

## Tesis de Posgrado

# Regulación de la función testicular en la diabetes experimental

Tesone, Marta

1978

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

**Cita tipo APA:**

Tesone, Marta. (1978). Regulación de la función testicular en la diabetes experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1553\\_Tesone.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1553_Tesone.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Tesone, Marta. "Regulación de la función testicular en la diabetes experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1553\\_Tesone.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1553_Tesone.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

REGULACION DE LA FUNCION TESTICULAR  
EN LA DIABETES EXPERIMENTAL

Autor : Marta Tesone

Padrino de Tesis : Dr. Eduardo H. Charreau

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN LA ORIENTACION CIENCIAS BIOLOGICAS

Reg. 10 1553  
1553

1553

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo H. Charreau por haberme brindado los conocimientos, el apoyo y el estímulo necesario para que esta investigación pudiera realizarse.

Al Dr. L.B.S. Valle y al Lic. J.C. Calvo por la colaboración prestada en este trabajo.

A la Dra. Alicia Roldán por su espontáneo asesoramiento.

A la Sra. María Cristina Mussini y Ana Rosa de la Cámara de Charreau por su asistencia técnica.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental por haberme permitido la realización de este trabajo.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para que esta investigación pudiera concretarse.

A Sergio, compañero de casi toda mi vida.

## INDICE

### Página

#### INTRODUCCION

#### CONSIDERACIONES GENERALES

##### Función testicular

I.Células de Leydig	1
I. a)Hormona luteinizante. (LH).Receptores	3
I.b)Hormona folículo estimulante(FSH)	6
I.c)Andrógenos	7
II.Túbulos seminíferos	
II.a)Células de Sertoli. Hormona folículo estimulante(FSH)	9
II.b)Células de Sertoli. Androgenos. Receptores	15
II.c)Metabolismo de andrógenos	17
II.d)Células germinales. Andrógenos	19
Organos sexuales accesorios	
III.Receptores de andrógenos	21
Unión a $5\alpha$ DHT	23
DIABETES Y FUNCION TESTICULAR	
IV.Alteraciones reproductivas	25
V.Patología testicular	27
V.a)Biosíntesis de testosterona por testículo	28

VI. Atrofia de los órganos sexuales accesorios	28
VII. Eje hipotálamo-hipofisario	31
HIPOTESIS DE TRABAJO	33
Objetivos generales y específicos de la presente investigación	34
REACTIVOS	36
MÉTODOS	
Obtención de los animales diabéticos	
a) Inyección de estreptozotocina	37
b) Pancreatectomía parcial	39
Aislamiento de células de Leydig por tratamiento con colagenasa	40
Incubaciones con testículos intactos y células de Leydig aisladas	41
Radioinmunoensayo	42
Determinación de la concentración de testosterona sérica, tisular y del medio de incubación	
Testosterona sérica	43
Testosterona tisular	44
Testosterona del medio de incubación	44
Incubación de túbulos seminíferos con T y DHT. Identificación de los productos obtenidos	44
Caracterización y cuantificación de ABP	46
Preparación de Sepharosa - Concanavalina A	49

Purificación por columnas de celulosa	54
Componentes del ensayo de unión de la hCG a la fracción particulada	54
Solubilización de partículas testiculares	56
Centrifugación en gradientes	57
Determinación de receptores androgénicos por electroforesis en geles de poliacrilamida-agarosa	59

## RESULTADOS

### DETERMINACIONES Y CARACTERISTICAS GENERALES

Diabéticos por estreptozotocina	62
Diabéticos por pancreatectomía	63
Niveles tisulares y séricos de Ten ratas normales y diabéticas	63

### RESPUESTA TESTICULAR A LA ESTIMULACION CON hCG

#### NIVELES DE ABP EN CABEZA DE EPIDIDIMO

Diabetes por estreptozotocina	73
Diabetes por pancreatectomía	75

### METABOLISMO DE TESTOSTERONA EN TUBULO SEMINIFERO

Actividad de 5 $\alpha$ reductasa	78
Actividad de 3 hidroxisteroide deshidrogenasa	81

### RECEPTORES HORMONALES

Unión de gonadotrofinas a receptores testiculares	84
---	----

Receptores testiculares de gonadotrofinas en animales diabéticos por estreptozotocina	86
Receptores testiculares de gonadotrofinas en animales diabéticos con terapia sustitutiva	88
Receptores testiculares de gonadotrofinas en animales diabéticos por pancreatectomía	89
Solubilización y caracterización de receptores de gonadotrofinas por gradientes de sacarosa	91
Receptores de andrógenos en próstata ventral	91
DISCUSION	95
BIBLIOGRAFIA	113



## ABREVIATURAS

hCG	Gonadotrofina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
ACTH	Adenocorticotrofina
ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
AMPc	3', 5' Adenosina monofosfato cíclico
ABP	Proteína transportadora de andrógenos
BSA	Albúmina sérica bovina
Tris	Tris (hidroximetil) - amino metano
PBS	Buffer fosfo-salino (Dulbecco)
EDTA	Etilendiamino tetraacético
DTT	Ditiotreitol (Reactivo de Cleland)
SH	Grupo sulfhidrilo
T 1/2	Vida media
H <sup>3</sup>	Tritio
C <sup>14</sup>	Carbono 14
Testosterona (T)	17 $\beta$ ol-4- Androsten 3 ona
Androstenodiona	4- Androsten 3, 20 diona

Dihidrotestosterona (DHT)	$17\beta$ ol-5 $\beta$ Androstano <sup>3</sup> ona
$\alpha$ diol	5 $\alpha$ Androstano, 3 $\alpha$ , 17 $\beta$ diol
$\beta$ diol	5 $\alpha$ Androstano, 3 $\beta$ , 17 $\beta$ diol
Progesterona	4-Pregnen 3, 20 diona
Pregnenolona	3 $\beta$ ol-5Pregnen 20 ona
nm	Nanometro
M	Molar
pmol	Picomol
fmol	Fentomol
ug	Microgramo
ng	Nanogramo
pg	Picogramo
ul	Microlitro
U.I.	Unidad internacional
mU	Miliunidad
rpm	Revoluciones por minuto
DPM	Desintegraciones por minuto
Ci	Curie
NADPH	Fosfato de nicotinamidadenindinucleótido reducido
mC	milicurie

## INTRODUCCION

### CONSIDERACIONES GENERALES

#### Función testicular.

La regulación hormonal de la reproducción implica una estrecha interrelación de esteroides sexuales y hormonas gonadotróficas pituitarias actuando sobre las células específicas del testículo.

En la última década se han realizado una serie de trabajos con el objeto de identificar a las células receptoras de las hormonas hipofisarias y esteroideas y elucidar sus mecanismos moleculares de acción.

En su recopilación sobre control hormonal en la espermatogénesis en Mamíferos, Steinberger (1971) (1); concluye que "el conocimiento de los parámetros bioquímicos de la acción hormonal sobre la espermatogénesis aún es limitado como para formular hipótesis de trabajo". Sin embargo durante los últimos años se ha adelantado mucho en lo que respecta a la regulación hormonal de las funciones de las células del testículo, y acerca de las interacciones entre células extra e intra tubulares. Así han sido realizados importantes avances sobre el control hormonal de las células de Sertoli y de Leydig y la interacción entre las células de Sertoli y las células germinales (2, 3).

Smith demostró en 1927 que la hipofisectomía impide el desarrollo testicular y la espermatogénesis (4). Como resultado de estos trabajos (4, 5) nace el concepto de que las hormonas hipofisarias estimulan al testículo.

De los importantes trabajos de Greep y colaboradores (6, 7), se evidenció que la actividad gonadotrófica de la hipófisis es debida a dos sustancias diferentes: la hormona luteinizante (LH), que estimula la producción de testosterona (T) en las células intersticiales o de Leydig, y la hormona folículo estimulante (FSH) que actúa sobre los túbulos seminíferos promoviendo la espermatogénesis. El rol preciso de la FSH se hizo menos claro cuando se demostró que en ausencia de la hipófisis la testosterona es capaz de mantener la espermatogénesis (8-10). La función de la FSH sobre la regulación de la espermatogénesis sigue siendo una fuente de controversias.

En Mamíferos la morfología típica del testículo está dada por la presencia de túbulos seminíferos separados por tejido conectivo intersticial. Este último consta de células de Leydig y vasos linfáticos y sanguíneos (11). Además los túbulos están rodeados de células peritubulares, las cuales son similares a las células musculares lisas y son probablemente un factor importante para las contracciones de los túbulos seminíferos (12-14). Dentro del túbulo, rodeando a éste, se encuentran las células de Sertoli adyacentes a las espermatogonias, e interconectadas con la barrera sanguínea testicular (15). Los espermatocitos I, II, las espermatidas y los espermatozoides están localizados en el compartimento adluminal (16). La respues-

ta de estos diferentes tipos celulares a las hormonas varía en las distintas edades, así como también bajo diferentes condiciones hormonales.

Toda la información discutida en esta introducción proviene de experiencias realizadas en ratas.

## I - CELULAS DE LEYDIG

### I -a) Hormona Luteinizante (LH). Receptores.

Los estudios clásicos que indican que la LH (u hormona estimulante de las células intersticiales: ICSH) es la principal hormona estimulante del desarrollo y biosíntesis de las células de Leydig, ha sido cuidadosamente revisado por Hooke (1970) (17).

Evidencias muy importantes de que la LH actúa directamente sobre las células de Leydig surgieron de la identificación de receptores específicos para LH y gonadotrofina coriónica humana (hCG) en las membranas de las células de Leydig (18) y de la observación que la LH/hCG estimula la biosíntesis de T en células de Leydig aisladas (18, 19).

El receptor de LH/hCG ha sido estudiado usando preparaciones de membranas (19-22) y componentes de membranas solubilizadas (2, 23). La hormona luteinizante o la hCG se une a receptores de membrana de células de Leydig in vitro y estimula la actividad de la adenil ciclase así como también la producción de T (24).

Un sitio receptor común para LH y hCG está presente en las células

de Leydig. La unión de LH o hCG radioactiva está confinada a las células intersticiales, ya que no ha sido demostrado que exista una unión específica de estas hormonas a los elementos tubulares. La constante de equilibrio de asociación es  $K_a = 2-6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  a  $0^\circ \text{ C}$ . La unión de LH y hCG a los receptores de las células de Leydig se ha demostrado que es temperatura dependiente. La unión ocurre rápidamente a  $37^\circ \text{ C}$  y es dependiente de la concentración relativa de la hormona y de los sitios receptores (22). Luego de la centrifugación por gradiente de sacarosa de fragmentos de células intersticiales se detecta que los receptores de LH y hCG están asociados a membranas vesiculares (25).

Uno de los hechos que prueban que la localización de receptores a LH es la membrana plasmática es la habilidad que posee la LH acoplada a Sepharosa para activar la esteroidogénesis testicular in vitro (22, 26).

Existe una correlación entre la unión a hCG, el incremento de la producción de AMP cíclico y la esteroidogénesis. La unión de hCG a la membrana de las células de Leydig es acompañada por estimulación de la síntesis de testosterona. Sin embargo, los niveles máximos de producción de T son alcanzados cuando sólo una pequeña porción (menos del 1%) del total de sitios de unión están ocupados (18, 24, 27, 28). La estimulación de AMP cíclico no es detectable hasta que la producción de T llega al máximo estimulable (18, 28). Esta observación determina al-

gunas incógnitas acerca de la relación entre el receptor y el AMP cíclico en la acción de LH o hCG sobre las células de Leydig.

Bahl y col. (1974) y Moyle y col. (1976) demostraron que los derivados de hCG que fueron tratados con glicosidasas inhiben la unión de hCG-I <sup>125</sup> a los receptores de células de Leydig y son potentes inhibidores de la adenilciclase estimulada por hCG (19, 28).

En presencia de un exceso de análogos tratados con glicosidasas la estimulación de AMP cíclico fué completamente suprimida, mientras que la respuesta esteroidogénica se mantuvo máxima. Así, habría dos tipos de sitios receptores para hCG en la membrana plasmática, uno que promueve la esteroidogénesis y otro la producción de AMP cíclico. Eliminando algunos de los grupos de carbohidratos de la hCG no se disminuirá su afinidad por los sitios receptores que estimulan la esteroidogénesis pero si se afectaría la unión a los sitios que inducen formación de AMP cíclico. Esto sugiere que habría o un "pool" separada de AMP cíclico o quizás otro mediador para la esteroidogénesis (19, 28).

Datos similares han sido provistos por Charreau y col. (1974) (23) y por Mendelson y col. (1975) (27). Parecería que la mayoría de los receptores de hCG en las células de Leydig están acoplados a la adenilatociclase de la membrana plasmática. Sin embargo, la ausencia de incrementos en la actividad de la adenilatociclase, durante la estimulación de la síntesis de T con bajos niveles de LH o hCG, ha hecho pen-

sar en la posibilidad de que otras respuestas asociadas a la membrana puedan operar durante la fase inicial de la esteroidogénesis inducida por gonadotrofinas en las células de Leydig. Además, la observación de un período de "lag" que ocurre entre la unión de LH o hCG al receptor y la estimulación de la síntesis de T (18, 19), sugiere que algunos eventos metabólicos pueden ocurrir antes que se observen los fenómenos esteroidogénicos.

La síntesis de T inducida por LH parece depender de la síntesis concomitante de proteínas y ARN (18). Esta acción de LH difiere de la acción de otras trofinas como la ACTH en glándulas suprarrenales. En estas glándulas, se postula que la producción de esteroides es mediada por eventos citoplasmáticos que requieren de la síntesis proteica, resultante de la traducción de moléculas de ARN mensajeros ya presentes (30).

#### I -b) Hormona folículo estimulante (FSH)

Algunos investigadores han encontrado un efecto de FSH sobre la secreción de T en el testículo (31, 32). Como las células de Leydig son las responsables de la secreción de T, la función de éstas podría estar afectada por FSH.

Los estudios de Johnson y Ewing (1971) demostraron que la FSH aumenta la secreción de T en testículo de rata perfundido luego de la esti-



mulación con LH (33). El hecho de que la FSH estimula la secreción de T en presencia de concentraciones saturantes de LH sugiere que estas hormonas gonadotróficas actúan en sitios diferentes o por distintos mecanismos (32). Que la FSH aumenta el efecto de LH también ha sido sugerido con respecto a la estimulación del citocromo P-450 (34) y la 5 $\alpha$ reductasa (35) en células intersticiales de testículos de rata.

Mientras que Bhalla y Reichert (1974) (36) encontraron una unión específica de FSH a membranas de células de Leydig, esto no pudo ser demostrado por Means y Huckins (1974) (37).

Sin embargo, incubando testículos decapsulados Dufau y col. (1972) no encontraron acción sinérgica entre FSH y LH sobre la producción de T. (38). Es posible que estos datos contradictorios puedan ser debidos a metodologías diferentes, especies distintas o que la respuesta de las células de Leydig a la FSH esté limitada a un período determinado del desarrollo.

#### I - c) Andrógenos

La posibilidad que las células de Leydig, fuente primaria de T, pueda ser una célula receptora para su propio producto, es intrigante.

Estudios recientes han demostrado la presencia de receptores androgénicos en células intersticiales de testículos de ratas hipofisectomizadas. Stumpf, Sar y col. (39, 40) han provisto datos autoradiográficos que muestra acumulación nuclear de T y dihidrotestosterona (DHT) en células extra

tubulares, incluyendo las células de Leydig.

La localización de andrógenos en núcleos de células intersticiales es inhibida por inyecciones previas de T no radioactiva o el antiandrógeno, acetato de ciproterona (39, 40). Receptores intracelulares específicos para T y DHT, fueron también evidenciados en células extratubulares utilizando técnicas bioquímicas. Wilson y Smith (1975) (41) compararon los receptores androgénicos presentes en túbulos seminíferos aislados y en el tejido intersticial remanente (que contenía también una cantidad considerable de elementos tubulares). Cuando limpiaron cuidadosamente la preparación tubular no observaron un incremento de la actividad específica de receptores androgénicos en túbulos purificados comparándolos con la de tejido remanente (tejido intersticial más túbulos). Si los receptores androgénicos estuviesen localizados dentro de los túbulos seminíferos, la preparación tubular altamente purificada debería contener mas receptores por mg. de proteína citosólica que el tejido remanente. Sin embargo se ha encontrado que el tejido intersticial remanente contiene por lo menos el mismo contenido de receptores androgénicos (41)

Estudios sobre biosíntesis de andrógenos, morfología de las células de Leydig, así como receptores androgénicos (los cuales son claramente diferente de los de estrógenos) sugieren que los andrógenos podría directamente afectar la función de la célula de Leydig.

A pesar de que la LH es el principal estímulo de las células de Leydig: andrógenos, estrógenos, FSH y prolactina podrían tener un rol complementario importante en la regulación de la diferenciación y función de estas células. Aunque mucho se ha avanzado sobre la regulación hormonal de la biosíntesis de andrógenos en las células de Leydig y considerando que la T debe ser admitida como el principal estímulo para los procesos espermatogénicos, la regulación de la biosíntesis de andrógenos en células de Leydig es un aspecto muy importante en el estudio del control hormonal de la reproducción.

## II - TUBULOS SEMINIFEROS

### II -a) Células de Sertoli. Hormona folículo estimulante (FSH)

La FSH, así como otras hormonas proteicas se conoce que produce su efecto a través de la interacción con sitios específicos de unión, localizados sobre la membrana plasmática de las células receptoras (42).

Numerosas evidencias indican que las hormonas proteicas no entran en sus células receptoras y que la unión de la hormona a la superficie receptora es suficiente para activar los mecanismos intracelulares, los cuales eventualmente producen una respuesta biológica específica.

Receptores específicos para FSH han sido identificados en testículos (36, 43-45).

Ensayos de radioligado para FSH han sido usados para cuantificar si-

tios de unión a FSH durante el desarrollo, luego de hipofisectomía y durante diferentes tratamientos hormonales (46, 47).

Un sistema adenilatociclasa funcionando supuestamente como una subunidad catalítica del receptor de FSH (48), ha sido descrito en tejido testicular (49, 50) y parece estar localizado dentro de los túbulos seminíferos. Más aún se ha demostrado que la FSH estimula la síntesis de ARN y proteínas en el testículo (51-54).

A pesar de que los efectos bioquímicos de la FSH sobre el testículo fueron establecidos tempranamente, es relativamente reciente el descubrimiento de la localización de las células receptoras sensibles a FSH. En 1965 Murphy propuso que una inyección de FSH aumenta la actividad secretoria celular y sugiere que este efecto podría ser usado como un ensayo biológico de la FSH sobre el testículo (55, 56).

Subsecuentemente, estudios de Manccini y col. mostraron evidencias de que la FSH conjugada con sustancias electrodenas, tales como ferritina o isotiocianato, interactuaba con las células de Sertoli y/o espermátogonias (57, 58). Todas estas observaciones son compatibles con la idea de que las células de Sertoli son células receptoras en el macho, para la hormona folículo estimulante.

La importancia de estos estudios fue disminuída, sin embargo, por desventajas inherentes a las técnicas utilizadas. Por ejemplo las hormonas inyectadas fueron sólo preparaciones parcialmente purificadas y sus

contaminantes pueden haber causado localizaciones no específicas.

Las hormonas fueron marcadas directamente por colorantes fluorescentes o con ferritina (peso molecular alrededor de 6.000.000) usando un proceso de conjugación que causa más del 50% de pérdida de la actividad biológica en la preparación de FSH. En suma impedimentos estéricos pueden tener interferencia con el transporte y la unión normal a las células receptoras dentro del testículo. Finalmente dosis extremadamente altas fueron inyectadas con el objeto de observar una localización clara de FSH en el testículo, lo que admite dudas sobre la especificidad de los resultados.

La posibilidad de utilizar técnicas de marcación para glicoproteínas usando tritio o radioiodo (59, 60); posibilitaron importantes estudios sobre la identificación de las células testiculares receptoras de FSH.

Midgley y col. (1972) realizaron estudios autoradiográficos luego de aplicaciones tópicas de FSH -  $I^{125}$  a secciones congeladas no fijadas. Estos autores confirmaron que la FSH se localiza dentro de los túbulos seminíferos, aunque la localización subcelular no fue establecida (61).

Algunas líneas de investigación durante los últimos tres años han establecido que las células de Sertoli son células receptoras para FSH. Un importante descubrimiento fue la localización y caracterización de una proteína transportadora de andrógenos (ABP) la cual es producida

por las células de Sertoli y ~~secretada~~ al fluido testicular (62). ABP desaparece tanto del testículo como del epidídimo luego de la hipofisectomía y reaparece luego del tratamiento con gonadotrofinas pituitarias (63-67). En ratas inmaduras, la concentración de ABP en cabeza de epidídimo disminuye a niveles indetectables a los cinco días de la hipofisectomía, mientras que en ratas maduras se observa una menor declinación. (62, 66). Dentro de las veinticuatro horas después de la inyección de FSH en rata hipofisectomizadas maduras, la acumulación de ABP pudo ser medida en testículo y cabeza de epidídimo. Los niveles en el epidídimo alcanzaron un "plateau" entre los dos y cuatro días, y tratamientos más intensos no dan un aumento proporcional del contenido de ABP (66). Cuando las ratas hipofisectomizadas son inyectadas con diferentes dosis de FSH, la concentración de ABP en cabeza de epidídimo es dependiente de la dosis. La sensibilidad de esta respuesta de ABP es comparable al ensayo de aumento de peso ovárico (ensayo Steelman-Pohley) (66). La respuesta de las células de Sertoli a la administración de FSH es específica cuando es medida por la cantidad de ABP en el epidídimo. Otras hormonas pituitarias, andrógenos (2 mg./3 días) o estrógenos (5 mg./3 días) no producen efecto cuando son administradas durante el mismo tiempo (62, 63, 66). Cuando se mide la habilidad de las diferentes preparaciones de FSH para inducir la secreción de ABP, se observa que la

preparación de mayor potencia es también la más potente en el ensayo de Steelman-Pohley (HHG-B1), más aún, las diferentes preparaciones de FSH mostraron la misma potencia relativa en los dos sistemas. Estos hechos proveen más evidencias de que la FSH es la hormona que estimula las células de Sertoli para la producción de ABP.

Estudios de Means y Tindall (1975) (42) utilizando testículos enriquecidos en células de Sertoli obtenidos por irradiación prenatal con rayos X, han demostrado convincentemente que la administración de FSH produce una respuesta estimuladora temprana de la producción de ABP.

El recambio de ABP en el testículo es muy rápido y horas después de la inyección de FSH, la concentración de ABP en el testículo vuelve a los valores controles. En cambio en el epidídimo se ha medido ABP uno a tres días después de la administración de la hormona y siempre se lo encuentra por lo menos doce horas después de la última inyección. El efecto rápido de FSH sobre ABP testicular (52) refleja probablemente su síntesis y degradación en las células de Sertoli, mientras que la cantidad medida en epidídimo luego de un largo período de estimulación es resultado de su síntesis y secreción.

Todos estos estudios sobre el efecto de FSH en células de Sertoli sugiere que estas células son receptoras para FSH. Recientes experimentos usando cultivos de células de Sertoli confirman esta conclusión. Algunos efectos de FSH en cultivos de células de Sertoli incluyen incor-

poración de timidina- $H^3$  a ADN nuclear (68), cambios morfológicos característicos (69) y estimulación de la conversión de T a  $17\beta$  estradiol (70). Algunos laboratorios han mostrado que la FSH estimula la formación de AMP cíclico en cultivo de células de Sertoli aisladas (71-73). Más aún, Means y Huckins (1974) (37) demostraron unión específica de FSH- $H^3$  a receptores de membrana de túbulos seminíferos desprovistos de células germinales y una subsecuente estimulación de la formación de AMP cíclico, proteína kinasa y formación de RNA mensajero. Finalmente, la FSH estimula la producción de ABP in vitro, en cultivo de órganos (74) y cultivo de células (72).

Todos estos estudios sugieren que las células de Sertoli son las principales células receptoras para FSH en testículo. Es menos claro, sin embargo, si existen sitios receptores adicionales en otras células del testículo, si todos los efectos testiculares producidos por FSH pueden ser medidos por la respuesta de la célula de Sertoli y si la regulación de la síntesis y/o secreción de ABP está mediada únicamente por FSH .

En cuanto a la función de ABP es conocido que los andrógenos sintetizados en las células de Leydig son secretados al fluido intersticial, los cuales entran al tubo seminífero y son transportados por el fluido del ducto eferente al epidídimo; la otra alternativa es el pasaje de andrógenos a capilares sanguíneos y linfáticos. La forma en que los andrógenos



son retenidos en los túbulos seminíferos y en el epidídimo, depende de la presencia de ABP en dicho compartimento. Parece que la unión a ABP causa acumulación androgénica dentro de los túbulos seminíferos y aumenta la concentración de andrógenos disponibles en el epitelio germinal.

