

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**PURIFICACIÓN PARCIAL DE UN FACTOR
INHIBIDOR DE LA SÍNTESIS DE TESTOSTERONA,
A PARTIR DE MEDIOS CONDICIONADOS POR
CÉLULAS DE SERTOLI**

Tesis que presenta

Lorena Soledad de la Concepción Ruiz Paniagua

**Para la obtención del grado de Maestría en Biología
Experimental**

México, D. F., diciembre 1994

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa cuenta con el apoyo del CONACyT, según convenio PFPN\66\92, por considerarsele con nivel de excelencia

Agradezco a CONACyT el apoyo económico que me brindo durante mis estudios, através de la beca con número de registro 5678.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Mecanismos de Regulación Hormonal del Departamento de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, bajo la tutoría de el M. en B. E. Joaquín Fernando Herrera Muñoz y la asesoría de el M. en C. Héctor Fernando Serrano y el M. en C. José Alfonso Arroyo Reyna.

**A todas y cada una de las personas sin cuyo apoyo
y comprensión hubiera sido imposible llevar a su fin
este trabajo.**

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	2
FISIOLOGÍA TESTICULAR	2
TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	2
Células peritubulares	2
Células espermáticas	4
Células de Sertoli.....	4
TEJIDO INTERSTICIAL	6
Células de Leydig.....	7
COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS	7
Ambientales.....	7
Nutricionales	10
Reguladora.....	10
Interacción SC-GC	10
Interacción SC-PC.....	10
Interacción SC- LC.....	11
HPLC PARA LA PURIFICACIÓN DE MACROMOLÉCULAS.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
HIPÓTESIS	20
METODOLOGÍA	21
1. Obtención de MCCS	21
2. Concentración del MCCS.....	21
3. Cuantificación de proteínas.....	22
4.- Obtención de fracciones proteicas.	23
5.- Determinación de la actividad biológica.	23
RESULTADOS	25
OBTENCIÓN DE LOS MCCS.....	25
CONCENTRACIÓN DE LOS MCCS.....	25
FRACCIONAMIENTO DE LOS CONCENTRADOS	28
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

ABREVIATURAS

ABP	Proteína Unidora de Andrógenos
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
cAMP	Adenosin Monofosfato Cíclico
GC	Células Germinales
LC	Células de Leydig
SC	Células de Sertoli
PC	Células Peritubulares
DME	Medio Mínimo de Dulbeco modificado por Eagle
EGF	Factor Estimulador del Crecimiento
FSH	Hormona Foliculo Estimulante
IGF-I	Factor de Crecimiento similar a Insulina -1
IL-1	Interleucina 1
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
LCI	Inhibidor de las Células de Leydig
LH	Hormona Luteinizante
α MSH	Hormona Estimulante de los Melanocitos
PmodS	Factor de las células peritubulares que modifica la actividad de las células de Sertoli.
POMC	Proopiomelanocortina
SEC	Cromatografía de Exclusión Molecular
T	Testosterona
TGF α	Factor de Transformación y Crecimiento α
TGF β	Factor de Transformación y Crecimiento β
Ve	Volumen de Elusión

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Las dos funciones características del testículo son, por una parte la síntesis y secreción de andrógenos y por otra la espermatogénesis. Se han estudiado, entre los diversos tipos de células del testículo, las posibles formas de regulación de estas dos funciones, así como los factores que intervienen en ellas y se ha demostrado que, además de los ampliamente conocidos factores de tipo endocrino, también están involucrados mecanismos de tipo paracrino (Saez, 1987; Skinner, 1990; Papadopoulos, 1987). Desde hace varios años, se ha demostrado que las LC, SC y GC secretan una gran cantidad de factores de diversa naturaleza, entre ellos proteínas, y algunos tienen efectos paracrinos. Las SC son las que más se han estudiado y se sabe ahora que sintetizan y secretan al menos 100 proteínas, cuyos pesos moleculares fluctúan de 16 hasta 140 KDa y, aunque se conocen varias de estas proteínas secretadas, menos de 30 han sido aisladas e identificadas (Wilson, 1979; Jégou, 1992).

FISIOLOGÍA TESTICULAR

TÚBULOS SEMINÍFEROS

La pared externa de los túbulos seminíferos está formada por las células peritubulares (PC) y en la parte interna se encuentra el epitelio germinal, formado por una población fija de SC y una población móvil de GC (Figura 1).

Células peritubulares

Los túbulos seminíferos están rodeados por una o varias capas estructurales, que están en contacto con la superficie basal de las SC a través de la lámina basal. La organización de esta envoltura varía de una especie a otra. Ultraestructuralmente, estas células tienen los rasgos característicos del músculo liso y son contráctiles. No puede llamárseles verdaderas células musculares lisas, a causa de su forma atípica y su organización epiteliode, por lo que se les denomina células peritubulares o mioides. Se cree que son responsables de la estabilidad estructural y de las contracciones rítmicas que se observan en los túbulos seminíferos. Además, son responsables de la formación del primer paso de la barrera hemato-testicular, que es de gran importancia para el desarrollo de las GC (Fawcett, 1989).

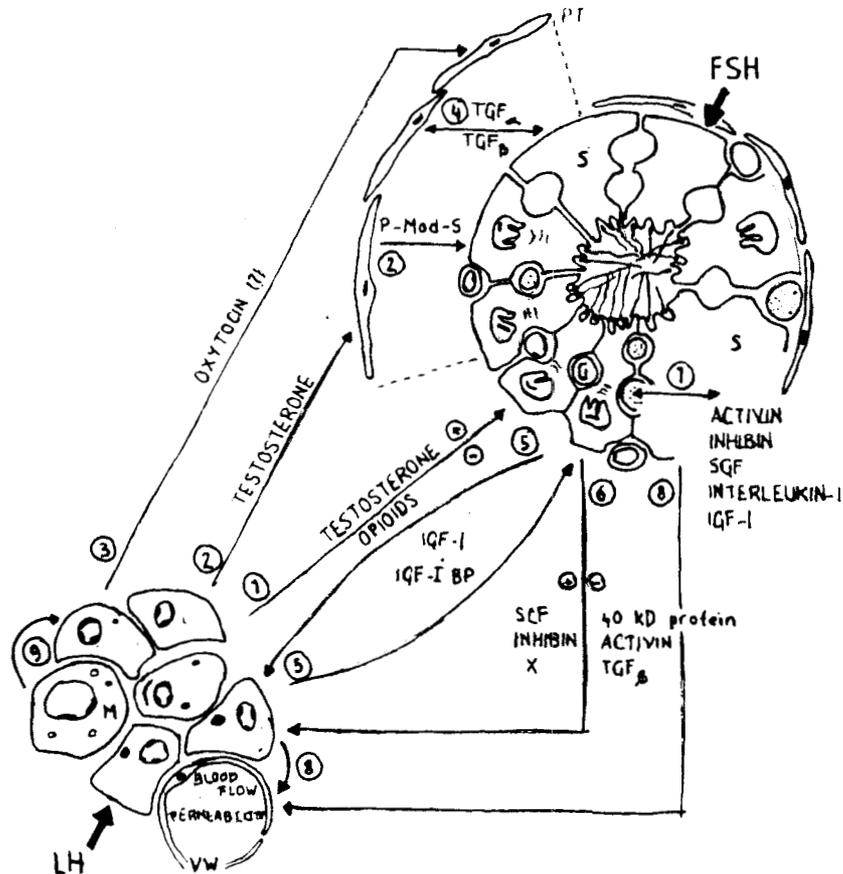


Figura 1. Principales tipos celulares dentro del testículo y algunas de sus interacciones paracrinas, así como los factores que pueden estar involucrados. 1. Factores de las CL que actúan sobre las SC. 2. Efectos indirectos de los andrógenos mediados por las PC. 3. Interacción entre PC y LC. 4. Interacciones recíprocas entre las SC y PC. 5. Interacciones recíprocas entre el intersticio y los túbulos mediadas por IGF-1 y proteínas unidoras de IGF-1. 6. Factores tubulares que modulan la función de las LC. 7. Interacciones SC-GC. 8. Factores tubulares e intersticiales que afectan el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular. 9. Interacciones macrófagos-LC. G, GC; L, LC; M, macrófagos; PT, PC; S, CS; VW, paredes de los vasos (Verhoeven, 1992).

Células espermáticas

Las GC forman una capa estratificada de cuatro a ocho células de grosor que, unidas a las SC, revisten los túbulos seminíferos y se diferencian progresivamente de la región de la lámina basal del tubo hacia la luz. La proliferación-diferenciación parece desplazar a las células a partir de la base y ocasiona que las más cercanas a la luz se transformen en espermatozoides, que se desprenden del epitelio y quedan libres (Lesson, 1985; Fawcett, 1989).

A la secuencia de eventos de proliferación-diferenciación que resultan en la formación de espermatozoides, se le denomina espermatogénesis, y en la mayoría de los mamíferos está dividida en estadios. En términos generales, se pueden tomar tres etapas principales: a) la renovación de las células primordiales, por mitosis; b) la reducción del número de cromosomas, por meiosis; y c) la transformación de una célula 'típica' en un espermatozoide. En esta última etapa, suceden una serie de cambios que no involucran división celular y que representan un proceso de metamorfosis llamado espermiogénesis (Krestser, 1988).

Células de Sertoli

Las SC se extienden desde la lámina basal, mediante la cual están en contacto con las PC, hacia el lumen del túbulo seminífero. En la mayoría de los animales adultos, el núcleo es grande e irregular y está normalmente situado en la parte basal de la célula. El citoplasma de las SC comúnmente se encuentra polarizado, localizándose la mayor proporción de organelos en la parte basal y la menor en la parte apical (Jégou, 1992).

Las funciones principales de las SC son: soporte estructural del epitelio seminífero; desplazamiento de las GC y liberación de los espermatozoides; formación de la barrera hemato-testicular, y secreción de varios productos de importancia en la regulación y nutrición de las GC (Jégou, 1992).

En términos generales, la barrera hemato-testicular está formada por tres capas que sirven de filtros, cada vez más finos: la capa circundante de células peritubulares mioideas, la lámina basal y formalmente las uniones estrechas Sertoli-Sertoli, más restrictivas como filtro y que no permiten el paso de diversas sustancias de bajo peso molecular. Esta barrera divide funcionalmente los testículos en dos compartimientos: uno de tejido intersticial vascularizado, formado principalmente por LC, macrófagos, vasos linfáticos y tejido conectivo laxo, y otro de túbulos seminíferos que contienen SC y células germinales en diversas etapas de

diferenciación (Saez, 1987; Wayne, 1988).

En el mismo túbulo seminífero, los complejos especializados de unión estrecha entre las SC, dan lugar a una barrera hemato-testicular tan efectiva, que genera diferencias en la composición química entre el líquido del túbulo seminífero y el líquido intersticial. Estas uniones dividen al epitelio germinal en el compartimiento basal que contiene a las espermatogonias y la zona basal de las SC del compartimiento adluminal en el que se encuentran los espermátocitos, las espermátidas, los espermatozoides, así como la zona apical de las SC, cada compartimiento con un ambiente diferente y único, por lo que la barrera hemato-testicular tiene una gran importancia para la espermatogénesis (Jégou, 1992).

Como se había mencionado, las SC son el principal elemento secretor del epitelio germinal y proveen, entre otras cosas, de las sustancias nutritivas necesarias a las células germinales en desarrollo. De entre las sustancias que sintetizan y secretan, algunas pueden formar parte del líquido seminífero como algunos oligopéptidos, esteroides y proteínas; una de estas últimas, específica de las SC, es la proteína unidora de andrógenos (ABP) (Wayne, 1988). Además de las proteínas específicas como la ABP y la inhibina, las SC producen varias proteínas que habían sido identificadas previamente en suero y/o sintetizadas por otros tipos celulares, como la transferrina (transportadora de hierro), la ceruloplasmina (transportadora de cobre), clusterina, activador de plasminógeno, α_2 -macroglobulina (inhibidora de proteasas), albúmina testicular, etc. (Wayne, 1988; Stahler, 1990; Cheng, 1989). Aproximadamente entre el 4-14% de las proteínas son glucoproteínas de secreción, más del 80 % del total son proteínas unidoras de metales, mientras que algunas otras, como la prodinorfina, representan sólo alrededor del 0.006 % de la secreción total. Si un producto es secretado en niveles bajos de concentración, no quiere decir que su función no sea de importancia. De hecho, eso ayuda, según algunos autores, a que las funciones de los diferentes productos secretados puedan ser explicadas con respecto a sus niveles de producción. Los péptidos o proteínas secretadas en bajas concentraciones, pueden estar involucradas preferentemente en acciones locales (autocrino o paracrino), mientras que las producidas a niveles más altos, pueden actuar a mayores distancias (endocrino) (Jégou, 1992).

