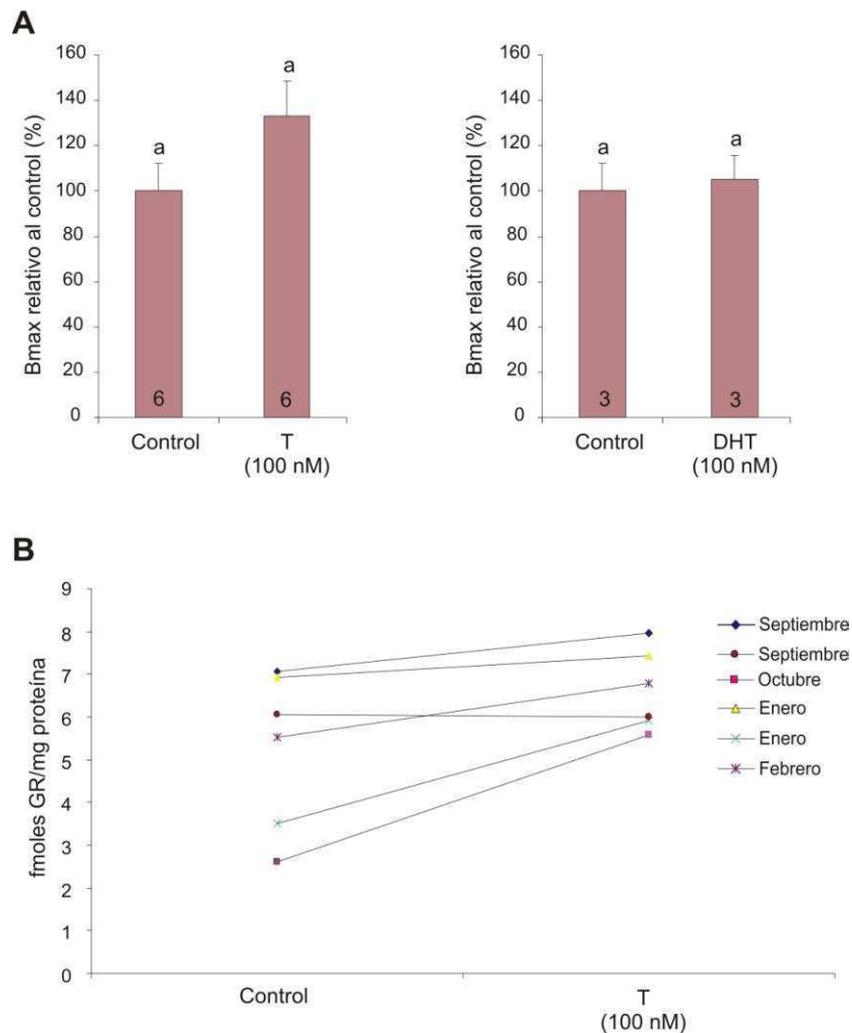


Figura II. 9. Efecto del agregado de andrógenos en la regulación del número de sitios de unión del GR. La unión al GR fue analizada 24 h después de la incubación con testosterona (T) o 5 α -dihidrotestosterona (DHT). El panel A muestra los resultados como el valor promedio del unido máximo (Bmax) obtenido luego de cada tratamiento referido al valor control. El número de réplicas se indica dentro de cada columna. La diferencia estadísticamente significativa entre el control y cada tratamiento se indica con letras diferentes sobre cada barra de error estándar. El panel B muestra el gráfico de perfiles con la respuesta al tratamiento para cada ensayo realizado con T.

Asimismo, como se indica en la Figura II. 10A, tampoco se observaron diferencias en el Bmax cuando se bloqueó la acción de los andrógenos exógenos con CNK o casodex. Los ensayos realizados en distintas épocas del año también mostraron una respuesta similar al tratamiento, en este caso con CNK (Figura II. 10B).

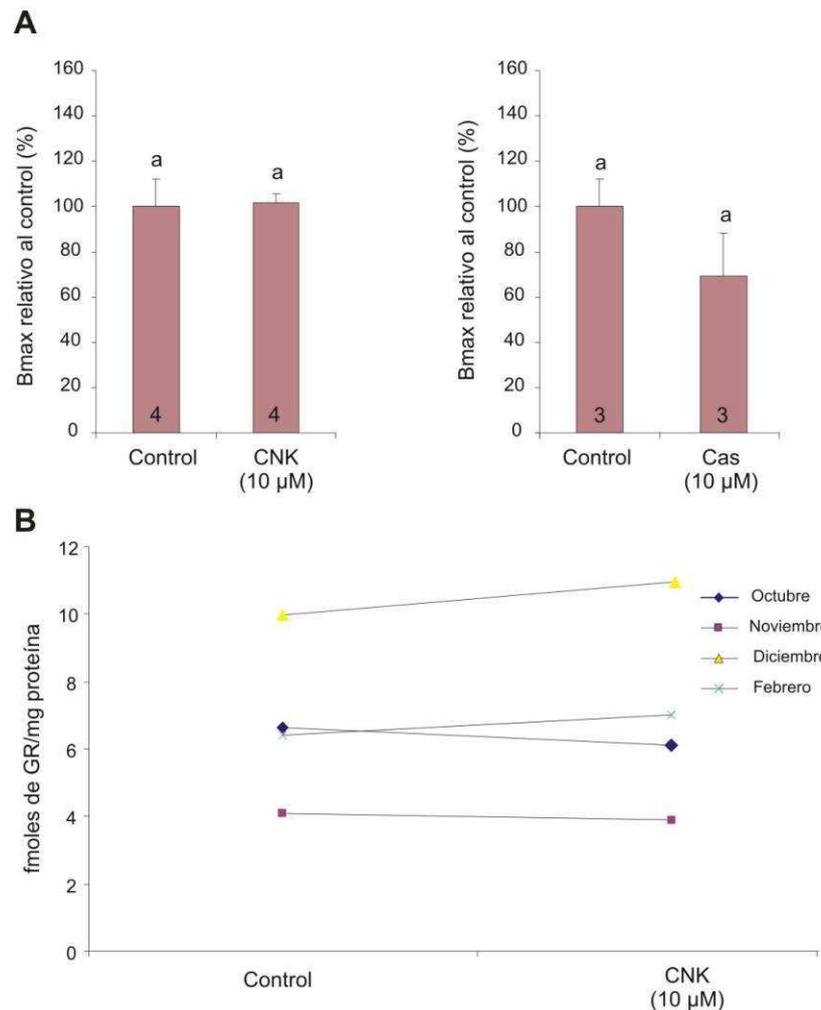


Figura II. 10. Efecto del bloqueo de la acción de los andrógenos endógenos en la regulación del número de sitios de unión del GR. La unión al GR fue analizada 24 h después de la incubación con CNK o casodex (Cas). El panel A muestra los resultados como el valor promedio del unido máximo (Bmax) obtenido luego de cada tratamiento referido al valor control. El número de réplicas se indica dentro de cada columna. La diferencia estadísticamente significativa entre el control y cada tratamiento se indica con letras diferentes sobre cada barra de error estándar. El panel B muestra el gráfico de perfiles con la respuesta al tratamiento para cada ensayo realizado con CNK.

Los valores obtenidos en el ANOVA de dos factores fueron los siguientes:

$F_{1,5}=3,5$; $p=0,1$ para testosterona;

$F_{1,2}=0,1$; $p=0,8$ para DHT;

$F_{1,3}=0,4$; $p=0,6$ para CNK;

$F_{1,2}=2,1$; $p=0,2$ para casodex.

Cuando se evaluó el rol de los andrógenos en la regulación de la proteína GR se obtuvieron resultados similares, ninguno de estos tratamientos modificó las bandas inmunoreactivas semicuantificadas por Western blot (Figura II. 11A,B).

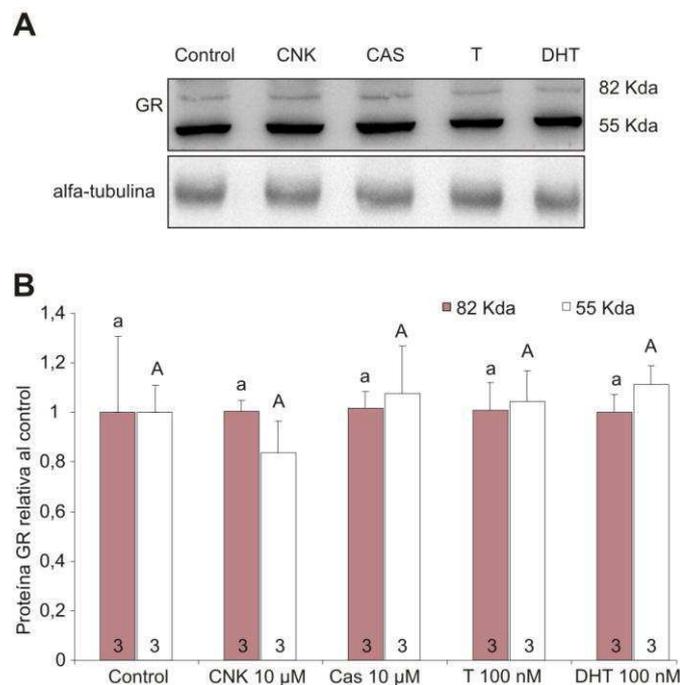


Figura II. 11. Efecto de los andrógenos en la regulación de la proteína receptora del GR. La proteína fue analizada 24 h después de la incubación con CNK, casodex (Cas), testosterona (T) y 5α -dihidrotestosterona (DHT). El panel A muestra una foto de un Western blot representativo. El panel B muestra los valores de la proteína GR relativizados a los correspondientes niveles de α -tubulina y se expresan como el valor promedio referido al control. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes minúsculas (para la banda de 82 Kda) o mayúsculas (para la banda de 55 Kda) sobre cada barra de error estándar.

Los valores del ANOVA de dos factores son los siguientes: $F_{4,8}=0,3$; $p=0,9$ y $F_{4,8}=0,99$; $p=0,46$ para las bandas de 82 y 55 Kda, respectivamente.

El efecto inhibitorio de CNK en la esteroidogénesis se confirmó midiendo la producción de testosterona por radioinmunoensayo en los medios de incubación control y tratados con CNK. Los resultados se muestran en la Figura II. 12 ($F_{1,3}=16,4$; $p=0,03$, ANOVA de dos factores).

Luego de 24 h de incubación, en los testículos control el Bmax fue $6,17 \pm 0,73$ fmol/mg de proteína y la producción basal de testosterona en el medio de incubación de $8,92 \pm 2,46$ ng/ml.

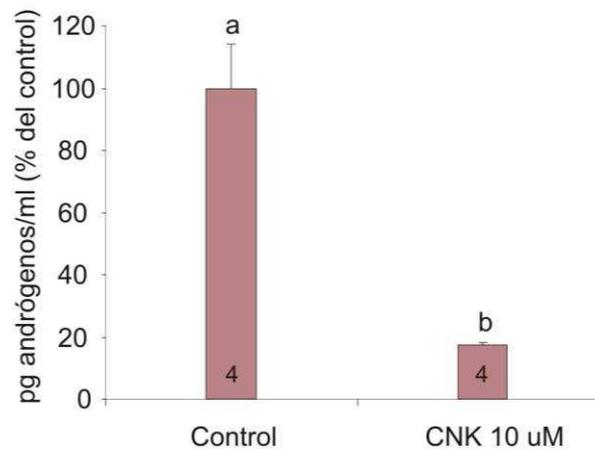


Figura II. 12. Efecto de CNK en la esteroidogénesis testicular. Los resultados se expresan como el valor promedio de los pg de andrógenos/ml de medio de incubación referido al valor control. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes sobre cada barra de error estándar.

6. Rol de los GC en la regulación del GR

Además de analizar el rol de los andrógenos en la regulación del GR, se estudió si los GC, que en esta especie también varían estacionalmente (Denari y Ceballos, 2006), regulan su propio receptor. En este caso sólo se estudió el efecto sobre la proteína receptora del complejo GR, dado que la Dexametasona y el RU486 empleados para la incubación in vitro interfieren con el ensayo de medición de sitios de unión. Como se observa en la Figura II. 13, sólo la incubación in vitro de fragmentos de testículos

con Dexametasona (Dexa) 150 nM produjo un aumento significativo de ambas bandas inmunoreactivas de la proteína GR. En el análisis estadístico por ANOVA de un factor se obtuvieron los siguientes valores: $F_{5,33} = 2,75$; $p = 0,03$ y $F_{5,33} = 2,98$; $p = 0,02$ para las bandas de 82 y 55 Kda, respectivamente.

Dado que la incubación con el antagonista del GR RU486 no modificó la cantidad de proteína GR respecto del control, se podría inferir que el aumento de la proteína producido por Dexa 150 nM no se debe a la estabilización de la proteína receptora por la unión a un ligando (Figura II. 13).

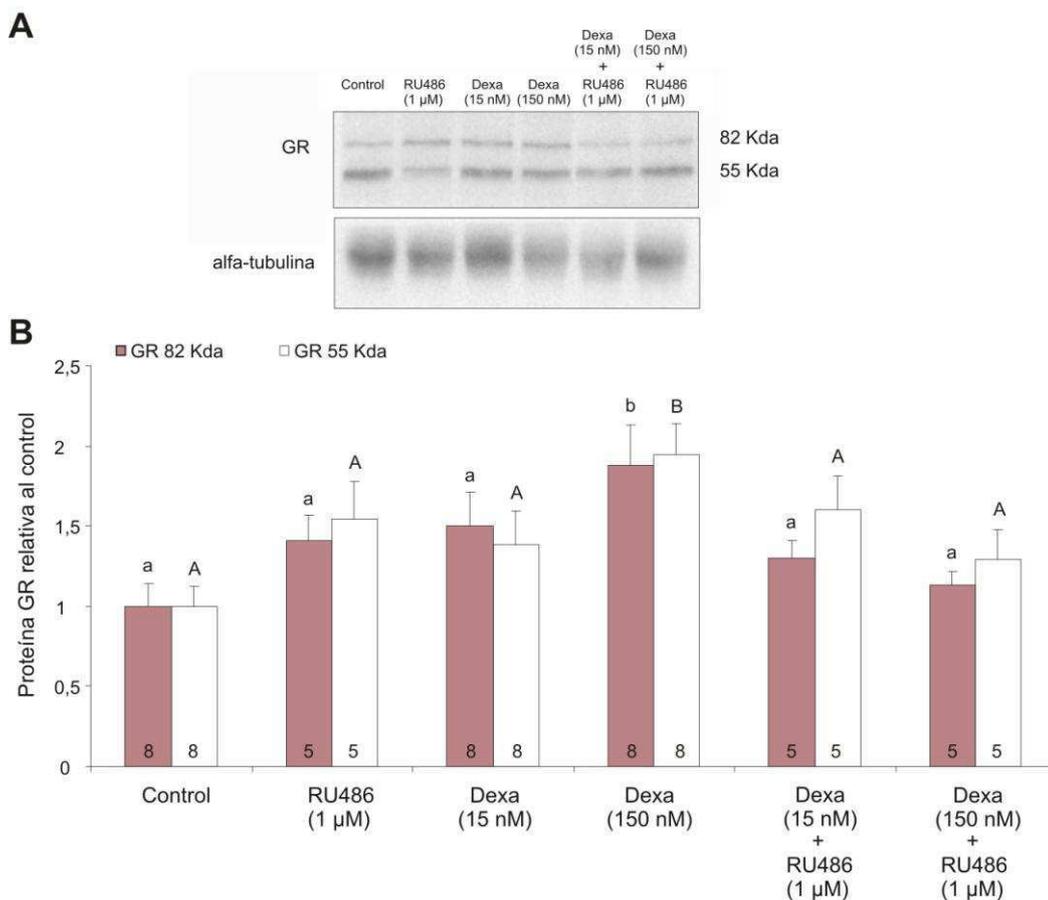


Figura II. 13. Efecto de los GC en la regulación de su propio receptor. La proteína GR fue analizada luego de 24 h de tratamiento con Dexa y/o RU486. El panel **A** muestra una foto de un Western blot representativo. El panel **B** muestra los valores de la proteína GR relativizados a los correspondientes niveles de α -tubulina y se expresan como el valor promedio referido al control. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes minúsculas (para la banda de 82 Kda) o mayúsculas (para la banda de 55 Kda) sobre cada barra de error estándar.

7. Rol de la melatonina en la regulación del GR

Como se mencionara en la Introducción, la melatonina es una hormona que varía estacionalmente en diversos vertebrados y ha sido descrito que regula el GR de distintas maneras. Por lo tanto, también se evaluó el rol de la melatonina en la regulación del GR testicular. Dado que estos experimentos se realizaron previo a la medición de dicha hormona en el plasma de *R. arenarum*, se evaluó el efecto de dos concentraciones de melatonina descritas en el plasma de otro anuro, *Pelophilax perezi*, como se mencionó en II. Materiales y Métodos. Cuando se incubaron fragmentos de testículos durante 24 h con melatonina se observó que esta hormona produce un efecto bifásico en el Bmax del GR testicular; la menor concentración evaluada (40 pg/ml) disminuye el Bmax pero la mayor (200 pg/ml) no lo modifica (Figura II. 14A, $F_{2,10}=8,4$; $p=0,007$, ANOVA de dos factores). Cuando se comparó la respuesta al tratamiento con melatonina entre los distintos ensayos realizados en diferentes épocas del año, se observó que en todos se produjo, en mayor o menor medida, una respuesta bifásica (Figura II. 14B).

Al evaluar el efecto de la incubación conjunta con el antagonista no específico de receptores de membrana de melatonina, luzindole, se observó que la presencia del antagonista en el medio de incubación inhibe el efecto producido por la menor concentración de melatonina (Figura II. 15, $F_{3,6}=8,4$; $p=0,8$ ANOVA de dos factores). Estos resultados implican que el efecto inhibitorio de la menor concentración de melatonina estaría mediado por la unión a uno de los tipos de receptor de membrana.

Por otro lado, al analizar la proteína GR por Western blot se determinó que ninguna de las concentraciones de melatonina empleadas, ni la incubación conjunta con luzindole, modificó las bandas inmunoreactivas de 55 ni de 82 Kda (Figura II. 16A,B). Los valores del ANOVA de un factor para el efecto de melatonina sola fueron, $F_{2,15}=0,82$; $p=0,5$, para la banda de 55 Kda y $F_{2,15}=0,62$; $p=0,5$, para la banda de 82 Kda. Para el efecto de melatonina en presencia de luzindole, los valores del ANOVA de un factor fueron $F_{3,8}=0,74$; $p=0,6$, para la banda de 55 Kda y $F_{3,8}=0,30$; $p=0,83$, para la banda de 82 Kda.

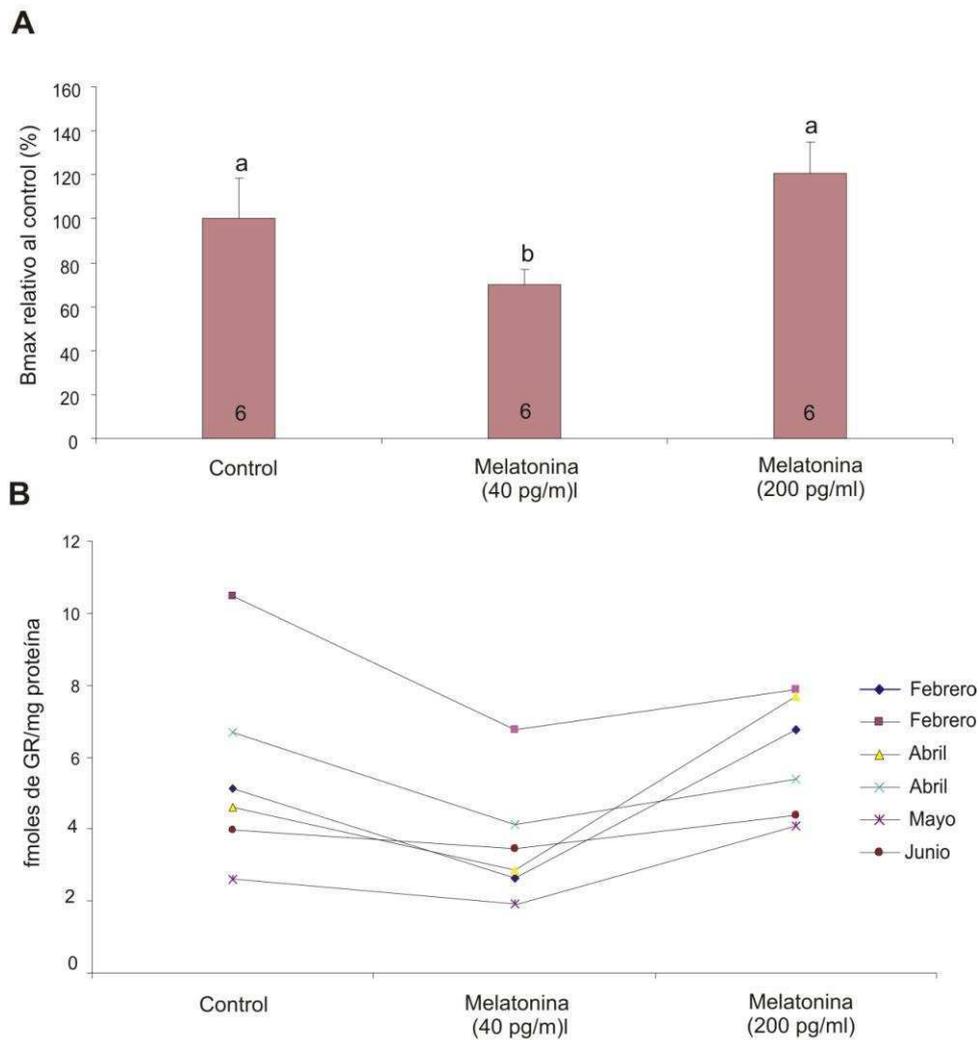


Figura II. 14. Efecto de la melatonina en la regulación del número de sitios de unión del GR. La unión al GR fue analizada 24 h después de la incubación con melatonina. El panel **A** muestra los resultados como el valor promedio del unido máximo (Bmax) obtenido luego de cada tratamiento referido al valor control. El panel **B** muestra el gráfico de perfiles con la respuesta al tratamiento para cada ensayo realizado con melatonina. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes sobre cada barra de error estándar.

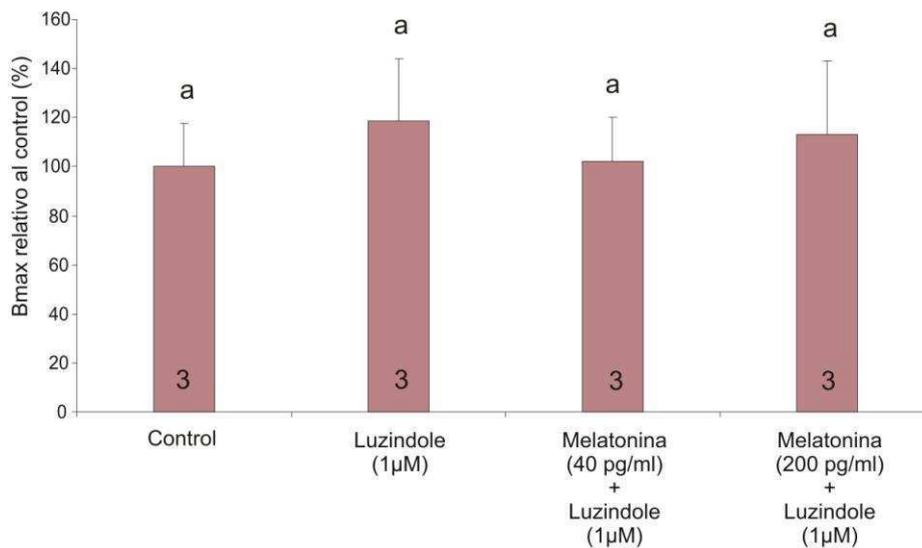


Figura II. 15. Efecto del antagonista luzindole sobre la acción de melatonina sobre el número de sitios de unión del GR. La unión al GR fue analizada 24 h después de la co-incubación con melatonina y luzindole. Los resultados se expresan como el valor promedio del unido máximo (Bmax) obtenido luego de cada tratamiento referido al valor control. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes sobre cada barra de error estándar.

Para evaluar si la incubación con la menor concentración de melatonina (40 pg/ml) disminuye el Bmax del GR debido a modificaciones postraduccionales del receptor, se incubaron fragmentos de testículos durante tiempos cortos con ambas concentraciones de melatonina. La Figura II. 17 muestra que dichos tratamientos no produjeron modificaciones en el Bmax ($F_{2,12}=0,03$, $p=0,97$, ANOVA de un factor).

Se debe aclarar que tanto en el caso de la medición de la proteína GR por Western blot como en el experimento de incubación durante 3 h los datos se analizaron por un ANOVA de un factor porque se detectó interacción entre los factores tratamiento y réplica, pero que no se observó relación entre la época del año en la cual se realizó el ensayo y la respuesta al tratamiento.

El Bmax en los testículos control a las 3 y 24 h de incubación fue de $15,85 \pm 1,08$ y $6,26 \pm 0,88$ fmoles/mg de proteína, respectivamente.

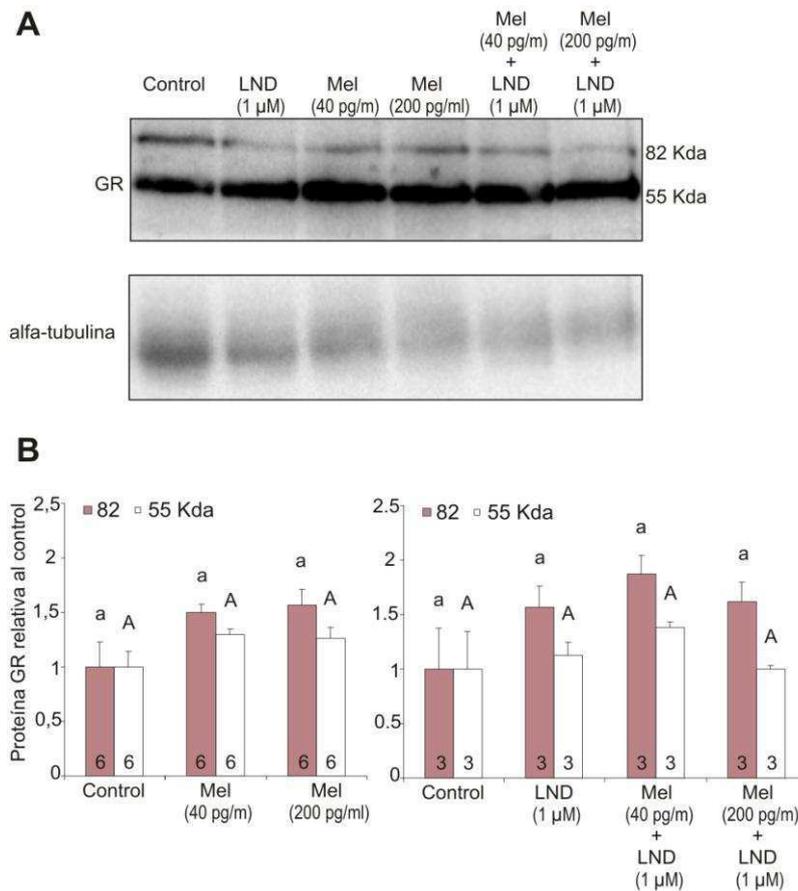


Figura II. 16. Efecto de la melatonina en la regulación de la proteína receptora del GR. La proteína GR fue analizada 24 h después de la incubación con melatonina (Mel) y/o luzindole (LND). El panel **A** muestra una foto de una membrana de un experimento representativo. El panel **B** muestra los valores de la proteína GR relativizados a los correspondientes niveles de α -tubulina y se expresan como el valor promedio referido al control. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes minúsculas (para la banda de 82 Kda) o mayúsculas (para la banda de 55 Kda) sobre cada barra de error estándar.

Dado que la medición de sitios de unión al ligando se realizó en condiciones de saturación, la misma no aportó datos sobre la afinidad del receptor. Para evaluar si la concentración de melatonina que disminuye los sitios de unión a Dexa también modifica la afinidad del GR por el ligando se debieron realizar ensayos de competencia luego del tratamiento de los testículos con melatonina 40 pg/ml. No se utilizó la concentración mas elevada de melatonina por cuanto no produjo ningún efecto en la unión de Dexa al GR. El análisis de los resultados con el programa Ligand mostró que la incubación durante 24 h con melatonina 40 pg/ml no produjo

diferencias significativas en el K_d (Figura II. 18). Los valores medios de K_d calculados por el programa para el control y para el tratado con melatonina 40 $\mu\text{g/ml}$ fueron $10,30 \pm 2,69$ nM y $3,07 \pm 1,22$ nM, respectivamente.

La leve diferencia que se observa entre ambas curvas de desplazamiento no se debe a una variación en el K_d sino a la diferencia en el número de sitios de unión.

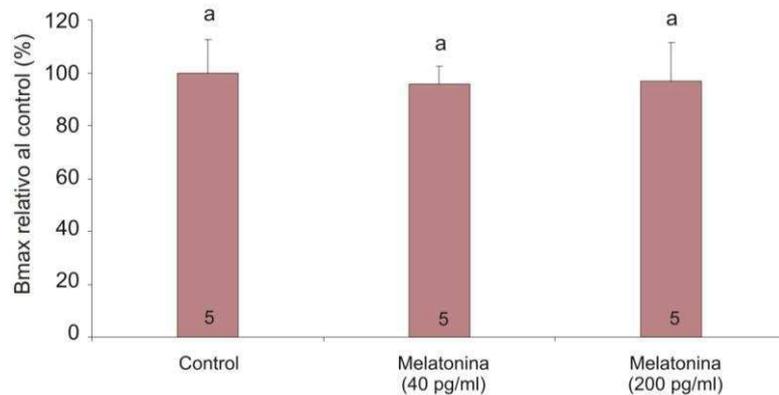


Figura II. 17. Efecto del tratamiento in vitro con melatonina por tiempos cortos en el número de sitios de unión del GR. La unión al GR fue analizada 3 h después de la incubación con melatonina. Los resultados se expresan como el valor promedio referido al control. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes sobre cada barra de error estándar.

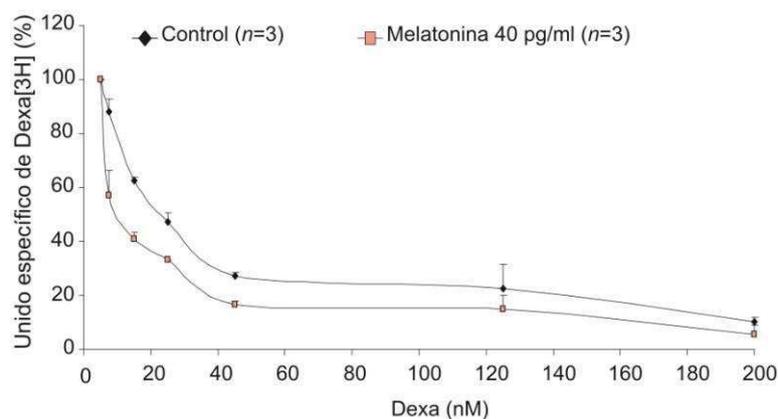


Figura II. 18. Efecto de la melatonina sobre la constante de disociación (K_d) del GR. El K_d fue medido 24 h después de la incubación con 40 $\mu\text{g/ml}$ de melatonina. Se muestran las curvas de desplazamiento de la unión específica de Dexa- ^3H con diferentes concentraciones de Dexa radioinerte (2,5-200 nM). Los resultados se expresan como el valor promedio de los distintos experimentos \pm error estándar. El número de réplicas se indica entre paréntesis junto a la leyenda correspondiente a cada tratamiento.

8. Ensayo de unión del GR a Dexa en presencia de melatonina y luzindole

Se evaluó si la melatonina disminuía el número de sitios de unión del GR interfiriendo con la unión de Dexa al complejo receptor. Para ello, se realizaron los ensayos de unión en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de melatonina o luzindole. Los resultados que se presentan en la Figura II. 19 muestran que ni la melatonina ni el luzindole interfieren con la unión de Dexa al receptor, en todos los casos y para todas las concentraciones el Bmax relativo al control, sin melatonina o luzindole, es cercano al 100%.

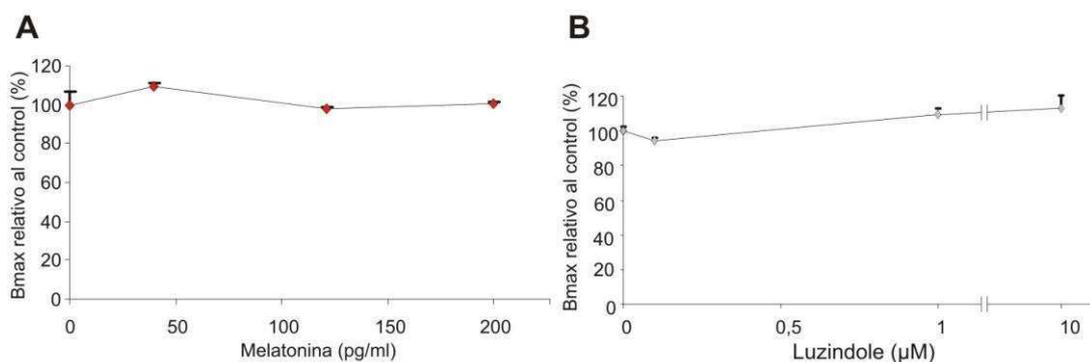


Figura II. 19. Ensayo de unión de Dexa al GR en ausencia o presencia de melatonina y luzindole. Los paneles **A** y **B** muestran los efectos de distintas dosis de melatonina y luzindole, respectivamente, sobre la unión de Dexa- ^3H al GR en la fracción postnuclear de homogenatos de testículos no tratados. Los resultados se expresan como el valor promedio de 3 réplicas realizadas para cada dosis \pm error estándar.

9. Efecto de melatonina en la producción basal de testosterona

Dado que se observó efecto de melatonina sobre el GR testicular, se evaluó también si la melatonina afectaba la síntesis de andrógenos. Se estudió el efecto de la incubación durante 24 h con melatonina 40 y 200 pg/ml en ausencia o presencia de luzindole 1 μM sobre la síntesis basal de andrógenos. La medición de la concentración de andrógenos en el medio de incubación mostró que ninguna de las concentraciones de melatonina evaluadas, ni el antagonista luzindole, modificó la síntesis basal de dichos esteroides (Figura II. 20, $F_{5,45}=0,42$; $p=0,84$, ANOVA de un factor).

