

## REGULACION DE LA ESTEROIDOGENESIS TESTICULAR POR OXIDO NITRICO

KARINA DEL PUNTA, MARIA E. SANCHEZ-RUIZ, OMAR P. PIGNATARO

*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Buenos Aires*

**Resumen** Los macrófagos testiculares y las células endoteliales, constituyen una fuente paracrína potencial de óxido nítrico (NO) en el testículo. En este trabajo, se investigó el efecto de liberadores de NO sobre la esteroidogénesis en una línea celular tumoral de Leydig murina y en células de Leydig de rata. Se observó que los liberadores de NO inhiben, de una manera reversible, la esteroidogénesis inducida por hCG en ambos tipos celulares. También se estudió el mecanismo de acción del NO. Contrariamente a lo observado en otros sistemas, los efectos inhibitorios del NO sobre la esteroidogénesis en células de Leydig no son mediados por GMPc, puesto que el NO no aumenta la producción de GMPc ni los análogos de GMPc reproducen los efectos del NO. El NO tampoco modifica la producción de AMPc, el segundo mensajero de la acción gonadotrófica. Cuando se evaluó el efecto del NO sobre el camino esteroidogénico en las células MA-10, se encontró que el NO inhibe la conversión de colesterol a pregnenolona. En conjunto, estos resultados muestran un efecto inhibitorio de liberadores de NO sobre la esteroidogénesis en células de Leydig y sugieren que el NO puede inhibir en forma directa la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol (citocromo P-450<sub>sc</sub>) como lo hace con otras hemo proteínas que incluyen diferentes citocromos P-450.

**Palabras claves:** testículo, esteroidogénesis, óxido nítrico, sistemas transductores

La función principal de las células de Leydig testiculares consiste en la secreción de andrógenos, principalmente testosterona, en forma regulada. Aunque es reconocido que la esteroidogénesis de las células de Leydig se encuentra bajo el control primario de la hormona luteinizante (LH) hipofisaria, a través de su segundo mensajero, el AMPc, en los últimos años se ha demostrado la existencia de una fina regulación a nivel local de la función testicular a través de factores secretados por las distintas poblaciones celulares.<sup>1</sup> Los macrófagos constituyen alrededor de un 20% de las células del intersticio testicular, se encuentran frecuentemente en íntima asociación con las células de Leydig, parecerían ser

necesarios para la diferenciación, proliferación y normal desarrollo de las células de Leydig. Además, se ha demostrado que factores secretados por estos macrófagos son capaces de modular la síntesis de testosterona testicular.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre inorgánico. Esta pequeña molécula es un gas a temperatura ambiente, altamente reactivo, con una vida media de no más de 10 segundos. El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, produciéndose citrulina como coproducto mediante la acción de las óxido nítrico sintetasas (NOSs)<sup>2</sup>. Se han identificado al menos tres isoformas distintas de NOS, producto de tres genes distintos: la *nNOS*, originalmente identificada en cerebro; la *eNOS*, originalmente identificada en endotelio; y la *mNOS*, originalmente identificada en macrófagos.

Entre las funciones del NO en la fisiología de los mamíferos mejor descriptas hasta el momento están su función como neurotransmisor, como regulador del sistema cardiovascular y su parti-

Recibido: 13-XI-1996

Aceptado: 6-I-1997

**Dirección postal:** Dr. Omar P. Pignataro, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Vuelta de Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina

cipación en la respuesta inmune<sup>3,4</sup>. El NO parece estar involucrado también en la regulación de sistemas endocrinos y en la esteroidogénesis en células de la granulosa-luteales. El NO ejerce la mayoría de sus acciones fisiológicas mediante una reacción con el Fe o con grupos -SH, localizados en sitios activos o alótropos de proteínas claves del metabolismo celular como por ejemplo la isoforma soluble de la guanilil ciclase, aumentando, de esta manera, la producción de GMPc<sup>5,6</sup>.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del NO sobre la esteroidogénesis en células de Leydig, a modo de evaluar la posible función regulatoria de este compuesto sobre la función testicular.