La primera proteína secretada por las SC en ser descubierta, fue la ABP en rata. El papel fisiológico de esta proteína no es muy claro aún, ya que, a pesar de que se ha encontrado en la mayoría de los mamíferos, en algunos como el verraco o el caballo, no se ha podido

determinar su presencia. Puede actuar como un acarreador intracelular de andrógenos tanto en las SC como en las células epiteliales de la cabeza del epidídimo y posiblemente en las GC. Además puede servir de acarreador y fijador para almacenar andrógenos en el fluido de los túbulos seminíferos. Desde el descubrimiento de la ABP, al menos otras 30 proteínas han sido caracterizadas o identificadas, las cuales en su mayoría pueden estar involucradas en las interacciones entre las células del testículo (Tabla 1).

Tabla 1. Factores con identidades bioquímicas conocidas, que pueden actuar sobre las LC y las SC de forma paracrina o autocrina ^a.

Tipo de Factor	Células de Leydig	Células de Sertoli
Hormonas peptídicas	Agiotensina II (L, G) ^b	ACTH (L)
	Factor Natriuretico Atrial (U)	α-MSH (L)
	Oxitocina (S, L)	Opioides (L, S, G, P)
	Vasopresina (U)	
Esteroides	Andrógenos (L)	Andrógenos (L)
	Estrógenos (L, S)	Estrógenos (L, S)
Factores de Crecimiento	Activina (S, L)	bFGF (S)
	Inhibina (S, L)	IGF-1 (S, P, L)
	bFGF (S)	NGF (G)
	IGF-1 (S, P, L)	TGFα (S, P, L)
	TGFα (S, P, L)	
	TGFβ (S, P)	
Factores liberadores	LHRH (U)	
	CRF (L, G)	
Citocinas	Interleucina-1 (S, M)	
	Interleucina-2 (U)	

^a Tomado de Verhoeven (1992).

^bLa fuente del factor esta indicada entre paréntesis: G, GC; L, LC; M, macrófagos; P, PC; S, SC; U, desconocido.

TEJIDO INTERSTICIAL

El llamado tejido intersticial, que llena los espacios entre los túbulos seminíferos, es del tipo conectivo laxo y está formado principalmente por grupos de LC (Figura 1), las células endoteliales que limitan los espacios capilares sanguíneos y linfáticos, contiene algunos fibroblastos, macrófagos, ocasionalmente células cebadas y unas pocas células,

relativamente indiferenciadas, de origen mesenquimatoso, que bajo el estímulo apropiado de gonadotropinas, pueden llegar a convertirse en LC (Fawcett, 1989).

Células de Leydig

Las células especializadas dentro del tejido intersticial son conocidas como células de Leydig (Skinner, 1991). La función principal de las LC es la esteroidogénesis, que tiene como fin la producción de T. En este sentido y aunque son capaces de sintetizarlo, las LC toman el colesterol que comúnmente les llega desde el torrente sanguíneo, convirtiéndolo en pregnenolona (Fig. 2). Para la posterior transformación de ésta en T, existen dos rutas metabólicas principales, denominadas Δ^4 y Δ^5 (fig 3) en base a la posición del doble enlace de la mayoría de sus componentes intermedios. La ruta principal utilizada por las LC es la de los Δ^4 (Mann, 1981; Ewing, 1977).

COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS

Dentro de un organismo, las interacciones entre los diferentes aparatos y sistemas tienen un papel determinante para que exista un buen funcionamiento. Este concepto es también aplicable a nivel tisular, en donde las interacciones entre los diferentes tipos celulares son determinantes para el mantenimiento, regulación, diferenciación, funcionamiento y crecimiento del mismo.

Los mecanismos de control local pueden tomar diferentes formas: las células pueden intercambiar material e información por conexiones directas, tales como uniones especializadas o puentes intercelulares. Además, pueden interactuar por medio de mecanismos paracrinos a través de la secreción de sustancias, las cuales afectan la función de las células vecinas. De acuerdo con Skinner (1991), estas interacciones pueden ser divididas en tres categorías: ambientales, nutricionales y reguladoras, dependiendo de la naturaleza de los mensajeros químicos involucrados.

Ambientales

Las células colaboran en la formación de un ambiente específico, contribuyendo, por ejemplo, en la creación de la matriz extracelular, o bien en la secreción de proteínas específicas de adhesión y así crear un microambiente único. Para que este tipo de interacción se lleve a cabo, es necesario un contacto estrecho entre las estirpes celulares que participan.

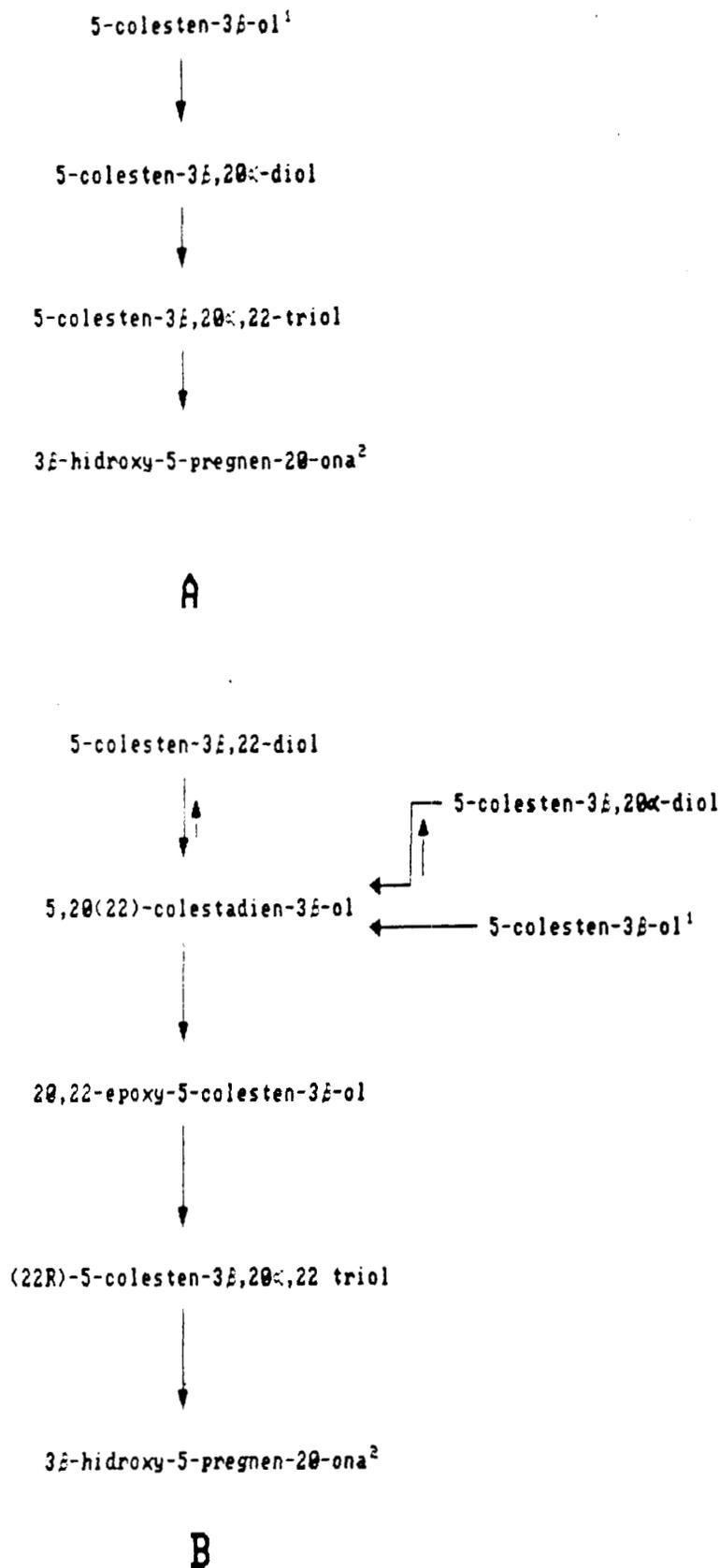


Fig. 2. (A) Ruta para la formacion de pregnenolona a partir de colesterol, propuesta por Hall. (B) Revision reciente de la via de sintesis de pregnenolona a partir de colesterol (15). (1) colesterol, (2) pregnenolona.

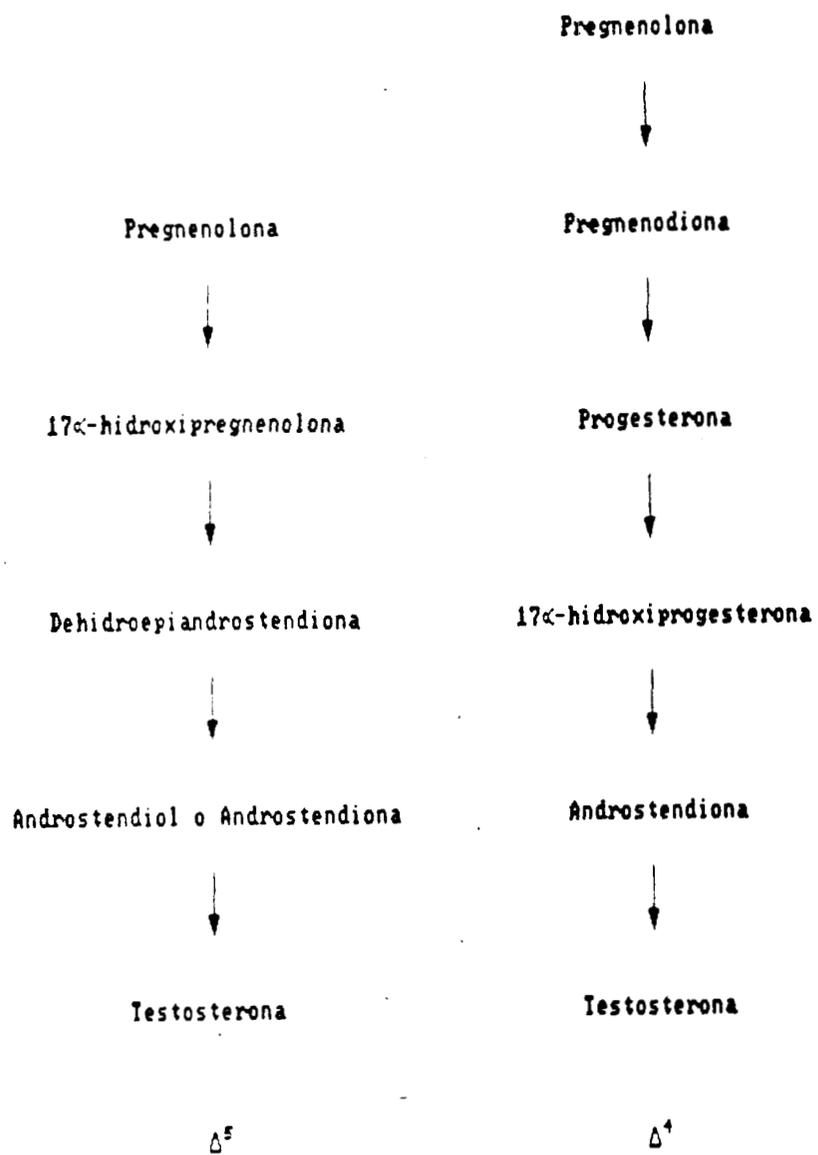


Fig. 3. Posibles vias de síntesis Δ^4 y Δ^5 , para testosterona (15).

Nutricionales

Implica el suplemento de nutrientes esenciales para la supervivencia y funcionamiento óptimo. Cuando un determinado metabolito necesario para una célula es liberado por otro tipo celular, se lleva a cabo una interacción de tipo nutricional.

Reguladora

Cuando un compuesto es producido por un tipo celular y actúa sobre otro (o sobre el mismo) dando lugar a una señal que induce una respuesta celular específica; a esta interacción se le denomina reguladora.

Una combinación de estos tres diferentes tipos de interacciones da lugar a un mecanismo de control apropiado para el mantenimiento de un ambiente único, para cada célula en particular, que se ajuste a su función en un momento determinado (Skinner, 1990, Verhoeven, 1992).

Interacción SC-GC

De la citoarquitectura de las SC y la naturaleza de sus productos secretados, se ha deducido que tienen una gran influencia sobre las GC en diferentes formas: estructural y nutricionalmente (barrera hemato-testicular, fluido tubular, metabolitos nutricionales); controlando la progresión de las GC en diferenciación, hacia la luz del túbulo y la liberación de los espermatozoides; traduciendo señales extracelulares (FSH, T); y controlando, al menos en parte, sus divisiones (factores de crecimiento) (Jégou, 1992).

A pesar de la íntima relación existente entre estos dos tipos celulares, es poco lo que se conoce acerca de la influencia de las GC sobre las SC, ya que sólo en la última década se ha aceptado que las GC pueden modular, en forma paracrina, las funciones de las SC. Recientemente se ha demostrado la existencia de dos proteínas, derivadas de medios condicionados de "espermátidas redondas". Una de ellas es de 24.5 KDa (Onoda, 1993a) y la otra es de 29 KDa (Onoda, 1993b), ambas aumentan significativamente la síntesis de proteínas en las SC.

Interacción SC-PC

Es poco lo que se sabe acerca de los factores involucrados en la modulación de las PC por las SC. Se sabe por ejemplo, que ambos tipos celulares cooperan en la formación de la matriz extracelular y de la lámina basal; además se ha observado que si las funciones de las SC son modificadas, se manifiestan alteraciones dramáticas en la morfología de las PC (Jégou, 1992).

