

# Chalona Espermatogonial G<sub>1</sub>\*

G<sub>1</sub> -spermatogonial chalone

EDUARDO BUSTOS-OBREGON

Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina Norte,  
Universidad de Chile, Santiago

Chalones are physiological inhibitors of cell proliferation that act either at the G<sub>1</sub> or G<sub>2</sub> phase of the cell cycle. They have been described for a variety of tissues, including the seminiferous epithelium. *In vivo* and *in vitro* characterization of rat G<sub>1</sub> spermatogonial chalone demonstrate that it is a glycoprotein, heat-labile, molecular weight under 5,000 D, tissue specific but not species-specific, active at physiological pH, with a mechanism of cell action mediated by cyclic AMP. The origin of the substance are the differentiated cells of the spermatogenesis from primary spermatocytes up to round spermatids. The target cells are the type A (and perhaps only the A<sub>0</sub>) spermatogonia. The inhibitory effect, measured as a decrease in the uptake of H<sup>3</sup>-thymidine into testicular DNA, is not dependent on testicular steroids, Sertoli cell products (inhibin or the like) nor on the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis, since it occurs *in vitro*.

In the mouse, the biological half-life (*in vivo*) of the G<sub>1</sub> spermatogonial chalone is around 14 hs. Chronic administration for the entire length of mouse spermatogenesis does not alter spermatogenic kinetics nor does it result in azoospermia.

The biological effect of the G<sub>1</sub> spermatogonial chalone can be counteracted *in vitro* by means of an immune rabbit serum raised against a partially purified rat testicular extract (source of the chalone).

## INTRODUCCION

La proliferación gonial en el testículo está regulada en gran medida por inhibidores fisiológicos que actúan en diferentes etapas del ciclo celular de las espermatogonias del tipo A. A estos factores se les ha designado con el nombre general de chalongas. La presencia de chalongas en el testículo fue demostrada hace más de una década por Clermont y Mauger (1-2) al encontrar que un extracto testicular inhibía la incorporación *in vivo* de <sup>3</sup>H-timidina, tanto en ratas irradiadas localmente al escroto como en ratas prepúberes. En ambos casos la proliferación espermatogonial está significativamente aumentada con respecto a la rata adulta normal. Esta chalona actuaría a nivel de la etapa G<sub>1</sub> del ciclo celular, impidiendo que las células entren en S. También se ha demostrado la existencia de una chalona espermatogonial G<sub>2</sub> (3), cuya acción disminuye notoriamente el índice mitótico en el testículo de ratas irradiadas. Se ha postulado que las chalongas testiculares actuarían fundamentalmente sobre las espermatogonias A<sub>0</sub> inducidas a

proliferar por irradiación del epitelio seminífero, y que serían producidas por la población más diferenciada, A<sub>1</sub> - A<sub>4</sub>.

Thumann y Bustos-Obregón (4) observaron que túbulos seminíferos de rata irradiada localmente, incubados *in vitro* con extracto testicular (sobrenadante de 105.000 g) presentaban una importante disminución en la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Esta fue la primera confirmación *in vitro* de la existencia de la chalona espermatogonial G<sub>1</sub> en el testículo. Se encontró, además, que este inhibidor es termolábil, liofilizable, precipitable con etanol y específico de tejido, propiedades que son compartidas con chalongas obtenidas de otros tejidos. Además se encontró que la curva de inhibición de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina era compatible con la teoría de ocupación de receptores. Posteriormente, Thumann *et al.* (5) utilizando el bioensayo *in vitro*, demostraron que la actividad chalónica espermatogonial es específica, independiente de bacterias contaminantes, máxima a pH fisiológico, y especie inespecífica. Por otra parte, extractos acetónicos testiculares

\* Los resultados expuestos pertenecen a trabajos realizados en colaboración con: Alex Thumann, Roberto Carboni, Patricia Arenas, Enrique Castellón.

mantenían la actividad inhibidora, lo que indica que su acción es independiente de lípidos y esteroides testiculares. Además, mostraron que la producción de esta chalona está asociada a las células de la línea germinal del túbulo seminífero de rata y que existe una correlación entre la producción de este inhibidor mitótico, la edad del animal y la aparición de células más diferenciadas (tales como espermatoцитos) en el testículo de la rata prepúber, por lo que postularon que en las condiciones usadas, los espermatoцитos serían las células responsables de la producción de la chalona espermatogonial. Paralelamente se observó un aumento progresivo de la sensibilidad en las células que responden a este inhibidor, la cual es máxima a los 25 días de edad para disminuir posteriormente como consecuencia del establecimiento de la línea germinal completa, ya que con ello se determinan las condiciones de autorregulación propias del testículo adulto normal.

