

Tesis de Posgrado

Regulación hormonal de la función testicular

Calvo, Juan Carlos

1979

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Calvo, Juan Carlos. (1979). Regulación hormonal de la función testicular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1594_Calvo.pdf

Cita tipo Chicago:

Calvo, Juan Carlos. "Regulación hormonal de la función testicular". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1979.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1594_Calvo.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

REGULACION HORMONAL DE LA
FUNCION TESTICULAR

Autor: Juan Carlos Calvo

Padrino de Tesis: Prof. Dr. Eduardo H. Charreau

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Expe-
rimental.

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

AGRADECIMIENTOS

· Al Prof. Dr. Eduardo H. Charreau por su constante apoyo y estímulo para que esta investigación pudiera realizarse.

A los Dres. Ricardo S. Calandra, Luiz B. de Souza Valle y Ricardo Martins de Oliveira Filho, a la Dra. Marta Tesone y a los Lic. Selva Cigorraga y José Lino S. Baraño por la colaboración prestada en este trabajo.

A los Dres. J. A. Moguilevsky y P. Scacchi por los animales androgenizados.

Al Dr. J. A. Guzmán, de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de San Luis, por facilitarme las vizcachas.

Al Dr. C. Libertun y al Lic. G. Larrea por los animales envejecidos.

Al Dr. Virgilio Foglia por los animales hipofisectomizados.

A los Dres. H. N. Torres y M. Flawiá de Torres por su colaboración en la determinación de la actividad de la adenilato ciclasa.

A la Bioquímica Violeta Chiauzzi y a la Srta. Diana Bas por las determinaciones radioinmunológicas y asistencia técnica.

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

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

A mis padres.

... Cada uno mire cómo edifica, que cuanto al fundamento, nadie puede poner otro sino el que está puesto, que es Jesucristo.

... Aquel cuya obra subsista recibirá el premio y aquel cuya obra sea consumida sufrirá el daño...

(1 Cor. 3: 10-11, 14-16)

... el que se gloríe, que se gloríe en el Señor.

(1 Cor. 1: 31)

INDICE

	Página
INTRODUCCION	
Consideraciones generales	1
Fuente de andrógenos testiculares	3
Células de Leydig. Morfología	5
Función de las células de Leydig	7
Control de las células de Leydig	9
Hormonas actuantes sobre las células intersticiales del testículo	13
Desarrollo de los receptores para go- nadotrofinas y respuesta de la célula de Leydig	16
Inhibición de la función de la célula de Leydig por deficiencia gonadotrófica	19
Inhibición de la función de la célula de Leydig por esteroides	20
Regulación hormonal de los receptores para gonadotrofinas y la función de las células de Leydig. Hormona Luteinizante	28

	Página
Efecto de la Hormona Luteinizante en la regulación de sus sitios recep- tores	32
Consecuencias clínicas y fisiológicas de la desensibilización inducida por gonadotrofina	45
Insulina	47
Generalidades sobre la diabetes y la función testicular. Alteraciones repro- ductivas	47
Patología testicular	49
Biosíntesis de testosterona por el testículo	50
Prolactina	54
Prolactina sérica y desarrollo sexual de la rata macho	57
Efectos de la prolactina sobre la produc- ción de testosterona	60
Papel de la prolactina sobre el receptor testicular para LH	69

	Página
Otros aspectos en la regulación de la función testicular. Androgenización neonatal.	71
Efecto del tratamiento hormonal pre- y postnatal sobre la reproducción	73
Influencia de la administración prepuberal de esteroides sexuales sobre la fisiología reproductiva del macho. Andrógenos	76
-Estrógenos	78
Efecto de la androgenización neonatal sobre los niveles de testosterona, LH, FSH y prolactina en rata macho	80
Efecto de la edad sobre la función testicular	82
Fotoperíodo, glándula pineal y reproducción	88
Fotoperíodos cortos y función pineal	89
Fotoperíodos largos y función pineal	92

	Página
Objetivos de la presente investigación	93
MATERIALES Y METODOS	
Animales	95
Tratamiento de los animales. Obtención de animales diabéticos	95
Administración de insulina a los anima- les diabéticos	96
Obtención de animales "desensibilizados" por hCG	96
Obtención de animales androgenizados	97
Estudios sobre ratas envejecidas	97
Estudios realizados en vizcachas	98
Aislamiento de células de Leydig por tratamiento con colagenasa	98
Incubaciones con testículos intactos y cé- lulas de Leydig aisladas.	
- Testículos intactos	100
- Células intersticiales	100
Determinación de testosterona	101

	Página
Testosterona sérica	102
Testosterona del medio de incubación	103
Determinación de AMP cíclico	103
Aislamiento de la proteína quinasa de adrenal bovina	103
Ensayo para la determinación de AMP cíclico	104
AMP cíclico del medio de incubación	104
AMP cíclico intracelular	105
Obtención de hormonas radiactivas.	
Hormona luteinizante	105
Preparación de Sepharosa-Concanava- lina A	106
Purificación por cromatografía en Sepharosa-Concanavalina A	108
Prolactina	110
Insulina	111
Unión de hormonas marcadas a la frac- ción particulada	112

	Página
- Testículos enteros	113
- Células intersticiales	114
Determinación de sitios totales de unión de hCG	114
Solubilización de las partículas testicu- lares	115
Centrifugación en gradientes	116
Determinación de la unión de AMP cíclico a sus receptores intracelulares	117
Determinación de la actividad de las en- zimas generadoras de NADPH	119
Producción de testosterona utilizando un sistema generador de NADPH	120
Incubación de células de Leydig en presen- cia de dibutiril-AMP cíclico, cóleratoxina y/o inhibidores de la síntesis de testoste- rona	121
Estudio del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal	122
Determinación de la actividad biológica de	

	Página
la LH sérica	122
Evaluación de la respuesta hipofisaria	123
RESULTADOS	
Insulina	124
Estado diabético y actividad de las enzimas generadoras de NADPH	124
Estudio de la producción de testosterona en presencia de inhibidores de su síntesis	130
Acción de la insulina sobre la producción de AMP cíclico	134
Ocupación de los receptores para AMP cíclico durante la estimulación de células de Leydig con hCG	138
Estudio del eje hipotálamo-hipofisario	139
Prolactina	
Receptores específicos para prolactina en células de Leydig. Caracterización parcial	145
Acción de la prolactina sobre los receptores para LH y FSH	152

Página

Efecto de la prolactina sobre la res- puesta testicular a la gonadotrofina exógena.	
-Efecto "in vivo"	155
-Efecto "in vitro"	161
Acción de la prolactina sobre la proteí- na quinasa de la célula de Leydig	163
Hormona Luteinizante	
Mecanismo de desensibilización: efecto de la administración de dos dosis de hCG	168
Estudio del efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre el fenómeno de resensibilización	176
Estudio del efecto del agregado de NADPH exógeno y de AMP cíclico sobre la síntesis de testosterona, en el proceso de resensi- bilización	184
Estudio del efecto de dos dosis consecuti- vas de hCG sobre el proceso de resensibili-	

	Página
zación	190
Regulación de los sitios de unión de LH por testosterona	194
Estudio sobre la vida media del recep- tor para LH	197
Estudio sobre la desaparición de los si- tios receptores para LH, "in vitro"	199
Androgenización neonatal y función tes- ticular	204
Efecto de la edad sobre los sitios recep- tores para LH	208
Efecto del fotoperíodo sobre el testículo	210
DISCUSION	214
REFERENCIAS	271

ABREVIATURAS

hCG	Gonadotropina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
ACTH	Adenocorticotrofina
ADN	Acido desoxi-ribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
AMP _c	3', 5'-Adenosina monofosfato cíclico
BSA	Albúmina sérica bovina
Tris	Tri (hidroxi-metil)-amino metano
PBS	Buffer fosfo-salino (Dulbecco)
EDTA	Etilendiamino tetraacético
SH	Grupo sulfhidrilo
³ H	Tritio
¹⁴ C	Carbono 14
Testosterona (T)	17 β -ol-4-Androsten-3-ona
Androstenodiona	4-Androsten-3, 20-diona
Progesterona	4-Pregnen-3, 20-diona
Pregnenolona	3 β -ol-5-Pregnen-20-ona
nm	Nanometro

M	Molar
pmol	Picomol
fmol	Femtomol
ug	Microgramo
ng	Nanogramo
pg	Picogramo
ul	Microlitro
UI	Unidad internacional
mU	Miliunidad
rpm	Revoluciones por minuto
cpm	Cuentas por minuto
Ci	Curie
uCi	Micro-Curie
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleó tido fosfato. Forma reducida
Estradiol	1, 3, (5-10)-Estratrien-3, 17 β -diol
17-hidroxi-Proges terona	17 α -ol-4-Pregnen-3, 20-diona
17-hidroxi-Pregne nolona	3 β , 17 α -diol-5-Pregnen-20-ona

TGA

Acido Tricloroscético

DTT

Ditiotreito

NEM

N-etil-maleimida

INTRODUCCION

CONSIDERACIONES GENERALES

La facultad reproductiva de los machos sexualmente maduros, depende de la capacidad de los túbulos testiculares para producir gran número de espermatozoides altamente viables y de las células intersticiales para producir niveles adecuados de andrógenos que aseguren el desarrollo de la libido y la maduración del sistema reproductivo. Es imperativo que ocurra una diferenciación embriológica normal del sistema reproductivo si los testículos deben adquirir su pleno potencial funcional luego de la pubertad.

Aunque existen algunas diferencias en el proceso y estadios del desarrollo testicular entre mamíferos, los procesos involucrados pueden ser divididos en cuatro fases: (1) diferenciación del testículo, (2) descenso del testículo dentro del escroto, (3) crecimiento fetal y desarrollo y (4) maduración pre y postpuberal.

Los testículos desarrollan dos funciones, distintas pero relacionadas, en la vida reproductiva del macho adulto, a saber, la función germinal de proveer células sexuales y la fun-

ción endocrina de secretar hormonas, principalmente andrógenos. Además, el testículo fetal juega un papel importante en el desarrollo del tracto genital masculino.