Existen dos factores, $TGF\alpha$ y $TGF\beta$, que son sintetizados por ambos tipos celulares y que se unen al receptor de EGF. Se cree que el $TGF\alpha$ puede ser un sustituto o un complemento del EGF y, como resultado de algunos experimentos, se ha demostrado que afecta la diferenciación y la migración de las PC, ayudando en la formación de racimos con las SC. Además al cultivar SC en presencia de EGF, se observó que este factor estimula la secreción de lactato e inhibina. Estas acciones sobre ambas células son importantes no sólo para el desarrollo de los túbulos seminíferos, sino también para la función testicular en el adulto (Verhoeven, 1992).

Por otro lado, se sabe que las PC secretan un factor al que se le ha denominado PmodS, el cual se cree que, de manera indirecta, modula la acción que los andrógenos tienen sobre las SC, ya que se ha observado que tiene un efecto estimulador sobre la producción de ABP, por lo que algunos autores lo utilizan como marcador del buen funcionamiento de las SC (Verhoeven, 1992).

Interacción SC- LC

La importancia funcional de las LC fue demostrada al determinar que son el sitio de producción de andrógenos y que la LH, a través de la acción del cAMP, estimula la secreción y producción de andrógenos. Estos fueron los primeros en ser investigados como agentes paracrinos involucrados en las interacciones célula-célula en el testículo (Cunningham, 1979).

La localización de las LC en el intersticio y la presencia de las PC en la zona periférica del túbulo seminífero, así como la membrana basal no permiten el contacto físico entre las SC y las LC, por lo que no es posible entre ellas una interacción de tipo ambiental. Debido a la inexistencia de contacto entre estas células y a que ambas pueden tener acceso a nutrientes mediante el fluido intersticial y el sistema circulatorio, la existencia de interacciones nutricionales entre estas estirpes celulares es mínimo (Skinner, 1991).

La producción de andrógenos por las LC y la habilidad de éstos para mantener el proceso de la espermatogénesis, ha llevado a muchos laboratorios a investigar la función de aquellos esteroides sobre las SC, las cuales contienen y expresan el receptor de andrógenos que es diferente de ABP. La acción de los andrógenos observada, *in vitro*, no se detecta o es menor que la producida por la FSH (Ailenberg, 1990).

La habilidad de las PC para aumentar la acción de los andrógenos sobre las SC, sugiere que la actividad de aquéllos puede ser de manera indirecta. Además de los andrógenos, existen otros factores sintetizados por las LC que pueden influenciar a las SC. Entre estos se encuentran algunos péptidos y proteínas como la renina, la prodimorfina, la oxitocina, así como el POMC y péptidos relacionados (Bardin, 1987).

Algunos péptidos derivados de la POMC como el α -MSH y la ACTH tienen una acción poco estimulante, que aparentemente involucra cambios en los niveles de cAMP (Fabbri, 1985). Otro derivado es la β -endorfina y se ha demostrado que el receptor para este péptido se encuentra en las SC. Aunque la β -endorfina sola tiene únicamente un ligero efecto, puede disminuir parcialmente la habilidad de la FSH para estimular las SC. La concentración requerida de estos péptidos POMC es relativamente alta y no se ha demostrado que tengan un efecto significativo sobre las SC, en comparación con factores como la FSH (Juniewicz, 1988; Margioris, 1989).

En cocultivos de LC con SC se ha demostrado que estas últimas generalmente incrementan tanto las funciones basales como las estimuladas de las LC y que la FSH, indirectamente a través de las SC, estimula la esteroidogénesis de las LC. Determinar el tipo celular que da origen a los factores involucrados en este tipo de cocultivos puede resultar problemático, por lo tanto, se ha optado por el uso de dos cámaras separadas por una membrana que prevenga el contacto entre los dos tipos celulares. Mediante esta última forma experimental se ha demostrado que los factores involucrados en la regulación de las LC por las SC, son moléculas que se difunden a través del medio de cultivo (Verhoeven, 1992).

Otro método para evitar el contacto entre los dos tipos celulares, es el uso de cultivos primarios separados, con los que es posible generar medios condicionados por alguna de las estirpes celulares involucradas para que, posteriormente, sean probados sus efectos sobre la otra estirpe celular; de esta forma se han desarrollado MCCS o medios condicionados de túbulos seminíferos. Con estos medios se ha demostrado la existencia de actividades estimuladoras e inhibitorias de las funciones basal y estimulada de las LC (Bermúdez, 1988; Verhoeven, 1992).

Varios productos de secreción de las SC han sido identificados como reguladores potenciales de la relación SC-LC. Uno de estos factores es el estradiol, sintetizado por las SC a partir de

andrógenos, que tiene un efecto inhibitor sobre la producción de T en las LC. Existen otros factores que afectan la actividad de las LC de diversas formas, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Factores presentes en las interacciones regulatorias entre LC-CS^a

Factor paracrino potencial	Sitio de producción	Sitio de acción	Función Propuesta
Andrógenos	Leydig	Sertoli	Regulación/mantenimiento de la función y la diferenciación
Péptidos POMC β-endorfina MSH, ACTH	Leydig	Sertoli	Disminuye las acciones de la FSH Incrementa las acciones de la FSH/ cAMP
Factor estimulador (?) (dependiente o independiente de FSH)	Sertoli	Leydig	Incrementa la esteroidogénesis
Factor similar a la hormona liberadora de LH	Sertoli	Leydig	Disminuye la esteroidogénesis
Estrógenos	Sertoli	Leydig	Disminuye la esteroidogénesis
IGF-1	Sertoli	Leydig	Aumenta la esteroidogénesis
TGF α	Sertoli	Leydig	Disminuye la esteroidogénesis
TGF β	Sertoli	Leydig	Disminuye la esteroidogénesis
IL-1	Sertoli	Leydig	Disminuye la esteroidogénesis
Inhibina	Sertoli	Leydig	Aumenta la esteroidogénesis

^aTomada de Skinner, 1991.

Las sustancias con actividades biológicas presentes en los medios condicionados requieren de aislamiento y caracterización bioquímica para poder establecer su función y tener un mayor conocimiento de las interacciones celulares. Varios de los efectos estimulatorios e inhibitorios observados en los MCCS, pueden ser atribuidos a factores reguladores conocidos como el IGF-I, IL-1, TGF α o TGF β , por lo que es necesario un mayor análisis para determinar su importancia en las interacciones celulares y su relevancia fisiológica (Skinner, 1991).

REGULACIÓN TESTICULAR

Las dos principales funciones testiculares, la espermatogénesis y la esteroidogénesis, dependen, en primera instancia, de la acción sinérgica de las hormonas hipofisarias LH y FSH (Saez, 1987). La secreción de éstas por la porción anterior de la glándula adenohipófisis, está bajo la estimulación positiva de la hormona liberadora de gonadotropinas de origen hipotalámico, y un control negativo en el que participan la T y el estradiol, además de inhibina y otros factores de origen testicular (Amann, 1989).

Para la espermatogénesis se requieren tanto la FSH como la LH. La primera actúa directamente sobre las SC y su función principal es iniciar la espermatogénesis; la función de la segunda es un efecto estimulante en la biosíntesis de T en las LC, misma que proporcionan al epitelio germinal para el complemento de la espermatogénesis (Saez, 1987) que, además, desarrolla y mantiene los caracteres sexuales secundarios (Connell, 1977). Sin embargo, hay evidencias que indican que la regulación de la función testicular puede ser modulada localmente. Por lo tanto, se puede decir que las hormonas hipofisarias proveen el estímulo básico, del cual depende la función, mientras que el tiempo y la intensidad de la respuesta de las células del testículo a esta estimulación, parece estar modulada por complejas interacciones intratesticulares (Wayne, 1988; Saez, 1987).

En años recientes, mediante el empleo de diversas técnicas como fracciones enriquecidas, cocultivos (Aquilano, 1984) o cultivos primarios (Mather, 1984) de los diferentes tipos celulares presentes en los testículos, se ha contribuido al mejor entendimiento del control hormonal de la esteroidogénesis que se lleva a cabo en las LC. Así han aumentado las evidencias en las que, además de las gonadotropinas y otros factores extratesticulares, algunos moduladores locales contribuyen a la regulación de la función testicular en la rata (Saez, 1987). Se han descrito y propuesto una amplia variedad de productos secretados por las SC, que afectan la actividad esteroidogénica de las LC (Sharpe, 1984, Verhoeven, 1987) y se ha sugerido que los esteroides producidos en las SC pudieran ser responsables de la actividad moduladora (Hsueh, 1978). No obstante, diversos autores han descrito en MCCS la presencia de factores de naturaleza proteica, a los cuales se les han atribuido funciones tanto activadoras como inhibitoras (Syed, 1988; Parvinen, 1990; Verhoeven, 1990, Cailleau, 1991, Zwain, 1991; Papadopoulos, 1987; Grootenhuis, 1990). Ya que la naturaleza de algunos de los factores responsables de los efectos sobre cultivos primarios de LC no ha sido completamente

definida, se requiere un estudio más detallado y con metodología actualizada (como métodos de separación cromatográfica) para determinar la naturaleza bioquímica de estos moduladores y sus posibles mecanismos de acción.

HPLC PARA LA PURIFICACIÓN DE MACROMOLÉCULAS

Fundamentos teóricos de la separación cromatográfica

Las técnicas de filtración y permeabilidad por geles ya eran muy usadas hace algún tiempo, pero dada su naturaleza identificable con el progreso cromatográfico, con facilidad se han incorporado recientemente al mundo del HPLC (García, 1988). Esta no es una técnica nueva, sino que representa un avance en la teoría operacional y en la fabricación de sistemas cromatográficos. Los sistemas de HPLC para la separación de macromoléculas varían de los otros (como la SEC, cromatografía en capa fina, etc.) en tres características: 1) los materiales de relleno tienen mayor resistencia mecánica; 2) el tamaño de la partícula es de 5-10 veces menor, mejorando la cinética de adsorción-elusión, con lo que disminuye el ensanchamiento de los picos y 3) las columnas pueden operarse a una mayor velocidad de la fase móvil (10-60 veces) (Chicz, 1990).

En la mayoría de los casos, excepto en la SEC, la resolución cromatográfica de macromoléculas es un proceso de adsorción, en el cual los solutos se adhieren a la superficie del material de relleno de la columna en forma diferencial.

Las macromoléculas difieren físicamente en su tamaño, forma, hidrofobicidad y el arreglo de los grupos funcionales en la estructura tridimensional de la molécula. De acuerdo con estas características podemos dividir los métodos cromatográficos de la siguiente manera: de exclusión molecular (discriminación de tamaño y forma), de intercambio iónico (separación por carga), de interacción hidrofóbica (hidrofobicidad de la superficie), de fase reversa (hidrofobicidad en general), de afinidad a metal inmovilizado (histidinas disponibles en superficie) y de bioafinidad (distribución de aminoácidos específicos en la superficie de las proteínas) (Chicz, 1990).

La cromatografía de exclusión se basa en la diversa penetrabilidad en poros de las moléculas. No se trata de fuerzas claramente establecidas (adsorción, iónicas, partición) sino de una mayor o menor probabilidad de entrar en, mayor o menor grado, en los poros que para el

efecto poseen las partículas de relleno, lo que produce un avance diferencial a lo largo de la columna de las distintas moléculas inyectadas y cuanto más avanzan por la columna, más separadas quedan (García, 1988).

La discriminación entre las moléculas por su tamaño, esta basada en el paso diferencial por las matrices de porosidad controlada. Por lo tanto, las moléculas pequeñas, como el óxido de deuterio, pasa a través del volumen líquido dentro de y entre las partículas de la columna y finalmente eluye de la columna en un volumen líquido denominado volumen de máxima exclusión (V_t). Por otro lado, macromoléculas que son muy grandes para penetrar en los poros de la matriz, son excluidos del volumen del líquido interno y eluyen en lo que se llama volumen vacío de la columna (V_o), que es igual al volumen líquido entre las partículas de la matriz. Substrayendo de V_t el V_o se obtiene el volumen interno (V_i) del material de relleno de la columna. Todas las macromoléculas que interactúan con el relleno de la columna eluyen entre esos dos extremos. El volumen de elusión de todas las macromoléculas esta dado por la ecuación:

$$V_e = V_o + K_s V_i$$

donde K_s es el coeficiente de distribución de exclusión, en un intervalo de entre cero, para las moléculas excluidas totalmente, y uno, para las que pasan a través de todo el relleno (Chicz, 1990).

Debido a la gran abundancia y variedad de las proteínas del testículo que pudieran intervenir en su regulación paracrina, se han utilizado varios métodos para su aislamiento y purificación. Las técnicas utilizadas para este propósito son diversas y pueden variar de entre los diferentes laboratorios. Algunos utilizan la SEC, otros HPLC de fase reversa o normal, o bien, combinaciones de estos tipos en forma secuencial, variando no solo el tipo de cromatografía, sino también el tipo de fases móviles utilizadas.