Se utilizaron dos modelos experimentales: las células de Leydig MA-10<sup>7</sup>, que son una línea clonal tumoral de ratón, que secreta principalmente progesterona, y células de Leydig purificadas<sup>8</sup>, obtenidas a partir de testículos de ratas adultas de la cepa Sprague Dawley. Como liberadores de NO se utilizaron compuestos que en solución liberan espontáneamente el gas, como el complejo dietilamina/óxido nítrico sal de sodio (DEA/NO), el aducto dietilentriamina óxido nítrico (DETA/NO) y el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), que farmacológicamente reproducen la acción de la NOS. Las determinaciones de progesterona (Pg), testosterona (T), GMPc y AMPc se realizaron por RIAs específicos. La estadística se realizó por medio de un análisis de varianza, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

Para evaluar la posibilidad de que el NO afectara la esteroidogénesis, se incubaron las células de Leydig MA-10 con concentraciones crecientes de distintos compuestos liberadores de NO (DEA/NO, DETA/NO o SNAP, 30 min) antes de ser estimuladas con una dosis máxima de hCG (20 ng/ml). Como se observa en la Figura 1, los tres liberadores de NO produjeron una inhibición dependiente de la dosis sobre la síntesis de progesterona estimulada por hCG. Sin embargo, el agregado de liberadores de NO en ausencia de hCG no afectó la producción basal del esteroide. La inhibición observada no fue debida a un efecto citotóxico de los liberadores de NO sobre las células MA-10, ya que el porcentaje de células vivas determinado mediante la tinción por exclusión con Azul de Tripán no mostró diferencias entre las células tratadas con los liberadores de NO (93%) y los controles (94%).

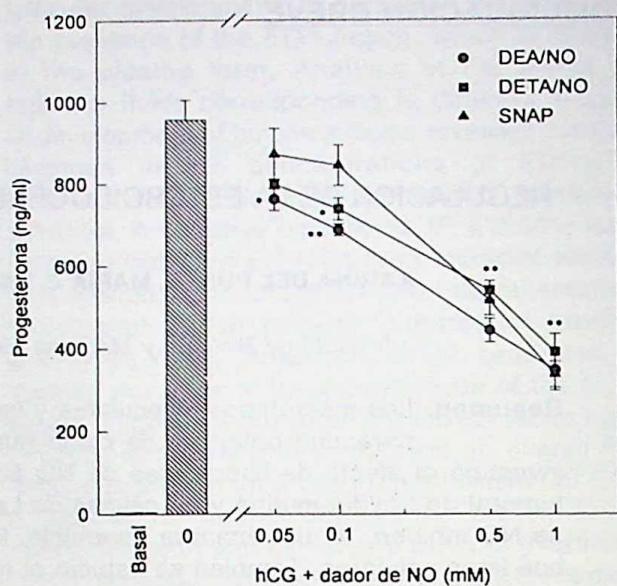


Fig. 1.— Efecto de distintos liberadores de NO sobre la síntesis de progesterona estimulada por hCG en las células de Leydig MA-10. Se preincubaron las células con concentraciones crecientes (0-1 mM) de DEA/NO, DETA/NO o SNAP durante 30 min. Se agregó hCG (10 ng/ml) y se continuó la incubación durante 4 h más. Basal = valores control en ausencia de hCG. Cada punto o barra representa la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes, con incubaciones por duplicado. \*, P < 0,01 vs hCG sola. \*\*, P < 0,001 vs hCG sola.

Para descartar un efecto inhibitorio inespecífico sobre las funciones celulares, se realizó un ensayo de incorporación de <sup>35</sup>S-Metionina a proteínas como índice de síntesis proteica, en paralelo al ensayo de síntesis de esteroides. La incorporación de <sup>35</sup>S-Metionina no fue afectada por el tratamiento con el liberador. Para confirmar que el efecto inhibitorio observado estuviera verdaderamente mediado por NO, y no por uno de los coproductos de hidrólisis de los compuestos, se agregó hemoglobina (Hb, 160  $\mu$ g/ml) conjuntamente con DEA/NO. Esta proteína, que es capaz de unir y capturar NO del medio impidiendo su acción biológica, revirtió por completo el efecto inhibitorio del DEA/NO para la dosis de 0,1 mM, y parcialmente para la de 1 mM. También se estudió la reversibilidad del efecto del NO sobre la esteroidogénesis. Se pudo observar que la inhibición ejercida por el NO sobre la síntesis activada de progesterona (para las células estimuladas con hCG: 52% de inhibición al final del tratamiento con DEA/NO en el Día 1) fue completamente revertida luego de 24 h en ausencia del mismo: Las células MA-10 recuperaron en

un 100% su capacidad de responder a un estímulo esteroidogénico en el Día 2. Estos resultados conforman, además, que el liberador de NO no resulta citotóxico para las células MA-10.