Los testículos no pueden alcanzar ni mantener una función normal sin el aporte de la glándula pituitaria^{1,2}. Los principales, pero no únicos, mediadores de este aporte son las hormonas gonadotróficas: hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona estimuladora de las células intersticiales (ICSH) o luteinizante (LH)^{1,2}. Está claro que estas dos funciones de los testículos no se encuentran completamente divorciadas, ya que la LH estimula las células intersticiales (de Leydig) para producir andrógenos, los que, a su vez, estimulan el epitelio germinal¹⁻⁵. Se supone que la acción de FSH se realiza directamente en el epitelio germinal³, aunque la naturaleza de esta acción no ha sido completamente dilucidada⁵⁻⁷.

En los mamíferos, la morfología típica del testículo está dada por la presencia de túbulos seminíferos, separados por tejido conectivo intersticial. Este último consta de las células de Leydig y vasos linfáticos y sanguíneos⁸. Además los túbulos están rodeados de células peritubulares, que son similares a las cé

lulas musculares lisas y son, probablemente, un factor importante para la contracción de los túbulos seminíferos^{9, 10}. Dentro del túbulo, rodeando a éste, se encuentran las células de Sertoli, adyacentes a las espermatogonias e interconectadas con la barrera sanguínea testicular¹¹. Los espermatocitos I, II, las espermatidas y los espermatozoides están localizados en el compartimiento adluminal¹².

FUENTE DE ANDROGENOS TESTICULARES

Los andrógenos pueden ser definidos como hormonas que desarrollan y mantienen los órganos sexuales accesorios y las características sexuales secundarias masculinas. Esta definición indica que, en ausencia de andrógenos antes de la pubertad, las características de la masculinidad no se desarrollan, mientras que, por otra parte, si los andrógenos son eliminados durante la vida adulta, las características masculinas establecidas regresionan.

Desde hace tiempo, ha quedado establecido que los andrógenos son sintetizados en las células de Leydig o células intersticiales del testículo.

El tejido intertubular de los testículos corresponden al tejido intersticial o estroma de otras glándulas y, como en otras glán

dulas, constituye el almacón del órgano y el soporte del parénquima, en este caso los túbulos seminíferos. Como en otras glándulas, esta almacón es tejido conectivo fibroso que sostiene los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios del testículo, especialmente las ramas pequeñas y terminales. El tejido intertubular del testículo contiene células que son componentes del tejido conectivo: fibroblastos, células reticulares, macrófagos, células plasmáticas, linfocitos, células mastoideas y los variados elementos figurados de la sangre.

El componente distintivo del tejido intersticial del testículo mamífero, activo y adulto, es una célula epiteloide que aparece en número variable como células más o menos aisladas o, más comúnmente, como racimo de células. Estas células epiteloides se denominan células intersticiales de Leydig, frecuentemente llamadas células intersticiales del testículo. El último nombre es impreciso por el hecho que cualquier célula en el intersticio debe ser llamada célula intersticial.

Es una interesante coincidencia que la demostración de la función androgénica de los testículos, realizada por Berthold¹³ y el descubrimiento de Leydig¹⁴ de las células que llevan su nombr

bre fueron alcanzados simultáneamente. El hecho que las células de Leydig estuviesen involucradas en la secreción de los andrógenos testiculares ha sido la razón primordial del interés en estas células.

CELULAS DE LEYDIG

MORFOLOGIA

La típica célula de Leydig de mamíferos es una célula epiteloide, relativamente grande, poliédrica. Usualmente posee un núcleo, más o menos localizado en forma excéntrica, aunque no son raras las células binucleadas. El núcleo es ovoide o esférico. Contiene uno, dos o, a veces, tres nucleolos excéntricos. La cromatina remanente se presenta como gránulos distribuidos predominantemente hacia la periferia del núcleo, dando una apariencia de considerable delgadez a la membrana nuclear cuando se la observa con el microscopio óptico a bajo aumento. Como los núcleos de otras células intersticiales no exhiben estos atributos, la estructura del núcleo de la célula de Leydig provee un medio de identificación muy útil.

El citoplasma de la célula de Leydig madura es usualmente abundante, finamente granulado y es teñido por colorantes á-

cidos, pero tiene poca afinidad por los colorantes básicos usuales¹⁵⁻¹⁸.

En las preparaciones usuales, observadas al microscopio óptico, el citoplasma de las células de Leydig maduras contiene vacuolas cuyo número y tamaño varía según la especie. Estas vacuolas representarían glóbulos lipídicos disueltos en el curso de la preparación del espécimen.

La presencia de lípidos en las células de Leydig y la posibilidad de que este material estuviese involucrado en la elaboración de andrógenos, han impulsado estudios sobre su naturaleza química. Los lípidos citoplasmáticos son sudanofílicos en la rata, ratón, cobayo, perro, gato, etc.¹⁸⁻²¹. La reacción de Schultz indica colesterol en el ratón, rata, cobayo, perro, gato, hombre, etc.^{20,21}.

Por otra parte, mediante estudios histoquímicos de células de Leydig en diversas especies, se ha podido evidenciar otras sustancias entre las que se incluyen: hidratos de carbono²²⁻²⁴, ADN y ARN^{25,26}, enzimas hidrolíticas como lipasas, estererasas y fosfatasas²⁷⁻³¹ y enzimas oxidativas de diversos tipos³².

El ácido ascórbico parece ser un material constitutivo de

tejidos productores de esteroides. De hecho la concentración de esta sustancia es mayor en las células de Leydig, corteza adrenal y ovarios que en otras células del organismo.

FUNCION DE LAS CELULAS DE LEYDIG

Según la opinión de sus descubridores, las células de Leydig eran, simplemente, células de tejido conectivo conteniendo grasa y pigmento. Hacia fines de siglo, varios autores consideraron la función de las células de Leydig como la de elaboración y almacenamiento de materiales tales como lípidos y pigmentos para ser utilizados por los túbulos seminíferos.

La posibilidad de que las células de Leydig fuesen el sitio de elaboración de la hormona masculinizante del testículo fue reconocida, casi simultáneamente por varios autores franceses en los primeros cinco años de este siglo. Bouin y Ancel³³ tomaron conocimiento del hecho, bien conocido entre los veterinarios, que animales domésticos criptorquídicos exhibían atributos masculinos a pesar de una espermatogénesis defectuosa y reportaron que el tejido intertubular estaba bien desarrollado en testículos no descendidos de perros, caballos y cerdos, a pesar de que los túbulos exhibían gran atrofia. Ellos también

observaron que el tejido intersticial persistía sin atrofia en diversas enfermedades y luego de procedimientos experimentales, tales como la ligadura del ducto deferente. En ciertas circunstancias, los animales exhibían células intersticiales bien desarrolladas en presencia de una, casi total, ausencia de células germinales. En todas estas circunstancias, los caracteres sexuales secundarios eran similares a los de animales normales. Bouin y Ancel concluyeron, por lo tanto, que las células seminíferas no podían ser la fuente de la hormona responsable del desarrollo y el mantenimiento de los caracteres somáticos y el comportamiento masculinos. Además, dado que las células de Leydig poseían los atributos estructurales de células glandulares, eran un componente regular del testículo y estaban bien preservadas en animales que exhibían caracteres sexuales secundarios bien desarrollados pero deficientes en elementos tubulares, Bouin y Ancel arguyeron que esas células deberían ser el sitio de producción de los andrógenos testiculares.

El hecho de que las células de Leydig sean las productoras de los andrógenos testiculares también está demostrado en

tumores de esas células. En el hombre, dichos tumores, cuando se desarrollan durante la niñez, provocan cambios puberales adelantados^{34, 35} y, en adultos, están acompañados de elevados niveles de 17-ceto-esteroides urinarios^{36, 37}.

CONTROL DE LAS CELULAS DE LEYDIG

Generalmente es aceptado, desde los estudios clásicos de Smith y Engle³⁸ en la rata, que la pars distalis de la hipófisis ejerce el control primario de la estructura y función de la gónada y, a través de la gónada, el sistema genital entero.

Las observaciones, extendidas a varias especies por muchos investigadores, incluyen atrofia de los testículos y del sistema genital, posteriormente a la hipofisectomía y la prevención de esos cambios por implantes de pituitaria anterior o por administración de extractos de hipófisis.

La atrofia testicular que sucede a la hipofisectomía involucra, primordialmente, a los túbulos pero no existen dudas de que las células de Leydig también resultan afectadas por la hipofisectomía.

Un análisis satisfactorio de la regulación de las células de Leydig por la hipófisis requiere de información detallada y

precisa sobre el estado de esas células en ausencia de estímulo hipofisario. Esta información debería incluir la secuencia de cambios en las células maduras posteriormente a la hipofisectomía. Además, debería incluir el estado alcanzado por estas células en animales inmaduros hipofisectomizados. Dado que se conocen pocos estudios detallados, el conocimiento de los efectos de la hipofisectomía sobre las células de Leydig es, en efecto, un mosaico de trozos de información que no reúne esos requisitos.

El cambio más frecuentemente mencionado en la célula de Leydig, después de la hipofisectomía, es la atrofia, pero el tiempo requerido y la severidad de este cambio, varía entre especies y aún entre laboratorios, para las mismas especies.

En la rata, se describe al tejido intersticial como "marcadamente atrófico" a los 15 días después de hipofisectomizar animales de 40 días de edad³⁹; sin embargo, en ratas adultas, a los 43 días posteriores a la hipofisectomía, el cambio se describe simplemente como "atrofia"⁴⁰.

La depleción en los lípidos está correlacionada con el grado de atrofia observado en las células, luego de la hipofisec

tomía. Estudios histoquímicos indican que la pequeña cantidad de colesterol de la célula de Leydig se encuentra disminuida luego de la hipofisectomía^{19, 25}.

Se presume que los cambios en las células de Leydig, serían la contrapartida morfológica de la rápida disminución en la producción androgénica por el testículo, después de la hipofisectomía.