## II - b) Células de Sertoli. Andrógenos. Receptores

Las células de Sertoli parecen ser receptoras no sólo para FSH sino también para andrógenos (62, 65, 66, 74). La sensibilidad de las células de Sertoli a FSH, medida por la producción de ABP, disminuye bruscamente luego de la hipofisectomía, pero puede ser mantenida por pretratamiento con altas dosis de propionato de testosterona (65). Cuando las ratas inmaduras hipofisectomizadas son tratadas con dos mg. de testosterona diariamente, comenzando el tratamiento un día después de la hipofisectomía, la sensibilidad de las células de Sertoli a FSH se incrementa si se la compara con los animales comenzados a ser tratados dos días después de la hipofisectomía (65). Así, en animales prepuberales, los andrógenos influyen dramáticamente la sensibilidad de las células de Sertoli a FSH. La función secretora de las células de Sertoli durante este período de tiempo es dependiente de FSH y andrógenos.

El hecho de que los andrógenos sean capaces de mantener la producción de ABP está relacionado con las observaciones tempranas de que los andrógenos son capaces de mantener la espermatogénesis. Lo que sugie-

re que si el tratamiento con andrógenos mantiene la espermatogénesis también mantendría la función de las células de Sertoli.

Otros aportes sobre la acción de la T sobre las células de Sertoli han sido recientemente demostrados por Means y col. (1975) (42) y Korkite y col. (1976) (76). Estos autores observaron que la inyección de 1 mg. de T produce un rápido incremento del contenido testicular de ABP, con un máximo a las dos horas. Este efecto de la T es inhibido por cicloheximida y evidencias preliminares sugieren que la actinomiocina D produce el mismo efecto (77). Así, parece que la estimulación de ABP requiere procesos transcripcionales y post-transcripcionales.

A pesar que estos estudios "in vivo" señalan a las células de Sertoli como células receptoras para andrógenos, queda la posibilidad de que la hormona inyectada "in vivo" ejerza su efecto indirectamente a través de estos órganos. Ritzen y col. (19, 74, 75) han demostrado que la síntesis de ABP en cultivo de testículo puede ser estimulada por T, lo que probaría que esta hormona actúa directamente sobre el testículo estimulando la producción de ABP.

Otra indicación de que los andrógenos actúan directamente sobre las células de Sertoli proviene de la demostración de la existencia de receptores androgénicos en estas células (40, 41). Los receptores androgénicos en testículo tienen propiedades similares a los de receptores en próstata ventral y epidídimo y diferentes de la proteína transportadora de andrógenos.

Más aún, Wilson y col. (1976) (78) han demostrado que estos receptores androgénicos tienen idénticas propiedades de unión "in vitro". En dichos órganos los receptores son específicos para T y DHT teniendo a ésta última mayor afinidad de unión.

## II - c) Metabolismo de andrógenos.

En cuanto al metabolismo de andrógenos en túbulos seminíferos, ya fue citado que la T puede atravesar la barrera testicular sanguínea y presumiblemente entrar a los túbulos a través de las células de Sertoli (79). Es también posible que los precursores de T producidos en las células de Leydig sean transportados a los túbulos y convertidos a T y sus derivados reducidos, ya que se ha encontrado que los túbulos seminíferos pueden convertir pregnenolona a T "in vitro" (80).

El epitelio germinal de ratas maduras está en un continuo proceso de diferenciación y proliferación celular desde espermatogonias a espermatozoides. Aún no está totalmente aclarado cuales pasos de la espermatogénesis están controlados por andrógenos. Sin embargo se ha postulado que los andrógenos actúan sobre la formación de la espermatogonia tipo A y también durante la división meiótica (1).

El metabolismo de esteroides en túbulos está bien documentado. Si bien el túbulo contiene el equipo enzimático necesario para la síntesis de T a partir de progesterona y pregnenolona, Cooke y col. (82) demostraron que muy poca progesterona es producida en el túbulo utilizando pre-

cursores endógenos. Como la T es necesaria para completar la espermatogénesis, ésta provendría de las células de Leydig. La principal actividad enzimática de los túbulos parece ser la  $5\alpha$  reducción de la T, dando DHT y dioles  $5\alpha$  reducidos en distintas proporciones, dependiendo de la edad del animal (83).

Rivarola y col. (84) hallaron incrementada la actividad de la  $5\alpha$  reductasa y de la  $3\alpha$  oxidoreductasa al tiempo de la primera división meiótica (testículo inmaduro, 20 días de vida de la rata) lo que produce una acumulación de  $3\alpha$  diol en dicha etapa. En cambio en túbulos con espermatogénesis completa (testículo maduro, 45 días de vida en adelante) el andrógeno reducido predominante es la DHT, lo que indica un predominio de la actividad de la  $5\alpha$  reductasa en esta etapa. Drosdowsky y col. no encuentran transformación de T a DHT ni a dioles en estudios hechos en espermatoцитos y espermátidas aislados. En estas células solo detectan conversión a androstenodiona. Esto estaría en contradicción con los hallazgos de Dorrington y Fritz (86) que encuentran actividad de  $5\alpha$  reductasa en espermatoцитos de rata, pero no en espermátidas.

Por otro lado en túbulos enriquecidos con células de Sertoli por tratamiento prenatal con Busulphano, droga que inhibe el desarrollo de células germinales, encuentran transformación "in vitro" del precursor de progesterona a  $17\alpha$  hidroxiprogestero,  $20\alpha$  dihidroprogesterona, androstenodiona y testosterona. Incubando estos túbulos con TC<sup>14</sup> encuen

tran conversión a los productos reducidos DHT y dioles. Con lo cual se podría deducir que el sitio de metabolización de la T a compuestos reducidos en los túbulos seminíferos estaría principalmente confinado a las células de Sertoli.

#### II - d) Células Germinales. Andrógenos.

La dependencia de andrógenos de la espermatogénesis refleja la necesidad de andrógenos de las células germinales. Sin embargo, la íntima relación entre las células de Sertoli y las germinales proveen dificultades para determinar si los efectos hormonales sobre las células germinales están mediados a través de las células de Sertoli o por acción directa sobre las células germinales.

Sólo evidencias indirectas indican que las células germinales contienen receptores de andrógenos. Estudios autorradiográficos (40) sugieren marcación de algunos tipos celulares dentro del epitelio germinal. Estos estudios fueron, sin embargo, hechos en ratas inmaduras hipofisectomizadas, donde sólo células de Sertoli, espermatogonias y espermatocitos están presentes en el epitelio germinal.

El contenido de receptores androgénicos en testículos de ratas normales hipofisectomizadas se comparó con el de ratas hipofisectomizadas de la misma edad en las cuales las células germinales fueron selectivamente destruidas por irradiación prenatal con rayos X (41). La concentración

de receptores en testículos exentos de células germinales (calculado por mg. de proteína) fue similar al de controles no irradiados, los cuales contienen células germinales. Calculando sobre la base de testículo total, hubo una considerable pérdida de receptores concomitante con la pérdida de células germinales (espermatogonias y espermatocitos). Sin embargo la posibilidad de que la irradiación prenatal pueda reducir el número de receptores en células de Sertoli no debe ser excluida.

Otras evidencias con respecto a la presencia de receptores androgénicos en células germinales han sido presentadas por Sanborn y col. (1975) (87). Luego de la separación de diferentes tipos de células testiculares se usó un ensayo de intercambio para demostrar la unión nuclear específica de T y DHT. Sin embargo no se demostró un aumento de los sitios nucleares específicos luego de incubar las células con T, y las características del componente nuclear de unión no han sido aún determinadas.

De manera que la hipótesis de que los andrógenos actúan directamente sobre las células germinales aún debe ser confirmada. Parece más razonable suponer que la mayoría de los efectos hormonales sobre la espermatogénesis esté mediada a través de las células de Sertoli, cuya función está regulada por FSH y andrógenos.

## ORGANOS SEXUALES ACCESORIOS

### III - RECEPTORES DE ANDROGENOS

Las hormonas androgénicas son transportadas por la sangre primariamente unidas a una proteína: la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) la cual también es capaz de transportar estrógenos. Pequeñas cantidades de andrógenos circulan unidas a albúmina, glucoproteínas y a la globulina transportadora de corticoides (CBG) (88). Así, sólo una pequeña fracción (1 - 2%) del total de andrógenos plasmáticos se mantiene libre o no unido a proteína. Esta unión a proteínas previene la posible metabolización de los esteroides plasmáticos.

Los andrógenos son capaces de entrar a las células receptoras para iniciar una acción biológica específica. Los estudios hechos sobre mecanismos moleculares de acción de andrógenos han demostrado que los tejidos sensibles a estas hormonas, contienen macromoléculas androfilicas, las cuales no estarían presentes en tejidos no receptores.

Aparentemente la acción de andrógenos está mediada por la interacción de la hormona con estas macromoléculas, las cuales han sido denominadas receptores. Los receptores androgénicos en varios tejidos receptores muestran ciertas propiedades características que incluyen una alta afinidad y una baja capacidad de unión para andrógenos biológicamente activos. Así los receptores están presentes en los tejidos "blancos" de andrógenos tales

como glándula prostática (89), vesícula seminal, testículo (62) y epidídimo (90), pero también en otros tejidos como hipófisis y cerebro (91, 92), músculo elevador anal (93), piel (94), glándula prepucial (95) y riñón (96).

En el compartimento extranuclear de la célula, más específicamente en el citosol (fracción citoplasmática soluble), estas macromoléculas interactúan con los andrógenos (T o DHT) para formar el complejo receptor-hormona, el cual es posteriormente traslocado al núcleo donde se une a sitios específicos de la cromatina, donde puede iniciar el proceso transcripcional (97). Los sitios específicos de unión para el complejo receptor-hormona sobre la cromatina se denominan sitios aceptores nucleares (98, 99).

El receptor androgénico es de naturaleza proteica, pero tiene propiedades distintas de la proteína transportadora de andrógenos (ABP) secretada por las células de Sertoli. El receptor es sensible al calor dependiendo de grupos SH para mantener su actividad de unión. Por el contrario ABP es resistente al calor y no depende de grupos SH (62). ABP tiene un peso molecular menor y la velocidad de disociación de la hormona unida es muy rápida ( $T_{1/2}$  0°C: 6 min.), mientras que la disociación del complejo receptor - hormona es muy baja ( $T_{1/2}$  a 0°C: mayor de 2 días) (62).

La mayoría de los estudios sobre unión específica de andrógenos ha sido hecha en glándulas accesorias sexuales, siendo la próstata ventral de rata el tejido más estudiado.

De estos trabajos surge que el metabolismo de la T dentro de las células



receptoras de andrógenos, forma parte obligatoria e integral del mecanismo de acción de los andrógenos. Este metabolismo corresponde a la conversión de T a DHT que ocurre catalizado por la enzima  $5\alpha$  reductasa, dependiente de NADPH. Liao y Fang (100) han demostrado que la DHT es más potente como andrógeno que la T en la mayoría de los tejidos estudiados.

La importancia crítica de la unión selectiva de esteroides androgénicos en glándulas sexuales accesorias dependientes de andrógenos fue primero demostrado por Wilson y Loeb (1965) (101), en sus trabajos sobre metabolismo de T tritiada en glándula uropigial. Mediante estos estudios se observó que más del 90% de la T estaba unida a la eucromatina, fracción considerada como el sitio más importante de síntesis de ARN en la cromatina. Actualmente en la mayoría de los laboratorios la próstata ventral de ratas castradas adultas es la fuente de tejido dependiente de andrógenos de más fácil acceso, y un gran número de estudios sobre receptores se hicieron en dicha glándula.

#### Unión a $5\alpha$ DHT

Jensen y col. (1968) (102) demostraron que la unión de  $17\beta$  estradiol en útero de rata se realiza en dos pasos: primero, la unión del estradiol al receptor proteico citoplasmático, y segundo, la entrada del complejo receptor-estradiol al núcleo. Más recientemente se ha agregado otro paso, que es el pasaje termodependiente del complejo receptor citoplasmático 8 S a 5 S antes de producirse la traslocación al núcleo, y poste-

riormente ocurre la unión a la cromatina,

Conclusiones similares han sido posteriormente obtenidas para el mecanismo de unión de DHT en células receptoras de próstata.

La demostración más gráfica de que los andrógenos se unen a un receptor citoplasmático antes de su entrada al núcleo, fue dada por los estudios de Mainwaring y Peterken (98); quienes determinaron en próstata la distribución intracelular de la radioactividad a varios tiempos después de la inyección de una única dosis de T tritiada. A tiempos muy cortos una pequeña proporción de radioactividad está asociada a microsomas pero un 80% se localiza en el sobrenadante de 105.000 g. A los 15 min. de la inyección de T tritiada, la radioactividad en el sobrenadante comienza a disminuir y la del núcleo a aumentar y luego de los 30 min., los núcleos cuentan con prácticamente toda la radioactividad de la próstata.

El modo de interacción entre este complejo nuclear: receptor-hormona y la cromatina, y el mecanismo por el cual a consecuencia de la formación del complejo ternario se produce una respuesta biológica específica, aún no está totalmente aclarado.

## DIABETES Y FUNCION TESTICULAR

### IV - ALTERACIONES REPRODUCTIVAS

La diabetes se define como una anormalidad del metabolismo creado por insuficiencia de la actividad insulínica de las células beta del páncreas.

En diabetes la homeostasis de la glucosa sanguínea está permanentemente alterada. En casos no tratados la elevación anormal de la glucosa sanguínea es un fenómeno corriente. Esta enfermedad altera diversas áreas del organismo; una de ellas es la relacionada con la reproducción. En la especie humana la diabetes se acompaña de graves trastornos sexuales y reproductivos (103, 104). El tratamiento con insulina y otros recursos terapéuticos solo los corrige parcialmente. En lo que respecta a sus mecanismos de producción es poco y mal conocido y por lo tanto se impone una amplia revisión del problema.

En el hombre ha sido señalado repetidamente la alta frecuencia de la impotencia sexual. Según las documentadas estadísticas de Rubin (105) y Babott (106) afecta del 25% al 75% de los pacientes, aumentando la proporción con la edad de los mismos. También se han observado lesiones testiculares (107-110) tales como: atrofia, desaparición de la línea germinal, engrosamiento de la membrana basal en los túbulos (111), y esclerosis del vaso deferente (111).

En el semen se ha descrito disminución del número de espermatozoos

des (108) y de su contenido en fructosa (112). En la orina baja el contenido de 17 cetoesteroides (109, 110, 113-116) y el de andrógenos (114). El nivel de T en la sangre es normal para algunos autores (117, 118) y disminuído para otros (119).

La mujer diabética era excepcional que tuviera un hijo vivo antes de la era insulínica. Aún hoy su embarazo y parto están erizados de dificultades: aborto, muerte fetal, toxemia, etc.

La amenorrea y la atrofia del ovario son comunes. Se han descrito también trastornos endócrinos caracterizados por el alto nivel de gonadotrofinas en la sangre y orina y el de glucocorticoides en la sangre (120, 121).

En los animales de experimentación también se observan alteraciones en la esfera sexual. En la rata macho con diabetes aloxánica Soulairac (116) ha descrito atrofia testicular con desaparición de la línea germinal de los túbulos en los que restan solamente las células de Sertoli. Interpreta estos resultados por la posible disminución de la síntesis y/o secreción de la hormona folículo estimulante. Hechos similares han sido observados en otras especies: perro, gato, criceto, gallo. La insulina es capaz de reparar parcialmente estos trastornos (107, 108, 115, 116, 122-124). La inyección de aloxano en la rata antes de la pubertad retarda su aparición (124, 125).

En ratas hembras diabéticas por aloxano ha sido descrita menor fertilidad, facilidad de abortar y presencia de lesiones morfológicas en la hipófisis anterior, en ovario y en útero. La insulina corregiría parcialmen-

te estas alteraciones (126-129).

En la rata macho pancreatopriva la causa de la fertilidad disminuída parece depender de la falta de inseminación en la hembra por trastornos en la conducta sexual masculina (130) imputándose éstas consecuencias a un trastorno en la producción y/o secreción de T.

Todos estos desórdenes reproductivos podrían ser consecuencia de un estado hipogonadotrófico-hipogonadal, el cual se desarrollaría durante el curso de esta enfermedad metabólica.

#### V - PATOLOGIA TESTICULAR

Los estudios realizados en ratas diabéticas muestran una serie de lesiones testiculares. Al microscopio óptico se observan cambios degenerativos, de grado variable, del epitelio germinal, sin modificaciones del intersticio o la membrana basal (131).

El grado de lesión varía entre la desorganización del epitelio germinal con detención de la espermatogénesis, hasta la ausencia total de ese epitelio con persistencia ocasional de células de Sertoli colapsadas. La intensidad de la lesión varía de un túbulo a otro y se la ha clasificado en: ligera, moderada, grave, según la gravedad y cantidad de túbulos afectados. Existe una relación directa entre la gravedad de las lesiones y el nivel de la glucemia: no las hay en prediabetes; mientras con glucemias de 120-200 mg. de glucosa por ciento, las tienen.

Sobre la base de determinaciones histométricas en tejido testicular

de ratas diabéticas por aloxano Schofling y col. (1967) (132) definen los cambios en el testículo como una retardación general del proceso espermatogénico con interrupción parcial de la espermatogénesis entre espermatocitos y espermatidas, con descamación de la membrana basal, e integridad del tejido intersticial.

#### V - a) Biosíntesis de testosterona por testículo

En estudios "in vitro" de la transformación de progesterona  $C^{14}$  a testosterona por homogenados de testículo se observó conversiones análogas en los tejidos de animales normales y prediabéticos. Sin embargo en animales con glucemia en ayuno por encima de 120 mg. de glucosa por ciento se reduce progresivamente la producción de T (133, 134).

#### VI - ATROFIA DE LOS ORGANOS SEXUALES ACCESORIOS

La próstata, glándula coagulante y vesículas seminales se atrofian durante la fase hiperglucémica de la diabetes por pancreatectomía parcial (135).

La T es responsable del crecimiento y mantenimiento de los tejidos sexuales accesorios. Esta hormona es capaz de restaurar los órganos sexuales accesorios en regresión de los animales castrados. Sufrin y col. (1974) (136) demuestran en animales diabéticos castrados, que para restaurar los órganos sexuales secundarios es necesario administrar testosterona e insulina,

ya que la T sola produce únicamente una normalización parcial de los tejidos afectados. Los parámetros estudiados por estos autores fueron el peso húmedo de próstata ventral y vesícula seminal, el contenido total de ADN, ARN, proteínas y la síntesis de ADN medida por incorporación de timidina- $H^3$  en estos órganos.

Loströh y col. han estudiado la relación entre T y insulina sobre la próstata ventral de roedores en cultivo de órganos (137, 138). Estos autores han demostrado que en próstata en regresión, la adición de T sola en el medio de cultivo, sólo tiene un pequeño efecto anabólico. En cambio si además de T se agrega insulina al medio, se observa una pronunciada estimulación de la capacidad metabólica prostática.

Angervall y col. (1967) (139) investigaron la acción "in vivo" de la T sobre los órganos accesorios sexuales de ratas tratadas con aloxano, observando una respuesta disminuída a la T. Estos autores obtienen sus conclusiones basándose en el peso húmedo de los órganos pero no administraron insulina para revertir los efectos atribuídos a una deficiencia de esta hormona.

Oksanen y col. (1975) (140) realizaron estudios de captación y retención de  $TH^3$  a nivel de órganos receptores periféricos de andrógenos en ratas diabéticas por estreptozotocina. Una marcada disminución en la captación de  $TH^3$  fue observada en animales castrados diabéticos, y este fenómeno fue revertido parcialmente por tratamiento con insulina.

En tejidos tales como el muscular, (menos dependientes de andrógenos para el mantenimiento de su estructura y función) no se observan diferencias en la captación de esteroides. Estos mismos autores dividen los tejidos receptores androgénicos en dos grupos sobre la base de su sensibilidad a los disturbios en la captación de  $TH^3$  causada por la diabetes: a) tejidos en los cuales la diabetes causa una clara disminución en la captación de  $TH^3$  : la próstata, glándula preputial y epidídimo; b) los tejidos tales como vesícula seminal y glándulas coagulatorias, donde la diabetes no causa una importante disminución de la captación o retención de  $TH^3$ . Teniendo como hipótesis que la conversión de DHT es un prerrequisito para la acción de T, Oksanen y col. (140) realizaron estudios "in vitro" del metabolismo de la T en próstata ventral. En los animales diabéticos castrados encuentran disminuída la transformación a DHT, pero inalterada la producción de dióles y androstenodiona. El hecho de que la formación de  $3\alpha$  diol permanezca inalterado en ratas diabéticas, lo atribuyen a la pequeña cantidad relativa de este metabolito, lo que hace que pequeños cambios no sean detectados.

En cuanto a las posibles causas por las cuales en la diabetes se producen alteraciones en el funcionamiento de los órganos sexuales accesorios, se postularía que a nivel celular, la insulina podría interactuar con la T en distintos caminos. El concepto básico de acción androgénica incluye la entrada de T en las células receptoras, seguido por el rápido metabolismo de la hormona, la unión del metabolito reducido al receptor proteico



citoplasmático y el transporte del complejo receptor-hormona al núcleo de las células receptoras, donde se une específicamente a la cromatina. Como resultado de la estimulación del metabolismo celular se produce un aumento de la síntesis de ADN, ARN, y proteínas. La T igual que otras hormonas es teroideas, se estima que pasa a través de la membrana celular por un proceso de difusión pasiva (141-143). La insulina podría facilitar el transporte de T del fluido extracelular al citoplasma por cambio de la permeabilidad de la membrana celular. Otras hormonas proteicas, como la prolactina incrementan la unión de andrógenos a próstata "in vivo" (144).

Los cambios en las glándulas accesorias sexuales de ratas diabéticas no se pueden explicar, únicamente por disturbios en el metabolismo de andrógenos. Otros estados atróficos, así como la deprivación de andrógenos durante un largo tiempo, disminuye la cantidad de receptor proteico androgénico en próstata ventral (145). Para entender mejor este problema ~~debe~~ rían realizarse experiencias sobre el estado de los receptores androgénicos en órganos sexuales accesorios de ratas diabéticas.

## VII - EJE HIPOTALAMO HIPOFISARIO

Es sugestivo que en la rata macho diabética aparezcan en el hipotálamo anterior modificaciones en el consumo de oxígeno y también en la producción de ácido láctico, análogas aunque menos marcadas a las observadas después de la castración en normales.

Si bien los conocimientos actuales conducen a pensar que la relación entre la hiperglucemia y los niveles bajos de T sería la causa de origen de la infertilidad masculina en la rata, no existen pruebas directas que expliquen como se efectúa.

Una posibilidad sería que la hiperglucemia afecta directamente al testículo disminuyendo la producción de T. Otra que bloquee la acción de las hormonas sobre los efectores modificando ya sea los sitios de reconocimiento o discriminador, como así también los fenómenos de transducción o amplificación de las señales hormonales.

En la rata diabética se ha postulado que los disturbios en la función reproductora son en parte debidos a las alteraciones en la secreción o producción de gonadotrofinas hipofisarias (133).

Niveles bajos de gonadotrofinas fueron demostrados ocho días después de la inducción de la diabetes por aloxano (147). En ratas diabéticas de veintin días (por estreptozotocina y aloxano), los valores séricos de LH tienden a estar disminuídos, en tanto que los valores hipofisarios aumentados. En estos mismos experimentos los niveles séricos de FSH están inalterados mientras que los hipofisarios aumentados (148). Estos resultados indicarían que habría una falla en los mecanismos de secreción de LH, los cuales no estarían alterados con respecto a FSH, cuyos valores séricos se mantienen normales.

En la rata pancreatopriva los valores basales de ambas hormonas pa-

recen no diferir de los correspondientes controles normales (149). Es probable entonces que algunos de los factores moleculares involucrados en los mecanismos de acción de gonadotrofinas, se encuentren alterados en la diabetes experimental.

### HIPOTESIS DE TRABAJO

La diabetes experimental podría alterar alguno de los siguientes mecanismos moleculares:

- a) Las hormonas folículo estimulante y luteinizante inician sus efectos al unirse específicamente a los sitios de reconocimiento de los túbulos seminíferos y células de Leydig respectivamente.
- b) Los fenómenos de producción de T se ven mediados por la unión de LH a sitios receptores.
- c) La T producida por estimulación de LH es transportada al epidídimo por una proteína transportadora de andrógenos (ABP) dependiente de FSH.
- d) En los túbulos seminíferos se produce metabolización de T a sus derivados reducidos  $5\alpha$  DHT y dioles.
- e) La T se une en los órganos sexuales accesorios a sus receptores celulares específicos, y como resultado de dicha interacción se produce un efecto biológico específico.