Se comenzó a estudiar el mecanismo de acción del NO en las células de Leydig MA-10. Dado que en la mayoría de los sistemas estudiados hasta el momento, y con especial referencia al sistema endocrino, el NO ejerce su acción biológica mediante la activación de una guanilil ciclase soluble aumentando los niveles de GMPC, se estudió la posibilidad de que el efecto inhibitorio del NO en las células de Leydig MA-10 también estuviera mediado por la activación de esta vía. El factor atrial natriurético (ANF), se sabe que estimula a una guanilil ciclase de membrana en estas células<sup>9</sup>; se utilizó como control positivo para la medición de GMPC extracelular en incubaciones de 4,5 h. Mientras el ANF (10-8 M) produjo un notable incremento en los niveles de este nucleótido, los liberadores de NO no produjeron variaciones con respecto al control, ni en ausencia ni en presencia hCG. Los liberadores de NO tampoco modificaron los niveles intra o extracelulares de GMPC en incubaciones de 20 min. Además, el agregado de análogos del GMPC, como el 8-BrGMPC o (Bu)<sub>2</sub>GMPC (0,1-5 mM), no reprodujeron el efecto inhibitorio del NO. Se decidió entonces evaluar la posibilidad de que el NO estuviera disminuyendo los niveles de AMPc, principal segundo mensajero que media la acción de LH/hCG. Para ello se incubaron las células con DEA/NO (1mM), en presencia o ausencia de hCG, y se midieron los niveles extracelulares de AMPc. El DEA/NO no produjo variaciones en los niveles extracelulares de este nucleótido en incubaciones de 4,5 h, ni en ausencia ni en presencia de hCG. Tampoco produjo cambios en la acumulación de AMPc intra o extracelular en incubaciones de 20 min. Sin embargo, el DEA/NO produjo una inhibición dependiente de la dosis aún sobre la síntesis de progesterona estimulada por una dosis máxima de dbAMPc (1mM), siendo la magnitud de la inhibición similar a la observada sobre la estimulación con hCG. Estos resultados sugieren que el/los sitios de inhibición del NO estarían a nivel de por lo menos algún paso posterior a la síntesis de AMPc. Para estudiar el camino esteroidogénico que va desde colesterol a progesterona, y que incluye a la enzima clave del camino que es la citocromo P-450scc, se incubaron

las células en presencia de 22R-hidroxcolesterol (60 uM) o pregnenolona (50  $\mu$ M) (Figura 2). Cuando se agregó exógenamente pregnenolona, que es el precursor inmediato de progesterona, se revirtió por completo la inhibición producida por DEA/NO (1 mM) sobre la acumulación de progesterona, tanto en presencia como en ausencia de hCG (Figura 2B), sugiriendo que el NO no afecta a la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroido deshidrogenasa. Sin embargo, cuando se utilizó 22R-hidroxcolesterol como sustrato para la esteroidogénesis, el DEA/NO produjo una inhibición significativa sobre la síntesis de progesterona, en este caso tanto en presencia como en ausencia de hCG (Figura 2C). Para validar el modelo de la línea tumoral MA-10, se realizaron experimentos con células de Leydig normales de rata y se observó que también en estas células un liberador de NO, el DEA/NO produjo una inhibición dependiente de la dosis sobre la síntesis de esteroides, en este caso testosterone, confirmando que efectivamente el NO ejerce un efecto inhibitorio sobre la función esteroidogénica de las células de Leydig.

Finalmente, se comenzó a estudiar la posibilidad que la NOS se expresara en células MA-10. Para ello se obtuvieron las secuencias del Gene Bank y se realizó RT-PCR de la NOS endotelial<sup>10</sup> y la inducible<sup>11</sup>. En ningún caso se encontró amplificación. Sin embargo, un trabajo reciente<sup>12</sup>

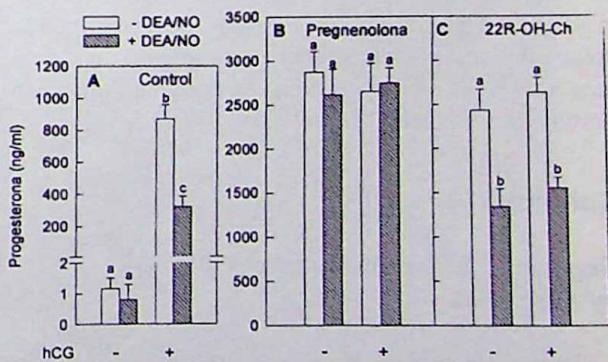


Fig. 2.— Sitio de acción del liberador de óxido nítrico (NO) DEA/NO sobre la producción de esteroides. Las células MA-10 se preincubaron en presencia o ausencia de DEA/NO (1mM) durante 30 min. La incubación se continuó durante 4h más con o sin hCG (10 ng/ml) y: A, sin ningún otro agregado; B, en presencia de pregnenolona (50  $\mu$ M); C, con 22R-hidroxcolesterol (22R-OH-Ch 60  $\mu$ M). Se midieron los niveles de progesterona. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes con incubaciones por duplicado. Diferentes letras implican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) entre tratamientos dentro de cada panel.