En la mayoría de los mamíferos, el túbulo seminífero presenta una ordenación espacial en estratos celulares que van desde la membrana basal hacia el lumen. Junto a la membrana basal se encuentran las espermatogonias que darán origen por mitosis a los precursores de los espermatozoides. En ratón, al igual que en la rata, las espermatogonias reciben denominaciones de  $A_0$  (células troncales de reserva),  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$  (células troncales en renovación), intermedias y B (espermatogonias diferenciadas) (6). Normalmente las espermatogonias del tipo  $A_0$  están en reposo mitótico, pero pueden ser inducidas a entrar en mitosis luego de una irradiación local al escroto con una dosis determinada de rayos X (por ejemplo, 300 r, que producen una depleción parcial del túbulo seminífero). Fundamentalmente son destruidas las células en activa proliferación ( $A_1$  -  $A_4$ , Intermedias y B), mientras que los espermatoцитos y las espermátidas no son afectados y continúan su evolución hacia espermatozoide. Sin embargo, las espermatogonias  $A_0$  sólo disminuyen en un pe-

queño porcentaje. Las espermatogonias remanentes entran en activa proliferación y son capaces de repoblar el túbulo seminífero. En la rata a los 11 días y en ratón a los 7 días postirradiación (7), se produce una activa repoblación del túbulo seminífero a expensas de las espermatogonias  $A_0$  radioresistentes. Es este modelo de animal irradiado el utilizado en nuestros experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, para el ensayo de la actividad chalónica.

En el presente trabajo se muestran los resultados de la caracterización biológica de la chalona espermatogonial  $G_1$ , tanto *in vivo* como *in vitro*, fundamentalmente en lo que se refiere a su vida media biológica, su producción y probable mecanismo de acción. Además se incluyen algunos datos preliminares sobre su purificación.

#### VIDA MEDIA BIOLÓGICA DE LA CHALONA ESPERMATOGONIAL $G_1$

Se estudió la vida media biológica *in vivo* de la chalona espermatogonial  $G_1$ , para lo cual se irradiaron ratones machos de la cepa A/Sn localmente al escroto con 300 r de rayos X. A los 7 días postirradiación se inyectaron i.p. distintos grupos de animales con 4 dosis de extracto testicular (3,5 mg c/u) a intervalos de 2, 4, 8, 12, 14, 18, 24 y 48 h. Paralelamente se inyectaron grupos controles con solución salina (PBS) a los mismos intervalos. Diez horas después de la última inyección se les administró i.p. a todos los ratones una dosis de 1  $\mu$ Ci/g de peso corporal de  $^3$ H-timidina. Dos horas más tarde se sacrificaron y se procesaron sus testículos para determinación de radiactividad específica y cuantificación de DNA por el método de Schneider (8) y Burton (9). Se observó que la actividad inhibidora se mantuvo hasta las 12 h, disminuyendo rápidamente para llegar a niveles basales a las 18 h (Fig. 1). La actividad biológica media se encuentra aproximadamente a las 16 h. La actividad chalónica se expresa, en todos los casos, como fracción de inhibición de la incorporación de  $^3$ H-timidina (F.I.\*).

$$* \text{ F.I.} = \frac{\text{RDNA (control)} - \text{RDNA (experimental)}}{\text{RDNA (control)}}$$

RDNA = Radiactividad específica del DNA

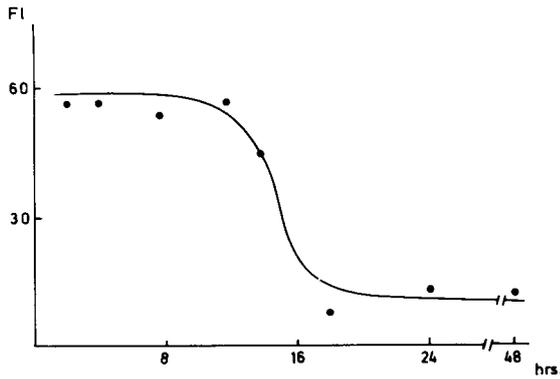


Fig. 1: Análisis de la vida media de la actividad biológica de la chalona espermatogonial G<sub>1</sub> de ratón. Se inyectaron ratones (4 animales por grupo) 7 días postirradiación con PBS o extracto testicular (E.T.). Estos animales reciben 4 inyecciones intraperitoneales a intervalos de 2, 4, 8, 12, 14, 18, 24 y 48 h. Los resultados se expresan como la fracción de inhibición (F.I.) de la incorporación de <sup>3</sup>H-TdR.