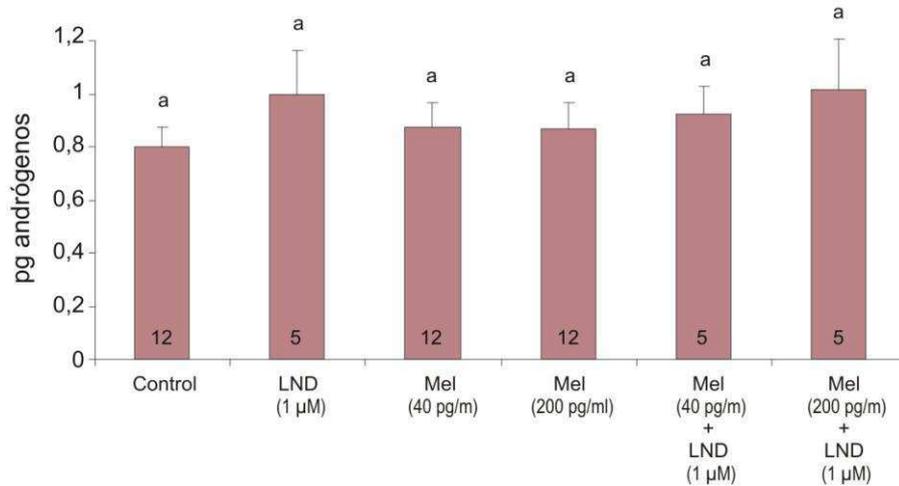


Figura II. 20. Efecto de la melatonina en la síntesis basal de andrógenos. Se evaluó la síntesis de testosterona en el medio de incubación con melatonina (Mel) y/o luzindole (LND) durante 24 h. Los resultados se expresan como pg andrógenos/ml de medio de incubación referido a la cantidad total de proteínas de los testículos incubados. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se indican con letras diferentes sobre cada barra de error estándar.

Se debe aclarar que los datos se analizaron por un ANOVA de un factor porque se detectó interacción entre los factores tratamiento y réplica, pero que no se observó relación entre la época del año en la cual se realizó el ensayo y la respuesta al tratamiento.

El radioinmunoensayo de testosterona realizado en presencia de melatonina o luzindole mostró que el anticuerpo antitestosterona no tiene reacción cruzada con ninguna de las dos sustancias (datos no mostrados).

10. Concentraciones plasmáticas de melatonina en *R. arenarum*

La concentración plasmática de melatonina se midió en animales sacrificados entre las 11-12 h en distintos meses del año y entre la 22-23 h durante la primavera. Los datos se agruparon según los períodos reproductivos descritos para *R. arenarum* (Denari y Ceballos, 2005). En la Figura II. 21 se observa que la concentración plasmática de melatonina varía a lo largo del año, las mayores concentraciones de melatonina plasmática se encuentran durante el período prerreproductivo y las menores se observan durante el período reproductivo

($F_{2,22}=4,64$, $p=0,02$ de un ANOVA de un factor). Por otro lado, durante el período reproductivo, la melatonina aumenta durante la noche ($F_{1,11}=14,58$; $p=0,002$, ANOVA de un factor).

Los valores de melatonina plasmática medidos en las condiciones experimentales llevadas a cabo en esta tesis se encuentran entre los 5 pg/ml y 34 pg/ml y en la Tabla II. 1 se muestran los valores promedio para cada período.

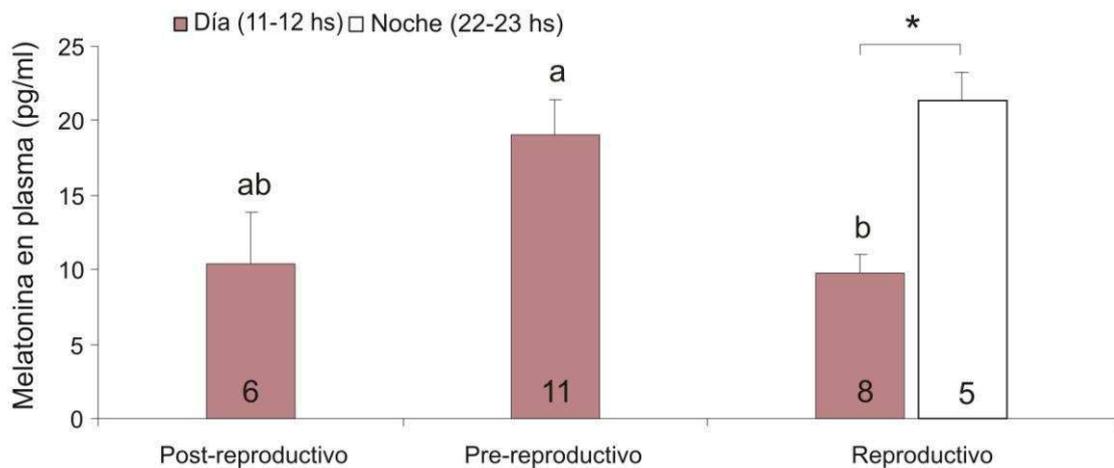


Figura II. 21. Concentración plasmática de melatonina. El gráfico muestra la concentración plasmática de melatonina en los tres períodos reproductivos descritos para *R. arenarum*. Los resultados se expresan como el valor promedio en cada período. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada grupo. Las diferencias estadísticamente significativas entre los períodos se indican con letras minúsculas diferentes sobre cada barra de error estándar y la diferencia estadísticamente significativa entre los plasmas obtenidos de día y de noche se indica con un asterisco.

Tabla II. 1. Concentración plasmática de melatonina

	Período		
	Post-R (enero-abril)	Pre-R (mayo-agosto)	Reproductivo (septiembre-diciembre)
Día (11-12 hs)	10,4 ± 3,4 ^{ab}	19,1 ± 2,4 ^a	9,8 ± 1,2 ^b
Noche (22-23 hs)	-	-	21,2 ± 2,9 [*]

Las letras diferentes minúsculas indican diferencias significativas entre los períodos reproductivos. El asterisco indica diferencia significativa entre el día y la noche durante el período reproductivo.

II | Discusión

1. El efecto de los glucocorticoides en la función esteroidogénica

Diversos estudios mostraron que en la mayoría de las especies de vertebrados ectotermos, incluida *R. arenarum*, existen variaciones estacionales de los niveles plasmáticos de GCs, tanto en condiciones basales como de estrés (Denari y Ceballos, 2005; Romero, 2002). Sin embargo, a pesar de que se han postulado diversos roles fisiológicos para dichas variaciones, se conoce poco sobre su efecto a nivel gonadal. Teniendo en cuenta lo mencionado, la primera parte de esta tesis consistió en el estudio de la acción de los GCs en algunas funciones testiculares. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio en *R. arenarum* mostraron que tanto corticosterona como Dexametasona disminuyen en forma dependiente de la dosis la síntesis de andrógenos por la inhibición de la actividad de la enzima esteroidogénica *cyp450c17* (Malamud, 2005). Además, se demostró que dicha inhibición se produce por un mecanismo mediado por el GR. Estos efectos se obtuvieron con 150 nM de GCs, concentración que corresponde a los niveles plasmáticos de corticosterona durante el período reproductivo. Los efectos fueron evidentes también con 1500 nM, que es una concentración muy elevada que podría corresponder a los niveles plasmáticos inducidos en una situación de estrés (Paolucci y col., 1990; Yao y col., 2008).

En esta tesis se analizó por Western blot si la disminución de la actividad del *cyp450c17* se debe a que los GCs producen una caída en la síntesis o estabilidad de dicha proteína. Los experimentos mostraron que sólo la mayor concentración de Dexametasona utilizada (1500 nM) produce una disminución de la proteína *cyp450c17* (Figura II. 2). Este resultado fue llamativo dado que concuerda sólo en parte con el efecto de los GCs sobre la actividad mencionada. Por un lado, la concentración de GCs correspondiente al período reproductivo (150 nM) induce una disminución de la actividad de la enzima pero no modifica la cantidad de proteína *cyp450c17*. Por otro lado, una concentración muy alta de GCs produce una disminución tanto en la actividad de la enzima como en la cantidad de proteína. Esta diferencia plantea que los GCs pueden modular la síntesis de andrógenos de manera diferencial y dependiente de la dosis, pero que en ambos casos dicha inhibición está mediada por el efecto de los GCs sobre la enzima *cyp450c17*. Por un lado, las concentraciones

basales altas de GCs modificarían la actividad de la enzima *cyp450c17* sin disminuir la cantidad de proteína. Por otro lado, los niveles de GCs inducidos durante una situación de estrés inhibirían la síntesis de andrógenos a través de la disminución de la cantidad de proteína de dicha enzima esteroideogénica y probablemente también de la actividad. Los GCs podrían disminuir la actividad de la enzima *cyp450c17* a través de la alteración de las modificaciones postraduccionales necesarias para el funcionamiento del citocromo (ver revisión en Aguiar et al., 2005; Millar, 2005) o disminuyendo la cantidad del citocromo b5 involucrado en la transferencia de electrones que interviene en el proceso de hidroxilación catalizado por el *cyp450c17* (Billen y Squires, 2009; Miller, 2005).

Biswas y col. (2000) también analizaron el efecto de la corticosterona en la función testicular de un anuro, *D. melanostictus*, pero por otra aproximación experimental. Estos autores evaluaron el efecto in vivo de la administración de corticosterona durante 6 días y observaron que dicho tratamiento inhibe la actividad de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, los niveles plasmáticos de testosterona y la espermatogénesis. Debido a que los tratamientos fueron realizados in vivo, estos experimentos no permiten concluir si la corticosterona tiene un efecto directo en el testículo. De hecho los autores postulan que la corticosterona produce un efecto indirecto a través de la disminución de la secreción de LH a nivel hipofisario.

Como ya se ha planteado en la Introducción, el efecto biológico producido por los GCs depende no sólo de la concentración plasmática de dicha hormona sino también de los niveles séricos de su proteína transportadora y de la sensibilidad del tejido a la acción hormonal. Esto último está determinado por la cantidad y afinidad del GR que tienen las células y por la actividad de la enzima inactivante de GCs, la 11β -HSD, ambos mecanismos presentes en el testículo de *R. arenarum*. Además, se debe considerar que el testículo del sapo expresa otra enzima, la 5α -reductasa (Canosa y col., 1998; Tesone y col., 2012), que transforma la corticosterona en 5α -dihidrocorticosterona o DHB (Tesone y col., 2012). La DHB tiene la capacidad de unirse al GR testicular y se comporta como un agonista de dicho receptor dado que disminuye, al igual que lo hacen corticosterona y Dexa, la actividad de la enzima *cyp450c17* (Tesone y col., 2012). En esta tesis se evaluó el efecto de DHB en la

proteína cyp450c17 y se pudo observar que las concentraciones más altas evaluadas, 150 y 1500 nM, disminuyen los niveles de la proteína al igual que inhiben la actividad (Figura II. 2). Estas concentraciones de DHB corresponden a los niveles plasmáticos de corticosterona encontrados durante el período reproductivo y durante una situación de estrés, respectivamente. Es llamativo que DHB inhiba la proteína a una concentración menor (150 nM) que Dexa (1500 nM) y que a diferencia de lo observado con esta última, el efecto sobre la proteína coincide con el obtenido sobre la actividad. Una posible explicación para las diferencias observadas entre Dexa y DHB es que cuando corticosterona ingresa a la célula de Leydig es transformada en DHB y que esto constituya un mecanismo de activación semejante al que ocurre en algunos tejidos con la transformación de testosterona en 5α -dihidrotestosterona (Sitteri y Wilson, 1974). En cambio Dexa, que no es sustrato de la 5α -reductasa, no puede activarse y por ende se requerirían concentraciones más elevadas para obtener el efecto inhibitorio sobre la síntesis de la proteína.

Varios años atrás, se determinó que en *R. arenarum* no sólo los GCs producen un efecto en la esteroidogénesis testicular sino que, como se describió en otros vertebrados, la misma es regulada por el eje hipotálamo-hipofisario (Ball, 1981; Sharpe, 1982). Resultados de nuestro laboratorio demostraron que GnRH y FSH inducen un cambio en el patrón esteroidogénico durante el período reproductivo. Dicho cambio consiste en redireccionan la esteroidogénesis desde la producción de andrógenos hacia la síntesis de derivados reducidos de progesterona, efecto debido a la inhibición de la enzima cyp450c17 (Canosa y Ceballos, 2002b; Canosa y col., 2002; Fernández Solari y col., 2002). Estos resultados más los presentados en esta tesis sugieren que en este anuro la síntesis de andrógenos es un proceso regulado por diversas hormonas. Durante el período reproductivo, los niveles plasmáticos de GCs aumentan (Denari y Ceballos, 2005) y probablemente, como ocurre en otros anuros, también sean mayores los niveles plasmáticos de FSH (Kim y col., 1998; Licht y col., 1983). Todas estas hormonas producirían una disminución en la actividad de la enzima cyp450c17 que se traduciría en la caída de andrógenos plasmáticos observada durante el período reproductivo (Denari y Ceballos, 2005). Respecto del rol de GnRH en la función testicular, poco se conoce sobre la procedencia de la hormona que actuaría en el testículo, aunque su efecto sobre la enzima cyp450c17 así como la

presencia de receptores de GnRH en dicho órgano, sugiere que puede regular también la síntesis de andrógenos. En mamíferos (Bahk y col., 1995; Dong y col., 1996) y en *P. esculentus* (Battisti y col., 1997; Di Mateo y col., 1996) GnRH se sintetizaría también en el testículo aunque este no es el caso de *R. arenarum* (Canosa y col., 2002c). Algunas evidencias indican que la GnRH que actúa sobre el testículo podría originarse en el hipotálamo. En *R. arenarum* se describió hace algunos años que existen fibras positivas para GnRH originadas en el hipotálamo que llegan al lóbulo neural de la hipófisis y los autores de ese trabajo propusieron que GnRH puede secretarse a circulación (Miranda y col., 1998).

Canosa y Ceballos (2002a) postularon, luego del análisis cuantitativo de las enzimas esteroideogénicas, que el *cyp450c17* representa la enzima clave en la regulación estacional de la esteroideogénesis. Los resultados previos del laboratorio y de esta tesis apoyan dicha hipótesis. Cabe resaltar que ninguna de las hormonas evaluadas modificó la actividad de otra enzima esteroideogénica, la 3β -HSD/I.

2. El receptor de glucocorticoides

Los resultados mencionados en el punto anterior sugieren que el testículo de *R. arenarum* expresa al menos un tipo de receptor a través del cual los GCs ejercen sus efectos. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se demostró, a través de ensayos de unión de Dexametasona y de corticosterona, la presencia de un receptor citosólico o GR tanto en células de Leydig como de Sertoli (Denari y Ceballos, 2006). La cinética de unión de ambos agonistas ajustó a un modelo de un sitio único, lo cual sugiere dos posibilidades: 1) que haya un solo tipo de receptor; 2) que haya más de un tipo de receptor pero que no difieren entre ellos en la afinidad por los ligandos utilizados.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis muestran, mediante la técnica de Western blot, que pueden encontrarse dos isoformas de GR citoplasmático de distinto peso molecular, una de 82 Kda y la otra de 55 Kda. Estas isoformas se detectaron empleando un anticuerpo heterólogo realizado contra la porción amino terminal del GR de ratón que contiene a la región regulatoria A/B. Esta región es altamente variable entre los distintos miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Figura I. 1; Stolte y col., 2006; Yao y col., 2008), con lo cual es

improbable que el anticuerpo reconozca a otro miembro de la superfamilia. Al evaluar la similitud del fragmento de 50 aminoácidos del extremo amino terminal del GR de ratón con distintos receptores nucleares secuenciados en *X. laevis* se puede ver que el fragmento de ratón sólo se alinea, aunque parcialmente, con el extremo amino terminal del GR (datos no mostrados). Estas características del anticuerpo utilizado, los resultados de los experimentos de translocación, sumado a que no se revelaron bandas inmunoreactivas cuando el anticuerpo se preincubaba con el péptido bloqueante apoyan la identidad de las bandas detectadas en esta tesis.

El mayor peso molecular obtenido no fue el esperado dado que el del GR de *X. laevis* es de 96 Kda y tampoco se esperaban encontrar dos isoformas. Sin embargo, al profundizar la búsqueda bibliográfica se pudo detectar que en diversos modelos experimentales se ha encontrado más de una banda inmunoreactiva del GR. Por ejemplo, Saoud y Wood (1996) describieron dos bandas inmunoreactivas de 97 y 45 Kda en el hipotálamo e hipófisis de oveja. Particularmente con el anticuerpo GRm-20 utilizado en esta tesis se detectaron varias bandas en una línea celular de hepatocitos humanos (Psarra y col., 2005) y en los conductos deferentes, el epidídimo, la vesícula seminal (Silva y col., 2010) y el pulmón de rata (Swezey y col., 1998). En cambio, Presman y col. (2006) hallaron sólo una banda de 90 Kda en timocitos de ratón. Estos resultados muestran claramente que el número de bandas inmunoreactivas varía entre las distintas especies y/o órganos.

Entonces surge la pregunta ¿cada banda corresponde a una forma diferente del mismo receptor o a dos receptores distintos? A esta altura es conveniente recordar que las dos bandas descriptas mas arriba se encontraron luego de analizar homogenatos celulares completos por Western blot y no sólo la fracción citosólica. Por ello, y debido a que en el cerebro del anfibio urodelo *T. granulosa* se describió un receptor asociado a la membrana plasmática de 63 Kda (Evans y col., 2000), en esta tesis se evaluó si la banda de 55 Kda correspondía a un receptor de membrana. Por otro lado, se analizó si dicha banda era un producto de degradación de una proteína de mayor peso molecular. Los resultados obtenidos nos permitieron descartar las dos posibilidades mencionadas, con lo cual ambas bandas serían isoformas del GR. Además, a través del estudio de las bandas del GR en el homogenato de células aisladas de testículo libre de espermatozoides se descartó que

alguna de las bandas observadas correspondiera a una forma que se expresa en los espermatozoides, como ocurre en los mamíferos (Kaufmann y col., 1992).

Como se mencionó en la Introducción, en los mamíferos se han descrito diversas isoformas del GR que se generan por el inicio alternativo de la traducción del ARNm o por splicing alternativo (Yudt y Cidlowski, 2002). Asimismo, en algunas especies de peces se encontraron dos genes que codifican GRs muy similares que, a través del splicing alternativo, generan transcritos funcionales con distintas propiedades de transactivación (Stolte y col., 2006). Al igual que fuera descrito en los mamíferos, las variantes producidas por splicing alternativo se expresan en distintos tejidos y además, difieren en su afinidad por el cortisol, el GC predominante en los peces (Stolte y col., 2006). Dado que el anticuerpo GRm-20 reconoce el extremo amino terminal del receptor, es altamente probable que en *R. arenarum* ninguna de las dos isoformas sea un producto del inicio alternativo de la traducción del ARNm y que, en cambio, sean productos del splicing alternativo. En este sentido, en larvas de *X. laevis* se observó que a partir del gen del GR se expresan al menos dos ARNm, lo cual sugiere la presencia de varias isoformas generadas por splicing alternativo (Gao y col., 1994; Krain y Denver, 2004).

Desafortunadamente no se ha podido secuenciar el/los ARNm del GR de *R. arenarum*, lo cual hubiera esclarecido estos interrogantes.

Los ensayos de translocación realizados para validar el anticuerpo mostraron que tanto la banda de 82 como de 55 Kda translocan al núcleo cuando los testículos son incubados con Dexametasona, lo cual apoya la especificidad del anticuerpo utilizado y por ende la identidad de las bandas observadas. Sin embargo, sólo la translocación de la banda de 82 Kda es estadísticamente significativa. Ahora bien, esta diferencia estadística entre ambas bandas puede estar evidenciando una diferencia en el mecanismo de translocación al núcleo o en la localización subcelular en ausencia de hormona.

Lo discutido hasta aquí muestra claramente que el análisis de la proteína GR generó diversos interrogantes que no han sido aclarados en esta tesis y, además, determinaron que la evaluación de la proteína receptora se realizara analizando ambas bandas por separado.

3. Variaciones estacionales del receptor de glucocorticoides

Como fuera mencionado anteriormente, para obtener un panorama integrado de la plasticidad de la respuesta testicular a la acción de los GCs se deben analizar las variaciones estacionales en los niveles plasmáticos de GCs, corticosterona en este caso, en el contexto de las variaciones del GR y de la enzima 11 β -HSD, entre otros. En este sentido, la sensibilidad del testículo a la acción de los GCs depende en gran medida de la cantidad de receptores y de la afinidad de los mismos por el ligando. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que en *R. arenarum* la afinidad del GR por DEXA permanece constante durante el año y que, en cambio, el número de sitios de unión (Bmax) varía entre los distintos períodos reproductivos (Denari y Ceballos, 2006). En la Tabla II. 2 se resumen los datos obtenidos en ese trabajo:

Tabla II. 2. Parámetros estacionales del GR y corticosterona plasmática

Período	Kd (nM)	Bmax (fmoles/mg proteína)	Corticosterona (nM)
PostR	13,68 \pm 3,01 ^a	339,18 \pm 58,05 ^a	95,70 \pm 10,16 ^a
PreR	7,83 \pm 0,91 ^a	197,63 \pm 23,91 ^b	61,60 \pm 10,34 ^a
R	12,49 \pm 3,78 ^a	244,30 \pm 24,15 ^{ab}	144,59 \pm 17,67 ^b

Letras diferentes implican diferencias significativas entre los períodos con $p < 0,05$.

PostR: postreproductivo, PreR: prerreproductivo, R: reproductivo.

Adaptado de Denari y Ceballos, 2006.

Dado que la determinación de receptores por el ensayo de unión al ligando sólo mide receptores libres, estos valores no representan la cantidad total de GR en el testículo por que dependen tanto de los niveles plasmáticos de corticosterona como de la actividad de la enzima inactivante de GCs 11 β -HSD. De hecho, es muy probable que durante el período reproductivo el número de receptores totales esté más subestimado que en los otros períodos debido a que los animales tienen una concentración plasmática elevada de corticosterona, tanto total como libre, que aumentaría el número de receptores ocupados en el tejido. Además, el aumento de la actividad de la enzima 11 β -HSD durante el período postreproductivo (Denari y Ceballos, 2005) podría inactivar los GCs circulantes produciendo un aumento de los receptores libres y de esta manera causar la sobrestimación del número de receptores totales.

Además de los factores mencionados anteriormente, que afectan la medición del número de receptores libres, las variaciones estacionales en el Bmax se pueden deber a cambios en distintos componentes que integran el complejo receptor y que modifican la función del mismo (Oakley y Cidlowski, 2011). Primero, se debe considerar la cantidad de proteína receptora dado que si disminuye dicha proteína también disminuye la cantidad de complejo receptor. Por otro lado, se deben considerar las proteínas chaperonas e inmunofilinas que constituyen el complejo y que afectan su función (Oakley y Cidlowski, 2011). En esta tesis se abordó el estudio de las variaciones anuales de la cantidad de proteína receptora utilizando la técnica de Western blot y se analizó el patrón estacional de cada una de las bandas obtenidas (Figura II. 8). Se pudo ver que en la mayoría de los casos la banda mayoritaria en el testículo es la de 55 Kda y que el patrón estacional de la misma coincidió con el patrón del Bmax descrito previamente. Por otro lado, el patrón de la banda de 82 Kda mostró que ésta es mayor durante el período postreproductivo y disminuye en los otros dos períodos. Estos resultados sugieren que la cantidad de proteína receptora varía estacionalmente lo cual influiría en los cambios anuales de la cantidad de receptor biológicamente activo. Dado que el patrón de la banda de 55 Kda coincide con el del Bmax, esta proteína podría ser la involucrada en formar el complejo receptor medido por el ensayo de unión al ligando. Sin embargo, no se descarta que la isoforma de 82 Kda también pueda formar complejos receptores y cumplir un rol fisiológico como receptor de glucocorticoides. Desafortunadamente, se desconoce el rol de ambas isoformas.

Los resultados hallados en la medición de la proteína GR fueron llamativos en el sentido que se esperaban diferencias entre el patrón anual del Bmax y de la proteína. Denari y Ceballos (2006) midieron la variación anual del Bmax y encontraron que durante el período postreproductivo el Bmax es significativamente mayor que en el del período prerreproductivo en tanto que el valor medido durante el período reproductivo no es significativamente diferente de los otros dos períodos. En esta tesis se observaron las mismas diferencias estadísticas en el patrón de la banda de 55 Kda lo cual implica que, a diferencia de lo esperado, la proteína GR no es significativamente mayor durante el período reproductivo. Durante este período, la cantidad de proteína de la isoforma de 82 Kda fue aún menor que la de 55 Kda. Especulando con que la isoforma de 55 Kda fuera la involucrada en la medición del

B_{max}, las variaciones estacionales de dicha proteína sugieren que la cantidad de proteína receptora es un componente de mucho peso en la determinación del número de sitios de unión en el testículo.

A partir de todos estos resultados, que incluyen los de esta tesis, se puede resumir lo siguiente:

A) Durante el período prerreproductivo se encuentran los menores niveles de corticosterona plasmática y de proteína receptora de GC, el menor B_{max} y una actividad baja de la enzima 11 β -HSD (Denari y Ceballos, 2005). Por lo tanto durante este período el testículo se vería poco afectado por los GCs lo cual coincide con que se observen los mayores niveles plasmáticos de andrógenos.

B) Durante el período reproductivo el testículo sería más sensible a los efectos de los GCs dado que se observan los mayores niveles plasmáticos de corticosterona, el B_{max} y la proteína receptora son altos y la actividad de la 11 β -HSD es la más baja de todos los períodos (Denari y Ceballos, 2005). Todas estas características coinciden con que durante esta etapa se han observado los niveles de andrógenos plasmáticos más bajos, lo cual ocurriría, en parte, por la acción de los GCs en el testículo.

C) Durante el período postreproductivo en cambio, y a pesar del aumento en la proteína receptora y el B_{max}, el testículo estaría protegido de los efectos de los GCs por la actividad aumentada de la enzima 11 β -HSD, que es un orden de magnitud mayor que en los otros períodos (Denari y Ceballos, 2005).

Un factor que no se ha tenido en cuenta en el estudio de la sensibilidad del testículo a las variaciones estacionales de corticosterona es la proteína transportadora de glucocorticoides. Este parámetro no ha sido determinado en *R. arenarum* pero el hecho de que la concentración plasmática total de corticosterona tenga un patrón anual similar a la corticosterona libre (Denari y Ceballos, 2005) sugiere que la proteína transportadora de corticosteroides varía estacionalmente de manera similar a como varía la corticosterona total.

Hasta el momento no se han realizado estudios estacionales del GR en el testículo de otros anfibios pero sí se han evaluado variaciones estacionales del B_{max} en el hígado de *X. laevis* (Lange y Hanke, 1988; Lange y col., 1989). En estos

trabajos se observó que en los machos el Bmax varía a lo largo del año, aumentando durante el verano y parte del otoño. Además, el patrón estacional del GR no coincide con el de la concentración de corticosterona plasmática. En otro grupo de vertebrados, las aves, se realizaron estudios estacionales tomando como modelo el cerebro del gorrión. Dichos trabajos demostraron que el Bmax aumenta durante la época de anidación y disminuye durante el invierno (Breuner y Orchinik, 2001). En este pájaro, la concentración plasmática de corticosterona total aumenta durante la época de anidación y el patrón de la proteína transportadora de corticosteroides es el mismo que el de la corticosterona total, lo cual sugiere que la corticosterona libre no varía a lo largo del año.

Estos trabajos junto con los realizados en el testículo de *R. arenarum* apoyan la hipótesis que plantea que la plasticidad de un órgano a la acción de los GCs depende de diversos factores y que la interacción y regulación de dichos factores proporcionan una base para las diferencias estacionales en las respuestas fisiológicas inducidas por los GCs.

4. Regulación hormonal del receptor de glucocorticoides

Hasta aquí ha quedado claro que la sensibilidad del testículo a la acción de los GCs varía estacionalmente debido, en gran medida, a los cambios en la cantidad de GR. Como se mencionara en la Introducción, la modulación de los niveles del GR por diversas hormonas ha sido estudiada en diversos modelos y en distintos órganos (Kalinyak y col., 1987; Krain y Denver, 2004; Schmidt y Meyer, 1994; Silva y col., 2011; Swezey y col., 1998; Yao y col., 2008, entre otros). Estos trabajos permiten concluir que la regulación de este receptor es un proceso complejo y específico de cada tejido. En esta tesis se trató de esclarecer qué factores hormonales están involucrados en la regulación de la cantidad de GR en el testículo a lo largo del año y, además, si dichas hormonas afectan de la misma manera a la proteína receptora y al complejo receptor que constituye el número de sitios de unión.

Como se resume en la Tabla II. 3, en *R. arenarum* los andrógenos plasmáticos tienen un patrón opuesto al del Bmax:

Tabla II. 3. Parámetros estacionales del GR y testosterona plasmática

Período	Bmax del GR (fmoles/mg proteína)	Testosterona (nM)
PostR	339,18±58,05 ^a	~75 ^a
PreR	197,63±23,91 ^b	~150 ^b
R	244,30±24,15 ^{ab}	~15 ^c

Letras diferentes implican diferencias significativas entre los períodos con $p < 0,05$.
 PostR: postreproductivo, PreR: prerreproductivo, R: reproductivo.
 Adaptado de Denari y Ceballos, 2005 y 2006.

Estos datos sumados a los mostrados en la Tabla II. 2 nos llevaron a plantear las hipótesis de que en el testículo los andrógenos regulan negativamente los niveles del GR y los GCs regulan positivamente su propio receptor. Los estudios in vitro llevados a cabo para poner a prueba las hipótesis mostraron que los andrógenos no parecen ser los responsables de los cambios en los niveles testiculares del GR. Ni la adición de andrógenos exógenos, testosterona y su derivado 5α -reducido, ni la inhibición de la acción de los andrógenos endógenos mediante el uso de antagonistas ni la inhibición de la esteroidogénesis modificaron el Bmax o la proteína del GR (Figura II. 9-12). En cambio, los GCs parecen regular positivamente la proteína de su propio receptor a través de un mecanismo mediado por el mismo GR dado que dicho efecto es bloqueado por el antagonista RU486. Por lo tanto, se podría pensar que los niveles elevados de GCs plasmáticos del período reproductivo son los responsables, junto con otros factores, del aumento de la proteína GR observado durante este período.

Diversos trabajos han demostrado que en distintas células de mamíferos los GCs regulan tanto positiva como negativamente su propio receptor (ver revisión en Schmidt y Meyer, 1994). En los anfibios, particularmente en *X. laevis*, el grupo del Dr. Denver demostró que la autorregulación del ARNm del GR es diferente en distintos tejidos de la larva (Krain y Denver, 2004) y que en el adulto las variaciones en los niveles de GCs regulan la expresión del GR en el cerebro (Yao y col., 2008). Mientras que los GCs regulan positivamente su receptor en el intestino del renacuajo no parecen tener efecto ni en la cola ni en el cerebro. En el adulto, por otra parte, niveles plasmáticos de corticosterona que corresponden a una situación de estrés regulan negativamente los niveles del GR. Sin embargo, cuando se inhibe la síntesis de corticosterona con metopirona los niveles del GR disminuyen, lo cual sugiere que

los niveles basales de GCs son fundamentales para mantener la expresión de su receptor. Debe considerarse que dichos estudios se realizaron *in vivo*, tratando tanto a las larvas como a los adultos con distintas concentraciones de corticosterona o metopirona en el agua del acuario. Este tipo de tratamiento pone en duda si el efecto observado sobre el GR es directo o mediado por algún otro factor endógeno regulado por los GCs.

Los resultados de esta tesis muestran que en el testículo de *R. arenarum* los GCs regularían su receptor al igual que ocurre en otras especies y órganos. Sería importante analizar si concentraciones altas de corticosterona, correspondientes a una situación de estrés, logran inhibir la expresión del GR al igual que ocurre en el cerebro de *X. laevis*.

Como se mencionó en la Introducción, la melatonina es una hormona que varía estacionalmente en todos los vertebrados estudiados (Binkley, 1993; Gern y col., 1986; Reiter, 1993) y se ha demostrado que antagoniza el efecto de los GCs en distintos modelos bloqueando diversos pasos de la activación del GR (Blackhurst y col., 2001; Brotto y col., 2001; Kiefer y col., 2005; Persengiev, 1999; Presman y col., 2006; Presman y col., 2012; Quiros y col., 2008; Sainz y col., 1999). Estos antecedentes nos llevaron a evaluar si la melatonina está involucrada en la regulación de los niveles testiculares del GR.

En el momento en que se realizaron los ensayos *in vitro* con melatonina aún no se conocían los niveles plasmáticos de esta hormona en *R. arenarum*, sin embargo, se supuso que en esta especie la melatonina variaba tanto circadiana como circanualmente, al igual que en otros vertebrados. Como una aproximación para estudiar el rol de la melatonina en el GR, se evaluó el efecto de dos concentraciones fisiológicas descritas en otros anfibios, una baja, de 40 pg/ml y una muy alta, de 200 pg/ml (Delgado y Vivien-Roels, 1989). Antes de continuar con el análisis de los resultados obtenidos en los experimentos relacionados con el rol de dicha hormona en la regulación estacional del GR, se discutirán las variaciones estacionales en los niveles de melatonina plasmática halladas en *R. arenarum* en comparación con lo observado en otras especies de anuros.

Hasta donde nosotros sabemos sólo en cuatro especies de anuros se midieron los niveles plasmáticos de melatonina en los adultos, aunque estos estudios no abarcaron las variaciones anuales. En uno de ellos, realizado en *P. perezi*, se midieron las variaciones diarias de melatonina plasmática en verano y en invierno y se observó que durante el verano los niveles plasmáticos de melatonina se encuentran entre los 25 pg/ml en la fase de luz y los 140 pg/ml en la fase de oscuridad (Delgado y Vivien-Roels, 1989). En el invierno, el ritmo diario de melatonina desaparece y la concentración en plasma es constantemente baja (20 pg/ml). En ese trabajo, se observó que la temperatura cumple un rol fundamental en la amplitud del aumento diario de melatonina, encontrándose que bajas temperaturas disminuyen dicho aumento. En *P. esculentus* se midieron las variaciones diarias de melatonina durante el otoño, el invierno y el verano (d'Istria y col., 1994; Serino y col., 1993). Los autores observaron que durante el otoño y el invierno la melatonina varía entre los 40 y 90 pg/ml y que, llamativamente, durante el verano el ritmo diario de melatonina desaparece y la concentración plasmática es de 45 pg/ml. En *Pseudepidalea viridis* sólo se midió la melatonina en plasma durante el invierno y se observó que los niveles no fluctúan a lo largo del día, manteniéndose constantes en aproximadamente 75 pg/ml (Serino y col., 1993). En *L. catesbeianus* se midió una concentración plasmática de 150 pg/ml durante la fase oscura en condiciones de temperatura constante, 17 °C, y un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad (Chowdhury y col., 2008). Como puede inferirse de lo expuesto, existen resultados opuestos aún dentro del mismo género. Por ejemplo en *P. esculentus* el ritmo circadiano desaparece durante el verano en tanto que en *P. perezi* desaparece durante el invierno.

