

**ACCIONS ALTERNATIVES DE LA PROTEÏNA
TRANSPORTADORA D'ESTEROIDS SEXUALS
(SHBG/ABP) A L'ESPERMATOGÈNESI I AL CÀNCER
DE PRÒSTATA**



DAVID MARTINEZ SELVA
Setembre 2001



TESI DOCTORAL



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Programa de Doctorat: Bioquímica i Biologia Molecular. Bienni: 1996-1998

**ACCIONS ALTERNATIVES DE LA PROTEÏNA TRANSPORTADORA
D'ESTEROIDS SEXUALS (SHBG/ABP) A L'ESPERMATOGÈNESI I AL
CÀNCER DE PRÒSTATA**

Memòria presentada per David Martinez Selva per optar al grau de Doctor en
Bioquímica i Biologia Molecular

Tesi Doctoral realitzada a la Unitat de Recerca Biomèdica de l'Hospital Materno-
Infantil de la Vall d'Hebron, sota la direcció de la Dra. Francina Munell Casadesus i el
Dr. Jaume Reventós Puigjaner

Tesi adscrita al departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències,
Universitat Autònoma de Barcelona
Tutor: Dra. Margarita Sentís

L'interessat:

Els Co-Directors de Tesi:

David Martinez Selva

**Dra. Francina
Munell Casadesus**

**Dr. Jaume Reventós
i Puigjaner**

A la Solange, per tota la seva ajuda durant tots aquests anys de convivència, per la seva paciència a l'hora d'aguantar tot el que representa haver pogut fer aquesta tesi doctoral, i que només sap ella.

Als meus pares, Joan i Magda, per l'educació que he rebut i per recolzar-me en totes les decisions que he pres al llarg de la meua vida. A les meves germanes, Eva i Anna, per suportar-me durant aquests anys. Al meu avi, Joan, amb el qual he passat moments molt agradables i que no oblidaré mai.

Als companys de laboratori, Oscar, Nouredine, Cristina A, Cristina C, Joan, Lluís, Olga, Nuria, Maya i Marta amb els que he tingut experiències, tant a nivell científic com personals, inoblidables; i tot i que ara estem acabant aquest cicle i ens separarà la distància, espero seguir-los veient.

Als meus companys de facultat i amics, Josep, Pedro, Lluís, Jordi, Montse, Meritxell, Núria M, Lidia, Núria E, Pere Jordi, Alfonso, Laia, Julieta i Luis, per la seva amistat durant tots aquests anys.

.

AGRAÏMENTS

A la Dra. Francina Munell i el Dr. Jaume Reventós co-directors d'aquesta tesi, per haver-me transmés els seus coneixements i per la seva dedicació a la meva formació.

Al Dr. Philip Durand per acollir-me al seu laboratori durant la meva estada a Lyon i per ensenyar-me totes les tècniques de biologia cel.lular.

Al Dr. Geoffrey Hammond per l'acollida en el seu laboratori de Canada i haver-me transmés la seva experiència en el camp de la SHBG/ABP.

A la Dr. Núria Torán, Dr. Lluís Bassas, Dr Joan Morote i Dra. Inés de Torres, per la seva col.laboració i interès en la realització d'aquesta Tesi Doctoral.

	Pàgina
Presentació	1
Introducció	5
I. L'organització testicular	7
I.1. El compartiment intersticial	7
I.2. El compartiment dels túbuls seminífers	8
I.2.1. Les cèl.lules peritubulars	8
I.2.2. Les cèl.lules de Sertoli	8
II. L'espermatogènesi	13
II.1. La fase proferativa	14
II.2. La fase meiòtica	16
II.3. La fase espermiogènica	18
II.3.1. El desenvolupament del flagel	19
II.3.2. El desenvolupament de l'acrosoma	19
II.3.3. La formació i la condensació nuclear	20
II.3.4. L'eliminació del citoplasma	21
II.4. La classificació de l'espermatogènesi	22
III. La regulació hormonal de les funcions testiculars	27
III.1. L'hormona luteinizant, la testosterona i l'espermatogènesi	27
III.2. La FSH i l'espermatogènesi	29
III.3. Accions de la FSH en funció de l'edat	31
III.4. El paper de la LH, de la T i de la FSH en la iniciació i el manteniment de l'espermatogènesi	31
III.5. Regulació del funcionament testicular per altres hormones	33
IV. Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) / Androgen-Binding Protein (ABP)	35
IV.1. Introducció històrica	35
IV.2. Distribució a les espècies	36
IV.3. La purificació i l'estructura	37
IV.4. El clonatge dels cDNA	39
IV.5. La glicosilació i les propietats químiques	41
IV.6. Els dominis funcionals	42

IV.7.	Les dades estructurals.....	44
IV.8.	La SHBG/ABP transportadora d'esteroids sexuals	46
IV.9.	La SHBG/ABP en la reproducció	48
IV.10.	La homologia amb altres proteïnes	51
IV.11.	La regulació de l'expressió de la SHBG/ABP	52
IV.12.	Els llocs d'expressió de SHBG/ABP	54
V.	La mort cel.lular programada o apoptosi durant l'espermatogènesi	55
V.1.	El procés de desenvolupament i mort de les cèl.lules germinals	55
V.2.	Les senyals que regulen l'apoptosi de les cèl.lules germinals	58
V.2.1.	Les senyals paracrines	58
V.2.2.	Les senyals per contacte cel.lular	59
V.2.3.	Les senyals endocrines	60
V.3.	Les proteïnes intracel.lulars que decideixen el destí de la cèl.lula germinal	61
V.4.	L'apoptosi selectiva de cèl.lules germinals danyades	62
VI.	Anatomia i histologia de la pròstata humana	63
VI.1.	El teixit glandular	64
VI.2.	El teixit no glandular	65
VI.3.	L'arquitectura de la pròstata glandular	67
VI.4.	Els compartiments epitelials	71
VI.5.	La Hiperplàsia Benigna de Pròstata	72
VI.6.	La Neoplàsia Intraepitelial Prostàtica i el Càncer	73
	Objectius	77
	Materials i Mètodes	81
I.	Materials.....	83
I.1.	Els ratolins trangèncis per la SHBG/ABP de rata	83
I.1.1.	RT-PCR	83
I.1.2.	<i>Southern Blot</i>	83
I.2.	Els ratolins trangènics per la SHBG/ABP humana	84
I.3.	Linies cel.lulars	84
I.4.	Mostres humanes	85

I.4.1.	Mostres de pròstata	85
I.4.2.	Mostres d'esperma total, líquid seminal i espermatozous	86
I.4.3.	Mostres de testicle, epidídim i vesícules seminals	86
II.	Mètodes	87
II.1.	Tècniques en biologia cel.lular	87
II.1.1.	Extracció de cèl.lules de Sertoli	87
II.1.2.	Aïllament de cèl.lules germinals	88
II.1.3.	Extracció de cèl.lules peritubulars	89
II.1.4.	Elutriació de cèl.lules germinals	90
II.1.5.	Cocultius de cèl.lules de Sertoli/Paquitens i cèl.lules de Sertoli/Espermàtides rodones	92
II.1.6.	Tranfeccions	93
II.1.7.	Mesura de l'índex de DNA per citometria de fluxe	94
II.1.8.	Concentració del medi de cultiu	94
II.2.	Tècniques en biologia molecular	95
II.2.1.	Extracció de DNA genòmic de baix pes molecular	95
II.2.2.	Extracció de RNA	95
II.2.3.	Expressió per RT-PCR	98
II.2.4.	Especificitat dels <i>primers</i> de SHBG/ABP de rata i ratolí	98
II.2.5.	Expressió diferencial	99
II.2.6.	Purificació del producte de PCR	100
II.2.7.	Purificació de banda del gel d'agarosa	101
II.2.8.	Extracció ràpida de DNA plasmídic de bacteri	101
II.2.9.	Extracció de DNA plasmídic de bacteri	102
II.2.10.	Purificació de la fracció d'IgGs del sèrum	103
II.2.11.	Purificació de l'anticòs anti-SHBG/ABP humana de sèrum immune de conill	103
II.2.12.	Clonatge	104
II.2.13.	<i>Northerh Blot</i>	105
II.2.14.	<i>Western Blot</i>	105
II.2.15.	Fluoroimmunoassaig a temps de resolució (DELFIÀ)	107
II.2.16.	Seqüenciació	108
II.3.	Tècniques en histologia	109

II.3.1.	Histologia i TUNEL	109
II.3.2.	Immunohistoquímica	111
II.3.3.	Immunohistoquímica d'ER i TUNEL amb 2 marcadors fluorescents	114
III.	Anex	116
Resultats	119
I.	Ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata	121
I.1.	Estudi de fertilitat	121
I.2.	Anàlisi morfològic	121
I.3.	Anàlisi de la fragmentació del DNA	122
I.4.	Expressió de la SHBG/ABP	125
I.5.	Anàlisi del contingut de DNA per citometria de fluxe	128
I.6.	Expressió gènica en el ratolí transgènic per la SHBG/ABP de rata	129
I.7.	Immunohistoquímiques	131
I.8.	Immunohistoquímica d'ER i TUNEL en seccions consecutives	132
I.9.	Expressió d'ER en cèl.lules germinals apoptòtiques	133
I.10.	<i>Northern Blot</i>	134
I.11.	<i>Western Blot</i>	135
I.12.	Cocultius de cèl.lules de Sertoli/paquitens i cèl.lules de Sertoli/espermàtides rodones	136
II.	Ratolí transgènic per la SHBG/ABP humana (no disponible)	139
II.1.	<i>Northern Blot</i> (no disponible)	139
II.2.	Immunohistoquímica (no disponible)	143
II.3.	DELFIÀ (no disponible)	145
II.4.	Especificitat de l'anticòs anti-SHBG/ABP humana (no disponible)	145
III.	Testicle i esperma humà	147
III.1.	RT-PCR	147
III.2.	Immunohistoquímica	147
III.3.	<i>Western Blot</i>	148
III.4.	DELFIÀ	150
IV.	La pròstata	151
IV.1.	Linies cel.lulars	151

IV.1.1. RT-PCR	151
IV.1.2. <i>Northern Blot</i>	153
IV.1.3. Transfecció transitòria i estable	154
IV.1.4. DELFIA	155
IV.1.5. <i>Western Blot</i>	156
IV.2. Mostres humanes	157
IV.2.1. RT-PCR	157
Discussió	159
I. La SHBG/ABP de rata i l'espermatogènesi	161
I.1 Apoptosi de cèl.lules germinals en el ratolí trangènic per la SHBG/ABP de rata	161
I.2. L'apoptosi com una conseqüència del bloqueig meiótic	163
I.3. Mecanisme d'acció de la SHBG/ABP de rata durant l'espermatogènesi	165
II. La SHBG/ABP humana i l'espermatogènesi	169
II.1. Ratolí trangènic per la SHBG/ABP humana	169
II.2. La SHBG/ABP en el testicle humà	170
III. La SHBG/ABP humana i la pròstata	170
III.1. Linies cel.lulars de pròstata humana	171
III.2. Mostres de pròstata humana	173
Conclusions	175
Bibliografia	179

PRESENTACIÓ

La proteïna transportadora d'esteroids sexuals (SHBG) és una glicoproteïna que uneix andrògens i estrògens amb alta afinitat i els transporta als teixits diana (Hammond, G.L. et al. 1990; Rosner, W. et al. 1990; Petra, P.H. et al. 1991; Joseph, D.R. et al. 1994). En l'humà és sintetitzada majoritàriament pel fetge i circula pel plasma (Rosner, et al. 1984). Les cèl·lules de Sertoli testiculars de rata i ratolí produeixen una proteïna transportadora d'andrògens en el tracte reproductor que s'ha anomenat Androgen-Binding Protein (ABP) (Gershagen, S. et al. 1989). Ambdues proteïnes són productes del mateix gen (Joseph, D.R. et al. 1988; Reventós, J. et al. 1988; Hammond, G.L. et al. 1989), comparteixen la mateixa seqüència d'aminoàcids (Sullivan, P.M. et al. 1991) i tan sols es diferencien en la glicosilació de les seves cadenes laterals (Cheng, C.Y. et al. 1985).