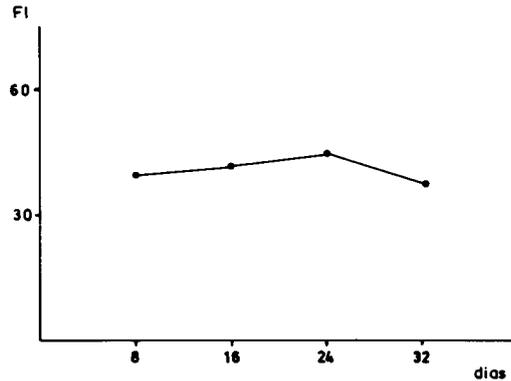


Fig. 2: Efecto de tratamientos prolongados con chalona espermatogonial G<sub>1</sub> de ratón. Se inyectaron ratones intraperitonealmente 7 días postirradiación con PBS o extracto testicular cada 12 h, durante 8, 16, 24 y 32 días. Doce horas después de la última inyección se administró a todos los animales <sup>3</sup>H-TdR (2,5 μC/g peso corporal) y se sacrificaron 35 días después de la primera inyección de PBS o extracto testicular (E.T.). Los resultados se expresan, como se indicó, en la leyenda de la Fig. 1.

#### TRATAMIENTOS PROLONGADOS CON EXTRACTO TESTICULAR

Con el objeto de estudiar la acción prolongada *in vivo* de la actividad chalónica se utilizaron ratones machos adultos de la cepa A/Sn, 7 días postirradiación local al escroto. Distintos grupos de estos animales se inyectaron i.p. con extracto testicular (3,5 mg) cada 12 h, durante 8, 16, 24 y 32 días. Paralelamente se inyectaron ratones en las mismas condiciones, con PBS como control. A las 12 h después de la última inyección se les administró i.p. a todos los animales una dosis de 2,5 μCi/g peso corporal de <sup>3</sup>H-timidina, dejándoseles completar su espermatogénesis. Al cabo de este tiempo (35 días postprimera inyección) se sacrificaron todos los ratones. Uno de sus testículos fue utilizado para determinar radiactividad específica y cuantificar DNA y el contralateral fue fijado en Bouin, incluido en parafina y procesado para radioautografía. Los radioautogramas se tiñeron con técnica corriente (hematoxilina - eosina) y fueron examinados con un aumento de 1.000x con el objeto de establecer el tipo de célula germinal marcada tanto en controles como experimentales. Se encontró que la F.I. se mantuvo aproximadamente constante a lo largo del tratamiento (Fig. 2). Comparando el índice de marcación y el tipo celular marcado de acuerdo a los estados del

ciclo del epitelio seminífero del ratón, en los radioautogramas se encontró que en los animales tratados con extracto testicular durante 8 días, tanto en controles como experimentales, la marca se concentraba en espermátidas maduras de los estados VI al VIII (Tabla I). En ratones tratados durante 16 días (controles y experimentales) las células marcadas correspondían a espermátidas redondas de los estados IV al VI. En el grupo que recibió extracto testicular (o PBS) durante 24 días, la marca se presentó en los espermatoцитos en paquiteno de los estados IX y X. El último grupo (32 días de tratamiento) mostró espermatoцитos en leptoteno de los estados IX al XI, marcados (Tabla I). Con respecto a la histología de los túbulos seminíferos, el tratamiento con extracto testicular no causó un daño significativo al ser comparado con el tratamiento análogo con PBS (Tabla I).

#### ENSAYO *IN VITRO* DE LA CHALONA ESPERMATOGONIAL G<sub>1</sub>

Para el ensayo *in vitro* de la actividad chalónica se utilizan generalmente ratas macho adultas de las cepas Donju o Sprague-Dawley irradiadas localmente al escroto con 300 r de radiación X. A los 11 días postirradiación (máximo índice proliferativo) se sacrifican los animales, se extraen sus testículos y se disgregan manualmente

TABLA I

Porcentaje de marcación de células espermatogénicas en distintos estados del ciclo del epitelio seminífero de ratones bajo tratamiento prolongado con extracto testicular (E.T.)

Tiempo (días)	Grupos*	Índice de marcación**	Tipo celular	Estado del ciclo
8 días	Control (PBS)	40,45	Espermátidas	VI - VIII
	Experimental (E.T.)	38,22	maduras	
16 días	Control	39,42	Espermátidas	IV - VI
	Experimental	38,31	redondas	
24 días	Control	44,00	Paquitenos	IX - XI
	Experimental	44,23		
32 días	Control	38,87	Leptotenos y	IX - XI
	Experimental	40,75	Zigotenos	

\* Animales tratados con PBS o extracto testicular (E.T.).