En esta tesis se estudiaron las variaciones anuales de la concentración plasmática de melatonina durante la fase lumínica (Figura II. 21). Los resultados indican que entre las 11 y las 12 h a lo largo del año, los niveles plasmáticos de esta hormona fluctúan entre los 5 y 34 pg/ml. Las mayores concentraciones, que promedian los 20 pg/ml, se observaron durante el período prerreproductivo (mayo a agosto), cuando el fotoperíodo es corto y las temperaturas son bajas. Las menores concentraciones se observaron durante el período reproductivo (septiembre-diciembre) y el postreproductivo (enero-abril), cuando el fotoperíodo es más largo y las temperaturas son mayores. Lamentablemente, debido a impedimentos técnicos,

sólo se midieron las concentraciones nocturnas de melatonina en el período reproductivo y se observó que las mismas son el doble que las observadas durante la fase lumínica, 10 pg/ml durante la fase lumínica y 20 pg/ml durante la fase oscura. Estos datos muestran que en *R. arenarum* la concentración de melatonina plasmática varía a lo largo del año y que, al menos durante la primavera, los niveles de melatonina aumentan durante la noche. Se desconoce si el ritmo diario de melatonina desaparece durante el invierno o el verano como ocurre en otras especies de anfibios (Delgado y Vivien-Roels, 1989; d'Istria y col., 1994; Serino y col., 1993), pero se puede asegurar que durante el invierno las concentraciones diurnas de melatonina son mayores con respecto al resto de las estaciones.

Nuestros datos sugieren que en *R. arenarum* los niveles de melatonina plasmática son menores a los encontrados en otras especies de anfibios; sin embargo, se debe tener en cuenta que son datos preliminares ya que aún se desconoce el patrón circadiano completo a lo largo del año. Además, de que las diferencias entre los valores encontrados en distintas especies pueden deberse a los métodos de medición, radioinmunoensayo o ELISA, también pueden ser debidas a diferencias interespecíficas relacionadas con el ambiente que habita cada una de ellas. Por ejemplo, en otro grupo de vertebrados como los peces se ha observado que los animales de agua dulce que habitan regiones tropicales, como la tilapia de El Nilo o los bagres, tienen concentraciones plasmáticas de melatonina menores que aquellos que viven en agua dulce de zonas más frías o en el mar (Bayarri y col., 2003; García-Allegue y col., 2001; Guerrero y col., 2008; Martínez-Chávez y col., 2008; Strand y col., 2008; Vera y col., 2005, 2007).

Retomando la discusión del rol de la melatonina en la regulación del GR, los experimentos *in vitro* mostraron que la incubación durante 24 h con esta hormona produce un efecto bifásico en el Bmax del GR testicular (Figura II. 14). Sólo la menor concentración evaluada, 40 pg/ml, produjo una disminución del Bmax pero sin modificar los niveles de la proteína GR (Figura II. 16). Esta diferencia entre el Bmax y la proteína sugiere que la incubación con melatonina produce una modificación en el complejo receptor que inhibe la unión del ligando y que dicha modificación no involucra cambios en la síntesis y/o degradación de la proteína GR. Por lo tanto, la melatonina podría disminuir el Bmax por alguno de los siguientes

mecanismos: 1) interfiriendo directamente en la unión del complejo receptor con el GC, 2) modificando la interacción con otros componentes del complejo receptor, como las hsp 70 o 90, que ayudan a que el dominio de unión al ligando se pliegue correctamente y se mantenga en una conformación de alta afinidad (Pratt y Toft, 1997) o 3) inhibiendo las modificaciones postraduccionales del GR que son necesarias para la unión al ligando.

Los ensayos de unión al ligando realizados con homogenatos de testículos recién disecados, en ausencia o presencia de distintas concentraciones de melatonina mostraron que esta hormona no interfiere directamente con la unión de Dexa al complejo receptor (Figura II. 19). Presman y col. (2006) realizaron ensayos similares para dilucidar el mecanismo a través del cual la melatonina antagoniza el efecto de los GCs en los timocitos de ratón y observaron que en estas células la melatonina tampoco interfiere en la unión de Dexa al complejo receptor, pero que impide la translocación del GR al núcleo a través de la inhibición de la disociación de la hsp 90.

Con respecto a la segunda posibilidad planteada, trabajando en hígado de rata, Elaković y col. (2009) observaron que ciertos antidepresivos disminuyen el Bmax inhibiendo la interacción de la proteína receptora con las hsp 70 y 90, es decir modificando la estequiometría del complejo. Aún no se ha elucidado si en *R. arenarum* las hsp están involucradas en el efecto inhibitorio de la melatonina sobre el Bmax del GR. En cambio, las incubaciones con melatonina por un tiempo más corto, 3 h, permiten sugerir que la disminución del Bmax no se debe a modificaciones postraduccionales como las fosforilaciones que afectan la función del GR y que se producen en tiempos cortos (Ismaili y Garabedian, 2004). Además, se pudo observar que la concentración de melatonina que disminuye el Bmax no modifica la constante de afinidad del receptor.

El hecho de que el luzindole, un antagonista inespecífico de receptores de membrana de melatonina (Dubocovich, 1988) haya logrado revertir el efecto inhibitorio producido por la menor concentración de melatonina sugiere que este mecanismo es mediado por receptor y que en el testículo de *R. arenarum* habría al menos un tipo de receptor de melatonina (Figura II. 15). El efecto bifásico observado con las concentraciones de melatonina evaluadas en esta tesis podría deberse al

efecto antagónico de dos receptores diferentes, como ha sido descrito en células linfoides de pollo (Markowska y col., 2004). En estas células, la melatonina se puede unir a dos tipos de receptores de membrana, Mel 1a (MT1) o Mel 1c, que actúan a través de segundos mensajeros diferentes y producen efectos opuestos sobre la proliferación celular.

Recientemente, se caracterizó y secuenció un receptor de melatonina en el testículo del anuro *P. esculentus* y se observó que es del tipo mel 1b (Serino y col., 2011). Los autores sugieren que este receptor sería el mediador de los efectos de la melatonina previamente demostrados por su grupo de investigación (d'Istria y col., 2003; Izzo y col., 2004). En estos trabajos observaron que la melatonina interfiere con el efecto positivo del estradiol sobre las células germinales y sobre la acumulación de mastocitos en el testículo de dicha especie. Estos resultados sugieren que la melatonina antagonizaría el efecto del estradiol en el testículo de *P. esculentus* al igual que ocurre con la melatonina y el efecto de los GCs en *R. arenarum*. Estos resultados a nivel fisiológico, concuerdan con los observados por Kiefer y col. (2005) en una línea celular de cáncer de mama que postulan que la melatonina antagoniza el efecto de los GCs y del estradiol disminuyendo la actividad transcripcional de ambos factores de transcripción.

Entonces, ¿cómo se relacionan los resultados obtenidos con la regulación del GR en el testículo? Los datos mostraron que, al igual que en muchos otros modelos, la melatonina antagonizaría el efecto de los GC disminuyendo el número de sitios de unión. Dado que se desconoce si la concentración de 200 pg/ml puede ser alcanzada durante las noches de invierno tampoco se puede saber si naturalmente esta hormona produce un efecto bifásico. La concentración de 40 pg/ml, que es un valor alto en esta especie, es cercana a los valores medidos durante el período prerreproductivo, con lo cual la melatonina regularía negativamente al GR durante este período. No se ha evaluado aún si menores concentraciones de melatonina modifican el número de sitios de unión y si lo hacen de manera dependiente de la dosis. De todas maneras se debe tener en cuenta que los estudios *in vitro* son aproximaciones experimentales en las cuales se generan situaciones artificiales para esclarecer, en el caso de esta tesis, preguntas fisiológicas. Es evidente que la llegada de las hormonas a un tejido a través de la circulación sanguínea es muy diferente de la llegada por difusión que se crea al

incubar un órgano o un fragmento del mismo en un medio de incubación. Hay que destacar, por otro lado, que los ensayos in vitro tienen la ventaja frente a los estudios in vivo de disminuir las variables involucradas al evaluar el efecto de una sustancia.

La suma de los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis nos permite sugerir que las variaciones estacionales de los niveles del GR en el testículo son debidas a los propios GCs y a la melatonina, aunque no se descarta que también estén involucradas otras hormonas. Los GCs regularían de manera positiva los niveles proteicos de su propio receptor durante el período reproductivo, aumentando la sensibilidad del testículo al efecto de los GCs que en este período se encuentran elevados. Por otro lado, durante el período prerreproductivo los niveles plasmáticos altos de melatonina y los bajos de GCs disminuirían tanto la proteína GR, como los sitios de unión. En este período, el testículo sería menos sensible al efecto de los GCs y coincide con el período de mayor producción de andrógenos. Finalmente en el período postreproductivo, cuando la producción de andrógenos y corticosterona es intermedia entre los otros dos períodos, la cantidad de GR es mayor pero la actividad alta de la enzima 11β -HSD observada durante esta época “protegería” al testículo del efecto de los GCs.

Los resultados de las variaciones estacionales de la proteína GR mostraron que la isoforma de 55 Kda es la que tiene un patrón anual similar al de los sitios de unión y que es la isoforma que aumenta durante el período reproductivo, lo cual sugiere que o bien es la principal mediadora de los efectos de los GC o que podría regular positivamente la función biológica de la isoforma de 82 Kda.

Además, en este trabajo se descarta la participación de los andrógenos en la regulación del GR dado que no afectan ni al B_{max} ni a la proteína receptora, por lo menos en las condiciones experimentales utilizadas en la tesis.

5. Rol de la melatonina en la regulación de la síntesis de andrógenos

Finalmente, más allá de que la melatonina antagoniza el efecto de los GCs en el testículo disminuyendo los sitios de unión del GR y por lo tanto disminuyendo el efecto negativo de los GCs en la producción de andrógenos, se estudió si la misma regula directamente la síntesis de andrógenos. Los datos de las incubaciones in vitro

mostraron que la melatonina no modifica la producción basal de andrógenos. Este resultado concuerda con datos de experimentos *in vitro* realizados en tres especies de anuros, *P. perezi*, *D. pictus* y *P. esculentus*, en los cuales se observa que la melatonina no modifica localmente la síntesis de testosterona en el testículo, aunque sí podría regularla de manera indirecta a través de la regulación del eje hipotálamo-hipofisario (Gancedo y col., 1991; Pierantoni y col., 1986). En estos trabajos se incubaron fragmentos de testículos con concentraciones de melatonina similares a las utilizadas en esta tesis además de concentraciones hasta 1000 veces mayores y se vio que ninguna de las concentraciones de melatonina modificaba ni la síntesis basal de testosterona ni la inducida por hCG.

En el testículo de algunos mamíferos roedores se pudo demostrar que la melatonina inhibe la síntesis de andrógenos a nivel gonadal (Frungeri y col., 2005; Niedziela y col., 1995; Valenti y col., 1995, entre otros). En estos trabajos se observó que cuando se tratan células de Leydig aisladas con melatonina en forma aguda (3h) disminuye la síntesis de andrógenos basal y la inducida por hCG por un mecanismo mediado por el receptor de melatonina. En cambio, el tratamiento crónico con melatonina (16 h) produce una disminución de la sensibilidad de dicho órgano a la acción de la melatonina (Valenti y col., 2001) y un aumento de la sensibilidad a la acción de LH en la síntesis de andrógenos. (Valenti y col., 1995).

Igualmente, en el pájaro estornino pinto, la incubación *in vitro* de fragmentos de testículos durante 4 h con melatonina disminuye la síntesis de andrógenos inducida por LH (McGuire y col., 2011).

A partir de lo mencionado se podría pensar que las diferencias respecto de lo observado en *R. arenarum* pueden deberse a que en esta tesis se estudió solamente el efecto de la incubación crónica con melatonina durante 24 h. Sin embargo, dado que se midió la cantidad de andrógenos acumulados durante las 24 h de tratamiento, si la melatonina hubiera inhibido la síntesis de andrógenos durante las primeras horas se debería haber detectado una disminución en la cantidad de andrógenos acumulados a lo largo de todo el tratamiento. Por otro lado, la melatonina podría actuar de manera diferente en los distintos grupos de vertebrados. Apoyando esta suposición, se debe considerar que en el anuro *P. esculentus* se evaluó el efecto del tratamiento agudo con melatonina y que tampoco se observó una disminución de la síntesis de

andrógenos (Pierantoni y col., 1986). Resta aún evaluar el efecto de la melatonina en la síntesis de andrógenos inducida por hCG.

En este capítulo se estudiaron distintos factores involucrados en la regulación de la esteroidogénesis testicular. En la segunda parte de esta tesis se analizará el rol de los andrógenos en la función de la glándula interrenal y la organización de los tipos celulares en dicha glándula.

CAPÍTULO III

ESTUDIOS EN LA GLÁNDULA INTERRENAL

III | Materiales y Métodos

1. Animales

Para el siguiente estudio también se utilizaron sapos machos adultos de la especie *R. arenarum* mantenidos en las mismas condiciones descritas en los Materiales y Métodos del capítulo II.

2. Obtención del material biológico

Los animales fueron anestesiados como fuera descrito en los Materiales y Métodos del capítulo II. Ambas glándulas interrenales fueron rápidamente extraídas junto con los riñones por disección ventral y se colocaron en una placa de Petri con 10 ml de solución fisiológica para retirar los restos de sangre. Luego, según el ensayo a realizar se procedió de la siguiente manera:

- 1) Para los experimentos de incubaciones in vitro, se separó íntegramente la glándula interrenal del riñón bajo lupa, cuidando de no dejar fragmentos de riñón asociados a la misma.
- 2) Para el análisis histológico con coloraciones topográficas e histoquímicas y para las técnicas inmunohistoquímicas las glándulas se fijaron sin separar de los riñones, para no perder la estructura, en líquido de Bouin durante 24 h.
- 3) Para la coloración de Sudan III se fijaron las glándulas sin separar de los riñones en formol 4% en buffer fosfato salino (PBS).
- 4) Para la técnica de microscopía electrónica y los cortes semifinos las glándulas sin separar de los riñones se fijaron en glutaraldehído 3% en PBS durante 24 h.

3. Medios de incubación, buffers, soluciones colorantes y fijadores

Medio DMEM, buffer de homogeneización, buffer de siembra, buffer de revelado: fueron definidos en II. Materiales y Métodos.

Medio Krebs Ringer Glucosa Hepes (KRGH): 0,9% NaCl, 1,15% KCl, 1,22% Cl_2Ca , 2,11% H_2KPO_4 , 3,8% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 M Glucosa, 0,026 M Hepes, pH 7,4.

Buffer para radioinmunoensayo (RIA) de corticosterona: 100 mM borato de sodio, 1% gelatina, 0,1% azida sódica, pH 7,4.

Líquido de Bouin: 70% p/v ácido pícrico saturado en agua destilada, 25% v/v formaldehído, 5% v/v ácido acético.

Hematoxilina de Carazzi: 0,1% p/v hematoxilina, 5% p/v sulfato doble de aluminio y potasio, 0,02% p/v iodato de potasio, 20% v/v glicerina, agua destilada.

Eosina alcohólica: 0,25% p/v eosina (soluble en alcohol), alcohol 70%.

Fucsina ponceau de xilidina: 0,075% p/v ponceau de xilidina, 0,075% p/v orange G, 0,0325% p/v fucsina ácida, agua acética 0,2% v/v.

Ácido fosfomolibdico: 1% p/v en agua destilada.

Azul de anilina acética: azul de anilina a saturación en agua acética al 2,5% v/v.

Sudan III: Sudan III a saturación en alcohol 70%.

Reactivo de Schiff (según Bancroft): 0,5% p/v fucsina básica, 1% v/v ácido clorhídrico puro, 1% p/v metabisulfito de sodio, 1% p/v carbón activado, agua destilada.

Ácido periódico: 0,5% p/v en agua destilada.

Azul de alcian a pH 3,5: 0,1% p/v azul alcian, 0,5% v/v ácido acético, agua destilada.

4. Incubaciones in vitro. Diseño experimental

4.1. Estudio del rol de los andrógenos en la regulación de la síntesis de corticosterona

Se evaluó el efecto del tratamiento con testosterona sobre la síntesis de corticosterona in vitro a través de dos aproximaciones experimentales diferentes. En la Figura III. 1 se esquematizan los protocolos utilizados.

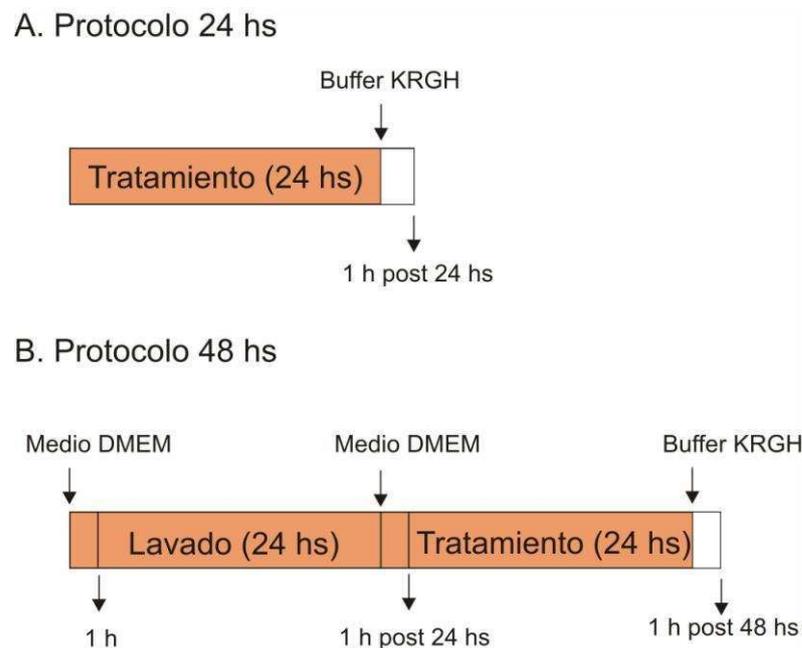


Figura III. 1. Protocolos experimentales utilizados para evaluar el efecto de los andrógenos en la liberación de corticosterona. El panel **A** muestra el protocolo que involucra un tiempo total de incubación de 24 h. El panel **B** muestra el protocolo que involucra un tiempo total de incubación de 48 h (24 h de lavado más 24 h de tratamiento).

Por un lado, se incubaron fragmentos de interrenales con concentraciones de testosterona correspondientes a las concentraciones plasmáticas medidas por Denari y Ceballos (2005) en *R. arenarum* durante los períodos reproductivo (10 nM) y prerreproductivo (100 nM), durante 24 h para luego evaluar la síntesis de corticosterona relativa al peso de interrenal incubada (protocolo 24 h). Por otro lado, se preincubaron fragmentos de interrenales con medio solo (24 h), luego se incubaron con testosterona (10 nM o 100 nM) durante 24 h y se evaluó la síntesis de

corticosterona postratamiento con testosterona, comparada con la síntesis inicial. A continuación se detalla cada experimento.

4.1.1. Incubación por 24 h

Se obtuvieron ambas glándulas interrenales de animales durante la época reproductiva y la no reproductiva. Las interrenales de cada animal fueron cortadas transversalmente en pequeños fragmentos que se dividieron en tres grupos al azar y que fueron aleatoriamente asignados a alguno de los siguientes tratamientos:

- control (medio DMEM solo)
- testosterona 10 nM
- testosterona 100 nM

Los fragmentos fueron incubados durante 24 h a 28 °C después de lo cual se descartaron los medios. Los fragmentos se lavaron con medio KRGH durante 30 min a 28 °C y luego se incubaron durante 1 h en 1 ml del mismo medio a 28 °C para evaluar la liberación de corticosterona al medio de incubación. Los medios se congelaron a -20 °C hasta su utilización para el radioinmunoensayo de corticosterona y los fragmentos incubados fueron pesados con una balanza analítica ($\pm 0,2$ mg).

Los datos se expresaron como ng de corticosterona/ml de medio por mg de interrenal incubada.

4.1.2. Incubación por 48 h

Debido a que en el experimento descrito en el punto 4.1.1 se observaron grandes variaciones en la síntesis de corticosterona entre las distintas réplicas, que podrían enmascarar el efecto de la testosterona en la síntesis de corticosterona, se decidió realizar un protocolo que incluyera un prelavado de los fragmentos con medio solo. Esta aproximación experimental permitiría con el prelavado disminuir las variaciones entre las interrenales debidas a diferencias en el estado fisiológico de los animales de los cuales se las extrajo. Para ello, se obtuvieron ambas glándulas interrenales de animales colectados durante el período no reproductivo. Las interrenales de cada animal fueron cortadas transversalmente en pequeños fragmentos que se dividieron en tres grupos al azar y se asignaron aleatoriamente a

pocillos de una placa multipocillos que contenían 2 ml de medio DMEM. Se incubaron durante 1 h a 28 °C, se recuperó el medio (medio 1h), se agregó medio DMEM fresco y se los incubó durante 24 h más. Finalizado dicho período, se descartó el medio y se los incubó 1 h adicional en medio nuevo que fue recuperado para la posterior determinación de corticosterona (medio 1 h post 24 h). Luego de 25 h de incubación con medio DMEM solo, se asignó aleatoriamente a cada pocillo alguno de los siguientes tratamientos:

- control (medio DMEM solo)
- testosterona 10 nM
- testosterona 100 nM.

Los fragmentos de interrenal se incubaron durante 24 h a 28 °C, luego se lavaron durante 30 min con medio KRGH y se incubaron durante 1 h más con 1 ml del mismo medio a 28 °C. Pasado el tiempo, se recuperó este último medio de incubación (medio 1 h post 48 h).

Los medios de 1h, 1h post 24 h y 1h post 48 h se congelaron a -20 °C hasta medir la concentración de corticosterona por radioinmunoensayo y se pesaron los fragmentos incubados con una balanza analítica ($\pm 0,2$ mg).

Los datos se expresaron de dos maneras:

1) como ng de corticosterona/ml de medio, para comparar los valores de ng de corticosterona sintetizados por cada fragmento a los distintos tiempos, analizando los datos por un diseño de medidas repetidas,

2) como ng de corticosterona a 1h post 48 h/ml de medio relativizado al peso de interrenal incubada, para comparar los resultados con los obtenidos en la incubación de 24 h del punto 4.1.1.

4.2. Estudio de la variabilidad antero-posterior de la glándula interrenal en la síntesis de corticosterona

Para evaluar si la glándula interrenal de *R. arenarum* posee variaciones en la síntesis de corticosterona a lo largo de su eje antero-posterior se obtuvieron ambas interrenales de animales del período reproductivo y no reproductivo. Las interrenales de cada animal se dividieron en tres porciones según su posición en la glándula: anterior, intermedia y posterior, la división de estas zonas fue arbitraria y se realizó

cortando la interrenal transversalmente en tres porciones de igual longitud. Los fragmentos se incubaron en 1 ml de medio DMEM durante 1 h a 28 °C. Luego, se recuperó el medio, se congeló a -20 °C para evaluar la síntesis de corticosterona por radioinmunoensayo y se pesaron los fragmentos de interrenal incubados en una balanza analítica ($\pm 0,2$ mg).

Los datos se expresaron como ng de corticosterona/ml de medio por mg de interrenal incubada.

5. Procesamiento del material para histología e inmunohistoquímica

Se analizaron las glándulas interrenales izquierda y derecha de tres animales sacrificados durante la época reproductiva (septiembre a diciembre) de 2010 y de dos animales sacrificados durante febrero (época postreproductiva) de 2011. Las glándulas, fijadas en líquido de Bouin, se deshidrataron e incluyeron en parafina:histoplast (1:1) y fueron completamente seccionadas transversalmente o parasagitalmente cada 7 μm con un micrótopo de rotación. Dichos cortes se numeraron de anterior a posterior o de izquierda a derecha y se eligieron cortes de distintas zonas para colorear con tricómico de Masson modificado según DeCarlo, hematoxilina-eosina, ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) o azul de alcian, o para realizar las inmunohistoquímicas de las enzimas 3 β -HSD/I y tirosina hidroxilasa (TH). La enzima 3 β -HSD/I es un marcador de células esteroidogénicas en tanto que la enzima TH es marcadora de células productoras de catecolaminas o cromafines.

6. Procesamiento del material fijado para colorear con Sudan III

Se analizaron glándulas interrenales de dos animales sacrificados durante la época reproductiva de 2010 para corroborar la presencia de células cargadas con lípidos y su disposición en la glándula. Para ello, se lavaron las glándulas fijadas en formol con PBS y se criopreservaron con 30% sacarosa en PBS toda la noche. Luego, se congelaron a -20 °C en medio Crioplast (Biopack, Argentina) y se cortaron transversalmente cada 15 μm con un crióstato. Los cortes se colorearon primero con una solución saturada de Sudan III durante 30 min y luego con hematoxilina.

7. Procesamiento del material fijado para microscopía electrónica

Se analizó la glándula interrenal de un animal sacrificado durante el período reproductivo de 2011. Luego de la fijación con glutaraldehído se realizó una fijación con tetróxido de osmio al 1% en buffer fosfato durante 2 h y las piezas se deshidrataron e incluyeron en resina epon-araldita. Se realizaron cortes semifinos de 1 μm que fueron coloreados con 1% de azul de toluidina en 1% de Na_2CO_3 .

Los cortes ultrafinos se obtuvieron con una cuchilla de diamante en un Ultramicrotomo Sorvall Porter Blum MT2-B y se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963). Los preparados se examinaron en un microscopio electrónico Philips EM 301.

8. Inmunohistoquímica de las enzimas 3β -HSD/I y TH

Las secciones fueron desparafinadas con xilol e hidratadas con concentraciones decrecientes de etanol hasta llegar a PBS, pH 7,4. La actividad de las peroxidasas endógenas se inhibió con una solución 3% de peróxido de hidrógeno en PBS durante 10 min, luego de lo cual se bloquearon los sitios inespecíficos con 5% de leche en polvo descremada en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizado el período de bloqueo, las secciones fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en PBS, durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos anti 3β -HSD/I de humano y anti TH de rata fueron diluidos 1:200 y 1:1000, respectivamente, en PBS que contenía 1% de albúmina sérica bovina. El anticuerpo anti 3β -HSD/I fue cedido por el Dr. Ian Mason de la Universidad de Edinburgo, Escocia, en tanto que el anticuerpo anti TH fue adquirido en Chemicon International, EEUU. Ambos anticuerpos fueron preparados en conejo. Luego del tratamiento con el anticuerpo primario, las secciones fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado, preparado en cabra y diluido 1:500 (DAKOCytomation, Dinamarca). La amplificación de la señal fue llevada a cabo incubando las secciones durante 45 min a temperatura ambiente con un complejo de estreptavidina-biotina unido a peroxidasa diluido 1:400 (GE Healthcare, Gran Bretaña). La actividad de la peroxidasa exógena fue puesta en evidencia con una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAKO North America, Inc., EEUU). Luego,

se realizó una suave coloración de contraste con hematoxilina y los cortes se montaron con medio DPX (Biopak, Argentina). Las secciones se examinaron y fotografiaron con un microscopio Leica DM2000 con cámara fotográfica incorporada Leica ICC50, resolución 3 Mpixeles.

Para descartar falsos positivos debidos a la técnica inmunohistoquímica se realizaron incubaciones de cortes en paralelo con PBS en ausencia de los anticuerpos primarios.

9. Análisis por Western blot de las enzimas 3 β -HSD/I y TH

Para corroborar la especificidad de los anticuerpos heterólogos anti 3 β -HSD/I y anti TH empleados en las inmunohistoquímicas realizadas en la interrenal de *R. arenarum*, se analizaron homogenatos de interrenal por Western blot. Ambos anticuerpos han sido previamente utilizados tanto para inmunohistoquímica como para Western blot en diversas especies de mamíferos (Sasano y col., 1990, Thomas y col., 1990, Giordano y col., 1996, Arbogast y Voogt, 2002, entre otros).

Las glándulas interrenales de animales recolectados en el mes de mayo de 2011 se homogeneizaron con micropistillo en buffer homogenato en una proporción de 250 mg órgano por ml de buffer. Luego, los homogenatos se centrifugaron a 400 xg por 10 min a 4 °C para sedimentar el debris y se congelaron a -20 °C hasta el momento de su utilización. La concentración de proteínas de cada homogenato se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Se mezclaron 100 μ g de proteínas del homogenato con buffer de siembra y se realizó la electroforesis y transferencia de las proteínas de la manera descrita en II. Materiales y Métodos. 12. Luego de la transferencia, las membranas se incubaron en una solución de PBS-T con 3% de peróxido de hidrógeno durante 10 min y los sitios inespecíficos se bloquearon con 5% de leche en polvo descremada en PBS-T durante 1 h. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti TH en una dilución de 1:2000 en PBS-T o con el anti 3 β -HSD/I diluido 1:500 en PBS-T. Finalizado el período de bloqueo, las membranas fueron incubadas con 0,2 μ g/ml de anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra y acoplado a peroxidasa (Chemicon International, EEUU) durante 1 h a temperatura ambiente.

Como en todos los Western blots, se realizó un control negativo omitiendo la incubación con el anticuerpo primario.

Las bandas inmunopositivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el buffer de revelado, en un detector de quimioluminiscencia Fujifilm LAS-1000.

10. Radioinmunoensayo de corticosterona

La cuantificación de corticosterona en los medios de incubación se realizó sin previa extracción de los esteroides debido a que en dicho medio no hay proteínas transportadoras. Dependiendo del tratamiento y/o del experimento se usaron entre 20 y 50 μl de medio. La curva patrón con corticosterona radioinerte (50-6400 pg/ml), el unido no específico y el unido máximo se realizaron por triplicado en tanto que las muestras se realizaron por duplicado. Todas las incubaciones se realizaron con una cantidad fija del marcador radioactivo, 10.000 dpm de corticosterona- ^3H , que poseía una actividad específica de 78,1 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ (Perkin-Elmer, EEUU) en un volumen final de 0,5 ml del buffer correspondiente. El anticuerpo anti corticosterona utilizado fue cedido por el Dr. Celso Gómez-Sánchez (Universidad de Misisipi, Medical Center, Jackson, EEUU) y fue utilizado en una dilución 1:20.000. La reacción cruzada de este anticuerpo con aldosterona es $<0,01\%$ (Gómez-Sánchez y col., 1975). La reacción se llevó a cabo durante 18-22 h a 4 °C y se interrumpió por el agregado de una mezcla de carbón-dextrano (0,5:0,05 %) en buffer borato de sodio 100 mM. Luego de 20 min de incubación, los tubos se centrifugaron a 2700xg durante 20 min a 4 °C y de los sobrenadantes obtenidos, que contenían el esteroide unido al anticuerpo, se tomaron 400 μl que se colocaron en viales con 1,5 ml de líquido de centelleo (OptiPhase-Hi safe 3, Finlandia) y se contó la radioactividad en un equipo Wallac 1409 DSA (Wallac Co, Finlandia).

La sensibilidad del ensayo fue de 50 pg/ml. La variación media intra ensayo fue de 9,3% y la variación media ínter ensayo fue de 12,2%.

11. Análisis estadístico

Los datos de las incubaciones in vitro con testosterona durante 24 h fueron analizados con un diseño de bloques aleatorizados, donde los bloques fueron los animales. Previo al análisis de los datos, como ha sido explicado en el punto 15 de la parte II. Materiales y Métodos, se verificó el supuesto de no interacción entre los factores (animal y tratamiento) con un gráfico de perfiles (Quinn y Keough, 2002). El gráfico mostró que la respuesta de los controles a la incubación fue variable, con lo cual se decidió restar el valor del control al valor de los tratamientos y así se observó que cada animal respondió de la misma manera a los tratamientos.

Los datos del estudio de la variabilidad antero-posterior de la síntesis de corticosterona fueron también analizados con un diseño de bloques aleatorizados donde los bloques fueron los animales. El gráfico de perfiles permitió inferir que no hay interacción entre los factores animal y región de la interrenal.

Se utilizó en ambos casos un ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para detectar diferencias significativas entre los tratamientos o entre la región de la interrenal.

Los datos de las incubaciones in vitro que involucraron un tiempo total de incubación de 48 h y que fueron expresados como ng corticosterona/ml de medio de incubación relativo al peso del fragmento incubado, fueron analizados por un ANOVA de un factor debido a la variabilidad en la respuesta de cada animal al tratamiento.

Previo al análisis estadístico se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad utilizando las pruebas de Lilliefors y Bartlett, respectivamente.

Los datos de las incubaciones in vitro durante 48 h (corticosterona a 1 h, 1 h post 24 h y 1 h post 48 h) se analizaron por un diseño de medidas repetidas. Previo al análisis se verificaron los supuestos de igualdad de las varianzas (prueba Box M) y de ajuste al modelo (prueba de esfericidad de Mauchly). Los datos fueron transformados aplicando el $\ln(X)$ para cumplir con ambos supuestos.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., Oklahoma, EEUU) y se consideraron diferencias significativas con $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar.

III | Resultados

En la primera parte de esta tesis se analizó, entre otras cosas, la acción de los GC sobre el testículo. Particularmente, se estudió el efecto de los GC sobre una de las enzimas limitantes en la síntesis de andrógenos como es la *cyp450c17* así como las variaciones estacionales y la regulación del receptor de GC. El objetivo de esta segunda parte fue analizar si los andrógenos están involucrados en la regulación de las variaciones estacionales de corticosterona a través de una acción directa sobre la glándula interrenal. Además, se analizó histológicamente la estructura de la glándula para evaluar la regionalización de los tipos celulares y tratar de discernir si hay distintos tipos de células esteroideogénicas.

1. Estudio del rol de los andrógenos en la regulación de la síntesis de corticosterona

El efecto de testosterona sobre la síntesis de corticosterona por la glándula interrenal se evaluó *in vitro* a través de dos esquemas experimentales.

Una de las aproximaciones consistió en incubar fragmentos de las interrenales de cada animal durante 24 h con medio solo (control) o con el agregado de testosterona 10 nM o 100 nM y luego evaluar la liberación de corticosterona a un medio fresco sin agregados. El gráfico de perfiles (Figura III. 2A), que representa la respuesta al tratamiento en cada animal, muestra que los controles fueron muy variables respecto de los tratamientos, por lo tanto hubo interacción entre el factor animal y el factor tratamiento, lo cual impide un análisis por bloques aleatorizados. Dado que en este caso el ANOVA de un factor no detectaría diferencias significativas entre los tratamientos debido a la variabilidad entre los animales, se debió restar el valor del respectivo control a cada tratamiento para así realizar un análisis por bloques aleatorizados. La Figura III. 2B muestra que testosterona 100 nM disminuyó significativamente la liberación de corticosterona al medio de incubación respecto del tratamiento con testosterona 10 nM ($F_{1,10}=11,2$; $p=0,007$, ANOVA de dos factores).