Durant els darrers 30 anys noves dades han anat augmentant la complexitat del funcionament d'aquesta proteïna. Per una banda, s'ha demostrat la seva unió a membranes de diferents teixits diana dels esteroids, fet que suggereix una acció de SHBG/ABP a través de receptors de membrana. Per una altra banda, s'ha evidenciat l'existència de *transcripts* alternatius de SHBG/ABP que donarien lloc a una proteïna amb la mateixa seqüència aminoacídica però de localització probablement intracel·lular (Hammond, G.L. et al. 1989; Sullivan, P.M. et al. 1993). També s'ha demostrat la presència de la proteïna en altres teixits diferents del fetge i el testicle, com són el cervell, l'ovari i l'endometri i determinats tumors hormono-dependents, suggerint que o bé la proteïna és internalitzada o bé s'expressa en aquests teixits (revisat en Munell, F. et al. 2001).

Resten encara moltes preguntes sense resposta. Per tal d'esbrinar les possibles accions d'aquesta proteïna diferents de les de transport d'esteroids, ens vàrem proposar la realització de la present tesi doctoral. La primera part de la tesi està dedicada a l'estudi de les accions de SHBG/ABP en el tracte reproductor masculí utilitzant diferents models animals (ratolins sobreexpressors de la SHBG/ABP de rata i de la humana), models *in vitro* (co-cultius de cèl·lules de Sertoli i germinals) i també mostres humanes (de testicle, d'epidídim i d'espermatozous). En la segona part, s'analitza l'expressió de la SHBG/ABP en la pròstata humana. Tot i que aquest apartat no formava part dels objectius inicials de la tesi sinó que va ser fruit d'una troballa inesperada, vàrem creure convenient incloure-ho i aprofundir en el seu estudi, degut a la seva relevància. Per aquest motiu s'han analitzat mostres de pròstata humana normal i tumorigènica i també models *in vitro* de cèl·lules derivades de pròstata humana normal i tumorigènica.

INTRODUCCIÓ

I. L'ORGANITZACIÓ TESTICULAR

El testicle està format per dos compartiments: el compartiment intersticial i el compartiment dels túbuls seminífers.

I.1. El compartiment intersticial

Aquest espai conté vasos sanguinis, vasos limfàtics i capilars. L'organització dels vasos limfàtics varia considerablement entre les espècies; al ratolí i la rata els vasos limfàtics són canals irregulars o sinuosos que no estan totalment adherits per les cèl.lules endotelials.

El tipus cel.lular més freqüent a l'interstici és la cèl.lula de Leydig (Mori, H. et al. 1980; Christensen, A.K. 1975). Aquest tipus cel.lular és l'encarregat de produir la major part dels andrògens, majoritàriament testosterona, però també produeix altres esteroides. La cèl.lula de Leydig té un reticle endoplasmàtic llis molt desenvolupat i abundants mitocondris, que contenen els enzims necessaris per a la síntesi d'esteroides. També es poden trobar macròfags que tenen una funció desconeguda (Christensen, A.K. 1975) (Figura 1).

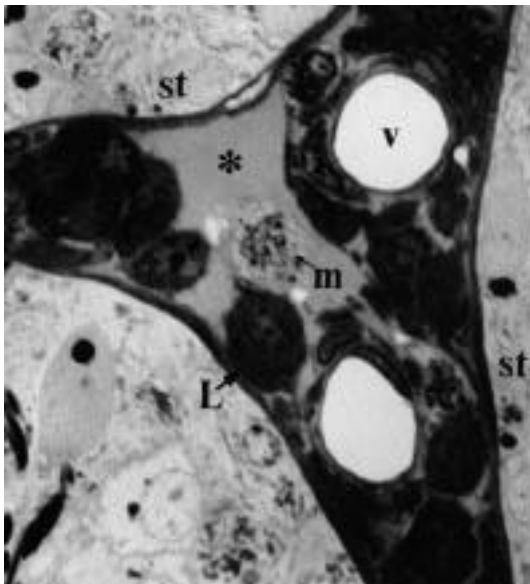


Figura 1. Regió intertubular de testicle de rata; on s'observen vasos sanguinis (v), cèl.lules de Leydig (L), macròfags (m) i vasos limfàtics (*). Les cèl.lules de Leydig estan properes, tant als vasos, com als túbuls seminífers (st). (Russell, L.D. et al. 1990)

I.2. El compartiment dels túbuls seminífers

Els túbuls espermatogènics contenen bàsicament cèl.lules germinals i cèl.lules de Sertoli. Les cèl.lules de Sertoli i les peritubulars són els dos tipus principals de cèl.lules somàtiques del túbul seminífer.

I.2.1. Les cèl.lules peritubulars

Les cèl.lules peritubulars envolten l'epiteli seminífer definint els límits del túbul seminífer. A més a més de les cèl.lules peritubulars, el teixit tubular limitant consta d'una lamina basal i de fibres de col.lagen elàstiques. Al ratolí i la rata, les cèl.lules peritubulars formen una única capa, mentre que a l'home formen tres capes (Johnson, L. et al. 1986 a; Johnson, L. et al. 1986 b; Johnson, L. et al. 1988). Aquestes cèl.lules peritubulars contenen filaments fins citoplasmàtics d'actina, que s'han relacionat amb la contracció rítmica dels túbuls seminífers. Per tant, aquestes cèl.lules mantenen la integritat dels túbuls seminífers i ajuden en els moviments de propulsió dels espermatozous i del fluid dels túbuls seminífers (Fawcett, D.W. 1975). També alteren la producció de proteïnes produïdes per les cèl.lules de Sertoli, com l'androgen-binding protein (ABP), la transferrina (Hettle, J.A. et al. 1988) i la proteïna activadora del plasminogen (Skinner, M.K. and Fritz, I.B. 1986).

I.2.2. Les cèl.lules de Sertoli

Les cèl.lules de Sertoli són crítiques en el desenvolupament de les cèl.lules germinals durant l'espermatogènesi. El nombre de cèl.lules de Sertoli està relacionat amb el nombre de cèl.lules germinals (Houchereu-de Rivers, M.T and Courot, M. 1978; Berndson, W.E. et al. 1987; Johnson, L. et al. 1991 a; Johnson, L. et al. 1991 b; Johnson, L. et al. 1994; Orth, J.M et al. 1988). Es considera que la cèl.lula de Sertoli mostra una morfologia cíclica, fenomen necessari per controlar i interaccionar amb les diferents fases del desenvolupament de les cèl.lules germinals. Hi ha diferents funcions que són assignades a la cèl.lula de Sertoli, algunes encara avui no tenen la verificació experimental, però, tot i així, tenen l'acceptació general (Fawcett, D.W. 1975; Dym, M. 1977). Aquestes funcions són:

1. Manteniment de l'integritat del túbul seminífer: les cèl.lules de Sertoli tenen diferents unions amb altres tipus cel.lulars i elements acel.lulars (Russell, L.D. 1980; Russell, L.D. and Peterson, R.N. 1985). Es troben unides a la làmina basal mitjançant

hemidesmosomes (Russell, L.D. 1978). Entre elles estan unides per desmosomes (Gilula, N.B. et al. 1976), *gap junctions* (Russell, L.D. 1977), i *tight junctions*, formant la barrera hemato-testicular (Russell, L.D. and Peterson, R.N. 1985; Gilula, N.B. et al. 1976; Dym, M. and Fawcett, D.W. 1970), I, finalment s'uneixen a les cèl.lules germinals mitjançant unions semblants als desmosomes (Russell, L.D. 1977.a), *gap junctions* (McGenly, D.M. et al. 1979), especialitzacions ectoplàsmiques (Russell, L.D. 1977.b; Russell, L.D. et al. 1988) i complexos tubulobulbars (Russell, L.D. and Clermont, Y. 1976; Russell, L.D. and Malone, J.P. 1980; Russell, L.D. 1979). Totes aquestes unions, juntament amb les relacions configuracionals de les cèl.lules de Sertoli (Russell, L.D. et al. 1986), formen un complex que ajuda a mantenir la integritat estructural de l'epiteli i la comunicació entre cèl.lules. Les especialitzacions ectoplàsmiques són aparells citoesquelètics complexos que uneixen les cèl.lules de Sertoli amb les cèl.lules germinals allargades. Les *gap junctions* entre les cèl.lules de Sertoli i les cèl.lules germinals serveixen per a la comunicació entre els dos tipus cel.lulars. Els complexos tubulobulbars actuen com a dispositius d'ancoratge, com a eliminadors de citoplasma, i com eliminadors de les unions just abans de l'alliberament de l'espermatozou. La fagocitació dels complexos tubulobulbars per part de les cèl.lules de Sertoli facilita l'alliberament del esperma (Russell, L.D. 1979).

2. Compartimentació de l'epiteli seminífer: dins de l'epiteli seminífer les cèl.lules de Sertoli formen dos compartiments permanents (basal i adluminal) i un transitori (intermig) (Figura 2). Les cèl.lules del compartiment basal inclouen les espermatogònies i els espermatòcits fins a la fase de leptotè de la meiosi (Russell, L.D. 1978; Russell, L.D. 1977.c). Aquests tipus cel.lulars tenen aparentment accés lliure a les substàncies que difonen des del sistema limfàtic. Indirectament, a través de la limfa, les cèl.lules del compartiment basal tenen accés als productes que venen pel sistema vascular. L'existència de nombroses vesícules picnòtiques dins de les cèl.lules endotelials i mioïdes del teixit adjacent fa pensar que existeix un transport no específic de molècules cap a les cèl.lules del compartiment basal. Les *tight junctions* entre les cèl.lules de Sertoli, a nivell de la superfície baso-lateral, divideix el compartiment basal del compartiment adluminal (Dym, M. and Fawcett, D.W. 1970).

La barrera hemato-testicular també podria ser anomenada barrera de cèl.lules de Sertoli, ja que està formada i és funcional exclusivament per cèl.lules de Sertoli (Huckins, C. 1978), tal i com s'ha vist en cultiu. El compartiment intermig es forma durant el trànsit

de les cèl.lules en leptotè, des del compartiment basal cap a l'adluminal. Durant aquest procés es formen i destrueixen de manera successiva les *tight junctions* (Russell, L.D. 1978; Russell, L.D. 1977.c).