La observación de que podía prevenirse la atrofia del sistema genital, consecuencia de la hipofisectomía, con implantes hipofisarios o extractos crudos de la pars anterior de la adenohipófisis, fue continuada con la demostración⁴¹ que la acción hipofisaria estimulante de la gónada, podía atribuirse a dos agentes, designados hormona folículo estimulante (FSH) y hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH), en reconocimiento de sus acciones más conocidas en el ovario. Casi en forma simultánea, se descubrió que la respuesta testicular al estímulo gonadotrófico es también una respuesta dual: que la actividad espermatogénica podía provocarse sin hipertrofia de las células de Leydig o producción evidente de andrógenos y, que la hipertrofia de las células de Leydig con evidente produc

ción de andrógenos, podía ser provocada con una pequeña estimulación de la espermatogénesis.

Con la separación del complejo pituitario gonadotrófico en una fracción folículo estimulante y una fracción estimulante de las células intersticiales se pudo encontrar^{1, 42} que la fracción FSH, administrada a ratas inmaduras, comenzando unos pocos días después de la hipofisectomía y a ratas inmaduras intactas, provocaba aumento testicular acoplado con aumento en la actividad mitótica intratubular y con la presencia de espermatozonias y espermatozonitos, pero que dejaba a las células de Leydig con poco citoplasma y núcleo picnótico y no aumentaba el tamaño de la glándula prostática y de las vesículas seminales. Por otra parte, la administración de ICSH (LH), resultaba en el restablecimiento, o incluso hipertrofia, de las células de Leydig y en un aumento del tamaño y actividad secretoria de las vesículas seminales y de la glándula prostática, pero sin estimular la espermatogénesis.

Probando fracciones gonadotróficas más purificadas, no se ha modificado la generalización de que la FSH estimula la espermatogénesis y que la ICSH estimula las células de Leydig,

provocando hipertrofia de estas células y la elaboración de andrógenos. Sin embargo, como veremos a continuación, la regulación de la función celular en el tejido intersticial, es bastante más complicada que esta atractiva generalización.

HORMONAS ACTUANTES SOBRE LAS CELULAS INTERSTICIALES DEL TESTICULO

La función endocrina de las células de Leydig del testículo está regulada por las acciones aguda y a largo plazo de la LH y está modulada por los efectos sinérgicos de FSH, prolactina y hormona de crecimiento. La forma en que LH actúa sobre las células de Leydig para estimular la biosíntesis androgénica y su secreción ha sido extensivamente analizada. Dado que LH ejerce acción regulatoria aguda sobre la esteroidogénesis y acción trófica para mantener la función de la célula de Leydig, es importante distinguir entre estos dos procesos cuando se analice el mecanismo por el cual las gonadotrofinas controlan la producción esteroidea. Así, algunos de los efectos de las gonadotrofinas sobre la producción androgénica se ejercen sobre el mantenimiento de los caminos enzimáticos esteroidogénicos de la célula de Leydig diferenciada, mientras que otros

se ejercen sobre procesos regulatorios más agudos que estimulan el camino esteroidogénico para producir cantidades de testosterona aumentadas.

El mecanismo por el cual la LH activa la célula de Leydig es iniciado por la unión de la hormona trófica a receptores de alta afinidad, ubicados en la superficie exterior de la membrana celular⁴³. Tales receptores exhiben especificidad de especie cruzada para LH y otras lutropinas, tales como hCG y PMSG (pregnant mare serum gonadotropin)(gonadotrofina de suero de yegua preñada), las que interactúan con los receptores para LH del testículo de rata. Esta interacción lleva al aumento de la actividad de la adenilato ciclasa y un consecuente aumento en los niveles intracelulares de AMP cíclico^{44, 45}. La unión del AMP cíclico a la subunidad regulatoria de una proteína quinasa (6, 2S) localizada en el citoplasma de la célula de Leydig es seguida por la activación de la holoenzima, con la disociación y liberación de una subunidad catalítica (2, 9S) que fosforila sustratos proteicos⁴⁶. A pesar de que las proteínas específicamente fosforiladas por la proteína quinasa aún no han sido identificadas en la célula de Leydig y en otras células

"blanco" para hormonas peptídicas, se presume que están involucradas en la regulación de la etapa temprana del camino esteroidogénico, en la región de la colesterol-esterasa y de la enzima responsable de la ruptura de la cadena lateral del colesterol. La etapa estimulada por la hormona probablemente regula el incremento de colesterol libre y su transporte dentro de la mitocondria, junto con la conversión a 20- y 22- α -hidroxicolesterol previamente a la ruptura de la cadena lateral para formar pregnenolona.

Existen evidencias de que otras hormonas, además de la LH, podrían modular estas etapas del camino biosintético esteroideo^{47, 48}. En el testículo de ratón, la prolactina promueve la acumulación de ésteres de colesterol y lleva al aumento en la producción de andrógenos testiculares en presencia de LH⁴⁹. La prolactina parece tener una importante acción permisiva y de sostén del mantenimiento del camino esteroidogénico, pero no participa en el control regulatorio agudo de la liberación androgénica. A continuación de la conversión del colesterol a pregnenolona en la mitocondria, el subsecuente metabolismo de pregnenolona a testosterona, requiere, al menos,

cinco reacciones enzimáticas que se realizan en los componentes microsomales de la célula de Leydig. Además de estas etapas enzimáticas definidas, la biosíntesis de testosterona depende de la síntesis continua de ARN y proteínas⁵⁰. El bloqueo rápido y marcado de la esteroidogénesis inducida por gonadotrofinas en el testículo, por inhibición de la síntesis proteica, indica que es esencial la síntesis continua de una proteína lábil para la activación hormonal de la producción de testosterona^{50, 51}. La inhibición por cicloheximida de la esteroidogénesis inducida por hormona, también se ha observado a nivel de la formación de pregnenolona, indicando que la necesidad de síntesis proteica permanente se observa antes de las etapas biosintéticas responsables de la producción de testosterona a partir de pregnenolona⁵².

DESARROLLO DE LOS RECEPTORES PARA GONADOTROFINAS Y RESPUESTA DE LA CELULA DE LEYDIG

La concentración de receptores para LH/hCG en el testículo, sufre marcados cambios durante el desarrollo^{53, 54} y variaciones cíclicas en la función gonadal⁵⁵. Los receptores para LH aparecen en el testículo en los estadios tempranos del

desarrollo fetal del conejo⁵⁶ y son mantenidos por las hormonas pituitarias fetales⁵⁷. En el feto de conejo, los receptores para LH pueden ser detectados en el testículo, a los 17 días de vida embrionaria y aumentan rápidamente durante los siguientes tres a cuatro días. La aparición de los receptores para LH es coincidente con la diferenciación de la célula de Leydig y con el desarrollo de las enzimas esteroideogénicas y la biosíntesis androgénica⁵⁶. En la rata, los receptores para LH y FSH aumentan marcadamente durante la maduración sexual y la mayor concentración de receptores coincide con el desarrollo máximo de las células de Leydig a los 50 a 60 días de edad⁵³. Así como otros receptores para hormonas peptídicas, los receptores para LH están sujetos a regulación positiva y negativa por hormonas peptídicas y esteroideas. En el testículo, la concentración de los receptores para LH es aumentada por FSH, prolactina y ciertos andrógenos⁵⁸⁻⁶⁰, mientras que la hormona homóloga (LH o hCG) y los estrógenos disminuyen el número de sitios receptores. El hecho de que exista una regulación negativa de los receptores para LH por la hormona homóloga, no descarta el papel positivo de la LH durante

la regulación fisiológica, como el principal aporte trófico para las células esteroidogénicas del testículo. También la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH o LHRH) tiene una influencia importante sobre la función de la célula de Leydig, a través de cambios cuantitativos y posiblemente cualitativos en la secreción de LH y FSH.

El número de receptores para FSH en el testículo de rata, aumenta progresivamente durante la maduración sexual, paralelamente con el crecimiento de las células de Sertoli y el consecuente desarrollo de los túbulos seminíferos^{53, 61}. En contraste con los receptores para LH y prolactina, los receptores para FSH no parecen estar bajo un control regulatorio agudo de la glándula pituitaria. Los receptores para prolactina están regulados por esteroides sexuales^{62, 63} y, así, indirectamente regulados por LH, de forma tal que el desarrollo y regulación de los receptores para prolactina van paralelos a los de los sitios de unión de LH. A su vez, parece que la prolactina ejerce su acción sobre la función testicular, influenciando los receptores para LH^{55, 60} y manteniendo la esteroidogénesis. Los sitios de unión para prolactina en el testículo de rata

aumentan junto con los receptores para LH durante la maduración sexual en la rata macho, alcanzando un máximo a los 70 días de edad, para declinar después⁶⁴.

INHIBICION DE LA FUNCION DE LA CELULA DE LEYDIG POR DEFICIENCIA GONADOTROFICA

El papel de los factores pituitarios en la regulación de la función endocrina de los testículos ha sido extensamente investigado en la rata^{65,66}. La remoción de la glándula pituitaria es seguida por una cesación rápida de la producción de testosterona, pérdida de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis y atrofia testicular^{2,49,67}.

A pesar que la LH es la principal hormona trófica de las células intersticiales del testículo, existe poca evidencia acerca de la regulación positiva sobre el contenido de receptores homólogos en el testículo. La hipofisectomía es seguida por un descenso en los receptores testiculares para LH y en la función de la célula de Leydig en la rata⁶⁸⁻⁷¹, dependiendo de la edad del animal⁷². Sin embargo, el tratamiento post-operatorio con LH solamente, si bien mantiene la función de la célula de Leydig, no restaura la población de receptores del testículo. En contras-

te, se ha demostrado claramente la regulación heteróloga de los receptores para LH durante la maduración o diferenciación de las células de Leydig, bajo la influencia de FSH y prolactina. Recientemente, Hauger y col.⁷³ demostraron que una reducción selectiva de las gonadotrofinas plasmáticas durante 3 a 6 días, por inmunoneutralización con suero anti-LHRH, no tiene efecto sobre los receptores testiculares para LH, indicando que otros factores pituitarios, en presencia de bajos niveles de gonadotrofina, podrían actuar para mantener la población de sitios receptores para LH. También, el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con prolactina junto con pequeñas cantidades de LH, es capaz de mantener la respuesta de la célula de Leydig junto con el receptor para LH⁶⁰.