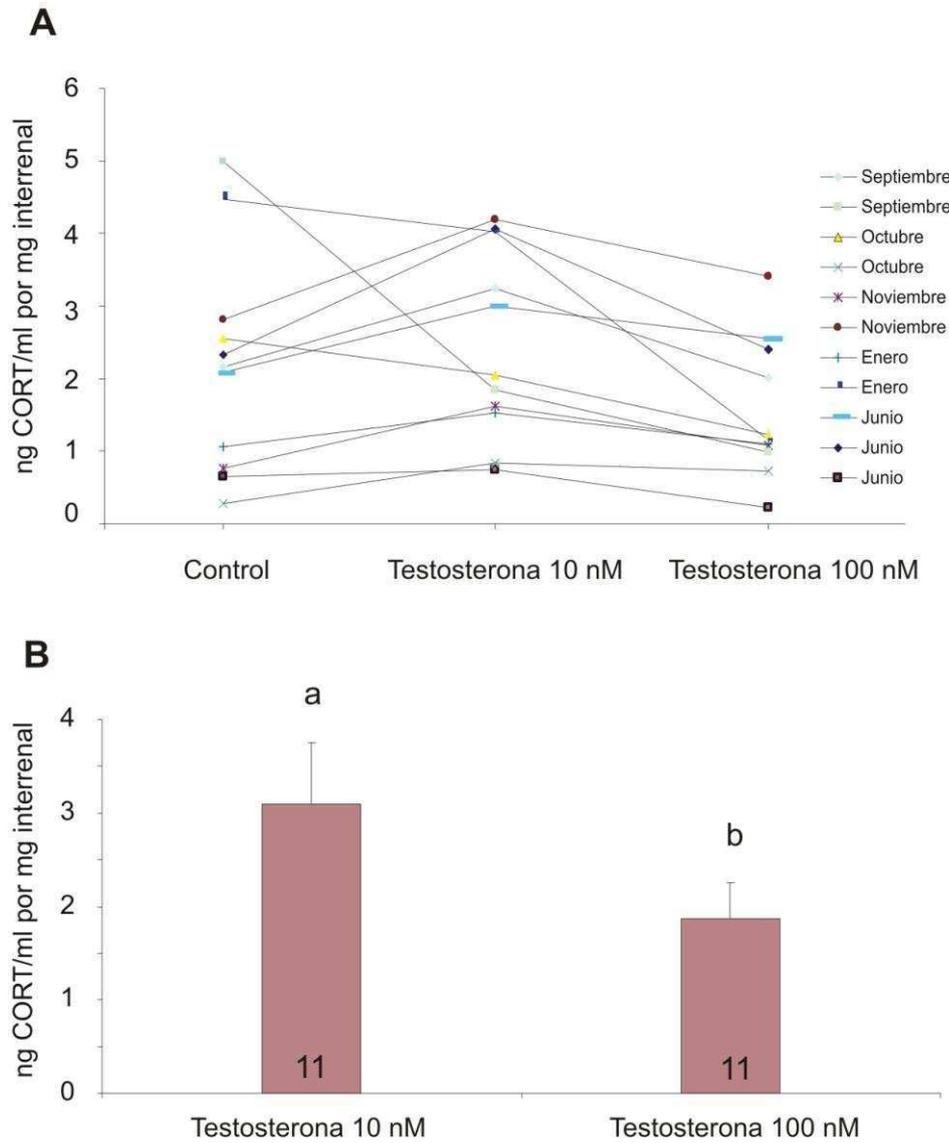
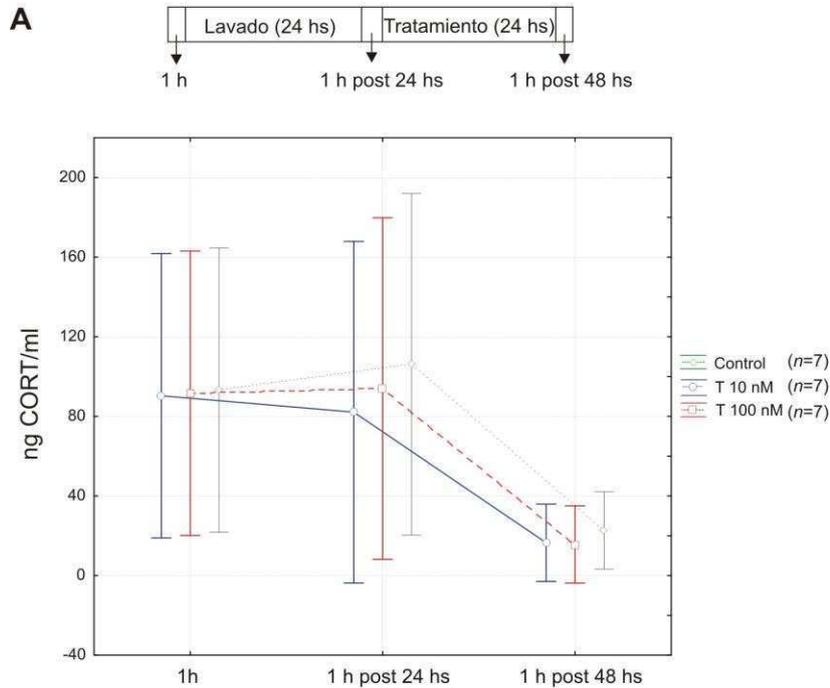


Figura III. 2. Liberación de corticosterona (CORT) luego de la incubación in vitro con testosterona por 24 h. El panel **A** muestra el gráfico de perfiles donde se observa la respuesta de cada animal al tratamiento con testosterona. El panel **B** presenta los valores promedio de los tratamientos. En ambos gráficos los resultados se expresan como los ng de corticosterona/ml de medio de incubación por mg de interrenal incubada. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento y las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se muestran con letras distintas sobre cada barra de error estándar.

La otra aproximación experimental consistió en la preincubación de los fragmentos de interrenal durante 24 h con medio solo y aplicar posteriormente el tratamiento durante otras 24 h (control, testosterona 10 nM o 100 nM). El objetivo de este experimento fue evaluar si el prelavado de los fragmentos de interrenal con medio solo disminuía la variabilidad entre el control y los tratados con testosterona

en los distintos animales. Esta aproximación experimental permitiría con el prelavado con medio solo reducir las variaciones entre las interrenales debidas a diferencias en el estado fisiológico de los animales de los cuales se las extrajo.



B

EFEECTO	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0,1672	2	0,0836	0,0183	0,981870
Error	82,1394	18	4,5633		
Tiempo	28,4423	2	14,2211	25,2949	1,3773x10 ⁻⁷ *
Tiempo*tratamiento	0,5266	4	0,1317	0,2342	0,917279
Error	20,2397	36	0,5622		

Figura III. 3. Efecto del tratamiento con testosterona sobre la liberación in vitro de corticosterona (CORT). El panel **A** muestra el protocolo experimental utilizado y el gráfico en el que se expresan los ng de corticosterona/ml medidos a los distintos tiempos. El panel **B** muestra el resultado del análisis estadístico utilizando medidas repetidas. SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios, F: estadístico de Fisher, p: valor de probabilidad de la prueba. El número de réplicas se indica en la leyenda del gráfico (panel **A**).

En este caso también se evaluó la liberación de corticosterona a un medio fresco sin agregados. Dado que se midieron los ng de corticosterona/ml a diferentes tiempos (ver esquema experimental en la Figura III. 3A) se optó por realizar un análisis de medidas repetidas cuyos resultados se presentan en la Figura III. 3A,B. Este análisis mostró que no hay interacción entre los factores tiempo y tratamiento, lo cual indica

que los tratamientos produjeron la misma respuesta en el tiempo ($F_{4,36}=0,2$; $p=0,91$). Luego de 48 h totales de incubación, la síntesis de corticosterona disminuyó significativamente ($F_{2,36}=25,3$; $p<0,0001$) tanto en el control como en los tratados. Sin embargo, los tratamientos no produjeron diferencias significativas en la síntesis del glucocorticoide ($F_{2,18}=0,02$; $p=0,98$).

Dado que en el análisis de medidas repetidas no se consideró el peso de los fragmentos de las interrenales incubadas, se evaluó además la liberación de corticosterona al medio fresco aplicado postratamientos, luego de 48 h totales de incubación, relativizada al peso de los fragmentos incubados. En este caso la respuesta de cada animal al tratamiento fue muy dispar por lo cual no se pudieron analizar los resultados por un diseño de bloques aleatorizados sino que se analizaron por un ANOVA de un factor. Como se observa en la Figura III. 4 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{2,18}=0,14$; $p=0,87$). Se debe considerar que, como se mencionó en el párrafo anterior, luego de las 48 h totales de incubación la actividad de la glándula disminuye significativamente, lo cual dificulta poder evaluar el efecto de la testosterona en la síntesis de corticosterona.

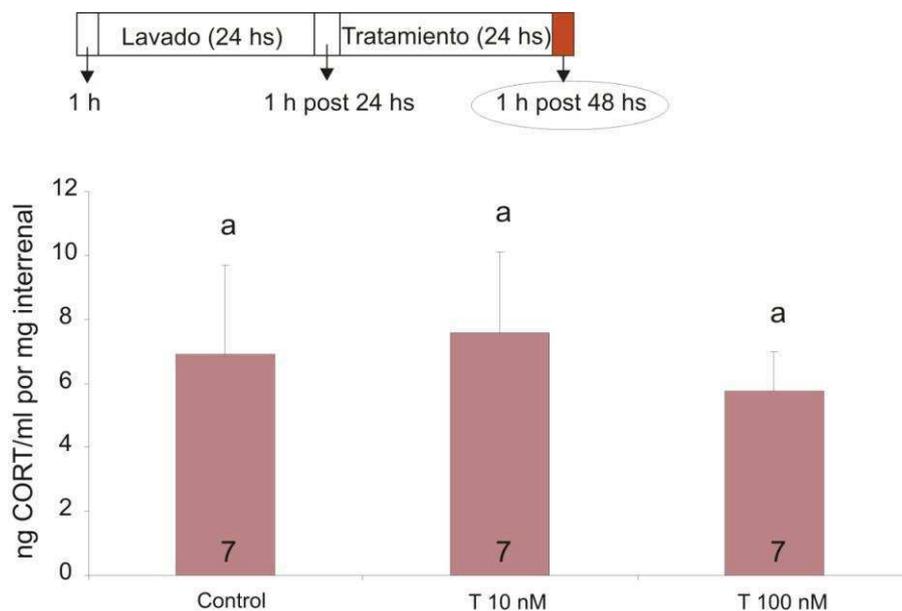


Figura III. 4. Liberación de corticosterona (CORT) in vitro luego de 24 h de lavado más 24 h de tratamiento con testosterona. El gráfico presenta los valores promedio de cada tratamiento como los ng de corticosterona/ml de medio de incubación por mg de interrenal incubada. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento y las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se muestran con letras distintas sobre cada barra de error estándar.

2. Variación antero-posterior de la síntesis de corticosterona por la glándula interrenal

Cuando se evaluó el efecto de los andrógenos en la síntesis de corticosterona se observó que había mucha variación en la síntesis del glucocorticoide luego de 24 h de incubación. Dichas diferencias podrían deberse o bien al estado fisiológico del animal del cual se extrajeron las glándulas, lo cual fue planteado en el experimento que involucró 48 h totales de incubación, o a variaciones en la regionalización de las células productoras de corticosterona en la glándula interrenal. Dado que se desconoce si la interrenal de *R. arenarum*, y de los anuros en general, varía antero-posteriormente, se decidió evaluar la liberación in vitro de corticosterona por diferentes zonas de la interrenal: anterior, intermedia y posterior. Se debe considerar que la división de estas zonas fue arbitraria y se realizó cortando la interrenal transversalmente en tres porciones de igual longitud.

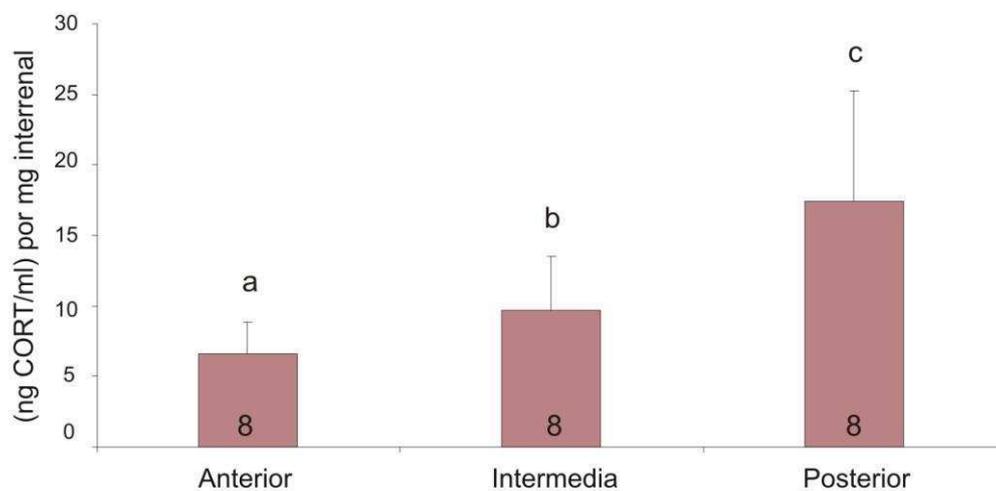


Figura III. 5. Variación antero-posterior de la liberación de corticosterona (CORT) en la glándula interrenal. Se incubaron fragmentos de interrenal durante 1 h y luego se midió la concentración de corticosterona en el medio de incubación. Los resultados se expresan como el valor promedio de los ng de corticosterona/ml de medio de incubación por mg de interrenal incubada. El número de réplicas se indica dentro de la columna correspondiente a cada tratamiento y las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se muestran con letras distintas sobre cada barra de error estándar.

Los valores de ng de corticosterona/ml de medio fueron relativizados al peso del fragmento de interrenal incubado y el análisis estadístico de estos datos mostró que existe una gradación antero-posterior en la liberación de corticosterona, siendo mayor en la región posterior, media en la región intermedia y menor en la región anterior (Figura III. 5, $F_{2,14}=25,3$; $p<0,0001$, ANOVA de dos factores).

3. Estudio de la glándula interrenal con técnicas de histología clásicas

3.1. Coloraciones topográficas

La glándula interrenal de *R. arenarum* se halla íntimamente asociada a la cara ventral del riñón opistonéfrico y el lado opuesto al riñón está delimitado por una capa de tejido conectivo denso asociada a un mesotelio plano simple (Figura III. 6A-C). En la zona medial ventral se localiza la vena renal eferente que está rodeada por el parénquima de la glándula, este último organizado en cordones anastomosados de varias células de espesor (Figura III. 6B-E). Cada cordón está rodeado por una delgada capa de tejido conectivo y entre los cordones hay capilares sinusoides amplios (Figura III. 6B,C). Las coloraciones topográficas utilizadas, tricrómico de Masson y hematoxilina-eosina, permitieron observar que los cordones celulares no son homogéneos sino que poseen características diferentes y están formados por células distintas. Inclusive, hay zonas de la glándula en la cual se observan grandes grupos de células basófilas, que no parecen ser cordones (Figura III. 6B,D,F).

En los cortes coloreados con tricrómico de Masson se caracterizaron los tipos celulares que se mencionan a continuación. Se le asignó a cada tipo una letra arbitraria para facilitar la comparación con lo observado con las otras técnicas:

- Células A, esféricas con núcleo central esférico u ovalado cuyo citoplasma es ligeramente acidófilo y contiene gran cantidad de espacios redondeados vacíos que le otorgan un aspecto esponjoso debido muy probablemente al contenido de lípidos extraídos durante la preparación de la pieza. El núcleo es eucromático, puntillado y se observa generalmente un nucleolo central. Estas células se organizan en cordones anastomosados de entre dos y cinco células de espesor y se encuentran en íntimo contacto con grandes capilares sinusoides (Figura III. 7A).

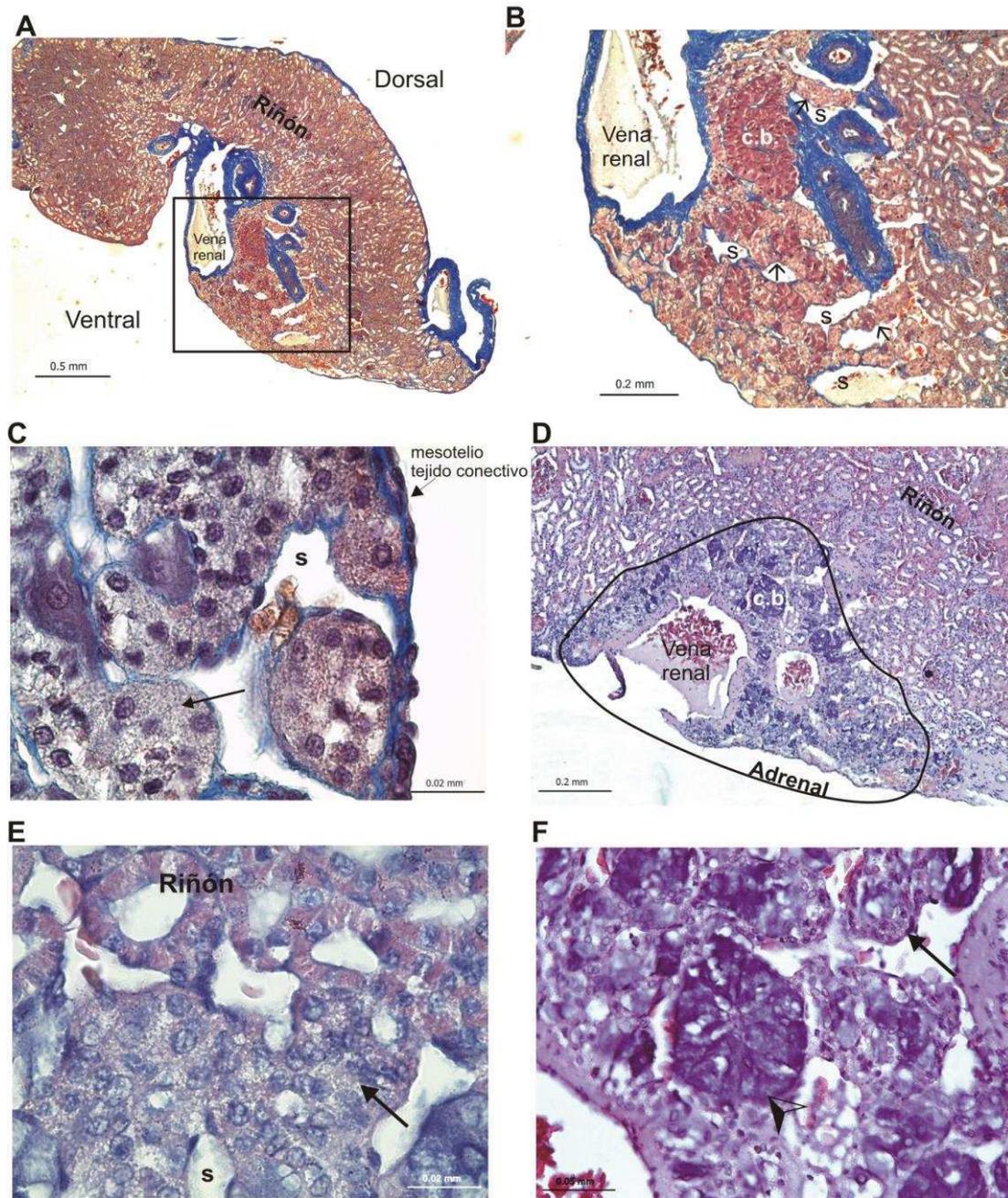


Figura III. 6. Corte transversal de riñón y glándula interrenal. Los paneles **A**, **B** y **C** muestran cortes coloreados con tricrómico de Masson. El panel **B** es un detalle de la zona marcada en el panel **A** con un rectángulo. El panel **C** muestra en detalle la porción de la glándula más distal al riñón. Las flechas indican los cordones celulares de la glándula interrenal y la “s” los capilares sinusoides. Los paneles **D**, **E** y **F** muestran cortes coloreados con hematoxilina-eosina. En ellos, las flechas indican los cordones de células y la punta de flecha señala un grupo de células basófilas. “c.b.” en letras blancas muestra la zona con células basófilas hallada con ambas coloraciones.

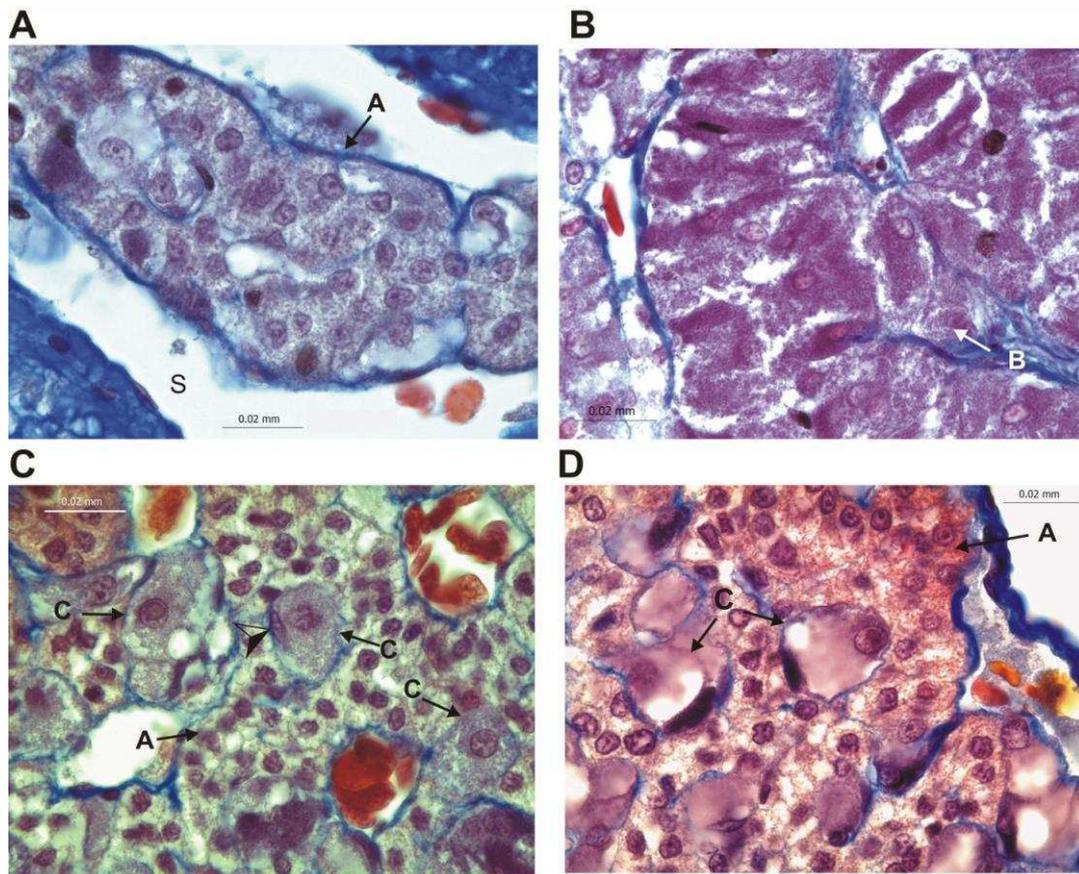


Figura III. 7. Detalle de los tipos celulares diferenciados en los cortes coloreados con tricrómico de Masson. El panel A muestra un cordón de células “A” y la “s” indica un capilar sinusoide El panel B muestra un grupo de células “B”. Los paneles C y D muestran cordones de células “A” donde se observan intercaladas células “C”. Las flechas señalan los tipos celulares diferenciados y la punta de flecha muestra un núcleo ovalado asociado a una célula “C”. Las células “A”, “B” y “C” han sido denominadas y descritas en III. Resultados. 3.1.

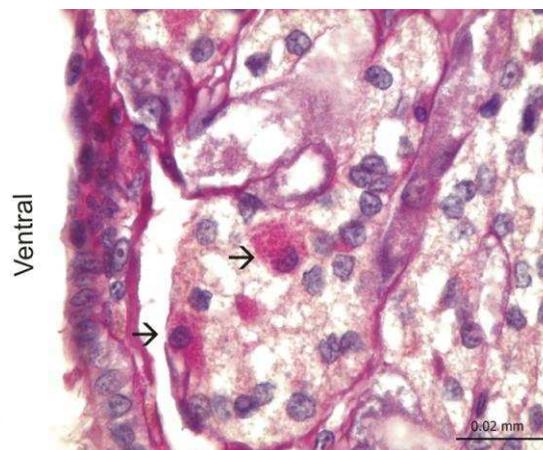


Figura III. 8. Detalle de células PAS positivas. Las flechas indican las células con gránulos PAS positivos, que se encuentran solitarias en los cordones.

- Células B, de apariencia claviforme con núcleo central ovalado cuyo citoplasma posee gránulos basófilos altamente empaquetados. Poseen un núcleo eucromático, grumoso, en el cual no se distinguen nucleolos. Estas células se observan principalmente en la zona central de la glándula y forman grandes grupos oscuros, amorfos en los cuales es muy complicado diferenciar los cordones (Figura III. 7B). Se observan variaciones antero-posteriores en la cantidad de estas células en diferentes regiones de la glándula como se explica en el punto 5.

- Células C, alargadas o triangulares, más grandes que las anteriormente descritas, con núcleo excéntrico y cuyo citoplasma posee pequeños gránulos basófilos. El núcleo se observa eucromático y presenta un nucleolo grande y marcado (Figura III. 7C,D). Se suelen encontrar asociadas a otra célula cuyo núcleo es ovalado (Figura III. 7C) y muchas veces se observa una banda basófila muy coloreada en parte de la periferia de la célula (Figura III. 7D). Estas células se encuentran casi siempre aisladas, formando parte de los cordones celulares descritos anteriormente (Figura III. 7C,D).

En los cortes coloreados con hematoxilina-eosina fue más complicado diferenciar los tipos celulares y su organización, sin embargo se evidenció la presencia de grupos de células basófilas, que se ven como grupos oscuros, alternados con cordones de células ligeramente acidófilas (Figura III. 6D-F). Esta coloración permitió descartar la presencia de células con inclusiones citoplasmáticas fuertemente eosinófilas como fuera descrito para las interrenales de otros anuros (Moorhouse, 1963; Sottovia-Filho, 1974).

3.2. Coloraciones histoquímicas de PAS y azul de alcian

La técnica del ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS), que se utiliza para detectar carbohidratos neutros, mostró células con gránulos citoplasmáticos positivos para esta reacción (Figura III. 8). Estas células tienden a ser ovaladas, su eje mayor se encuentra entre los 10 y 15 μm y el núcleo es esférico y excéntrico. Las mismas se encuentran solitarias, rodeadas por las células acidófilas de aspecto esponjoso descritas previamente (células A del tricrómico de Masson) y cercanas a los sitios del riñón donde ocurre hematopoyesis. Estas células PAS positivas, rodeadas por células acidófilas de aspecto esponjoso son similares a las células de Stilling o de

verano descritas previamente en otros anfibios (Kawamura, 1986; Lesouhaitier y col., 1996). No se observaron células coloreadas con el azul de alcian lo que indicaría la ausencia de células con carbohidratos ácidos (fotos no mostradas).

3.3. Coloración de lípidos con Sudan III

El Sudan III es un colorante que se disuelve en los lípidos y les otorga un color rojizo. En las glándulas interrenales fijadas con formol para no perder los lípidos se observaron cordones de células con inclusiones lipídicas alternados con grupos de células basófilas (Figura III. 9A,B).

4. Identificación de células esteroideogénicas y productoras de catecolaminas por técnicas de inmunohistoquímica

La glándula interrenal es una glándula mixta que produce tanto catecolaminas como esteroides. Para identificar células esteroideogénicas y productoras de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) se emplearon, respectivamente, anticuerpos anti 3 β -HSD/I y anti TH. El análisis del homogenato de interrenal por Western blot mostró que ambos anticuerpos utilizados revelan una sola banda cuyo peso molecular coincide con el valor esperado: 45 Kda para la enzima 3 β -HSD/I y 60 Kda para la enzima TH (Figura III. 10); lo cual sugiere la especificidad de los anticuerpos heterólogos utilizados por los respectivos antígenos.

La coloración de contraste, hematoxilina, permitió diferenciar distintas células inmunoreactivas para 3 β -HSD/I en la glándula interrenal. En los controles negativos, sin el agregado del anticuerpo, se observaron grupos de células muy basófilas, al igual que con la hematoxilina del tricrómico de Masson, y cordones de células más claras (Figura III. 11A). Dado que las coloraciones y las inmunohistoquímicas se realizaron en cortes seriados alternados de las mismas interrenales se pudo corroborar que las células más claras, diferenciadas con la coloración de contraste, son las células A y que las basófilas son las células B, ambos tipos celulares fueron descritos en el punto 3.1.

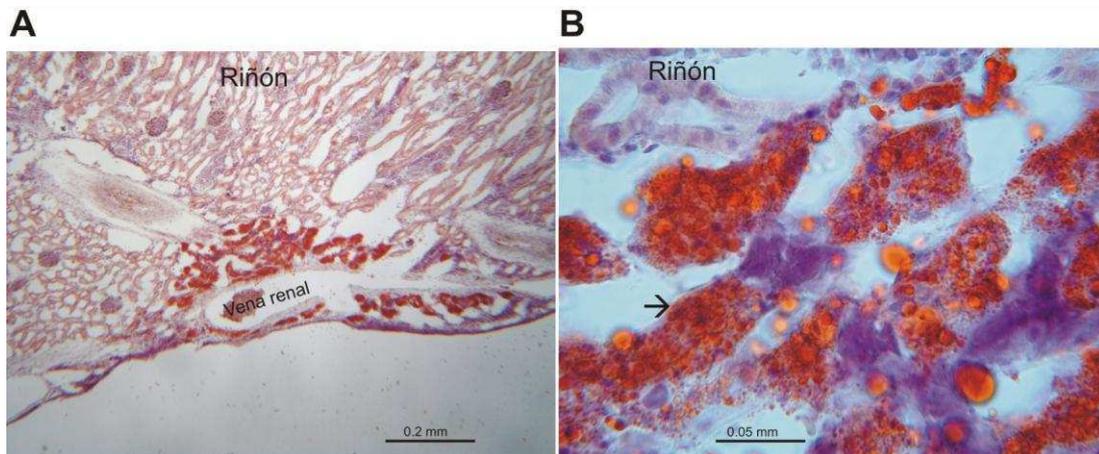


Figura III. 9. Detección de lípidos con Sudan III. La fotografía muestra cordones de la glándula interrenal con grupos de células con alto contenido lipídico alternados con grupos de células basófilas sin lípidos. La flecha indica las células coloreadas con el Sudan III (anaranjado).

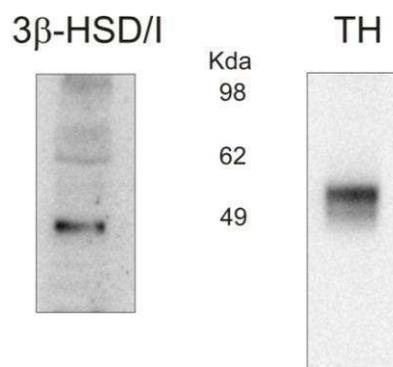


Figura III. 10. Western blot de las enzimas 3β -HSD/I y TH de homogenato de glándula interrenal. Se presenta la fotografía de una membrana representativa del revelado de ambas proteínas con los mismos anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica.

Se localizaron células inmunoreactivas para 3β -HSD/I tanto en los cordones con células claras de aspecto esponjoso (células A), como en los grupos con células basófilas (células B, Figura III. 11B-E). La inmunohistoquímica llevada a cabo sin la coloración de contraste permitió corroborar la inmunomarca en las células basófilas (Figura III. 11F) y se pudo observar que en los cordones de células claras, algunas células se marcan con mayor intensidad que el resto. No se observó inmunomarca en el riñón.

Cuando se realizó la inmunohistoquímica omitiendo el anticuerpo primario no se observó marcación (Figura III. 11A).

El anticuerpo anti TH coloreó células aisladas, de mayor tamaño que las marcadas por el anticuerpo anti 3β -HSD/I, dispersas en toda la interrenal (Figura III. 12A). La observación de las células inmunomarcadas con mayor aumento permitió distinguir que en la interrenal hay diferentes células que expresan TH. Por un lado, se distinguieron células triangulares con núcleo esférico grande en relación al tamaño de la célula, con prolongaciones celulares y asociadas a una célula pequeña con núcleo ovalado (célula acompañante, Figura III. 12B). Por otro lado, se observaron células ovaladas cuyo núcleo es más pequeño que el de las anteriormente descritas, en las cuales no se aprecian prolongaciones celulares (Figura III. 12C). No se observó inmunomarca en el riñón ni en los controles negativos omitiendo el anticuerpo primario (Figura III. 12D).

También se observó inmunomarca de TH en los ganglios simpáticos paravertebrales que se encuentran entre los riñones. En éstos ganglios se distinguió la inmunomarca en:

- Fibras nerviosas (Figura III. 13A,B).
- Células triangulares o fusiformes aisladas, con núcleo esférico grande en relación al tamaño de la célula y con prolongaciones celulares, que parecen ser somas neuronales (Figura III. 13B).
- Células basófilas agrupadas, con núcleo ovalado pequeño y sin prolongaciones celulares (Figura III. 13A).

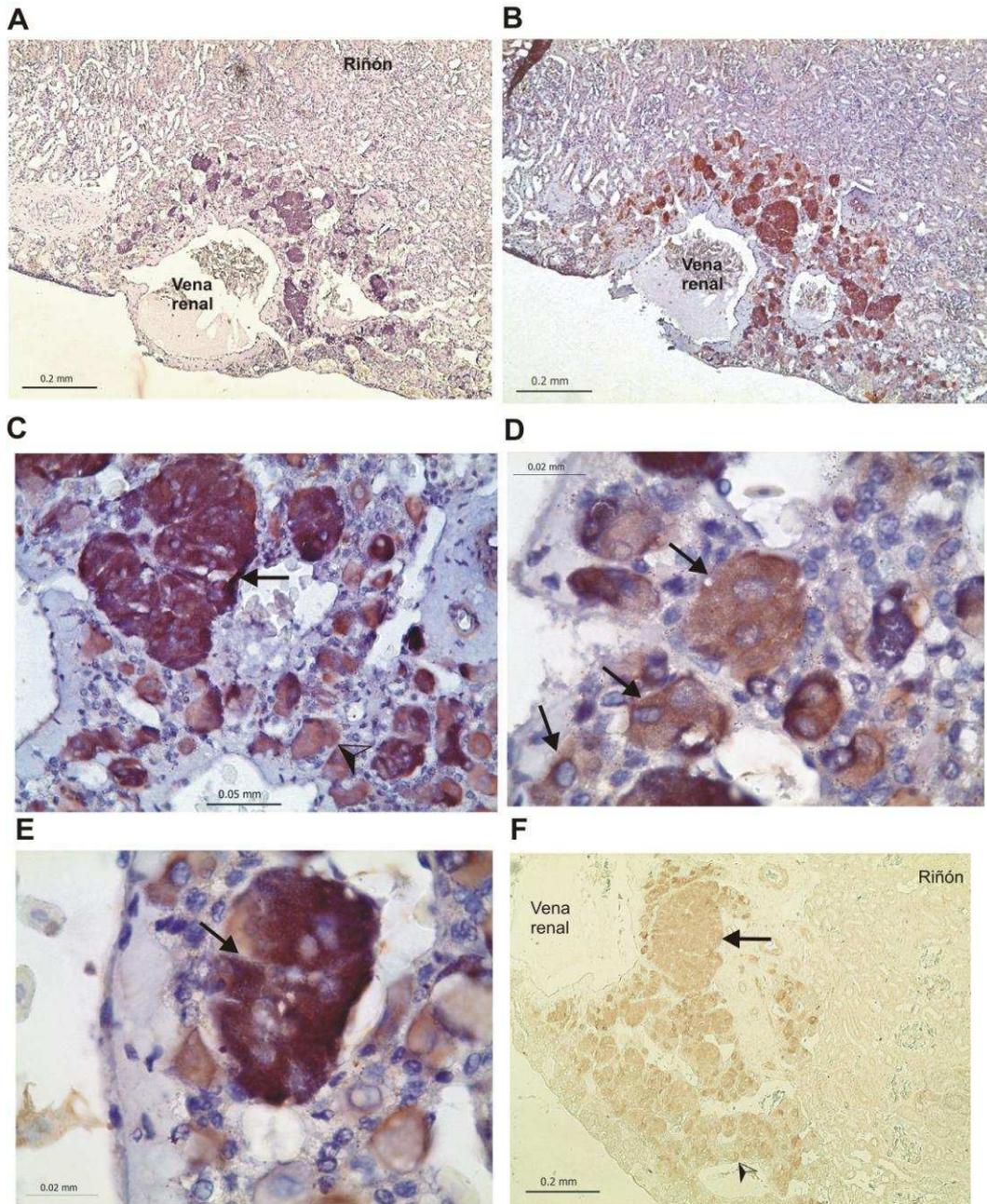


Figura III. 11. Detección de células esteroidogénicas por inmunohistoquímica de 3β-HSD/I. El panel **A** muestra un control negativo omitiendo el anticuerpo primario y coloreado con hematoxilina (coloración de contraste). El panel **B** muestra la inmunomarca marrón en la zona correspondiente a la glándula interrenal. En el panel **C** se observa marca en grupos de células basófilas (células “B”, flecha) y en células claras, de aspecto esponjoso (células “A”, punta de flecha). Los paneles **D** y **E** muestran, respectivamente, detalles de células “A” y “B” con inmunomarca. Las flechas indican las células marcadas. El panel **F** muestra una inmunohistoquímica sin la coloración de contraste, donde la flecha indica un grupo de células “B” y la punta de flecha las células “A”.