## Objetivos generales y específicos de la presente investigación

Los objetivos generales de esta tesis consisten en verificar las hipótesis de trabajo y se proponen los siguientes objetivos específicos:

A) Estudiar la unión de gonadotrofinas marcadas (hormona luteinizante o gonadotrofina coriónica) conservando su actividad biológica a preparados subcelulares de testículos o a células de Leydig aisladas de ratas diabéticas y controles.

A-1) Las formas moleculares de los sitios receptores, serán caracterizadas mediante solubilización y análisis en gradientes de ultracentrifugación.

B) Determinación en incubaciones con testículos decapsulados y células de Leydig aisladas, de las concentraciones de T en los medios de incubación en condiciones basales y con estimulación con LH o hCG.

C) Medición de las concentraciones séricas y testiculares de T en ratas diabéticas y controles.

D) Estudio del metabolismo de andrógenos en túbulos seminíferos con particular atención a la formación de los derivados 5  $\alpha$  reducidos de la T.

E) Determinación de la concentración de ABP en preparaciones citoplasmáticas de epidídimo en ratas diabéticas y controles.

F) Estudios de receptores celulares a DHT en próstata de animales diabéticos y controles.

G) Determinación de la influencia de la insulina sobre estos parámetros.

## REACTIVOS

La gonadotropina coriónica humana (10.000 UI/mg.) fue gentilmente donada por el Dr. E. Paseron (Laboratorio Endócrino, Buenos Aires).

La testosterona 1, 2, 6, 7, H<sup>3</sup> (88 Ci/mmol) y la dihidrotestosterona 1, 2, 4, 5, 6, 7 H<sup>3</sup> (125 Ci/mmol) fueron obtenidas de New England Nuclear Corporation.

Se utilizó sílica gel: MN-Sílica Gel G-HR de Macherey, Nagel & Co.

Los solventes metanol, cloroformo y acetato de etilo (Mallinckrodt grado analítico) se utilizaron sin posterior purificación y el eter etílico (Rhodia Argentina S. A.) fue usado inmediatamente después de la apertura del recipiente.

La Sepharosa 6 B, Agarosa, Dextran T-70 y Blue Dextran, se adquirió en Pharmacia Fine Chemicals, y la concanavalina A de Calbiochem y el Carbón Norit - A Neutro de Lab. Amend Drug an Chemical Co. N. Y.

Para los geles de poliacrilamida se utilizaron Acrilamida p. A; 4 x Krist de Serva Feinbiochemica Heidelberg, la bisacrilamida y el Temed de Bio. Red Laboratories Richmond Calif.

## MÉTODOS

### Obtención de los animales diabéticos

En todos los casos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (Rattus norvegicus albinus, variedad Wistar).

Las condiciones del bioterio fueron las siguientes: la temperatura se mantuvo constante a 25° C, con períodos de luz de 12 hs. y 12 hs. de oscuridad. Los animales recibieron dieta balanceada y agua "ad libitum".

La diabetes se produjo en base a dos modelos experimentales:

#### a) - Inyección de estreptozotocina

Se utilizaron ratas de 60-70 días de edad cuyo peso oscilaba entre 150-200 gr.. Se las dividió en tres grupos:

Grupo I: Controles (C. S.).

Se les administró por vía endovenosa el vehículo correspondiente. Los animales se sacrificaron 30 días después de la inyección.

Grupo II: Inyectados con estreptozotocina (D. S.).

Se les aplicó una única inyección de estreptozotocina por la vena caudal (65 mg. por Kg. de peso). Esta fue preparada en una concentración de 32 mg. por ml. en solución salina acidificada con unas gotas de ácido cítrico 0,025 M hasta ajustar el pH a 4,5.

Tres días después de la inyección de estreptozotocina se midió

diariamente la glucosa en sangre por medio de tiras reactivas Destrotix o por el método de la glucosa oxidasa (150) y en orina utilizando tiras reactivas Diastix.

El criterio utilizado para determinar el estado diabético se estableció por la aparición de los siguientes parámetros:

Hiper glucemia: en los diabéticos los valores de glucosa oscilaron entre 300-390 mg. /100 ml. de sangre. Los valores de los controles fueron de 90 mg. /100 ml.

Glucosuria: En los diabéticos los valores de glucosa fueron mayores a 10 gr. /100 ml. de orina. En los controles hubo menos de 0,2 gr. /100 ml. de orina.

Poliuria: el volumen urinario osciló entre 80-100 ml. /24 hs.

En tanto que los valores de los controles no exceden de 15 ml./24 hs.

También se observó: polidipsia, inhibición del crecimiento, hipertrofia visceral y atrofia cutanea.

Los animales se utilizaron a los 30 días de la inyección de estreptozotocina.

### Grupo III: (D. S. I. ).

En estas ratas la diabetes se produjo por el método utilizado para el grupo II.

A los 15 días de la inyección de estreptozotocina se inició un



tratamiento con insulina. Se administró 0,5 U.I. por rata en forma subcutánea diariamente 15 días. Con esta dosis se detectó una relativa normalización de la glucemia. En algunos casos hubo hipoglucemia. También se observó un aumento del peso corporal, disminución de la poliuria y poli-dipsia, y regresión de la hipertrofia visceral y de la atrofia cutánea.

Finalizado el tratamiento con insulina los animales se sacrificaron y se realizaron los experimentos pertinentes.

b) - Pancreatectomía parcial

Se utilizaron ratas de 30 días de edad, cuyo peso oscilaba entre 70-80 gr.

Se las dividió en dos grupos:

Grupo IV: Controles (C.P.).

Estas ratas fueron falsamente operadas para ser utilizadas como controles.

Grupo V: Diabéticos por pancreatectomía parcial (D.P.).

Se extirpó el 95% de la masa pancreática total. La mortalidad fue escasa (10%) y los animales sobrevivieron en buen estado general.

Los animales diabéticos por este método presentan un curso evolutivo particular (135), observándose tres etapas sucesivas denominadas: prediabetes, diabetes incipientes y diabetes

confirmada.

La diabetes franca fue observada tardíamente, debido a que la cepa Wistar es resistente a la pancreatectomía, y esta etapa apareció recién a los 11 meses de realizada la operación.

Los experimentos fueron hechos en la etapa de diabetes confirmada con una edad promedio de 12 meses. En esta etapa se determinó hiperglucemia y glucosuria por medio de las tiras reactivas ya descritas.

#### Aislamiento de células de Leydig por tratamiento con colagenasa

Se decapsulan los testículos, los cuales se suspenden en Medio 199 (6 testículos en 6 ml. de Medio), conteniendo 0,250 mg./ml. de Colagenasa Worthington. Se incuba a 37° C durante 20 min. en un Dubnoff metabólico bajo atmósfera de carbógeno (O<sub>2</sub> : 95%, CO<sub>2</sub>: 5%) con agitación constante. Terminada la incubación se lleva a 50 ml. con Medio 199, se agita 3 min., se deja decantar otros 3 min.. En el precipitado quedan los túbulos seminíferos y en el sobrenadante las células de Leydig, éste se filtra por Nitex (malla de poro 50). Los túbulos se lavan con otros 50 ml. de Medio 199 y se repite la operación anterior. El filtrado se centrifuga 10 min. a 700 g, y el precipitado se resuspende en Medio 199 (6 ml. / testículo).

Con el objeto de contar las células, 50ul de esta preparación se tiñeron

con 100 ul de azul de metileno al 0,2%. Se dejó 10 min. y se agregó 350 ul de Medio 199. Las células se contaron en una cámara cuenta glóbulos. En estas condiciones se obtuvieron preparaciones de alrededor de 7.000.000 de células por ml. .

#### Incubaciones con testículos intactos y células de Leydig aisladas.

Los testículos intactos fueron obtenidos inmediatamente después de sacrificar los animales por decapitación. Cada testículo se decapsuló e incubó en un volumen total de 2 ml. de buffer Krebs Ringer bicarbonato, conteniendo glucosa (1 mg. /ml. ) y suplementado con distintas concentraciones de hCG.

En las incubaciones con células de Leydig aisladas por tratamiento con colagenasa, aproximadamente 10.000.000 de estas células fueron incubadas en dos ml. de Medio 199, metil isobutilxantina (MIX: concentración final 0,1 mM) y distintas concentraciones de hCG.

En ambos casos las incubaciones fueron realizadas a 34°C en un agitador metabólico a 150 rpm bajo una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Los períodos de incubación fueron de 4 hs. para testículos intactos y 2 hs para células de Leydig. Terminadas las incubaciones se centrifugó el medio de incubación a 700 g durante 15 min. y se midió en el sobrenadante la T producida, por radioinmunoensayo.

## Radioinmunoensayo

El dosaje de T se realizó mediante la utilización de un suero anti-testosterona obtenido por inmunización de conejos a intervalos de dos semanas con un conjugado de testosterona-albúmina sérica bovina (BSA), preparado por acoplamiento de la carboximetiloxima de la T a BSA. El suero anti-testosterona utilizado en el presente estudio posee una constante de afinidad del orden de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  y liga 50% de la T-  $\text{H}^3$  de referencia (20.000 dpm) utilizándolo a una dilución final de 1:2.500.

El rango de utilización es de 25 a 800 pg de T en un volumen final de 0,5 ml.. Previa incubación durante 16 hs. a  $4^{\circ}\text{C}$ , la hormona libre es separada por el agregado de 0,2 ml. de una suspensión de carbón-dextrano (0,25-0,025%) en buffer de ensayo (Buffer B):  $\text{PO}_4 \text{ Na}_2 \text{ H}_7 \text{ H}_2\text{O}$  0,04 M,  $\text{PO}_4\text{H}_2 \text{ Na. H}_2\text{O}$  0,03 M, Acida sódica 0,015 M, Cl Na 0,15 M, Edta 10 mM, gelatina 1%, pH 7.

La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido Packard Tri Carb (modelo 3.320).

Determinación de la concentración de testosterona sérica, tisular, y del medio de incubación

Testosterona sérica

Se pipetearon alícuotas de 200 ul de suero en tubos cónicos de centrífuga. A cada alícuota se le agregó 15,000 cpm de  $\text{TH}^3$  para determinar las pérdidas. Se extrajo con 3 ml. de eter etílico redestilado, luego de 30 seg. de agitación. Este paso se repitió dos veces.

Los extractos etereos fueron transferidos a tubos de 12 x 75 mm. y secados bajo atmósfera de nitrógeno. Los extractos se disolvieron en 2 ml. de n hexano-tolueno (4:1) y fueron purificados por cromatografía en columnas de celite (0,5 x 13 cm.) usando propilenglicol como fase estacionaria.

La elución fue hecha paso por paso, con un flujo de 20 gotas por min. bajo presión de nitrógeno. La primera fracción de 2 ml. de n hexano-tolueno (4:1) fue descartada. Un volumen de 15 ml. de hexano-tolueno (3:1) eluye DHT. La tercera fracción conteniendo T fue eluida con 15 ml. de hexano-tolueno (1:1). Los androstanodioles fueron eluidos con 5 ml. de hexano-tolueno (2:3) y 10 ml. de hexano-tolueno (3:7).

Usualmente la recuperación fue del 60% para la extracción y purificación de T.

### Testosterona tisular

Para la determinación de T tisular se decapsularon los testículos y se homogenizaron en 3 ml. de ClNa 0,15 M, conteniendo 5% de etanol. La extracción se realizó con 10 ml. de acetato de etilo (2 veces) y la purificación por el método arriba descrito, previo agregado de 8.000 dpm de TH<sup>3</sup>.

Tanto en esta determinación como en la de T sérica el residuo seco de la hormona purificada se redisuelve en 500 ul de buffer de ensayo (Buffer B) y se toman las alícuotas correspondientes para evaluar pérdidas y para medir T por radioinmunoensayo.

### Testosterona del medio de incubación

Los medios de incubación se centrifugaron a 1.500 g durante 10 min., los sobrenadantes fueron analizados inmediatamente o congelados a -15°C para su posterior análisis como ya se describió.

### Incubación de túbulos seminíferos con T y DHT. Identificación de los productos obtenidos

Los túbulos seminíferos fueron aislados de los testículos por el procedimiento de Christensen y Mason (151).

Los túbulos seminíferos (300 mg. de tejido húmedo) fueron incubados a 32°C durante 30 o 60 min. en 2 ml. de buffer Krebs Ringer fosfato a pH

7,4 en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Cada incubación contenía el correspondiente precursor radioactivo: 4 x 10<sup>5</sup> dpm de TH<sup>3</sup> o 4 x 10<sup>5</sup> dpm de DHT H<sup>3</sup>. Como blanco de incubación se utilizó tejido desnaturalizado por el calor (100°C).

Las reacciones fueron detenidas con 5 ml. de acetato de etilo. A cada incubación se le agregó los siguientes esteroides de referencia: TC<sup>14</sup>, DHT C<sup>14</sup> y dioles C<sup>14</sup>; con el objeto de calcular las posibles pérdidas ocurridas durante los pasos de extracción y purificación. Luego de las incubaciones, tejido y medio se homogenizaron y se extrajeron los esteroides con acetato de etilo. Los extractos fueron evaporados y los residuos secos se retomaron con cloroformo-metanol (1:1) y se cromatografiaron en placa delgada de sílica-gel usando el sistema cloroformo-eter etílico (4:1).

Los cromatogramas fueron divididos en tres áreas: las áreas menos polares (1 y 2) conteniendo DHT y T respectivamente fueron separadas de las placas, eluidas en columnas de vidrio con cloroformo-metanol (1:1), secadas y contadas. El área 3 conteniendo una mezcla de los dioles, fue eluida y cromatografiada en papel Watmann N°3 en el sistema hexano-metanol-agua (10:9:1). Por medio de este sistema fueron separados el 5 $\alpha$  androstano-3 $\alpha$ , 17 $\beta$  diol y el 5 $\alpha$  androstano-3 $\beta$ , 17 $\beta$  diol.

La pureza radioquímica de los esteroides aislados se determinó por recristalización a actividad específica constante.

La radioactividad en las placas y en el papel se midió utilizando un radiocromatógrafo Scanner Packard (modelo 7.201).

## Caracterización y cuantificación de ABP

Para la identificación y cuantificación de ABP se ha utilizado el método de electroforesis en gel de poliacrilamida en estado estacionario (152). Este método combina los beneficios de alta resolución del gel de electroforesis con las ventajas de las condiciones del estado estacionario.

El estado estacionario es alcanzado cuando el ritmo de asociación iguala al de disociación. Esta condición es utilizada en el clásico equilibrio de diálisis y en la técnica de equilibrio en gel de Sephadex (152). En los sistemas convencionales cromatográficos o electroforéticos el estado estacionario no es usualmente utilizado.

En la mayoría de estos métodos el extracto crudo con los componentes de unión, el suero o el citosol es saturado con el ligando radioactivo antes de su separación. La cantidad de ligando unido recobrado es altamente dependiente del tiempo de elución cromatográfica o longitud de corrida electroforética, la constante de equilibrio de disociación ( $K_d$ ) y el valor de disociación ( $k_{-1}$ ). Cuando la velocidad de disociación es baja comparada con el tiempo requerido para separar el esteroide unido del libre, el número de sitios de unión puede ser acertadamente calculado midiendo la cantidad de ligando radioactivo unido.

Sin embargo si la velocidad de disociación del ligando a la proteína es alta como en el caso de ABP ( $T_{1/2}$  a  $0^\circ\text{C}$ : 6 min.) (154) es erróneo cuanti-



ficar esta proteína por un método que no incluya el estado de equilibrio.

En electroforesis en gel de poli(acrilamida) al estado estacionario, el equilibrio entre la asociación y la disociación es alcanzado cuando la concentración de esteroide radioactivo libre es igual en el frente que detrás del pico radioactivo unido a la proteína.

Una de las condiciones para utilizar este método es que no se observe unión significativa o adsorción de los esteroides a la matriz del gel, lo cual ha sido demostrado

Al estado estacionario se aplica la ley de acción de masas:

$K_d (S_b) = (B_{Pu}) \times (S_u)$ , donde:

$K_d$ : constante de equilibrio de disociación

$S_b$ : esteroide unido

$S_u$ : esteroide libre

Sustituyendo  $B_{total} - S_b$  por  $B_{Pu}$  (Proteína ligadora unida)

$(B_{total}) = S_b (K_d / (S_u) + 1)$

$S_b$  es obtenida de la radioactividad medida en el pico luego de restar el "background" del esteroide libre (o sea el nivel de radioactividad frente y detrás del pico).

Como  $S_b$  y  $B_{total}$  están idénticamente distribuidas dentro de igual volumen, la cantidad total en moles puede ser sustituida por concentraciones molares:

$B_{total} = S_b (K_d / (S_u) + 1)$

De modo que mediante esta ecuación y asumiendo un sitio de unión por molécula de proteína se puede calcular la cantidad de ABP presente en el gel.

El procedimiento seguido para llevar a cabo este método fue el siguiente: los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente los epidídimos fueron extraídos, sus cabezas separadas y homogenizadas en 10 volúmenes de buffer Tris 50 mM (pH: 7,4) conteniendo 1,5 mM de EDTA, 0,5 mM de 2-mercaptoetanol y 10% de glicerol.

El homogenato fue centrifugado a 105.000 x g durante 60 min. y el sobrenadante fue incubado con agitación constante con carbón (1 mg. /mg. de proteína) durante toda la noche para remover los esteroides endógenos, luego de la incubación se separó el carbón por centrifugación.

Todas las operaciones fueron hechas entre 0° y 4°C.

Las proteínas fueron medidas en cada muestra por el método de Lowry y col. (155) usando albúmina sérica bovina como referencia.

La DHT H<sup>3</sup> es disuelta en la solución de acrilamida antes de su polimerización a una concentración 2n M. La DHT H<sup>3</sup> se distribuye uniformemente en estos geles de poliacrilamida al 6,5% y permanece estacionaria en el campo electroforético hasta su unión con la proteína que se moviliza a través del gel. Cada uno de estos geles (poro fino) miden 5 x 50 mm y el catalizador que se usó fue persulfato de amonio (0,1%p/v), la polimerización se realizó toda la noche a 4°C. Sobre este gel se prepara un gel de poro grueso (stacking

gel) que mide 5 x 15 mm.. Este consta de una solución de acrilamida al 3%,  
rivo flavina 0,5% p/v y DHT H<sup>3</sup> 15 nM. La polimerización se llevó a cabo  
bajo luz blanca durante 2 hs. a 4° C,

En cada gel se sembró 0,2 ml. de citosol (aproximadamente 300 mg. de  
proteína). La electroforesis se realizó a 0°C durante 7 hs. a 2 mA por tubo  
hasta un máximo de 150 V. Los geles se sumergieron totalmente en el buffer  
de corrida (Tris-glicina pH: 8,6), en la cámara electródica superior se agre-  
garon unas gotas de azul de bromofenol como indicador de frente de corrida.

La proteína se marca con la DHT H<sup>3</sup> al pasar por el gel de poro grueso  
y se mantiene en estado de equilibrio estacionario en toda su corrida.

Terminada la electroforesis los geles fueron cortados en láminas de 2mm.  
de espesor y llevados a viales de conteo de polietileno (5 x 1,2 cm.), se les  
agregó 3 ml. de tolueno centelleante y se los contó 12 a 14 horas más tarde.  
Con este método el 98% de la radioactividad fue extraída por el tolueno. En  
estas condiciones ABP presenta un Rf de 0,4.

#### Preparación de Sepharosa-Concanavalina A

La concanavalina A fue unida a sepharosa (156, 157) de la siguiente ma-  
nera: 50 gr. de sepharosa 6 B lavada y suspendida en 40 ml. de agua destila-  
da se activó por el agregado de 50 ml. de una solución al 16% (p/v) de agua  
de bromuro de cianógeno recientemente preparada, mezclando continuamen-

te con la ayuda de un agitador magnético y manteniendo el pH en 11 mediante la adición de una solución de OHNa 4M. La reacción, que aproximadamente llevó a 20°C unos 10 a 12 min. se consideró terminada cuando no se requirió adiciones ulteriores de álcali para mantener el pH. En estas circunstancias se consumieron unos 6 a 8 ml. de OHNa. Inmediatamente la suspensión conteniendo la sepharosa activada se filtró por Buchner y lavó con 100 ml. de agua destilada y 100 ml. de una solución 0,1 M de bicarbonato de sodio. Luego de ello, el sólido, se agregó a una solución de 500 mg. de concanavalina A disuelta en 40 ml. de ClNa 1 M, completándose la mezcla en 40 ml. de CO<sub>3</sub>HNa 1 M. Dicha mezcla se dejó entonces agitando durante la noche a 4°C y luego de ello la preparación se lavó por filtración a través de un embudo de vidrio poroso con dos litros de CO<sub>3</sub> HNa 0,1 M.

La eficiencia del acoplamiento fue determinada por comparación de la absorción a 280 nm de la solución original de concanavalina A con la correspondiente a los líquidos de filtrado y lavados obtenidos después de producido el acoplamiento.

El rendimiento en las condiciones mencionadas fue de un 95 a un 100%. Las preparaciones de sepharosa-concanavalina A fueron mantenidas en PBS a 4°C. El éxito de la actividad, depende casi exclusivamente de la calidad del bromuro de cianógeno.

## Obtención de hormonas radiactivas

Para la mayoría de los estudios se utilizó como ligado, hCG marcada con  $I^{125}$  de una actividad específica correspondiente a un átomo de iodo por molécula. Una serie de pruebas comparativas han demostrado que la hCG iodada presenta mayor afinidad por los receptores testiculares que preparaciones similares de LH humano u ovino, como así también mayor estabilidad.

Para preparaciones óptimas de la hormona marcada, 10-20 ug de hCG (10-12.000 U.I./mg) fueron marcadas con 1 mC de  $I^{125}$  por una modificación del método de la cloramina T que a continuación se detalla.

Todos los reactivos fueron agregados a tubos de vidrio de 10 x 75 mm mantenidos en hielo, de acuerdo a la siguiente proporción:

- 1) hCG (10.000-12.000 U. I./mg) 1 mg/ml - 25 ul.
- 2) Buffer fosfato 0,5 M pH 7, 4-65 ul.
- 3)  $I^{125}$  libre de portador en OHNa 0,1 N-20 ul, 2 mC.
- 4) Cloramina T recién preparada, 1 mg/ml. -25ul.

Después de agitar vigorosamente durante 20 seg., la mezcla de iodación fue transferida a una columna de celulosa o de sepharosa-concana-valina A para purificación de la hormona marcada.

Ambos métodos suministran hormona marcada de propiedades aceptables para estudios de "binding", aunque el proceso de cromatografía de a-

finidad utilizando sepharosa-concanavalina A, suministró preparaciones de capacidad de unión significativamente mayor.

### Purificación por cromatografía en sepharosa-concanavalina A.

La afinidad de los restos carbohidratados de las hormonas glucoproteicas por concanavalina A fue aplicada para la purificación de las gonadotrofinas marcadas.

Mediante este método, dichas hormonas son específicamente adsorbidas a sepharosa-concanavalina A y luego eluidas con soluciones de  $\alpha$  metilglucósido o  $\alpha$  metilmanósido. La selectividad de este procedimiento por la porción de hidratos de carbono de la molécula marcada, contrasta enormemente con el método de absorción en celulosa, donde el componente proteico es el que desempeña el papel principal.

Para la purificación de  $I^{125}$  hCG, la mezcla de iodinación fue transferida a una columna de sepharosa-concanavalina A (5 x 140 mm). El yodo libre y la hormona dañada fueron eluidos con 12 ml. de PBS conteniendo 1 mg/ml de gamma globulina bovina, luego de ello, la hormona marcada fue eluida con la misma solución conteniendo 0,2 M  $\alpha$  metilglucósido.

La hormona preparada por combinación de los dos procedimientos posee la mayor captación específica, suministrando al mismo tiempo los mejores blancos. Las propiedades físicas de la  $I^{125}$ -hCG obtenida por

estos métodos, no difieren de la hormona no marcada por los criterios utilizados (filtración por gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, electrofocus).

La concentración de hormona en las preparaciones radiactivas, se determinó mediante radioinmunoensayo (158). Es de hacer notar que marcaciones de hCG por el método de la lactoperoxidasa (159) produjeron preparados similares a los obtenidos con cloramina T aunque no mostraron ventajas en su realización.

Estudios recientes, han mostrado que los residuos de tirosina marcados con  $I^{125}$  en radioiodaciones de hormonas gonadotróficas humana y ovina (160) se encuentran localizados exclusivamente en las subunidades  $\alpha$  de estas hormonas, mientras que los correspondientes a la subunidad  $\beta$  permanecen sin marcar. Esto sugeriría que dichos grupos están presumiblemente enmascarados por encontrarse en la región de unión de ambas subunidades.