INHIBICION DE LA FUNCION DE LA CELULA DE LEYDIG POR ESTEROIDES

Es conocido que la administración de esteroides gonadales a animales intactos y hombres normales causa reducción en la producción androgénica, efecto atribuido a la inhibición de la secreción de gonadotrofinas con efectos secundarios sobre la función testicular endocrina⁷⁴⁻⁷⁷. Mientras este mecanismo es un

factor importante en la acción de andrógenos y estrógenos sobre la secreción de testosterona, la presencia de un receptor para estradiol en las células intersticiales^{78, 79} y observaciones de que cambios en la LH plasmática no parecen estar correlacionados con una producción reducida de testosterona⁸⁰⁻⁸³ son compatibles con publicaciones previas⁸⁴⁻⁸⁶ de que los estrógenos podrían ejercer una acción inhibitoria directa sobre la función de la célula de Leydig. La producción de estrógenos, así como la de andrógenos, por el testículo ha sido demostrada en varias especies^{87, 88} y se han identificado receptores intratesticulares para cada uno de estos esteroides, i. e., receptores estrogénicos en células intersticiales y moléculas ligadoras de andrógenos en células de Sertoli^{79, 89}. Dado que los testículos producen y unen a los principales esteroides sexuales, no se puede descartar la existencia de una regulación intratesticular ultra-corta de la función testicular por estas hormonas.

Existe, claramente, la necesidad de una evaluación más extensa sobre la influencia del tratamiento con estrógenos sobre la función testicular endocrina, bajo condiciones controladas de estimulación gonadotrófica, para evitar el complicado

efecto de la inhibición de la secreción de LH durante la administración del esteroide. Un modelo experimental con un ingreso estable y definido de gonadotrofinas, se obtiene con ratas hipofisectomizadas tratadas con FSH, en las cuales se puede evaluar la acción directa de los estrógenos sobre la función de la célula de Leydig. Se ha demostrado que el tratamiento con FSH mantiene la función testicular en ratas inmaduras hipofisectomizadas y que aumenta la producción de testosterona inducida por LH después de la hipofisectomía^{59, 72, 90, 91}. En experimentos más recientes, se analizaron los efectos locales de los estrógenos sobre la unión de gonadotrofinas a receptores testiculares, la producción de AMP cíclico y la formación de testosterona, en ratas inmaduras hipofisectomizadas y tratadas con FSH.

Nueve días después de la hipofisectomía de ratas de 21 días de edad, se observó una marcada involución de los testículos, con una reducción del peso testicular de 169 ± 13 mg a 71 ± 6 mg. Como comparación, el peso testicular promedio de ratas inmaduras de 30 días de edad es de 469 ± 12 mg. El grado de atrofia testicular después de la hipofisectomía no se

ve afectado por inyección diaria de 5 ug de DES (diethyl-estilbestrol). Contrariamente, se observa un pronunciado incremento en el peso testicular de ratas hipofisectomizadas tratadas diariamente con 50 ug de FSH y, se observan posteriores incrementos durante un tratamiento conjunto con testosterona o progesterona (1 mg/día). Esto último podría ser una consecuencia del efecto directo de andrógenos sobre la función tubular y el mantenimiento de la espermatogénesis^{5,92}. El efecto de FSH sobre el peso testicular se ve disminuido por un tratamiento conjunto con DES.

Investigando la capacidad de unión de ¹²⁵I-hFSH a homogenatos de testículos, en ratas hipofisectomizadas tratadas con DES, con o sin tratamiento concomitante con FSH, se pudo observar que la administración única de DES no cambia significativamente el contenido testicular del receptor para FSH, en testículos de ratas inmaduras hipofisectomizadas. También, el tratamiento con 50 ug de FSH, diariamente, aumenta ligeramente los receptores para FSH, manteniéndose sin cambios con un tratamiento conjunto con DES. Así, aparentemente, no se pudo demostrar un efecto del tratamiento con FSH y/o estrógenos

sobre los receptores para FSH. Contrariamente, el tratamiento con testosterona o progesterona (1 mg) con o sin tratamiento conjunto con FSH, produce un pequeño pero significativo aumento en el contenido de receptores para FSH en los testículos de ratas inmaduras hipofisectomizadas.

La administración de 5 ug de DES por día, a ratas inmaduras hipofisectomizadas, disminuye el número total de receptores para LH por testículo, comparando con controles inyectados con aceite, mientras que no se observan cambios en los receptores para hCG luego de un tratamiento con testosterona y sólo un pequeño aumento cuando se las tratan con progesterona. Contrariamente, inyecciones diarias de 50 ug de FSH, causan un incremento significativo en el número total de receptores para LH por testículo^{58, 59}. Este aumento inducido por FSH es disminuido por inyecciones conjuntas de 5 y 20 ug de DES, mientras no se observan diferencias luego de administrar 1 mg de testosterona o progesterona.

El efecto de los estrógenos sobre la respuesta de la célula de Leydig fue evaluado midiendo la producción de testosterona y AMP cíclico por testículos descapsulados, incubados "in

vitro" con una concentración saturante de hCG (500 ng/ml). La producción basal de testosterona, en ausencia de hCG, fue pequeña, similar en testículos de controles y animales tratados con FSH. La administración de DES, con o sin tratamiento conjunto con FSH, disminuyó significativamente los niveles basales de la producción de testosterona. En presencia de hCG, la producción de testosterona "in vitro" por testículos de rata, fue estimulada varias veces por encima de los niveles basales y esta respuesta se vio considerablemente aumentada por el tratamiento con FSH. El tratamiento con DES, con o sin administración conjunta de FSH, disminuyó marcadamente la respuesta esteroidogénica de los testículos, a hCG, indicando un efecto inhibitorio directo de los estrógenos sobre las células de Leydig.

La producción basal de AMP cíclico por el testículo era baja en ratas controles hipofisectomizadas y mostraba un ligero descenso cuando los animales eran tratados con FSH y/o DES. En testículos incubados con hCG, la producción de AMP cíclico fue aumentada en todos los grupos. Sin embargo, el tratamiento con FSH, con o sin DES, causaba un descenso significativo

en la respuesta de AMP cíclico a hCG "in vitro". El tratamiento conjunto con DES no provocó cambios detectables en la producción de AMP cíclico por los testículos estimulados con hCG, en el grupo de animales tratados con FSH. Dado que se observaba una inhibición de la respuesta esteroidogénica a hCG en los mismos testículos, se dedujo la existencia de una disociación significativa entre la respuesta de AMP cíclico y la producción de testosterona por las células de Leydig de ratas tratadas con estrógenos.

Estas observaciones han demostrado un efecto inhibitorio directo de los estrógenos sobre las funciones de la célula de Leydig en animales hipofisectomizados.

Se han identificado receptores estrogénicos específicos en la fracción citoplasmática de las células de Leydig y se ha demostrado que se translocan a la fracción nuclear, luego de formar un complejo con la molécula de estradiol^{79,89}. La existencia de tales receptores provee un mecanismo a través del cual podría operar la acción directa del estradiol en la regulación de la función de la célula de Leydig.

Estos hallazgos son relevantes ante la posibilidad de que

los estrógenos se encuentren involucrados en la regulación intratesticular de la esteroidogénesis. Varios estudios han indicado que los estrógenos pueden ser sintetizados por las células testiculares y las observaciones de de Jong y col.⁸⁸ sugieren que esta síntesis se realiza en los túbulos seminíferos y que la acumulación se produce principalmente en el tejido intersticial.

Se ha demostrado que cultivos de células de Sertoli de rata, son capaces de aromatizar testosterona a estradiol, como un proceso dependiente de FSH⁹³. Contrariamente, se ha sugerido que las células de Leydig serían la fuente de estrógenos testiculares⁹⁴. A pesar de la incertidumbre sobre su origen dentro del testículo, está claro que los estrógenos deben tener un papel importante como reguladores intratesticulares de la función de la célula de Leydig.

La acción de los andrógenos sobre el testículo, específicamente sobre la función de los túbulos seminíferos y espermatogénesis, puede ser un importante punto de control para la regulación de la reproducción en el macho. Aunque se ha visto que los andrógenos mantienen la función tubular en ra-

tas hipofisectomizadas, tratamientos con altas dosis de testos
terona no mantienen la espermatogénesis en el hombre, pro-
bablemente debido a que no se alcanzan niveles adecuados de
testosterona en el compartimiento tubular⁹⁵. La testosterona,
probablemente, regula el proceso espermatogénico por inte-
racción con receptores androgénicos ubicados en la célula de
Sertoli⁸⁹ y también en las células germinales^{96,97}. Además,
la testosterona regula la secreción de gonadotrofinas a través
de un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la pitui-
taria, suprimiendo principalmente LH y con un efecto menos
marcado sobre la secreción de FSH.

REGULACION HORMONAL DE LOS RECEPTORES PARA GO-
NADOTROFINAS Y LA FUNCION DE LAS CELULAS DE
LEYDIG

HORMONA LUTEINIZANTE

La identificación de receptores específicos para LH/hCG
en membranas de células de Leydig⁹⁸, así como la observación
de que estas hormonas estimulaban la secreción de testosterona
en células intersticiales aisladas^{98,99}, constituyeron las evidenu

cias directas más importantes de la acción de la hormona luteinizante sobre la célula de Leydig.

La hormona luteinizante se une a receptores de membrana de células intersticiales, "in vitro", estimulando la actividad de la adenilato ciclasa, así como también la producción de testosterona¹⁰⁰.

La unión de LH radiactiva 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°C.

Existe una correlación entre la unión de 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 testosterona son alcanzados cuando sólo una pequeña fracción (menos del 1%) del total de sitios de unión están ocupados¹⁰¹. La estimulación de AMP cíclico no es detectable hasta que la producción de testosterona llega al máximo estimable^{102, 103}.

Esta observación determina algunas incógnitas acerca de la relación entre el receptor y el AMP cíclico en la acción de LH sobre las células de Leydig.

La discrepancia entre la formación de AMP cíclico y la producción esteroidea ha sido observada en células aisladas, durante la estimulación con bajas concentraciones de hormonas tróficas^{44, 104-107}. Esta disociación es marcada en el caso de las células de Leydig, donde niveles de gonadotrofina capaces de estimular la esteroidogénesis "in vitro" (0, 1-2 pM), no causan cambios detectables en la producción de AMP cíclico^{44, 104, 108}.