\*\* Se consideraron tres ratones por grupo, contándose células marcadas en 20 túbulos en corte transversal por cada animal. Tomada de Bustos-Obregón (17).

los túbulos seminíferos. Estos túbulos (150 - 200 mg por ensayo) se incuban según la técnica de Steinberger *et al.* (10) modificada, en medio de cultivo mínimo con sales de Hank y glutamina, suero fetal de ternera al 10%, Hepes 10 mM pH 7,2 y piruvato de Na 1 mM. Dependiendo del ensayo se adiciona 0,7 ml de la fracción a la cual se desea determinar actividad chalonica totalizando un volumen de 7 ml por placa de cultivo. Después de 2 h de incubación a 31°, se da un pulso de 25  $\mu$ Ci de  $^3$ H-timidina por placa, y luego se incuban por 1 h más en las mismas condiciones. Posteriormente, los túbulos son congelados hasta la cuantificación de DNA y radiactividad específica. Los resultados se expresan como la fracción de inhibición de la incorporación de  $^3$ H-timidina (F.I.). Cuando se incuban túbulos seminíferos de rata irradiada con 35 mg de extracto testicular de rata adulta por placa de cultivo, se obtienen F.I. de aproximadamente 0,50.

#### TIPO CELULAR INVOLUCRADO EN LA PRODUCCION DE LA CHALONA

En trabajos previos (11) se sugería que la actividad chalonica era producida fundamentalmente por las células de la línea

germinal, ya que un extracto obtenido de ratas "Sertoli solo"\* no presentaba actividad chalonica, la que coincide con la aparición de poblaciones celulares en diferenciación (espermátidas).

En experimentos recientes hemos usado fracciones enriquecidas con distintos tipos de células testiculares. Para ello se utilizaron testículos de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 2,5 meses de edad, los cuales fueron descapsulados y cortados en trozos de 2 mm. Los túbulos cortados se trataron con agitación y luego con una solución de tripsina al 20% más DNasa 5% por 20 min en las mismas condiciones anteriores, según la técnica propuesta por Welsh y Wiebe (12). Luego de una serie de filtraciones en mallas de seda de diferente tamaño de poro se obtuvieron las siguientes fracciones celulares:

a) Fracción de células de Sertoli: 85% de pureza determinada por microscopía óptica en frotis fijado con metanol acético y teñido con orceína acética.

b) Fracción de espermátidas y espermatogonias: 90 y 10%, respectivamente, determinada por microscopía óptica en fro-

\* Ratas macho carentes de línea germinal, nacidas de hembras tratadas con Busulfan, en el día 13 de preñez.

tis fijado con Bouin y teñido con PAS-hematoxilina.

c) Fracción espermátidas redondas: 95% de pureza determinada como en b.

d) Fracción espermátidas elongadas: 95% de pureza determinada en b.

Además se obtuvo una fracción de espermatozoides mediante flotación de macedero de epidídimos de rata adulta.

La viabilidad de estas fracciones se estimó mediante la exclusión del colorante azul tripan encontrándose en todos los casos sobre el 90% de las células no teñidas.

Se ensayaron *in vitro* para actividad chalónica, extractos celulares de todas las fracciones anteriores, encontrándose que sólo presentaban una importante F.I. la fracción de espermatoцитos y espermatogonias y la fracción de espermátidas redondas. La carencia de actividad inhibitoria de la fracción de células de Sertoli confirmó el origen germinal de la chalona testicular (Tabla II).

PROBABLE MECANISMO DE ACCION DE LA CHALONA ESPERMATOGONIAL

Se ha propuesto que la proliferación celular está relacionada con las concentraciones intracelulares de cAMP, de tal manera que una población en activa división presenta bajos niveles de este nucleótido cíclico y, por el contrario, células en reposo proliferativo tienen altas concentraciones de cAMP (13). Por otro lado, se ha sugerido que el receptor de chalona podría actuar a través de una activación de la adenilato ciclasa (Oye 1968, citado por Iversen) (14).

Con estos antecedentes hemos medido los niveles de cAMP en nuestras distintas condiciones experimentales. Las diferentes muestras se homogeneizaron en PCA, se centrifugaron y se neutralizaron. En el sobrenadante se determinó cAMP por desplazamiento isotópico, utilizando [8-<sup>3</sup>H]-cAMP, de acuerdo a Tavey *et al.* (15) y proteína ligante de músculo esquelético de bovino purificada según Gilman (16). Los túbulos seminíferos de rata adulta normal presentaban 8 veces más cAMP intracelular que los túbulos provenientes de rata después de 11 días de la irradiación (máxima proliferación) y que nuevamente se elevaban (aproximadamente 4 veces) cuando estos últimos se trataban con extracto testicular (chalona) por 3 h a 31°. El extracto testicular agregado no presentó niveles detectables de cAMP, por el método usado (Tabla III).

Paralelamente se estudió el efecto de distintas concentraciones (10<sup>-6</sup> - 10<sup>-2</sup> M) de dibutiril-cAMP junto con un inhibidor de la fosfodiesterasa (teofilina 2 mM) utilizando el bioensayo *in vitro* para actividad chalónica. Se observó que el dibutiril-cAMP presentó un efecto inhibitorio, dosis-dependiente, sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina (Tabla IV). Los resultados sugieren la participación de cAMP como segundo mensajero en el efecto chalónico.