muestra que tanto en células de Leydig humanas como en células MA-10 se detectó la presencia, por inmunohistoquímica, de la NOS neuronal pero no de las otras isoformas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

Nuestros resultados demuestran que el NO inhibe la esteroidogénesis en células de Leydig. A diferencia de la mayoría de los sistemas estudiados, el efecto no está mediado por la activación de guanilil ciclase, que produce GMPC, ni por AMPc. El NO no afecta la actividad de la enzima 3β-hidroxiesteroidoide deshidrogenasa, que transforma pregnenolona a progesterona pero inhibe la conversión de colesterol a pregnenolona, sugiriendo que la inhibición del NO sobre el camino esteroidogénico activo ocurriría, por lo menos, a nivel de un paso relacionado con la actividad de la enzima citocromo P-450 scc, probablemente por unión directa al grupo hemo, tal como ocurre con el CO. Teniendo en cuenta que el NO puede ser sintetizado en el testículo, se propone que el compuesto puede provenir de macrófagos u otros tipos celulares, o inclusive sintetizarse en las células de Leydig, por lo que puede considerarse como un nuevo regulador paracrino y/o autócrino de la esteroidogénesis testicular.

**Agradecimientos:** Deseamos agradecerle a los Dres. J.C. Calvo, A. Colman Lerner, E.H. Charreau, G. Lanuza e I. Luthy, todos miembros del Instituto de Biología y Medicina Experimental, por su desinteresada colaboración en distintas etapas de la realización de este trabajo. El mismo fue subsidiado por la Fundación Antorchas y el CONICET.

## Summary

### Regulation of testicular steroidogenesis by nitric oxide

Testicular macrophages as well as endothelial cells, which are intimately associated with Leydig cells, constitute a potential source of paracrine nitric oxide (NO). In the present study, we investigated the effect of NO donors on MA-10 murine Leydig tumor cell line and rat Leydig cell steroidogenesis. We observed that NO donors, reversibly inhibit hCG-induced steroidogenesis in both types of cells. We also studied NO mechanism of action. Contrary to what is observed in many other systems, NO inhibitory effect on Leydig cell steroidogenesis is not mediated by cGMP, as NO fails to increase cGMP production

and cGMP analogs do not reproduce NO effect. NO does not modify the production of cAMP, the main second messenger that mediates gonadotropin action. When we studied NO effect over the steroidogenic pathway in MA-10 cells, we found that NO is inhibiting the conversion of cholesterol to pregnenolone. Taken together these results show an inhibitory effect of NO donors on Leydig cell steroidogenesis and suggest that NO can be directly inhibiting cholesterol side-chain cleavage enzyme (cytochrome P-450scc) as it does with other heme proteins, including different cytochromes P-450.

## Bibliografía

1. Saez JM. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 1994; 15: 574-626.
2. Nathan CF. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992; 6: 3051-64.
3. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 1994; 63: 175-95.
4. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
5. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; 78: 931-6.
6. Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Collins RJ, Eshenaur SC, Nims RW. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 115-23.
7. Ascoli M, Pignataro OP, Segaloff DL. The inositol phosphate/diacylglycerol pathway in MA-10 Leydig tumor cells. Activation by arginine vasopressin and lack of effect of epidermal growth factor and human choriogonadotropin. *J Biol Chem* 1989; 264: 6674-81.
8. Pignataro OP, Radicella JP, Calvo JC, Charreau EH. Mitochondrial biosynthesis of cholesterol in Leydig cells from rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 1983; 33: 53-67.
9. Pandey KN, Kovacs WJ, Inagami T. The inhibition of progesterone secretion and the regulation of cyclic nucleotides by atrial natriuretic factor in gonadotropin responsive murine Leydig tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 800-6.
10. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10480-4.
11. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7773-7.
12. Davidoff MS, Middendorf R, Mayer B, Holstein AF. Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of human testis. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 17-30.