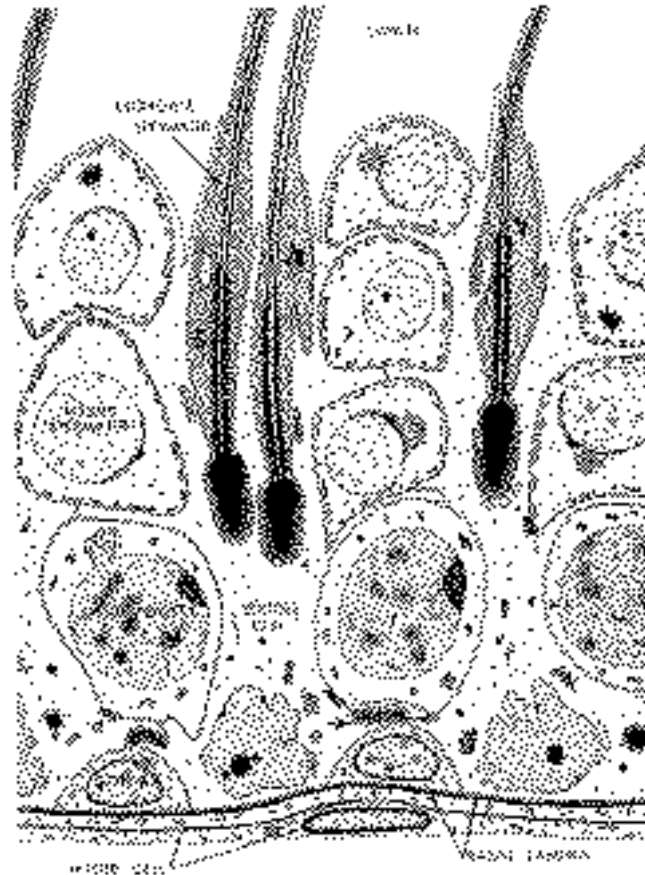


Figura 2. Diagrama d'organització del túbul seminífer. A la base de l'epiteli es troben les espermatogònies, i en nivells superiors successius els espermatòcits i les espermatides rodones. Les espermatides allargades ocupen les criptes de les cèl.lules de Sertoli i sovint estan entre els altres tipus de cèl.lules germinals. Les espermatogònies i les cèl.lules de Sertoli són les úniques cèl.lules que estan en contacte amb la làmina basal. Aquestes últimes estan en contacte les unes amb les altres formant la barrera hemato-testicular. (Russell, L.D. et al. 1990)

3. Secreció de fluid per a formar el lumen tubular: les cèl.lules de Sertoli secreten fluid, tant a nivell basal, com apical (Setchell, B.P. 1978; Setchell, B.P. and Waites, G.H.M. 1975). La superfície apico-lateral representa un 90% de tota la cèl.lula, el que suggereix que la majoria del fluid secretat va cap al lumen tubular. Les unions entre les cèl.lules de Sertoli eviten la sortida del fluid des del lumen cap a la limfa. Hi ha una correlació temporal entre la formació de les unions entre les cèl.lules de Sertoli i el desenvolupament del lumen tubular (Vitale, R. et al. 1973; Russell, L.D. et al. 1989). El

fluid luminal serà el medi en el qual seran transportats els espermatozous cap al sistema ductal.

4. Participació en l'alliberament de l'espermatozou: aquest alliberament és un procés complex pel qual els espermatozous es desenganxen de les cèl.lules de Sertoli i es dirigeixen cap al lumen tubular. Les cèl.lules de Sertoli participen activament en aquest procés (Fawcett, D.W. and Philips, D.M. 1969; Russell, L.D. 1984), ajudant a eliminar les unions entre els dos tipus cel.lulars (Russell, L.D. et al. 1988). No tots els espermatozous són alliberats, alguns seran fagocitats (Russell, L.D. 1984).
5. Fagocitosi: les cèl.lules germinals degeneren periòdicament durant l'espermatogènesi normal (Roosen-Runge, E.C. 1973; Russell, L.D. and Clermont, Y. 1977). Les cèl.lules de Sertoli fagociten les cèl.lules germinals que degeneren de manera normal, les que es moren per l'efecte d'algun tòxic i les que ho fan per altres actuacions no fisiològiques. Les cèl.lules de Sertoli també fagociten els complexos tubulobulbars durant l'alliberació de l'espermatozou, procés en el qual s'elimina, tant el citoplasma de l'espermàtida, com els contactes entre les cèl.lules de Sertoli i les cèl.lules germinals (Russell, L.D. et al. 1988). Finalment, les cèl.lules de Sertoli fagociten les restes de citoplasma i orgànuls que s'eliminen (cossos residuals) provinents de les espermàtides (Kerr, J.B. and Kretser, D.M. 1974).
6. Producció de nutrients per a les cèl.lules germinals: com que les cèl.lules de Sertoli regulen l'ambient del compartiment adluminal, s'assumeix que els nutrients rebuts per aquest compartiment provenen de les cèl.lules de Sertoli. Així, les cèl.lules de Sertoli es poden considerar com cèl.lules pont, entre el sistema limfàtic/vascular i les cèl.lules germinals. Per tant, són capaces de proporcionar o modificar les substàncies que transferiran a les cèl.lules germinals (Vilar, O. et al. 1962). Per exemple, el lactat es creu que és el substrat energètic preferit que utilitzen les cèl.lules germinals (Mita, M. and Hall, P.F. 1982); segons això, el lactat podria ser produït per les cèl.lules de Sertoli, a partir de substrats provinents del sistema vascular, i lliurat a les cèl.lules germinals.
7. Esteroidogènesi i metabolisme esteroïdal: aquests processos, probablement, tenen lloc dins de les cèl.lules de Sertoli, però la seva importància es desconeix. Les cèl.lules de

Sertoli contenen una gran quantitat de reticle endoplasmàtic llis, indicant la possibilitat de realitzar esteroidogènesi (Tcholokain, R.K. and Steinberger, A. 1978).

8. Moviment de cèl.lules dins de l'epiteli: es creu que les cèl.lules de Sertoli actuen activament en el procés de translocació de les cèl.lules germinals des del compartiment basal fins a l'adluminal. Les cèl.lules de Sertoli faciliten, de manera continuada, el moviment cap a munt de les espermatòides rodones durant el procés cap a espermatòcits primaris (Russell, L.D. 1977.c). Les seves unions i l'aparell citoesquelètic són importants en el transport de les espermatòides allargades a través de les criptes que formen les cèl.lules de Sertoli, i en la destrucció d'aquestes criptes en el moment de l'alliberació dels espermatozous (Kormano, M. and Hovatta, O. 1972) (Figura 3).

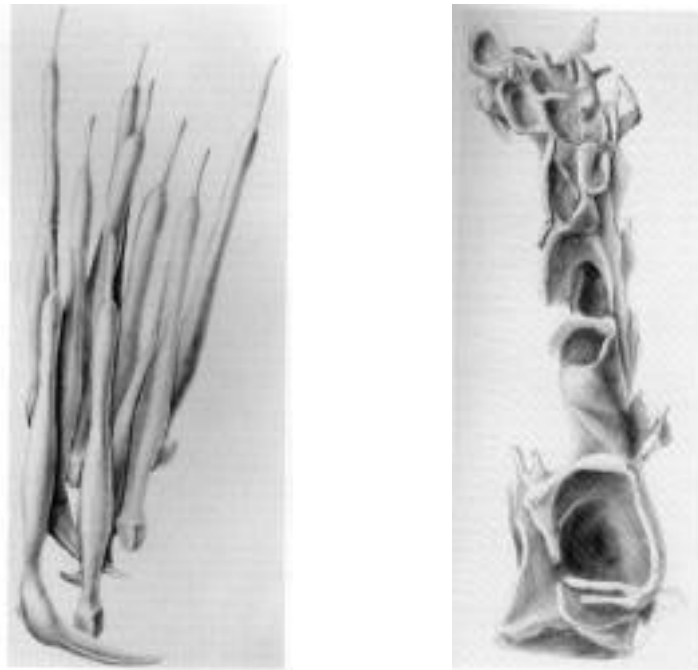


Figura 3. En la figura de l'esquerra s'observen nombroses criptes apicals de la cèl.lula de Sertoli. I en la figura de la dreta s'observa la disposició de les espermatòides allargades dins de les criptes de la cèl.lula de Sertoli. (Russell, L.D. et al. 1990)

9. Secreció de proteïnes: les cèl.lules de Sertoli secreten moltes proteïnes, tant *in vivo* com *in vitro* (Bardin, C. W. et al. 1988). Moltes d'aquestes tenen una gran importància en la regulació de l'espermatogènesi o de les funcions endocrines, com són: la inhibina, que a nivell pituïtari inhibeix la secreció de FSH (Bardin, C. W. et al. 1988), o bé, l'androgen-binding protein (ABP), proteïna transportadora d'esteriods.

II. L'ESPERMATOGÈNESI

L'espermatogènesi és un procés de divisió i diferenciació que pateixen les espermatogònies i que té com resultat final els espermatozous. És un procés llarg i crònic durant el qual les espermatogònies *stem cells* es divideixen per mitosi per tal de mantenir el seu nombre i per produir espermatòcits primaris de manera cíclica. Aquests acabaran entrant en meiosi i produiran espermatides haploids, que es diferenciaran en espermatozous, que seran alliberats a la llum dels túbuls (Figura 4).

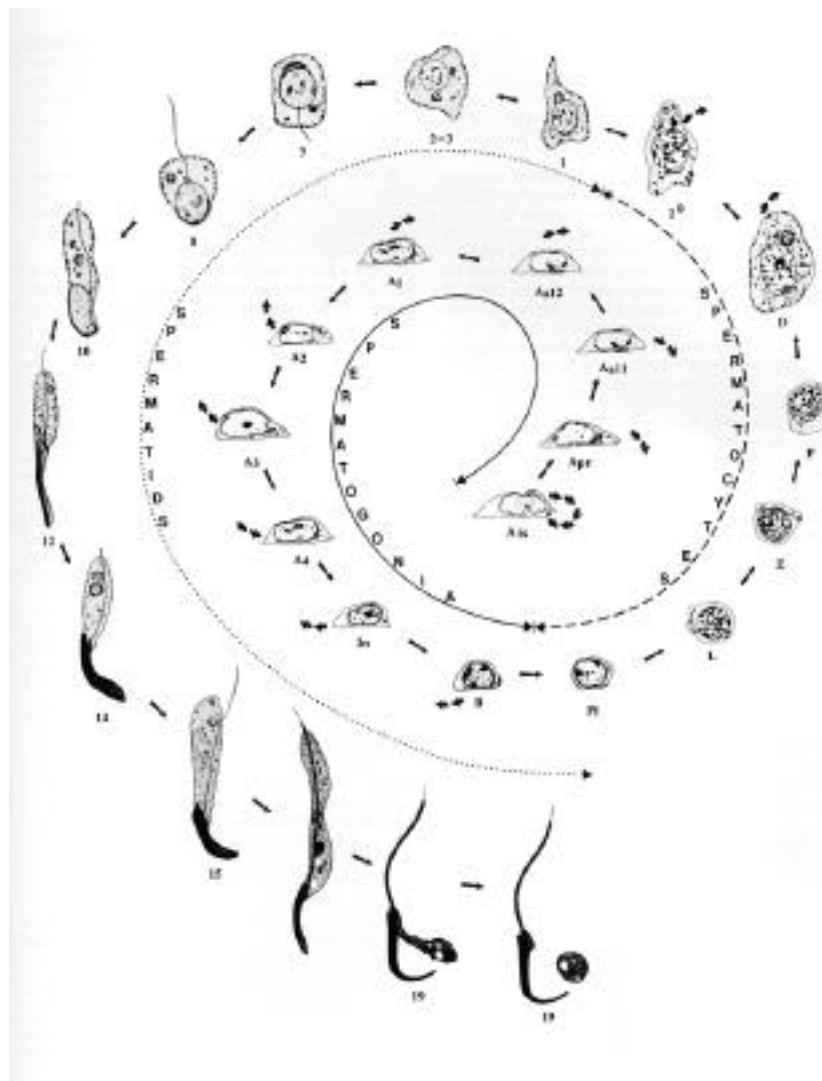


Figura 4. Diagrama de l'espermatogènesi de la rata, on s'observa les tres fases del desenvolupament: fase proliferativa (espermatogònia), fase meiòtica (espermatòcit) i fase espermiogènica (espermatida). (Russell, L.D. et al. 1990)

L'espermatogènesi, des d'un punt de vista funcional, pot ser dividida en tres fases o etapes: la fase proliferativa, la fase meiòtica i la fase espermiogènica.