PURIFICACION PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD CHALONICA

La caracterización bioquímica de la chalona espermato gonial G<sub>1</sub> ha resultado difícil

TABLA II

Efecto de chalona G<sub>1</sub> *in vitro*, debido a poblaciones celulares aisladas de testículo de rata

Grupo*	cpm/mg DNA ( $\bar{X} \pm$ E.S.)	F.I.**	n	p (vs 1)
1. Control (BSA)*	12.176 $\pm$ 1.094	—	4	—
2. Fracción células de Sertoli	12.084 $\pm$ 1.329	0,01	4	> 0,05
3. Espermato gonias y espermatoцитos	6.237 $\pm$ 919	0,49	4	> 0,001
4. Espermátidas redondas	6.587 $\pm$ 657	0,46	4	> 0,001
5. Espermátidas elongadas	12.873 $\pm$ 989	0,01	4	> 0,1
6. Espermatozoides	12.901 $\pm$ 1.304	0,01	4	> 0,1

\* Al medio de incubación se le agrega 0,7 ml de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) o 0,7 ml de un extracto de las diferentes poblaciones celulares enriquecidas.

\*\* F.I.: Fracción de inhibición de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina.

TABLA III

Concentraciones de cAMP en túbulos seminíferos y extracto testicular de rata

	cAMP (M)
Túbulos seminíferos de rata normal	$11,9 \times 10^{-7}$
Túbulos seminíferos de rata irradiada	$1,4 \times 10^{-7}$
Túbulos seminíferos de rata irradiada tratada con BSA (control)	$1,2 \times 10^{-7}$
Túbulos seminíferos de rata irradiada tratada con extracto testicular	$4,9 \times 10^{-7}$
Extracto testicular	No detectado

Los resultados representan el promedio de muestras en duplicado.

de realizar. Su actividad es termolábil, pero no se pierde por liofilización. En intentos preliminares se ha logrado sólo un pequeño aumento en su actividad específica (4 veces) mediante precipitación con etanol (fracción 50 - 70%). La purificación por Sephadex G-100 no ha sido satisfactoria debido a la pérdida de actividad probablemente por extrema dilución de la sustancia activa.

En vista de estas dificultades sometimos el extracto testicular (sobrenadante de 105.000 g) a un sistema de ultrafiltración diferencial a través de membranas Amicon de diferente tamaño de poro. Se encontró que la actividad chalónica pasa a través de una membrana con límite de retención de 10.000 d. La fracción activa contiene un 2,5% de la proteína del extracto testicular inicial y una actividad específica 17 veces superior (Tabla V).

## DISCUSION

En el presente trabajo se han revisado los hallazgos más relevantes en relación a la caracterización biológica de la chalona espermatogonial  $G_1$ . Los datos presentados se han discutido parcialmente en revisiones recientes (17, 18).

Existen dos tipos de chalonas en la rata: la chalona espermatogonial  $G_1$  demostrada *in vivo* por Clermont y Mauger (1) y confirmada *in vitro* por nuestro grupo (4) y la chalona espermatogonial  $G_2$  demostrada por Irons y Clermont (3).

El efecto de la chalona espermatogonial  $G_1$  se evidencia fundamentalmente en ani-

TABLA IV

Inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en túbulos seminíferos de rata irradiada por diferentes concentraciones de dibutilil-cAMP

	cpm/mg DNA ( $\bar{X} \pm \text{E.S.}$ )	F.I.*	N	P
Control (3,5 mg BSA)	$18.024 \pm 1.629$	—	4	—
Extracto testicular (3,5 mg)	$9.271 \pm 1.392$	0,49	5	< 0,001
Teofilina (2 mM)	$13.203 \pm 1.548$	0,27	5	< 0,001
dib-cAMP $10^{-6}\text{M}$ + Teof. (2 mM)	$9.739 \pm 1.383$	0,46	5	< 0,001
dib-cAMP $10^{-4}\text{M}$ + Teof. (2 mM)	$8.162 \pm 743$	0,55	5	< 0,001
dib-cAMP $10^{-2}\text{M}$ + Teof. (2 mM)	$7.626 \pm 1.199$	0,58	5	< 0,001

\* F.I.: Fracción de inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina.

TABLA V

Ultrafiltración diferencial de extracto testicular de rata por membranas AMICON

	Actividad chalónica (F.I.*)	Actividad chalónica específica (F.I./mg Prot.)	Purificación (veces)
Extracto testicular sin filtrar	0,30	0,08	1
Remanente de la filtración por PM 10.000	0,02	—	—
Eluido de la filtración por PM 10.000	0,26	1,33	17
Remanente de la filtración por PM 2.000	0,25	1,33	17
Eluido de la filtración por PM 2.000	0,00	—	—

\* F.I.: Fracción de inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina.

males adultos irradiados localmente. Sin embargo, se ha demostrado que este inhibidor puede actuar también sobre el epitelio seminífero de ratas inmaduras tanto *in vivo* (2) como *in vitro* (11).