Se ha demostrado también que estas hormonas mantienen su completa actividad biológica a juzgar por los ensayos de aumento de peso de la próstata ventral y la disminución del contenido de ácido ascórbico ovárico (161, 162) y la producción de T por testículos aislados (163).

La actividad específica usual de la  $I^{125}$  hCG empleada en estos estudios fue de 60-100 dpm por ng o aproximadamente 50 uCi/ug.

### Purificación por columnas de celulosa

Se preparó una pequeña columna de celulosa en polvo Whatmann CF 60 comprimiendo suavemente hasta la marca indicada de 2 ml. en una jeringa descartable de plástico de 6 ml. El émbolo se utilizó para la compresión. Una vez transferida la mezcla de reacción sobre la celulosa seca, la columna es lavada cuatro veces con alícuotas de 4 ml. de PBS y a continuación la hormona radiactiva se eluyó con alícuotas de 4 ml. de una solución al 2% de gamma globulina o albúmina sérica bovina en PBS.

El método es rápido y simple y la mayoría de la hormona yodada se eluye en las primeras dos fracciones.

### Componentes del ensayo de unión de la hCG a la fracción particulada

La interacción entre las gonadotrofinas y sus receptores se estudió fundamentalmente sobre la base de la inhibición específica de la unión de  $I^{125}$  hCG a componentes particulados de células intersticiales de testículos de rata adulta, en presencia de LH o hCG no radiactivas. Testículos de ratas fueron decapsulados y cardados cuidadosamente en "buffer" Dulbecco pH 7,4 (PBS) en la relación 3 ml/testículo. Mediante este procedimiento se ha demostrado que fragmentos de células intersticiales de alta afinidad de unión para las hormonas LH y hCG (20, 21) son liberados al medio.



Una posterior liberación de partículas pudo obtenerse por agitación de la masa de túbulos dispersos por 5-10 min. con un agitador magnético. Después de la filtración a través de algodón, la suspensión fue centrifugada a 120 g por 20 min. para eliminar células intactas y restos de tejido. La fracción sobrenadante fue centrifugada a 1.500 g durante 15 min. a 4°C y el precipitado obtenido diluido con PBS en la proporción de 5 ml. / testículo utilizado.

En los casos en que se procedió a la solubilización del receptor, el sobrenadante de 120 g fue centrifugado a 27.000 g durante 20 min. y a continuación se procedió como se describirá.

Para los ensayos de unión a la fracción particulada, alícuotas de 0,5 ml. de la suspensión de "receptores" fueron incubadas durante 16 hs. a 24°C con 0,5 ml. (200-400.000) cpm  $I^{125}$ -hCG y hormonas de referencia (0,1 ml.) en un volumen final de 1,1 ml. Al día siguiente se agregó 3 ml. de PBS frío y todos los tubos se centrifugaron a 15.000 g durante 10 min. Los precipitados fueron resuspendidos en 4 ml del mismo "buffer" y centrifugados nuevamente. Después de aspirar los sobrenadantes, los tubos se contaron en un contador gamma. Todas las hormonas ensayadas fueron diluidas en PBS conteniendo 1 mg/ml. de gamma globulina bovina.

### Solubilización de partículas testiculares

Los precipitados de 27.000 g obtenidos como se detalló anteriormente fueron suspendidos en soluciones al 1% de Tritón X-100, en PBS, durante 30 min. a 4°C. Después de diluir las muestras a 10 veces con PBS, la solución se centrifugó a 27.000 g durante 10 min. para remover partículas no solubilizadas. El tratamiento de la fracción particulada correspondiente a 10 testículos con 0,5 ml. de Tritón X-100 al 1% extrae la mayoría de los lugares de unión formando una solución cuya concentración en proteínas es de 4 mg/ml. Estos receptores permanecieron en solución aún después de centrifugar las muestras a 360.000 g por 3 horas.

En algunos experimentos, las partículas testiculares fueron preincubadas con  $I^{125}$ -hCG para marcar los sitios receptores antes de proceder a la extracción con detergentes. En estos casos, 40mg. de partículas intersticiales fueron incubados a 4°C por 16 hs. con 600.000 cpm (20 ng) de  $I^{125}$ -hCG. Al final de la incubación se procedió a lavar exhaustivamente las partículas con PBS frío, mediante sucesivas centrifugaciones y resuspensiones, a fin de eliminar el exceso de hormona marcada.

En estas condiciones entre 40-60 % de la hormona fue captada por la fracción particulada y permaneció aún unido a ella al cabo de varios días de almacenamiento entre 0 y 4°C. Por otra parte, los complejos hormona-receptor extraídos de estas partículas demostraron ser más estables que

el receptor soluble extraído de partículas testiculares que no fueron previamente marcadas con hCG.

### Centrifugación en gradientes

Los gradientes de ultracentrifugación en sacarosa 5-20% (P/V) conteniendo 0,1% del detergente (Tritón X-100), fueron realizados en una ultracentrífuga Beckmann modelo L2-65 B, empleando un rotor SW 56. Dichos gradientes fueron preparados con una bomba peristáltica Desaga. Estos se cargaron en tubos de polialómero de 7/16" de diámetro x 2-3/8".

Los gradientes se estacionaron generalmente a 4°C por 3-4 hs. antes de ser utilizados. Este procedimiento suministra gradientes extremadamente lineales y reproducibles verificados por el método de Martin y Ames (164).

Las muestras de usualmente 0,4 ml. fueron aplicadas después de agregarles las proteínas marcadoras, generalmente inmunoglobulina G y albúmina de suero bovino (BSA).

Las centrifugaciones se llevaron a cabo a 45.000 rpm durante 14 hs. a 4°C y las fracciones fueron colectadas cada 15 seg. por aspiración a través de un capilar metálico conectado a la bomba de succión. El número total de fracciones fue generalmente de 30, con un volumen individual de 0,14 ml..

La posición de los picos proteicos fue determinada mediante la lectura de su densidad óptica a 280 nm, por medio de un espectrofotómetro

Beckmann DB-G; y los picos radioactivos fueron localizados contando la radioactividad presente en cada fracción en un Contador  $\gamma$  Beckmann Modelo 300.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowy y col. (155) usando albúmina sérica bovina como referencia

Determinación de receptores androgénicos por electroforesis en geles de poliacrilamida-agarosa.

Se utilizó el método de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, 3,25% de acrilamida y 0,5% de agarosa), esencialmente como lo describe Dingman y Peacock (175), con la modificación de Tindall y col. (176).

Este método es eficiente para evaluar receptores de andrógenos en hipotálamo e hipófisis y en epidídimo y próstata (92). En estos tejidos se demostró que el complejo receptor-hormona posee una alta afinidad ( $K_d: 3,4 \pm 0,7 \times 10^{-10}$  M) y una velocidad de disociación baja:  $t_{1/2}$  a  $0^\circ$  C mayor de 4 días.

Un factor importante considerado para la determinación de receptores fueron los altos niveles de esteroides endógenos, los cuales, a menudo saturan los tejidos a estudiar. En esta situación la mayoría de los receptores dentro de dichos tejidos están ocupados y consecuentemente los sitios de unión disponibles son escasos. Por este motivo es importante disminuir los niveles de esteroides endógenos y así permitir que los esteroides radiactivos se unan a los sitios receptores expuestos. Esto se logra castrando a los animales 24-48 hs. antes de obtener los tejidos receptores, en este caso la próstata. La duración de la castración puede ser crítica, ya que un período de castración (de 3-5 días), hace extremadamente difícil detectar un receptor marcándolo "in vitro", presumiblemente a consecuencia de cambios degenerativos rápidos en estos tejidos, probablemente causados por un incremento

de la actividad de enzimas proteolíticas lisosomales.

Con el objeto de minimizar el contenido endógeno de andrógenos para mantener los sitios receptores para la hormona libres, se procedió a castrar los animales 48 hs. antes de medir los receptores. La castración bilateral fue hecha por medio de una incisión ventral media. A los 2 días los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se extrajeron las próstatas, las cuales se homogenizaron en "buffer" (50 mM Tris-HCl pH: 7,4, 1,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,25 M sacarosa), en una proporción 1:5 p/v. Se utilizó un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón, cuidando que la temperatura no subiera de 4°C.

Los homogenatos fueron centrifugados a 105.000 xg durante 60 min. a 2°C.

Las fracciones citosólicas fueron incubadas a 4°C con constante agitación durante 2 hs. con  $3 \times 10^{-8}$  M de DHT-H<sup>3</sup>.

Alícuotas adecuadas del citosol se usaron para dosar proteínas por el método de Lowy y col. (155), usando albúmina de suero bovina como referencia.

Para la preparación de los geles se utilizó una solución de acrilamida al 3,25% y 10% de glicerol, se calentó a 40°C antes de agregar la agarosa.

La agarosa se disolvió en agua bidestilada (0,5% p/v) y se calentó a reflujo con agitación vigorosa hasta su total disolución, luego se desconectó el calor y se esperó hasta que bajó la temperatura a 40°C, en este momento se une a la solución de acrilamida y se llenan los geles hasta una altura de

70 mm en tubos de vidrio de 110 x 7 mm de diámetro. La agarosa solidificada a 20 °C, motivo por el cual es importante controlar la temperatura. Los geles se dejan a 4°C durante toda la noche para su polimerización.

Alícuotas de 200 ul de citosol fueron sembradas en la superficie del gel y la electroforesis se desarrolló a 0°C durante 3 hs. a 2 mA/tubo y aproximadamente 150 V. Los tubos fueron completamente sumergidos en "buffer" Tris-glicina pH: 8,6. En la cámara electródica superior se agregó unas gotas de azul de bromofenol como marcador del frente de la corrida. Su movilidad fue usada para calcular la movilidad relativa de la proteína receptora. En estas condiciones se determinó su Rf: 0,5, lo que concuerda con los datos bibliográficos. (65)

Terminada la electroforesis los geles fueron cortados en láminas de 2 mm y la radiactividad se midió por el mismo procedimiento detallado para geles de poliacrilamida al estado estacionario.

## RESULTADOS

### DETERMINACIONES Y CARACTERISTICAS GENERALES

#### Diabéticos por estreptozotocina

Los niveles de glucosa sanguínea aumentaron a las 24 hs. de la inyección hasta alcanzar valores máximos a los 12 días manteniéndose constante este valor durante los 30 días de diabetes (tabla 1)

TABLA 1: Niveles de glucosa sanguínea. Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos por el método de la glucosa oxidasa a distintos tiempos de la inyección de estreptozotocina. Los resultados son promedio de 10 animales y se expresan en mg/100 ml de sangre  $\pm$  ES.

Tiempo (días)	Glucemia
0	114 $\pm$ 10
1	404 $\pm$ 50
2	460 $\pm$ 25
4	396 $\pm$ 26
6	548 $\pm$ 67
8	437 $\pm$ 36
10	476 $\pm$ 34
12	520 $\pm$ 57
14	510 $\pm$ 62
30	516 $\pm$ 46



Los animales en general no aumentaron de peso o en algunos casos hay una disminución de éste de alrededor del 10%. También se observó una disminución del peso testicular y de los órganos sexuales accesorios (tabla 2).

#### Diabéticos por pancreatectomía

En este caso el aumento de la glucosa en sangre se observó a los 12 meses de realizada la operación, debido a que la cepa Wistar es relativamente resistente a la pancreatectomía. Los valores de glucosa sanguínea se detallan en la tabla 2. A los 30 días de realizada esta observación se hicieron los experimentos en las ratas hiperglucémicas.

En este caso no hubo diferencia significativa entre los controles y los diabéticos en el peso corporal, así como tampoco en el peso testicular y epididimal (tabla 2).

#### Niveles tisulares y séricos de T en ratas normales y diabéticas

La T se separó de DHT y de los dioles por medio de las columnas de celite ya descritas. El gráfico de elución se muestra en la figura 1.

En animales diabéticos por estreptozotocina y pancreatectomía los niveles de T sérica y tisular están significativamente disminuídos (figura 2 y tabla 3).

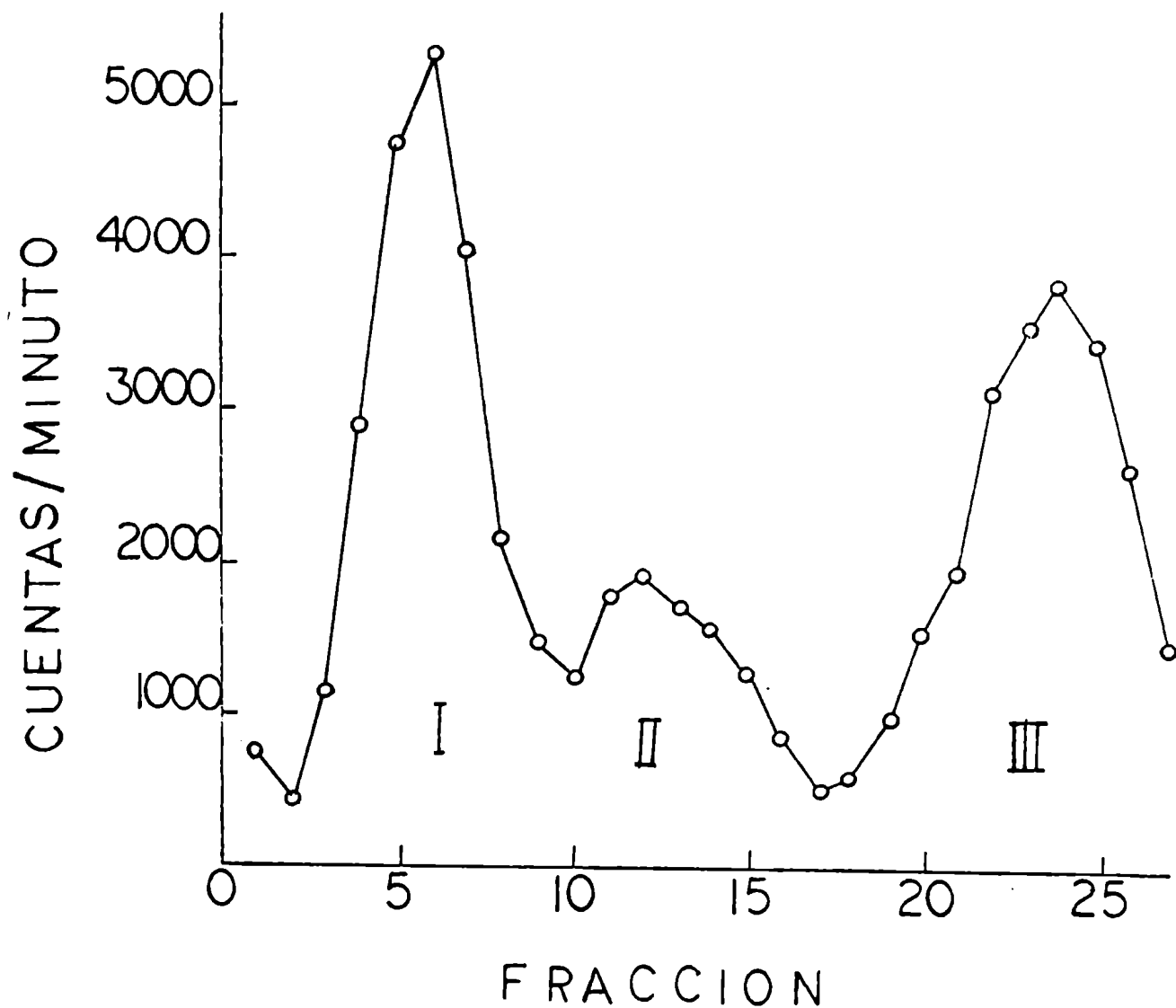


FIGURA 1: Perfil de elución de andrógenos séricos y testiculares. A cada extracto se le agregó como carriers de referencia: DHT  $C^{14}$ ,  $TH^3$  y dioles  $C^{14}$ , luego se disolvieron en 2 ml de hexano-tolueno (4:1) y se purificaron por cromatografía en columnas de celite usando propilenglicol como fase estacionaria.

Pico I: DHT eluída con 15 ml de hexano-tolueno 3:1

Pico II: T eluída con 15 ml de hexano-tolueno 1:1

Pico III: androstanodioles eluídos con 5 ml de hexano-tolueno 2:3 y 10 ml de hexano-tolueno 3:7.

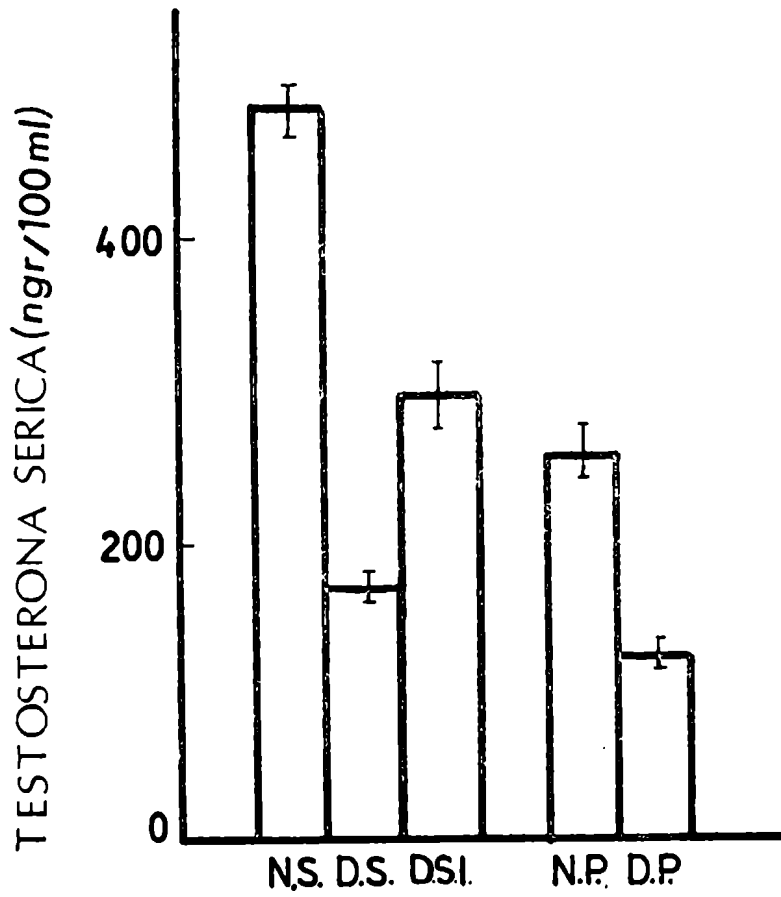


FIGURA 2: Niveles de testosterona sérica en ratas diabéticas por estreptozotocina (D. S.), diabéticas por estreptozotocina más insulina (D. S. I.) y sus controles (C. S.).

Diabéticos por pancreatectomía (D. P.) y sus controles (C. P.)

Los resultados son valores promedios  $\pm$  error standard de 15 animales por grupo.

TABLA 2: Glucemia, peso corpóral y peso de órganos de animales diabéticos y normales.

Grupo	Glucemia mg/100ml de sangre	Peso corporal (gr.)	Peso testicular (gr.)	Peso Epididimal (par) (gr.)	Peso prostático (gr.)
C.S.	107 ± 17	300 ± 45	1,36 ± 0,09	0,88 ± 0,08	0,25 ± 0,01
D.S.	572 ± 53	197 ± 35	0,86 ± 0,34	0,40 ± 0,09	0,10 ± 0,02
D.S.I.	78 ± 32	260 ± 32	1,17 ± 0,27	0,90 ± 0,20	0,26 ± 0,05
C.P.	110 ± 16	380 ± 56	1,55 ± 0,11	0,92 ± 0,20	0,33 ± 0,04
D.P.	490 ± 25	352 ± 61	1,49 ± 0,25	0,95 ± 0,10	0,29 ± 0,08

Los valores son promedios ± error standard (n=25)

C.S.: controles de los diabéticos por estreptozotocina.

D.S.: diabéticos por estreptozotocina

D.S.I.: diabéticos por estreptozotocina tratados con insulina

C.P.: controles de los diabéticos por pancreatectomía.

D.P.: diabéticos por pancreatectomía.

TABLA 3: Niveles de testosterona testicular

Grupo	ng/gr testículo	ng/testículo
C. S.	131 + 10	148 + 12
D.S.	30 + 5 (a)	29 + 5
D.S.I.	117 + 7	132 + 8
C.P.	275 + 22	350 + 22
D.P.	142 + 15 (b)	117 + 15

Los resultados son valores promedios  $\pm$  error standard (n= 15).

a) - Las diferencias son significativas con respecto a su respectivo control (p menor a 0,001).

b) - Las diferencias son significativas con respecto a su respectivo control (p menor a 0,01).

Los cálculos de T testicular se expresaron en nanogramos por gramo de testículo y por testículo entero debido a que el tamaño testicular difiere en los animales diabéticos por estreptozotocina respecto a los controles.

En el grupo de animales diabéticos por estreptozotocina a los cuales se les suministró terapia sustitutiva con insulina, hubo una recuperación parcial de los niveles de T sérica y una recuperación total de los niveles testiculares. En este último caso los valores se ven restablecidos tanto si se expresan los resultados por gramo de testículo, como por testículo entero.

Estos datos indicarían que en los diabéticos hay una disminución de la síntesis y liberación de T por las células de Leydig. La terapia sustitutiva que fue aplicada en estos animales, si bien normaliza los niveles de T testicular sólo restablece parcialmente los niveles séricos, lo que indicaría que aún en estas condiciones no hay una normalización total de los mecanismos de síntesis y/o liberación de T.

Por otro lado, el peso de los órganos sexuales accesorios a través del curso del experimento está estrechamente correlacionado con el estado androgénico de los animales (tabla 2).

Los valores de T sérica en los controles de las ratas diabéticas por estreptozotocina es mayor que en los controles por pancreatectomía (figura 2), esto se debe a la diferencia de edad de estos controles, lo cual está correlacionado con los niveles androgénicos en sangre. En el experimento con ratas diabéticas por estreptozotocina éstas poseen 3 meses de edad y las pancreatectomizadas 12 meses, esta diferencia provee la variación de T sérica observada entre estos dos grupos experimentales.

## RESPUESTA TESTICULAR A LA ESTIMULACION CON hCG

Durante la incubación de los testículos por 4 hs. con distintas concentraciones de hCG se observaron diferencias en la respuesta testicular entre controles y diabéticos.

El testículo intacto de animales diabéticos posee menor "sensibilidad" a gonadotrofinas exógenas en lo que respecta a la producción de T y a su liberación al medio de incubación.

Cuando se mide la T en el medio de incubación de testículos de animales diabéticos por estreptozotocina (D.S.) se observa que una concentración de 2 miliunidades (mU) de hCG no alcanzaron a estimular la producción de T. En cambio en sus respectivos controles (C.S.) esa concentración de hCG en el medio de incubación produce un incremento en la producción y liberación de T de 3 veces el nivel basal (figura 3). En los testículos de ratas diabéticas por estreptozotocina tratadas con insulina (D.S.I.) se produce una reversión parcial de este proceso. En este caso con dos miliunidades de hCG ya se observa un incremento en la producción de T, aunque ésta no alcanza los valores normales, la diferencia es significativa respecto al valor basal (figura 3).

Una alteración similar se observó en las ratas pancreatectomizadas donde es necesario duplicar la cantidad de hCG en diabéticos para obtener igual respuesta testicular que en los controles (figura 4).