La mayoría de los estudios realizados para analizar la regulación testicular, involucran individuos púberes o aún prepúberes, por lo que las células que componen el testículo no se han diferenciado totalmente, al menos en sus aspectos fisiológicos. Este modelo puede

resultar inadecuado, ya que tanto los factores sintetizados por las células maduras, con todas sus funciones definidas, como respuesta a factores externos, pueden variar mucho debido a que en la regulación de las células inmaduras es posible que estén involucrados algunos factores de diferenciación que no se encuentran en animales adultos

También es muy común que, al hacer estudios de regulación testicular, se utilicen animales a los que se les ha practicado la hipofisectomía, orquidectomía, criptorquidia, o bien se les ha administrado algún compuesto o tratamiento que destruye un tipo celular específico dentro del testículo. Más aún, también han sido utilizadas líneas celulares provenientes de tumores cancerosos (Cailleau, 1991; Stocco, 1992; Zwain, 1991). Todos estos modelos se apartan, poco o mucho, de las condiciones fisiológicas de los animales adultos normales y, por lo tanto, sus resultados deben ser tomados con cuidado, así como los resultados de los estudios *in vitro*, ya que pueden diferir de las condiciones fisiológicas *in vivo*.

Debido a los problemas metodológicos y éticos relacionados a la experimentación con células humanas, se han hecho estudios acerca de los factores que intervienen en la regulación de las funciones de las células del testículo en modelos animales y los principales han sido rata, ratón y cerdo; en ellos se demostró la existencia de algunos factores. Sin embargo los estudios existentes son, como se menciono anteriormente, en animales inmaduros (Saez, 1989; Fujisawa, 1992; ; Benahmed, 1989; Cailleau, 1991), o bajo algún tratamiento (Cailleau, 1991; Stocco, 1992; Zwain, 1991).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a todo lo anterior y a la necesidad de un mayor y mejor entendimiento de la función testicular normal en el organismo adulto, nuestro grupo de trabajo ha optado por tener como modelo experimental la rata, representada por individuos normales (sin ninguna modificación) y que hayan alcanzado la madurez sexual (al menos 60 días de edad); utilizando cultivos primarios de fracciones celulares enriquecidas para la obtención de MCCS y probando su efecto en la síntesis de T, midiendo la concentración de ésta última por medio de RIA, en los medios de cultivos primarios de fracciones enriquecidas de LC. Así se ha demostrado que existe un factor inhibidor de la síntesis de T que proviene de las SC, que es sensible a la tripsina y al calor, por lo que se presume que es de naturaleza proteica (Bustos, 1991). Además, la actividad inhibitoria del MCCS se ve incrementada por la presencia de FSH, AMPc y por el estradiol en el cultivo de las SC (Herrera, 1991; Herrera, 1992).

También se observó que al intentar medir la concentración de proteína en los MCCS por el método de Groves, era tan pequeña que se salía del intervalo de sensibilidad del método (10 μ g), por lo que se definió la necesidad de utilizar un método con mayor sensibilidad además de concentrar los medios, para poder medir la concentración de proteínas presente (Ruiz, 1991).

Por la necesidad de tener un mayor conocimiento sobre este factor modulador presente en MCCS, parece estar indicado proceder a su purificación con métodos de alta sensibilidad. Para ello debe de tomarse en cuenta que al tener una concentración, como proteína, muy pequeña se requiere la obtención de un volumen importante de MCCS y más aún, hay que realizar una concentración de los MCCS para obtener una cantidad conocida de proteína medible que permita trabajar en el aislamiento y purificación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones óptimas necesarias para que a partir de MCCS y mediante HPLC, se obtengan fracciones proteicas, que mantengan la actividad inhibidora sobre la síntesis de T, en cultivos primarios de LC.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener medios condicionados de células de Sertoli de ratas adultas normales.
2. Concentrar las proteínas presentes en los MCCS.
3. Obtener diferentes fracciones proteicas, a partir de los medios condicionados.
4. Concentrar las fracciones obtenidas.
5. Evaluar la capacidad inhibitoria de las diferentes etapas, sobre cultivos primarios de células de Leydig, midiendo la concentración de T por medio de RIA.

HIPÓTESIS

Por medio de filtración en gel es posible aislar fracciones con un factor de naturaleza proteica sintetizado por las SC, presente MCCS, que inhibe la síntesis de T en cultivos primarios de LC..

METODOLOGÍA

1. Obtención de M CCS

Se sacrifican, por dislocación cervical, ratas Wistar macho adultas (90 días de edad) normales y se extraen los testículos. Se lavan en una solución amortiguadora de Krebs-Ringer Glucosado (KRBG) a pH 7.4 y se descapsulan. Cada par de testículos se incuban en 7 ml de una solución de colagenasa Sigma 1G con una concentración final de 1 mg/ml, por 18 min a 37°C con agitación periódica. Se adicionan 15 ml de NaCl 0.9% invirtiéndose varias veces, se dejan reposar durante 10 min a 4°C; se filtran a través de una malla de poro 50-100 μ m, utilizando una pipeta Pasteur para trasvasar el sobrenadante. Para obtener la fracción enriquecida en SC, el precipitado testicular se fragmenta con bisturí, hasta obtener fragmentos de aproximadamente 5 mm, los cuales se incuban en 20 ml de pancreatina-KRBG (0.2 mg/ml), durante 20 min a 28°C con agitación periódica; se deja sedimentar durante 10 min a 4°C, se decanta el sobrenadante y la fracción celular se vuelve a fragmentar mecánicamente, pasándola a presión por una aguja de calibre 20 ga. Posteriormente, se coloca sobre un gradiente discontinuo (2-6% en intervalos de 1%) de KRBG-Sacarosa dejándola sedimentar a 1 x g durante 30 min a 4°C. Se recuperan por aspiración las fracciones correspondientes al 4 y 5% ; la suspensión celular se filtra por una malla, como la anterior, y las células filtradas se sedimentan a 1,500 x g por 2 min a 4°C. El sobrenadante se desecha y el paquete celular es resuspendido en 5 ml de DME, para el conteo celular. Después de ajustar a 1×10^6 células/ml la densidad de SC, se siembran en botellas de plástico para cultivo (Nunc) de 25 cm² de superficie y con un volumen final de 10 ml/botella (Bermúdez, 1988).

Las células se cultivan sin suero o cualquier otro aditivo en una atmósfera de aire-CO₂ (95:5%), a una temperatura de 37°C, durante 36 hrs, después de lo cual se recuperan los medios condicionados.

2. Concentración del M CCS

Concentración por diálisis.

Los medios condicionados se concentran utilizando bolsas para diálisis, previamente lavadas, con medidas de 15 x 5 cm y límite de exclusión de 10 KDa.

La diálisis se lleva a cabo por periodos de 48 hrs a 4°C, utilizando agua desionizada como medio de diálisis. Se realizan cambios del medio a diferentes tiempos acumulativos: 20 min, 60 min, 120 min, 24 hrs y 48 hrs. Después, las muestras se liofilizan para obtenerlas concentradas (Pohl, 1990).

Concentración por Centricon*

Los Centricon son tubos que contienen una membrana de filtración, con limite de exclusión molecular de 10 KDa, que divide al tubo en dos secciones: una en la que se coloca el medio a concentrar y otra en la que se acumula el filtrado que contiene las moléculas con pesos menores a los 10 KDa.

Los tubos se lavan con agua desionizada (contienen residuos de glicerina que pueden interferir), sedimentando a 7,000 r.p.m., hasta que la mayor parte del agua pase a la cámara de filtración. Después se colocan los MCCS en los Centricon, se centrifuga a la misma velocidad hasta que todo el medio haya pasado. Finalmente, el concentrado se lava con PBS, centrifugando nuevamente hasta que el rojo de fenol presente en el MCCS sea eliminado (Pohl, 1990).

3. Cuantificación de proteínas

Método de BCA (ácido biscinconínico).

La sensibilidad de este método es de 100-1200 ng (Smith, 1985).

Se prepara una solución patrón de proteína con BSA a una concentración de 1 mg/ml y con ella se prepara una curva patrón de 0 - 50 µg, con intervalos de 5 µg, por duplicado.

Se hacen otras dos soluciones la A (reactivo BCA) y una B (CuSO₄).

La solución A: carbonato de sodio 2%, BCA 1%, tartrato de sodio 0.16%, NaOH 0.4%, bicarbonato de sodio 0.95%, se disuelve en agua desionizada y se ajusta el pH a 11.25 con NaOH o NaHCO₃.

La solución B: CuSO₄ al 4% en agua desionizada.

Se prepara una mezcla de las dos soluciones utilizando 100 ml de la solución A, por cada 5 ml

222830

de la solución B (solución C).

A cada punto de la curva patrón, así como a cada una de las muestras (50 μ l, por duplicado), se le adiciona 1 ml de la solución C, se calientan en horno de microondas durante 20 seg y se procede a leer a 562 nm.

4.- Obtención de fracciones proteicas.

Los concentrados obtenidos se fraccionaron mediante HPLC utilizando un cromatógrafo marca Waters, con un controlador modelo 600 y un detector de absorbancia 486, de la misma marca. Se usó una columna Varian de filtración en gel (TSK) G2000SW de 30 x 0.75 cm, con una tamaño de partícula de 10 μ m marcando los límites de exclusión de la columna entre 10 - 100 KDa. Utilizando como fase móvil PBS 10 mM, pH 7, se hicieron corridas de 20 min con un flujo de 1 ml/min, midiendo la absorbancia en UV a 280 nm. Cada una de las fracciones obtenidas se concentró por Centricon (hasta un volumen final de 1ml), como se describió anteriormente.

La columna fue calibrada utilizando proteínas de diferentes pesos moleculares (albúmina bovina, albúmina de huevo, anhidrasa carbónica, mioglobina), así como azul dextran y L-tirosina para determinar el volumen vacío y el volumen de máxima retención respectivamente.

5.- Determinación de la actividad biológica.

Obtención de la fracción enriquecida en LC

Se sacrifican ratas Wistar macho adultas (90 días de edad) normales y se extraen los testículos, lavándolos después en una solución amortiguadora de KRBG a pH 7.4 y se descapsulan. Cada par de testículos se incuban en 7 ml de una solución de colagenasa Sigma 1G con una concentración final de 1 mg/ml, por 18 min a 37°C con agitación periódica. Después se adicionan 15 ml de NaCl 0.9% invirtiéndose varias veces y dejándose reposar durante 10 min a 4°C; se filtra a través de una malla de poro 50-100 μ m, utilizando una pipeta para trasvasar el sobrenadante. El filtrado se centrifuga a 1,500 x g durante 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspende en 1 ml de KRBG y se coloca en 8 ml de KRBG-Ficoll-BSA (13%-0.2%) pH 6.5; se centrifuga a 1000 x g por 15 min a 4°C, y el precipitado se resuspende en 5 ml de DME. Se cuentan las células utilizando un hemocitómetro y se ajustan a 3 x 10⁵ células/ml, sembrándolas en cámaras multipozos de plástico (Nunc), con un volumen final de 0.5 ml/pozo (Bermúdez, 1988).

Evaluación de la capacidad inhibitoria

Las células de Leydig se cultivan sin suero o factores adicionales en una atmósfera de aire-CO₂ (95:5%), a una temperatura de 37°C. Se mantienen en preincubación durante 24 hrs, antes de la sustitución por medios prueba (concentrados o fracciones de los MCCS) con un volumen final de 0.5 ml por pozo.

Radioinmunoanálisis (RIA)

Los medios de cultivo se recuperan después de 24 hr de realizada la sustitución. Se procesan para la medición de T por medio del procedimiento de RIA, utilizando anticuerpos específicos (Bermúdez, 1973).

Se eligen intervalos de sensibilidad para la T de 0-1,000 pg de T no marcada (fría), además de una concentración a saturación de 10,000 pg para medir las uniones inespecíficas al anticuerpo y otra para determinar las cuentas por minuto (cpm) totales del esteroide marcado.

Se prepara una solución ensayo con ³H-T (marcada) de actividad conocida para que al final contenga 5,000 cpm / 500µl en DME y suero antiT en dilución final 1 : 7500.

Con soluciones de concentraciones conocidas de T, se prepara una curva patrón (por triplicado) 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 pg misma que con las muestras por cuadruplicado forman una *corrida*. A cada tubo se adicionan 100 µl de la solución de ensayo con el anticuerpo y la T marcada, se dejan incubar toda la noche a 4°C para establecer el equilibrio de unión y competencia por el anticuerpo. Después, para separar la fracción unida al anticuerpo, se agregan 200 µl de una suspensión de Carbón activado -Dextrán T-70 (0.625-0.0625%) y previa agitación, se sedimentan a 1,500 x g durante 15 min. El sobrenadante o fracción unida se decanta en viales de conteo, se le adicionan 5 ml de solución de centelleo Instagel y se evalúa el contenido de radiactividad en un espectrómetro de centelleo líquido Beckman LS-7000, con una eficiencia de conteo homogénea de 45 %.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE LOS MCCS

Debido a la baja concentración de proteína en el MCCS, es necesario obtenerlo en cantidad suficiente. Durante ocho semanas se sacrificaron 30 ratas y se obtuvo un total de 300 ml de medio (tabla 3), que se utilizó después para la concentración y para las pruebas de actividad biológica.