En bioensayo para actividad chalónica realizado *in vivo* en ratones adultos no irradiados (19) no se encontró una fracción de inhibición significativa comparada con la F.I. obtenida en el modelo irradiado. Estos resultados se contraponen con los de De Rooij (20), quien, trabajando con ratones adultos de la cepa Cpb-N, no irradiados, encontró que inyecciones i.p. de extracto testicular disminuían significativamente el número de espermatogonias indiferenciadas (A). Este efecto fue evaluado contando el número total de espermatogonias (A<sub>0</sub> + A<sub>1</sub>) en los estados VII y VIII del ciclo del epitelio seminífero del ratón (21), momento en el cual las espermatogonias A<sub>1</sub> se dividen para dar origen a los A<sub>2</sub>. Los animales se sacrificaron a diferentes intervalos de tiempo después del tratamiento, encontrándose una disminución en el número de espermatogonias totales en los estados VII y VIII, de aproximadamente un 20% al quinto día. Esto indica que el efecto se produjo sobre las células provenientes de las espermatogonias indiferenciadas que se encontraban en la primera mitad de su ciclo de 8,6 días al momento de la inyección (estados XI, XII y I del ciclo del epitelio seminífero).

Sin embargo, Clermont y Mauger (1) afirman que: "En animales cuyos testículos no han sido irradiados, las inyecciones de extracto testicular no tienen efecto sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina de las espermatogonias de tipo A, sea cual fuere el número de estas células a lo largo de la membrana que limita al túbulo".

Para aclarar estas aparentes contradicciones es conveniente detallar la actividad proliferativa de las espermatogonias indiferenciadas durante el ciclo. Entre los estados III y IX la actividad proliferativa de estas espermatogonias es baja. Durante este período el número total de espermatogonias A se eleva solamente a 297±8 a 340±9 por 1.000 células de Sertoli (20); en cambio, entre los estados IX y III se produce una activa proliferación de espermatogonias in-

diferenciadas, elevándose su número de 55 a 297 por 1.000 células de Sertoli. Al determinar el número de espermatogonias en los estados VII y VIII después del quinto día de tratamiento, De Rooij evalúa las células que en el momento de la inyección estuvieron en el período de máxima proliferación espermatogonial (estados IX al I) (20). Nuestro trabajo cuantifica la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina después de 2,5 días de iniciado el tratamiento, consistente en 4 inyecciones de extracto testicular a intervalos de 12 h cada una, y una inyección del precursor marcado 12 h después de la última inyección con extracto, lo que indica que las espermatogonias sobre las cuales se produjo el efecto se encontraban en los estados de baja proliferación. Esto nos permite utilizar este modelo de animal no irradiado como control de nuestros experimentos con animales sometidos a irradiación.

La vida media biológica determinada *in vivo* para la chalona espermatogonial en ratón resultó ser aproximadamente 16 h. No se han realizado experimentos similares con chalonas provenientes de otros tejidos que nos permitan comparar nuestros resultados. Elgjo (22) encontró que células epidérmicas sometidas a inhibición proliferativa, reingresaban al ciclo celular cuando se suspendía el tratamiento con chalona epidérmica. Elgjo y Hennings (23) habían demostrado que la chalona epidérmica G<sub>2</sub> tenía un tiempo de renovación corto, mientras que la chalona G<sub>1</sub> era mucho más estable. En general, los extractos crudos de piel son inestables y su acción inhibitoria de la mitosis permanece sólo por 30 min a temperatura ambiente (24).

Nuestros resultados indican una mantención de la actividad chalónica espermatogonial *in vivo* por más de 12 h. Se desconoce hasta el momento los mecanismos de degradación *in vivo* de estas sustancias.

El análisis radioautográfico de los túbulos seminíferos de los animales sometidos a tratamientos prolongados (8, 16, 24, 32 días) con extracto testicular *in vivo*, y posterior pulso de <sup>3</sup>H-timidina, muestra que la población celular marcada, en todos

los casos, corresponde a la encontrada en los respectivos controles. La proliferación espermatogonial postirradiación se mantuvo inhibida en alrededor de un 40% en todos los tratamientos, por lo que el resto de las células debió seguir la misma evolución que sus controles, y por lo tanto la marca se concentra en cada grupo tratado en el mismo tipo celular que su correspondiente grupo control (inyectado con PBS) y aproximadamente en la misma proporción. Esto significa que la acción prolongada de la actividad chalónica no modifica la velocidad del ciclo de las células espermatogénicas, y, por ende, se mantiene constante la duración del ciclo del epitelio seminífero en estos animales tratados.