II.1. La fase proliferativa

La majoria dels mamífers en període reproductor produeixen milions d'espermatozous per dia. L'estratègia reproductora dels mascles consta d'un increment del nombre de cèl.lules en l'inici de l'espermatogènesi. Les espermatogònies són cèl.lules immadures que pateixen nombroses mitosi, això dona lloc a una gran població de cèl.lules que seguidament patiran una meiosi i es diferenciaran donant lloc a l'espermatozou. També hi ha un requeriment simultani de cèl.lules per tal de mantenir el nombre d'espermatogònies inicial.

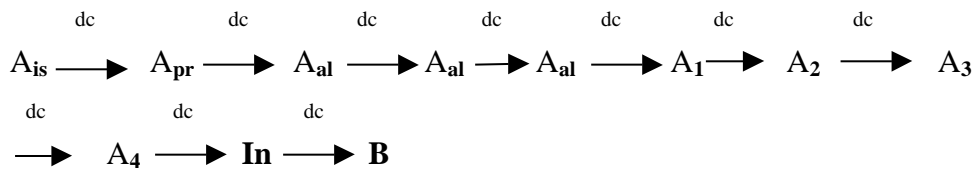
Hi ha tres tipus d'espermatogònies: espermatogònies *stem cells*, espermatogònies proliferatives i espermatogònies diferenciadores. Els dos primers tipus també es coneixen com espermatogònies indiferenciades. Les espermatogònies *stem cells* són resistents a gran varietat d'insults i sobreviuen, fins i tot, quan altres tipus de cèl.lules germinals es moren (Dym, M. and Clemons, Y. 1970; Huckins, C. and Oakberg, E.F. 1978). Una destrucció completa de les *stem cells* dona lloc a la pèrdua irreversible de la capacitat espermatogènica. Per tant, són una reserva de cèl.lules germinals que poden repoblar el túbul seminífer després d'un insult al testicle. La seva constant divisió fa molt difícil que els insults afectin a totes les cèl.lules, per tant, alguna acaba sobrevivint. Les espermatogònies que proliferen i es diferencien tenen un ratio mitòtic molt elevat i, per tant, són molt més susceptibles als insults.

Aquest mecanisme pel qual les *stem cells* i espermatogònies proliferatives es transformen en espermatogònies que es diferencien i simultàniament mantenen la seva pròpia població ha estat subjecte de molts estudis. Les espermatogònies que es consideren *stem cells* s'anomenen espermatogònies A_{isolated} (A_{is}), mentre que el tipus d'espermatogònia **Tipus A** són proliferatives (A_{paired} ; A_{pr} i A_{aligned} ; A_{al}) i diferenciadores (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , **Intermitges** i **Tipus B**).

Tipus d'espermatogònies

<i>Stem</i>	Proliferatives	Diferenciadores
A_{isolated}	A_{paired} A_{aligned}	A_1, A_2, A_3, A_4 Tipus B Intermitges

Les espermatogònies A_{isolated} i A_{aligned} estan connectades amb altres espermatogònies del mateix tipus per ponts intercel.lulars (Fawcett, D.W. et al. 1959; Weber, J.E. and Russell, L.D. 1987). Aquests ponts es pensa que promouen el desenvolupament sincrònic dels diferents clons espermatogonials, així com el sincronisme dels altres tipus de cèl.lules germinals (Huckins, C. 1978). La seqüència de divisions espermatogonials és: (dc indica divisió cel.lular).

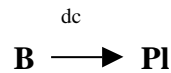


Teòricament, a cada divisió cel.lular el nombre de cèl.lules es duplica, però, a la majoria de A_{al} no es produeix divisió per formar A_1 . Les A_1 presenten uns canvis morfològics que les fan diferents a les A_{al} . Les espermatogònies proliferatives també s'anomenen espermatogònies diferenciadores. Però ha d'haver un número mínim de divisions per tal de mantenir el *pool* d' A_1 . Ara bé, s'ha pogut observar fins a 16 espermatogònies A_1 connectades pels ponts intercel.lulars, això indica que totes provenen de la mateixa *stem cell* (Huckins, C. 1978). Es coneix l'existència d'una considerable degeneració durant les divisions espermatogonials (Huckins, C. 1978). Les divisions inicials d' A_1 i d' A_2 i les divisions posteriors estan associades a uns túbuls que tenen associacions cel.lulars específiques o estadiatges.

Només alguns tipus d'espermatogònies poden ser diferenciats per criteris morfològics. De manera general, les espermatogònies poden ser diferenciades per la quantitat de cromatina i el seu aspecte al llarg de l'embolcall nuclear. L'espermatogònia de tipus A gairebé no en té, l'espermatogònia intermitja té una quantitat moderada, mentre que l'espermatogònia de tipus B en conté una gran quantitat.

II.2. La fase meiòtica

Al final de la fase de diferenciació les espermatogònies més madures es divideixen per donar lloc als espermatòcits primaris. Més concretament, les cèl.lules de tipus B es divideixen per a donar a lloc als espermatòcits en preleptotè (PI).



Les cèl.lules en preleptotè són les últimes cèl.lules en la seqüència espermatogènica en dur a terme la fase S (síntesi) del cycle cel.lular. La morfologia dels preleptotens és molt semblant a la de les cèl.lules de tipus B, l'única diferència és que són lleugerament més petites, i contenen menys cromatina a l'embolcall nuclear.

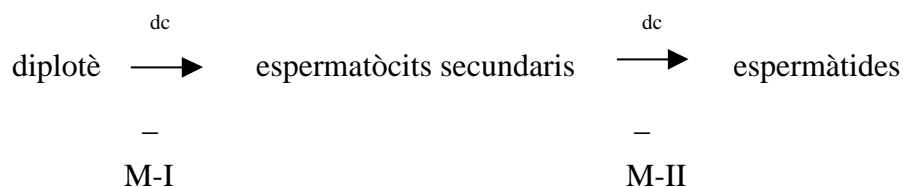
Els cromosomes són recombinats i el material genètic és reduït a la meitat en les dues divisions meiòtiques. A més a més, el número de cèl.lules germinals és quadruplicat al final de la primera i segona divisió meiòtica. Durant la profase meiòtica té lloc la recombinació genètica que és seguida per dues divisions molt ràpides, al final de les quals s'obtenen espermatides haploids.

La profase de la primera divisió meiòtica és excepcionalment llarga, dura unes tres setmanes. Té lloc una transició morfològica gradual des d'una fase de la profase a l'altre (Russell, L.D. and Frank, B. 1978). El tamany de les cèl.lules i del seu nucli augmenta progressivament durant la profase, augmentant de forma dramàtica al final d'aquesta (Russell, L.D. and Frank, B. 1978). Els canvis a nivell del nucli són les bases per subdividir les diferents etapes de la profase:

preleptotè (PI) _ leptotè (L) _ zigotè (Z) _ paquitè (P) _ diplotè (Di)

La presència de cèl.lules en leptotè és la senyal de que la profase meiòtica s'ha iniciat. En la transició de preleptotè a leptotè el nucli perd gradualment la seva cromatina perifèrica, formant un fil prim de cromatina que poden ser vistos al microscopi. Aquests fils són la cromatina condensada, tot i que els cromosomes es mantenen desaparellats. En la transició de cèl.lules en preleptotè cap a leptotè les cèl.lules es mouen lleugerament de la base del túbul (Russell, L.D. 1978; Russell, L.D. 1977.c), i tant la cèl.lula com el nucli adopten una forma arrodonida. Les cèl.lules en zigotè comencen a tenir aparellats els cromosomes homòlegs. Aquest aparellament en el nucli rep el nom de complex

sinaptonèmic (Moses, M.J. 1968). La fase de paquitè de la meiosi dura entre una setmana i mitja i dues, depenent de l'espècie de mamífer de la qual parlem. La recombinació genètica, també coneguda com entrecreuament, té lloc en aquest període i la seva finalitat és obtenir cèl.lules germinals que tinguin una composició genètica diferent de les cèl.lules somàtiques del mateix animal. Els paquitens, cap a la meitat del seu període, tenen un augment de la síntesi (Monesi, V. 1965) i augmenten ràpidament de tamany (Russell, L.D. and Frank, B. 1978). El nuclèol augmenta força de tamany i es fa visible una estructura molt especialitzada anomenada vesícula sexual (Solari, A.J. and Tres, L. 1967; Solari, A.J. 1964). Degut a l'increment del tamany del nucli, els cromosomes estan més separats, i els paquitens tardans tenen el nucli ovoide, mentre que els seus predecessors el tenen rodó. La fase de diplotè de la meiosi en el mascle és molt breu; aquí, el complex sinaptonèmic es disipa, els cromosomes aparellats es separen, excepte en unes regions conegudes com a quiasmes. La fase de diplotè és difícil de reconèixer en seccions histològiques. Les cèl.lules en diplotè són les cèl.lules més grans dels espermatòcits primaris i també de tots els tipus de cèl.lules germinals. La fase de diplotè és la culminació de la profase, el procés de divisió cel.lular es produït ràpidament. La metafase, l'anafase i la telofase són la resta d'etapes de la primera divisió meiòtica o meiosi I (M-I), que donaran lloc als espermatòcits secundaris, que patiran la segona divisió meiòtica o meiosi II (M-II), que finalitzarà amb la producció de les espermàtides.



Les cèl.lules de la meiosi I són d'un tamany semblant a la dels diplotens i es poden diferenciar de les cèl.lules de la meiosi II, ja que aquestes són més petites (Russell, L.D. and Frank, B. 1978). Totes les fases de la meiosi II són molt breus. El resultat final del procés meiòtic és la producció de cèl.lules haploids amb una composició de material genètic únic.

II.3. La fase espermiogènica

A la rata aquest procés requereix unes setmanes. És un procés en el qual les espermatides evolucionen cap a espermatozous sense cap divisió cel.lular. És el fenomen de transformació cel.lular més gran que es dona a l'organisme. Diferents successos tenen lloc simultàniament a les espermatides durant les diferents fases de l'espermiogènesi. La manera més senzilla de seguir la transformació de l'espermàtida és fixar-se en un únic procés morfològic a l'hora (Figura 5).

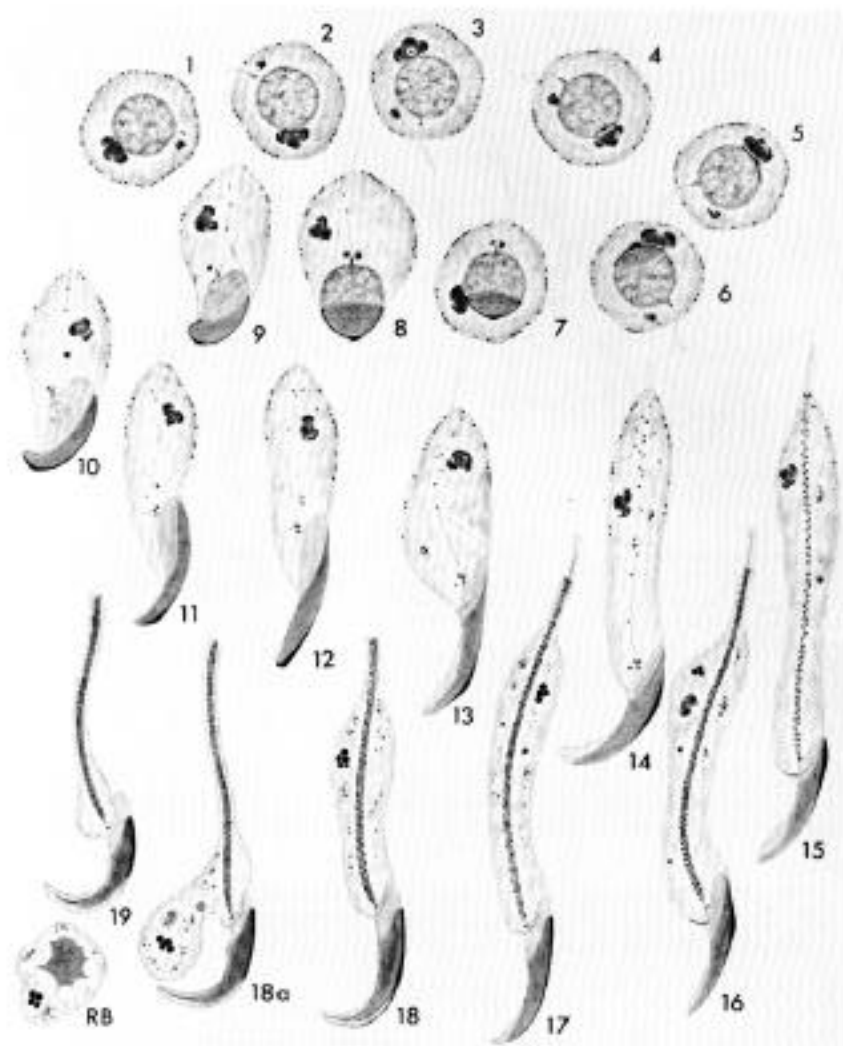


Figura 5. L'espermiogènesi de la rata, que consisteix en la transformació de l'espermàtida més immadura (1) a l'espermatozou (19). (Russell, L.D. et al. 1990)