Tabla 3. Obtención de medio condicionado de células de Sertoli.

No. de ratas	30
No. de semanas	10
Ratas/Semana	3
MCCS obtenido	300 ml
Células/ml	1.5×10^6

CONCENTRACIÓN DE LOS MCCS

En la tabla 4 se puede observar una comparación de las características físicas de los concentrados obtenidos, así como de su eficiencia en la concentración.

Tabla 4. Comparación entre métodos de concentración

Característica del concentrado	Dializado y Liofilizado	Centricon
COLOR	Amarillo	Transparente
APARIENCIA	Turbio	Poco turbio
TIEMPO	48 h/20 ml	2 h/ml
CONCENTRACIÓN	13	24
TOTAL DE ml CONCENTRADOS	105	48
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	37.795 mg	114.0432 mg

Se puede determinar que, en cuanto a características físicas, el concentrado obtenido por

medio del Centricon probablemente tenga un menor grado de impurezas. Además, el menor tiempo utilizado por este procedimiento representa una ventaja ya que, en menos número de horas, se puede concentrar una mayor cantidad de medio condicionado.

En los dializados hay que tomar en cuenta que el volumen en el que queda la muestra es mucho mayor por lo que, es necesario liofilizar para disminuirlo, provocando que el tiempo utilizado en todo el proceso sea mayor.

La concentración de proteína es más eficiente con el Centricon, ya que a partir de un menor volumen concentrado se obtiene una mayor cantidad de proteína.

Después los concentrados se utilizaron para hacer una prueba de actividad biológica, midiendo la síntesis de T en LC.. En la tabla 5 se muestran los promedios de los valores obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar y en la figura 4 una representación gráfica de estos resultados.

Tabla 5. Concentración de T (pg/ml) en los medios de LC (Tratamiento con concentrados)

	Tratamiento	Diálisis y Liofilización	Centricon
Controles	To	2920±495.6	2510±280.0
	DME	2262±163.5	1444±100.6
	MCCS	630 ± 45.3	604 ± 50.7
Concentrados	Dil 1:50	222 ± 21.7	189 ± 9.6
	Dil 1:100	362 ± 24.9	350 ± 27.4
	Dil 1:250	1250±199.2	1042± 99.9
	Dil 1:500	1300±174.1	1511±139.2

Dil: Dilución

Para esta prueba se utilizaron cuatro diluciones de los concentrados, una por debajo y tres por encima de la dilución utilizada en experimentos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio (MCCS sin concentrar), se hicieron las correcciones necesarias al tomar en cuenta el factor de concentración. Se utilizó en las diluciones la concentración de proteína presente

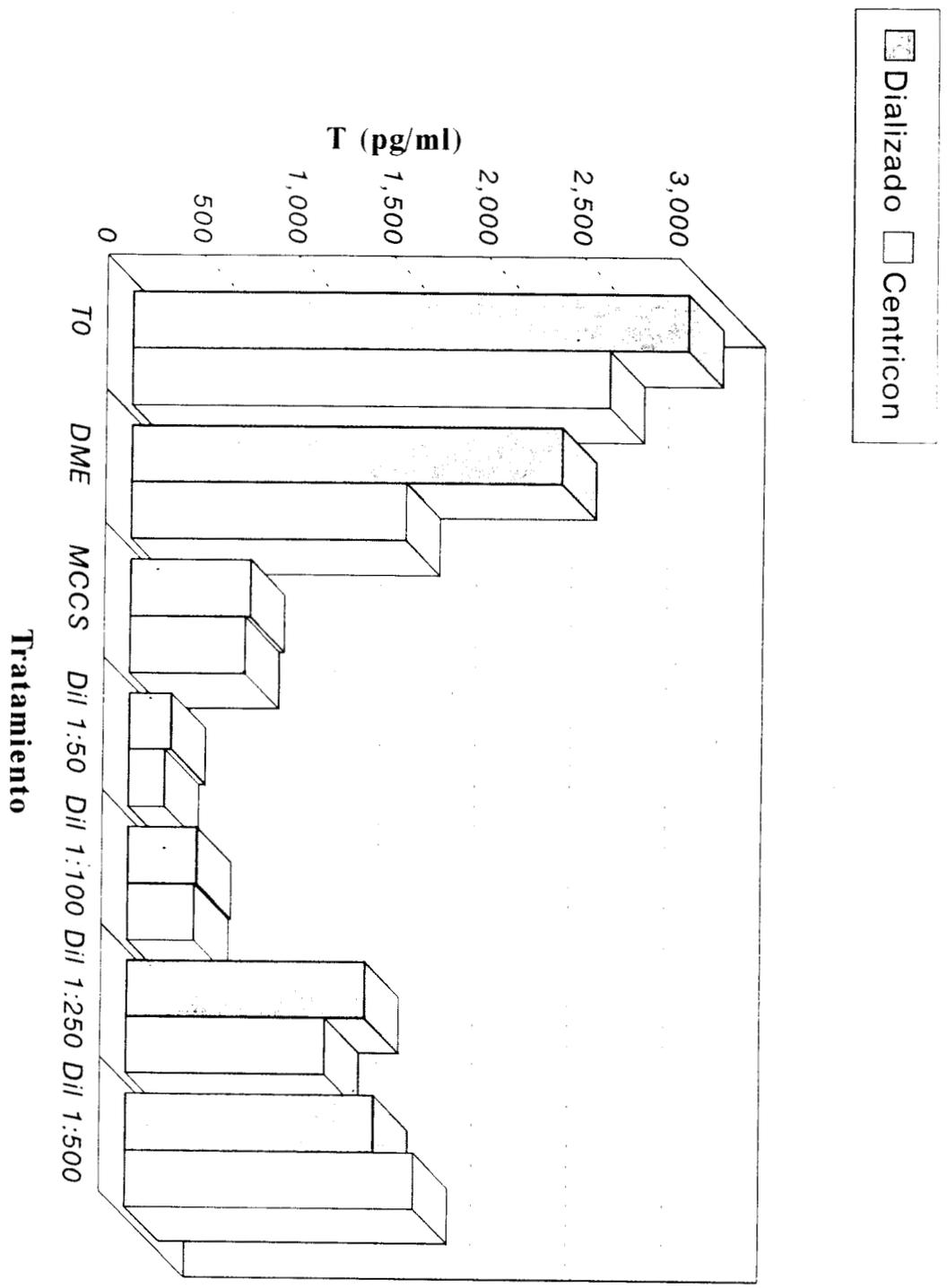


Figura 4. Efecto de los MCCS concentrados sobre la síntesis de T en CL

en el concentrado por diálisis y liofilización. Se uso como control negativo del efecto inhibitorio del DME y el de los MCCS.

Si se observan los valores obtenidos, se puede llegar a la conclusión de que no existe una diferencia significativa entre ambos métodos de concentración en cuanto a su capacidad de inhibir la síntesis de T.

FRACCIONAMIENTO DE LOS CONCENTRADOS

Los cromatogramas obtenidos de los dos concentrados se muestran en las figuras 5 y 6, en los cuales se muestran las zonas colectadas. Las fracciones I y VI corresponden a los volúmenes inicial y final de la columna, que fueron tomados como controles de la separación y detección. Las fracciones II, III y V fueron colectadas por los picos observados, mientras que en el caso de la fracción IV, aunque se observan dos picos, se colectó como una sola fracción, debido a que la absorbancia es comparativamente menor que en las otras zonas. Además, los volúmenes de elusión eran muy próximos, por lo que se dificultaba la separación, por medio del método utilizado. Los volúmenes de elusión de las fracciones de los concentrados se muestran en la tabla 6. Cada una de las fracciones fue probada, ajustando la concentración de proteína en forma similar a la contenida en la dilución 1:50 utilizada en la prueba de los concentrados sin fraccionar.

Tabla 6. Ve de las zonas obtenidas mediante HPLC

Zona	Ve Dializado	Ve Centricon
2	4.788 ± 1.268	4.661 ± 0.081
3	6.700 ± 0.848	6.113 ± 0.168
4	8.719 ± 1.165	8.114 ± 0.167
	9.400 ± 1.209	8.649 ± 0.189
5	11.846 ± 1.380	11.055 ± 0.221

Se determinó la capacidad inhibitoria de las fracciones, utilizando como controles DME, MCC1 (concentración de 1×10^6 células/ml) y MCC2 (concentración de 200×10^3 células/ml), en cultivos primarios de LC y se midió la concentración de T por medio de RIA.

Con ambos concentrados se observó una inhibición significativa de la síntesis de la

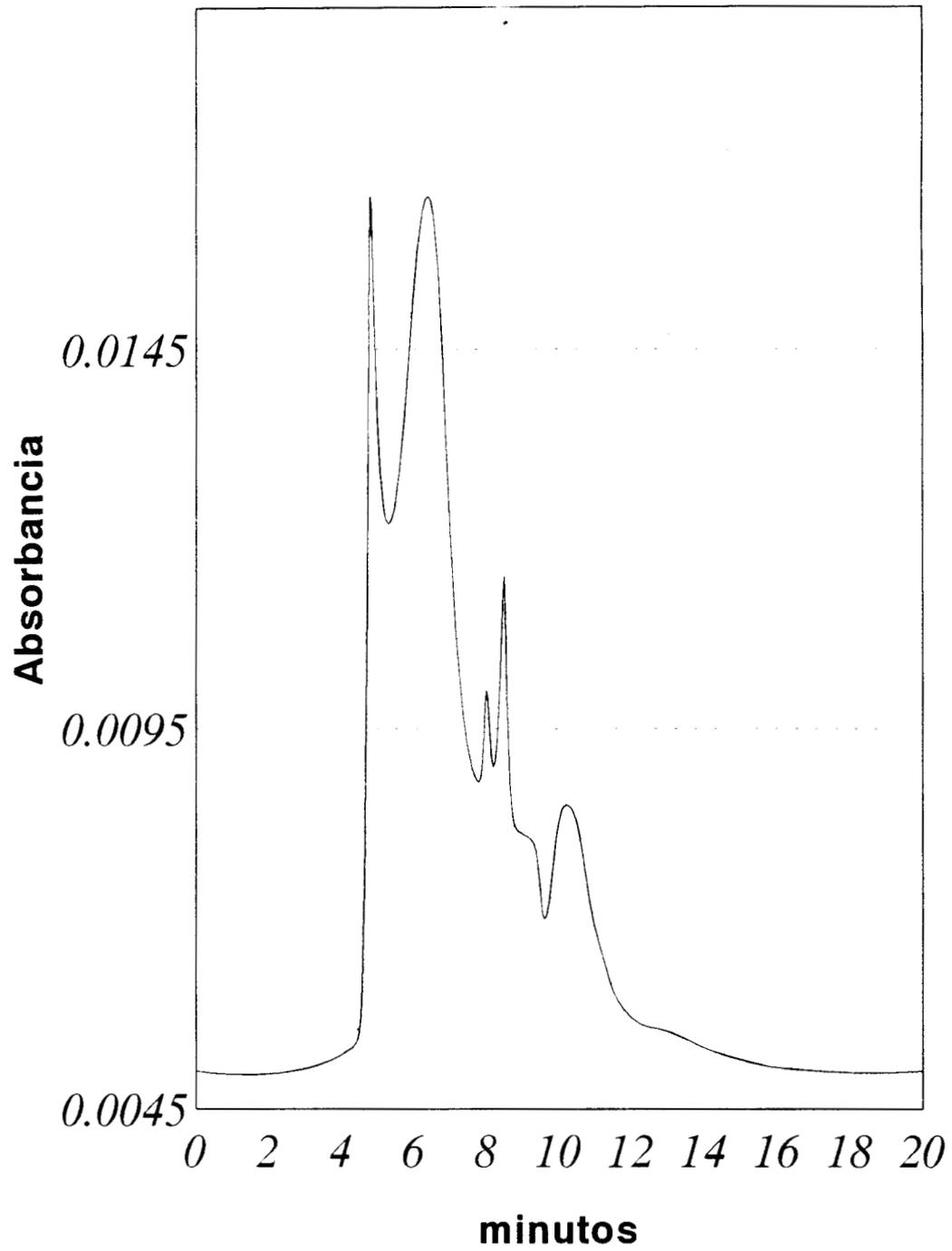


Figura 5. Cromatograma obtenido mediante HPLC, partir del concentrado por diálisis y liofilización. Se realizaron un total de 20 corridas.