Por otra parte, existe demasiada evidencia indirecta que sugiere que el AMP cíclico actúa como intermediario en la respuesta esteroideogénica aguda a las hormonas peptídicas. Así, la producción de testosterona por células intersticiales o testículos intactos es estimulada por AMP cíclico y dibutiril-AMP cíclico¹⁰⁴. También se observa un aumento en la sensibilidad de la respuesta cuando las incubaciones se realizan en presencia de inhibidores de la fosfodiesterasa^{108, 109}. Estas observaciones hacen surgir la posibilidad de que la esteroidogénesis

observada en ausencia de una elevación detectable en la producción de AMP cíclico, sea activada por concentraciones de este nucleótido cíclico extremadamente pequeñas, por translocación del AMP cíclico dentro de un "pool" intracelular pequeño o por un mecanismo que involucre un recambio aumentado del nucleótido.

Para resolver esta importante cuestión acerca del papel intermediario del AMP cíclico en la respuesta esteroidogénica aguda a la estimulación con hormona trófica, se utilizó un método indirecto para la medición de los niveles del AMP cíclico producido. Este método se basa en la determinación de los sitios de unión para AMP cíclico del componente regulatorio de la proteína quinasa, libres y ocupados, ante la estimulación hormonal, "in vitro".

En esta forma, se ha podido demostrar que ocurren cambios progresivos en la producción de AMP cíclico y en su unión a la proteína quinasa, durante la estimulación gonadotrófica esteroidogénica.

Estas observaciones proveyeron evidencia directa del papel del AMP cíclico y la proteína quinasa durante la estimula-

ción hormonal de la esteroidogénesis en la célula de Leydig, con bajas concentraciones de gonadotrofina⁴⁵.

La síntesis de testosterona inducida por LH, parece depender de la síntesis concomitante de proteínas y ARN^{50, 110}. 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.

EFECTO DE LA HORMONA LUTEINIZANTE EN LA REGULACION DE SUS SITIOS RECEPTORES

Como ya se ha visto, la regulación de la esteroidogénesis y la síntesis de testosterona por las células intersticiales del testículo, depende de la secreción y acción de la hormona luteinizante de la glándula pituitaria anterior.

El principal sitio de acción, una vez activado el camino fosforilativo mediado por la proteína quinasa, se encuentra a nivel de la conversión de colesterol a pregnenolona^{111, 112}. El control de esta reacción parece ser el mecanismo predominan-

te de la regulación hormonal en todas las células esteroidogénicas, durante la estimulación por sus respectivas hormonas tróficas.

Además, se ha demostrado que muchas hormonas regulan la concentración de sus receptores específicos en la superficie de las células "blanco"¹¹³⁻¹¹⁷. Esta regulación, comúnmente, lleva a la pérdida de sitios receptores, sin cambiar las propiedades de unión de los restantes receptores. Las consecuencias de esta pérdida de receptores, inducida por hormonas, sobre la función de la célula "blanco", no ha sido examinada en detalle, aunque varios trabajos han establecido que la "desensibilización" de la adenilato ciclasa al estímulo hormonal está relacionada con la reducción en el número de receptores específicos^{114, 116}.

Se ha demostrado que el efecto desensibilizante de la gonadotropina sobre la adenilato ciclasa ovárica, resulta de la pérdida de receptores para LH¹¹⁸ y que, la regulación negativa de los receptores testiculares para LH por la gonadotropina está acompañada de una respuesta disminuida, medida por la estimulación "in vitro" de la producción de AMP cíclico y tes-

tosterona por testículos descapsulados¹¹⁸⁻¹²³.

La naturaleza y la extensión de estos cambios en los receptores y la respuesta hormonal, después de la administración exógena de gonadotrofina, están relacionadas con las dosis de hCG administradas y varían con el tiempo de inyección.

Por ejemplo, dosis de hCG de 10 UI no causa cambios en el contenido de receptores en las primeras 24 horas, pero, luego de 48 horas, se puede observar una marcada disminución en la unión de hCG, que se mantiene a bajos niveles durante varios días. La ocupación de una pequeña proporción de los receptores testiculares por hCG, se acompaña de una marcada disminución en la respuesta de AMP cíclico durante las primeras 12 horas posteriores a la inyección de hormona, en ausencia de cambios detectables en la formación basal de AMP cíclico. Sin embargo, la producción de testosterona "in vitro" muestra un cambio inverso, con una elevación en la producción basal y sin cambio en la respuesta máxima a hCG. Estas observaciones indican que la ocupación de un pequeño número de receptores, causa inicialmente una marcada desensibilización en la respuesta de AMP cíclico y, subsecuentemente lleva a la pér

dida de 2/3 de los sitios receptores. A través de estos cambios, que no alcanzan al estado de completa abolición de sitios receptores y respuesta de AMP cíclico, la respuesta máxima de testosterona a hCG, "in vitro", permanece inalterada. Los cambios más prolongados luego de la administración de hCG, indican que el retorno gradual de los sitios receptores se acompaña de la recuperación de la respuesta de AMP cíclico "in vitro", presumiblemente reflejando el retorno de la actividad de la adenilato ciclasa que responde a hormona. Durante este tiempo, la respuesta de testosterona a hCG es normal, indicando la presencia de receptores en exceso en relación con la esteroidogénesis^{104, 108}. Así, la pérdida de 2/3 de los sitios receptores no daña la capacidad de las células intersticiales de producir testosterona cuando son expuestas a concentraciones saturantes de gonadotrofina.

Luego de la inyección de dosis mayores de hCG (200 UI), la pérdida de la capacidad de unión de hCG ocurre más rápidamente. Esta pérdida de receptores persiste hasta el quinto día y es seguida por el retorno a los 2/3 del nivel normal, al séptimo día. Así como se nota con la dosis menor de hCG, la res-

puesta de AMP cíclico a gonadotrofina, "in vitro", decrece rápidamente. Sin embargo, la dosis mayor de hCG también produce un aumento transitorio en la producción basal de AMP cíclico "in vitro", que se completa dentro de las 12 horas y se continúa con una prolongada pérdida de respuesta hormonal, hasta 6 días. Los cambios correspondientes en la producción de testosterona "in vitro", son similares a los observados en la producción de AMP cíclico. Sin embargo, la respuesta esteroidea retorna a niveles normales entre los 3 y 5 días posteriores a la inyección de hCG, cuando el contenido en receptores para LH y la respuesta de AMP cíclico muestran un mínimo grado de recuperación.

La correlación entre el contenido de receptores para LH y la respuesta de AMP cíclico a hCG durante la desensibilización inducida por gonadotrofina, está de acuerdo con la propuesta de que la mayoría de los sitios receptores, en el testículo de rata, están acoplados funcionalmente con el proceso de generación de AMP cíclico^{104, 108}.

La medición simultánea de la hCG unida a tejido y de los sitios de unión para hCG disponibles (es decir no ocupados), per

mite la cuantificación del contenido total de sitios receptores para LH/hCG del testículo. La ocupación de un pequeño número de sitios receptores, varias horas después de la administración de 10 ó 200 UI de hCG es acompañada por un aumento inicial en el total de sitios receptores. Esto sugiere que la unión de hCG induce un cambio en la conformación de la membrana que lleva al desenmascaramiento de receptores de superficie con el consiguiente aumento en el contenido total de sitios receptores. Luego del aumento inicial, se observa una prolongada y marcada pérdida de receptores para cada dosis de hormona.

La pérdida de receptores para LH es menos marcada en preparaciones extraídas con detergentes¹²⁴ que en la fracción particulada, enriquecida en membranas. Esta diferencia en sitios disponibles sugiere la posibilidad de que una proporción de la población de receptores que desaparecen, sea enmascarada u ocluida dentro de la membrana, siendo liberada para la interacción con la hormona cuando se solubiliza la membrana con un detergente no iónico. Aparentemente, la ocupación inicial de sitios receptores a nivel de membrana es se-

guida por la internalización de los complejos (y receptores libres adyacentes) por endocitosis y subsecuente degradación, luego de su asociación con lisosomas. Tales cambios podrían ser similares, en secuencia y también, probablemente, en mecanismo, al proceso de pinocitosis por el cual, solutos unidos a sitios de reconocimiento en membrana, son internalizados con la vesícula pinocítica¹²⁵. Así, recientes estudios han sugerido que una proporción de la LH unida a las células de Leydig, sería internalizada y degradada por lisosomas¹²⁶, y cambios similares se han observado en tejido ovárico, donde la hormona trófica era localizada, por autorradiografía, en la membrana plasmática y en cuerpos densos citoplasmáticos tales como lisosomas¹²⁷.

Dado que las células de Leydig poseen abundancia de receptores en exceso, las reducciones en los receptores deberían causar un corrimiento hacia la derecha en la curva dosis-respuesta, con una ED₅₀ mayor para hCG, reflejando una disminución en la sensibilidad a la hormona trófica. Sin embargo, dado que nunca se lograron los niveles máximos de producción de testosterona con dosis estimuladoras elevadas de hormona gonadotrófica,

se puede pensar: que el AMP cíclico producido no está disponible para las respuestas estimuladoras siguientes; que ha tenido lugar una disminución marcada de la proteína fosfoquinasa o que ha ocurrido una lesión distante en una o más de las enzimas que regulan el camino esteroideogénico.