II.3.1. El desenvolupament del flagel

A la rata, la primera evidència del flagel es pot observar a les espermàtides més inicials. Després de la migració dels dos parells de centríols cap a la superfície cel.lular, un d'aquests dos parells forma l'axonema. Aquesta estructura conté microtúbuls (9+2) que sobresortiran de la membrana plasmàtica de l'espermàtida. Tot seguit el parell de centríols que formen l'axonema flagel.lar es mouen des de la superfície cel.lular cap al nucli; el centríol s'implanta a la membrana nuclear formant la fossa d'implantació (Fawcett, D.W. and Philips, D.M. 1969). El flagel s'implanta en una zona o àrea del nucli de l'espermàtida, diferent de la regió on es formarà l'acrosoma. Normalment, el flagel s'implanta en una posició oposada a la de l'acrosoma, així es poden distingir dos pols nuclears, l'acrosòmic i el flagel.lar.

Per a formar les 3 parts del flagel: mitjana, principal i final, són necessaris diferents components accessoris que s'afegiran. Les mitocondries són reclutades del citoplasma per formar un patró en hèlix al voltant de la part mitjana del flagel. S'acumulen fibres denses, tant a la part mitjana, com a la principal, i es forma un anell fibrós a la part principal. El desenvolupament flagel.lar és un procés continuat que dura des de les primeres etapes de l'espermioogènesi fins que s'obté l'espermatozou. Tot i que el flagel dóna motilitat a la cèl.lula, l'espermatozou en el testice és essencialment immòbil. La capacitat per a la motilitat es desenvolupa a l'epidídim, i l'espermatozou no és mòbil fins que no es deposita al tracte reproductor femení.

II.3.2. El desenvolupament de l'acrosoma

Tot i que els trets generals del desenvolupament de l'acrosoma en els mamífers són semblants, cada espècie difereix de les altres en petits detalls en la seva formació i la forma que adopta el cap de l'espermatozou. El procés de formació de l'acrosoma és lent però continuat. La majoria d'espermàtides immadures de rata no tenen acrosoma, però mostren un aparell de Golgi perinuclear. Després de la formació de les espermàtides, l'aparell de Golgi produeix unes petites vacuoles condensades o vesícules proacrosomals que contenen material dens o granuls proacrosomals. Aquestes es fusionen donant lloc a una única vesícula gran unida a la membrana que conté un únic grànul i que és la vesícula acrosomal. Aquesta vesícula és rodona abans de contactar amb la membrana nuclear. Després esdevé plana per la part que entra en contacte amb la superfície del nucli. Hi ha una regió més densa en forma de mitja esfera que rep el nom de grànul acrosomal. L'aparell de Golgi es queda a prop, contribuint amb més material per desenvolupar l'acrosoma. Mitjançant un

mecanisme desconegut, el nucli de l'espermatòcida es mou cap a la superfície cel·lular (Russell, L.D. et al. 1983). Un cop aquí, la regió acrosomal de l'espermatòcida s'enganxa fortament a la membrana nuclear, provocant una polaritat cel·lular, donant lloc a la regió del cap i la regió del flagel. La regió que els uneix s'anomena coll. A la vegada, la cèl·lula va adquirint una forma allargada, on el citoplasma es va estirant al llarg del flagel. A mesura que passa el temps el nucli es va allargant progressivament. L'aparell de Golgi migra cap a la part caudal de la cèl·lula. En aquest punt, l'acrosoma ja no creix en massa, però incrementa gradualment la seva densitat. La forma del cap de l'espermatòcida i de l'acrosoma canvia durant dues setmanes abans de l'alliberament de l'espermatozou (Lalli, M.F. and Clermont, Y. 1981), tot i que no es coneix el mecanisme. Es creu que la forma de l'acrosoma canvia degut a l'allargament del nucli, o bé degut a l'activitat del citoesquelet d'actina que hi ha entre l'acrosoma i el nucli. La progressió de canvis en l'acrosoma és la base primària per a classificar l'espermioogènesis a la rata en etapes, i s'utilitzen aquestes etapes per a classificar les associacions cel·lulars en estadiatges (Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952). L'acrosoma es considera un sac d'enzims secretat i necessari per a la penetració a l'ou.

II.3.3. La formació i la condensació nuclear

Fins a cert punt de l'espermioogènesis el nucli de l'espermatòcida és esfèric. Finalment, el cap de l'espermatozou de moltes espècies acaba tenint una forma característica. La forma de cap més comuna entre els mamífers és en espàtula (Fawcett, D.W. 1975; Fawcett, D.W. 1958; Fawcett, D.W. et al. 1971). El cap de l'espermatòcida dels rosegadors és de forma falciforme (Lalli, M.F. and Clermont, Y. 1981). Els canvis de forma nuclears poden ser deguts en part al complex citoesquelètic format per microtúbuls al voltant del nucli (Wolosewick, J. and Bryan, J.H.D. 1977). S'ha argumentat també que els canvis de forma del nucli poden ser el resultat de la condensació de cromatina que seria característica de cada espècie (Fawcett, D.W. et al. 1971). Els canvis de forma del cap de les espermatòcides pot ser utilitzat com a una forma secundària de classificació de l'espermioogènesis en etapes (Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952). L'empaquetament del DNA nuclear és degut als canvis en les histones i d'altres proteïnes específiques que s'associen al DNA. Com a conseqüència d'aquest empaquetament i la pèrdua de fluid provinent del nucli, el volum nuclear es redueix considerablement. Mitjançant aquests canvis de forma i tamany, el cap de l'espermatozou esdevé hidrodinàmic per tal de poder moure's correctament en el fluid del tracte reproductor de la femella.

II.3.4. L'eliminació del citoplasma

El volum de l'espermàtida és reduït en un 25% respecte del volum original abans de que l'espermatozou sigui alliberat (Sprando, R.L. and Russell, L.D. 1987). El seu tamany petit i la forma hidrodinàmica fa que el seu aparell impulsor sigui capaç de transportar-lo a través del fluid del tracte reproductor. Hi ha tres fases fins a obtenir una espermàtida petita i hidrodinàmica. Primer de tot, ha de ser eliminada part de l'aigua del nucli i del citoplasma durant l'allargament de l'espermàtida (Sprando, R.L. and Russell, L.D. 1987). Com a resultat d'això, les espermàtides allargades semblen més denses que les altres cèl.lules. En segon lloc, part del citoplasma és eliminat just abans de l'alliberament de l'espermatozou. Això es fa mitjançant unes estructures anomenades complexes tubulobulbars (Russell, L.D. and Clermont, Y. 1976; Russell, L.D. and Malone, J.P. 1980, Russell, L.D. 1979). En tercer lloc, es produeix la separació del paquet citoplasmàtic o cos residual. Aquest cos residual és el responsable d'un quart de la reducció del volum de l'espermàtida (Sprando, R.L. and Russell, L.D. 1987). Aquests cossos residuals contenen paquets de RNA i paquets d'altres orgànuls i inclusions que han estat utilitzats prèviament per l'espermàtida, però que ja no són necessaris per a la supervivència de l'espermatozou un cop sigui alliberat (Huckins, C. 1971). Aquests fragments citoplàsmics són fagocitats per les cèl.lules de Sertoli i transportats a la base de la cèl.lula de Sertoli on els digerirà (Kerr, J.B. and Kretser, D.M. 1974). Després de l'eliminació del citoplasma, una petita quantitat de citoplasma es manté al voltant del coll de l'espermàtida (Figura 6 i Figura 7).



Figura 6. Al final de l'espermioigènsi, el falgel de l'espermatozou desenvolupa estructures accessòries, com l'agrupament de fibres i de mitocondris. (Russell, L.D. et al. 1990)

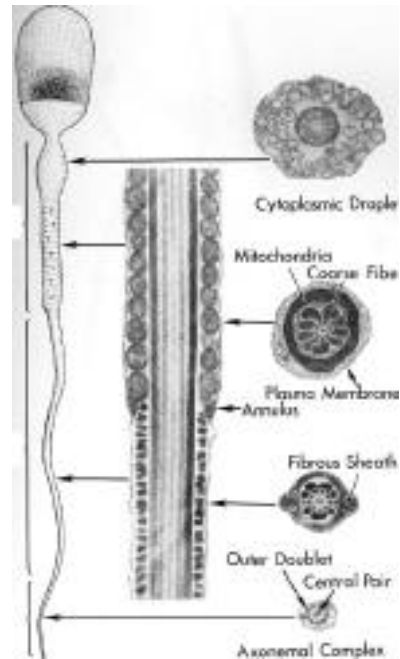


Figura 7. Components principals del flagel de l'espermatozou, que es pot dividir en tres parts: la del mig, la principal i la final. (Russell, L.D. et al. 1990)

II.4. La classificació de l'espermatogènesi

L'organització de les cèl.lules en els túbuls seminífers ha estat extensament estudiada en la rata (Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952.a; Clermont, Y. and Perey, B. 1957; Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952.b); en menys grau s'ha estudiat al ratolí (Leblond, C.P. and Clermont, Y. 1952; Oakberg, E.F. 1956), i encara molt menys en altres espècies. Per això, la rata ha estat l'espècie utilitzada per a descriure la classificació de l'espermatogènesi, que s'ha basat en l'estudi de les seccions transversals dels túbuls seminífers.

Els estadiatges de l'espermatogènesi i les etapes de l'espermioogènesi

En seccions transversals dels túbuls seminífers s'observen diferents tipus de cèl.lules germinals, cada tipus cel.lular està més o menys distribuït en capes concèntriques dins del túbul. Un tipus concret de cèl.lula germinal es troba relativament sincronitzat amb les cèl.lules que la precedeixen en el desenvolupament i amb les cèl.lules a que donaran lloc. Podem trobar, per tant, associacions de cèl.lules o estadiatges amb una composició de cèl.lules germinals constant. Per conveni, cada estadiatge està designat amb un número romà, així, a les rates hi ha 14 associacions de cèl.lules o estadiatges (Figura 8 i Figura 9).