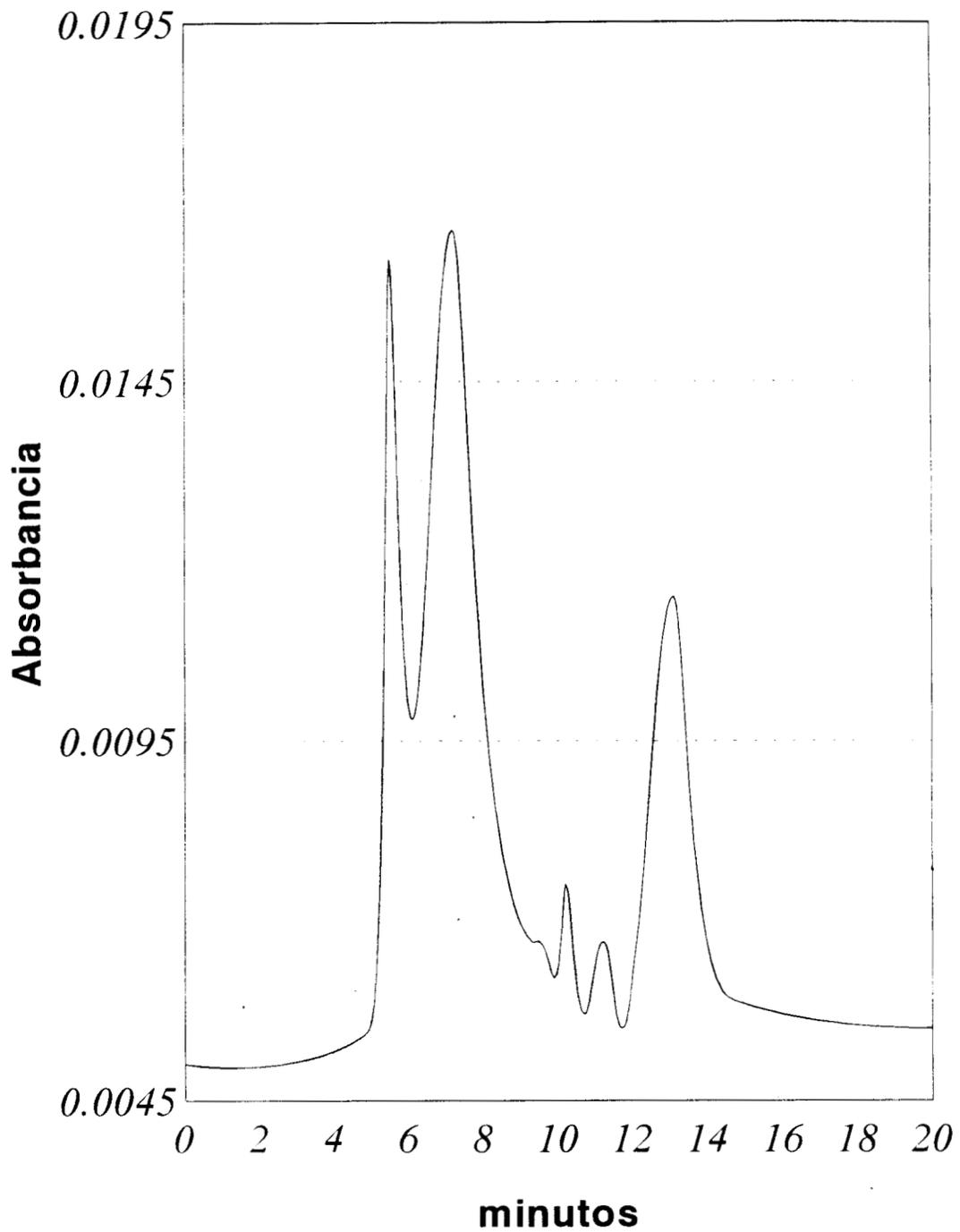


Figura 6. Cromatograma obtenido mediante HPLC, a partir de la muestra concentrada por Centricon. Se realizaron un total de 20 corridas

fracción IV, como se muestra en la gráfica de la figura 7 y en la tabla 7. Al observar los porcentajes de inhibición en la figura 8 y cuyos valores se muestran en la tabla 8 se puede apreciar que la inhibición cuando el medio se obtiene de cultivos con un mayor número de células y, también, al tener un concentrado más fresco, como en el caso del Centricon.

Tabla 7. Concentración de T (pg/ml) en los medios de LC (Tratamiento con fracciones).

	Tratamiento	Diálisis y Liofilización	Centricon
Controles	To	3378.50±224.80	3495.0±282.0
	DME	2376.10±259.34	2964.3±171.7
	MCC1	446.830±59.97	122.40 ± 33.5
	MCC2	1538.08±106.87	1983.0± 57.8
Fracciones*	I	2085.25±63.73	2908.0± 47.7
	II	2027.16±60.93	2937.0± 61.7
	III	1959.50±77.45	2346.0± 71.8
	IV	1397.75±75.77	745.20 ±101.4
	V	1908.00±92.50	2826.0± 71.4
	VI	2061.08±79.36	2860.0±266.0

*Se utilizó la concentración de proteína correspondiente a la dilución 1:50.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de la síntesis de T. Se muestran los valores de los MCCS control y de las fracciones con actividad inhibidora.

Tratamiento	Dializado	Centricon
MCCS1	81.19	95.87
MCCS2	35.26	33.10
III		20.85
IV	41.17	74.86

Para obtener el Mr aproximado de las fracciones se calibro la columna con los patrones que se muestran en la tabla 9; el azul dextrán corresponde al volumen vacío de la columna y la L-

tirosina al de máxima exclusión. Con estos valores se realizó una regresión linear (figura 9) y mediante la ecuación de la recta se determinó el Mr.

Tabla 9. Proteína utilizadas para la calibración de la columna con sus respectivos valores de peso molecular y KD.

Proteína	Peso Molecular	KD	Log P. M.
Azul Dextran	2. 000, 000	0.0	6.30
Albumina Bovina	66, 000	0.05	4.82
Ovoalbumina	45, 000	0.1	4.65
Anhidrasa Carbónica	29, 000	0.44	4.46
Mioglobina	17, 000	0.54	4.23
L-Tirosina	118.9	1	-0.74

222880

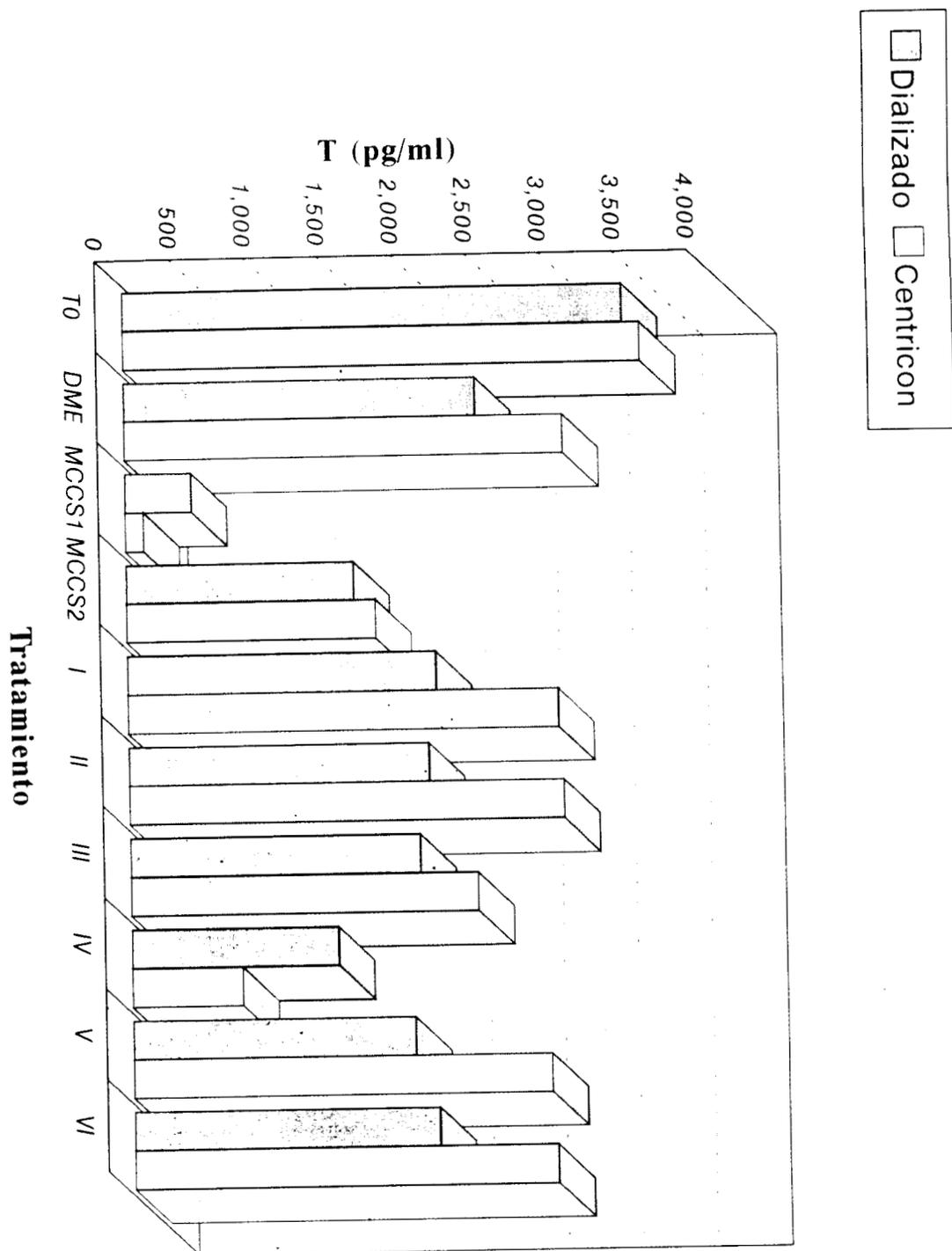


Figura 7. Efecto de las fracciones obtenidas mediante HPLC sobre la síntesis de T en CL.

Dializado Centricon

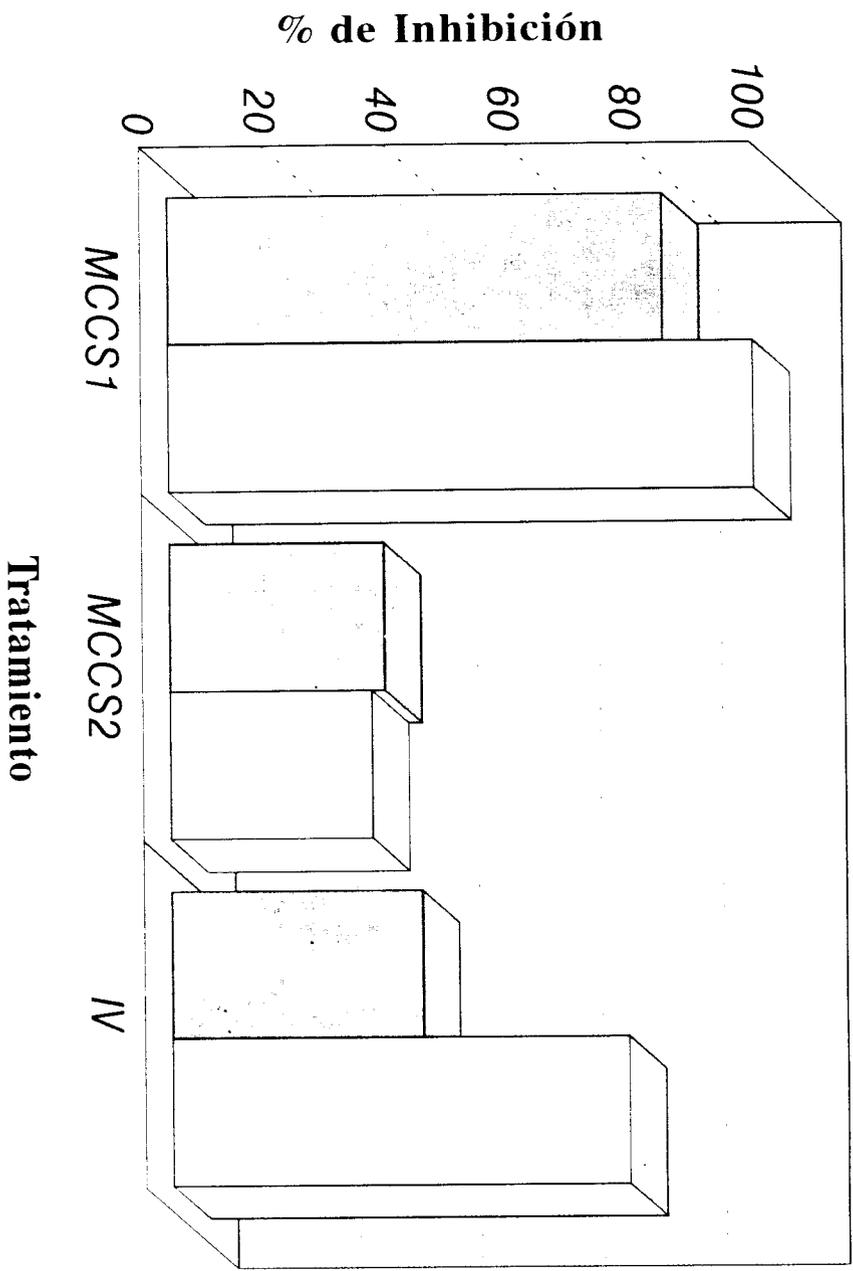


Figura 8. Porcentajes de inhibición de la síntesis de T. Se muestran las fracciones III y IV (con actividad inhibitoria), además de los MCCS utilizados como control.