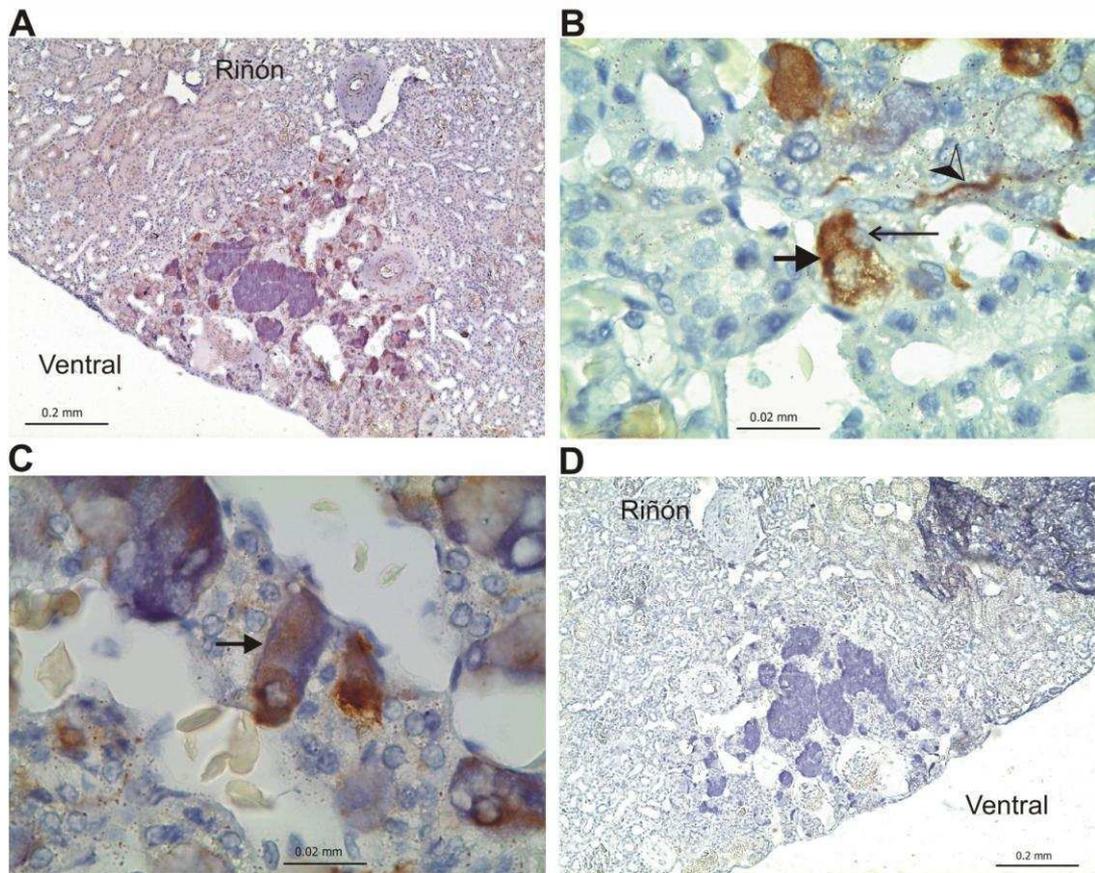


Figura III. 12. Detección de células productoras de catecolaminas en la glándula interrenal por inmunohistoquímica de TH. El panel **A** muestra la inmunomarca marrón en la zona de la interrenal. Los paneles **B** y **C** muestran detalles de las células descritas en III. Resultados. 4. Las flechas gruesas indican las células inmunomarcadas, la flecha fina indica el núcleo de una célula acompañante y la punta de flecha, una prolongación celular con inmunomarca. El panel **D** muestra un control negativo omitiendo el anticuerpo primario y coloreado con la coloración de contraste (hematoxilina).

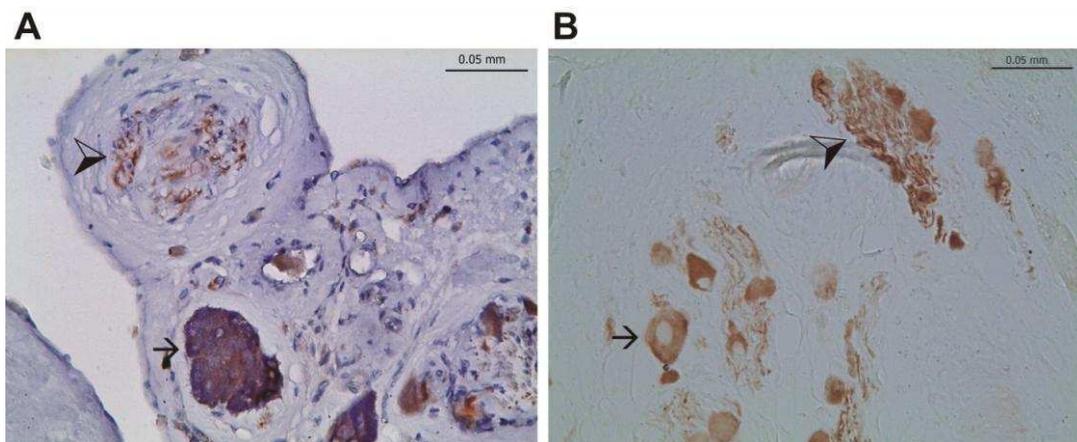


Figura III. 13. Detección de células productoras de catecolaminas en ganglios simpáticos paravertebrales por inmunohistoquímica de TH. El panel **A** muestra la inmunomarca marrón en fibras nerviosas (punta de flecha) y en células muy basófilas (flecha). El panel **B** muestra un corte que no fue coloreado con hematoxilina y se aprecia la inmunomarca en fibras nerviosas (punta de flecha) y en somas neuronales (flecha).

5. Estudio histológico de la organización y regionalización de las distintas células en la glándula interrenal

Dado que se determinó una gradación antero-posterior en la secreción de corticosterona (ver Figura III. 5) se decidió analizar si existían variaciones en la estructura a lo largo de la glándula. Se estudió la organización de los tipos celulares y su variación antero-posterior en los cortes coloreados con tricrómico de Masson dado que fue la coloración topográfica que aportó mayor detalle sobre los tipos celulares que forman la interrenal.

En los cortes transversales, tanto anteriores como posteriores, se observó que las células que constituyen el parénquima de la glándula se organizan en cordones anastomosados de varias células de espesor (Figura III. 14A,C). Sin embargo, no todos los cordones tienen la misma disposición y, además, están formados por distintos tipos celulares. Como fuera mencionado en el punto 3.1, se observaron cordones constituidos por células A rodeados por amplios capilares sinusoides y grupos amorfos formados por células B (Figura III. 14A). Estos últimos se encuentran mayormente hacia el interior de la glándula aunque también se observan en la zona más periférica (Figura III. 14A,B). Las células C se observaron dispersas, asociadas a los cordones y en la mayoría de los casos solitarias (Figura III. 14B y 7D).

Cuando se estudió la variación antero-posterior en los cortes transversales seriados y en los parasagittales, se observó que en la zona posterior de la glándula la proporción de células B respecto de las A es menor que en la zona anterior (Figura III. 14A vs. C). Mientras que en la zona anterior, las células B forman grandes grupos amorfos (Figura III. 14A,B), en la zona posterior las células B se agrupan como pequeños “parches” alternados con células A (Figura III. 14C,D). No se observó variación antero-posterior ni en la organización ni en la abundancia de las células C (ver Figura III. 7D de zona posterior vs. Figura III. 14B de zona anterior).

Dado que con la técnica de inmunohistoquímica de la enzima 3β -HSD/I se pudo identificar a las células inmunomarcadas como las células “A” y “B” descritas con el tricrómico de Masson, se puede deducir que en la glándula interrenal existe una variación antero-posterior de los distintos tipos de células esteroideogénicas.

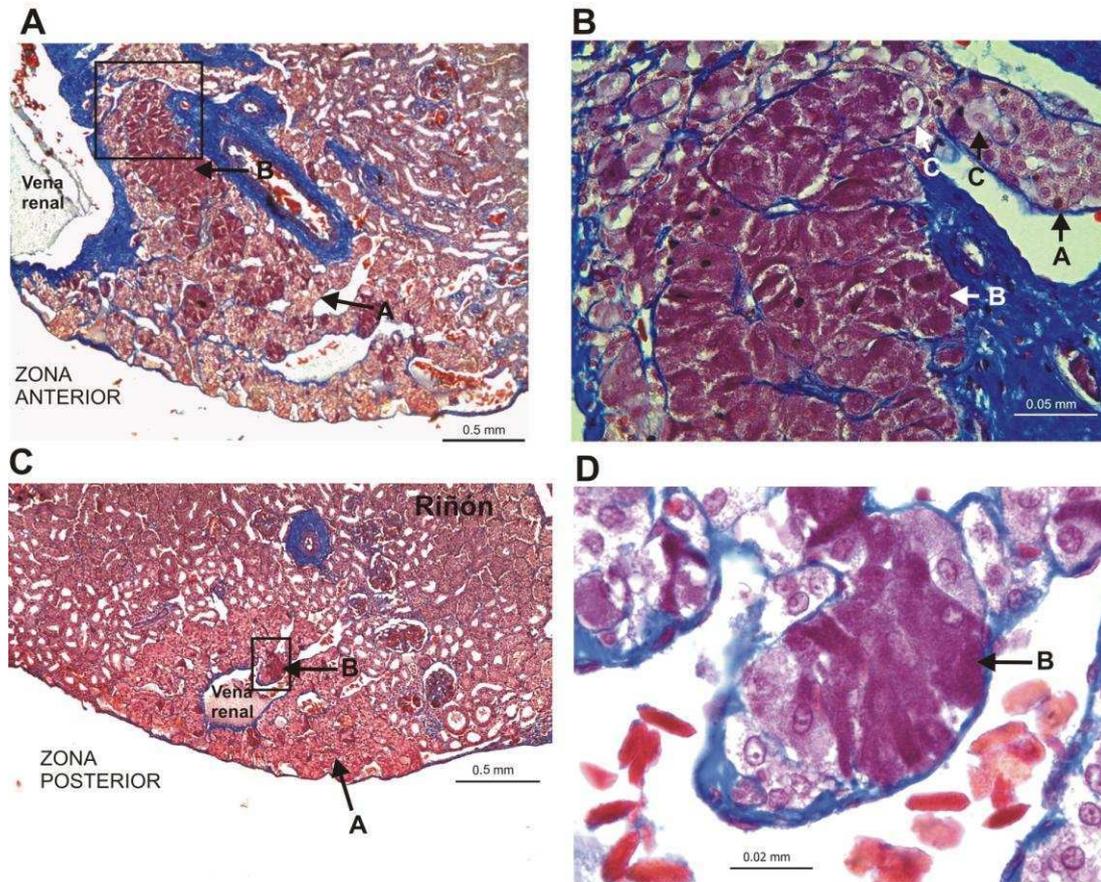


Figura III. 14. Variación antero-posterior de los tipos celulares en la glándula interrenal. El panel **A** muestra un corte transversal de la zona anterior de la interrenal. El panel **B** es un detalle de la zona marcada con un rectángulo en el panel **A**. El panel **C** muestra un corte transversal de la zona posterior de la interrenal, donde se observa abundante cantidad de células “A”. El panel **D** es un detalle de la zona marcada en el panel **C**. Las flechas en todos los paneles indican los distintos tipos celulares diferenciados, “A”, “B” y “C”.

En cambio, la inmunohistoquímica de TH en cortes seriados transversales no mostró diferencias entre las distintas zonas de la interrenal. Se observaron en todos los cortes células dispersas como se observa en la Figura III. 12A.

6. Estudio de la glándula interrenal y diferenciación de tipos celulares en cortes semifinos

Para realizar los cortes semifinos y las grillas para microscopía electrónica se eligió la zona anterior de la glándula interrenal dado que allí se observaron los grandes grupos amorfos de células B con el tricrómico de Masson. Los cortes semifinos coloreados con azul de toluidina aportaron gran detalle sobre los tipos de células presentes en la glándula interrenal así como sobre su organización. Como se puede ver en la Figura III. 15A, la organización topográfica de la glándula se ve muy distinta respecto de aquella observada en los cortes realizados en parafina y coloreados con el tricrómico de Masson. En los cortes semifinos, en los cuales los lípidos no se han extraído, se observan cordones de células con lípidos (inclusiones verde-turquesas) y “parches” pequeños de células sin lípidos.

A continuación se caracterizan los tipos celulares diferenciados y a cada uno de ellos se le asigna un número arbitrario para poder luego compararlos con las imágenes de microscopía electrónica:

- Células I, poseen gotas lipídicas en el citoplasma que se aprecian verde-turquesas por la metacromasia del azul de toluidina. Se diferenciaron dos tipos de células con inclusiones lipídicas. Por un lado, las células Ia que son poliédricas con núcleo esférico de posición variable, desplazado generalmente hacia un extremo por las gotas lipídicas. Entre las gotas lipídicas se observan gránulos azules de tamaño y número variable. En el núcleo se observa cromatina puntillada, levemente engrosada en la periferia nuclear y generalmente se diferencian dos o tres nucleolos (Figura III. 15B-D). Es difícil ver los límites celulares pero se puede estimar que estas células tienen un tamaño aproximado de 20 μm . Por otro lado, las células Ib con núcleos más ovalados, oscuros y con borde irregular (Figura III. 15C). El citoplasma de las mismas es más oscuro que el de las anteriormente descritas, dado que tiene mayor densidad de gránulos azules. Las gotas lipídicas de estas células parecen ser de menor tamaño que las de las células Ia.

Estas observaciones nos muestran que histológicamente se pueden diferenciar dos tipos de células esteroideogénicas en la glándula interrenal.

- Células II, poliédricas y alargadas, con núcleo ovalado y citoplasma con pequeños gránulos azules muy empaquetados. La cromatina es homogénea y no se distinguen nucleolos (Figura III. 15B,E). El eje mayor de estas células tiene un tamaño aproximado de 30 μm , se disponen en pequeños grupos formando parte de los cordones anastomosados y son menos abundantes que las descritas anteriormente. Siempre se encontraron en íntimo contacto con las células III.

- Células III, de mayor tamaño que todas las anteriores, alargadas, con prolongaciones y su eje mayor tiene aproximadamente 40 μm . El núcleo tiene disposición central, es esférico, con cromatina puntilleada mas clara que la del resto de las células y en él se observa un sólo nucleolo. El citoplasma de estas células posee pequeños gránulos azules dispersos. Se suele observar una banda muy coloreada en parte de la periferia de la célula que parece corresponder a una célula II (Figura III. 15B-E). Se ubican en los cordones, asociadas a una célula acompañante pequeña cuyo núcleo es ovalado (Figura III. 15C-E). Debido al gran tamaño de las células III se suelen ver porciones de las mismas en las cuales no se observa el núcleo (Figura III. 15B,E).

- Células IV, esféricas, pequeñas, cuyo diámetro se encuentra alrededor de los 10 μm . El núcleo se encuentra desplazado hacia un extremo de la célula y en el citoplasma se observan gránulos muy oscuros. Se las encuentra rodeadas por células I (Figura III. 15B).

- Células V, alargadas, más pequeñas que los dos tipos anteriores, el eje mayor tiene aproximadamente 10 μm , con núcleo ovalado excéntrico y citoplasma basófilo homogéneo en el que no se distinguen gránulos. La cromatina se dispone en cúmulos gruesos ubicados sobre todo en la periferia del núcleo y se distingue un nucleolo (Figura III. 15E). Se disponen solitarias o de a pares en la parte más externa de los cordones, rodeadas por tejido conectivo. Estas células se identificaron como fibroblastos del tejido conectivo asociado a los cordones que forman la glándula.

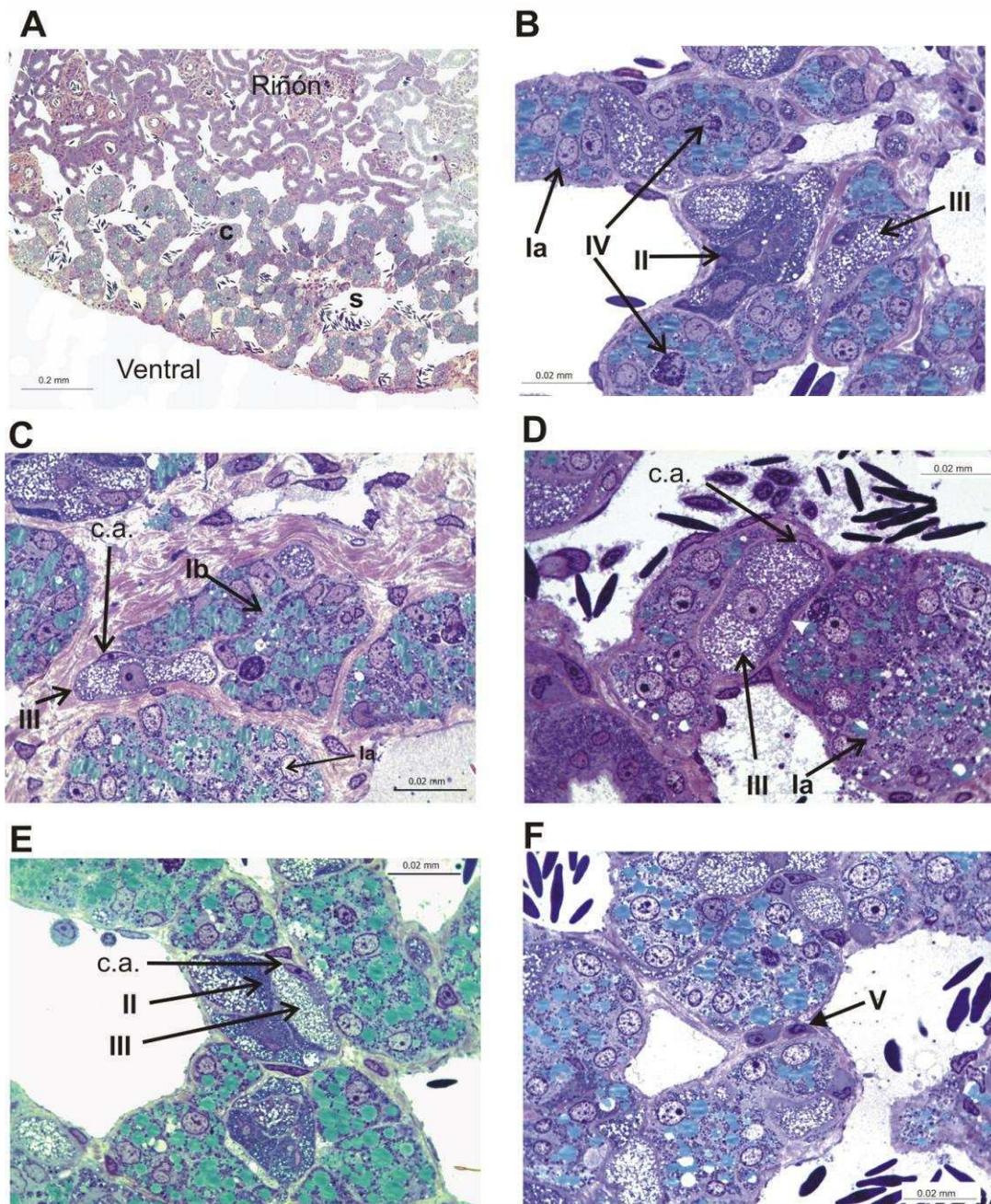


Figura III. 15. Detalle de los tipos celulares diferenciados en los cortes semifinos coloreados con azul de toluidina. Los paneles A-F muestran cordones de la interrenal con los tipos celulares descritos en III. Resultados. 6. Las flechas indican las células Ia, Ib, II, III, IV y V. En el panel A, la “c” muestra los cordones celulares y la “s” los capilares sinusoides. En los paneles C, D y F, “c.a.” señala el núcleo de una célula acompañante. En el panel D la cabeza de flecha blanca marca una banda muy coloreada en parte de la periferia de la célula III.

7. Caracterización ultraestructural de los tipos celulares por microscopía electrónica de transmisión (MET)

Con el objetivo de caracterizar con mayor detalle los tipos celulares diferenciados con las técnicas de histología clásica y de inmunohistoquímica, se analizaron cortes ultrafinos por MET. Con esta técnica se pudieron reconocer los mismos tipos celulares descritos en los cortes semifinos y además, caracterizar a nivel ultraestructural como se detalla a continuación.

- Células I. Se pudo observar que estas células, diferenciadas porque contienen gran cantidad de gotas de lípidos en su citoplasma, poseen numerosas mitocondrias con crestas tubulares (Figura III. 16, 17 y 18). El alto grado de empaquetamiento de dichas crestas sugiere que estas mitocondrias tienen, según la clasificación de Prince (2002), crestas de asociación tubular que se encuentran exclusivamente en algunas células esteroideogénicas. Además, en el citoplasma se observa una gran cantidad de túbulos y vesículas limitados por membrana que forman el retículo endoplásmico liso (REL) y un conjunto de cisternas aplanadas, también limitadas por membrana, que constituyen al aparato de Golgi (Figura III. 17). La gran cantidad de mitocondrias así como la presencia preponderante de un REL en el citoplasma es característica de las células esteroideogénicas. En estas organelas se encuentran las enzimas involucradas en la vía de síntesis de esteroides.

Al igual que en los cortes semifinos, se observaron dos tipos de células I diferentes, cuya variación radica en la forma del núcleo, la cromatina y el tamaño de las gotas lipídicas. A continuación se describen las diferencias entre estos tipos celulares, denominados células Ia y Ib.

Por un lado, las células Ia son esféricas o poligonales, de aproximadamente 18 μm , con gotas lipídicas grandes de hasta 5 μm de diámetro. Su núcleo es esférico y posee un contorno regular (Figura III. 16A). La cromatina es laxa en la zona central y forma pequeños cúmulos densos en contacto con la membrana nuclear (Figura III. 16A y 17). Se observa un nucleolo prominente de posición relativamente central (Figura III. 16A).

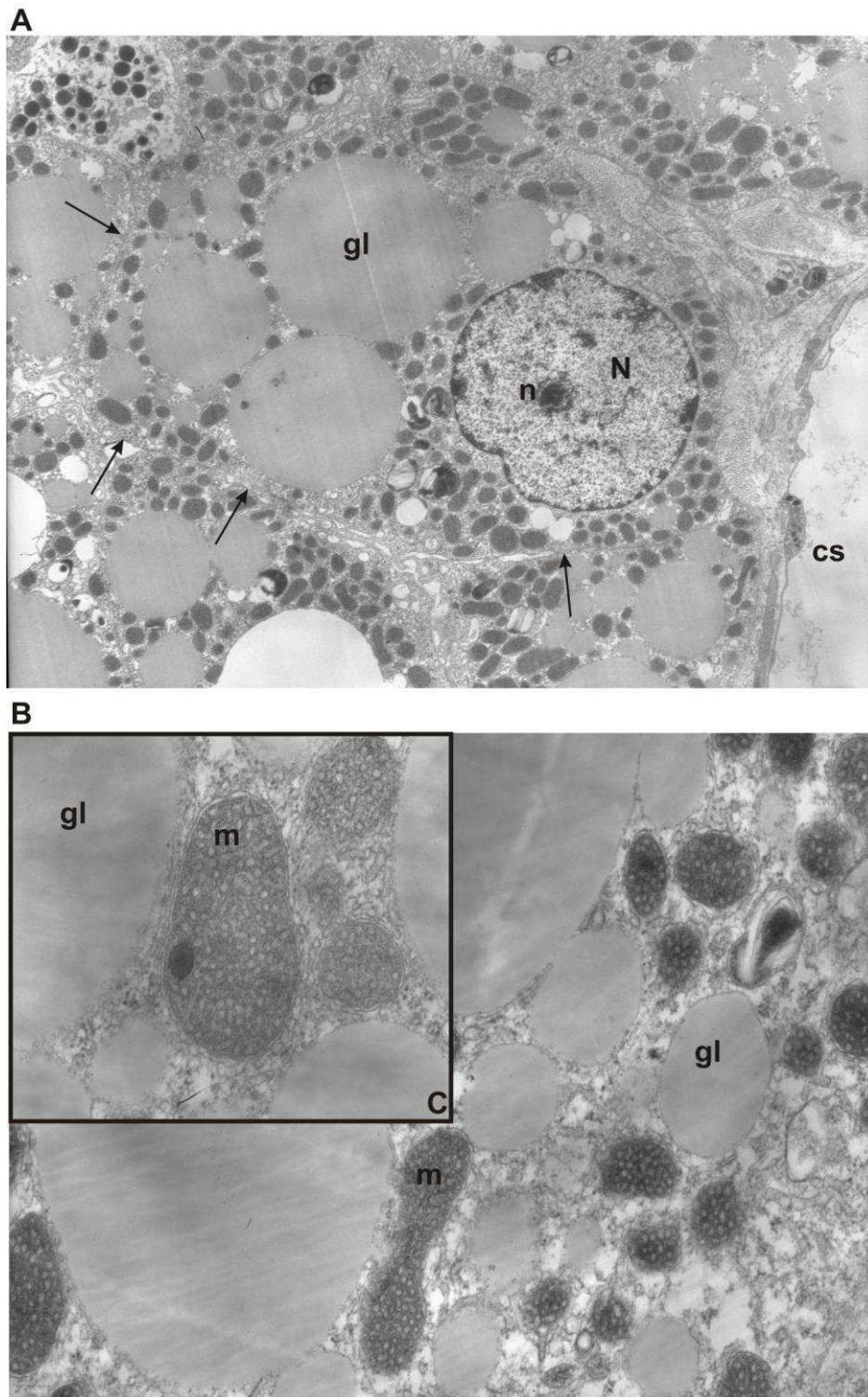


Figura III. 16. Micrografía electrónica de células Ia. La imagen **A** muestra una célula Ia rodeada por otras células del mismo tipo y cerca de un capilar sinusoide (4.000x). La imagen **B** es un detalle de las gotas lipídicas y de las mitocondrias presentes en el citoplasma de la célula esteroidogénica (18.500x). La imagen **C** es un detalle de una mitocondria en la cual se observan las crestas tubulares (35.000x). gl: gota de lípidos; N: núcleo; n: nucleolo; m: mitocondrias; cs: capilar sinusoide; flechas: límite intercelular.

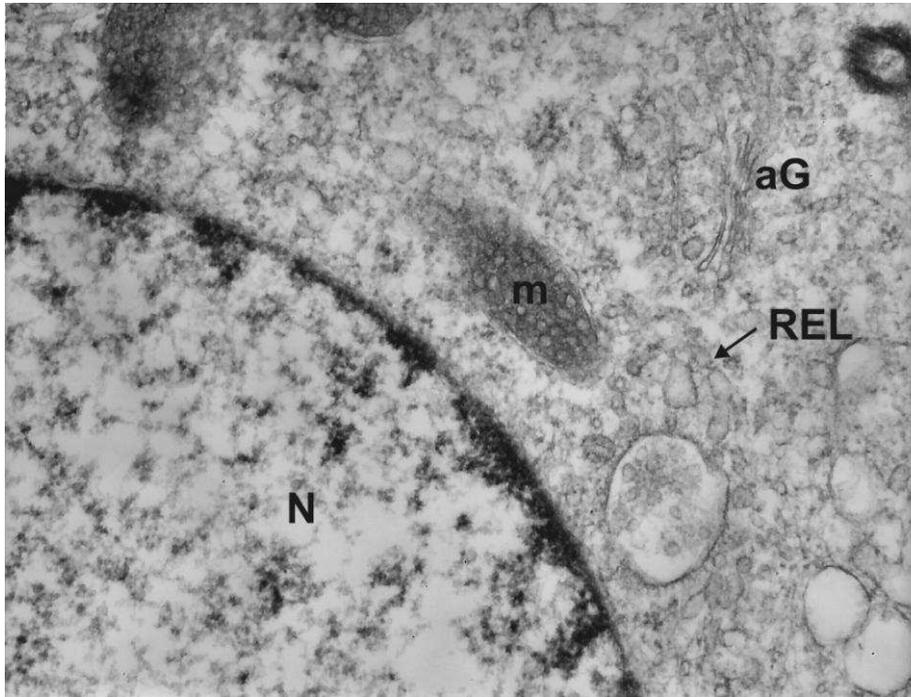


Figura III. 17. Detalle de células Ia. Se muestra el citoplasma de una célula Ia donde se observa el retículo endoplásmico liso (REL), el aparato de Golgi (aG), mitocondrias (m) y parte del núcleo (N). (35.000x).

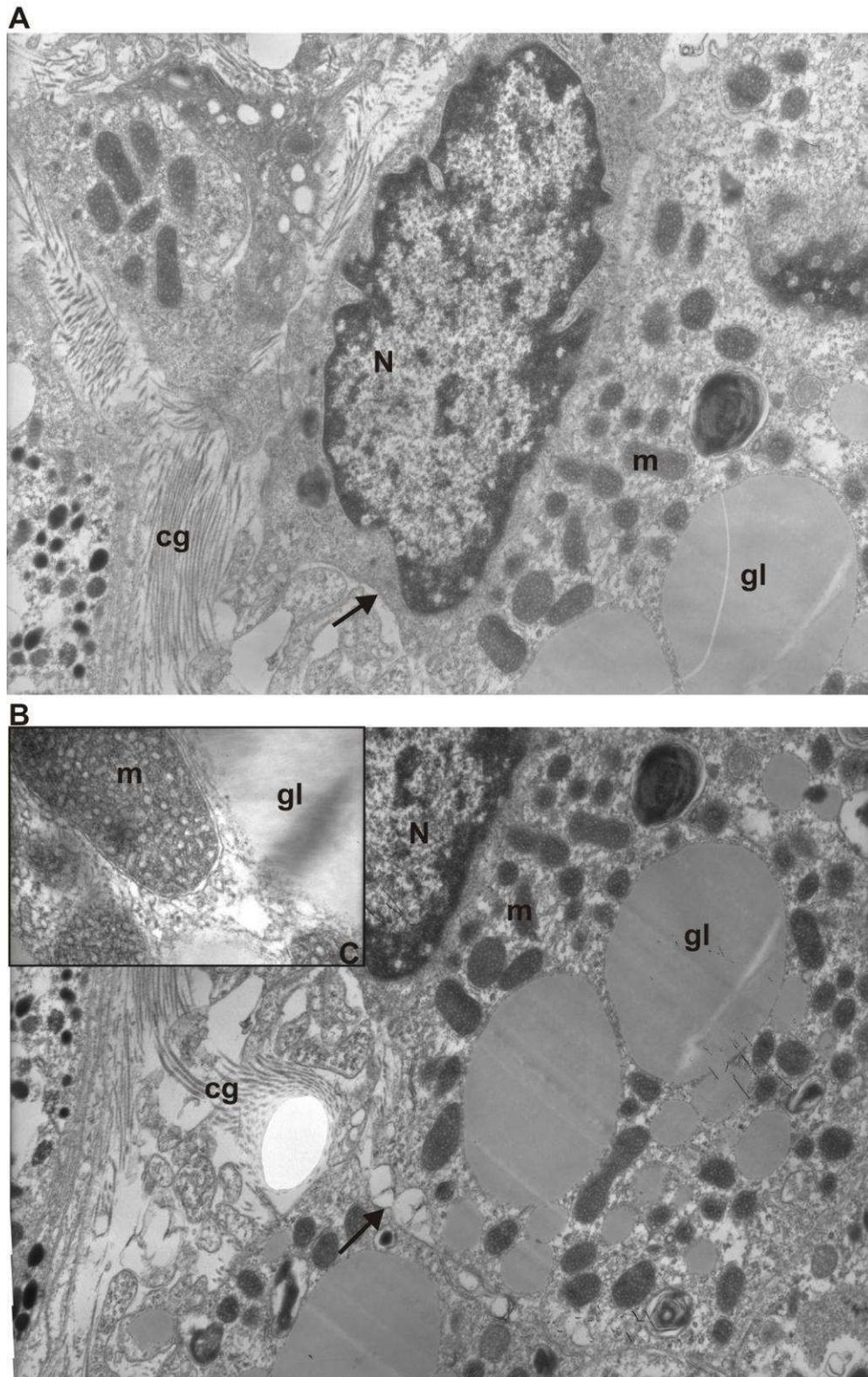


Figura III. 18. Micrografía electrónica de células Ib. Las imágenes **A** y **B** muestran porciones contiguas de una célula Ib (8.600x). La **C** es un detalle de las mitocondrias y del borde de una gota de lípidos (35.000x). gl: gota de lípidos; N: núcleo; m: mitocondrias; cg: colágeno en la matriz extracelular; flechas: límite intercelular.

Por otro lado las células Ib son de forma más irregular y con gotas lipídicas de tamaño variable pero más pequeñas que las del tipo Ia (Figura III. 18A,B). Se observó que las gotas de lípidos más grandes tienen un tamaño aproximado de 2 μm . Las mitocondrias son iguales a las de las células Ia (Figura III. 18C). A diferencia de las células Ia, el núcleo de estas células es ovalado y posee un contorno irregular. La cromatina es más densa que la de las células Ia y se encuentra aún más condensada en la zona periférica en contacto estrecho con la membrana nuclear (Figura III. 18A,B). Se observan cúmulos centrales más densos que podrían corresponder a la presencia de varios nucleolos (Figura III. 18A).