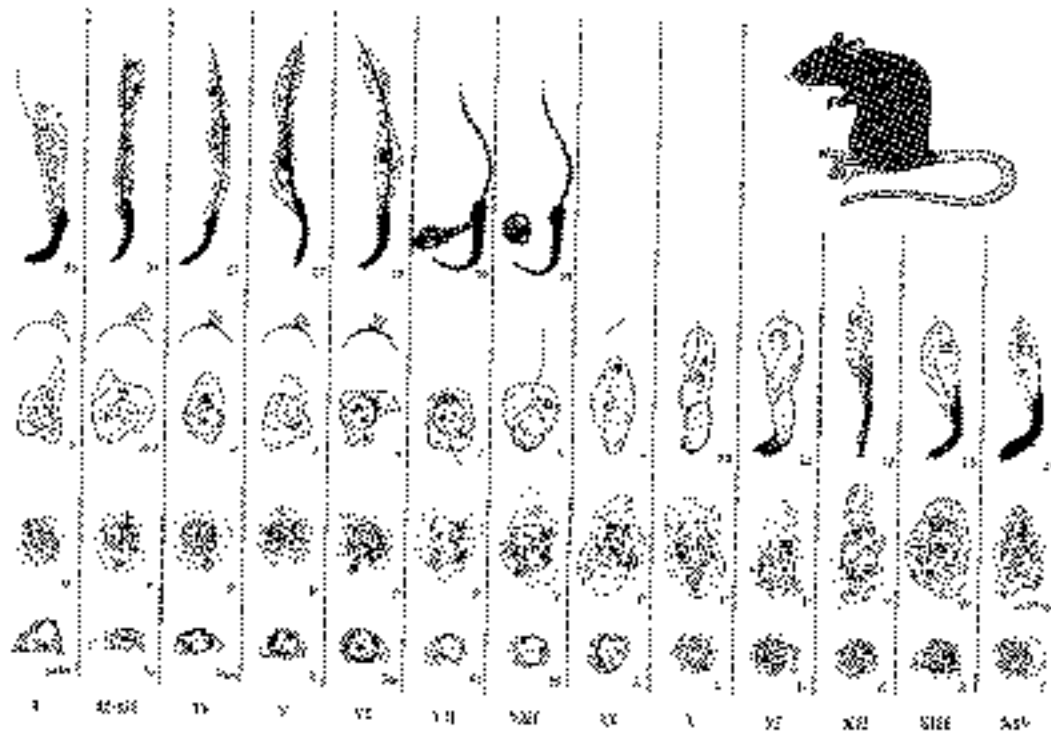


Figura 8. Els estadiatges de l'espermatogènesi de la rata. (Russell, L.D. et al. 1990)

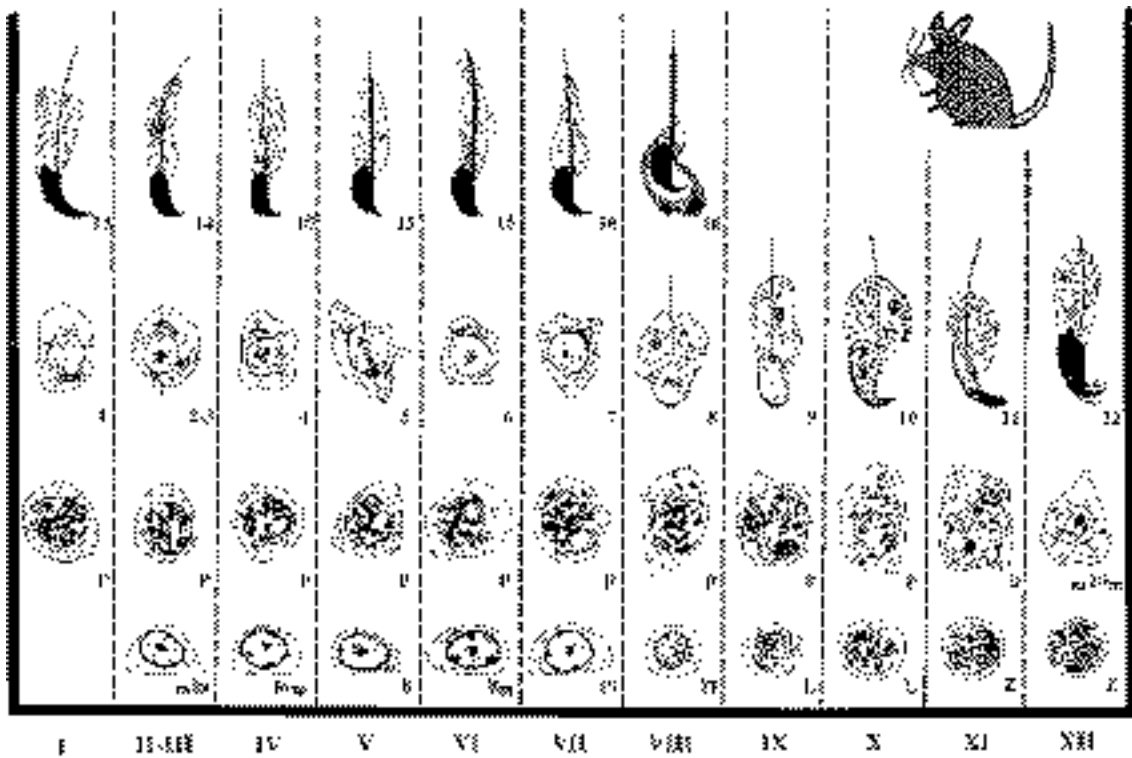


Figura 9. Els estadiatges de l'espermatogènesi del ratolí. (Russell, L.D. et al. 1990)

Les espermatides són el tipus de cèl.lules que s'acostuma a utilitzar per a classificar els estadiatges de l'espermatogènesi, ja que la generació d'espermatides és la que presenta canvis morfològics més fàcils de reconèixer. Els canvis en l'acrosoma i en la forma del nucli de les espermatides són fàcilment identificats en seccions parafinades tenyides al microscopi. Una entitat morfològica definida és anomenada etapa de l'espermiogènesi. Aquestes etapes són designades amb números aràbics. Així, tenim diferents tipus cel.lulars que estan associats i que es desenvolupen de manera sincronitzada. Aquest procés o cicle té lloc durant tota la vida reproductiva de l'individu, per tant, és necessari un cert grau de coordinació durant un llarg període de temps (Figura 10), tot i que no és un procés absolutament rígid, ja que, per exemple, les mitosi de les espermatogònies tenen lloc de manera esporàdica en un estadiatge diferent del descrit. El mecanisme que causa aquesta relativa sincronia dels diferents tipus cel.lulars en els estadiatges no es coneix, però s'han suggerit diferents possibilitats:

1. Les cèl.lules germinals que van passant a una nova etapa del desenvolupament envien senyals, ja sigui directament o mitjançant les cèl.lules de Sertoli, a les altres cèl.lules germinals per a que procedeixin al seu desenvolupament.
2. Les cèl.lules de Sertoli segueixen un ritme cíclic que es correspon amb el de les cèl.lules germinals (Elftman, H. 1950). No es coneix si els factors que determinen el ritme són propis de la cèl.lula de Sertoli o si és dirigit externament per hormones o altres substàncies.
3. Alguns fets sincrònics poden ser deguts a altres moviments que tenen lloc a l'epiteli, com per exemple, quan les cèl.lules de Sertoli es mouen cap a dalt (Russell, L.D. 1977.c). Això podria incrementar la pressió sobre els paquitens que estan a sobre dels leptotens, desplaçant-los cap a dalt, al mateix temps.

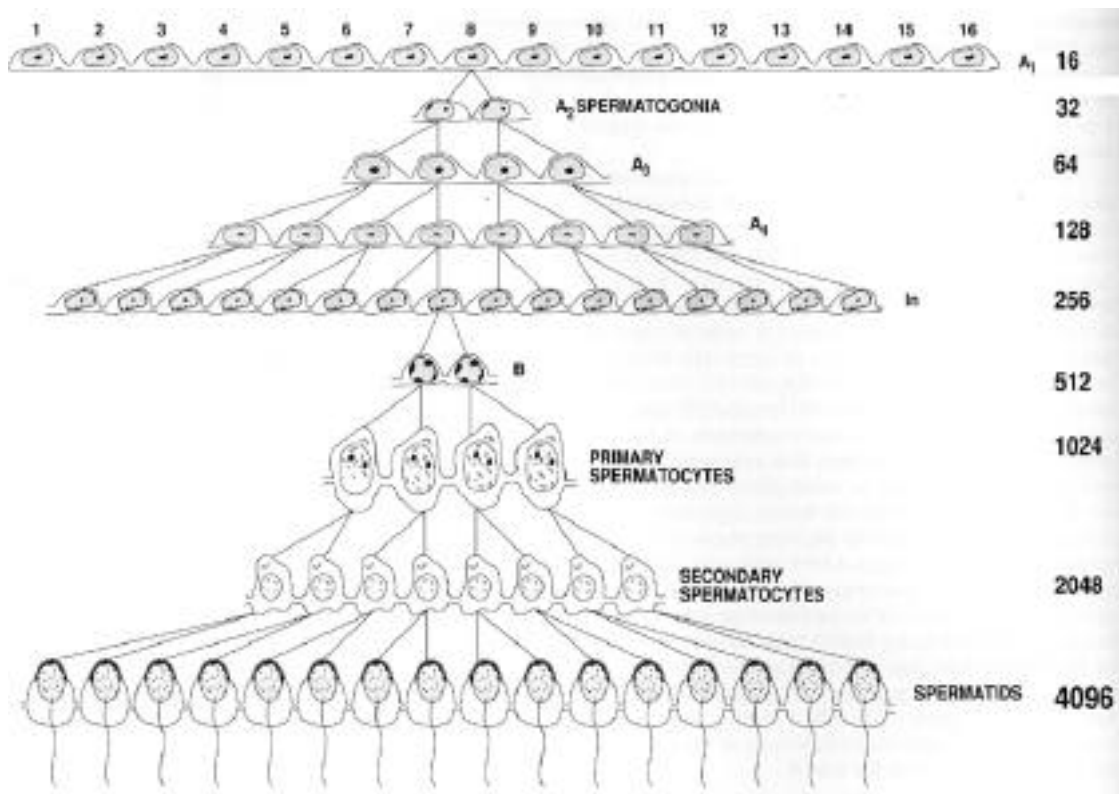


Figura 10. Tal i com Huckins va observar, si hi ha més de 16 cèl·lules espermatogonials A₁ en un clon, llavors seguint la cinètica de l'espermatogènesi s'acaben obtenint 4096 espermàtids. (Russell, L..D. et al. 1990)

La durada del cicle no és igual a totes les espècies, fins i tot, hi ha diferències entre animals de la mateixa espècie, però de soques diferents. Per exemple, la rata *Sherman* té un cicle que dura 12 dies (Clermont, Y. et al. 1959), la *Sprague-Dawley* 12.9 dies (Clermont, Y. and Harvey, S.C. 1965) i la *Wistar* 13 dies (Clermont, Y. 1963). La durada d'un estadiatge és determinat per la següent fórmula:

$$\text{Durada de l'estadiatge} = \text{Freqüència de l'estadiatge (\%)} \times \text{Durada del cicle}$$

Per tant, es conten en seccions de testicles el número de túbuls que estan en l'estadiatge en concret i es multiplica el tant per cent per la durada del cicle. El temps que dura cada estadiatge pot ser representat en el següent esquema (Figura 11).

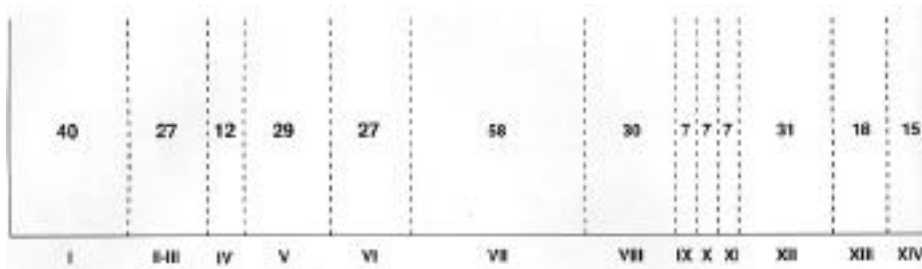


Figura 11. Mapa dels estadiatges de l'espermatogènesi de rata. A les columnes verticals hi ha el temps en hores de cadascun. Tot el cicle dura 12,9 dies. (Russell, L.D. et al. 1990)

L'espermatogènesi a l'home, així com a altres primats, sembla ser més desordenada en comparació als altres mamífers (Figura 12), ja que en una secció d'un túbul seminífer es poden trobar més d'un estadiatge diferent (Sharpe, R.M. 1994).