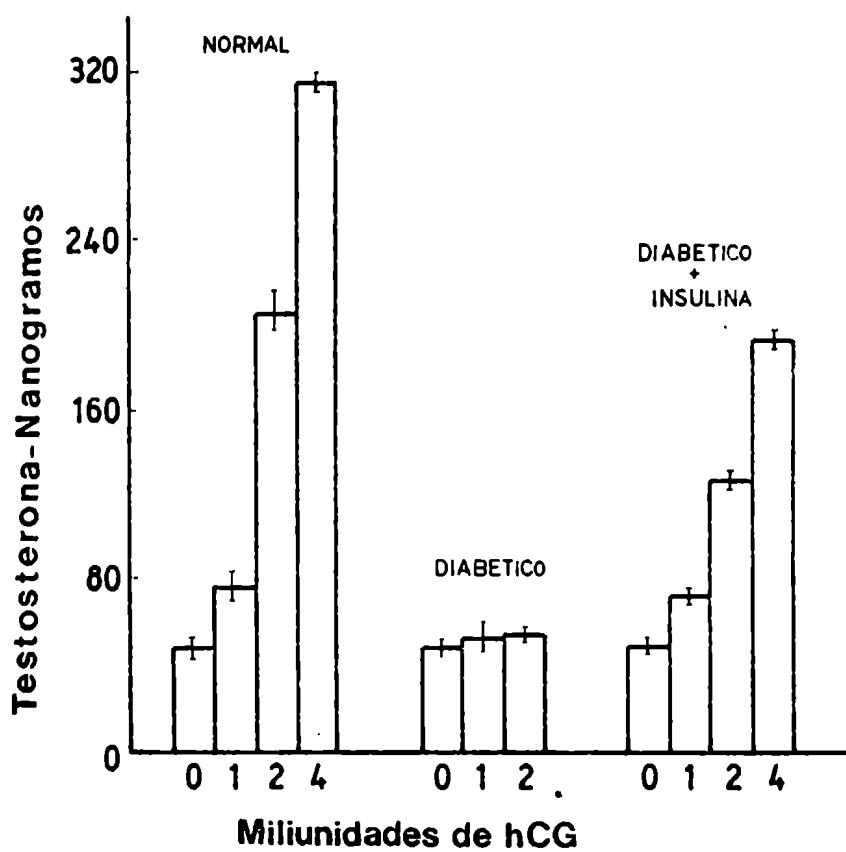


FIGURA 3 A: Determinación de testosterona liberada al medio de incubación. Se utilizaron ratas controles, diabéticas por estreptozotocina y diabéticas tratadas con insulina. Los testículos decapsulados fueron incubados en 2 ml de "buffer" Krebs Ringer bicarbonato conteniendo glucosa (1 mg/ml), con las concentraciones indicadas de hCG durante 4 horas a 34°C.



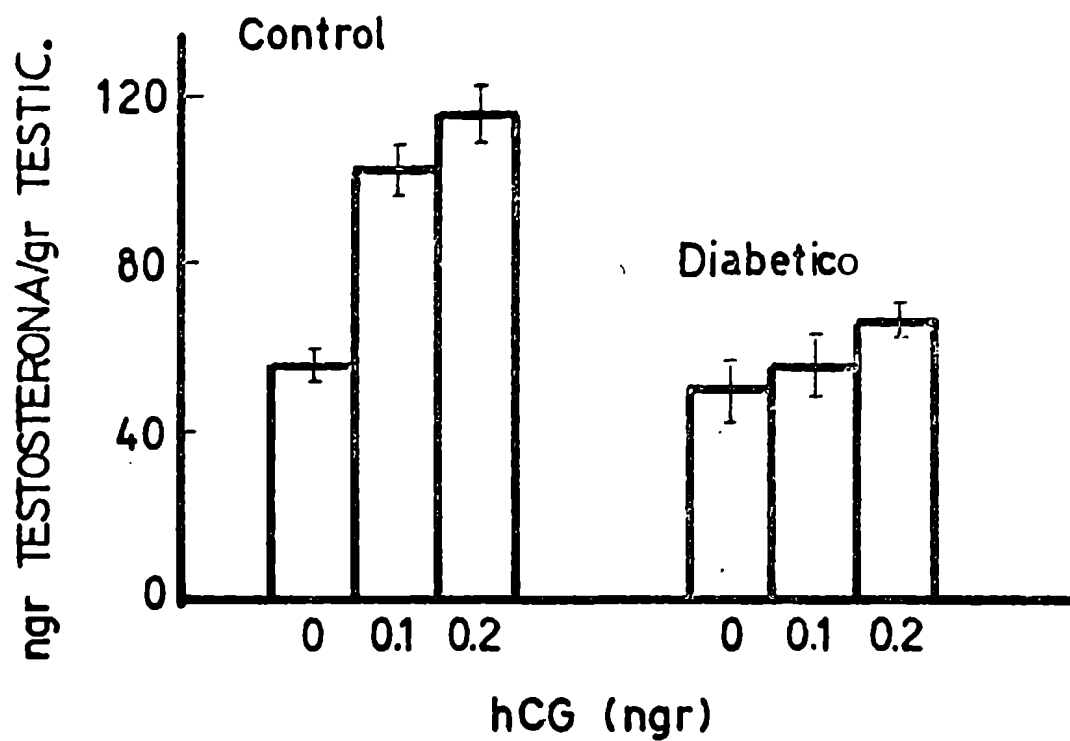


FIGURA 3 B: Determinación de testosterona liberada al medio de incubación expresada en ngr por gr de tejido testicular. Las condiciones fueron idénticas a las correspondientes a la figura 3 A.

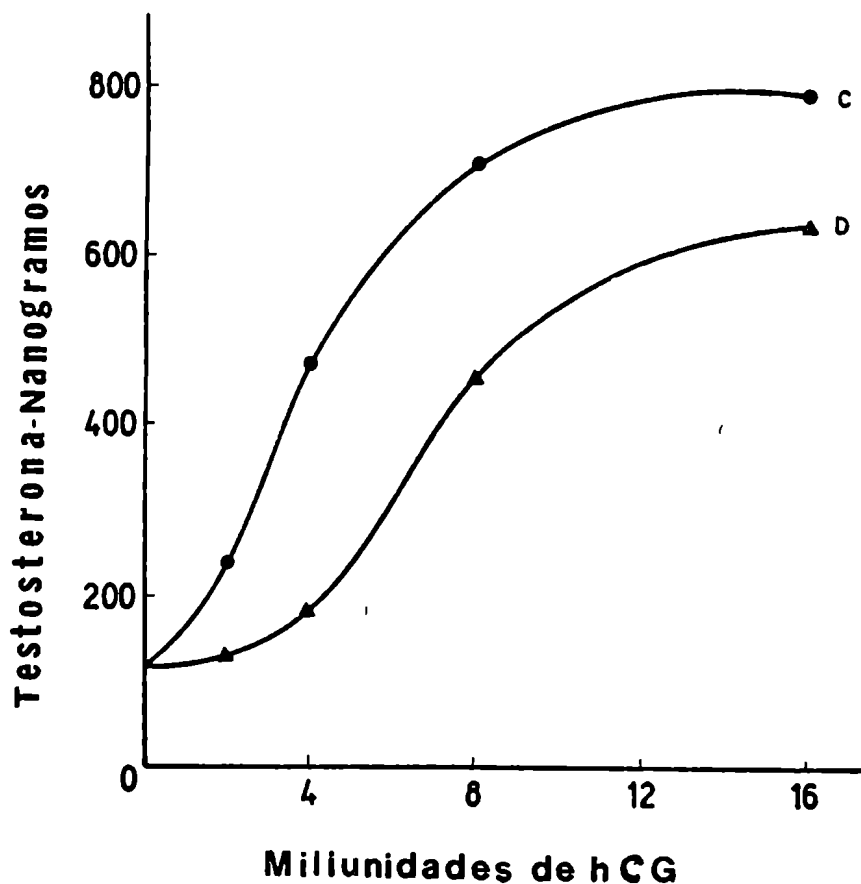


FIGURA 4: Determinación de testosterona liberada al medio en incubaciones con células de Leydig aisladas por tratamiento con colagenasa. Aproximadamente  $10^6$  de estas células fueron incubadas en 2 ml de Medio 199, metil iso butilxantino: MIX (concentración final 0,1 mM) y distintas concentraciones de hCG. Se utilizaron ratas diabéticas por pancreatectomía y sus controles.

## NIVELES DE ABP EN CABEZA DE EPIDIDIMO

### Diabetes por estreptozotocina

La concentración de la proteína transportadora de andrógenos (ABP) fue medida en cabeza de epidídimo de animales normales, diabéticos y diabéticos tratados con insulina. La medición se llevó a cabo en cabeza de epidídimo, en donde se encuentra la concentración máxima de ABP. El ABP se sintetiza en las células de Sertoli y a través de la luz de los túbulos seminíferos migra hasta el epidídimo. En este órgano se detectó que el 90% de ABP se encuentra en la cabeza y el resto se localiza en la parte media y en la cola, donde se observa una creciente desaparición antero-posterior. Por este motivo se determinó la concentración de ABP en cabeza de epidídimo.

La medición se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al estado estacionario (PAGE). Los resultados gráficos de la electroforesis se muestran en la figura 5.

La concentración de ABP expresada como pmoles/mg de proteína citosólica fue de  $2,63 \pm 0,5$  en los animales controles ( $n=10$ ). A los 30 días de la administración de estreptozotocina el contenido de ABP en cabeza de epidídimo disminuye claramente. Su valor fue de  $1,11 \pm 0,2$  ( $n=10$ ) y la diferencia entre ambos grupos es significativa para un  $p$  menor de 0,02. También fue investigada la habilidad de la insulina para restaurar la actividad ligadora de andrógenos. La concentración de ABP fue

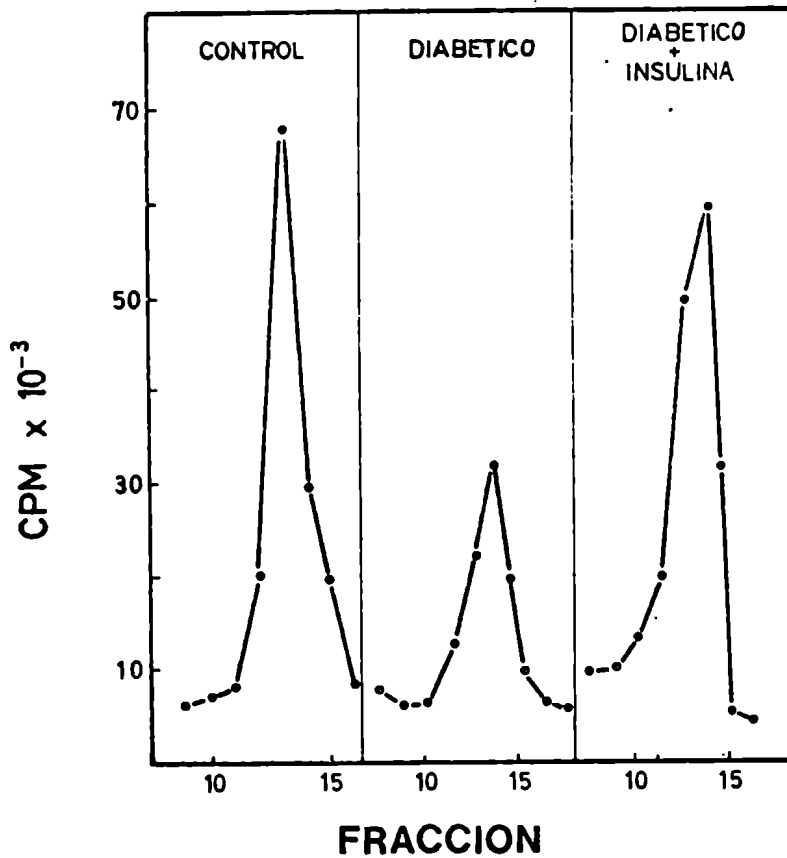


FIGURA 5: Electroforesis en estado estacionario en geles de poliacrilamida (6,5%). Se corrieron muestras de cabeza de epidídimo de animales normales, diabéticos por estreptozotocina y diabéticos tratados con insulina. Por este método la DHT H<sup>3</sup> es disuelta en la solución de acrilamida en una concentración de 2 nM, ésta se distribuye uniformemente y permanece estacionaria en el campo electroforético hasta su unión con la proteína. Las muestras fueron corridas a 0°C durante 7 horas a 2 mA por gel. Luego de la electroforesis los geles fueron cortados en secciones de 2 mm, extraídos durante 16-18 horas con tolueno centelleante y contada la radiactividad.

determinada en cabeza de epidídimo de animales tratados con 0,5 unidades de insulina diarias durante 15 días, administradas 2 semanas después de la inyección de estreptozotocina. En estos animales los niveles de ABP por mg de proteína citosólica alcanzan los encontrados en epidídimos de los controles:  $2,61 \pm 0,2$  (n=9) (figura 6). Lo que demuestra que la insulina administrada en esas condiciones tiene capacidad para estimular la biosíntesis de ABP en animales diabéticos y restituir la concentración de esta proteína a valores normales.

#### Diabéticos por pancreatectomía

Utilizando la misma técnica que la realizada en animales diabéticos por estreptozotocina se midió la concentración de ABP en cabeza de epidídimo en animales diabéticos por pancreatectomía.

Los resultados obtenidos (figura 6) indicaron que no hay una reducción en los niveles de ABP epididimal en estos animales diabéticos. Los valores coinciden con los controles. Esto indicaría que algunos mecanismos relacionados con la función testicular son diferentes en los dos tipos de diabetes estudiados. Tomando ésto en cuenta es importante comparar los valores de ABP en ambos grupos experimentales. En la figura 6 se observa que los valores de ABP en los controles por pancreatectomía son significativamente menores que en los controles por estreptozotocina.

De acuerdo a los datos bibliográficos esto se debe a la diferencia de

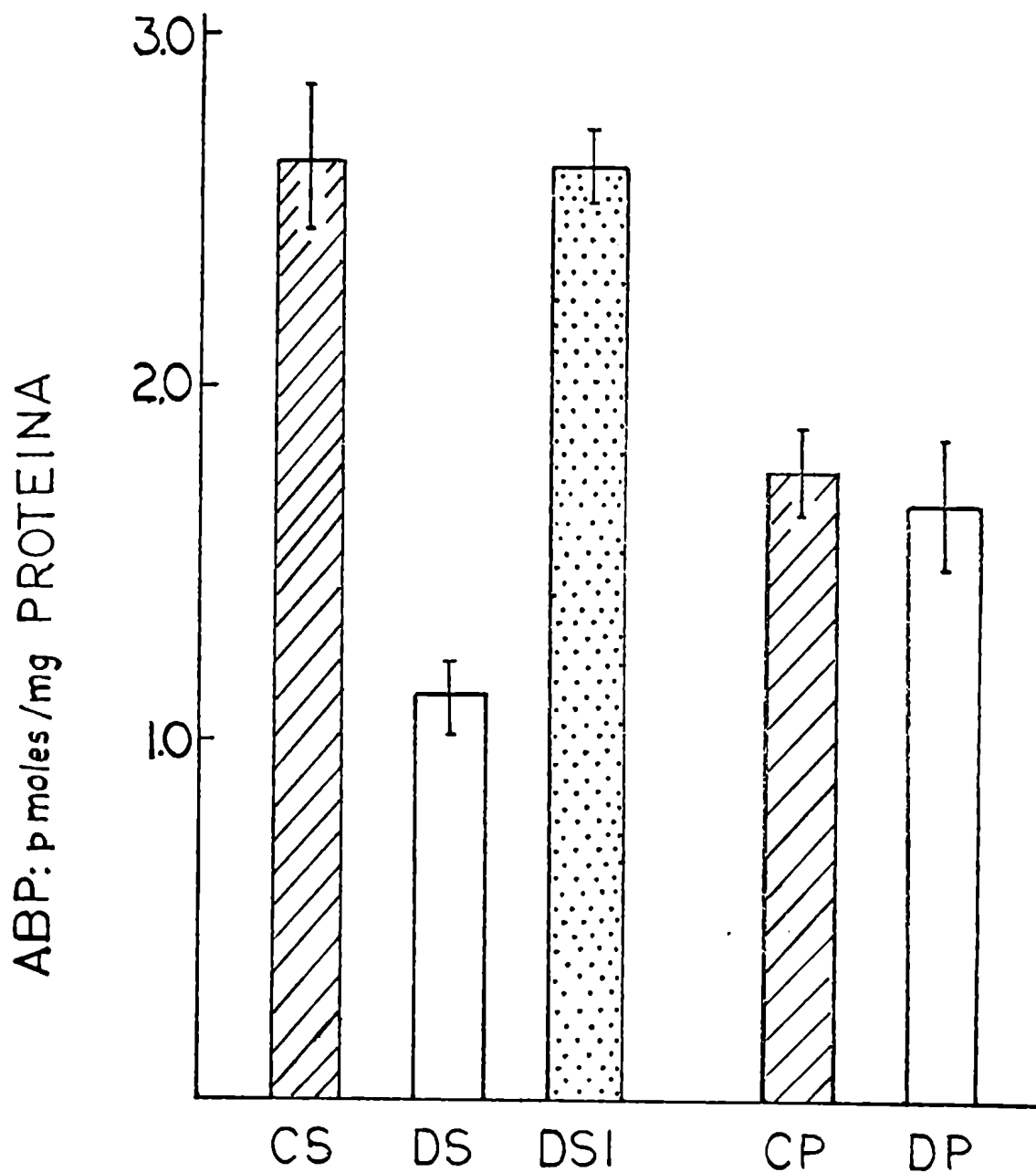


FIGURA 6: Gráfico comparativo de los niveles de ABP en epidídimo de ratas diabéticas por estreptozotocina (D. S.), diabéticas por estreptozotocina tratadas con insulina (D.S.I.) y sus controles (N. S.). Y en ratas diabéticas por pancreatocmía (D.P.) y sus controles (N.P.). ABP fue medido por electroforesis en gel de poliacrilamida al estado estacionario.

edad entre estos animales. La concentración de ABP disminuye con la edad y el grupo de diabéticos por pancreatectomía y sus controles poseen 12 meses de edad, mientras que los tratados con estreptozotocina 3 meses. Esta variación en la edad podría ser uno de los factores que influyen en el hecho de que la concentración de ABP permanezca inalterada en la diabetes por pancreatectomía.

## METABOLISMO DE TESTOSTERONA EN TUBULO SEMINIFERO

### Actividad de $5\alpha$ reductasa

Desde que los andrógenos son necesarios para completar la espermatogénesis, es importante conocer el metabolismo de éstos en túbulos seminíferos de animales diabéticos. Es conocido (89) que es necesaria la presencia de componentes reducidos de la T para completar la meiosis. Debido a que ésta es incompleta en animales diabéticos es posible suponer una alteración del metabolismo de la T en los túbulos seminíferos.

La separación entre T, DHT y dioles y entre  $\alpha$  y  $\beta$  diol se realizó como se describió en materiales. Los cromatogramas típicos obtenidos en estos experimentos se observan en las figuras 7 y 8.

En estos ensayos se determinó que los túbulos seminíferos de testículos de ratas normales y diabéticas convierten T a  $5\alpha$  androstano  $3\alpha$ ,  $17\beta$  diol,  $5\alpha$  androstano  $3\beta$ ,  $17\beta$  diol y  $5\alpha$  dihidrotestosterona.

En la tabla 4 se muestra la conversión de T en el curso del tiempo de incubación en túbulos seminíferos de ratas diabéticas por estreptozotocina y sus controles. La velocidad de formación de DHT fue similar en ambos casos, mientras que la velocidad de formación a dioles parece ser líneal durante el período total de incubación. De la radioactividad total proveniente de los dioles obtenidos luego de 60 min. de incubación, alrededor del 26-30% correspondió a  $5\alpha$  androstano  $3\beta$ ,  $17\beta$  diol y el 70-74%



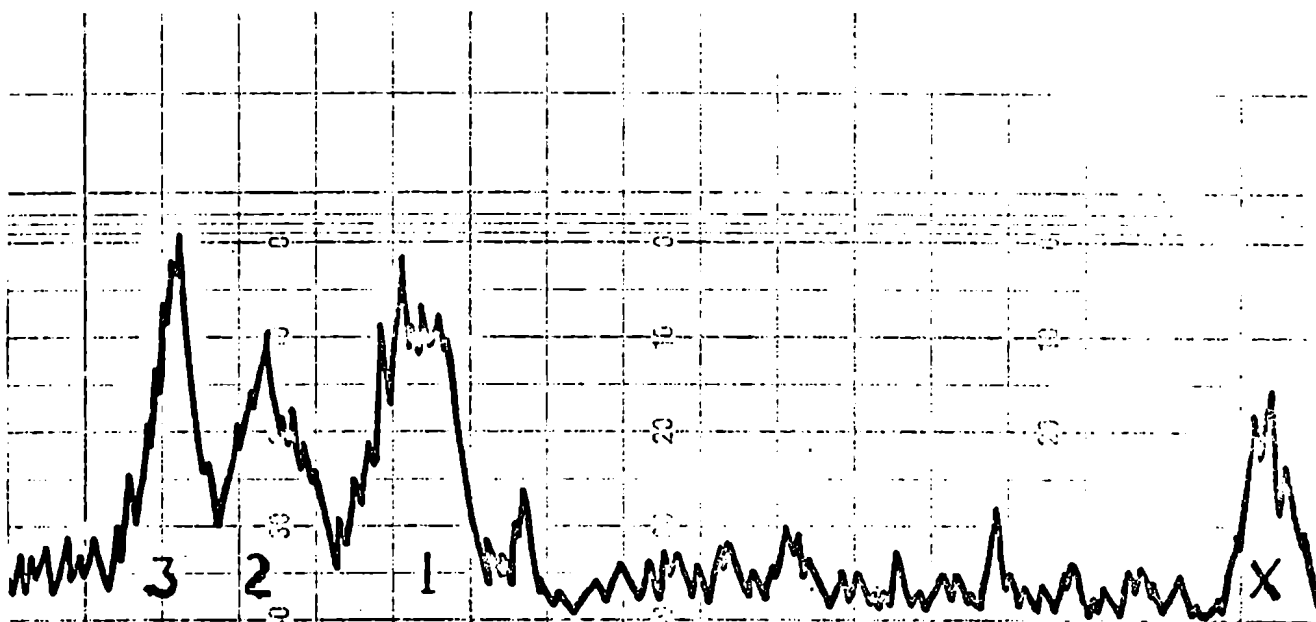


FIGURA 7: Radiocromatograma de los productos de incubación de túbulos seminíferos con  $TH^3$ . Se cromatografió en placa delgada de sílica-gel usando el sistema de desarrollo cloroformo-eter etílico 4:1.

3:  $5\alpha$  androstano  $3\alpha$   $17\beta$  diol +  $5\alpha$  androstano  $3\beta$   $17\beta$  diol.

2: testosterona

1:  $5\alpha$  dihidrotestosterona

X: marcador de referencia

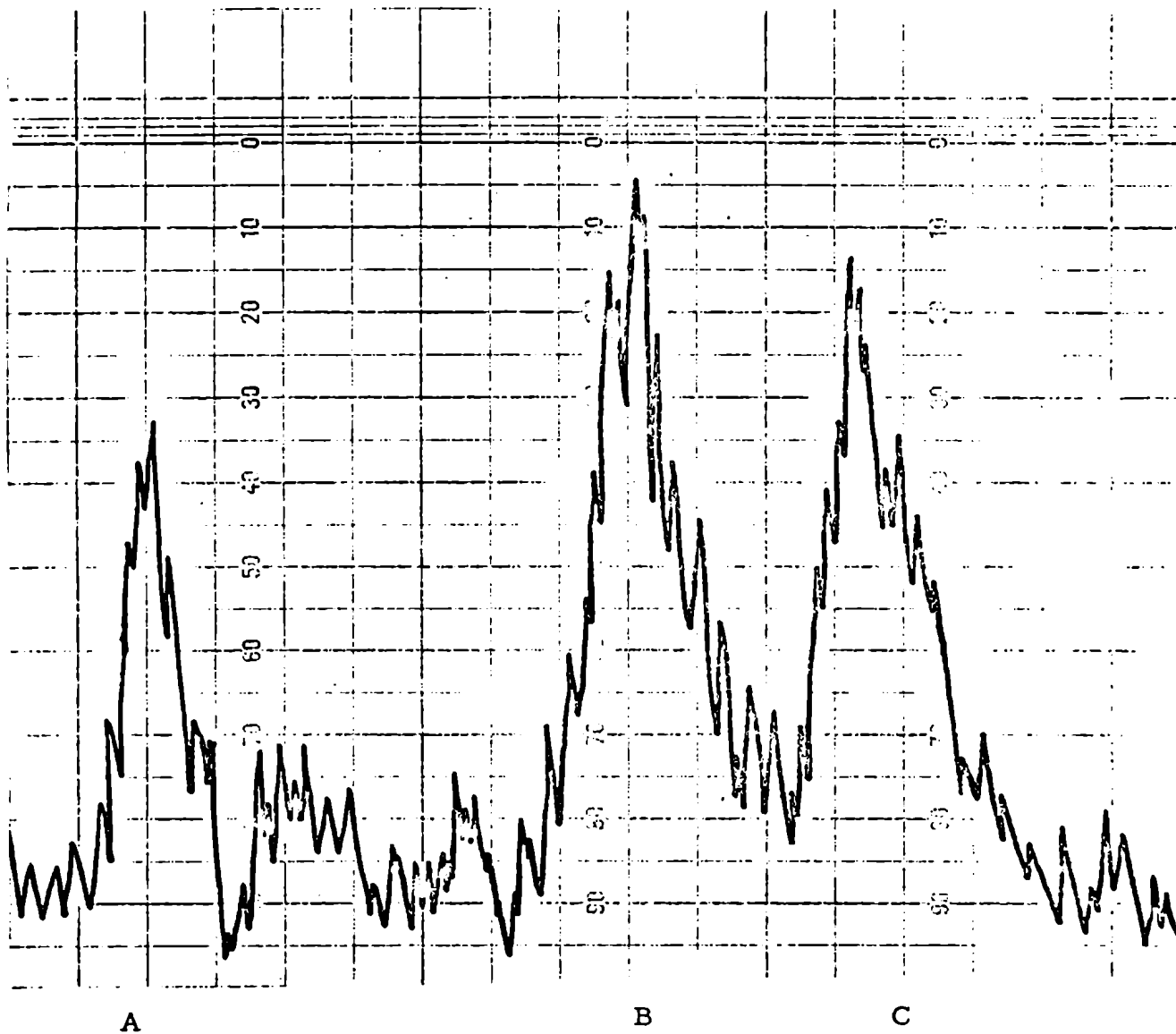


FIGURA 8: Radiocromatograma de la separación de  $\alpha$  y  $\beta$  diol. La mezcla de dioles fue cromatografiada en papel Watmann N°3 en el sistema hexano-metanol-agua (10:9:1).