Otra diferencia llamativa entre ambos tipos celulares, Ia y Ib, fue la distancia entre las membranas plasmáticas de células contiguas. Mientras que en las células Ia los límites celulares se observaron en contacto estrecho, en las Ib los límites celulares se encontraron generalmente separados por un espacio intercelular mayor (Figura III. 16A y Figura III. 19A-C). No se diferenció el tipo de unión intercelular involucrado en cada caso.

Nuevamente, al igual que en los cortes semifinos y en la inmunohistoquímica de la enzima $3\beta\text{-HSD/I}$, se diferenciaron dos tipos de células esteroidogénicas en la glándula interrenal de la especie en estudio.

- Células II. Se diferenciaron por la presencia en su citoplasma de numerosos gránulos oscuros, altamente empaquetados (Figura III. 20A-C). Son células alargadas, de forma irregular y su tamaño no se pudo medir con exactitud dado que en los cortes ultrafinos no se encontró la célula completa. El núcleo es ovalado, la cromatina es laxa y no se distinguieron nucleolos (Figura III. 20A). Los gránulos tienen forma variable, un centro electrodensito con un halo más claro y miden aproximadamente 0,2 μm (Figura III. 20C). Estas células se encontraron asociadas a las células III que se describen a continuación.

- Células III. Se diferenciaron por tener gránulos dispersos y un citoplasma de aspecto “vacuolado” claro, con espacios grandes y vacíos (Figura III. 20A y 21A). Como fue descrito en la sección correspondiente a los cortes semifinos, estas células son alargadas, más grandes que las células II, aunque su tamaño exacto tampoco pudo aproximarse dado que en los cortes ultrafinos no se encontró la célula completa. El núcleo es esférico, posee un contorno levemente irregular y la cromatina es laxa (Figura III. 20A). No se pudo encontrar un corte a nivel del

nucleolo, pero se sospecha que, como se vio en el corte semifino, tiene un nucleolo prominente. Estas células se encontraron, al igual que en los cortes semifinos, en íntimo contacto con las células II y acompañadas por una célula pequeña con núcleo ovalado que fue llamada célula acompañante (Figura III. 20A). Como se puede observar en la Figura III. 21A, en algunos casos se vieron porciones de células II rodeando una célula III, como una banda más oscura en parte de la periferia de la célula. Los gránulos de estas células tienen un contenido osmiofílico de densidad variable, granular y son menos electrodensos que los de las células II. En algunos se observa que el material central se encuentra separado de la membrana que lo rodea por un espacio claro (Figura III. 21B). El tamaño de los gránulos es similar al de las células II.

Entre las células II y III se observó una estructura con forma de anillo que se reconoce como un nervio amielínico (Figura III. 20B). Por las características ultraestructurales de las células II y III se pudo reconocer que son células cromafines. Las características de los gránulos sugieren que las células II son productoras de noradrenalina y las III de adrenalina (Piezzi, 1967).

- Células IV. Se encontraron rodeadas por células I (Figura III. 22A). Tienen un tamaño aproximado de 9 μm , son ovaladas y el núcleo se encuentra desplazado hacia un extremo por la gran cantidad de gránulos presentes en el citoplasma. Los gránulos son heterogéneos en forma y electrodensidad y en algunos se observa un halo más claro y granular alrededor de un centro oscuro (Figura III. 22B). El tamaño de los mismos se encuentra entre 0,3 μm y 0,6 μm . Las características ultraestructurales de estas células así como su disposición en contacto con las células I sugieren que son células similares a las células de Stilling, también conocidas como células de verano (Kawamura, 1986).

Las células V no se describieron por MET dado que se diferenciaron en los cortes semifinos como fibroblastos del tejido conectivo asociado a la glándula.

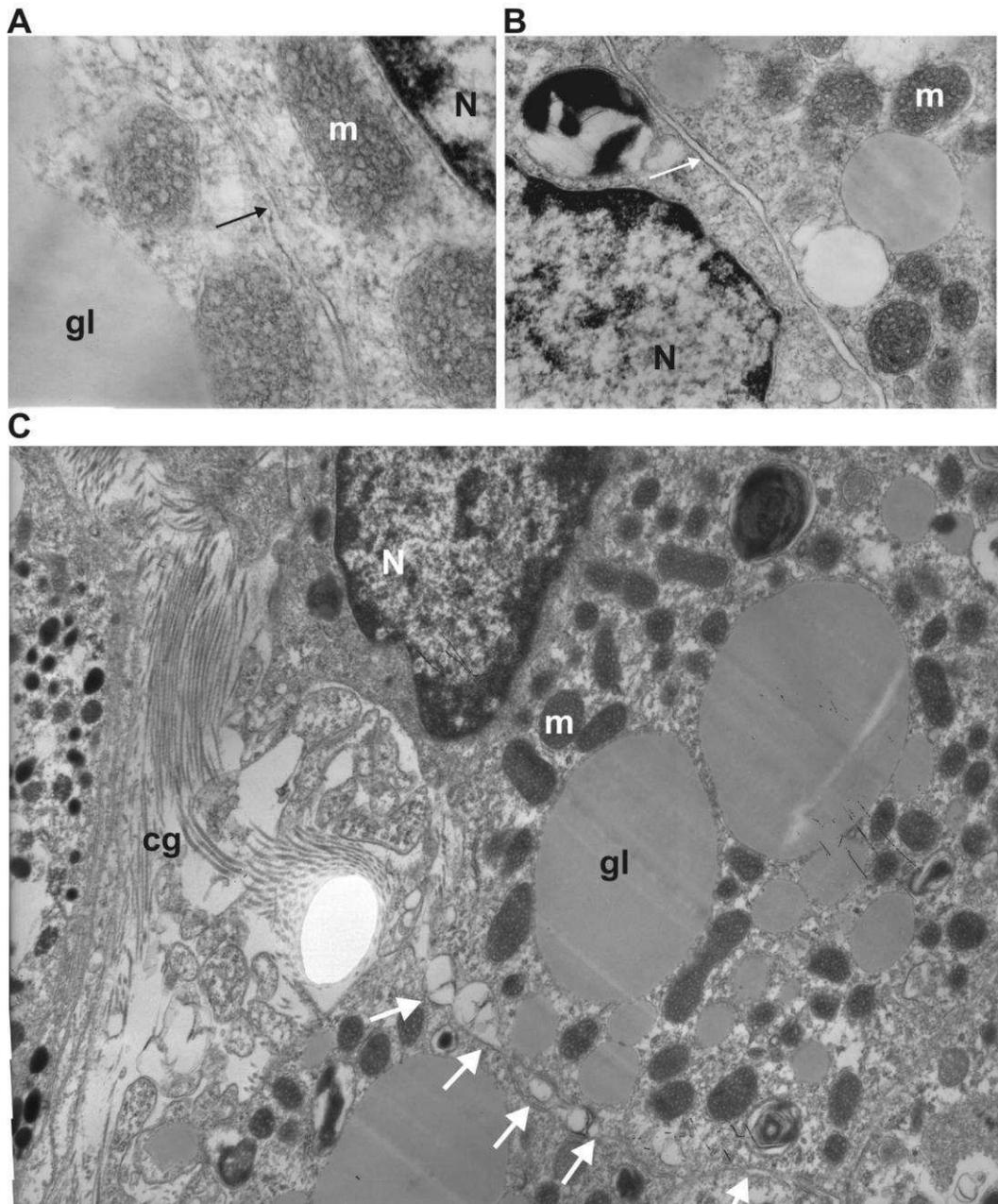


Figura III. 19. Detalle del contacto intercelular entre células Ia (panel A) y entre células Ib (paneles B y C). gl: gota de lípidos; N: núcleo; n: nucleolo; m: mitocondrias; cg: colágeno en la matriz extracelular; flechas: límite intercelular. **A:** 70.000x. **B:** 35.000x. **C:** 8.600x.

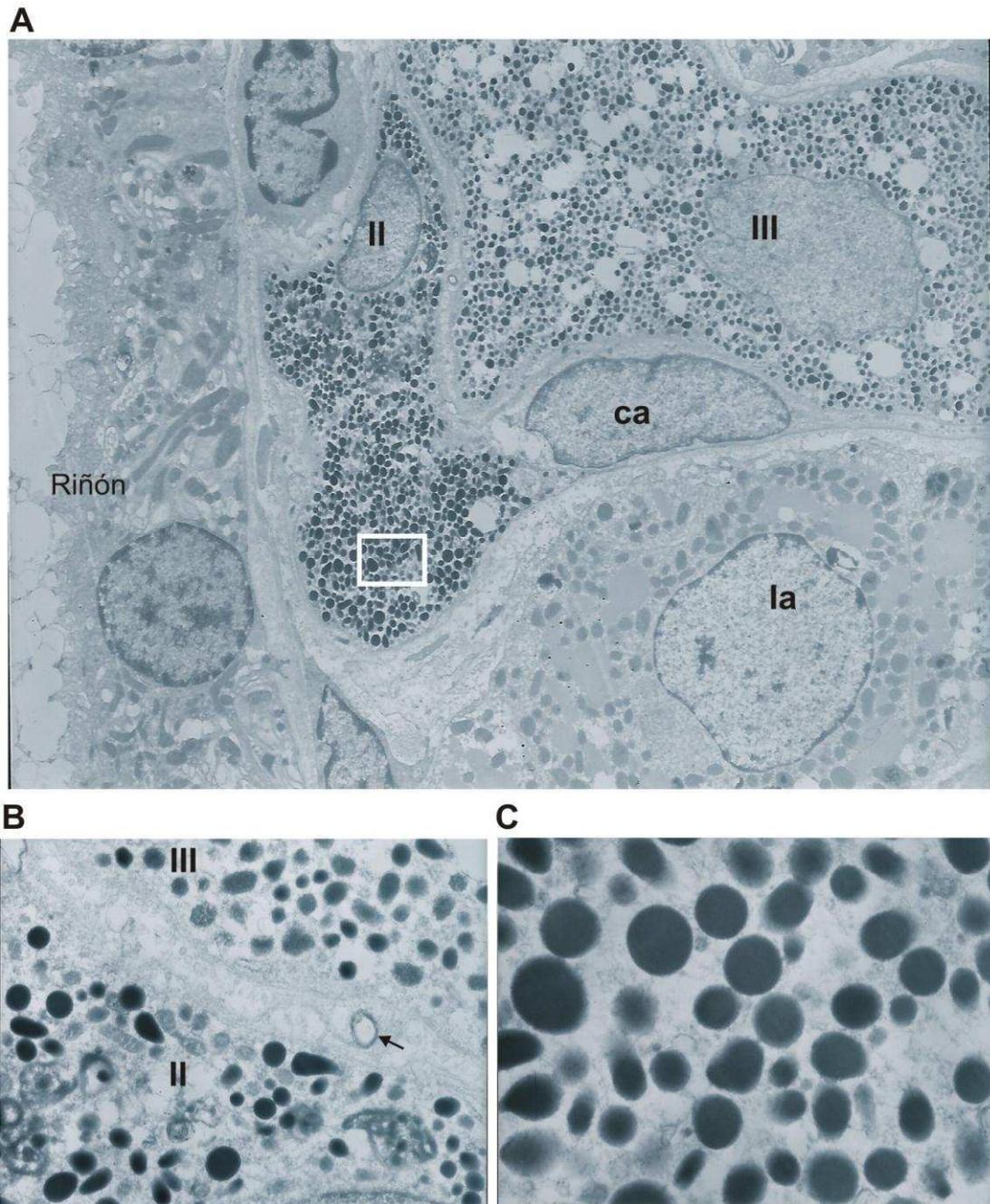


Figura III. 20. Micrografía electrónica de células II y III. La imagen **A** muestra una célula II en contacto con una célula III. Asociado a la célula III se observa el núcleo de una célula acompañante (ca, 4.000x). Puede observarse también una célula Ia. La imagen **B** es un detalle de la zona de contacto entre ambos tipos celulares, II y III (26.000x). La **C** es un detalle de los gránulos de la célula II marcados con un rectángulo en la imagen **A** (46.000x). El tipo celular se indica en el núcleo de cada célula, Ia, II, III y ca. La flecha indica un posible nervio entre las células II y III.

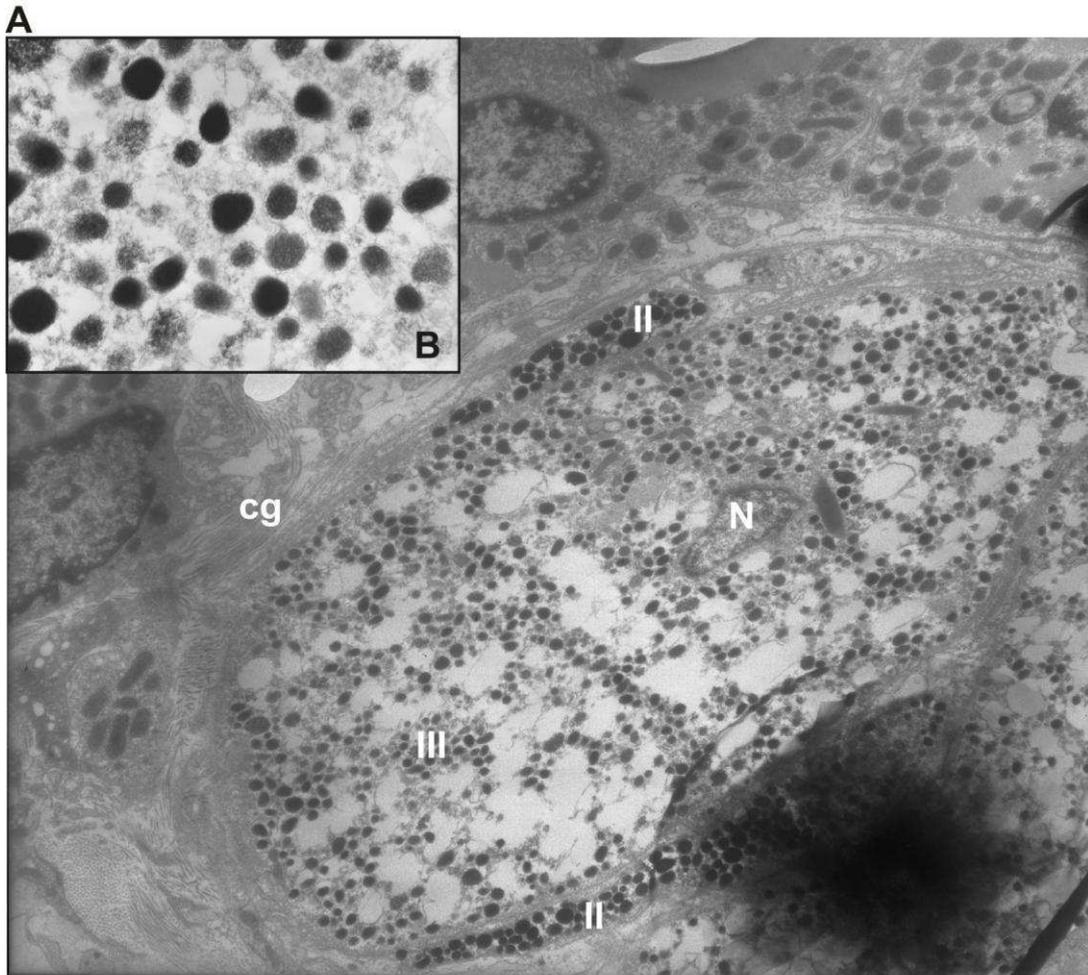


Figura III. 21. Micrografía electrónica de célula III. La imagen **A** muestra una célula III rodeada por porciones de una célula II. Esta última se observa como bandas oscuras en parte de la periferia de la III (4.000x). El detalle en **B** muestra los gránulos de la célula III (46.000x). La mancha negra en la parte inferior derecha de la micrografía **A** corresponde a un artefacto de técnica

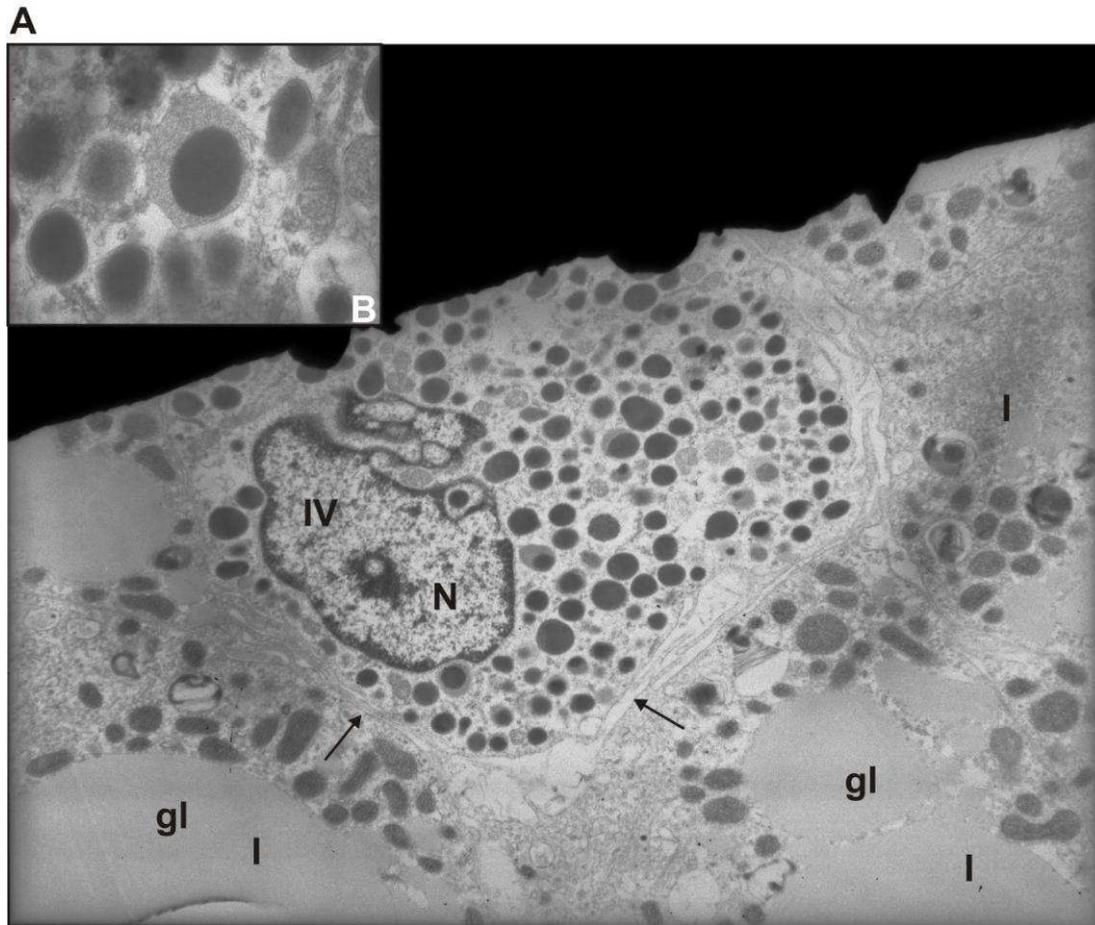


Figura III. 22. Micrografía electrónica de célula IV. La imagen **A** muestra una célula IV rodeada por células I en la parte inferior de la micrografía (6.000x). **B** es un detalle de los gránulos de la célula IV (46.000x). N: núcleo; gl: gota de lípidos; la flecha indica el límite celular de la célula IV en contacto con las células I. La zona superior de la imagen **A** se observa negra porque la célula se encontró en el borde de la grilla.

III | Discusión

1. Regulación de la síntesis de corticoides en la glándula interrenal

Como se mencionó en la Introducción, en los anfibios, al igual que en otros grupos de vertebrados, la actividad de la glándula interrenal se modifica tanto por variaciones estacionales como en respuesta a situaciones de estrés (Hanke y Weber, 1964; Romero 2002). Dado que los andrógenos también exhiben variaciones estacionales, que en esta especie son inversas a las de los GCs, podría pensarse en la existencia de una marcada interrelación entre ambas hormonas. En la segunda parte de esta tesis se estudió el rol de los andrógenos en la regulación de la síntesis de corticosterona.

Diversos estudios han examinado la interacción entre los GCs y el eje gonadal en los vertebrados. Mientras que los GCs suelen inhibir la liberación de hormonas a nivel gonadal (Sapolsky y col., 2000), como ocurre en *R. arenarum*, en algunas aves el tratamiento con testosterona aumenta los niveles plasmáticos de GCs (e.g., Ketterson y col., 1991; Schoech y col., 1999). Por otro lado, en *R. arenarum* la testosterona plasmática tiene un patrón estacional opuesto al de la corticosterona (Denari y Ceballos, 2005) y en otro anuro, *E. hexadactylus*, el tratamiento con testosterona produce la regresión de la glándula interrenal (Kasinathan y Basu, 1972). Tomados en forma conjunta, estos antecedentes sugieren una interacción compleja entre los ejes adrenal y gonadal y se postula que los andrógenos tendrían un rol regulador de los cambios estacionales en la concentración de GCs. A partir de esto evaluamos si en la especie en estudio en esta tesis los andrógenos inhiben la síntesis de corticosterona y si esa inhibición se obtiene con concentraciones de andrógenos en el orden de los valores fisiológicos.

Como se mencionara en III. Resultados, el efecto de testosterona sobre la síntesis de corticosterona se evaluó *in vitro* a través de dos esquemas experimentales. El primer esquema, consistió en incubar fragmentos de las interrenales de cada animal durante 24 h con medio solo o con el agregado de testosterona en distintas concentraciones, para luego evaluar la liberación de corticosterona a un medio fresco sin agregados. La Figura III. 2B muestra que testosterona 100 nM disminuye

significativamente la liberación de corticosterona al medio de incubación cuando se lo compara con el efecto del tratamiento con testosterona 10 nM.

Entonces, puede concluirse que una concentración de testosterona cercana a la descrita durante el período prerreproductivo, 100 nM, disminuye la síntesis de corticosterona respecto del tratamiento con una concentración más baja, 10 nM, concentración semejante a la descrita para la estación reproductiva de *R. arenarum* (Denari y Ceballos, 2005; Fernández Solari y col., 2002). Si bien no se estudió el mecanismo por el cual los andrógenos promueven dicha disminución, ni que pasos de la vía esteroidogénica se encontraban afectados, la enzima 3 β -HSD/I es una fuerte candidata ya que se ha observado que la testosterona disminuye no sólo su actividad sino también la síntesis de la proteína y el ARNm en la glándula adrenal del ratón, tanto en experimentos in vivo como in vitro (Perry y Stalvey, 1992; Stalvey, 2002). Además, existen algunos antecedentes en *R. arenarum* que avalan aún más la participación de dicha enzima en la regulación de la síntesis de corticosterona. Pozzi y col. (2002) evaluaron el efecto in vivo del Na⁺ y observaron que el tratamiento con una concentración alta del ión disminuye la concentración plasmática de aldosterona pero no modifica la de corticosterona. Además, describieron que la reducción de los niveles de aldosterona luego del tratamiento con Na⁺ se produce por una disminución de la actividad de la enzima 3 β -HSD/I mitocondrial y que, en cambio, la 3 β -HSD/I microsomal no se modifica. Previamente, se había demostrado que la enzima de localización mitocondrial cataliza preferentemente la síntesis de aldosterona en tanto que la microsomal, la de glucocorticoides (Pozzi y col., 1996). En consecuencia, sería importante evaluar en un futuro si en *R. arenarum* los andrógenos reducen la síntesis de corticosterona a través de la inhibición de la enzima 3 β -HSD/I microsomal, lo cual sugeriría dos vías de regulación diferentes para la síntesis de aldosterona y de corticosterona, una a través de la enzima de localización mitocondrial y la otra a través de la enzima de localización microsomal, respectivamente.

Cuando se analiza el gráfico de perfiles que se mostró en la Figura III. 2A puede verse claramente que los animales responden de manera diferente frente a los distintos tratamientos. Esto llevó a proponer un segundo esquema experimental que consistió en la preincubación de los fragmentos de interrenal durante 24 h con medio

solo y la aplicación posterior del tratamiento durante otras 24 h. El objetivo de estos experimentos fue el de establecer si la variabilidad encontrada en los controles se debe a que las interrenales provienen de animales en condiciones fisiológicas diferentes, diferencias que podrían perderse por acción de los andrógenos *in vitro*. Un aspecto fundamental de este esquema experimental radica en que el tejido se preincuba durante 24 h en medio sin agregado de ninguna hormona con el objeto de estabilizarlo y que se “desprenda” de las influencias del medio interno de los animales. En este caso también se evaluó la liberación de corticosterona a un medio fresco sin agregados. Luego de 48 h totales de incubación, la síntesis de corticosterona disminuyó significativamente tanto en el control como en los tratados. Sin embargo, los tratamientos no produjeron diferencias significativas en la síntesis del glucocorticoide. Un problema adicional en la interpretación de estos resultados surge del hecho de que la actividad de la glándula interrenal disminuyó considerablemente con lo cual la falta de diferencias significativas podría deberse al agotamiento generalizado del órgano, agotamiento independiente del tratamiento.

Los resultados mostrados hasta aquí sugieren que en *R. arenarum*, durante el período prerreproductivo, los niveles plasmáticos elevados de testosterona podrían inhibir la síntesis de corticosterona en la glándula interrenal y que durante el período reproductivo, los niveles bajos de andrógenos favorecerían la síntesis del glucocorticoide. Este modelo junto con el efecto de los GCs sobre la síntesis de andrógenos discutido en el capítulo II plantea la posibilidad de una interregulación entre la glándula interrenal y el testículo que sería relativamente independiente del eje hipotálamo-hipofisario.

Sin embargo, es claro que para comprender con mayor profundidad la regulación estacional de la síntesis de GCs se deben considerar otros factores, entre ellos las variaciones de los niveles de ACTH, que en los anuros están regulados negativamente tanto por aldosterona como por corticosterona (Hanke y Weber, 1964; Jorgensen, 1968; Laub y col., 1975). Además, se debe tener en cuenta el efecto de diversas hormonas producidas por las células cromafines que en los anuros regulan paracrinamente las síntesis de ambos corticoides (Kloas y Hanke, 1990, 1992; Morra y col., 1990; Lesouhaitier y col., 1995; Süren, 1999).

En *R. arenarum*, algunos datos preliminares sugieren que ni la masa ni el aspecto de la glándula interrenal varían de manera radical a lo largo del año como

ocurre en algunas aves con variaciones estacionales de GCs (e.g., Amirat y col., 1980; Sheppard, 1968). Esta diferencia podría deberse a que en los anfibios los niveles de aldosterona son más altos que en los amniotas e inclusive durante algunos períodos son mayores que los niveles de corticosterona, con lo cual la glándula es activa durante todo el año (Dupont y col., 1976; Pozzi y col., 2002). Como se discutirá a continuación, se desconoce en la actualidad cómo es la regulación diferencial de la síntesis de ambos esteroides en los anfibios y si la síntesis ocurre en tipos celulares diferentes.

2. Estudio histo-fisiológico de la regionalización y actividad de la glándula interrenal

Como fue mencionado anteriormente, uno de los grandes interrogantes respecto de la fisiología de la glándula interrenal en los anuros es si los principales productos de la glándula, aldosterona y corticosterona, son sintetizados por el mismo tipo celular. Más aún, existen contradicciones respecto de la regulación diferencial de la síntesis de ambos esteroides. En los experimentos que evaluaron el efecto de los andrógenos en la síntesis de corticosterona se observó que había mucha variación en la síntesis del glucocorticoide luego de 24 h de incubación. Dichas diferencias podrían deberse o bien al estado fisiológico del animal del cual se extrajeron las glándulas, lo cual fue planteado en el experimento que involucró 48 h totales de incubación, o a variaciones en la regionalización de las células productoras de corticosterona en la glándula interrenal. A partir de este interrogante, los siguientes objetivos fueron analizar que tipos celulares se pueden encontrar en la glándula interrenal de *R. arenarum*, focalizándonos principalmente en las células esteroidogénicas, analizar su regionalización antero-posterior y relacionar lo observado histológicamente con las variaciones antero-posteriores de la síntesis de corticosterona.

A partir de los estudios histológicos de la glándula con las distintas técnicas se pudieron reconocer los tipos celulares que se resumen en la Tabla III. 1, que se muestra a continuación.

Tabla III. 1

		Técnicas						
Tric. Masson	IHQ 3β-HSD/I	IHT TH	PAS	Semifino	MET	Identificación		
A	(+)	(-)	(-)	Ia	Ia	Célula esteroideogénica acidófila		
B	(+)	(-)	(-)	Ib	Ib	Célula esteroideogénica basófila		
C	(-)	(+)	(-)	II	II	Célula cromafín productora de noradrenalina (¿?)		
				III	III	Célula cromafín productora de adrenalina (¿?)		
No se diferenciaron	No se diferenciaron	No se diferenciaron	(+)	IV	IV	Célula de Stilling		
Células de tejido conectivo	Células de tejido conectivo	Células de tejido conectivo	(-)	V	No se observó	Fibroblastos del tejido conectivo asociado		

Tipos celulares

Las iniciales en la Tabla III. 1 corresponden a:
 Tric. Masson: tricrómico de Masson modificado.
 IHQ 3β-HSD/I: inmunohistoquímica de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenas/isomerasa.
 IHQ TH: inmunohistoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa.
 PAS: reacción del ácido periódico- reactivo de Schiff.
 MET: microscopía electrónica de transmisión.

El análisis integrado de los datos obtenidos con las distintas técnicas histológicas utilizadas corroboró la presencia de dos tipos de células esteroideogénicas en la glándula interrenal de *R. arenarum*. Además, se comprobó que, al igual que en otros anuros, el parénquima de la glándula también está formado por células cromafines productoras de adrenalina y noradrenalina y por células de Stilling.

Las células A, diferenciadas con el tricrómico de Masson como acidófilas y además inmunoreactivas para la enzima 3β -HSD/I, son las células Ia descritas en los cortes semifinos y ultrafinos. Estas células se caracterizan morfológicamente por: la presencia de gotas lipídicas en su citoplasma, por el núcleo esférico eucromático con borde regular y por la presencia de un nucleolo bien desarrollado.

Las células B, diferenciadas como basófilas en el tricrómico de Masson e inmunoreactivas para la enzima 3β -HSD/I, son las llamadas Ib en la descripción de los cortes semifinos y ultrafinos dado que: ambas son esteroideogénicas, las B porque son inmunoreactivas para la enzima 3β -HSD/I y las Ib porque tienen gotas de lípidos en su citoplasma y, además, porque ambas tienen el núcleo ovalado y con borde irregular y la cromatina es más densa que la de las A y Ia. En el tricrómico de Masson se observó que las células B tienen un citoplasma con gránulos basófilos altamente empaquetados y en los cortes semifinos coloreados con azul de toluidina las células Ib tienen en su citoplasma gránulos azules más empaquetados que en las células Ia, lo cual les confiere el aspecto de células más oscuras. El azul de toluidina es un colorante básico con gran afinidad por diversos componentes celulares, entre ellos, por los lípidos, las membranas celulares y las proteínas de membrana (Usacheva y col., 2001, 2003). Por lo tanto, es altamente probable que los gránulos azules que se ven en las células Ib correspondan a la gran cantidad de mitocondrias presentes en el citoplasma, mitocondrias que fueran caracterizadas por MET. Se desconoce a qué se debe la basofilia citoplasmática en las células B dado que las mitocondrias son estructuras acidófilas que no se colorean con la hematoxilina. En un primer momento se pensó que la basofilia era debida a la presencia de una abundante cantidad de retículo endoplásmico rugoso (REG), pero esto no se observó en la MET de las células Ib y, además, la presencia de REG no es característica de las células esteroideogénicas que sí poseen abundante cantidad de retículo endoplásmico liso (REL).

Piezzi y Burgos (1968) ya habían descripto que la glándula interrenal de *R. arenarum*, al igual que las otras especies de anuros estudiadas, está organizada en cordones anastomosados. Sin embargo, en esta tesis se pudo demostrar que en los cortes realizados con parafina, las células esteroideogénicas acidófilas se organizan en cordones anastomosados y en cambio las basófilas se suelen aglomerar en la zona central formando grandes grupos oscuros, sin una organización definida. Es llamativo que ni en los cortes realizados con criostato ni en los cortes semifinos, que fueron realizados en la zona anterior de la interrenal, se evidenció esta pérdida de la estructura en el centro de la glándula. De hecho, en los cortes semifinos se observó que toda la glándula está organizada en cordones anastomosados de entre 2 y 4 células de espesor formados mayoritariamente por células con lípidos del tipo Ia y Ib. Estas observaciones nos sugieren que en los cortes con parafina la pérdida de los lípidos durante el preparado de la pieza produce que las células esteroideogénicas basófilas pierdan su organización en cordones. Pero entonces, ¿Por qué las células acidófilas no pierden su estructura como las basófilas? En las imágenes de MET se pudo observar que los límites celulares de las células Ia se encuentran más cercanos y que, en cambio, entre las células Ib el espacio intercelular es mayor. Aunque no se reconocieron los tipos de uniones intercelulares involucrados en cada caso, es probable que la unión entre las células Ib sea “más laxa” y por lo tanto la preparación de la pieza para su inclusión en parafina haga que las células pierdan la organización en cordones. Hanke y Weber (1965) observaron algo similar en *R. temporaria* y describieron que las células esteroideogénicas más periféricas estaban organizadas de manera más compacta que las centrales.

¿Son estas células esteroideogénicas diferentes tipos celulares productores de distintas hormonas, por ejemplo gluco y mineralocorticoides o son distintos estados funcionales del mismo tipo celular? En *P. perezi* se describieron a nivel ultraestructural distintos estados funcionales de las células esteroideogénicas a lo largo del año y aunque los autores no lo mencionan, en las micrográficas publicadas se observa que en las células que se describen como “activas” el espacio intercelular es llamativamente mayor al espacio intercelular entre las células en condición “inactiva” (Álvarez, 1992). Además, Varma (1977) menciona que en *L. catesbeianus* la membrana plasmática de las células esteroideogénicas activas se encuentra plegada y que, en cambio, la de las menos activas es lisa. Estas observaciones sugieren que

las diferencias descriptas en esta tesis en cuanto a las células esteroideogénicas halladas en la interrenal de *R. arenarum* podrían ser debidas a la presencia de dos estados biosintéticos diferentes del mismo tipo celular. Sin embargo, como se discute más adelante y a diferencia de lo descrito para los modelos mencionados, en *R. arenarum* las células que tienen la membrana plasmática plegada y que se encuentran más separadas unas de las otras serían las más inactivas, por lo menos en cuanto a la síntesis de corticosterona.

Si bien Piezzi y Burgos (1968) estudiaron histológicamente la glándula interrenal de *R. arenarum*, no mostraron diferentes tipos de células esteroideogénicas y sólo describen que las células productoras de esteroides varían estacionalmente y que dichas variaciones están relacionadas con la cantidad de lípidos, la actividad de la enzima 3β -HSD/I medida por histoquímica, el desarrollo del REL, el aspecto de la cromatina y la densidad de la matriz mitocondrial. Durante el invierno, en comparación con el verano, las células tienen mayor cantidad de lípidos, menor actividad de la enzima 3β -HSD/I, un REL menos desarrollado, mitocondrias de menor electrodensidad y según los autores, aunque no se evidencia en las micrografías, un núcleo con cromatina menos voluminosa. En dicho trabajo se sugiere que estas características corresponderían a una glándula menos activa durante el invierno, lo cual coincide con resultados de nuestro laboratorio que mostraron que durante el invierno tanto los niveles plasmáticos de corticosterona como de aldosterona son menores que durante el verano (Denari y Ceballos, 2005; Pozzi y col., 2002). Por otra parte, la actividad de la enzima 3β -HSD/I medida en términos de transformación de sustrato en producto también fue menor durante el invierno (Pozzi y col., 1996).