La estimulación de las células de Leydig desensibilizadas, con colerágeno, desarrolla respuestas de AMP cíclico que son comparables con las de los grupos controles, pero, a pesar de tales aumentos en AMP cíclico, la producción de testosterona permanece marcadamente reducida. Tampoco se sobrepasa la lesión por estimulación con dibutiril-AMP cíclico, utilizando concentraciones que estimulan la esteroideogénesis en células de Leydig normales. Dado que los estudios de unión de AMP cíclico no demuestran pérdida de unión a la fosfoquinasa dependiente de este nucleótido en las células de animales desensibilizados, no parece que el AMP cíclico ni la proteína quinasa sean los factores limitantes en la respuesta esteroideogénica dañada. Además, el hallazgo de que la estimulación hormonal "in vitro" produce un aumento significativo en la síntesis de pregnenolona, indica la adecuada actividad de la enzima encargada de la ruptura de

la cadena lateral del colesterol. Estos resultados han demostrado que la segunda lesión en el camino esteroidogénico, inducida por la gonadotrofina, se encuentra después de la enzima que rompe la cadena lateral del colesterol en aquellas células con un moderado grado de depleción de receptores. Contrariamente, en el grupo de animales en los que la concentración de receptores unidos a membrana se redujo a un 6%, la respuesta de pregnenolona, "in vitro", fue completamente abolida. Esto indica que, una pérdida más extensa de receptores resulta en la pérdida de los procesos necesarios para mantener las enzimas esteroidogénicas, incluyendo la enzima responsable de la ruptura de la cadena lateral del colesterol.

Estudios posteriores evidenciaron que este defecto estaba caracterizado por una acumulación de intermediarios 17- α -hidroxilados, hallazgo concordante con una lesión a nivel de la 17,20-desmolasa, enzima responsable de la conversión de precursores 17-hidroxilados a androstenediona y dehidroepiandrosterona. La causa de la marcada disminución en la actividad de la 17,20-desmolasa, en las células de Leydig desensibilizadas por gonadotrofina, no ha sido elucidada aún, pero existen, al

menos, dos mecanismos que podrían ser responsables de la lesión enzimática observada.

Primero, estudios previos indican que la administración de estrógenos posee un efecto inhibitorio directo sobre la esteroidogénesis testicular¹²⁸ y es conocido que la estimulación gonadotrófica aumenta la producción de estrógenos en el testículo¹²⁹. Así, es posible que la estimulación local de la producción de estrógenos en el testículo, por la dosis desensibilizante de hCG, cause el bloqueo de la esteroidogénesis, como un fenómeno paralelo a la pérdida de receptores para LH. El efecto de los estrógenos sobre la síntesis androgénica incluye la supresión de la actividad 17-hidroxilasa y 17,20-desmolasa¹³⁰. Un defecto similar relacionado con la esteroidogénesis podría surgir de la formación de 17- α -hidroxi-20- α -dihidroprogesterona, que se encontró aumentada en testículos de machos tratados con estrógenos^{131, 132}, dado que se ha demostrado que este esteroide inhibe la actividad de la 17,20-desmolasa, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis androgénica¹³³. Además de los bien conocidos efectos de los estrógenos sobre la esteroidogénesis testicular,

debe considerarse también la posibilidad de que los andrógenos y otros esteroides intermediarios, influyeran directamente la biosíntesis esteroidea durante la respuesta aguda de testosterona, inducida por la dosis desensibilizante de gonadotrofina.

Segundo, el efecto general de remoción o reducción súbita del aporte de hormona trófica para las células de Leydig diferenciadas, podría ser un factor adicional en la aparición de defectos biosintéticos en las células desensibilizadas. Esto podría resultar del ingreso disminuido de hormona trófica, como consecuencia de la población reducida de receptores en las células desensibilizadas. Aunque solamente se necesita que una pequeña proporción de los receptores estén ocupados para producir la respuesta esteroideogénica máxima¹⁰⁸, un descenso marcado en los receptores podría causar una disminución correspondiente en la capacidad de los bajos niveles de gonadotrofina plasmática, para mantener los caminos esteroideogénicos característicos de las células de Leydig. Este proceso podría exacerbarse si, a la administración de una dosis desensibilizante de gonadotrofina exógena, le siguiera una caída secundaria en la secreción de

la gonadotropina endógena. Esta caída podría resultar, indirectamente, de la retroalimentación negativa a nivel hipotalámico por el aumento transitorio en los niveles androgénicos plasmáticos producidos por la dosis desensibilizante de hormona, "in vivo" y, posiblemente, por una acción negativa ultra-corta de la gonadotropina exógena para disminuir la secreción pituitaria de LH¹³⁴.

Estos estudios han demostrado que las respuestas de células efectoras, luego de la pérdida de receptores inducida por hormona, atraviesan una serie de cambios que resultan en un proceso conocido como "desensibilización". El primer cambio, es la pérdida de respuesta de adenilato ciclasa a la hormona, con la consecuente disminución en los niveles de AMP cíclico intracelulares. La desensibilización inicial de la adenilato ciclasa, es una consecuencia inmediata de la ocupación de los receptores y ocurre mucho antes que la verdadera pérdida de receptores. Este proceso ha sido descrito previamente en células luteales del ovario¹³⁵ y en las células de Leydig del testículo¹²⁰, así como en otros tejidos^{113, 114}. Las últimas consecuencias de la ocupación de los receptores incluyen la pérdida

de los mismos y el daño relacionado con la producción de AMP cíclico y las respuestas distales de la célula efectora. Se pueden distinguir dos componentes de este efecto retardado y que, probablemente, operan en diferente extensión para diferentes células efectoras. El primero y más obvio es la pérdida en la capacidad de la adenilato ciclasa de activarse y producir AMP cíclico, proporcionalmente a la pérdida de sitios receptores que median la señal hormonal. Este cambio, probablemente, ocurre en todas las células efectoras con receptores disminuidos y, en ausencia de otros cambios en la función celular, resultaría principalmente en una relativa pérdida de sensibilidad en la respuesta a la hormona homóloga. Sin embargo, ocurre un segundo efecto de la depleción de los receptores en ciertas células efectoras, tales como las del testículo y ovario. En estos tejidos, ocurren cambios adicionales en puntos más distantes en el camino metabólico celular y modifican la capacidad de las células para responder al estímulo hormonal. Tal cambio es el defecto en la esteroidogénesis ya mencionado y que resulta en una pérdida o disminución de la respuesta esteroidogénica máxima, a concentraciones saturantes de hormona. Este defecto, proba-

blemente, sería característico de células efectoras para hormonas tróficas, peptídicas y proteicas, que regulan tanto el estado de diferenciación, así como la respuesta aguda de la célula efectora. Mediante este razonamiento, la pérdida de esteroidogénesis en las células de Leydig, con niveles bajos de receptores, representaría el resultado de la acción trófica dañada de la LH "in vivo", durante las fases iniciales de la desensibilización y pérdida de receptores. Estos hallazgos demuestran que los resultados de la regulación de los receptores sobre la función de las células efectoras son complejos y que, cambios relacionados temporalmente con las respuestas inmediatas o distales, mediadas por los receptores, contribuyen al proceso total de la desensibilización celular.

CONSECUENCIAS CLINICAS Y FISIOLOGICAS DE LA DESENSIBILIZACION INDUCIDA POR GONADOTROFINA

En la rata macho, están presentes niveles relativamente bajos de LH circulante y las células intersticiales, probablemente, están raramente expuestas a las concentraciones de hormona usadas para inducir pérdida de receptor en los estudios descritos anteriormente. Sin embargo, en ciertas pato-

logías y estados fisiológicos, la desensibilización por gonadotrofina circulante es importante. Por ejemplo, hombres con coriocarcinoma, a veces exhiben niveles plasmáticos de hCG extremadamente altos, sin un correspondiente aumento en la secreción de testosterona¹³⁶. Esta pérdida de respuesta testicular a niveles elevados de gonadotrofinas podrían deberse a una regulación negativa de los receptores para LH o hCG de las células intersticiales¹¹³, aunque la secreción disminuida de FSH en estos pacientes probablemente juegue un papel importante en sus respuestas esteroidogénicas dañadas.

En el ovario, se ha observado la desensibilización de la adenilato ciclasa en folículos de Graaf y cuerpo lúteo, luego de la elevación endógena de gonadotrofina, durante el ciclo estral y preñez en ratas y conejos, así como luego de la inyección de hCG¹³⁷⁻¹⁴⁰. También se ha propuesto que la administración de un potente agonista del LHRH resultaría en una inhibición de la función ovárica¹⁴¹, ovulación¹⁴², así como también en tumores mamarios dependientes de hormonas¹⁴³, en ratas, como consecuencia de la regulación negativa de los receptores ováricos para LH y la respuesta gonadal, por concentraciones elevadas de

LH endógena¹²⁰. Tales efectos han sido demostrados en testículos de ratas, tratadas con un agonista del LHRH, que causa una marcada reducción en los receptores testiculares para LH y en la producción de testosterona^{144, 145}.

Estos resultados tienen, obviamente, importancia en el uso terapéutico del LHRH, para estimular la función gonadal, así como en el análisis de los mecanismos fisiológicos responsables de la regulación e integración de la función hipófiso-gonadal.

INSULINA

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

GENERALIDADES SOBRE LA DIABETES Y LA FUNCION TESTICULAR

TICULAR

ALTERACIONES REPRODUCTIVAS

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

En la diabetes, la homeostasis de la glucosa sanguínea está permanentemente alterada. En los 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^{146, 147}. El tratamiento con insulina y otros recursos terapéuticos sólo los corrige parcialmente. En lo que respecta a sus mecanismos de producción, son mal conocidos.

Se han descrito lesiones testiculares^{148, 151} tales como: atrofia, desaparición de la línea germinal, engrosamiento de la membrana basal de los túbulos¹⁵² y esclerosis del vaso deferente¹⁵².

En la orina baja el contenido de 17-ceto-esteroides^{150, 151, 153-156} y el de andrógenos¹⁵⁴. El nivel de testosterona es normal según algunos autores^{157, 158} y disminuido según otros¹⁵⁹.

En los animales de experimentación también se observan alteraciones en la esfera sexual. En la rata macho con dia.

betes aloxánica¹⁵⁶ se ha descrito atrofia testicular, con desaparición de la línea germinal de los túbulos, en los que quedan solamente las células de Sertoli. Se interpretan estos hechos por la posible disminución de la síntesis y/o secreción de la hormona folículo estimulante. La insulina es capaz de reparar parcialmente estos trastornos^{148, 149, 155, 156, 160-162}. La inyección de aloxano en la rata, antes de la pubertad, retarda su maduración^{162, 163}.

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

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 basal¹⁶⁴.

El grado de lesión varía desde la desorganización del epitelio germinal, con detención de la espermatogénesis, hasta la ausencia total de ese epitelio con persistencia ocasional de células

de Leydig colapsadas.