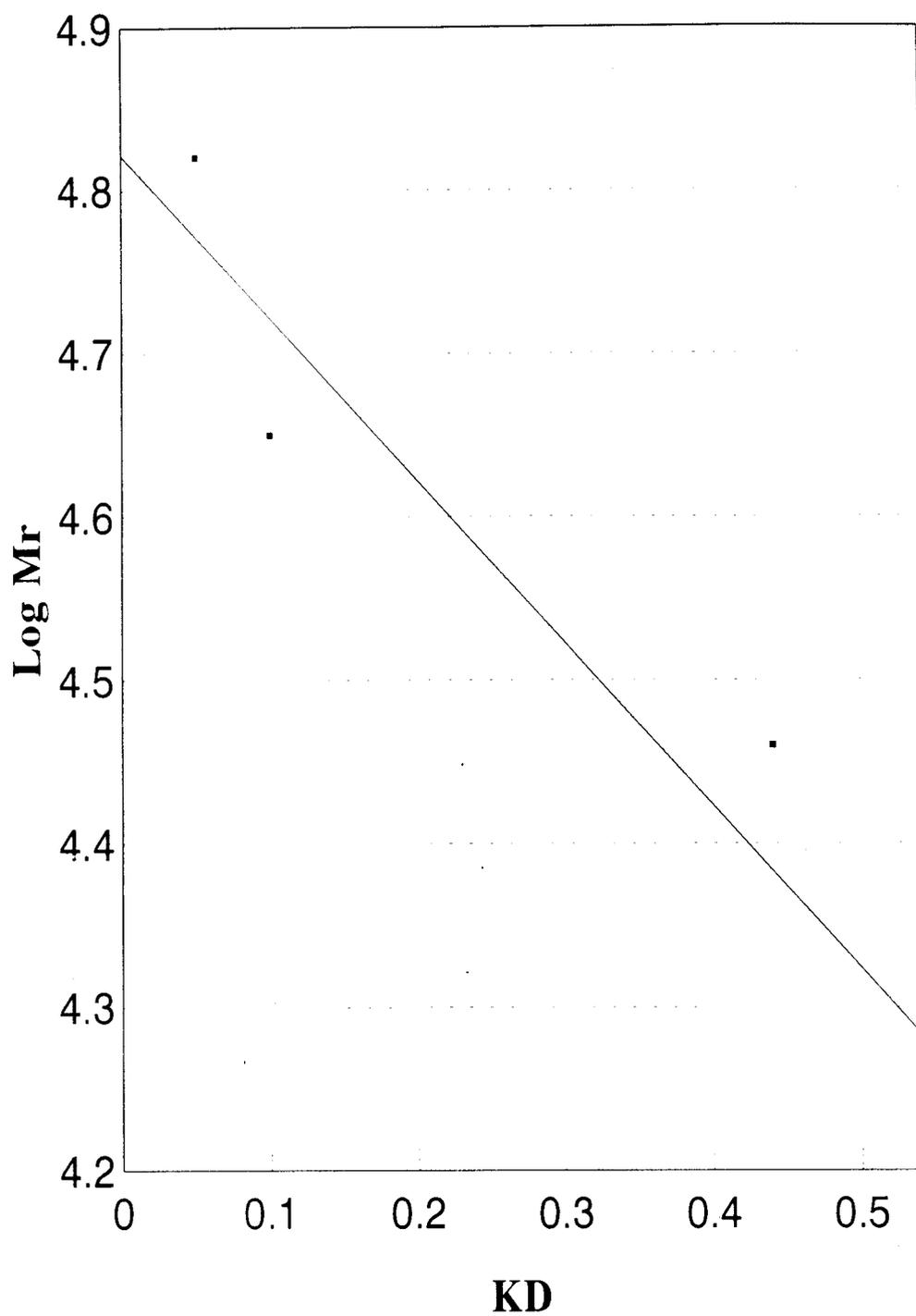


Figura 9. Gráfica de calibración de PM para la columna de HPLC. A partir de la ecuación de la recta se obtuvo el valor aproximado de Mr para el factor inhibidor

DISCUSIÓN

La remoción de solutos de bajo peso molecular, previa a la concentración de proteínas es una de las operaciones más frecuentemente utilizadas en la purificación y el análisis de proteínas. Sin embargo, debido a la labilidad de muchas de ellas, es necesario escoger con mucho cuidado el método a utilizar para realizar esta operación. El primer parámetro a considerar es la relación entre el volumen inicial y el final deseado de la muestra de proteína (el cambio en la dilución de la proteína pudiera promover cambios en su organización, formación de agregados, etcétera); el conocimiento de algunas características físicas y químicas facilitaría la elección del mejor método, pero cuando no se tiene esa información se deben preferir métodos convencionales para evitar riesgos. Además, hay que tomar en cuenta otros parámetros como el amortiguador, la temperatura y sobre todo el tiempo transcurrido como factores que pudiera promover una posible pérdida de la actividad biológica o de la destrucción parcial o total de la proteína. La diálisis es uno de los sistemas de aislamiento de proteínas más antiguos, sin embargo, el corte molecular no era muy preciso. Recientemente se han desarrollado membranas con un límite de exclusión molecular más preciso, por lo que se presentan menos variaciones. El Centricon y el Centriprep son métodos más recientes que se utilizan para concentrar volúmenes de hasta 2 ml a un volumen final de .045 ml y de 15 a 0.5 ml respectivamente (Pohl, 1990).

En la purificación de proteínas del testículo se han utilizado diferentes métodos de concentración. Las metodologías más usadas han sido la diálisis, precipitación por sales, celdas de ultrafiltración a presión con agitación, etcétera. Sin embargo, aunque muchos de estos métodos pudieran dañar la actividad biológica de la proteína, no es el caso de las proteínas obtenidas a partir de SC, pues se ha demostrado que pueden resistir cambios bruscos de temperatura, cambios en la fuerza iónica y cromatografía de diferentes tipos, sin que la actividad de la molécula se dañe (Verhoeven, 1987; Syed, 1988; Cheng, 1989; Zwain, 1994).

No obstante, la aparente resistencia de las proteínas a los tratamientos seguidos, en este estudio se utilizaron medios recién colectados o con poco tiempo en congelación y en algunos casos se utilizó medio que tenía alrededor de seis meses congelado. Entre estos medios no se observó ninguna diferencia significativa en cuanto a su capacidad inhibitoria de la síntesis de T, sin embargo, cuando la concentración se llevo a cabo e inmediatamente se fraccionó y

se probó la actividad biológica, se encontró que la actividad inhibidora presentada por estas fracciones *frescas*, era mejor en comparación con aquellas fracciones en las que existía un tiempo de espera. Los medios ya concentrados y liofilizados eran conservados sin hidratar hasta el momento de su fraccionamiento, ya que se observó que, cuando se colocaban en amortiguador y se dejaban por un espacio de hasta cuatro semanas, había una modificación progresiva que hacía que la resolución de las fracciones resultara diferente a la óptima. De igual manera, cuando los concentrados por Centricon se guardaban por un espacio similar, ocurría el mismo fenómeno, mientras que, como fue mencionado, los MCCS sin tratamiento no mostraban ningún cambio. Estos hechos pudieran implicar factores que están presentes en los MCCS y que de alguna manera estabilizan al factor modulador de la síntesis de T, son apartados por el proceso de concentración más el fraccionamiento, y generan con ello la pérdida de la actividad biológica de las proteínas presentes en los concentrados o fracciones.

Al comparar los dos métodos de concentración, no se observó una diferencia significativa en cuanto a su acción inhibitoria de la síntesis de T en el estudio de diluciones, ya que el porcentaje de inhibición en ambos métodos es parecido, sin embargo, al analizar los concentrados por HPLC se encontró una diferencia en los patrones de presencia y distribución de "picos", sin embargo, al analizar la actividad biológica de las fracciones, se demostró que fracción IV inhibe, en ambos métodos, la síntesis de T.

Con la finalidad de tener parámetro de confiabilidad en cuanto al sistema cromatográfico utilizado y en vista del número de corridas que se hicieron, fraccionaron y reunieron para cada medio concentrado, se calculó el valor de la desviación estándar, a partir de la ecuación de la recta, y se propagó, lo que da como resultado el valor aproximado del peso molecular. Se calculó que el factor proteico modulador de la síntesis de T aislado en este trabajo tiene un Mr para la fracción IV de $25,118 \pm 5913.14$ -- $20,682 \pm 4868.84$ para la purificación del medio dializado y de, $25,804 \pm 6074.63$ -- $29,908 \pm 7040.78$ para el Centricon.

Se puede observar que los valores de desviación son relativamente altos, sin embargo, en el caso de la fracción IV de ambos tratamientos, puede deberse a la falta de patrones de peso molecular adecuados, ya que, a pesar de que se buscaron algunos alrededor de 30,000, no se encontró ninguno que fuera suficientemente puro, pues al ser analizados por HPLC, se observaban varios picos.

Los MCCA han sido utilizados para identificar y caracterizar los factores paracrinos involucrados en las interacciones celulares testiculares. Se ha demostrado la existencia de factores de naturaleza proteica, tanto inhibidores como estimuladores de la síntesis de T, dependiendo no sólo del estadio de desarrollo de las GC, sino también de la pureza y la edad de las LC usadas en el bioensayo. Un factor con actividad inhibitoria ha sido caracterizado y se demostró que tenía un peso molecular aproximado de 40-50 KDa, cuya producción se incrementa de acuerdo con la edad y no puede ser detectado antes de los 35 días de edad (Syed, 1988). El medio utilizado para el cultivo (Medio 199) de las SC fueron suplementados con L-glutamina y 0.2% de BSA. Las LC utilizadas para el bioensayo fueron obtenidas a partir de ratas de 60 días de edad y se estimularon con LH. Recientemente fue descrito otro factor inhibidor de la síntesis de T, así como también de la producción de cAMP, de LC estimuladas con hCG y tiene un peso molecular entre 30-100 KDa (Vihko, 1989).

También se ha demostrado la existencia de un factor estimulador de la esteroidogénesis obtenido a partir de fragmentos tubulares de testículo humano y probado en LC obtenidas de humano, rata y ratón. Este factor tiene un peso molecular de entre 10-30 KDa y es importante señalar que el testículo humano fue obtenido de pacientes a los cuales se les practicó una orquidectomía, debido a la presencia de un tumor de LC (Verhoeven, 1987).

Recientemente, Zwain y col. (1994) reportaron la existencia de un factor que disminuye la síntesis de T en LC tanto para condiciones basales como estimuladas con hCG, al que denominaron Inhibidor de las LC (LCI); fue obtenido a partir de cultivos de fragmentos de túbulos seminíferos de ratas adultas normales y después de una filtración en gel (Sephadex G-100), se prosiguió la purificación por cromatografías secuenciales mediante HPLC (utilizando diferentes columnas y fases móviles), y se obtuvo un factor el cual, según demuestran, es diferente a los factores conocidos hasta el momento y tiene un peso molecular aparente de 21, KDa.

Los resultados reportados en el presente trabajo corresponden a los obtenidos por el cultivo primario de fracciones enriquecidas en LC y/o SC a los que no se les adicionó ningún otro factor que modificara las respuestas celulares, por lo que se midieron sólo la actividad y las concentraciones basales tanto del factor como de T.

Nuestro grupo de trabajo también ha realizado una evaluación del patrón de bandas y el

fraccionamiento por electroforesis "capilar" en geles de poliacrilamida de los MCCA obtenidos en condiciones basales o con la adición de algunos factores como FSH, cAMP, E₂ y T. Se demostró la existencia de actividades tanto inhibitoras como activadoras y que, además, al adicionarle los factores que modifican las funciones de las SC, se veía un cambio en el patrón de distribución de las bandas de proteína teñidas. También se demostró que, por la adición de factores como el E₂ y el cAMP durante el cultivo de las SC, la actividad del factor inhibitor se incrementa. (Herrera, 1992; Herrera, 1994).

Se puede observar que los resultados entre los diferentes grupos resultan, en algunos casos, contradictorios; sin embargo, se debe considerar que las condiciones utilizadas en cada etapa experimental son muy distintas, ya que las fuentes para la extracción de las células, los mecanismos de purificación de las mismas, los cultivos, la adición de factores al cultivo, el mismo medio de cultivo, los parámetros de evaluación etc. muestran gran diversidad, por lo que los resultados no pueden ser comparados directamente.

Debido a la variedad de resultados obtenidos por los diferentes grupos, es necesario profundizar acerca de la naturaleza, regulación y el mecanismo de acción de este factor, así como también de otros factores, no sólo de las SC, sino también de los otros tipos celulares como las LC, las PC y las GC, con ello se llegará a un mejor entendimiento de la fisiología testicular, así como los mecanismos involucrados en las interacciones celulares y la forma de regulación de éstos.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una cantidad suficiente de medio para que al ser concentrado, pudiera medirse la concentración de proteína.
- La concentración por Centricon resulta más práctica.
- La concentración de proteína, tomando en cuenta el volumen final del concentrado, es mayor en el Centricon, por lo que es más eficiente.
- Los medios concentrados mediante diálisis y liofilización o por Centricon, fueron capaces de inhibir la concentración de T en cultivos primarios de LC, sin que hubiera una diferencia significativa entre ambos.
- Se lograron las condiciones óptimas necesarias para la obtención de fracciones proteicas que conservaran su actividad inhibidora sobre la síntesis de T en cultivos primarios de LC, para ambos métodos de concentración.
- En los concentrados se obtuvo una misma fracción inhibidora, correspondiente a la IV, sin haber una diferencia significativa entre ambos métodos.