A diferencia de los resultados obtenidos por Piezzi y Burgos (1968), las observaciones realizadas en esta tesis mostraron que los dos tipos de células esteroideogénicas descriptas, las acidófilas y las basófilas, coexisten tanto durante el período reproductivo, cuando los GCs plasmáticos aumentan, como durante el período no reproductivo, cuando los GCs disminuyen.

Con respecto a los otros tipos celulares encontrados en la glándula interrenal, los productores de catecolaminas, se utilizó como herramienta importante para su caracterización la presencia de la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, la TH así como las características morfológicas observadas en la MET. La Tabla III. 1

resume los dos tipos de células cromafines diferenciados en la interrenal de *R. arenarum*. Hace varios años, Piezzi (1965, 1967) describió también dos tipos de células cromafines en la glándula interrenal del sapo, uno de los cuales sintetizaría mayormente adrenalina en tanto que el otro mayormente noradrenalina. En esta tesis, ambos tipos de células cromafines se diferenciaron en base a las características de los gránulos citoplasmáticos descritos por dicho autor, características que coinciden con lo observado en las células cromafines de otros vertebrados (Geneser, 2000; Wassermann y Tramezzani, 1963; Wright y Chester Jones, 1955; Yoakim y Grizzle, 1980). Además, se observaron unas células pequeñas asociadas a las cromafines productoras de adrenalina que se denominaron células acompañantes. Se desconoce la función de estas últimas y a nuestro conocimiento no han sido descritas previamente ni en la interrenal de los anuros ni en la adrenal de otros vertebrados.

Por otra parte, también se han encontrado células con inmunomarca positiva para la enzima TH en los ganglios paravertebrales. En este sentido Piezzi y Rodríguez Echandia (1968) ya habían descrito células cromafines en el ganglio simpático pararenal de *R. arenarum*.

Además, y a diferencia de lo observado por Piezzi y Burgos (1968), en esta tesis se demostró la presencia de células aisladas, con gránulos PAS positivos, núcleo excéntrico, rodeadas por grupos de células esteroidogénicas. Estas características sugieren que serían las células de Stilling o de verano previamente descritas en otros anuros (Kawamura, 1986; Lesouhaitier y col., 1996; Moorhouse, 1963; Sottovia-Fihlo, 1974). La diferencia entre lo observado por Piezzi y Burgos (1968) y esta tesis puede deberse a que los primeros autores sólo analizaron glándulas interrenales durante el período no reproductivo y quizás la presencia de células de Stilling en la glándula varíe estacionalmente. La función de este tipo celular en la interrenal de los anuros es incierta. Algunos autores sugieren que serían células similares a los mastocitos (Kawamura, 1986; Moorhouse, 1963; Sottovia-Fihlo, 1974) y que dada su cercanía con las células esteroidogénicas podrían regular de manera paracrina la síntesis de esteroides (Lesouhaitier y col., 1996).

El análisis de la organización antero-posterior de los tipos celulares permitió establecer que la proporción de células basófilas/células acidófilas decrece desde la zona anterior hacia la posterior debido al aumento de la cantidad de células acidófilas

y a la disminución de los “parches” de células basófilas (ver Figura III. 14). Lo sorprendente de este patrón es que correlaciona con la síntesis de corticosterona determinada in vitro en los experimentos cuyos resultados se mostraron en la Figura III. 5. En dichos experimentos se observó que la secreción de corticosterona al medio de incubación es mayor en la zona posterior y menor en la región anterior. Es decir, que la cantidad de células basófilas parece ser inversamente proporcional a la capacidad de síntesis del GC en tanto que la proporción de células acidófilas correlaciona positivamente con la síntesis de corticosterona. Lamentablemente, estos resultados no resuelven el dilema de si realmente se trata de dos tipos celulares distintos o bien de dos estados biosintéticos diferentes del mismo tipo celular, dado que el aumento de la liberación de corticosterona de anterior a posterior puede deberse o bien a que las células basófilas sintetizan mineralocorticoides o a que son menos activas que las acidófilas. Para resolver esta disyuntiva se debería medir la liberación de aldosterona in vitro de anterior a posterior y ver si la misma disminuye o aumenta al igual que el GC. Hasta donde nosotros sabemos, esta es la primera vez que se describe una regionalización antero-posterior de distintos tipos de células esteroidogénicas en los anuros. Hanke y Weber (1965) habían observado que en *R. temporaria* la cantidad de células cromafines decrece desde la zona craneal hacia la zona caudal, pero a nuestro entender la identificación de las células cromafines en este trabajo es dudosa y lo que los autores reconocen como células cromafines basófilas podrían ser las células esteroidogénicas basófilas. La implicancia fisiológica de la organización antero-posterior de las células esteroidogénicas se desconoce pero podría relacionarse con una variación antero-posterior de la inervación de la glándula dado que la interrenal de los anuros está inervada por múltiples fibras provenientes de distinto origen (Lesouhaitier y col., 1995).

Respecto del grado de actividad de ambos tipos de células esteroidogénicas, se deben considerar varios parámetros. Uno de ellos es el tamaño del núcleo. Süren (1999) y Troyer (1968) postulan que este factor sería el más importante para evaluar el estado de actividad de una célula y que si el núcleo es más grande entonces la célula es más activa. En este sentido, las células acidófilas serían más activas que las basófilas. Por otro lado, la presencia de eucromatina y de un nucleolo bien definido en contraposición a la presencia de heterocromatina sería otra característica de una célula activa y las células acidófilas tienen una cromatina más laxa y un nucleolo

más desarrollado. Particularmente en las células esteroideogénicas el tamaño de las gotas lipídicas, su osmiofilia y su grado de coalescencia así como la densidad de la matriz mitocondrial y el desarrollo del REL serían indicadores de actividad celular (Álvarez, 1992; Capaldo y col., 2004a, b, c, 2006; Gay y col., 2008; Hanke y Weber, 1965; Süren 1999). De todos estos parámetros el único que difirió entre los dos tipos celulares fue el tamaño de las gotas lipídicas, que en las células acidófilas tiende a ser mayor que en las basófilas. Las evidencias respecto de si una célula esteroideogénica con gotas lipídicas grandes es más o menos activa son contrapuestas. Por un lado, hay trabajos que plantean que la presencia de gotas lipídicas grandes está correlacionada con una mayor actividad celular (e.g.: Álvarez, 1992; Capaldo y col., 2004c, 2006; Süren 1999) en cambio otros autores plantean que está asociada a células con menor actividad (Capaldo y col., 2004a, b, c, 2008). Las diferencias encontradas en la literatura tendrían que ver, muchas veces, con la época del año en la cual se realizan los estudios.

En el caso de *R. arenarum*, ambos tipos de células esteroideogénicas muestran señales de actividad alta. Por un lado, tienen gotas lipídicas osmiofílicas en las imágenes de MET y bien verdes en los cortes semifinos coloreado con azul de toluidina, por otro, ambas tienen un REL desarrollado y abundantes mitocondrias con crestas tubulares. Por lo tanto, la única diferencia que sugiere que las células basófilas son menos activas es que el núcleo tiene menor tamaño y que la cromatina es más densa. Por otro lado, los dos tipos celulares encontrados podrían sugerir que la corticosterona y la aldosterona son secretadas por células diferentes.

Como se comentó en la Introducción, solamente un trabajo propone que en los anuros la corticosterona y la aldosterona es sintetizada por distintos tipos celulares (Varma, 1977). Este trabajo, realizado en *L. catesbeianus*, muestra a nivel ultraestructural que en la glándula interrenal hay una población de células activas y otra de inactivas y que la hiponatremia induce en los animales adultos un aumento de células activas con mitocondrias de crestas lamelares, características de las células de la zona glomerulosa de la adrenal de los mamíferos que sintetizan aldosterona. Los autores concluyen que estas células serían las que sintetizan aldosterona y que en cambio, las células con mitocondrias de crestas vesiculares sintetizarían corticosterona. En esta tesis no se han observado mitocondrias con crestas lamelares en ninguno de los tipos celulares observados. Sin embargo, se debe considerar que

Varma (1977) observó este tipo de células en los animales privados de Na^+ , lo cual sugiere que podrían ser células que cambian su vía biosintética frente a la falta de Na^+ y que por eso en los controles casi no se observan.

Varios autores describieron que la glándula interrenal de los anuros posee más de un tipo de célula esteroideogénica (Álvarez, 1992; Hanke y Weber, 1965; Moorhouse, 1963; Süren, 1999; Varma, 1977). En particular, Hanke y Weber (1965) y Süren (1999) observaron que las células que se ubican en la zona periférica tienen características histológicas que sugieren que son más activas que las que se encuentran en la zona central. En esta tesis se propone que en otras especies, como *R. arenarum*, existe también cierto grado de regionalización antero-posterior de los tipos de células esteroideogénicas. Se desconoce aún si las células esteroideogénicas basófilas son células menos activas o que sintetizan aldosterona. Es de fundamental importancia dilucidar esta diferenciación morfológica para comprender en profundidad la regulación del funcionamiento de la glándula interrenal en los anuros.

Una posibilidad para investigar dicho interrogante sería evaluar, por inmunohistoquímica, la presencia de la enzima aldosterona sintetasa de localización mitocondrial que cataliza los últimos pasos de la vía de síntesis de aldosterona (Nonaka y col., 1995). Sin embargo, en la rana *L. catesbeianus* dicha enzima se encuentra en todas las células esteroideogénicas de la interrenal y los autores proponen que estaría involucrada tanto en la vía de síntesis de corticosterona como de aldosterona (Nonaka y col., 1995). Por lo tanto, el estudio por inmunohistoquímica de la aldosterona sintetasa no discriminaría distintos tipos celulares.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

IV | Conclusiones

Teniendo en cuenta los trabajos previos realizados en *R. arenarum* y los diversos antecedentes de estudios endocrinológicos en distintos grupos de vertebrados, al principio de esta tesis se postularon diversas hipótesis. A continuación se enumeran cuáles hipótesis se aceptaron y cuáles se rechazaron a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

(1) Los GCs regulan negativamente la actividad de la enzima esteroidogénica cyp450c17 testicular durante el período reproductivo disminuyendo los niveles de la proteína cyp450c17.

El estudio de la regulación de la proteína esteroidogénica cyp450c17 testicular mostró que las concentraciones de GCs características de la época no reproductiva y reproductiva no modifican la cantidad de proteína. Por consiguiente, la disminución en la actividad de la enzima inducida por los GCs durante el período reproductivo podría deberse a alteraciones en las modificaciones postraduccionales del citocromo o bien a la inhibición de la síntesis de alguno de los componentes de la cadena de transporte de electrones como el citocromo b5. Por lo tanto se rechaza la hipótesis (1). Sin embargo, una concentración de GCs alta, que podría encontrarse en una situación de estrés, sí produce una disminución en los niveles de la proteína cyp450c17. Estos resultados plantean que durante una situación de estrés la síntesis de andrógenos a nivel testicular puede ser regulada de manera diferente. Por otra parte, la 5α -reducción de los GCs podría ser un mecanismo de activación.

(2) La sensibilidad del testículo a la acción de los GCs varía estacionalmente debido en parte a los cambios en la proteína del GR testicular y (3) El patrón estacional del número de sitios de unión del GR y de la proteína GR son diferentes.

El análisis de la proteína GR por Western blot sugiere que en el testículo se expresan dos isoformas del GR, una de 82 y otra de 55 Kda. El patrón estacional de dichas isoformas mostró que tanto la de 55 Kda como la suma de ambas bandas tienen un patrón anual similar al de los sitios de unión, lo cual sugiere que las variaciones estacionales en el número de sitios de unión son debidas, al menos en

parte, a cambios en los niveles de la proteína. Dado que la cantidad de sitios de unión medidos previamente por Denari y Ceballos (2006) están supeditados a los cambios en la concentración plasmática de corticosterona, se esperaba que la proteína GR fuera mayor durante el período reproductivo. Sin embargo, no fue así y por lo tanto se acepta la hipótesis (2) pero se rechaza la hipótesis (3).

(4) Durante el período prerreproductivo, cuando la síntesis de andrógenos es máxima, los niveles bajos del GR testicular disminuyen la acción de los GCs.

Durante el período prerreproductivo se midieron los menores niveles de la proteína GR, con lo cual se acepta la hipótesis (4).

(5) Los andrógenos son responsables de regular negativamente al GR durante el período reproductivo.

El estudio de la regulación de las variaciones estacionales en la sensibilidad del testículo a la acción de los GCs relacionados con el GR mostró que los cambios estacionales en el GR testicular no parecen depender de los cambios en los niveles de andrógenos. Por lo tanto se rechaza la hipótesis (5).

(6) Los GCs regulan su propio receptor de manera positiva a lo largo del año.

Los GCs parecen ser responsables de regular positivamente su propio receptor a través de un mecanismo mediado por el propio GR, con lo cual se acepta la hipótesis (6).

(7) La melatonina antagoniza el efecto de los GCs en el testículo.

Como ocurre en otras especies y órganos, la melatonina parece antagonizar el efecto de los GCs en el testículo a través de un mecanismo mediado por receptor, disminuyendo la capacidad de unión del complejo receptor al GC. En base a este resultado se acepta la hipótesis (7).

(8) La concentración plasmática de melatonina fluctúa a lo largo del año, siendo mayor durante la época de fotoperíodo corto (otoño-invierno).

La concentración plasmática de melatonina fluctúa a lo largo del año y es mayor durante el otoño-invierno (periodo prerreproductivo), con lo cual se acepta la hipótesis (8).

(9) La melatonina inhibe en forma directa la síntesis de andrógenos en el testículo.

La melatonina no parece regular directamente la síntesis de andrógenos a nivel testicular, por lo tanto se rechaza la hipótesis (9).

(10) Los andrógenos plasmáticos regulan en forma directa y negativamente la síntesis de corticosterona en la glándula interrenal durante el período prerreproductivo.

En la segunda parte de esta tesis se observó que una concentración alta de andrógenos regula en forma directa y negativamente la síntesis de corticosterona en la glándula interrenal, con lo cual podrían ser responsables, en parte, de regular las variaciones estacionales de los niveles plasmáticos de corticosterona. A partir de este resultado se acepta la hipótesis (10).

(11) La glándula está compuesta por distintos tipos de células esteroideogénicas con actividad biosintética diferente.

La glándula interrenal de *R. arenarum* esta formada por células esteroideogénicas con distinta capacidad para sintetizar corticosterona, con lo cual se acepta la hipótesis (11).

(12) Las distintas células tienen una regionalización específica en la glándula.

Se pudo observar que las células que producen menor cantidad de corticosterona se encuentran en la zona más interna de la glándula y disminuyen en cantidad hacia el extremo posterior de la misma. Por lo tanto, se acepta la hipótesis (12). Se desconoce si las células que sintetizan menor cantidad de corticosterona son células con menor grado de actividad biosintética o si son productoras del otro esteroide producido en la glándula, la aldosterona.

Los resultados expuestos en esta tesis confirman la hipótesis general de trabajo y se puede postular que en los machos de *R. arenarum* existe una interregulación negativa entre los andrógenos gonadales y los GCs interrenales que es independiente, por lo menos en parte, del eje hipotálamo-hipofisario.

Considerando los trabajos previos realizados en *R. arenarum*, tanto por nuestro grupo de investigación como por otros, así como lo observado en esta tesis, puede concluirse que las variaciones estacionales de la esteroidogénesis testicular están reguladas por múltiples vías endocrinas que modulan la síntesis de andrógenos y la cantidad del GR testicular, entre otras.

El esquema que se muestra en la Figura IV. 1 resume los resultados obtenidos en esta tesis incorporados al modelo conocido del ciclo esteroidogénico anual en los machos de *R. arenarum*. Durante el período reproductivo, los GCs, FSH y GnRH inhibirían la síntesis de andrógenos actuando directamente a nivel testicular. Durante el período postreproductivo, un aumento en la cantidad de la enzima 11β -HSD testicular protegería a dicho órgano de la acción de los GCs. Finalmente, en el período prerreproductivo los niveles plasmáticos bajos de corticosterona debidos, en parte, al aumento de los andrógenos plasmáticos, sumado a la cantidad baja del GR y al efecto antagónico que produce la melatonina en la acción de los GCs, producirían un aumento en la síntesis de andrógenos a nivel testicular.

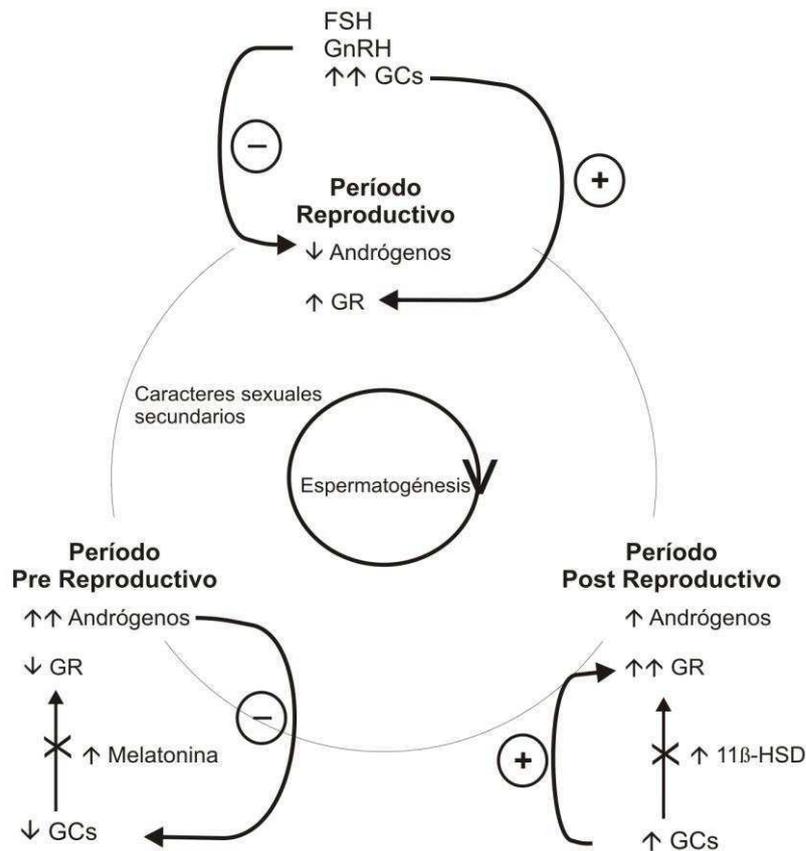


Figura IV. 1. Ciclo anual de andrógenos, GCs y otros parámetros en los machos de *R. arenarum*.

Se requieren estudios complementarios que permitan resolver diferentes interrogantes que se plantearon a lo largo de esta tesis. Los más importantes son:

- Analizar el/los ARNm del GR en el testículo para corroborar la presencia de isoformas.
- Describir el patrón mensual y circadiano de la melatonina plasmática.
- Estudiar el mecanismo a través del cual la melatonina disminuye la unión del GC al complejo receptor en el testículo.
- Investigar si la regulación de la síntesis de corticosterona en la glándula interrenal ocurre a través de la regulación de la enzima 3β-HSD de localización microsomal, en contraposición con la regulación de la síntesis de aldosterona que ocurre a través de la modulación de la actividad de la enzima 3β-HSD de localización mitocondrial.

- Evaluar si en la glándula interrenal, las células que sintetizan menos cantidad de corticosterona son células menos activas o si sintetizan mayormente aldosterona.

Bibliografía

- Aguiar, M., Masser, R., Gibbs, B.F. 2005. Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug. Metab. Rev.* 37:379-404.
- Alonso-Bedate, M., Delgado, M.J., Carballada, R. 1988. In vivo effect of melatonin and gonadotropin-releasing hormone on testicular function in *Rana temporaria*. *J. Pineal Res.* 5:323-332.
- Álvarez, R. 1992. Functional stages in the interrenal cells of *Rana perezi* (Anura: Ranidae). *J. Morphol.* 212:65-70.
- Amirat, Z., Khammar, F., Brudieux, R. 1980. Seasonal changes in plasma and adrenal concentrations of cortisol, corticosterone, aldosterone, and electrolytes in the adult male sand rat (*Psammomys obesus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 40:36-43.
- Antakly, T., Thompson, E.B., O'Donnell, D. 1989. Demonstration of the intracellular localization and up-regulation of glucocorticoid receptor by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Cancer Res.* 49:2230-2234.
- Arbogast, L.A., Voogt, J.L. 2002. Progesterone induces dephosphorylation and inactivation of tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology* 75:273-281.
- Ayre, E.A., Yuan, H., Pang, S.F. 1992. The identification of ¹²⁵I-labelled iodomelatonin binding sites in the testes and ovaries of the chicken (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 133:5-11.
- Ayre, E.A., Wang, Z.P., Brown, G.M., Pang, S.F. 1994. Localization and characterization of (¹²⁵I) iodomelatonin binding sites in duck gonads. *J. Pineal Res.* 17:39-47.
- Bahk, J.Y., Hyum, J.S., Chung, S.H., Lee, H., Kim, M.O., Lee, B.H., Choi, W.S. 1995. Stage specific identification of expression of GnRH mRNA and

- localization of the GnRH receptor in mature rat and adult human testis. *J. Urol.* 154:1958-1961.
- Ball, J.N. 1981. Hypothalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians, and reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44:135-170.
- Battisti, A., Pierantoni, R., Vallarino, M., Trabucchi, M., Carnevali, O., Polzonetti-Magni, A.M., Fasano, S. 1997. Detection of GnRH molecular forms in brains and gonads of the crested newt, *Triturus carnifex*. *Peptides.* 18:1029-1037.
- Bayarri, M.J., Rol de Lama, M.A., Madrid, J.A., Sanchez-Vasquez, F.J. 2003. Both pineal and lateral eyes are needed to sustain daily circulating melatonin rhythms in sea bass. *Brain Res.* 969:175-182.
- Best, R., Nelson, S.M., Walker, B.R. 1997. Dexamethasone and 11-dehydrodexamethasone as tools to investigate the isozymes of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in vitro and in vivo. *J. Endocrinol.* 153:41-48.
- Billen, M. J., Squires E. J.. 2009. The role of porcine cytochrome b5A and cytochrome b5B in the regulation of cytochrome P45017A1 activities. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 113:98-104.
- Binkley, S. 1993. Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia.* 49:648-653.
- Biswas, N.M., Chaudhuri, G.R., Sarkar, M., Sengupta, R. 2000. Influence of adrenal cortex on testicular activity in the toad during the breeding season. *Life Sci.* 66:1253-1260.
- Bittman, E.L., Dempsey, R.J., Karsch, F.J. 1983. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology.* 113:2276-2283.
- Blackhurst, G., McElroy, P.K., Fraser, R., Swan, R.L., Conell, J.M.C. 2001. Seasonal variation in glucocorticoid receptor binding characteristics in human mononuclear leucocytes. *Clin. Endocrinol.* 55:683-688.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Braverman, B., Davis, J. O., Taylor, A. A. 1973. Sodium depletion and postcaval vein constriction on steroid secretion in the bullfrog. *Am. J. Physiol.* 224:1358-1362.
- Brem, A.S., Matheson, K.L., Conca, T., Morris, D.J. 1989. Effect of carbenoxolone on glucocorticoid metabolism and Na transport in toad bladder. *Am. J. Physiol.* 257:F700-704.
- Breuner, C.W., Lynn, S.E., Julian, G.E., Cornelius, J.M., Heidinger, B.J., Love, O.P., Sprague, R.S., Wada, H., Whitman, B.A. 2006. Plasmabinding globulins and acute stress response. *Hormone Metab. Res.* 38:260-268.
- Breuner, C.W., Orchinik, M. 2000. Downstream from corticosterone: seasonality of binding globulins, receptors and behavior in the avian stress response. En: Dawson, A., Caturvedi, C.M., (Eds). *Avian Endocrinology*. Narosa Publishing House Nueva Delhi, India. 385-399.
- Breuner, C.W., Orchinik, M. 2001. Seasonal regulation of membrane and intracellular corticosteroid receptors in the house sparrow brain. *J. Neuroendocrinol.* 13:412-420.
- Brotto, L.A., Gorzalka, B.B., LaMarre, A.K. 2001. Melatonin protects against the effects of chronic stress on sexual behavior in male rats. *NeuroReport.* 12:3465-3469.
- Burgos, M.H. 1951. Acción de la gonadotrofina hipofisaria sobre la línea germinal y el tejido intersticial del testículo de sapo. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 27:331-335.
- Burgos, M.H., Houssay, B.A. 1957. Acción de LH y FSH sobre espermiación del sapo. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 33:336-339.
- Burgos, M.H., Mancini, R.E. 1948. Ciclo espermatogénico anual del *Bufo arenarum* Hensel. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 24:328-336.

- Burgos, M.H., Rufino, M.A. 1952. Acción de las gonadotrofinas séricas y coriónicas sobre el testículo del sapo. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 28:159-164.
- Caldwell, J.P. 1987. Demography and life history of two species of chorus frogs (Anura: Hylidae) in South Carolina. *Copeia*. 1:114-127.
- Callard, I.P., Callard, G.V., Lance, V., Bolaffi, J.L., Rosset, J.S. 1978. Testicular regulation in non-mammalian vertebrates. *Biol. Reprod.* 18:16-43.
- Canosa, L.F., Ceballos, N.R. 2002a. Seasonal changes in testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum* H. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125:426-434.
- Canosa, L.F., Ceballos, N.R. 2002b. In vitro hCG and human recombinant FSH actions on testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126:318-324.
- Canosa, L.F., Ceballos, N.R. 2002c. Effects of mGnRH on testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127:174-180.
- Canosa, L.F., Pozzi, A.G., Ceballos, N.R. 1998. Pregnenolone and progesterone metabolism by testes of *Bufo arenarum*. *J. Comp. Physiol. B.* 168:491-496.
- Canosa, L.F., Pozzi, A.G., Rosemblyt, C., Ceballos, N.R. 2003. Steroid production in toads. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85:227-233.
- Capaldo, A., Gay, F., De Falco, M., Virgilio, F., Laforgia, V., Varano, L. 2006. The adrenal gland of newt *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela) following in vivo betamethasone administration. *Anat. Embriol.* 211:577-584.
- Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., Laforgia, V., Varano, L. 2004a. Effects of noradrenaline administration on the interrenal gland of the newt, *Triturus carnifex*: evidence of intra-adrenal paracrine interactions. *J. Morphol.* 259:33-40.
- Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., Laforgia, V., Varano, L. 2004b. Effects of adrenaline administration on the interrenal gland of the newt, *Triturus carnifex*: evidence of intraadrenal paracrine interactions. *J. Morphol.* 261:18-25.

- Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., Laforgia, V., Varano, L. 2004c. Release of aldosterone and catecholamines from the interrenal gland of *Triturus carnifex* in response to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) administration. *J. Morphol.* 262:692-700.
- Carter, S.B. 1956. The influence of sex hormones on the weight of the adrenal gland in the rat. *J. Endocrinol.* 13:150-160.
- Carstensen, H., Burgers, A.C., Li, C.H. 1961. Demonstration of aldosterone and corticosterone as the principal steroids formed in incubates of adrenals of the American bullfrog (*Rana catesbeiana*) and stimulation of their production by mammalian adrenocorticotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1:37-50.
- Carter, D.S., Goldman, B.D. 1983. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology.* 113:1261-1267.
- Ceballos, N. R., Cozza, E. N., Lantos, C. P. 1983. Corticoidogenesis in *Bufo arenarum* H. I In vitro biosynthesis of [3H]pregnenolone and [3H]corticosterone metabolites and of endogenous 3-oxo-4-ene intermediates at 28°C and 37°C. *Gen. Comp. Endocrinol.* 51:138-147.
- Chowdhury, V.S., Yamamoto, K., Saeki, I., Hasunuma, I., Shimura, T., Tsutsui, K. 2008. Melatonin stimulates the release of growth hormone and prolactin by a possible induction of the expression of frog growth hormone-releasing peptide and its related peptide-2 in the amphibian hypothalamus. *Endocrinology.* 149:962-970.
- da Rosa, I., Camargo, A., Canavero A., Naya, D. E., Maneyro, R. 2006. Ecología de un ensamble de anuros en un humedal costero del sudeste de Uruguay. En: Menafra, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F., Conde, D. (Eds.). Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Montevideo, Uruguay. 447-455.
- Davis, J. O., Copeland, D. L., Taylor, A. A., Baumer, J. S. 1970. Plasma electrolyte concentrations and steroid secretion in the bullfrog and opossum. *Am. J. Physiol.* 219:555-559.

- de Atenor, M.S.B., de Romero, I.R., Brauckmann, E., Pisanó, A., Legname, A.H. 1994. Effects of the pineal gland and melatonin on the metabolism of oocytes in vitro and on ovulation in *Bufo arenarum*. *J. Exp. Zool.* 268:436-441.
- Delgado, M.J., Alonso-Gomez, A.L., Gancedo, B., De Pedro, N., Valenciano, A.I., Alonso-Bedate, M. 1993. Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin level in the frog retina are not correlated during the seasonal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92:143-150.
- Delgado, M.J., Gutierrez, P., Alonso-Bedate, M. 1989. Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73:1-11.
- Delgado, M.J., Vivien-Roels, B. 1989. Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye and plasma of the frog *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:46-53.
- Denari, D., Ceballos, N.R. 2005. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Bufo arenarum*. Changes in its seasonal activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143:113-120.
- Denari, D., Ceballos, N.R. 2006. Cytosolic glucocorticoid receptor in the testis of *Bufo arenarum*: seasonal changes in its binding parameters. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147:247-254.
- Deviche, P.J., Hurley, L.L., Fokidis, H.B., Lerbour, B., Silverin, B., Silverin, B., Sabo, J., Sharp, P.J. 2010. Acute stress rapidly decreases plasma testosterone in a free-ranging male songbird: potential site of action and mechanism. *Gen. Comp. Endocrinol.* 169:82-90.
- Diederich, S., Hanke, B., Oelkers, W., Bähr, V. 1997. Metabolism of dexamethasone in the human kidney: nicotinamide adenine dinucleotide-dependent 11 β -reduction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:1598-1602.
- Di Mateo, L., Vallarino, M., Pierantoni, R., 1996. Localization of GnRH molecular forms in the brain, pituitary and testis of the frog, *Rana esculenta*. *J. Exp. Zool.* 274:33-40.

- d'Istria, M., Delrio, G., Botte, V., Chieffi, G. 1974. Radioimmunoassay of testosterone, 17β -oestradiol and oestrone in the male and female plasma of *Rana esculenta* during sexual cycle. *Steroids Lipids Res.* 5:42-48.
- d'Istria, M., Monteleone, P., Serino, I., Chieffi, G. 1994. Seasonal variations in the daily rhythm of melatonin and NAT activity in the Harderian gland, retina, pineal gland, and serum of the green frog, *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96:6-11.
- d'Istria, M., Palmiero, C., Serino, I., Izzo, G., Minucci, S. 2003. Inhibition of the basal and oestradiol-stimulated mitotic activity of primary spermatogonia by melatonin in the testis of the frog, *Rana esculenta*, in vivo and in vitro. *Reproduction.* 126:83-90.
- d'Istria, M., Serino, I., Izzo, G., Ferrara, D., De Rienzo, G., Minucci, S. 2004. Effects of melatonin treatment on Leydig cell activity in the testis of the frog *Rana esculenta*. *Zygote.* 12:293-299.
- Dong, K.-W., Duval, P., Zeng, Z., Gordon, K., Willams, R.F., Hodgen, G.D., Jones, G., Kerdelhue, B., Roberts, J.L. 1996. Multiple transcription start sites for the GnRH gene in rhesus and cynomolgus monkeys: a non-human model for studying GnRH gene regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 117, 121–130.
- Dong, Y., Poellinger, L., Gustafsson, J.A., Okret, S. 1988. Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 2:1256-1264.
- Dong, Q., Salva, A., Sottas, C.M., Niu, E., Holmes, M., Hardy, M.P. 2004. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *J. Androl.* 25:973-981.
- Dubocovich, M.L. 1988. Luzindole (N-0774): A novel melatonin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246:902-910.
- Duma, D., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A. 2006. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 102:11-21.

- Dupont, W., Leboulenger, F., Vaudry, H., Vaillant, R. 1976. Regulation of aldosterone secretion in the frog *Rana esculenta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 29:51-60.
- Echeverría, D.D. 1987. Desarrollo del testículo en *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). Ciclos espermatogénicos y variaciones estacionales en los sapos juveniles. *Rev. Mus. Arg. Cs. Nat.* 9:125-138.
- Echeverría, D. D. 1990. Organogénesis y ciclos estacionales del órgano de Bidder en las larvas y los juveniles de *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). *Cuad. Herpetol.* 5:1-9.
- Eisen, L.P., Elsasser, M.S., Harmon, J.M. 1988. Positive regulation of the glucocorticoid receptor in human T-cells sensitive to the cytolytic effects of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 263:12044-12048.
- Elaković, I., Brkljacić, J., Matic, G. 2009. Gender-related differences in the effects of antidepressant imipramine on glucocorticoid receptor binding properties and association with heat shock proteins in the rat liver and kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 608:7-13.
- Evans, R.M. 2005. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol. Endocrinol.* 19:1429-1438.
- Evans, S. J., Moore, F. L., Murray, T. F. 1998. Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67:1-8.
- Fasano, S., Minucci, S., Di Matteo, L., D'Antonio, M., Pierantoni, R. 1989. Intratesticular feedback mechanisms in the regulation of steroid profiles in the frog, *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:335-342.
- Fasano, S., Goos, H.J., Janssen, C., Pierantoni, R. 1993. Two GnRHs fluctuate in correlation with androgen levels in the male frog *Rana esculenta*. *J. Exp. Zool.* 266:277-283.
- Faus, H., Haendler, B. 2006. Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed. Pharmacother.* 60:520-528.