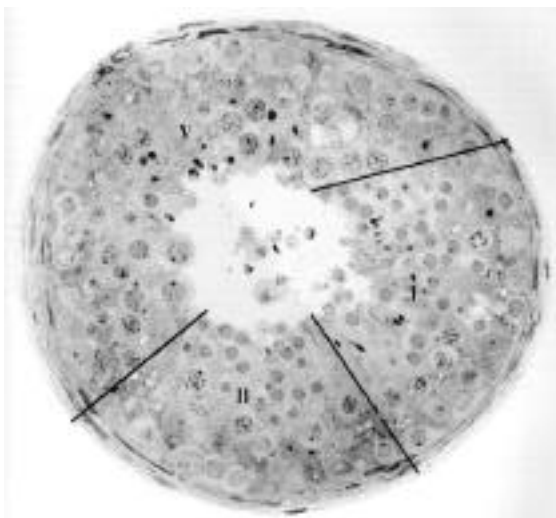


Figura 12. L'espermatogènesi en els túbuls seminífers humans. Es pot observar més d'una associació diferent dins d'un mateix túbul seminífer. (Russell, L.D. et al. 1990)

III. REGULACIÓ HORMONAL DE LES FUNCIONS TESTICULARS

Les dues funcions del testicle són la producció d'andrògens i l'espermatogènesi. Les hormones gonadotròfiques pituitàries són l'hormona luteinizant (LH) i l'hormona estimulant del fol·licle (FSH), que són les encarregades de regular les funcions del testicle (Sharpe, R.M. 1994; Steinberger, E. 1971). Amb l'arribada a la pubertat s'inicia la síntesi de testosterona (T) i l'espermatogènesi, degut a la secreció de gonadotrofines. L'hipogonadisme hipogonadotròfic va sempre acompanyat de baixos nivells de T en plasma i fallades en l'espermatogènesi. La supressió de la secreció de gonadotrofines en models animals experimentals i en humans hipofisectemitzats comporta una disminució de la producció de T i una aturada de l'espermatogènesi. La regulació de l'espermatogènesi per part de la FSH té lloc de manera indirecta a través de les cèl·lules de Sertoli, ja que cap cèl·lula espermatogènica té receptors per aquesta hormona. La LH actua a través de les cèl·lules de Leydig estimulants l'esteroidogènesi. La T té una varietat d'efectes androgènics/anabòlics, i el seu efecte paracrí intratesticular sobre l'espermatogènesi té lloc probablement mitjançant una acció indirecta via cèl·lules peritubulars i/o cèl·lules de Sertoli. La necessitat de LH per a la síntesi de T és indiscutible, però el paper de la FSH a l'espermatogènesi està continuament qüestionat. Juntament amb les gonadotrofines, hi ha tota una sèrie de mecanismes de regulació paracrins i autocrins dins els diferents compartiments testiculars. Tot i que, el paper fisiològic d'aquests efectes, molts d'ells demostrats *in vitro*, encara queden obscurs.

III.1. L'hormona luteinizant, la testosterona i l'espermatogènesi

El requisit inicial per a l'espermatogènesi és una alta concentració intratesticular de T, que en l'home és unes 100 vegades més gran que la concentració de la circulació perifèrica. La LH estimula l'esteroidogènesi unint-se al seu receptor de membrana en les cèl·lules de Leydig, que està acoplat a una proteïna G. L'AMPC sembla ser el segon missatger del sistema de transducció de senyal de LH, tot i que hi ha altres sistemes de transducció de senyal involucrats, com la proteïna G inhibidora de canals de calci i clor, i fosfolípids de membrana i prostaglandines (Leung, P.C. et al. 1992). Un argument que demostra aquest sistema de senyalització múltiple és l'estequiometria de l'unió de LH, la resposta d'AMPC i esteroidogènesi. La màxima estimulació d'esteroidogènesi té lloc a nivells molt baixos d'unió de LH, que provoca un augment de la producció d'AMPC. Així

la LH transmet el seu missatge via AMPc; aquest mecanisme està clarament modulats per altres mecanismes de transducció de senyal (Figura 13).

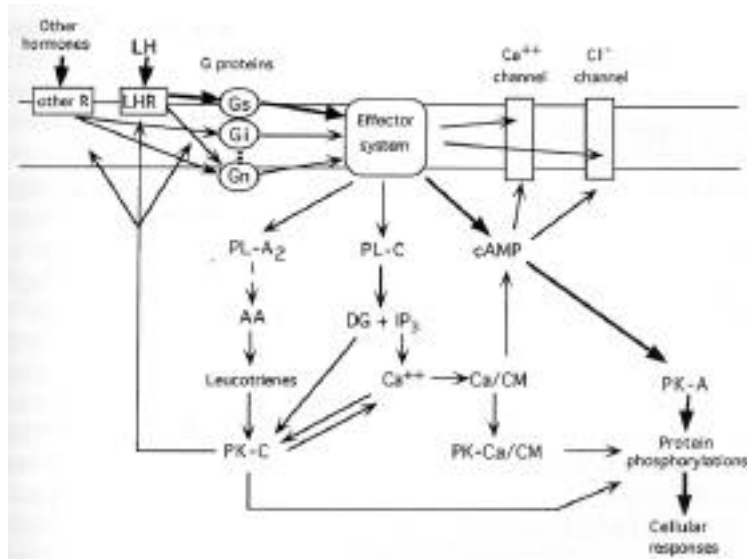


Figura 13. Sistemes de senyal de transducció diferencial que involucren a la LH en les cèl·lules de Leydig. A l'esquema s'observa els diferents missatgers secundaris del sistema d'acció de la LH i la modulació dels mateixos per part d'altres lligands.

Gs: proteïna G estimuladora PK: proteïna quinasa R: receptor
 Gi: proteïna G inhibidora CM: calmodulina PL: fosfolipasa
 Gn: altres proteïnes G AA: àcid araquidònic

(Huhtaniemi, I. and Topari, J. 1998)

Tot això permet veure com nombrosos factors paracrins poden modular l'acció de les gonadotrofines. Els passos en la cascada d'acció de la LH després de l'AMPc inclou l'activació de la proteïna quinasa A (PK-A), que catalitzarà la fosforilació/activació dels enzims involucrats en l'esteroidogènesi. Un element en la part distal de la cascada és la *steroidogenic acute regulatory protein* (Star), que augmenta el transport de colesterol des de fora cap a l'interior de la membrana mitocondrial on té lloc el primer pas de la síntesi d'hormona esteroïdal, *i.e. cholesterol side chain cleavage*.

La resposta esteroidogènica a la LH és en principi molt ràpida, però existeixen grans diferències entre espècies. Una injecció de LH o gonadotrofina coriònica humana (hCG) als rosegadors, provoca en menys d'una hora, un increment de fins a 10 cops els nivells de T al sèrum. En l'humà, la resposta és menor, i només es dona un increment de 2 cops els nivells de T 2 o 4 dies després de l'estímul. (Huhtaniemi, I. et al. 1982; Huhtaniemi, I. et al. 1983). La raó d'aquesta resposta menor pot ser la diferència en el transport de T per la circulació. Ja que mentre a l'humà la majoria de T va unida a la *sex hormone-binding globulin* (SHBG), als rosegadors els nivells d'*androgen-binding protein* (ABP) són molt

baixos. Això fa que la vida mitja de la T a la circulació humana s'allargui, i per tant, actui com a tamponador en els canvis de concentració (Griffin, J.E. and Wilson, J.D. 1992). Uns efectes similars s'han pogut veure *in vitro*, ja que cèl.lules de Leydig humanes en cultiu després d'una estimulació amb LH/hCG produeixen una quantitat petita de T (Kumar, T.R. et al. 1997). La LH també regula el creixement i diferenciació de les cèl.lules de Leydig.

La LH estimula l'esteroidogènesi testicular i manté alta la concentració intratesticular d'esteroids que és necessària per a l'espermatogènesi (Sharpe, R.M. 1994; Sharpe, R.M. 1987). No es coneix com la concentració alta de T intratesticular regula l'espermatogènesi. El receptor d'andrògens està present a les cèl.lules de Leydig, peritubulars i de Sertoli (Sharpe, R.M. 1994; Weinbauer, G.F. and Nieschlag, E. 1990). Tot i que s'ha suggerit que algunes cèl.lules espermatogèniques siguin una diana dels andrògens (Sharpe, R.M. 1994), hi ha evidències de que aquest efecte androgènic és indirecte via factors paracrins produïts per les cèl.lules somàtiques testiculars, com poden ser les cèl.lules peritubulars i de Sertoli, en resposta a aquesta T. A part de la T són necessaris un gran nombre d'hormones i factors paracrins per tal de mantenir l'espermatogènesi, cap d'ells per si sol és suficient. La sinèrgia i/o accions additives de tots els reguladors, proporcionen un ambient fisiològic idoni per a l'espermatogènesi.

III.2. La FSH i l'espermatogènesi

Les cèl.lules de Sertoli són la diana d'acció de la FSH a l'epiteli seminífer. Un estudi autoradiogràfic revela que les espermatogònies podrien unir FSH, però això no ha estat confirmat per altres autors (Orth, J.M. and Christensen, A.K. 1978). Les cèl.lules de Sertoli posseeixen receptors específics per a la FSH, que són estructuralment semblants als receptors de la LH (Heckert, LL. and Griswold, M.D. 1991). De la mateixa manera que amb la LH, el senyal de transducció de la FSH té lloc via proteïna G acoplada a l'adenilat ciclasa (Casey, P.J. and Gilman, A.G. 1988; Griswold, M.D. 1993), que provocarà un increment en els nivells d'AMPc i l'activació de la PK-A (Figura 14). La PK-A fosforila proteïnes com la vimentina, enzims i factors reguladors, que inclouen l'element de resposta a AMPc (CRE), la *CRE binding protein* (CREB) i els moduladors de CRE (CREMs). La CREB funciona com a activador transcripcional unint-se específicament als CRE presents en les regions promotores dels gens que responen a AMPc (Montminy, M.R. et al. 1990) (Figura 14). El mRNA de CREB és expressat tant a les cèl.lules de Sertoli com a cèl.lules espermatogèniques (Weaber, G. et al. 1991). L'expressió a les cèl.lules de Sertoli depèn de l'estadiatge del túbul seminífer i es troben nivells elevats en els estadiatges II i VI

(Toppari, J. et al. 1991). També es troben en el testicle les isoformes de CREM activadores i repressores. Els nivells de mRNA de c-fos augmenten després de l'estimulació per FSH (Hall, S.H. et al. 1988). Els protooncogen c-fos i els membres de la família c-jun són factors reguladors trans-activadors que controlen l'activitat d'altres gens.