A: marcador de referencia

B:  $5\alpha$  androstano  $3\beta$   $17\beta$  diol

C:  $5\alpha$  androstano  $3\alpha$   $17\beta$  diol

fue  $5\alpha$  androstano  $3\alpha$ ,  $17\beta$  diol.

El porcentaje de conversión de  $\text{TH}^3$  a dioles por túbulo de ratas diabéticas por estreptozotocina es significativamente mayor que el observado en túbulo de ratas normales adultas.

Estas diferencias también son observadas cuando el total de la actividad de  $5\alpha$  reductasa es evaluado a 30 y 60 min. de incubación. Respectivamente 30% y 44% de radioactividad es recobrada como metabolitos  $5\alpha$  reducidos de túbulo de ratas diabéticas mientras que 23% y 32% de reducción es observada en las incubaciones controles.

Con respecto a las ratas diabéticas por pancreatectomía, no se observó diferencia entre la actividad de la  $5\alpha$  reductasa en túbulo seminíferos de diabéticos y controles. Como se observa en la tabla 5 a los 60 min. de incubación la producción de dihidrotestosterona es similar en diabéticos y controles.

#### Actividad de 3 hidroxisteroide deshidrogenasa

La velocidad de formación de dioles  $\text{H}^3$  cuando el sustrato utilizado fue DHT  $\text{H}^3$  fue estudiado en cada uno de los grupos experimentales descritos.

En los diabéticos por estreptozotocina se observa algo similar que en las incubaciones con T. La actividad de la 3 hidroxisteroide deshidrogenasa es mayor en túbulo seminíferos de ratas diabéticas en donde la conversión a dioles es mayor que en normales. Por otro lado

TABLA 4: Metabolismo de TH<sup>3</sup> y-DHT H<sup>3</sup> por túbulos seminíferos de ratas normales y diabéticas por estreptozotocina. Los resultados se expresan como porcentaje de conversión por gr. de tejido.

SUSTRATO	TESTOSTERONA		DIHIDROTESTOSTERONA	
	Normal	Diabético	Normal	Diabético
	30	60	30	60
TIEMPO DE INCUBACION (minutos)	30	60	30	60
METABOLITOS				
5 $\alpha$ dihidrotestosterona	12,7	12,2	15,3	14,0
5 $\alpha$ androstano 3 $\alpha$ , 17 $\beta$ diol	5,8	14,5	7,8	20,9
5 $\alpha$ androstano 3 $\beta$ , 17 $\beta$ diol	4,6	5,2	7,1	9,1
			2,4	2,8
			2,6	2,4
				3,5
				-
				4,8
				2,6

en todos los casos la conversión a  $5\alpha$  androstano  $3\alpha$ ,  $17\beta$  diol fue mayor que a  $5\alpha$  androstano  $3\beta$ ,  $17\beta$  diol (tabla 4).

En forma similar a lo ocurrido con la actividad de  $5\alpha$  reductasa, en las ratas diabéticas por pancreatectomía tampoco existen diferencias entre diabéticos y controles en la conversión de DHT  $H^3$  a los correspondientes dioles (tabla 5)

TABLA 5: Metabolismo de  $TH^3$  y DHT  $H^3$  por túbulos seminíferos de ratas normales y diabéticas por pancreatectomía. Los resultados se expresan como porcentaje de conversión por gr. de tejido. El tiempo de incubación fue de 60 minutos.

SUSTRATO	TESTOSTERONA		DIHIDROTESTOSTERONA	
	C.P.	D.P.	C.P.	D.P.
<u>Metabolitos</u>				
$5\alpha$ dihidrotestosterona	10,2	9,87		
$5\alpha$ androstano $3\alpha$ , $17\beta$ diol	29,3	25,4	2,95	2,85
$5\alpha$ andorstano $3\beta$ , $17\beta$ diol	13,7	12,8	2,60	2,15

## RECEPTORES HORMONALES

### Unión de gonadotrofinas a receptores testiculares

Los sitios específicos de acción de algunas hormonas tróficas pituitarias sugieren que sus órganos receptores poseen un sistema sensible el cual es capaz de detectar cantidades extremadamente pequeñas de estas hormonas. Este sistema debe poseer un especial reconocimiento de las hormonas tróficas por sus tejidos receptores e implica la existencia de algún tipo de interacción entre los sitios receptores específicos con la hormona concerniente. Uno de los ensayos más frecuentemente utilizado es la combinación entre hormonas marcadas y sus sitios receptores celulares. Este sistema de unión a hormonas radioactivas es respuesta a la conformación biológicamente activa de la hormona y a la naturaleza de sus sitios receptores. La unión de LH o hCG I<sup>125</sup> a homogenados de testículo o a células intersticiales, ha sido demostrado que ocurre "in vitro" con inhibición de la captación en presencia de hormona no radioactiva.

En base a esto se realizaron estudios de unión de hCG a los receptores gonadales mediante incubaciones de gonadotrofinas marcadas con dos tipos de preparaciones testiculares: fracción particulada de testículo total o células de Leydig aisladas por tratamiento con colagenasa. Ambos preparados fueron utilizados en los ensayos de unión de gonadotrofinas marcadas a sus receptores testiculares. (Figura 9 ).

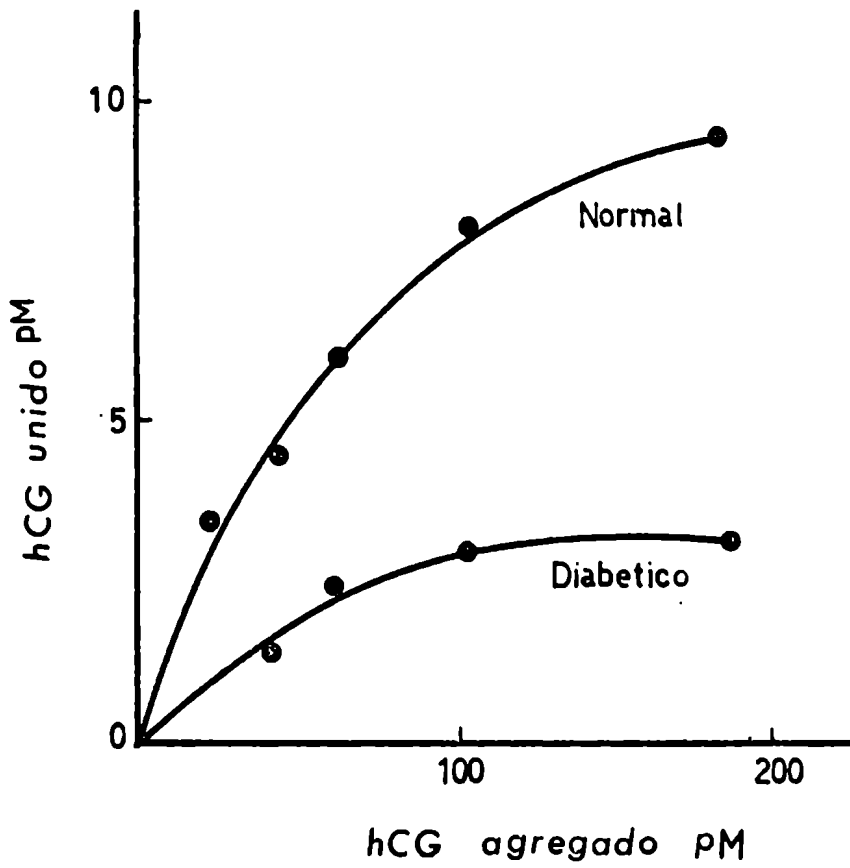


FIGURA 9 : Curvas de saturación del receptor particulado para hCG.

En ambos casos la metodología consistió en incubar las distintas preparaciones con concentraciones fijas de hCG marcado con  $I^{125}$ , y hCG fría en concentraciones variables de  $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  M.

La presencia de cantidades en aumento de hCG causa un progresivo desplazamiento de la unión hCG  $I^{125}$  con su receptor testicular.

Durante las incubaciones, como máximo hasta un 50% de la hormona radioactiva es captada por los testículos. En todos los casos los resultados han sido corregidos substrayendo al valor de la captación determinado, el correspondiente a la unión inespecífica. Este último se evaluó en presencia de un exceso de hormona fría ( $10^{-7}$  M) y en todos los casos osciló entre un 10 y un 12%.

El desplazamiento de la unión al receptor de la hormona marcada por la hormona fría provee los valores de hCG unido al receptor y libre.

Con estos datos se construye por el método de Scatchard un gráfico; a partir de éste y de una serie de consideraciones analíticas (166) se obtiene el número de sitios receptores correspondientes a cada preparación y la constante de afinidad de la unión de hCG con su receptor testicular.

#### Receptores testiculares de gonadotrofinas en animales diabéticos por estreptozotocina.

Este estudio se realizó en fracciones subcelulares de testículo decapsulado. En la figura 10 se muestra el diagrama de Scatchard derivado de



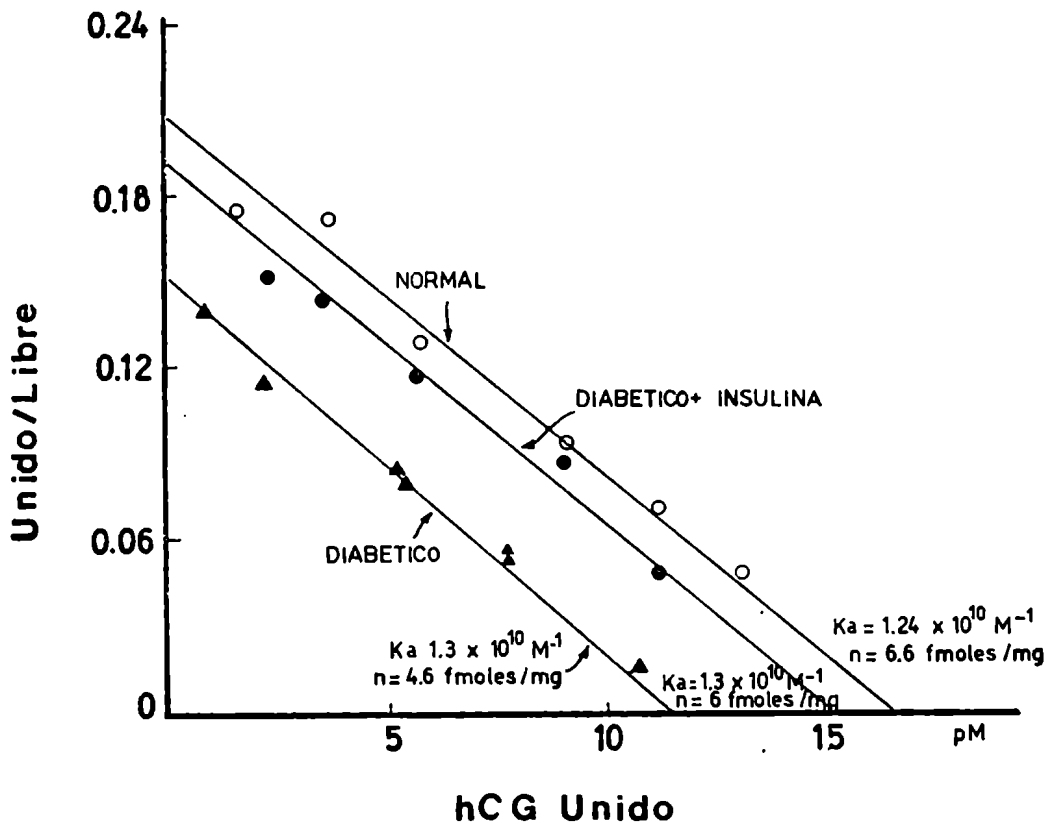


FIGURA 10: Diagrama de Scatchard obtenido de los estudios de desplazamiento de la unión de hCG I<sup>125</sup> a la fracción particulada de células intersticiales. Indica la presencia de un orden simple de sitios de ligadura con un  $K_a$  de  $1,3 \times 10^{10} M^{-1}$ . El número de sitios de unión ( $n$ ) se expresa en fmoles/mg de proteína incubada.

los estudios de desplazamiento, éste indica la presencia de un orden simple de sitios de ligadura. La determinación del número de sitios de unión de la gonadotrofina al receptor testicular dió los siguientes valores: en los animales diabéticos 4 fmoles/mg. de proteína y en los normales 6,6 fmoles/mg de proteína. La constante de afinidad fue la misma en ambos casos con un valor de  $K_a = 1,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ .

Esta disminución en el número de sitios receptores de hCG en testículo de animales diabéticos podría ser uno de los factores responsables de la disminución en los niveles de T observados y desencadenante de los desórdenes reproductivos ya enunciados.

#### Receptores testiculares de gonadotrofinas en animales diabéticos con terapia sustitutiva.

A los animales diabéticos por estreptozotocina se los trató con 0,5 unidades diarias de insulina luego de 15 días de la inyección de estreptozotocina. A los 15 días de tratamiento se realizó el experimento de unión de gonadotrofinas marcadas a sus receptores específicos. En este caso se observó que el número de sitios receptores se restaura a valores normales (figura 10).

Esto confiere a la insulina un importante papel en la regulación de la biosíntesis de receptores de gonadotrofina.

## Receptores testiculares de gonadotrofinas en animales diabéticos por pancreatomecía

Los resultados obtenidos fueron similares a los hallados en la determinación de receptores a hCG en testículos de animales diabéticos por estreptozotocina. En este caso se usaron preparaciones de células de Leydig aisladas por tratamiento con colagenasa.

El gráfico de Scatchard de receptores de células intersticiales de ratas normales y pancreatomecizadas revela la presencia de una sola clase de sitios de unión con alta afinidad para hCG I<sup>125</sup> (figura 11). La constante de asociación de receptores de LH/hCG de ratas diabéticas fue comparable con la de receptores de gonadas de animales normales.

Como lo determina el análisis de Scatchard los valores de  $K_a$  fueron de  $1,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , casi idéntico con el observado en partículas intersticiales. También se encontró que mientras que el número de sitios de unión a hCG en células de Leydig de los controles corresponde a  $26 \text{ fmoles}/10^7$  células, equivalente a alrededor de 3.000 receptores a gonadotrofinas por célula, los animales diabéticos mostraron una marcada disminución en el número de receptores específicos para LH/hCG, en donde el número disponible de sitios de unión fue de  $9 \text{ fmoles}/10^7$  células. De estos valores se puede deducir que el número de receptores a gonadotrofinas en células de Leydig se redujo a alrededor de 1.000 sitios.

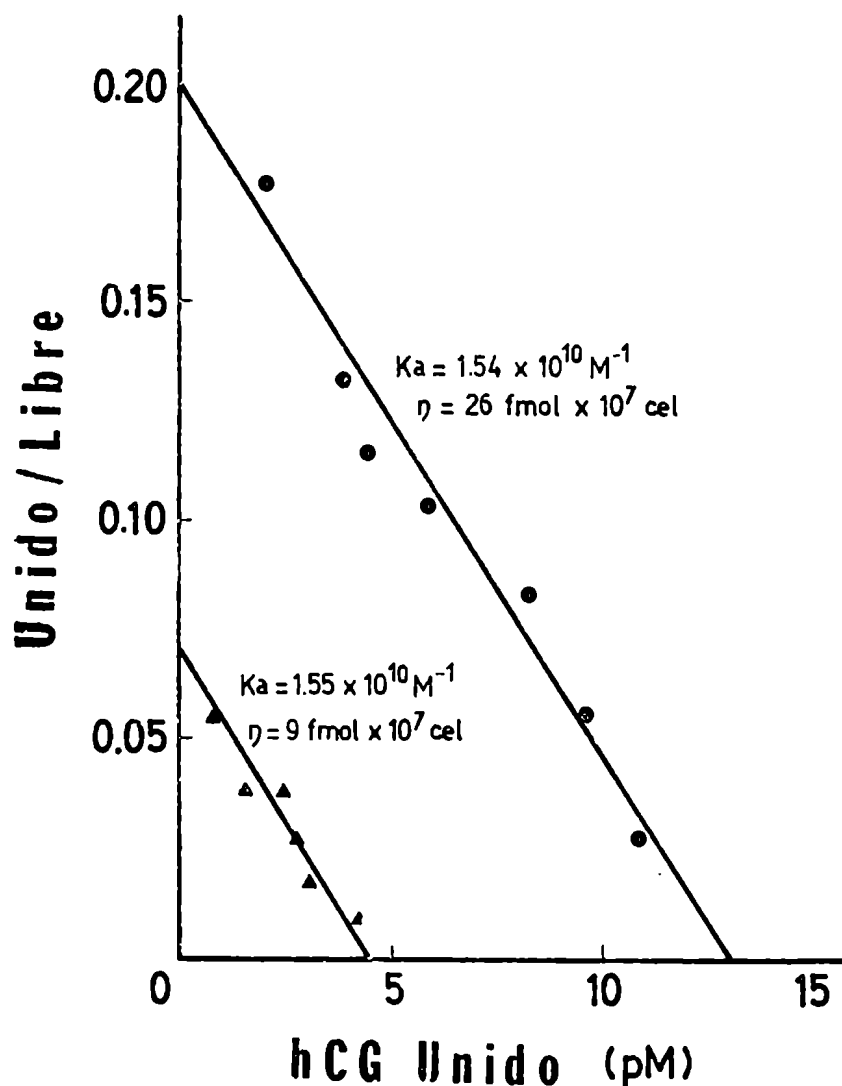


FIGURA 11: Diagrama de Scatchard obtenido de los estudios de desplazamiento de la unión de hCG I<sup>125</sup> a células de Leydig. Los estudios de unión fueron hechos por equilibración de 10<sup>7</sup> células (obtenidas por tratamiento con colagenasa de testículos decapsulados) con incremento de la concentración de hCG no radiactiva en presencia de una cantidad constante de hCG I<sup>125</sup>. Las incubaciones se hicieron a 34°C durante 2 horas en un volumen final de 1 ml en Medio 199 suplementado con 0, 1% de BSA, en una atmósfera de 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> con agitación constante. La separación de la hormona libre fue hecha por sucesivas sedimentaciones y resuspensiones de las células en el mismo medio.

## Solubilización y caracterización de receptores de gonadotrofinas por gradientes de sacarosa

Los receptores de gonadotrofinas (LH/hCG) fueron aisladas de partículas de células de Leydig de ratas diabéticas por estreptozotocina.

La solubilización de fracciones receptoras fue hecha con Tritón X-100, antes y después de su marcación "in vitro" con hCG I<sup>125</sup>; y el complejo receptor-hormona fue analizado por centrifugación en gradientes de sacarosa.

En preparados de animales diabéticos se obtuvieron las dos formas previamente descritas para receptor soluble testicular de LH-hCG en ratas normales (167): la forma 7,5 S observada cuando la marcación fue posterior a la solubilización de los sitios receptores, y la forma 8,8 S cuando la marcación fue previa a su solubilización (figura 12).

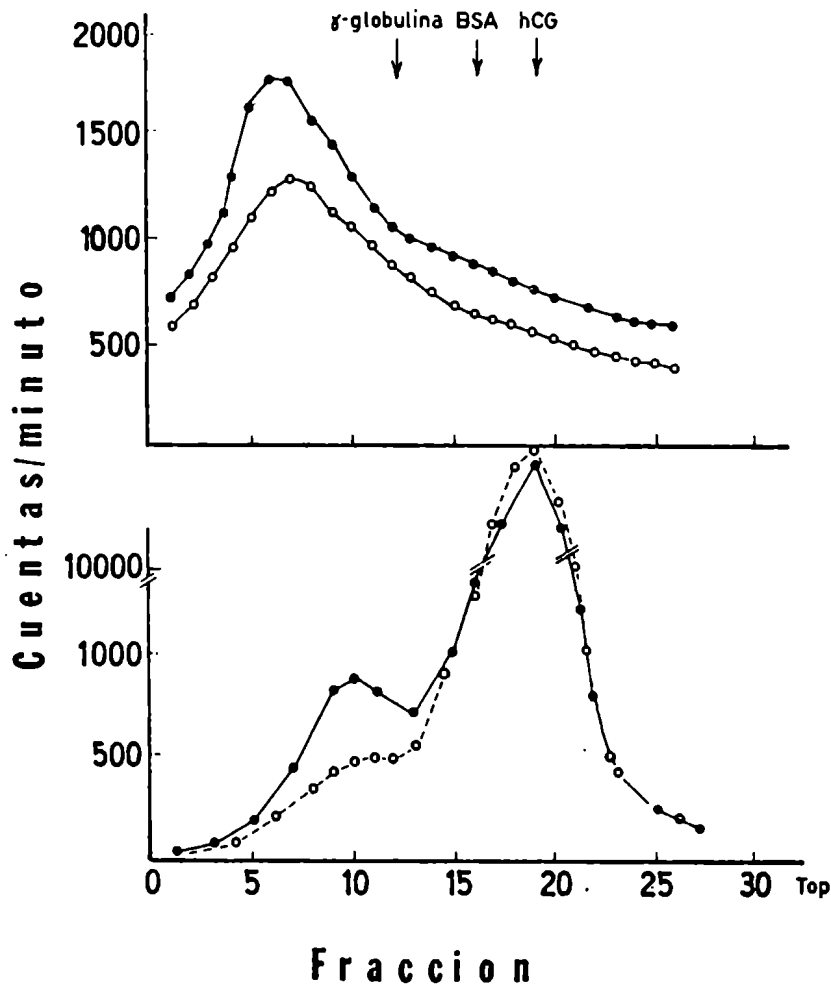
Estos resultados indican que las características de sedimentación de los receptores de hCG de ratas diabéticas son idénticas a aquellos complejos formados en testículos de ratas normales.

## Receptores de andrógenos en próstata ventral

Los resultados se observan en la figura 13. En los animales diabéticos luego de 30 días de la inyección de estreptozotocina, no se detectan por este método receptores androgénicos en la fracción citosólica de próstata

ventral.

La administración de insulina exógena durante dos semanas produce un aumento de la capacidad de unión de DHT  $H^3$ , obteniéndose valores promedio de  $4,5 \pm 0,03$  femtomoles/mg de proteína. Este aumento, si bien es considerable respecto al estado de los receptores en los diabéticos, es significativamente inferior en relación a la concentración de receptores en los controles, cuyo valor es de  $20,9 \pm 3,2$  femtomoles/mg de proteína.



●-----● ratas normales

o-----o ratas diabéticas

FIGURA 12: Perfil de la centrifugación del receptor testicular de hCG en gradientes de sacarosa (5-20%) conteniendo 0,1% de Tritón X-100. Las muestras contenían 1,2 mg de proteína en 0,4 ml de PBS pH 7,4.

Parte superior. Partículas testiculares premarcadas fueron solubilizadas con Tritón X-100, y el complejo receptor-hCG I<sup>125</sup> fue centrifugado, observándose el pico radiactivo 8,8 S.

Parte inferior. Partículas de células intersticiales fueron solubilizadas con Tritón X-100 y marcadas con hCG I<sup>125</sup>. Luego de la centrifugación se observan dos picos de radiactividad, el correspondiente a la hCG libre y el del complejo receptor-hormona 7,5 S.