- Fernández Solari, J.J., Pozzi, A.G., Ceballos, N.R. 2002. Seasonal changes in the activity of the cytochrome P450_{c17} from the testis of *Bufo arenarum*. *J. Comp. Physiol. B.* 172:685-690.
- Filadelfi, A.M., Castrucci, A.M. 1996. Comparative aspects of the pineal/melatonin system of poikilothermic vertebrates. *J. Pineal Res.* 20:175-186.
- Firth, B.T., Belan, I., Kennaway, D.J., Moyer, R.W. 1999. Thermocyclic entrainment of lizard blood plasma melatonin rhythms in constant and cyclic photic environments. *Am. J. Physiol.* 277:1620-1626.
- Firth, B. T., Kennaway, D. J. 1989. Thermoperiod and photoperiod interact to affect the phase of the plasma melatonin rhythm in the lizard, *Tiliqua rugosa*. *Neurosci. Lett.* 106:125-130.
- Fischer, B., Musshof, U., Faubeck, J.D., Madeja, M., Wittkowski, W., Speckmann, E.J. 1996. Expression and functional characterization of a melatonin-sensitive receptor in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 381:98-102.
- Ford, L.S., Cannatella, D.C. 1993. The major clades of frogs. *Herpetological Monographs.* 7:94-117.
- Free, M.J., Tillson, S.A. 1973. Secretion rate of testicular steroids in the conscious and halothane-anesthetized rat. *Endocrinology.* 4:874-879.
- Frost, D.R. 2011. *Amphibian Species of the World: an Online Reference.* Version 5.5 (31/01/2011). Disponible en <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, Nueva York, EEUU.
- Frungieri, M.B., Gonzalez-Calvar, S.I., Bartke, A., Calandra, R.S. 1999. Influence of age and photoperiod on steroidogenic function of the testis in the golden hamster. *Int. J. Androl.* 22:243-252.
- Frungieri, M.B., Mayerhofer, A., Zitta, K., Pignataro, O.P., Calandra, R.S., Gonzales-Calvar, S.I. 2005. Direct effect of melatonin on syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology.* 146:1541-1552.

- Frye, C. A., Bayon, L. E., Pursnani, N. K., Purdy, R. H. 1998. The neurosteroids, progesterone and 3α , 5α -THP, enhance sexual motivation, receptivity and proceptivity in female rat. *Brain Res.* 808:72-83.
- Frye, C. A., Duncan, J. E., Bascham, M., Erskine, M. S. 1996. Behavioral effects of 3α -androstenediol. II. Hypotalamic and preoptic area action via a GABAergic mechanism. *Behav. Brain Res.* 79:119-130.
- Frye, C. A., Vongher, J. M. 1999. Progesterone has rapid and membrane effects in the facilitation of female mouse sexual behaviour. *Brain Res.* 815:259-269.
- Fuller, P.J. 1991. The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB Journal.* 5:3092-3099.
- Funder, J.W. 1993. Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science.* 259:1132-1133.
- Funder, J.W. 1997. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Ann. Rev. Med.* 48:231-240.
- Galgano, M. 1934. L'influenza della temperatura sulla spermatogenesi della *Rana esculenta* L. *Monit. Zool. Ital.* 45:83.
- Gallardo, J.M. 1965. Especiación en tres *Bufo* neotropicales (Amphibia, Anura). *Papeis Avulsos do Dpto. Zool.* 17:57-75.
- Gallardo, J.M. 1974. Anfibios de los alrededores de Buenos Aires. EUDEBA. Buenos Aires, Argentina.
- Gancedo, B., Delgado, M.J., Alonso-Bedate, M. 1991. Lack of in vitro melatonin action on the gonadal function in two anuran amphibian species, *Rana perezi* and *Discoglossus pictus*. *Zool. Sci.* 8:541-547.
- Gao, X., Kalkhoven, E., Peterson-Maduro, J., van der Burg, B., Destrée, O.H. 1994. Expression of the glucocorticoid receptor gene is regulated during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1218:194-198.

- Gao, H.B., Shan, L.X., Monder, C., Hardy, M.P. 1996. Suppression of endogenous corticosterone levels in vivo increases the steroidogenic capacity of purified rat Leydig cells in vitro. *Endocrinology*. 137:1714-1718.
- García-Allegue, R., Madrid, J.A., Sanchez Vazquez, F.J. 2001. Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye: Influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J. Pineal Res.* 31:68-75.
- Gay, F., Laforgia, V., Capaldo, A. 2008. Human follicle-stimulating hormone modulation of adrenal gland activity in the Italian crested newt, *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 151:126-132.
- Geneser, F. 2000. *Histología*. 3ra edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires-Madrid, Argentina-España.
- Gern, W.A., Duvall, D., Nervina, J.M. 1986. Melatonin: a discussion of its evolution and actions in vertebrates. *Amer. Zool.* 26:985-996.
- Gern, W.A., Norris, D.O., Duvall, D. 1983. The effect of light and temperature on plasma melatonin in neotenic tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *J. Herpetol.* 17:228-234.
- Giusti, L., Houssay, B.A. 1923. Alteraciones cutáneas y genitales en el sapo por lesiones de la hipófisis y del cerebro. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 4:77-81.
- Gómez-Sánchez, C., Murry, B.A., Kem, D.C., Kaplan, N.M. 1975. A direct radioimmunoassay of corticosterone in rat serum. *Endocrinology*. 96:796-798.
- Gompertz, D. 1958 The effect of sex hormones on the adrenal gland of the male rat. *J. Endocrinol.* 17:107-113.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 46:645-652.
- Giordano, A., Morroni, M., Santone, G., Marchesi, G.F., Cinti, S. 1996. Tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, substance P, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in nerves of rat periovarian adipose tissue: an

- immunohistochemical and ultrastructural investigation. *J. Neurocytol.* 25:125-136.
- Guerrero, H.Y, Cardillo, E., Poleo, G., Marcano, D. 2008. Daily and annual variations of plasma melatonin in the tropical catfish “Sierra Negra” (*Oxydoras sifontesi*), related to the annual gonadal maturation. *Cybium.* 32:22-24.
- Guillette Jr., L.J., Cree, A., Rooney, A.A. 1995. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. En: Warwick, C., Frye, F.L., Murphy, J.B. (Eds.). *Health and welfare of captive reptiles.* Chapman y Hall. Londres, RU. 32-81.
- Grassi Milano, E., Accordi, F. 1983. Comparative morphology of the adrenal gland of anuran amphibia. *J. Anat.* 136:165-174.
- Green, C.B., Liang, M.Y., Steenhard, B.M., Besharse, J.C. 1999. Ontogeny of circadian and light regulation of melatonin release in *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Brain. Res.* 117:109-116.
- Greenberg, G.N., Wingfield, J.C. 1987. Stress and reproduction: reciprocal relationships. En: Norris, D.O., Jones, R.E. (Eds.), *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles,* Plenum. Nueva York, EEUU. 461-503.
- Hammond, G.L. 1997. Determinants of steroid hormone bioavailability. *Biochem. Soc. Trans.* 25:577-582.
- Handrigan, G.R., Wassersug, R.J. 2007. The anuran Bauplan: a review of the adaptive, developmental, and genetic underpinnings of frog and tadpole morphology. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 82:1-25.
- Hanke, W. 1978. The adrenal cortex of Amphibia. En: Chester Jones, I., Henderson, I.W., (Eds.). *General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex,* vol. 2, Academic Press. Londres, RU. 419-495.
- Hanke, W., Weber, K. 1964. Physiological activity and regulation of the anuran adrenal cortex (*Rana temporaria* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 55:662-72.

- Hanke, W., Weber, K. 1965. Histophysiological investigation on the zonation, activity, and mode of secretion of the adrenal gland of the frog, *Rana temporaria* Linnaeus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 5:444-455.
- Hardy, M.P., Ganjam, V.K. 1997. Stress, 11 β -HSD, and Leydig cell function. *J. Androl.* 18:475-479.
- Haas, A. 2003. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura). *Cladistics.* 19:23-90.
- Henley, D.E., Lightman, S.L. 2011. New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. *Neuroscience.* 2011. 180:1-8.
- Hoeck, W., Rusconi, S., Groner, B. 1989. Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells. Investigations with a monospecific antiserum against a bacterially expressed receptor fragment. *J. Biol. Chem.* 264:14396-14402.
- Hopkins, W.A., Mendonça, M.T., Congdon, J.D. 1999. Responsiveness of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in an amphibian (*Bufo terrestris*) exposed to coal combustion wastes. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 122:191-196.
- Hu, G.X., Lian, Q.Q., Lin, H., Latif, S.A., Morris, D.J., Hardy, M.P., Ge, R.S. 2008. Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids.* 73:1018-1024.
- Iriarte, J.V., Burgos, M.H. 1958. Bloqueo de la acción espermiante de la gonadotropina coriónica. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 34:268-272.
- Ismaili, N., Garabedian, M.J. 2004. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1024:86-101.
- Itoh, M., Ishii, S. 1990. Changes in plasma levels of gonadotropins and sex steroids in the toad, *Bufo japonicus*, in association with behavior during the breeding season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80:451- 464.

- Itoh, M., Inoue, M., Ishii, S. 1990. Annual cycle of pituitary and plasma gonadotropins and sex steroids in a wild population of the toad, *Bufo japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78:242-253.
- Izzo, G., d'Istria, M., Serino, I., Minucci, S. 2004. Inhibition of the increased 17 β -estradiol-induced mast cell number by melatonin in the testis of the frog *Rana esculenta* (in vivo and in vitro). *J. Exp. Biol.* 207:437-441.
- Johnston, C. I., Davis, J. O., Wright, F. S., Howards, S. S. 1967. Effect of renin and ACTH on adrenal steroid secretion in the American bullfrog. *Am. J. Physiol.* 213:393-399.
- Jolivet-Jaudet, G., Leloup-Hatey, J. 1986. Corticosteroid-binding in plasma of *Xenopus laevis*. Modifications during metamorphosis and growth. *J. Steroid Biochem.* 25:343-350.
- Jorgensen, C. B. 1968. Central nervous control of adenohipophyseal function. En: Barrington, E. J. W. & Jorgensen, C. B. (Eds.). *Perspective in Endocrinology*, Academic press. Nueva Cork, EEUU.469-541.
- Kalinyak, J.E., Dorin, R.I., Hoffman, A.R., Perlman, A.J. 1987. Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. *J. Biol. Chem.* 262:10441-10444.
- Kasinathan, S., Basu, S.L. 1971. Seasonal variation and exogenous hormonal effect on the interrenal glands of *Rana hexadactyla* Lesson. *Proc: Plant Sci.* 75:191-200.
- Kaufmann, S.H., Wright, W.W., Okret, S., Wikström, A.C., Gustafsson, J.A., Shaper, N.L., Shaper, J.H. 1992. Evidence that rodent epididymal sperm contain the Mr approximately 94,000 glucocorticoid receptor but lack the Mr approximately 90,000 heat shock protein. *Endocrinology.* 130:3074-3084.
- Kawamura, K. 1986. Occurrence and release of histamine-containing granules in summer cells in adrenal glands of the frog *Rana catesbeiana*. *J. Anat.* 148:111-9.

- Ketterson, E.D., Nolan, V. Jr., Wolf, L., Ziegenfus, C., Dufty, A.M. Jr., Ball, G.F., Johnsen, T.S. 1991. Testosterone and avian life histories: the effect of experimentally elevated testosterone on corticosterone and body mass in dark-eyed juncos. *Horm. Behav.* 25:489-503.
- Kiefer, T.L., Lai, L., Yuan, L., Dong, C., Burow, M.E., Hill, S.M. 2005. Differential regulation of estrogen receptor α , glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor α transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. *J. Pineal Res.* 38:231-239.
- Kim, K.H., Im, W-B., Choi, H.H., Ishii, S., Kwon, H.B. 1998. Seasonal fluctuations in pituitary gland and plasma levels of gonadotropic hormones in *Rana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109:13-23.
- Kinyamu, H.K., Archer, T.K. 2003. Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol. Cell Biol.* 23:5867-5881.
- Kloas, W., Hanke, W. 1990. Neurohypophysial hormones and steroidogenesis in the interrenals of *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80:321-30.
- Kloas, W., Hanke, W. 1992. Effects of atrial natriuretic factor on corticosteroid and catecholamine secretion by the adrenals of *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85:269-77.
- Kopp, C., Vogel, E., Rettori, M.C., Delagrangé, P., Misslin, R. 1999. The effects of melatonin on the behavioural disturbances induced by chronic mild stress in C3H/He mice. *Behav. Pharmacol.* 10:73-83.
- Krain, L.P., Denver, R.J. 2004. Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *J. Endocrinol.* 181:91-104.
- Kumar, R., Thompson, E.B. 1999. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64:310-319.

- Lance, V.A. 1990. Stress in reptiles. En: Epple, A., Scanes, C.G., Stetson, M.H. (Eds.). *Prospects in Comparative Endocrinology*, Wiley-Liss. Nueva York, EEUU. 461-466.
- Lange, C.B., Hanke, W. 1988. Corticosteroid receptors in liver cytosol of the clawed toad, *Xenopus laevis*: daily and seasonal variations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71:141-152.
- Laub, J.M., Callard, G.V., Callard, I.P. 1975. The role of adrenal steroids in the negative feedback control of the amphibian adrenal gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 25:425-431.
- Lesouhaitier, O., Esneu, M., Kodjo, M.K., Hamel, C., Contesse, V., Yon, L., Remy-Jouet, I., Fasolo, A., Fournier, A., Vandesande, F., y col. 1995. Neuroendocrine communication in the frog adrenal gland. *Zoolog. Sci.* 12:255-264.
- Lesouhaitier, O., Feuilloley, M., Lihmann, I., Ugo, I., Fasolo, A., Tonon, M.C., Vaudry, H. 1996. Localization of diazepam-binding inhibitor-related peptides and peripheral type benzodiazepine receptors in the frog adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 283:403-412.
- Licht, P., McCreery, B.R., Barnes, R., Pang, R. 1983. Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50:124-145.
- Licht, P., Papkoff, H. 1974. Separation of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Endocrinology.* 94:1587-1594.
- Lincoln, G.A. 2002. Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reproduction Supplement.* 19:131-147.
- Lofts, B. 1961. The effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on the testis of hypophysectomized frogs (*Rana temporaria*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1:179-189.
- Malamud, F. 2005. Efecto de los glucocorticoides sobre la espermiación y la síntesis de andrógenos en *Bufo arenarum* (Amphibia, Anura). Tesis de licenciatura de la

- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Mancini, R.E., Burgos, M.H. 1947. Acción in vivo e in vitro de las gonadotrofinas coriónicas y séricas sobre el testículo del sapo (*Bufo arenarum* Hensel). Arch. Soc. Argent. Anat. 9:326-330.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M. y col. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell. 83:835-839.
- Markowska, M., Mrozkowiac, A., Pawlak, J., Skwarlo-Sonta, K. 2004. Intracellular second messengers involved in melatonin signal transduction in chicken splenocytes in vitro. J. Pineal Res. 37:207-212.
- Martin, B., Ozon, R. 1975. Steroid-protein interactions in nonmammalian vertebrates. II. Steroids binding proteins in the serum of amphibians; a physiological approach. Biol. Reprod. 13:371-380.
- Martinez-Chavez, C.C., Al-Khamees, S., Campos-Mendoza, A., Penman, D.J., Migaud, H. 2008. Clock-controlled endogenous melatonin rhythms in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). Chronobiol. Int. 25:31-49.
- Maser, C., Janssens, P.A., Hanke, W. 1981. Stimulation of interrenal secretion in Amphibia. I: Direct effects of electrolyte concentration on steroid release. Gen. Comp. Endocrinol. 47:458-466.
- Matteri, R.L., Watson, J.G., Moberg, G.P. 1984. Stress or acute adrenocorticotrophin treatment suppresses LHRH-induced LH release in the ram. J. Reprod. Fertil. 72:385-393.
- Mayer, I., Bornestaf, C., Borg, B. 1997. Melatonin in non-mammalian vertebrates: Physiological role in reproduction? Comp. Biochem. Physiol. 118A:515-531.
- McCormick, J.A., Lyons, V., Jacobson, M.D., Noble, J., Diorio, J., Nyirenda, M., Weaver, S., Ester, W., Yau, J.L., Meaney, M.J., Seckl, J.R., Chapman, K.E. 2000. 5'-heterogeneity of glucocorticoid receptor messenger RNA is tissue

- specific: differential regulation of variant transcripts by early-life events. *Mol. Endocrinol.* 14:506-517.
- McGuire, N.L., Kangas, K., Bentley, G.E. 2011. Effects of melatonin on peripheral reproductive function: regulation of testicular GnIH and testosterone. *Endocrinology.* 152(9):3461-3470.
- Mendel, C.M. 1989. The free hormone hypothesis: a physiological based mathematical model. *Endocr. Rev.* 10:232–274.
- Mendonça, M.T., Licht, P., Ryan, M.J., Barnes, R. 1985 Changes in hormone levels in relation to breeding behavior in male bullfrogs (*Rana catesbeiana*) at the individual and population levels. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58:270-279.
- Miranda, L.A., Paz, D.A., Affani, J.M., Somoza, G.M. 1998. Identification and neuroanatomical distribution of immunoreactivity for mammalian gonadotropin-releasing hormone (mGnRH) in the brain and neural hypophyseal lobe of the toad *Bufo arenarum*. *Cell. Tissue Res.* 293:419-425.
- Monder, C., White, P. 1993. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam. Horm.* 47:187-271.
- Monder, C., Sakai, R.R., Miroff, Y., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J. 1994. Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology.* 134:1193-1198.
- Moore, I.T., Jessop, T.S. 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm. Behav.* 43:39-47.
- Moore, F.L., Miller, L.J. 1984. Stress-induced inhibition of sexual behavior: corticosterone inhibits courtship behaviors of a male amphibian *Taricha granulose*. *Horm. Behav.* 18:400-410.
- Moorhouse, D.E. 1963. A study of the adrenal tissue of the male African bullfrog, *Rana adspersa*. *Quart. J. micr. Sci.* 104:51-56.

- Morra, M., Leboulenger, F., Vaudry, H. 1990. Dopamine inhibits corticosteroid secretion from frog adrenal gland, in vitro. *Endocrinology*. 127:218-226.
- Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N.J. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5:25-44.
- Nelson, R.J., Drazen, D.L. 1999. Melatonin mediates seasonal adjustments in immune function. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:383-398.
- Netchitailo, P., Lihmann, I., Vaudry, H. 1984. Lack of effect of dexamethasone on corticosteroid production in the amphibian. *J. Steroid. Biochem.* 21:727-731.
- Niedziela, M., Lerchl, A., Nieschlag, E. 1995. Direct effects of the pineal hormone melatonin on testosterone synthesis of Leydig cells in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) in vitro. *Neurosci. Lett.* 201:247-250.
- Nonaka, Y., Takemori, H., Halder, S.K., Sun, T., Ohta, M., Hatano, O., Takakusu, A., Okamoto, M. 1995. Frog cytochrome P-450 (11 β ,aldo), a single enzyme involved in the final steps of glucocorticoid and mineralocorticoid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 229(1):249-256.
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A. 2011. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 286:3177-3184.
- Orchinik, M., Matthews, L., Gasser, P.J. 2000. Distinct specificity for corticosteroid binding sites in amphibian cytosol, neuronal membranes, and plasma. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118:284-301.
- Orchinik, M., Murray, T.F., Moore, F.L. 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science*. 252:1848-1851.
- Paolucci, M., Esposito, V., Di fiore, M.M., Botte, V. 1990. Effects of short postcapture confinement on plasma reproductive hormone and corticosterone profiles in *Rana esculenta*. *Boll. Zool.* 57:253-259.

- Payne, A.H. 1990. Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol. Reprod.* 42:399-404.
- Papkoff, H., Farmer, S.W., Licht, P. 1976. Isolation and characterization of luteinizing hormone from amphibian (*Rana catesbeiana*) pituitaries. *Life Sci.* 18:245-250.
- Peiffer, A., Barden, N. 1987. Estrogen-induced decrease of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid concentration in rat anterior pituitary gland. *Mol. Endocrinol.* 1:435-440.
- Perry, J.E., Stalvey, J.R.D. 1992. Gonadal steroids modulate adrenal fasciculate 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase in mice. *Biol. Reprod.* 46:73-82.
- Persengiev, S.P. 1999. Multiple domains of melatonin receptor are involved in the regulation of glucocorticoid receptor-induced gene expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 68:181-187.
- Pierantoni, R., Varriale, B., Minucci, S., Di Matteo, L., Fasano, S., D'Antonio, M., Chieffi, G. 1986. Regulation of androgen production by frog (*Rana esculenta*) testis: An in vitro study on the effects exerted by estradiol, 5 α -dihydrotestosterone, testosterone, melatonin, and serotonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64:405-410.
- Piezzi, R.S. 1965. Two types of chromaffin cells in the adrenal gland of the *Bufo arenarum* Hensel. *Acta Physiol. Latinoam.* 16:282-285.
- Piezzi, R.S. 1967. Chromaffin tissue in the adrenal gland of the toad, *Bufo arenarum* Hensel. *Gen. Comp. Endocrinol.* 9:143-153.
- Piezzi, R.S., Burgos, M.H. 1968. The toad adrenal gland. I. Cortical cells during summer and winter. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1:344-354.
- Piezzi, R.S., Rodríguez Echandia, E.L. 1968. Studies on the pararenal ganglion of the *Bufo arenarum* Hensel. I. Its normal fine structure and histochemical characteristics. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 88:180-186.

- Pisanó, A., Burgos, M.H. 1971. Response of immature gonads of *Ceratophrys ornata* to FSH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16:176-182.
- Pizarro, N.Z., Burgos, M.H. 1963. Actions of FSH on the newly differentiated testis of *Bufo arenarum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3:644-648.
- Polzonetti-Magni, A.M., Mosconi, G., Carnevali, O., Yamamoto, K., Hanaoka, Y., Kikuyama, S. 1998. Gonadotropin and reproductive function in the anuran amphibian, *Rana esculenta*. *Biol. Reprod.* 58:88-93.
- Pombal, J. 1997. Distribuição espacial e temporal de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste de Brasil. *Rev. Bras. Biol.* 57:583-594.
- Pottinger, T.G., Balm, P.H.M., Pickering, A.D. 1995. Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary-interrenal axis to stress in male rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98:311-320.
- Pozzi, A.G., Ceballos, N.R. 2000. Human chorionic gonadotropin-induced spermiation in *Bufo arenarum* is not mediated by steroid biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119:164-171.
- Pozzi, A.G., Fernandez Solari, J.J., Ceballos, N.R. 2001. Two populations cells with different responsiveness to mammalian LH, FSH and hCG from the testis of *Bufo arenarum*. *Perspect. Comp. Endocrinol.* 1:1189-1194.
- Pozzi, A.G., Lantos, C.P., Ceballos, N.R. 1996. Mitochondrial localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 5-ene isomerase in interrenals of the toad *Bufo arenarum* H. *Gen. Comp. Endocrinol.* 103(2):176-81.
- Pozzi, A.G., Lantos, C.P., Ceballos, N.R. 2002. Effect of salt acclimatization on 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase activity in the interrenal of *Bufo arenarum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126:68-74.
- Pozzi, A.G., Roseblit, C., Ceballos, N.R. 2006. Effect of human gonadotropins on spermiation and androgen biosynthesis in the testis of the toad *Bufo arenarum* (Amphibia, Anura). *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 305:96-102.

- Prado, C. P. A., Uetanabaro, M., Haddad, C. F. B. 2005. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. *Amphibia-Reptilia*. 26:211-221.
- Pratt, W.B., Toft, D.O. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18:306-360.
- Presman, D.M., Hoijman, E., Ceballos, N.R., Galigniana, M.D., Pecci, A. 2006. Melatonin inhibits glucocorticoid receptor nuclear translocation in mouse thymocytes. *Endocrinology*. 147:5452-5459.
- Presman, D.M., Levi, V., Pignataro, O.P., Pecci, A. 2012. Melatonin inhibits glucocorticoid-dependent GR-TIF2 interaction in newborn hamster kidney (BHK) cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349:214-221.
- Psarra, A.G., Solakidi, S., Trougakos, I.P., Margaritas, L.H., Spyrou, G., Sekeris, C.E. 2005. Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: Presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37:2544-2558.
- Quinn, G.P., Keough, M.J. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. 1ra. edición. Cambridge University Press. Nueva Cork, EEUU.
- Quiros, I., Mayo, J.C., Garcia-Suarez, O., Hevia, D., Martin, V., Rodriguez, C., Sainz, R.M. 2008. Melatonin prevents glucocorticoid inhibition of cell proliferation and toxicity in hippocampal cells by reducing glucocorticoid receptor nuclear translocation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110:116-124.
- Rastogi, R.K., Iela, L., Delrio, G., Bagnara, J.T. 1986. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. II. The male. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62:23-35.
- Rastogi, R.K., Iela, L., Saxena, P.K., Chieffi, G. 1976. The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta*. 196:151-165.
- Reiter, R.J. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12:151-180.

- Reiter, R.J. 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654-664.
- Reiter, R.J., Tan, D-X., Osuna, C., Gitto, E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *J. Biomed. Sci.* 7:444-458.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate of high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17:208-212.
- Romero, L.M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128:1-24.
- Rosner, W. 1990. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone binding globulin: Recent advances. *Endocrine Rev.* 11:80-91.
- Sainz, R.M., Mayo, J.C., Reiter, R.J., Antolin, I., Esteban, M.M., Rodriguez, C. 1999. Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB* 13:1547-1556.
- Saoud, C.J., Wood, C.E. 1996. Developmental changes and molecular weight of immunoreactive glucocorticoid receptor protein in the ovine fetal hypothalamus and pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229:916-921.
- Sapolsky, R.M. 1985. Stress-induced suppression of testicular function in the wild baboon: role of glucocorticoids. *Endocrinology.* 116:2273-2278.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21:55-89.
- Sasano, H., Mori, T., Sasano, N., Nagura, H., Mason, J.I. 1990. Immunolocalization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human ovary. *J. Reprod. Fertil.* 89:743-751.
- Scaia, M.F., Regueira, E., Sassone, A.G., Volonteri, M.C., Ceballos, N.R. 2011. The Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). Presence of steroidogenic enzymes. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 315:439-446.

- Schmidt, T.J., Meyer, A.S. 1994. Autoregulation of corticosteroid receptors. How, when, where, and why? *Receptor*. 4:229-257.
- Schoech, S.J., Ketterson, E.D., Nolan, V. 1999. Exogenous testosterone and the adrenocortical response in dark-eyed juncos. *Auk*. 116:64-72.
- Schultz, R., Isola, J., Parvinen, M., Honkaniemi, J., Wikström, A.C., Gustafsson, J.A., Pelto-Huikko, M. 1993. Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 95:115-120.
- Serino, I., d'Istria, M., Monteleone, P. 1993. A comparative study of melatonin production in the retina, pineal gland, Harderian gland of *Bufo viridis* and *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C:189-193.
- Serino, I., Izzo, G., Ferrara, D., Minucci, S., D'Istria, M. 2011. First evidence of a cDNA encoding for a melatonin receptor (mel 1b) in brain, retina, and testis of *Pelophylax esculentus*. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 315:520-526.
- Sever, D.M., Staub, N.L. 2006. Hormones, Sex Accessory Structures, and Secondary Sexual Characteristics in Amphibians. En: Norris, D.O., López, K.H. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volumen 2 Amphibians*. Elsevier Inc.
- Sharpe, R.M. 1982. Cellular aspects of the inhibitory actions of LHRH on the ovary and testis. *J. Reprod. Fertil.* 64:517-527.
- Sheppard, D.H. 1968. Seasonal changes in body and adrenal weights of chipmunks (*Eutamias*). *J. Mamm.* 49:463-474.
- Silva, E.J.R., Queiróz, D.B.C., Honda, L., Avellar, M.C.W. 2010. Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: Expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Mol. Cell. Endocrinol.* 325:64-77.
- Silva, E.J., Queiróz, D.B., Rodrigues, A., Honda, L., Avellar, M.C. 2011. Innate immunity and glucocorticoids: potential regulatory mechanisms in epididymal biology. *J Androl.* 32:614-624.

- Sitteri, P.K., Wilson, J.D. 1974. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38:113-125.
- Song, I.H., Buttgereit, F. 2006. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246:142-146.
- Sottovia-Filho, D. 1974. Morphological and histochemical study of mast cells in lizards and frogs, with special reference to the so-called "summer cells" or "Stilling cells" of Amphibians. *J. Herpetol.* 8:305-309.
- Spencer, R.L., Young, E.A., Choo, P.H., McEwen, B.S. 1990. Adrenal steroid type I and type II receptor binding: estimates of in vivo receptor number, occupancy, and activation with varying level of steroid. *Brain Res.* 514:37-48.
- Stalvey, J.R.D. 2002. Inhibition of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase in mouse adrenal cells: a direct effect of testosterone. *Steroids.* 67:721-731.
- Stolte, E.H., van Kemenade, B.M., Savelkoul, H.F., Flik, G. 2006. Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. *J. Endocrinol.* 190:17-28.
- Strand, J.E., Aarseth, J.J., Hanebrekke, T.L., Jørgensen, E.H. 2008. Keeping track of time under ice and snow in a sub-arctic lake: plasma melatonin rhythms in Arctic charr overwintering under natural conditions. *J. Pineal Res.* 44:227-233.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science.* 306:1783-1786.
- Süren, S. 1999. The functional relationships between the neurosecretory material and the adrenal gland of *Rana ridibunda* (Amphibia-Anura). *Tr. J. of Zoology.* 23:305-311.
- Suyemitsu, T., Terayama, H. 1975. Specific binding sites for natural glucocorticoids in plasma membranes of rat liver. *Endocrinology.* 96:1499-1508.

- Swezey, N.B., Ghibu, F., Gagnon, S., Schotman, E., Hamid, Q. 1998. Glucocorticoid receptor mRNA and protein in fetal rat lung in vivo: modulation by glucocorticoid and androgen. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 275:103-109.
- Tasker, J.G., Di, S., Malcher-Lopes, R. 2006. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology.* 147:5549-5556.
- Taylor, A. A., Davis, J. O., Braverman, B. 1972. Deoxycorticosterone secretion in the bullfrog: effects of ACTH, hypophysectomy, and renin. *Am. J. Physiol.* 223:858-863.
- Tesone, A.J., Regueira, E., Canosa, L.F., Ceballos, N.R. 2012. 5α -Reductase, an enzyme regulating glucocorticoid action in the testis of *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura). *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:10.1016/j.ygcen.2012.01.004.
- Thomas, J.L., Mason, J.I., Brandt, S., Spencer, B.R. Jr., Norris, W. 2002. Structure/function relationships responsible for the kinetic differences between human type 1 and type 2 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and for the catalysis of the type 1 activity. *J. Biol. Chem.* 277:42795-42801.
- Troyer, J.R. 1968. Neurosecretory material in the supraoptic-hypophyseal tract of the bat throughout the hibernating and summer periods: *Anat. Rec.* 162:407-415.
- Trueb, L. 1993. Patterns in cranial diversity among the Lissamphibia. En: Hanken, J., Hall, B.K. (eds.). *The Vertebrate Skull: Patterns of Structural and Systematic Diversity*, Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago, pp. 255-343.
- Usacheva, M.N., Teichert, M.C., Biel, M.A. 2001. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers. Surg. Med.* 29:165-173.
- Usacheva, M.N., Teichert, M.C., Biel, M.A. 2003. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers. Surg. Med.* 33:311-319.
- Uva, B., Deplano, S., Ghiani, P., Vaccari, L., Vallarino, M. 1977. Cytological changes promoted by ACTH in the adrenal gland of anuran amphibians. *Boll. Zool.* 44:195-198.

- Valenti, S., Fazzuoli, L., Giordano, G., Giusti, M. 2001. Changes in binding of iodomelatonin to membranes of Leydig steroidogenesis after prolonged in vitro exposure to melatonin. *Int. J. Androl.* 24:80-86.
- Valenti, S., Giusti, M., Guido, R., Giordano, G. 1997. Melatonin receptors are present in adult rat Leydig cells and are coupled through a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Eur. J. Endocrinol.* 136:633-639.
- Valenti, S., Guido, R., Giusti, M., Giordano, G. 1995. In vitro acute and prolonged effects of melatonin on purified rat Leydig cell steroidogenesis and adenosine 3',5'-monophosphate production. *Endocrinology.* 136:5357-5362.
- Van Kemenade, J.A.M. 1968. Effect of ACTH and hypophysectomy on the interrenal tissue in the common frog, *Rana temporaria*. *Zeit. Zellfor.* 92:549-566.
- van Oordt, G.J. 1960. The influence of internal and external factors in the regulation of the spermatogenetic cycle in amphibia. *Symp. Zool. Soc. London* 2:29-52.
- van Oordt, G.J., Klomp, H. 1946. Effects of oestrone and gonadotrophin administration in the male toad (*Bufo bufo*). *Proc. Kon. Nederl. Akad. Wet. (Biol. Med.)* 49:565-570.
- Varma, M.M. 1977. Ultrastructural evidence for aldosterone- and corticosterone-secreting cells in the adrenocortical tissue of the American Bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 33:61-75.
- Vera, L.M., De Oliveira, C., Lopez-Olmeda, J.F., Ramos, J., Mananos, E., Madrid, J.A., Sanchez-Vazquez, F.J. 2007. Seasonal and daily plasma melatonin rhythms and reproduction in Senegal sole kept under natural photoperiod and natural or controlled water temperature. *J. Pineal Res.* 43:50-55.
- Vera, L.M., López-Olmeda, J.F., Bayarri, M.J., y col. 2005. Influence of light intensity on plasma melatonin and locomotor activity rhythms in Tench. *Chronobiol. Int.* 22:67-78.
- Vitt, L.J., Caldwell, J.P. 2009. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 3ra edición. Academic Press, Burlington, Massachusetts, EEUU.

- Ward, C.K., Fontes, C., Breuner, C.W., Mendonça, M.T. 2007. Characterization and quantification of corticosteroid-binding globulin in a southern toad, *Bufo terrestris*, exposed to coal-combustion-waste. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152:82-88.
- Wasserman, G.F., Tramezzani, J.H. 1963. Separate distribution of adrenaline and noradrenaline-secreting cells in the adrenal of snakes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3:480-489.
- Wells, K.D. 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Anim. Behav.* 25:666-693.
- Webster, J.C., Jewell, C.M., Bodwell, J.E., Munck, A., Sar, M., Cidlowski, J.A. 1997. Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J. Biol. Chem.* 272:9287-9293.
- Wetzel, D.M., Kelley, D.B. 1983. Androgen and gonadotropin effects on male mate calls in South African clawed frogs, *Xenopus laevis*. *Horm. Behav.* 17:388-404.
- Wiest, J. 1982. Anuran successions at temporary ponds in a post oak-savanna region of Texas. Scott (Ed). *Herpetological Communities. Wildlife Research Report.* EEUU. 13:39-47.
- Woody, C.J., Jaffe, R.C. 1982. Partial characterization of frog (*Rana catesbeiana*) hepatic glucocorticoid receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47:28-35.
- Wright, A., Chester Jones, I. 1955. Chromaffin tissue in the lizard adrenal gland. *Nature.* 175:1001-1002.
- Yao, M., Hu, F., Denver, R.J. 2008. Distribution and corticosteroid regulation of glucocorticoid receptor in the brain of *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.* 508:967-982.
- Yajurvedi, H.N., Hooli, M.A. 1991. Histophysiological studies on sex steroid induced changes in the interrenals of the male frog *Rana cyanophlyctis* (Schn.). *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 74:89-96.

- Yoakim, E.G., Grizzle, J.M. 1980. Histological, histochemical and ultrastructural studies on the interrenal and chromaffin cells of the fathead minnow, *Pimephales promelas*, Rafinesque. *J. Fish Biol.* 17:477-494.
- Young, G., Thorarensen, H., Davie, P.S. 1996. 11-Ketotestosterone suppresses interrenal activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 103:301-307.
- Yudt, M.R., Cidlowski, J.A. 2002. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol. Endocrinol.* 16:1719-1726.