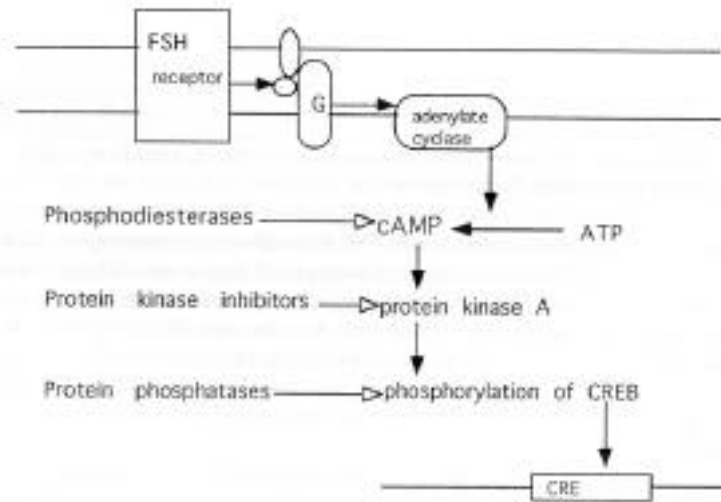


Figura 14. El camí de transducció de senyal des del receptor de FSH fins al gen regulat per AMPc. La modulació positiva s'indica amb fletxes negres i la modulació negativa amb fletxes blanques.
 CRE: element de resposta AMPc CREB: proteïna d'unió a CRE
 (Huhtaniemi, I. and Topari, J. 1998)

Mentre que la FSH estimula la producció d'AMPc, les fosfodiesterases disminueixen els nivells d'AMPc a les cèl.lules de Sertoli. Al testicle han estat clonats i identificats diferents gens que codifiquen per a fosfodiesterases, que són regulats per la FSH (Conti, M. et al. 1991). La FSH també estimula la producció d'un inhibidor de la proteïna quinasa que modula l'activitat de la PK-A a les cèl.lules de Sertoli (Tash, J.S. et al. 1981; Van Patten, S.M. et al. 1991). L'estimulació de la proteïna quinasa C (PK-C) inhibeix la producció d'AMPc dependent de la FSH a les cèl.lules de Sertoli (Monaco, L. and Conti, M. 1987).

El calci té un paper important en l'acció de la FSH. El seu flux és regulat per FSH i els efectes de la FSH són modulats pels nivells de calci lliure intracel.lulars. Tot i així, la cascada AMPc- PK-A es considera el camí més important de transducció de senyal de la FSH.

III.3. Les accions de la FSH en funció de l'edat

En els períodes prenatal i prepuberals la FSH estimula la proliferació de les cèl.lules de Sertoli (Orth, J.M. 1984). Aixó influencia a la fertilitat, ja que s'ha correlacionat el número de cèl.lules de Sertoli amb la llargada total de l'epiteli seminífer i amb la capacitat de producció d'espermatozous. Les cèl.lules de Sertoli rarament es divideixen després de la pubertat (Orth, J.M. 1982; Orth, J.M. et al. 1988). En estat hipotiroïdal, la fase proliferativa de les cèl.lules de Sertoli és prolongada, el que provocarà, a l'etapa madura, un increment del tamany testicular i de la producció diària d'espermatozous (Cooke, P.S. et al. 1991; Laron, Z. et al. 1971). La FSH ha estat considerada un factor essencial en l'inici de l'espermatogènesi a la pubertat, tot i que dades recents obtingudes amb el ratolí *knock-out* pel gen FSH i mutacions que inactiven el receptor de FSH en humans posen en entredit aquesta afirmació.

A l'epiteli seminífer adult trobem diferents tipus de cèl.lules germinals associades, aquesta disposició no solament és estructural, sinó que també és funcional, ja depèn de la regulació hormonal de les cèl.lules de Sertoli (Parvinen, M. et al. 1986). La cèl.lula de Sertoli respon a les principals hormones reguladores de l'espermatogènesi, la FSH i la T, que varien segons els estadiatges del cicle de l'epiteli seminífer (Parvinen, M. et al. 1986).

III.4. El paper de la LH, de la T i de la FSH en la iniciació i el manteniment de l'espermatogènesi

Aparentment, els requeriments hormonals per a la iniciació de la primera onada d'espermatogènesi a la pubertat, el manteniment de l'espermatogènesi a l'edat adulta i la reiniciació després d'una aturada transitòria, són diferents. Els estudis realitzats en rates immadures hipofisectomitzades van demostrar que els andrògens de manera aïllada no són capaços de conduir l'espermatogènesi fins al final (Chemes, H.E. et al. 1979.a). D'acord amb això, si un animal prepuberal és hipofisectomitzat, l'administració de LH evita parcialment la pèrdua de cèl.lules germinals (Russell, L.D. et al. 1987). Als primats, incloent l'home, s'ha demostrat que la T aïllada tan sols pot iniciar l'espermatogènesi, mentre que en els rosegadors la conduiria més lluny (Chemes, H.E. et al. 1979.b).

Una vegada iniciada l'espermatogènesi, el seu manteniment té uns requeriments hormonals diferents. En rosegadors, l'espermatogènesi pot ser mantinguda després d'una hipofisectomia amb T, DHT i LH (Weinbauer, G.F. and Nieschlag, E. 1990). A l'humà, la mateixa dependència de T i LH ha estat demostrada (Matsumoto, A.M. 1989). El tractament amb enantat de T (200 mg/setm. i.m) a l'humà suprimeix tant la T

intratesticular com les gonadotrofines, mantenint els nivells de T perifèrics normals o lleugerament elevats. L'espermatogènesi queda severament suprimida, el que suggereix que el tractament amb T exògena podria ser un bon mètode contraceptiu pels homes (World Health Organization 1990). Si a continuació els individus reben injeccions de LH o gonadotrofina coriònica, l'espermatogènesi es recupera, ja que els nivells de T intratesticulars tornen a augmentar (Figura 15). De totes maneres, els nivells de FSH no es recuperen, i si bé l'espermatogènesi es recupera de forma qualitativa, la quantitat d'espermatozous és menor, entre 25 i 50 milions per ml enfront de la concentració inicial de 75-100 milions per ml. Així, és evident que la reiniciació qualitativa de l'espermatogènesi es pot fer amb T de manera aïllada, però la recuperació quantitativa necessita FSH, ja que s'ha demostrat que la seva administració comporta la recuperació quantitativa de l'espermatogènesi (Matsumoto, A.M. 1989). Estudis en humans als quals se'ls ha suprimit la T, el tractament amb FSH estimula l'espermatogènesi (Matsumoto, A.M. 1989). Aquests estudis han posat de manifest que la T i la LH no són necessaris per a l'espermatogènesi. La FSH humana recombinant per ella sola és capaç d'estimular l'esteroidogènesi testicular (Matikainen, T. et al. 1994), per tant, aquest efecte de la FSH podria ser degut al sinergisme entre la FSH i els nivells baixos de T intratesticular.

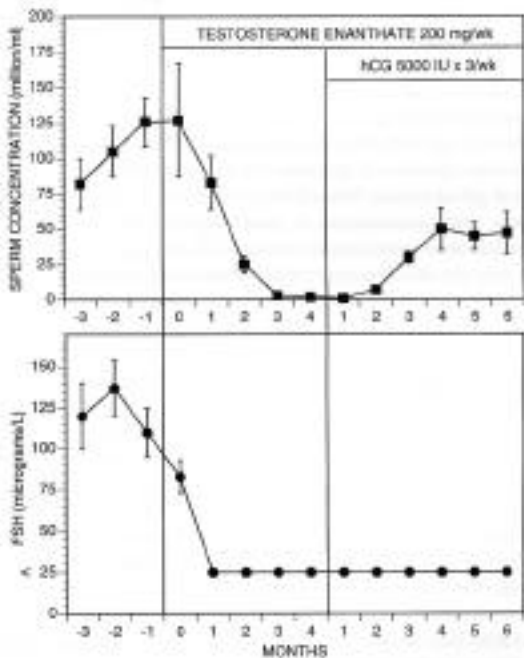


Figura 15. Efectes de l'enantat de T sol i amb hCG en la concentració d'espermatozous i els nivells sèrics de FSH. (Huhtaniemi, I. and Topari, J. 1998)

S'ha pogut obtenir més informació al respecte gràcies a la troballa d'humans adults amb mutacions que inactiven el receptor de la FSH i amb models animals com el ratolí *knock-out* pel gen FSH. Els homes amb un receptor no funcional per a la FSH tenen un

tamany testicular reduït i una supressió de l'espermatogènesi, però no són azoospermics, i alguns fins i tot tenen fills (Tapanainen, J.S. et al. 1997). Pel que fa al ratolí *knock-out*, té un tamany testicular reduït i l'espermatogènesi suprimida, però és fèrtil (Kumar, T.R. et al. 1997). En base a aquests resultats, la FSH seria necessària per a la proliferació de les cèl.lules de Sertoli peripuberals (determinant el tamany final del testicle) i per al manteniment quantitatiu de la producció d'espermatozous en l'edat adulta, però no per a la iniciació de l'espermatogènesi a la pubertat.

Una altra qüestió que cal analitzar és la quantitat de T necessària per al manteniment de l'espermatogènesi. Dades obtingudes amb experimentació animal ens indiquen que és suficient un 20-40% de la quantitat de T normal per a mantenir l'espermatogènesi (Sharpe, R.M. 1987; Weinbauer, G.F. and Nieschlag, E. 1990; Cunninham, G.R. and Huckins, C. 1979), i per tant, els nivells normals són més alts dels que es necessiten per a saturar el receptor d'andrògens. Tots aquests resultats ens porten a concloure que, per al manteniment de l'espermatogènesi, cal una acció de sinergisme entre la T, la FSH i altres hormones o factors paracrins. Així, la manca d'un dels factors pot ser compensada per la presència d'un altre. A més a més, la concentració de T intratesticular és més alta de la necessària, probablement com a mecanisme protector d'aquesta funció tant important.

III.5. La regulació del funcionament testicular per altres hormones

A més a més de la LH i la FSH, altres hormones circulants poden tenir efectes sobre el funcionament testicular, com són la prolactina, l'hormona del creixement (GH), la insulina, els glucocorticoids i l'hormona tiroïdal.

La prolactina augmenta l'esteroidogènesi testicular en resposta a la LH en rosegadors, probablement mantenint els receptors de LH de les cèl.lules de Leydig (Huhtaniemi, I. and Catt, K.J. 1981). La funció de la prolactina s'ha demostrat en estudis amb hamsters en els que se'ls ha disminuït el fotoperíode. Aquest canvi s'associa a una disminució dels nivells de prolactina i una involució del testicle (Bartke, A. et al. 1980). La prolactina reverteix la involució provocada per la foscor. De totes maneres no està clar que la prolactina tingui uns efectes directes sobre el funcionament del testicle, ja que existeixen resultats a favor i en contra d'aquesta hipòtesi (Huhtaniemi, I. 1993). L'hiperprolactinèmia en humans ha estat relacionada amb hipofuncionament testicular, tot i que molt probablement els efectes són indirectes.

L'hormona del creixement estimula a nivell testicular la formació del factor de creixement de la insulina 1 (IGF-1), i aquest actua com a mediador de les seves accions.

Estudis en models de rossegadors deficients en GH i rossegadors resistents a GH demostren un endarreriment de l'arribada de la pubertat i una disminució de la resposta de les cèl.lules de Leydig a LH/CG (Chatelain, P.G. et al. 1991).

S'han trobat receptors d'insulina a les cèl.lules de Leydig. La insulina i la LH augmenten l'expressió dels receptors l'una de l'altra. La insulina augmenta l'esteroidogènesi tant basal com estimulada amb LH de les cèl.lules de Leydig (Huhtaniemi, I. 1993).

La funció de la cèl.lula de Leydig també és modulada per les hormones esteroidals, que inclouen els andrògens, els estrògens i els glucocorticoids. Els estrògens i els andrògens són produïts per les cèl.lules de Leydig, i els seus efectes són paracrins i autocrins. Per contra, els glucocorticoids són d'origen adrenal, i poden contribuir a la regulació endocrina del testicle. En determinats síndromes i durant l'estrès, tant fisiològic com mental, s'han trobat nivells sistèmics elevats de glucocorticoids, que s'ha vist que suprimeixen la síntesi d'andrògens testiculars (Philips, D.M. et al. 1989). Les cèl.lules intersticials del testicle tenen receptors de glucocorticoids. S'ha comprovat que aquestes hormones suprimeixen la conversió de colesterol a hormones esteroidals (Hales, D.B. and Payne, A.H. 1989).