Debido a la diferencia en los resultados que existe entre los diferentes grupos de trabajo, es necesario llevar a cabo una purificación total del factor mediante el uso de metodologías alternativas, para realizar un estudio más detallado de su naturaleza, así como sus características biológicas, bioquímicas y fisicoquímicas, y poder determinar su identidad.

BIBLIOGRAFÍA

- AILENBERG, M., McCABE & D., FRITZ., I. B. (1990), Androgens inhibit plasminogen activator activity secreted by Sertoli cells in culture in a two-chambered assembly, *Endocrinol* **126**:1561-1572.
- AMANN, R. P. (1989), Structure and function of the normal testis and epididymis, *J Amer Toxic* **8**:437-449.
- AQUILANO, R. D. & DUFAU M. L. (1984), Studies on Leydig cell purification, *Ann NY Acad Sci* **483**:237-247.
- BARDIN, C. W., CHEN, C. L., MORRIS, P. L., GERENDAI, I. BOITANI, C., LIOTTA, A. S., MARGIORIS, A. & KRIEGER, D. T. (1987), Proopiomelanocortin-derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction, *Recent Prog Horm Res* **43**:1-15.
- BENAHMED, M., SORDOILLET, C., CHAUVIN, M. A., PERETTI, E. & MORERA, A. M. (1989), On the mechanisms involved in the inhibitory and stimulating actions of transforming growth factor- β on porcine testicular steroidogenesis: an in vitro study, *Mol Cell Endocrinol* **67**:155-164.
- BERMUDEZ, J. A., LEON, C. & HERRERA, J. (1973), Fundamento y estudio comparativo de dos métodos de análisis por saturación, *Rev Méd IMSS* **12**(1):11.
- BERMUDEZ, J. A., MENDIETA, E. & HERRERA, J. (1988), Evaluación de los métodos de aislamiento y purificación de células de Leydig y Sertoli, *Arch Invest Med* **19**:291-301.
- BUSTOS R., J. (1991), Efecto de los tratamientos térmicos y enzimáticos sobre la actividad moduladora de la esteroidogénesis de células de Leydig presente en el medio condicionado de células de Sertoli, Tesis de licenciatura, UNAM, México, D. F.
- CAILLEAU, J. & VERHOEVEN, G. (1991), Rat tumor Leydig cells as a test system for the study of Sertoli cell factors that stimulate steroidogenesis, *J Androl* **12**(1):9-17.
- CHENG, YAN C., GRIMA, J., STAHLER, M. S., LOCKSHIN, R. A. & BARDIN, C. W. (1989), Testins are structurally related Sertoli cell proteins whose secretion is tightly coupled to the presence of germ cells, *J Biol Chem* **264**(35):21386-21393.
- CHICZ, R. M. y REGNIER, F. E. (1990), High-Performance liquid chromatography: effective protein purification by various chromatographic modes, *Methods in Enzymology* **182**:392-421.
- CONNELL, C. J. & CONNELL, G. M. (1977), The Interstitial Tissue of the Testis. In: Johnson, A. D. & Gomes, W. B. (eds), *The Testis*, vol IV, Academic Press, NY, EUA, pp. 333-369.
- COOPER, L. E. (1978), The Tools in Biochemistry, John Wiley & Sons, NY, EUA.
- EWING, L. & BROWN, B. L. (1977), Testicular Steroidogenesis. In: Johnson, A. D. & Gomes,

W. B. (eds), *The Testis*, vol IV, Academic Press, NY, EUA, pp. 239-284.

- FABBRI, A., TSAI-MORRIS, C. H., LUNA, S., FRAIOLI, F. & DUFAU, M. L. (1985), Opiate receptors are present in rat testis. Identification and localization in Sertoli cells, *Endocrinol* **117**:2544-2553.
- FAWCETT, D. W. (1989), Tratado de histología, Ed. Interamericana-McGraw-Hill, México, D. F., pp. 804-839.
- FUJISAWA, M., BARDIN, C. W., & MORRIS, P. L. (1992), A germ cell factor(s) modulates preproenkephalin gene expression in rat Sertoli cells, *Mol Cell Endocrinol* **84**:79-88.
- GARCÍA DE MARINA, A. y DEL CASTILLO, B. (1988), Cromatografía líquida de alta resolución, Ed Limusa, México, D. F., pp. 252.
- GROOTENHUIS, A. J., MELSERT, R., TIMMERMAN, M. A., HOOGERBRUGGE, J. W., ROMMERTS, F. F. G. & DE JONG, F. H. (1990), Short-term stimulatory effect of Sertoli cell conditioned medium on Leydig cell steroidogenesis is not mediated by inhibin, *J Steroid Biochem* **36**(5):445-449.
- GROVES, W. E., DAVIS, F. C. & SELLS B. H. (1968), Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference, *Anal Biochem* **22**:195-203.
- HERRERA, J., RODRÍGUEZ, E., GONZÁLEZ, E., BERMUDEZ, J. A., MENDIETA, E. (1991). Efecto del estradiol sobre la síntesis de testosterona en células de Leydig en cultivo, XXXI Reunión de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Oaxaca, Oaxaca.
- HERRERA, J., GARCÍA, J., GONZÁLEZ, E., BERMUDEZ, J. A., MENDIETA, E. (1992). Efecto del AMP_C y el estradiol sobre la concentración de los factores moduladores de la esteroidogénesis de células de Leydig, XXXII Reunión de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Acapulco, Guerrero.
- HERRERA, J., RAMOS, L. BERMUDEZ, J. A., MENDIETA, E Y RUIZ. L. (1994), Purificación por dos procedimientos del factor modulador de la síntesis de testosterona en células de Leydig, a partir de medios condicionados por células de Sertoli, XXXIV Reunión de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Ixtapa-Zihuatanejo, Guerrero.
- HSUEH, A. J., DUFAU, M. & CATT, K. J. (1978), Inhibitory effects of estrogen on Leydig cell function: studies of FSH treated hypophysectomized rat, *Endocrinol* **103**:1069-1082.
- JEGOU, B. (1992) (a), The Sertoli Cell, *Balliere's Clin Endocrinol Metabol* **6**(2):273-311.
- JUNIEWICZ, P. E., KEENEY, D. S. & EWING, L. L. (1989), Effect of adenocorticotropin and other proopimelanocortin-derived peptides on testosterone secretion by the *in vitro* perfused testis, *Endocrinol* **122**:891-903.
- KRESTSER, D. M. & KERR, J. B. (1988), The Cytology of the Testis. In: Knobil, E. & Neill, J.

D. (eds), *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, NY, EUA pp. 837-931

- LESSON, S. T. & LESSON, C. R. (1985), *Histología*, Interamericana, 4a. edición, México, pp. 481-502.

- MARGIORIS, A. N., KOUKOULIS, G., GRINO, M. & CHROUSOS, G. P. (1989), *In vitro* perfused rat testes secrete β -endorphin and dynorphin: their effect on testosterone secretion, *Biol Reprod* **40**:776-788.

- MATHER, J. P. & PHILLIPS, D. M. (1984), Primary Cultures of Testicular Somatic Cells. In: Barnes, D. W. & Sato, G. H. (eds), *Methods for Serum Free Cultures of Cells of the Endocrine System*, Ian R. Liss, NY, EUA, pp. 225-242.

- ONODA, M., DJAKIEW, D., (1993) (a), A 24,500 Da protein Derived from Rat Germ Cells is Associated with Sertoli Cell Secretory Function, *Biochem Biophys Res Comm*, **193**(2):688-695.

- ONODA, M., DJAKIEW, D., (1993) (b), A 29,000 Mr Protein Derived from Round Spermatids Regulates Sertoli Cell Secretion, *Mol Cell Endocrinol*, **93**:53-61.

- PAPADOPOULOS, V., KAMTCHOUING, P., DROSDOWSKY, M. A., HOCHEREAU DE REVIERS, M. T. & CARREAU, S. (1987), Adult rat Sertoli cells secrete a factor or factors which modulate Leydig cell function, *J Endocrinol* **114**:459-467.

- PARVINEN, M. & HUHTANIEMI, I. (1990), Testosterone micromilieu in staged rat seminiferous tubule, *J Steroid Biochem* **36**:377-385.

- POHL, T. (1990), Concentration of proteins and removal of solutes, *Methods in Enzymology*, **182**:69-83.

- RUIZ P. (1991), Caracterización inicial del factor modulador de la esteroidogénesis presente en medios condicionados de células de Sertoli, Servicio Social, UAM, México, D. F.

- SAEZ, J. M., SANCHEZ, P., BERTHELON, M. C. & AVALLET, O. (1989), Regulation of pig Leydig cell aromatase activity by gonadotropins and Sertoli cells, *Biol Reprod* **41**: 813-820.

- SAEZ, J.M., PERRARD-SAPORI, M.H., CHATELAIN, P.G., TABONE, E. & RIVAROLA, M. A. (1987), Paracrine regulation of testicular function, *J Steroid Biochem* **27**:317-329.

- SHARPE, R. M. & COÓPER, I. (1984), Intratesticular secretion of a factor(s) with mayor stimulatory effects on Leydig cell testosterone secretion *in vitro*, *Mol Cell Endocrinol* **37**:159-168.

- SKINNER, M. K. (1990), Mesenchymal (stromal)-epithelial cell interactions in the testis and ovary which regulate gonadal function, *Reprod Fert Develop* **2**:237-243.

- SKINNER, M. K. (1991), Cell-Cell Interactions in the Testis, *Endocrine Reviews* **12**(1): 45-77.

- STAHLER, M. S., CHENG, YAN C., MORIIS P. L., CAILLEAU, J., VERHOEVEN, G. &

BARDIN, C. W. (1990) A2-macrogobulin: A multifunctional protein of seminiferous tubule, *Ann NY Acad Sci* **561**:73-80.

- STEINBERGER, A. & STEINBERGER, E. (1977), The Sertoli Cells. In: Johnson, A. D. & Gomes, W. B. (eds), *The Testis*, vol IV, Academic Press, NY, EUA pp. 371-399.

- STOCCO, D. M. & KHAN, S. A. (1992), Effects of steroidogenesis inducing protein (SIP) on steroid production in MA-10 mouse Leydig tumor cells: utilization of a non-cAMP second messenger pathway, *Mol Cell Endocrinol* **84**:185-194.

- SYED, V., KHAN, S. A., LINDH, M. & RITZEN, E. M. (1988), Mechanism of action of the factor(s) secreted by rat seminiferous tubules and inhibiting interstitial cell testosterone production in vitro, *Acta Endocrinol* **119**:427-434.

- VERHOEVEN, G. & CAILLEAU, J. A. (1987), A Leydig cell stimulating factor produced by human testicular tubules, *Mol Cell Endocrinol* **49**(2):137-145.

- VERHOEVEN G. & CAILLEAU, J. (1990), Influence of coculture with Sertoli cells on steroidogenesis in immature rat Leydig cells, *Mol Cell Endocrinol* **71**:239-250.

- VERHOEVEN, G. (1992), Local control systems within the testis, *Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, **6**(2):314-333.

- VIHKO, K. K. & HUHTANIEMI, I. (1989), A rat seminiferous epithelial factor that inhibits Leydig cell cAMP and testosterone production: mechanism of action, stage-specific secretion, an partial characterization, *Mol Cell Endocrinol* **65**: 119-127.

- WAYNE, B. C., YAN CHENG, C., MUSTO, N. A. & GUNSALUS, G. L. (1988), The Sertoli Cell. In: Knobil, E. & Neill, J. D. (eds), *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, NY, EUA. pp. 933-974.

- WILSON, Robert M. y GRIWOLD, Michael D. (1979), Secreted proteins from rat Sertoli cells, *Exp Cell Res* **123**: 127-135.

- ZWAIN, I. H., MORRIS, P. L. & YAN CHENG, C. (1991), Identification of an inhibitory factor from a Sertoli clonal cell line (TM4) that modulates adult rat Leydig cell steroidogenesis, *Mol Cell Endocrinol* **80**:115-126.

- ZWAIN, I. H. & CHENG, Y. C. (1994) Rat seminiferous tubular culture medium contains a biological factor that inhibits Leydig cell steroidogenesis: its purification and mechanism of action, *Mol Cell Endocrinol* **104**(1-2):213-227.

El jurado designado por la Division de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 8 de diciembre de 1994.

Tutor

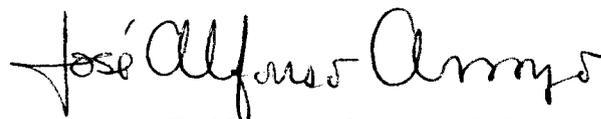


M. en B. E. Joaquín F. Herrera Muñoz

Asesores



M. en C. Héctor Fernando Serrano



M. en C. Alfonso Arroyo Reina