La ausencia de daño histológico significativo, en nuestras condiciones experimentales, avala la acción no citotóxica de la chalona espermatogonial. Sin embargo, no es posible aumentar la F.I., por lo menos al cabo de un mes de tratamiento. Además, es muy poco probable obtener una disminución drástica en el número de espermatozoides producidos por el animal, ya que, incluso, se observa una disminución de la F.I. hacia el final del tratamiento. La fase más probable de acción de la chalona espermatogonial estudiada por nosotros, es el período  $G_1$  o la transición  $G_1$ -S del ciclo celular de las espermatogonias. Monesi (25) afirma que el promedio de tiempo de duración del ciclo celular es aproximadamente el mismo entre todas las espermatogonias; esto es, entre 27 y 30,5 h. El promedio de tiempo de síntesis de DNA, los estados mitóticos desde metafase a telofase, y la etapa  $G_1$ , tampoco son muy diferentes y comprenden entre 7,5 y 10,5 horas. Existen, sin embargo, diferencias significativas entre la duración de S y  $G_2$  dentro de la población espermatogonial. Si bien es cierto que el período  $G_1$  es relativamente largo como para que la posibilidad de encontrar espermatogonias en ese estado durante el tratamiento con extracto testicular sea alta, es posible también que la chalona espermatogonial  $G_1$  actúe en un lapso más corto, por ejemplo, en la transición  $G_1$ -S, o incluso en la fase S temprana. Esto implicaría una menor probabilidad de encontrar células susceptibles a la

acción inhibitoria y, por ende, se dificultaría la obtención de un aumento significativo en la F.I. aún en tratamientos prolongados.

Es posible, por otra parte, que el organismo ponga en marcha otros mecanismos para restablecer el control normal de la proliferación espermatogonial, como, por ejemplo, la activación de sustancias promotoras de la mitosis, opuestas a la acción de las chalonas (antichalonas). Así, se ha visto que la actividad de la eritropoyetina, consecuente a la exposición a un medio hipóxico, puede ser antagonizada *in vivo* por la chalona eritrocitaria (26). Se han obtenido resultados similares con chalona granulocítica (27, 28). No existe información equivalente en referencia a la espermatogénesis, en la cual se postula a la FSH como hormona promotora de la proliferación espermatogonial (29).

De acuerdo a la teoría de Weiss y Kavanau (30), postulada para explicar la regulación del crecimiento de poblaciones celulares, la masa generativa (sobre la cual se ejerce el control) correspondería, en el testículo, a las espermatogonias del tipo A ( $A_0 + A_1 - A_4$ ) y el compartimiento diferenciado o en diferenciación (el cual ejerce el control) estaría formado por espermatoцитos y espermátidas. Los actuales resultados, obtenidos al ensayar fracciones enriquecidas con distintos tipos celulares, confirman lo informado por Thumann *et al.* (5), con respecto a la participación de los espermatoцитos en la producción chalónica, e incluyen en esta función también a las espermátidas redondas. Las células de Sertoli y las células germinales más diferenciadas (espermátidas elongadas y espermatozoides) no participarían en la producción de este inhibidor. Así, la regulación de la proliferación espermatogonial puede entenderse como un mecanismo del tipo *feed-back* negativo a través de la(s) chalona(s).

El mecanismo de acción de la chalona espermatogonial  $G_1$  puede estar mediado por cAMP. Esto se desprende de los resultados obtenidos al utilizar análogos liposolubles (dibutiril-cAMP) para simular el efecto chalónico. Esto último también se logra inhibiendo la fosfodiesterasa.

Nuestros hallazgos concuerdan con lo encontrado en varios sistemas (13) en cuanto a que células en activa proliferación presentan bajas concentraciones intracelulares de cAMP, mientras que células en reposo mitótico poseen bajo cAMP. En túbulos seminíferos 11 días postirradiación (activa proliferación espermatogonial) los niveles de este nucleótido cíclico se encuentran sustancialmente disminuidos con respecto al animal no irradiado. La acción chalónica puede estar mediada, entonces, por la activación de una proteína quinasa y la fosforilación de alguna proteína específica.

En experimentos en curso se estudia la actividad antigénica de la chalona espermatogonial, con el objeto de obtener anticuerpos contra este inhibidor, lo que puede aportar nuevas herramientas en su caracterización bioquímica y biológica.