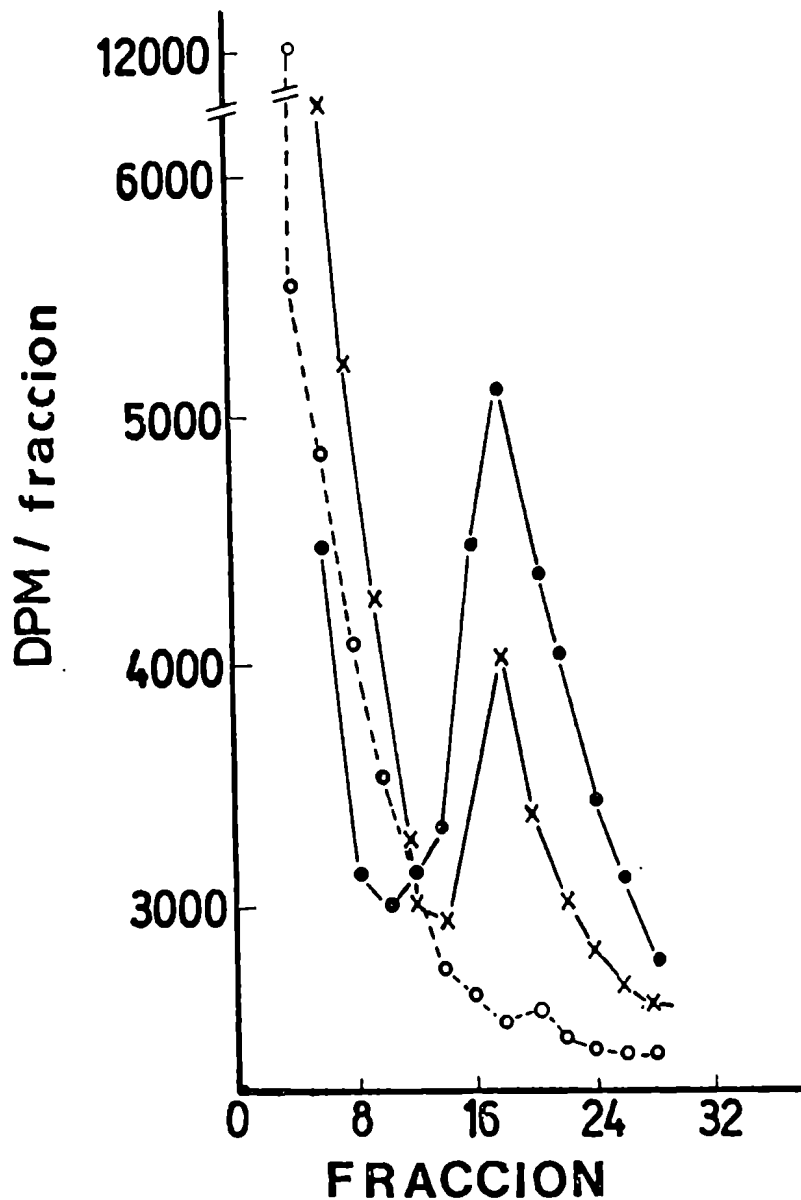


FIGURA 13: Electroforesis en geles de poliacrilamida (3,25%)-agarosa (0,5%) para receptores androgénicos en tejido prostático. Los animales fueron castrados 48 horas antes del experimento. Las fracciones citosólicas obtenidas por centrifugación a 105.000 g fueron incubadas a 4°C durante 2 horas con  $3 \times 10^{-8}$  M de DHT  $H^3$ . Se sembraron alícuotas de 200  $\mu$ l de citosol (100-200  $\mu$ g de proteína) y la electroforesis se desarrolló a 0°C durante 2 horas a 2 mA por tubo y aproximadamente 150 V.

●—● ratas normales  
 o---o ratas diabéticas  
 x—x ratas diabéticas tratadas con insulina



## DISCUSION

Es conocido que la diabetes produce innumerables trastornos sexuales y reproductivos tanto en machos como en hembras de varias especies estudiadas.

Recientemente se han hecho una serie de estudios tendientes a dilucidar las causas de las alteraciones de las funciones reproductivas masculinas en condiciones de diabetes experimental.

Es difícil determinar si la diabetes y sus disturbios en el metabolismo general actúan primariamente sobre el eje hipotálamo-hipofisario o sobre el testículo directamente. Para que la primera hipótesis sea verdadera la secreción de una o ambas gonadotrofinas debería estar reducida o al menos su potencia biológica.

La segunda hipótesis, o sea una acción directa de los disturbios diabéticos sobre el testículo es apoyada por la existencia de lesiones en el hipotálamo similares a los observados luego de la castración. Esto involucraría una falla en los mecanismos receptores y/o amplificadores de las gonadotrofinas.

Una tercera posibilidad es la que resulta de combinar las dos anteriores; o sea que las alteraciones al estado diabético se produzcan tanto en el eje hipotálamo-hipofisis como en el testículo.

En este trabajo se ha prestado especial atención a los mecanismos

receptores de gonadotrofinas y a los efectos biológicos producidos como consecuencia de tal interacción.

Dos modelos experimentales se han utilizado: diabetes por estreptozotocina y diabetes por pancreatectomía parcial (95%) El objetivo de hacer los estudios en dos modelos distintos fue con el propósito de hacer extensivos los resultados al estado diabético, y que éstos no estén visados por los posibles efectos que la droga (estreptozotocina) en sí, podría tener sobre la función testicular.

Se ha elegido como droga diabetogénica a la estreptozotocina (glucopiranososa, 2 deoxi 2-3 metil-3 nitroureido-D) la cual es extraída de Streptomyces achromogenes . Esta sustancia de actividad antibiótica y oncogénica, es capaz de desarrollar en corto tiempo un estado de franca diabetes. Tal efecto se detecta plenamente dentro de las 48 hs., y se caracteriza por una hipoglucemia e hipoglicosuria iniciales (alrededor de las 10 hs. de inyectada). Este efecto es producido por la liberación brusca de insulina al destruirse las células beta del páncreas. Luego de este estado inicial se produce una progresiva hiperglucemia y aumento de glucosa en orina, lo cual se estabiliza alrededor del 8° día del tratamiento. El área de acción de la estreptozotocina sobre el páncreas se limita a las células beta donde la droga ejerce una intensa actividad citotóxica produciendo degranulación celular y destruyendo estas células. Esta sustancia es más específica en su acción y menos tóxica que otras drogas diabetogénicas, como por

ejemplo el aloxano (165).

La pancreatectomía parcial es una operación que clásicamente se efectuó en ratas de la cepa Instituto de Biología, las cuales en el término de un mes de la pancreatectomía desarrollan una diabetes marcada. Por imposibilidad de conseguir estas ratas se utilizaron las de la cepa Wistar, en las cuales los primeros signos de diabetes se evidencian después de 11 meses de la operación, lo que trae como consecuencia considerar otra variable que es la edad de los animales, la cual tiene influencia crucial en el estado reproductivo.

En la última década Foglia y col. (133) han postulado que el binomio hiperglucemia-hipotestosteronemia estaría involucrado como una de las causas responsables de la infertilidad. Dichos autores se basan en sus observaciones de que el aumento de la glucosa en sangre era proporcional a la gravedad de las lesiones testiculares. Sin embargo el estado diabético no solamente comprende el aumento de glucosa en sangre, sino un disturbio general en el metabolismo corporal.

Los resultados expuestos muestran claramente una disminución de la capacidad esteroideogénica de las células de Leydig en animales diabéticos por estreptozotocina, como se evidencia por los bajos niveles plasmáticos y testiculares de testosterona. Resultados semejantes fueron obtenidos en los diabéticos por pancreatectomía.

El tratamiento sustitutivo con insulina produjo en los animales dia-

béticos una recuperación parcial de los niveles de testosterona plasmática, existiendo la posibilidad de que un tratamiento más prolongado produzca una recuperación total de dicho parámetro.

Los niveles plasmáticos bajos de testosterona en animales diabéticos se puede deber o a una disminución en la síntesis de testosterona por las células de Leydig o a un elevado ritmo de metabolización de la hormona. Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de una falla en la secreción de testosterona a la corriente sanguínea, pero esto no estaría de acuerdo con los bajos niveles en testículo.

Ya fue descrito que las células de Leydig son altamente sensibles a la acción de la hormona luteinizante (LH) o a la gonadotropina coriónica (hCG), y que estas gonadotropinas estimulan la síntesis y producción de testosterona en estas células. En relación a esto los bajos niveles de testosterona plasmáticos y testiculares podrían deberse a alguna de las siguientes causas:

- a) menor sensibilidad de las gonadas de animales diabéticos a la acción de LH.
- b) Una falla a nivel de los sitios receptores para LH, localizados en la membrana de las células de Leydig.
- c) Bajos niveles endógenos de LH en el estado diabético.
- d) Que la actividad biológica de la LH estuviese alterada.

El punto a) ha sido verificado en los experimentos en los que se demues

tra que la producción de testosterona en respuesta a la acción de gonadotrofina exógena es diferente en testículo de animales normales y diabéticos. Esto se observa tanto en animales que se han tornado diabéticos por pancreatectomía como por la inyección de estreptozotocina. Cuando se incubaron testículos de estas ratas con distintas concentraciones de gonadotrofina exógena, la respuesta, medida como producción de testosterona al medio de incubación, fue menor que en sus controles. Así, en los diabéticos por pancreatectomía es necesario duplicar la concentración de gonadotrofina para obtener una respuesta semejante a los normales. Y también en los inyectados con estreptozotocina la producción de testosterona es inferior que en sus controles. Cuando a estos animales se los trata con insulina, se observa una recuperación de la respuesta testicular, aunque ésta no alcanza los valores normales.

Estos resultados, permitirían postular que la disminución de la sensibilidad testicular a las gonadotrofinas, se debería probablemente a una falla de los receptores a LH/hCG como se menciona en el punto b).

En testículos de rata han sido identificados receptores a gonadotrofinas con alta afinidad y especificidad para LH y hCG (18-24), los cuales se acoplan funcionalmente a la enzima adenilato ciclasa, cuya activación estimula la síntesis de testosterona en células de Leydig intactas. Los resultados obtenidos utilizando células intersticiales de ratas normales

y pancreatectomizadas indican la presencia de una sola clase de sitios de unión con alta afinidad para hCG. La constante de asociación de los receptores de LH/hCG en ratas diabéticas fue comparable con la de los receptores gonadales de animales normales.

Como lo determina el análisis de Scatchard los valores de  $K_a$  fueron:  $1,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , casi idéntico con el descrito para partículas intersticiales. Si bien esta característica ( $K_a$ ) de los sitios receptores no se vio alterada, la cantidad de los mismos sufrió profundas modificaciones. Mientras que el número de sitios de unión a hCG en células de Leydig de ratas controles corresponde a  $26 \text{ fmoles}/10^7$  células y es equivalente a alrededor de 3.000 receptores a gonadotrofinas por célula; los animales diabéticos mostraron una marcada disminución en el número de receptores específicos para LH/hCG. En este caso el número de sitios de unión fue de  $9 \text{ fmoles}/10^7$  células. O sea que la diabetes redujo el número de receptores a alrededor de 1.000 sitios por célula.

Los estudios de receptores hechos con partículas intersticiales aisladas de ratas diabéticas por estreptozotocina y normales mostraron resultados similares a los obtenidos con animales pancreatectomizados. No se evidenciaron cambios significativos en la constante de asociación, mientras que hubo una marcada reducción en el número de sitios de unión a gonadotrofinas. La diabetes redujo en un 30% el valor normal ( $6,6 \text{ fmoles}/\text{mg}$  de proteína vs.  $4 \text{ fmoles}/\text{mg}$  de proteína en el estado diabético).

La administración de insulina a ratas diabéticas por estreptozotocina restaura la unión a hCG. El contenido de receptores de gonadotropinas en partículas testiculares de ratas tratadas con insulina fue de 6 fmoles por mg. de proteína y este valor no difiere significativamente de los valores normales.

Por otra parte no se encontraron diferencias en los perfiles de sedimentación de receptores de LH/hCG solubilizados de partículas de células de Leydig de ratas diabéticas. Las estructuras características de complejos hormona-receptor con coeficiente de sedimentación 7,5 S y 8,8 S (167) fueron observadas en partículas solubilizadas de células de Leydig de animales diabéticos e idénticas a los correspondientes a controles.

Es claro por este estudio que los receptores para LH/hCG han sufrido en la diabetes experimental, sólo cambios cuantitativos y no cualitativos, manteniendo las características físico-químicas estudiadas iguales a los controles.

Por otro lado, el número disminuído de receptores a LH en animales diabéticos es restaurado a valores normales mediante la administración de insulina luego de 15 días de tratamiento.

Todos estos hechos sugieren que la insulina puede influenciar el número de receptores de LH en gonadas, pero el mecanismo por el cual esta hormona ejerce su efecto no está todavía aclarado.

A pesar de la disminución observada en el número de sitios específicos de unión, las concentraciones séricas radioinmunológicas de LH en animales diabéticos por pancreatectomía o estreptozotocina permanecen inalteradas (149). Así, los efectos aquí presentados, no serían una consecuencia directa de variaciones en la secreción de estas hormonas, como ha sido recientemente postulado para los niveles séricos de prolactina y receptores a LH (168).

Desde que ha sido sugerido (167) la presencia de un componente glicoproteico en el receptor de gonadotrofinas, podría suponerse que el metabolismo de los carbohidratos, marcadamente alterado en los animales diabéticos provocaría como consecuencia cambios en la porción glicoproteica del receptor produciendo su inactivación o la disminución de su síntesis.

La reducción en los niveles de receptores de LH en animales diabéticos provocaría la disminución de la secreción de andrógenos por los testículos, como se confirma por los bajos niveles de andrógenos circulantes, lo cual subsecuentemente produce una disminución del peso de las glándulas accesorias sexuales.

Estos resultados también explicarían la respuesta disminuida "in vitro" de las células de Leydig a la hormona luteinizante. En este sentido otros autores han provisto evidencias que la diabetes provoca reducción de la sensibilidad ovárica a gonadotrofinas (169, 170).



El metabolismo alterado de los hidratos de carbono en los animales diabéticos, podría también alterar la composición de otras glicoproteínas como pueden ser las gonadotrofinas. En este caso si bien los valores radioinmunológicos de gonadotrofinas en animales diabéticos se encuentran inalterados, sería pertinente investigar en que condiciones se encuentran sus propiedades biológicas, de las cuales depende su respuesta específica.

En relación con la hormona folículo estimulante (FSH), la cual estimula y regula la espermatogénesis, se han estudiado algunas de las respuestas asociadas a la acción de esta gonadotrofina hipofisaria.

En animales diabéticos, estudios histológicos han determinado cambios en los túbulos seminíferos que van desde principios de descamación del epitelio germinal hasta interrupción total de la espermatogénesis (131, 132).

La histología testicular de estos animales frecuentemente es similar al descrito en animales hipofisectomizados (140). Estudios sobre la regulación hormonal de la fertilidad en el macho han indicado que los andrógenos testiculares son esenciales para completar la espermatogénesis en túbulos seminíferos (171), y para la adquisición de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (172), lo cual ocurre en el epidídimo. Para incidir en este proceso los andrógenos deben ser transportados de su sitio de origen en las células de Leydig hasta sus sitios de acción, ya sea a los túbulos seminíferos o al epidídimo.

Recientemente fue demostrada la presencia de una proteína transpor

tadora de andrógenos (ABP). Esta proteína, formada en el testículo es secretada al fluído del ducto eferente testicular y se concentra en la cabeza del epidídimo (62-66). Se ha sugerido que esta proteína tiene un papel importante en el transporte de andrógenos testiculares. Su sitio de acción es el epitelio germinal y el epidídimo.

Hansson y col. (64) han demostrado que una de las acciones de FSH en túbulos seminíferos es inducir la producción de ABP por las células de Sertoli. La producción adecuada de ABP indica un buen funcionamiento de las células de Sertoli. Está establecido que una espermatogénesis activa está asociada a una alta producción de ABP.

El significado biológico de ABP se podría resumir en base a los siguientes puntos:

- 1 - La FSH se une a un receptor específico ubicado en la membrana celular de las células de Sertoli donde activa la adenil ciclasa. El AMP cíclico formado en respuesta a este estímulo, promueve la síntesis de ARN, dependiente de ADN, lo cual trae como consecuencia un aumento de la síntesis proteica, que incluye a la proteína transportadora de andrógenos (ABP) (75).
- 2 - El ABP podría migrar a los espacios intercelulares donde se une a los andrógenos, los cuales han difundido dentro de los túbulos seminíferos desde el área intersticial. El ABP tiene una afinidad alta para los andrógenos pero una rápida velocidad de disociación (65, 75).

El acúmulo de andrógenos dentro del túbulo seminífero es un factor importante para la iniciación de la espermatogénesis.

El complejo andrógeno-ABP en contacto con la membrana de la célula germinal podría facilitar la transferencia de andrógenos al receptor androgénico citoplasmático (75). El complejo receptor- andrógeno es transportado dentro del núcleo de la célula germinal. Los mecanismos de acción androgénica en la célula germinal, no están totalm~~ente~~te aclarados.

3 - El ABP luego de liberar los andrógenos en las células germinales puede unirse nuevamente a otros andrógenos. El proceso descrito puede ser repetido o el complejo andrógeno-ABP puede ser secretado a la luz del túbulo seminífero y ser transportado al epidídimo; o destruído por enzimas proteolíticas dentro del epitelio germinal.

4 - El ABP tendría un papel importante en el proceso por el cual los espermatozoides adquieren capacidad fertilizante, lo cual ocurre durante su pasaje a través del epidídimo. Así, parece que una estimulación de la producción de ABP por FSH aumenta el transporte de andrógenos del testículo al epidídimo. Luego de liberar los andrógenos a las células epiteliales del epidídimo, los sitios ligadores de ABP quedan libres para ligar nueva testosterona o dihidrotestosterona. De esta forma, una alta concentración de andrógenos es mantenida en íntima proximidad con los espermatozoides y con las células andrógeno dependientes del epidídimo. Así, una importante función de ABP sería la de constituír

un mecanismo concentrador de andrógenos en testículo y epidídimo.

5 - El ABP, al unirse a la testosterona, la protege de su metabolización.

En el flujo del ducto eferente se encuentran altas concentraciones de andrógenos, y esto requiere una protección contra la reabsorción y metabolización por las células epiteliales.

6 - Como la secreción de testosterona es de naturaleza pulsátil probablemente el ABP contribuiría a mantener la concentración de testosterona en las fases de baja concentración.

En base a estas consideraciones, y considerando que en diabéticos se observan alteraciones en la espermatogénesis, se midió en todos los lotes la concentración de ABP. Esta proteína fue cuantificada en cabeza de epidídimo por electroforesis de poliacrilamida al estado estacionario. De acuerdo a los resultados presentados, en los animales diabéticos por estreptozotocina la cantidad de ABP medida fue significativamente menor que la de sus controles. Y la administración de insulina restaura los valores de ABP a valores normales.

En animales intactos e hipofisectomizados la estimulación de ABP es específica para FSH (64). Sin embargo la disminución en la concentración de ABP en epidídimo de animales diabéticos no puede ser atribuido a anomalías en los niveles séricos de FSH, ya que ni la concentración de FSH sérica, ni la hipofisaria están alteradas en la diabetes experimental (146 - 148). Una posible explicación sería como ya se men-

cionó, que el metabolismo de los hidratos de carbono marcadamente alterado en los diabéticos podría provocar cambios en los restos hidrocarbonados de glicoproteínas tales como el ABP.

Por otro lado la restauración total de los niveles de ABP luego de la administración de insulina sugieren que esta hormona podría tener una función importante en la regulación de la biosíntesis de ABP.

En las ratas diabéticas por pancreatectomía no se encontró diferencia en los niveles de ABP con respecto a sus controles. Los valores obtenidos son inferiores a los detectados en los controles de los diabéticos por estreptozotocina. Estos resultados podrían deberse a la diferencia de edad de estos animales, la rata de 12 meses tiene los niveles de ABP disminuidos. El mantenimiento de valores normales en los diabéticos por pancreatectomía se debe probablemente al hecho de que es una edad donde los mecanismos regulatorios de la reproducción se encuentran en un estado de relativa quietud. Por el contrario, en la pubertad (3 meses), que es la edad de las ratas diabéticas por estreptozotocina, la regulación de la reproducción es un mecanismo activo y extremadamente sensible.

Otro aspecto importante en la regulación androgénica de la espermatogénesis es el metabolismo de la testosterona en sus sitios de acción. Los túbulos seminíferos correspondientes a las ratas diabéticas por estreptozotocina convierten la testosterona a sus compuestos  $5\alpha$  reducidos (DHT y dioles), en proporción significativamente mayor que los túbulos de las ra-

tas normales.

La mayor actividad de la  $5\alpha$  reductasa y de la 3 hidroxisteroide deshidrogenasa, refleja probablemente la mayor proporción de células de Sertoli en los túbulos seminíferos de animales diabéticos. También contribuye a esto la concentración inferior de ABP en animales diabéticos, lo cual traería como consecuencia un mayor acceso de los sustratos a sus respectivas enzimas reductoras (deshidrogenasas). Estas observaciones son compatibles con las sugerencias hechas por Dorrington y Fritz (173) de que los niveles de andrógenos en el fluido tubular podrían ser regulables por la producción de ABP.

En ratas normales, la  $5\alpha$  reductasa y las deshidrogenasas no tendrían fácil acceso a sus sustratos porque estarían ligados a ABP en una mayor proporción.

Otra explicación sería considerar que las gonadas de animales diabéticos se mantendrían fisiológicamente inmaduras. Está descrito que en los animales prepúberes (alrededor de 20 días), la producción de dioles es mayor que en el animal adulto. De manera que la alta proporción de componentes reducidos de la testosterona podría reflejar una falta de maduración en los testículos de animales diabéticos.

Sin embargo no puede descartarse, que las diferencias observadas en los experimentos "in vitro" de metabolismo de andrógenos en ratas diabéticas y normales podría ser consecuencia de diferentes estados hormona-

les. Los sustratos radioactivos usados en las incubaciones podrían estar diferencialmente diluïdos con el contenido endógeno de andrógenos en la glándula.

En los animales diabéticos por pancreatocómia no se observaron alteraciones en el metabolismo de andrógenos en túbulo seminífero. Posiblemente la explicación sería semejante a la expuesta en relación a los niveles de ABP, ya que se ha observado una disminución de los andrógenos reducidos con respecto al aumento de edad del animal. Los resultados obtenidos en animales tratados serían semejantes a los de los controles, debido probablemente al hecho de que la diabetes en esta cepa se produjo 11 meses después de la pancreatocómia con lo cual el estado de maduración testicular es avanzado, con la consecuente reducción de la actividad de ciertos procesos metabólicos.

Es así importante destacar que las alteraciones producidas por la diabetes en dos de las funciones atribuidas a las células de Sertoli: producción de ABP y metabolismo de testosterona en testículo, varían de acuerdo con la edad del animal.

Los órganos sexuales accesorios en animales diabéticos poseen un peso menor que los normales (139). Esta atrofia en órganos dependientes de andrógenos, como la próstata, vesícula seminal, glándulas coagulantes y epidídimo sería consecuencia de los bajos niveles circulantes de andrógenos.

Varios autores han demostrado tanto "in vivo" (136), como "in vitro" (137), que la insulina puede estimular el crecimiento de la glándula prostática. También ha sido demostrada la existencia de un sinergismo entre insulina y testosterona en el crecimiento y mantenimiento de la actividad secretoria de la próstata (136-138).

Si bien ha sido probado que la retención de testosterona tritiada es menor en próstata de animales diabéticos que en normales (140), hasta el momento no fueron realizados estudios sobre el estado de los receptores androgénicos en órganos sexuales accesorios. Los resultados obtenidos en este trabajo sobre receptores androgénicos en próstata ventral, muestran claramente que en el estado diabético los sitios receptores androgénicos están disminuídos a valores no detectables por la técnica utilizada.

La administración de insulina exógena determina un aumento en la concentración de receptores, aunque la recuperación no es total ya que los valores de receptor prostático son significativamente inferiores a los controles. Esto podría ser una consecuencia de que en estos animales, la recuperación de los niveles de testosterona circulante es sólo parcial. Quizás la recuperación íntegra del número de receptores necesitaría una concentración endógena de testosterona que la insulina administrada en estas condiciones, no ha logrado restituir.



El mecanismo de acción de la insulina es un tema ampliamente discutido. Esta hormona tiene acciones variadas en el metabolismo general; observándose efectos rápidos sobre transporte a través de membranas, y efectos a largo término sobre la síntesis de ARN y ADN. Sin embargo, a pesar de 50 años de investigación, la acción (es) primaria de la insulina aún es (son) desconocida. Es de opinión general que el primer paso en la acción de la insulina es la unión de la hormona a un receptor proteico específico sobre la superficie de las células receptoras. Luego de esta unión, es presumible que este complejo receptor-hormona provoque todas las subsecuentes acciones de la hormona, tales como cambios en el transporte, actividad eléctrica, y la actividad de enzimas unidas a membranas. Además está establecido que la insulina regula varias funciones intracelulares, incluyendo síntesis de ADN, ARN y proteínas, así como la actividad de algunas enzimas regulatorias. Pero estos efectos intracelulares no pueden ser producidos directamente por la unión de la hormona a la membrana plasmática. Es posible que la función, así como el glucagón y otras hormonas proteicas, esté mediada por la formación de un segundo mensajero intracelular. O la otra hipótesis sería que la insulina entre a la célula y los eventos intracelulares estén mediados por su propia acción (174).