## REFERENCIAS

- CLERMONT, Y. y MAUGER, A. (1974) Existence of a spermatogonial chalone in the rat testis. *Cell Tissue Kinet.* 7: 165-172.
- CLERMONT, Y. y MAUGER, A. (1976) Effect of a spermatogonial chalone on the growing rat testis. *Cell Tissue Kinet.* 9: 99-104.
- IRONS, M. y CLERMONT, Y. (1979) Spermatogonial chalone (S): Effect on the phases of the cell cycle of type a spermatogonia in the rat. *Cell Tissue Kinet.* 12: 425-433.
- THUMANN, A. y BUSTOS-OBREGON, E. (1978) An *in vitro* system for the study of rat spermatogonial proliferative control. *Andrologia* 10: 22-25.
- THUMANN, A.; CARBONI, R. y BUSTOS-OBREGON, E. (1981) *In vitro* characterization of rat G<sub>1</sub> spermatogonial chalone. *Andrologia* 13: 583-589.
- OAKBERG, E. (1971) Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.* 169: 515-532.
- OAKBERG, E. (1959) Initial depletion and subsequent recovery of spermatogonia of the mouse after 20 r or gamma rays and 100, 300 and 600 r of X rays. *Radiation Res.* 11: 700-719.
- SCHNEIDER, W. (1957) Determination of nucleic acids in tissue by pentose analysis. *Methods Enzymol.* 111: 680-684.
- BURTON, K. (1956) A study of conditions and mechanism of the dyphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323.
- STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. y PERLOFF, W.H. (1964) Mammalian testis in organ culture. *Exp. Cell Res.* 36: 19-27.
- THUMANN, A. y BUSTOS-OBREGON, E. (1982) *In vitro* assay of rat spermatogonial chalone in prepubertal seminiferous tubules. *Andrologia* 14: 35-42.
- WELSH, M.J. y WIEBE, J.P. (1975) Rat Sertoli cells: A rapid method for obtaining viable cell. *Endocrinology* 96: 618-624.
- TEEL, R.W. (1972) Inhibition of DNA synthesis in hamster cheek pouch tissue in organ culture by dibutyl cyclic AMP and a homologous extract. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 47: 1000-1014.
- IVERSEN, O.H. (1969) Homeostasis regulators. *CIBA Foundation Symposium.* I and A. Churchill Ltd. pp. 29-56.
- TAVEY, K.C.; OLDHAM, K.G. y WHELAN, J.M. (1974) A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. *Clin. Chim. Acta* 56: 221-234.
- GILMAN, A.G. (1970) A protein binding assay for adenosine 3' : 5' cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 305-312.
- BUSTOS-OBREGON, E. (1984) Tissue Chalones, with special reference to the spermatogonial chalones. In *Regulation of Target Cell Responsiveness.* (A. Aakvaagand V. Hansson, ed.) Plenum Publishing Co., New York. Vol I, pp. 403-432.
- BUSTOS-OBREGON, E. (1985) Spermatogonial proliferation. Role of the chalones C. Paulsen Ed. Academic Press (en prensa).
- ARENAS, C.P. y BUSTOS-OBREGON, E. (1982) Vida media y tratamientos prolongados de chalona espermatozoide G<sub>1</sub> de ratón. *Arch. Biol. Med. Exp.* 15: R-19 (resumen).
- DE ROOIJ, D.G. (1980) Effect of testicular extracts on proliferation of spermatogonia in the mouse. *Virchows Archiv. (Cell Path.)* 33: 67-75.
- OAKBERG, E. (1956) Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.* 99: 507-516.
- ELGJO, K. (1974) Reversible inhibition of epidermal G<sub>1</sub> cells repeated injections of aqueous skin extract (chalone). *Virchows Archiv. (Cell Path.)* 15: 157-163.
- ELGJO, K. y HENNINGS, H. (1971) Epidermal mitotic rate and DNA sunthesis after injection of water extracts made from mouse skin treated with Actinomycin D: Two or more growth-regulating substances. *Virchows Archiv. (Cell Path.)* 7: 342-347.
- ELGJO, K. (1969) The stability of the epidermal mitosis inhibiting factor (chalone) in water solution. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 76: 31-34.
- MONESI, V. (1962) Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J. Cell Biol.* 14: 1-18.
- RYTOMAA, T. (1978) Chalones and blood cells. In *The year hematology* (Gordon, A.S., Silber, P. and Lobue, I., eds.) 2: 321-373. Plenum. New York.
- RYTOMAA, T. y KIVINIEMI, K. (1968a) Control of Granulocytic Production, I. Chalone and antichalone, two specific humoral regulators, *Cell Tissue Kinet.* 1: 329-340.
- RYTOMAA, T. y KIVINIEMI, K. (1968b) Control of Granulocytic Production II. Mode of action of chalone and antichalone. *Cell Tissue Kinet.* 1: 341-356.
- STEINBERGER, E. (1976) Male reproductive physiology. In *Male infertility. Workup, treatment and research.* (A.T.K. Cockett and R.L. Urry, eds.) Grund and Stralton, New York, pp. 1-27.
- WEISS, P. and KAVANAU, J.L.A. (1957) Model of growth and growth control in mathematical terms. *J. Gen. Physiol.* 41: 1-47.