Todos estos aspectos que confieren a la insulina un papel muy importante en el metabolismo celular, hacen reflexionar sobre el efecto que provoca la falta de insulina en el estado diabético. Llama la atención que

el tratamiento con insulina aquí descripto, recupera totalmente algunos parámetros alterados en los animales diabéticos y otros no. Aquellos involucrados directamente con síntesis proteica, tales como los receptores de LH y la concentración de ABP, son totalmente restablecidos. En cambio, otros que además de la síntesis proteica dependen de la esteroidogénesis (producción de testosterona, receptor de andrógenos en próstata) sólo se ven parcialmente recuperados.

Sería de interés considerar que la esteroidogénesis depende de una serie de factores que la posibilitan: el AMP cíclico o segundo mensajero; la coenzima NADPH, que estimula la esteroidogénesis actuando como cofactor en varias de sus etapas biosintéticas, incluyendo las reacciones de escisión de la cadena lateral del colesterol; la salida de pregnenolona mitocondrial al citoplasma, etc..

Esta información, juntamente con los conocimientos actuales, podrán relacionarse y utilizarse en el estudio y tratamiento de las alteraciones reproductivas características del estado diabético.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Steinberger, E. (1971) *Phys. Rev* 51, 1
- 2) Dufau, M. L. y Means, A. R. (1974) En "Hormone Bindig and Target Cell Activation in the Testis". pag. 47-77 (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.). Plenum Press, N.Y.
- 3) French, F.S., Hansson, V., Ritzen, E.M. y Nayfeh, S.N. (1965). En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis". pag. 210-231 (F.S. French, V., Hansson, E. M. Ritzen y S. N. Nayfeh, eds.) Plenum Press, N.Y.
- 4) Smith, P. E. (1927) *J. Amer. Med Ass* 88, 158.
- 5) Smith, P. E. (1930) *Amer J. Anat.* 45, 205.
- 6) Greep, R. O., Fevold, H.L. y Hisow, F. L. (1936). *Anat Rec.* 65, 261.
- 7) Greep, R. O., Fevold, H. L. (1937) *Endocrinology.* 21, 611.
- 8) Walsh, E. L., Cuyler, W.K. y Mc. Cullagh, P. (1937) *Amer J. Physiol.* 107, 508
- 9) Nelson, W.O. y Merckel, C. E. (1938) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38, 737
- 10) Ahmad, N., Haltmeyer, G. C. y Eik. Nes, K. B. (1973). *Biol. Reprod.* 8, 411.
- 11) Fawcett, D.W. (1973) *Adv. Biosci.* 10, 83.
- 12) Clermont, Y. (1958) *Exp. Cell. Res.* 15, 435.
- 13) Ross, M.H. (1967) *Am. J. Anat.* 121, 523.
- 14) Bressler, R. S. y Ross, M. H. (1972) *Biol Reprod.* 6, 148.
- 15) Fawcett, D.W. (1965). En "Handbook of Physiology"(D. W. Hamilton y R. O. Greep, Eds.) Vol. 5, sección 7, pag, 21-55. *Amer. Physiol. Sec.*
- 16) Dym, M. y Fawcett, D. W. (1970) *Biol. Reprod.* 3, 308.

- 17) Hooker, C. W. (1970) In "The Testis " (A. D. Johnson, W. R. Gomes, y N. L. Vandemark, eds.), Vol. I, pag. 483-550. Academic Press, N. Y.
- 18) Catt, K. J., Tsuruhara, T., Mendelson, C., Ketelslegers, J.M. y Dufau, M. L. (1974). En "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis" (M. L. Dufau y A. R. Means, eds.), pag. 1-30. Plenum Press, N.Y.
- 19) Bahl, P., Marz, L. y Moyle, W. R. (1974). En "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis" (M.L. Dufau y A. R. Means, eds.) pag. 125-144. Plenum Press, N.Y.
- 20) Catt, K. J., Dufau, M. L. y Tsuruhara, T (1971) J. Clin. Endocrin. 32, 860.
- 21) Catt, K.J., Tsuruhara, T. y Dufau, M. L. (1972) J. Clin Endocr. 34, 123.
- 22) Catt, K. J., Tsuruhara, T. y Dufau (1972) Biochim. Biophys. Acta 279, 1974.
- 23) Charreau, E. H., Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1974) J. Biol Chem 249 , 4189.
- 24) Moyle, W. R. y Ramachandran, J. (1973) Endocrinology 93, 27.
- 25) Tsuruhara, T., Van Hall, E. V., Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1972) Endocrinology 91, 463.
- 26) Dufau, M.L., Catt, K.J. y Tsuruhara, T. (1971) Biochim Biophys. Acta 252, 574.
- 27) Mendelson, C., Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1975) J. Biol Chem 250, 8818.
- 28) Moyle, W. R., Bahl, O.P. y Marz, L. (1976) J. Biol Chem. En prensa.
- 29) Rommerts, F.F.G., Cooke, B.A., Vander Kemp, J.W.C.M. y Van der Molen, H.J. (1972) FEBS Lett 24, 251.
- 30) Garren, L.D., Gill, G. N., Masui, H. y Walton, G. M. (1971). Recent Progr. Horm. Res. 27, 433.

- 31) Lostroh, A. J. (1969) *Endocrinology* 76, 438.
- 32) Connell, G.M. y Eik - Nes, K.B. (1968) *Steroids*. 12, 507.
- 33) Johnson, B.H. y Ewing, L.L. (1971) *Science* 173, 635.
- 34) Purvis, J.L. y Menard, R.H. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh, eds.) pag. 65-84. Plenum Press, N.Y.
- 35) Nayfeh, S. N., Coffey, J.C. Hansson, V. y French, F.S. (1975) *J. Steroid Biochim* 6, 329.
- 36) Bhalla, V.K. y Reichert, L.E., Jr. (1974). *J. Biol Chem* 249, 43.
- 37) Means, A. R. y Huckins, C. (1974). En "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis" (M.L. Dufau y A.R. Means, eds.) pag. 145-165. Plenum Press N.Y.
- 38) Dufau, M.L., Catt K.J. y Tsutuhara, T. (1972) *Endocrinology* 90, 1032.
- 39) Stumpf, W. E. (1969) *Endocrinology* 85, 31.
- 40) Sar, M., Stumpf, W. E., Mc. Lean, W.S., Smith, A.A., Hansson, V., Nayfeh, S. N. y French F. S. (1975). En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh, eds.) pag. 311-319. Plenum Press, N.Y.
- 41) Wilson, E.M. y Smith, A. (1975). En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh, eds.) pag. 281-286. Plenum Press, N.Y.
- 42) Means, A.R. y Tindall, D.J. (1975b). En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh, eds.) pag. 383-398. Plenum Press, N.Y.
- 43) Means, A. R. y Vaitukaitis, J. (1972) *Endocrinology* 90, 39.
- 44) Schwartz, S., Bell, J., Rechnitz y Rabinowitz, D. (1973) *Eur. J. Clin. Invest.* 3, 475.
- 45) Rabin, D. (1974). En "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis" (M.L. Dufau y A.R. Means, eds.) pag. 193-200 Plenum Press. N. Y.

- 46) Steinberger, A., Thanki, K.H. y Siegal, B. (1974). En "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis" (M.L. Dufau y A.R. Means, eds.) pag. 177-191. Plenum Press, N.Y.
- 47) Desjardins, C., Zeleznik, A.J., Midgley, R. y Reichert, L.E. (1974) En "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis" (M.L. Dufau y A.R. Means, eds.) pag. 221-235. Plenum Press, N.Y.
- 48) Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L. y Krans, H.M.J. (1971) Excerpta Medica International Congress Series 241, 199.
- 49) Murad, F., Strauch, B.S. y Vaughan, M. (1969) Biochim. Biophys. Acta 177, 591.
- 50) Knehl, F.A., Jr., Pontanelli, D.J., Tarnoff, J. y Humes, J.L. (1970) Biol. Reprod. 2, 154.
- 51) Means, A.R. (1971) Endocrinology 89, 981.
- 52) Means, A.R., (1974) Life Sciences 15, 371.
- 53) Means, A.R. (1975) En "Handbook of Physiology" (D.W. Hamilton y R.O. Greep, eds.) Vol. 5, sección 7, pag 203-218. Amer. Physiol. Soc.
- 54) Reddy, P.R.K., y Vिलlee, C.A. (1975) Biochim. Biophys. Res. Commun. 63, 1063.
- 55) Murphy, H.D. (1965) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 1202.
- 56) Murphy, H.D. (1965) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 671.
- 57) Mancini, R.E., Castro, A. y Seigner, A.C. (1967) J. Histochem. 15, 516.
- 58) Castro, A.E., Seigner, A.C. y Mancini, R.E. (1970) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 582.
- 59) Vaitukaitis, J., Hammond, J., Ross, G.T., Hickman, J. y Ashwell, G. (1971) J. Clin. Endocr. 32, 290.
- 60) Leidenberger, F. y Reichert, L.E., Jr. (1972) Endocrinology. 91, 135.
- 61) Midgley, A.R., Jr. (1972) En "Gonadotropins" (B.B. Saxena, C.G. Beling,

- y H.M. Gandy, eds.) pag. 248. Wiley. Interscience, N.Y.
- 62) Hansson, V., Ritzen, E.M., French, F.S. y Nayfeh, S.N. (19 5). En "Handbook of Physiology" (D.W. Hamilton y R.O. Greep, eds.). Vol. 5 sección 7, pag. 173. Amer. Physiol. Sec.
  - 63) Hansson, V., French, F.S., Weddington, S.C., Nayfeh, S.N. y Ritzen, E.M. (1974). En "Hormone Binding and Target Cell Activation of the Testis". (M.L. Dufau y A.R. Means, eds) Pag. 287-290. Plenum Press, N.Y.
  - 64) Hansson, V., Reusch, E., Trygstad, O., Tergersen, O., French, F.S. y Ritzen, E.M. (1973) Nature New Biology. 246, 56.
  - 65) Hansson, V., Trygstad, O., French, F.S., Mc. Lean, W.S., Smith, A. A., Tindall, D.J., Weddington, S.C., Petrusz, P., Nayfeh, S.N. y Ritzen, E.M. (1974) Nature, 250, 387.
  - 66) Hansson, V., Weddington, S.C., Petrusz, P., Ritzen, E.M., Nayfeh, S. N. y French, F.S. (1975) Endocrinology 97, 469.
  - 67) Fritz, I.B., Koper, B., Lam, K. y Vermon, R.G. (1974). En "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis" (M.L. Dufau y A.R. Means, eds.) pag. 311-327. Plenum Press, N.Y.
  - 68) Griswold, M., Mably, E. y Fritz, F.B. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh, eds.) pag. 413-420. Plenum Press, N.Y.
  - 69) Tung, P.S. y Fritz, I.B. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh, eds.) pag 495-508. Plenum Press, N.Y.
  - 70) Armstrong, D.T., Moon, Y.S., Fritz, I.B. y Donington J.H. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis " (F.S. French, V. Hansson, S.N. Nayfeh y E.M. Ritzen, eds.) pag. 85-96. Plenum Press, N.Y.
  - 71) Steinberger, E., Elkington, J.S.H., Sanborn, B.M., Heimdel, J.J. y Lindsey, J.N. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.M. Nayfeh, eds.) pag 337-366. Plenum Press, N.Y.
  - 72) Fritz, I.B., Louis, B.G., Tung, P.S., Griswold, M., Rommerts, F.G.

- y Dorrington, J.H. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.M. Nayfeh, eds.) pag. 367-382. Plenum Press, N.Y.
- 73) Steinberger, E. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermato-genesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.M. Nayfeh, eds.) Pag 337-366. Plenum Press, N.Y.
- 74) Ritzen, E.M., Hagenas, L., Hansson V. y French F.S. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.M. Nayfeh, eds.) pag. 353-366. Plenum Press, N.Y.
- 75) Hansson, V., Mc. Lean, W.S., Smith, A.A., Tindall, D.J., Weddington, S.C., Nayfeh, S.N. y French F.S. (1974) Steroids 23, 823.
- 76) Kokite, N., Morris, A.M., Petrusz, P., Hansson, V., Nayfeh, S.N. y French F.S. (1976) 58 th Program of the Endocrine Society.
- 77) Means, A.R., Fakunding, J.L., Huckins, C., Tindall, D.J. y Vitale, R. (1976) Rec. Prog. Horm. Res. 32. En prensa.
- 78) Wilson, E.M., Moussali, C. y French F.S. (1976) Program of the 58 th Meeting of the Endocrine Society.
- 79) Van Doorn, L.G., De Bruing, H.W.A., Galjard, H., Van der Molen, H. J. (1974) Biol. Reprod. 10, 47.
- 80) Hall, P.F., Irby, D.C. y de Krester, D.M. (1969) Endocrinology. 84, 488.
- 81) Neuman, F. y Von Berswordt-Wallrabe, R. (1966). J. Endocr. 53, 363.
- 82) Cooke, B.A., De Jong, F.H., Van der Molen, H.J. y Rommerts, F.F.G. (1972) Nature New Biology, 237, 255.
- 83) Matsumoto, K. y Yamada, M. (1974), Endocrinology. 93, 253.
- 84) Rivarola, M.A., Podestá, E.J., Chemes, H.E. y Cigorruga, S. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.M. Nayfeh, eds.) pag. 25. Plenum Press, N.Y.
- 85) Drosdowsky, M.A., Tence, M., Tence, J.F. y Barral, I. (1975) En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M.



Ritzen y S.M. Nayfeh, eds.) pag. 109. Plenum Press, N.Y.

- 86) Dorington, J.H. y Fritz, I.B. (1973). *Biochim Bioph. Res. Cojn.* 54, 1425.
- 87) Sanborn, B.M., Elkington, J.S.H., Steinberger, A., Steinberger, E. y Meistrich, L. (1975). En "Hormonal Regulation of Spermatogenesis" (F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh, eds.) pag. 293-309. Plenum Press, N.Y.
- 88) Westphal, V. "Steroid-protein interactions". *Monographs on Endocrinology* (1971). (Springer-Verlog, Berli-Heidelberg, N.Y.) Vol. 4.
- 89) Fang, S., Anderson, K.M. y Liao, S. (1969) *J. Biol. Chem* 244, 6584.
- 90) Blaquier, J.A. y Calandra, R.S. (1973) *Endocrinology*. 93, 51.
- 91) Jouan, P., Samperez, S., Thienlant, M.L. y Mercier, L. (1971) *J. Steroid Biochim* 2, 223.
- 92) Naess, O., Hansson, V., Djoeseland, O. y Attramadal, A. (1975) *Endocrinology* 97, 1355.
- 93) Jung, I. y Baulieu, E.E. (1972) *Nature New Biology* 237, 24.
- 94) Eppenberger, U. y Hsia, S.L. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 5463.
- 95) Bardin, C.W., Bullock, L.P., Sherins, R.J., Mowszowicz, I. y Blackburn, W.R. (1973) *Recent. Progr. Hormone Res.* 29, 65.
- 96) Bullock, L.P., Bardin, C.W. y Ohno, S. (1971) *Bioch. Biophys Res. comm.* 44, 1537.
- 97) O'Malley, B.W., Sherman, M.R., Toft, D.D., Spelsberg, T.C., Schader, W.T. y Steggels, A.W. (1971) *Advan Biosci* 7, 213.
- 98) Mainwaring, W.I.P. y Peterken, B.M. (1971) *Biochim J.* 125, 285.
- 99) Liao, S., Liang, T. y Tymoczko, J.L. (1972). *J. Steroid Biochim* 3, 401.
- 100) Liao, S. y Fang, S. (1969). *Vitams. Horm.* 27, 17.

- 101) Wilson, J.D. y Loeb, P.M. (1965) J. Clin. Invest. 44, 1111.
- 102) Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W. y de Sombre, E.R. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 632.
- 103) Foglia, V.G. (1958) Brit. Med. J. 844, II.
- 104) Bergvist, N. (1954) Acta Endocr. (Suppl.) 18, 1.
- 105) Rubin, A.: Amer J. Obst & Gynec (1958) 76, 25.
- 106) Babbot, D., Rubin, A. y Ginsburg, S.J. (1958) Diabetes 7, 33.
- 107) Schoffling, K., Federlin, K., Ditschuneit, H. y Pfeiffer, E.F. (1963) Diabetes 12, 519.
- 108) Schoffing, K., Federlin, K., Schmitt, W. y Pfeiffer, E.F. (1967) Acta Endocrinol 54, 335.
- 109) Irisawa, S.H., Shirai, M., Matsushita, S.H., Kagayama, M. y Ichijo, S. (1966) Tohoku J. Exp. Med. 88, 311.
- 110) Villanueva, A., Garcia, G., Hernandez, P. y Cesarman, E. (1964) Rev. Invest. Clin. (México) 16, 31.
- 111) Warren, S.J. y Le Compte, P.M. (1952). Lea & Febiger, Phila, Vol. I.
- 112) Salama-Benarrech, I. (1964) Rec. Clin. Española 95, 309.
- 113) Miller, S. y Masson, M.L. (1945). J. Clin. Invest. 5, 220.
- 114) Hortsman, L. (1958) Acta Endocr. 5, 261.
- 115) Soulairac, A., Desclaux, P. y Katz, R.P. (1948). C.R. Soc. Biol. 142, 311 París.
- 116) Soulairac, A. y Desclaux, P. (1948). Ann d'Endocr. 9, 333.
- 117) Kent, J.R. (1966) Diabetes 15, 537.
- 118) Faerman, I., Vilar, O., Rivarola, M., Rosner, J.M., Jadzinsky, M., Fox, D., Perez Lloret, A., Saraceni, D. y Bernstein Mahn, L. (1972).

Diabetes 21, 123.

- 119) Antonini, F.M. y Petruzzi, E. (1970), Acta VII Intern. Diabetes Fed. Congress, Buenos Aires.
- 120) Gray, CH. H. (1953). Ciba Found. Coll. Endocr. 6, 330.
- 121) Shipley, E.G. y Danley, K.S. (1947). Ann J. Physiol. 150, 84.
- 122) Stutinsky, F. y Mialhe, P. (1962). Bull. Assoc. Anat. 48 Reunión (Toulouse 15-19 Avril), 1249.
- 123) Belkin, R. Rapoport, J. y Striganoff, A. (1933) C.R. Soc. Biol. 114, 892.
- 124) Hunt, E.L. y Bailey, D.W. (1961) Acta Endocr. 38, 432.
- 125) Chesler, A. y Tislowitz, R. (1945). Science, 101, 468.
- 126) Lindan, O. y Morgons, M.E. (1949). J. Endocr. 6, 463.
- 127) Davis, M.E., Fuge, N. y Lawrence, K.C. (1947). Proc. Soc. Exp. Biol & Med. 66, 638.
- 128) Angerwall, L. (1959) Acta Endocr. (Sppl. 44) 1, 86.
- 129) Kim, J.N., Bunge, W., Wells, L.J. y Lazarow, A. (1960). 9, 396.
- 130) Fernandez-Collazo, E L. y Foglia, V.G. (1970). Physiol. Behaviour. 5, 1451.
- 131) Lema, B.E., Foglia, V.G. y Fernandez- Collazo, E.L. (1965). Rev. Soc. Argentina Biol. 41, 197.
- 132) Schofling, K., Federling, K., Schmitt, W. y Pfeiffer, E.F. (1967) Acta Endocrinol, 54, 335.
- 133) Foglia, V.G., Rosner, J.M., Cattaneo de Peralta Ramos, M. y Lema, B. (1969) Horm. and Metab. Res. 1, 72.
- 134) Cattaneo de Peralta Ramos, M. Irusta, D. y Foglia, V.G. (1973) Rev. Soc. Argent. Biol. 49, 56.

- 135) Foglia, V.G. (1945). Rev. Soc. Arg. Biol. 21, 45.
- 136) Sufrin, G. y Prutkin, L. (1974) Invest. Urol. 11, 361.
- 137) Calame, S.S. y Lostroh, A.J. Endocrinology (1964) 75, 451.
- 138) Lostroh, A.J. (1971) Endocrinology. 88, 500.
- 139) Angervall, L., Hesselsjo, R., Nilsson, S. y Tisell, L.E. (1967) Diabetología. 3, 395.
- 140) Oksanen, A. y Tsehima, P. (1975). Hormone Res. 6, 157.
- 141) Giorki, E.P., Stewart, J.C., Grant, J.K. y Scott, R. (1971) Biochem J. 123, 41.
- 142) Rennie, P. y Bruchowsky, N. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3288.
- 143) Lasnitzki, I., Franklin, H.R. y Wilson, J.D. (1974) J. Endocr. 60, 81.
- 144) Farnsworth, W.E. (1970) Proc. 52 nd Meet, Endocrine Soc, U.S.A. pag 159.
- 145) Baulieu, E.E. y Jung, I. (1970). Biochem. Biophys. Res. Commun 38, 599.
- 146) Howland, B.E. y Zebrowsky, E.J. (1972) J. Reprod. Fert 31, 115.
- 147) Howland, B.E. y Zebrowsky, E.J. (1974) Horm. Metab. Res. 6, 121.
- 148) Howland, B.E. y Zebrowsky, E.J. (1976) Horm. Metab. Res. 8, 465.
- 149) Libertun, C.A. Comunicación personal.
- 150) Hugget, A. S.G. y Nixon, D.A. (1957) Biochem J. 66, 12.
- 151) Christensen, A.K. y Mason N.R. (1965). Endocrinology 76, 646.
- 152) Ritzen, E.M., French, F.S., Weddington, S.C., Nayfeh S.N. y Hansson, V. (1974) J. Biol Chem, 249, 6597.
- 153) Pearlman, W.H. y Crepy, O. (1967) J. Biol. Chem. 242, 182.

- 154) Corvol, P.L., Chrambach, A., Rodbard, D. y Bardin, C. W. (1971) J. Biol Chem. 246, 3435.
- 155) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
- 156) Axen, R., Porath, J. y Ernback, S. (1967) Nature, 214, 1302.
- 157) Cuatrecasas, P., Wilchek, M. y Anfinsen, C.B. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 636.
- 158) Catt, K.J., (1969) Acta Endocrinol (Kbh) 63. Suppl. 142, 222.
- 159) Thorell, J.I. y Johanson, B.G. (1971) En "Structure Activity relationships of proteins and Polypeptide Hormones". (M. Margoulies y F.C. Greenwood, eds.) Excerpta Medica, Amsterdam.
- 160) Yang, K.P., y Ward, D.N. (1972) Endocrinology. 91, 317.
- 161) Mc. Arthur, J.W. (1952). Endocrinology. 50, 304.
- 162) Parlow, A.F. En "Human Pituitary Gonadotropins" (A. Albert, eds.) C.C. Thomas Publishers, Springfield, Ill, 1961, pag. 300.
- 163) Dufau, M.L., Tsuruhara, T. y Catt, K. J. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2414.
- 164) Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1372.
- 165) Junod, A, Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E. y Re-  
nold, A.E. (1967). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 201.
- 166) Scatchard, G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660.
- 167) Charreau, E.H., Dufau, M.L. y Catt, K.J. (1974). J. Biol. Chem. 249, 4189.
- 168) Aragona, C., Bohnet, H.C. y Friesen, J. (1977) Acta Endocrinol. (Kbh) 84, 402.
- 169) Farina, J.M.S., Chieri, R.A., Basabe, J.C. y Foglia, V.G. (1971) Fert. Steril, 22, 794.



- 170) Liu, F.T.Y., Lin, H.S. y Johnson, D.C. (1972) *Endocrinology* 91, 1172.
- 171) Steinberger, E., Steinberger A. y Fisher, M. (1970) *Rec. Prog. Horm. Res.* 26, 547.
- 172) Dyson, A.L.M.B. y Orgebin-Crist, M.C. (1973) *Endocrinology* 93, 391.
- 173) Dorrington, J.H. y Fritz, I.B. (1975) *Endocrinology* 96, 879.
- 174) Goldfine, I.D. y Smith, G.J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* 73, N° 5, 1427.
- 175) Dingman, C.W. y Peacock, A.C. (1968) *Biochemistry* 7, 659.
- 176) Tindall, D.J., Hansson, V., McLean, W.S., Ritzen, E.M., Nayfeh, S.N. y French, F.S. (1975) *Molecular and Cellular Endocrinology* 3, 83.