Sobre la base de determinaciones histométricas en tejido testicular de ratas diabéticas por aloxano, Schoffling y col. 165 definen los cambios en el testículo como un retardo general del proceso espermatogénico, con interrupción parcial de la espermatogénesis entre espermatocitos y espermátidas, con descamación de la membrana basal e integridad del tejido intersticial.

BIOSINTESIS DE TESTOSTERONA POR EL TESTICULO

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 fuera 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, está apoyada por la existencia de lesiones en el hipotálamo, similares a las observadas luego de la castración. Esto involucraría una falla en los mecanismos receptores y/o amplificadores de gonadotrofinas.

Una tercera posibilidad sería la resultante de combinar las dos anteriores, es decir que las alteraciones debidas al estado diabético se produzcan tanto en el eje hipotálamo-hipofisario como en el testículo.

Los resultados experimentales¹⁶⁶ demuestran claramente una disminución de la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig en animales diabéticos por estreptozotocina, evidenciada por los bajos niveles de testosterona circulante y en el contenido endógeno testicular de testosterona disminuido.

El tratamiento sustitutivo con insulina produce en los animales diabéticos una recuperación parcial de los niveles de testosterona plasmática.

Asimismo se ha demostrado que la producción de testosterona, en respuesta a la acción de gonadotrofina exógena, es diferente en testículo de animales normales y diabéticos. Cuando se incuban testículos de estas ratas con distintas concentraciones de gonadotrofina exógena, la respuesta, medida como producción de testosterona, es menor que en los controles. Así, en los diabéticos es necesario duplicar la concentración de hormona para obtener una respuesta semejante a las normales. Cuando a estos

animales se los trata con insulina, se observa una recuperación de la respuesta testicular, aunque ésta no alcanza los valores normales.

Como ya se ha mencionado en el punto correspondiente a la hormona luteinizante, el mecanismo de acción de la LH se inicia con la unión de la hormona a su receptor específico de membrana.

Los estudios de receptores realizados con células intersticiales aisladas de ratas diabéticas y normales, mostraron que, mientras no se observaban cambios en la constante de asociación, se había producido una reducción en el número de sitios de unión para LH. En una diabetes inducida por estreptozotocina, 30 días después de su establecimiento, esta disminución alcanzaba al 30%.

La administración de insulina a ratas diabéticas restaura la unión de hCG.

No se encontraron modificaciones en los perfiles de sedimentación de los receptores para LH/hCG, solubilizados de partículas de células de Leydig de ratas diabéticas. Las estructuras características de complejos hormona-receptor con coefi-

cientes de sedimentación de 7, 5S y 8, 8S¹⁶⁷ fueron observadas en partículas solubilizadas de células de Leydig de animales diabéticos, idénticos a los correspondientes a los animales controles.

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

Las concentraciones séricas radioinmunológicas de LH en los animales diabéticos, permanecen inalteradas. Por lo tanto, los efectos presentados no serían una consecuencia directa de variaciones en la secreción de estas hormonas, como se postula para los niveles séricos de prolactina y los receptores para LH¹⁶⁸.

Desde que se ha sugerido¹⁶⁷ 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 cambios en la porción glicoproteica del receptor, produciendo su inactivación o la disminución de su síntesis.

La reducción en los niveles de receptores para LH en los animales diabéticos, provocaría la disminución de la secreción de andrógenos por los testículos, como se confirma por los bajos niveles de andrógenos circulantes.

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 de que la diabetes provoca una reducción de la sensibilidad ovárica a la gonadotropina ^{169, 170}.

PROLACTINA

Se ha observado un efecto sinérgico de prolactina y hormona de crecimiento sobre la acción de FSH en la respuesta testicular a LH, utilizando animales hipofisectomizados ⁵⁸. También se sabe que la prolactina aumenta los efectos de la LH sobre la espermatogénesis y sobre la síntesis y secreción de testosterona ¹⁷¹. En ratones enanos, deficientes en prolactina, el tratamiento con esta hormona estimula la actividad de varias de las enzimas involucradas en la síntesis de testosterona. Recientemente se ha demostrado la existencia de receptores para prolactina en las células intersticiales del testículo

de rata^{172, 173}. También se ha demostrado que la prolactina aumenta los receptores para LH en el ratón enano¹⁷⁴ y en el testículo en regresión de los hamsters privados de luz⁵⁵. Estos reportes indican claramente que la prolactina tiene efectos importantes sobre la función testicular, via interacción con receptores específicos en las células intersticiales y que, una de las funciones de la prolactina, es la inducción de los receptores para LH. Recientemente, se ha encontrado que tratamientos combinados con LH y prolactina mantienen la población de los receptores para LH y la respuesta hormonal en los testículos de ratas hipofisectomizadas⁶⁰.

En el hombre, varios estudios clínicos han indicado que la prolactina posee una función en el control de la testosterona y de la función reproductiva¹⁷⁵ y que, una secreción de prolactina excesiva está asociada con una función testicular dañada. Consecuencias frecuentes de la hiperprolactinemia en el hombre son la impotencia y la pérdida de la libido¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. También se ha demostrado que la bromocriptina es útil en el tratamiento de la impotencia por hiperprolactinemia^{177, 180}. En hombres normales, tratados durante 4 días con un antagonista dopaminérgi-

co (Sulpiride) para elevar los niveles plasmáticos de prolactina, la respuesta en testosterona plasmática a la estimulación con hCG era normal, pero estaba acompañada por una disminución en la concentración de dihidrotestosterona. Resultados similares se observaron en un paciente con hiperprolactinemia. Estos resultados sugieren que la conversión de testosterona a dihidrotestosterona por la 5- α -reductasa en los tejidos periféricos está reducida durante la hiperprolactinemia¹⁸¹.

El perfil plasmático de la testosterona en el hombre, exhibe un ritmo circadiano con niveles aumentados durante el sueño, cambios que se correlacionan perfectamente con la prolactina plasmática, con niveles máximos una o dos horas antes de despertar. Contrariamente, las concentraciones plasmáticas de LH y FSH poseen poco ritmo circadiano y no parecen estar relacionadas con los cambios episódicos en la testosterona plasmática. Estos perfiles plasmáticos hormonales sugieren que la prolactina podría ejercer una acción regulatoria sobre la función de la célula de Leydig en el hombre adulto. El tratamiento con un antagonista dopaminérgico (Haloperidol), causa un aumento en los niveles plasmáticos de prolactina, pero no tiene efecto sobre LH y

FSH. El correspondiente incremento en la testosterona plasmática, luego del tratamiento con Haloperidol, apoya la opinión de que la prolactina influencia la secreción de testosterona por el testículo y podría contribuir al aumento nocturno de los niveles de testosterona¹⁷⁵.

El tratamiento de ratas intactas con inhibidores de la liberación de prolactina, pueden reducir los niveles periféricos de testosterona¹⁷¹. Contrariamente, trasplantes de tumores productores de prolactina a ratas machos, llevan a atrofia testicular¹⁸². Sin embargo, en otros experimentos que examinan el efecto de injertos pituitarios múltiples debajo de la cápsula renal en ratones, la presencia de niveles incrementados de prolactina por cinco meses, no estaba acompañada de cambios en los niveles plasmáticos de LH o en el peso testicular¹⁷¹.

PROLACTINA SERICA Y DESARROLLO SEXUAL DE LA RATA MACHO

Los niveles séricos de prolactina, FSH y LH poseen diferentes características secretorias durante el desarrollo sexual de la rata macho. A los 15 y 20 días de edad, los niveles séricos de prolactina y LH son muy bajos, mientras que los niveles

de FSH son comparables a los valores de ratas adultas. A los 25 días de edad, se observa un aumento en los niveles de prolactina y FSH, mientras que no se detectan cambios en los niveles de LH. Los niveles de prolactina no sufren modificaciones entre los 25 y 50 días de edad. A los 60 días se observa un pequeño aumento, detectándose un tercer incremento hasta llegar a niveles adultos a los 70 días de edad. Los niveles de LH muestran poca variación durante el desarrollo; sus valores aumentan gradualmente hasta alcanzar los niveles adultos a los 70 días de edad.

Si los valores hormonales séricos y el crecimiento de los órganos están correlacionados, puede observarse que el incremento inicial en el crecimiento testicular es precedido por un incremento en los niveles séricos de prolactina y FSH, a los 25 días de edad. Estos datos están de acuerdo con la hipótesis de que el desarrollo testicular está relacionado con cambios previos en los niveles plasmáticos de FSH y, al mismo tiempo, sugieren que la prolactina podría, de alguna manera, estar involucrada en esta respuesta. Se ha demostrado¹⁸³ que los transplantes de pituitaria a ratas inmaduras hipofisectomizadas, inducen

un aumento significativo en el crecimiento testicular. Dado que no se detecta FSH ni LH en la circulación de las ratas con injertos, se asume que la prolactina es la responsable del crecimiento testicular, probablemente por activación de mecanismos esteroideogénicos que conducen a la biosíntesis androgénica.

La velocidad de crecimiento de las glándulas sexuales accesorias es mayor después de los 35 días de edad, siendo máxima entre los 50 y 60 días. En este momento, los niveles séricos de prolactina se encuentran en aumento, los niveles de FSH están disminuyendo y los de LH permanecen inalterados. Así, es posible suponer, basándose en estos datos, que la prolactina actuaría en forma sinérgica con los andrógenos testiculares o directamente a nivel tisular, para promover el crecimiento de las glándulas sexuales accesorias. Se ha demostrado que injertos de pituitaria anterior debajo de la cápsula renal, producen aumento significativo del peso de los órganos accesorios en animales intactos, castrados, castrados y adrenalectomizados o hipofisectomizados. Esto indica que la prolactina podría, en ciertas circunstancias, promover el crecimiento de los

órganos sexuales accesorios aún en ausencia de andrógenos, sin excluir la posibilidad de una acción directa de la prolactina sobre la síntesis de testosterona por el testículo, teniendo luego un efecto sinérgico con los andrógenos sobre el crecimiento de la próstata y vesículas seminales. Un estudio de Hafiez y col.¹⁸⁴ muestra que el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con una combinación de prolactina y LH, aumenta la testosterona desde niveles no detectables hasta valores por encima de los correspondientes a los adultos normales, indicando que la prolactina actuaría sinérgicamente con la LH para estimular la esteroidogénesis testicular.

EFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA PRODUCCION DE TESTOSTERONA

Se ha descrito que el tratamiento con prolactina estimula la espermatogénesis en ratas hipofisectomizadas, tratadas con LH⁶⁵ y en ratones hereditariamente enanos^{185, 186}. En ratones adultos hipofisectomizados, se demostró que la prolactina potencia la acción de la LH sobre la restauración de la espermatogénesis¹⁸⁷, pero no así el propionato de testosterona. Así, se propuso que la acción de la prolactina sobre la espermatogénesis

se debía a una potenciación del efecto de la LH, endógena o exógena, sobre la esteroidogénesis testicular en lugar de un efecto potenciador de la acción androgénica sobre el epitelio seminífero¹⁸⁷. Apoyando esta sugerencia, los niveles plasmáticos de testosterona en ratas adultas hipofisectomizadas son significativamente mayores después de un tratamiento conjunto con LH más prolactina que con LH solamente¹⁸⁴. Más aún, los testículos de estos animales tratados con la mezcla de LH y prolactina incorporan más acetato en testosterona, "in vitro", que los de los animales tratados solamente con LH¹⁸⁸. La administración de esta hormona, prolactina, a ratones hereditariamente enanos, causa un aumento significativo de la capacidad de sus testículos para producir testosterona en respuesta a hCG, "in vitro"¹⁸⁹. La importancia fisiológica de la prolactina en la regulación de la función de la célula de Leydig puede deducirse a partir de los siguientes datos. Primero, en ratones enanos, la deficiencia congénita de prolactina^{190, 191} está asociada con esterilidad, la que puede ser revertida por tratamiento con prolactina¹⁹². Segundo, el tratamiento de ratones y ratas machos normales con inhibidores de

la liberación pituitaria de prolactina, reduce los niveles plasmáticos de testosterona¹⁹³, aunque este efecto no se observó siempre¹⁹⁴. Tercero, en hombres normales, las elevaciones de la testosterona plasmática, se correlacionan con las elevaciones de la prolactina sérica¹⁹⁵ y, además, aumentando los niveles periféricos de prolactina por administración de haloperidol o sulpiride, se previenen los descensos diurnos normales de la testosterona plasmática y se aumenta la respuesta testicular a hCG^{175, 196}.

Trabajos recientes acerca de los efectos de la prolactina en la función testicular del hamster, indican que la prolactina puede tener un papel importante en la regulación de los ciclos estacionales de regresión recrudescencia testicular en estas especies. En el hamster dorado (Sirio), el pasaje de los machos de un fotoperíodo largo (más de 12,5 horas de luz/24 horas) a un fotoperíodo corto (menos de 12,5 horas de luz/24 horas) produce regresión de los testículos^{197, 198}. Dos o tres meses de exposición a un fotoperíodo corto produce una reducción significativa en el peso testicular y de las vesículas seminales, una declinación significativa en los niveles plasmáticos de testostero-

na, cambios histológicos en los testículos que se asemejan a las consecuencias de una hipofisectomía y pérdida completa de la libido y de la fertilidad^{55, 199}.

Se ha demostrado que los niveles de LH y FSH también disminuyen luego de la transferencia de los animales a un fotoperíodo corto^{200, 201} pero esta respuesta a una cantidad reducida de luz no se observa siempre²⁰². Más aún, no parece probable que los niveles reducidos de LH y/o FSH sean responsables de la atrofia testicular, dado que la administración de LH, FSH, una mezcla de LH y FSH o LHRH a un hamster con testículos en regresión, no producen aumento del peso del sistema reproductivo masculina o en los niveles plasmáticos de testosterona^{55, 199}. En contraste, los niveles plasmáticos y pituitarios de prolactina se ven significativamente disminuidos por un fotoperíodo corto^{202, 203} y la administración de prolactina a animales con testículos en regresión produce una estimulación significativa del crecimiento testicular y su función¹⁹⁹. En recientes experimentos, se ha demostrado que un tratamiento prolongado con prolactina, por medio de un trasplante ectópico de una hipófisis de otro animal, puede revertir com

pletamente la atrofia testicular, inducida por un fotoperíodo corto. Tampoco se produce atrofia cuando se previene el descenso de los niveles periféricos de prolactina mediante un trasplante hipofisario bajo la cápsula renal del macho, antes de cambiar el régimen de luz (14 luz:10 oscuridad a 5 luz:19 oscuridad).

Así, parece que la inducción de la regresión testicular por un fotoperíodo corto está asociada con un descenso en los niveles periféricos de prolactina, manteniéndose el testículo refractario a la gonadotrofina exógena o endógena. Debe indicarse, sin embargo, que este período refractario de los testículos a la gonadotrofina, cuando la liberación de prolactina está reducida, es relativo. La administración de dosis masivas de hCG o PMSG pueden estimular el crecimiento testicular y aumentar los niveles plasmáticos de testosterona en tales animales. La administración de prolactina puede prevenir o revertir los efectos de la exposición de hamsters machos a un fotoperíodo corto.

El papel de la prolactina en la regulación de la regresión y recrudescencia de los testículos de los criadores estaciona-

les, probablemente no esté limitada al hamster. Estudios en cabras y carneros, indican que la elevación de la prolactina periférica en el verano coincide con el aumento en la testosterona plasmática que precede el establecimiento de la estación de cría^{204, 205}.

Parece razonable suponer que los efectos de prolactina sobre la función de los testículos refleje una acción directa de esta hormona sobre la célula de Leydig. Se han encontrado sitios receptores específicos para prolactina en tejido intersticial aislado²⁰⁶. El mecanismo de la estimulación esteroidogénica testicular por prolactina, probablemente involucre varios efectos de esta hormona sobre la célula de Leydig, cada uno contribuyendo a aumentar su capacidad de responder a la estimulación con LH. La deficiencia congénita de prolactina en los ratones hereditariamente enanos está asociada con una capacidad disminuida de los testículos para unir LH¹⁷⁴ y una reducción de los niveles periféricos de prolactina en los hamsters, por exposición a un fotoperíodo corto, se acompaña de un descenso en el número de receptores testiculares para LH⁵⁵. Además, el tratamiento de ratas inmaduras con bromoergocriptina,

un inhibidor de la liberación de prolactina, reduce la capacidad de unión de LH de sus testículos¹⁶⁸.

Otro mecanismo de acción de la prolactina sobre los testículos se sugiere a partir de la observación de que el tratamiento de ratones normales y hereditariamente enanos, con prolactina, aumenta la concentración de colesterol esterificado en sus testículos^{207, 208}. Las reservas gonadales de ésteres de colesterol proveen precursores para la esteroidogénesis^{208, 209} y, consecuentemente, el efecto de la prolactina sobre ellos puede explicar la capacidad de los testículos para producir testosterona en respuesta a LH. La facultad de la prolactina para aumentar la reserva de colesterol esterificado y la respuesta esteroidogénica a LH fue previamente demostrada en el ovario de coneja²¹⁰. Un mecanismo adicional, por el cual la prolactina podría aumentar la capacidad de los testículos para producir testosterona, es sugerido por la observación que el tratamiento de ratones enanos con prolactina aumenta la actividad de la 3- β y 17- β -hidroxi-esteroide deshidrogenasas en sus testículos^{212, 213}.

Además de la presunta acción directa de la prolactina so

bre la célula de Leydig, también podría afectar la esteroidogé
nesis testicular indirectamente. Se conoce que el tratamiento
de ratas hembras inmaduras con prolactina, aumenta los nivel
es periféricos de FSH²¹³, así como también en el ratón here-
ditariamente enano¹⁸⁹.

Los efectos de la prolactina sobre el testículo deben ser
particularmente importantes durante la maduración sexual. En
la rata inmadura, los niveles plasmáticos de prolactina aumen-
tan entre los 30 y los 55 días de edad¹⁹³, paralelamente con el
aumento en los niveles endógenos de testosterona²¹⁴, en el nú-
mero de receptores testiculares para LH^{215,216} y en la capaci-
dad de los testículos para responder a LH produciendo testoste-
rona^{217,218}. La capacidad de la prolactina de aumentar la res-
puesta testicular a LH fue demostrada en ratas hipofisectomiza-
das²¹⁹. En ratones hereditariamente enanos, deficientes en pro-
lactina, el tratamiento con esta hormona produce crecimiento
de los testículos, aumento en la supervivencia de las células ger-
minales en desarrollo¹⁸⁶ y establecimiento de la fertilidad¹⁹².

Un nuevo e importante aspecto del estudio de los efectos pi-
tuitarios sobre el testículo concierne a la observación de que ni-

veles muy altos de prolactina pueden inhibir la función testicular. En el hombre, la hiperprolactinemia (usualmente producto de microadenomas adenohipofisarios, productores de prolactina) puede ser asociada con hipogonadismo e impotencia²²⁰⁻²²³. En ratas, el transplante de tumores productores de prolactina induce atrofia testicular¹⁸². Los niveles aproximadamente normales de LH y FSH en pacientes con hiperprolactinemia e hipogonadismo^{220, 222-224} sugieren un profundo desarreglo en el sistema de retroalimentación hipófisis-gónada, en el que la pituitaria responde deficientemente a la reducción de los niveles de esteroides gonadales. La inducción de hiperprolactinemia crónica en ratas machos por injertos múltiples ectópicos de hipófisis, no induce atrofia testicular o caída en los niveles plasmáticos de testosterona pero reduce las concentraciones periféricas de LH y FSH¹⁹⁹. Además, se ha observado recientemente que la producción de testosterona por testículos de ratón, estimulados "in vitro" con gonadotropina, no es inhibida por el agregado de cantidades grandes de prolactina (0,5-50 ug/ml) al medio de incubación. El efecto sobre el testículo de la elevación extrema de los niveles periféri

cos de prolactina, podría estar mediada por las adrenales.

Las adrenales contienen grandes cantidades de receptores para prolactina^{225, 226} y la hiperprolactinemia está asociada con hipertrofia adrenal^{182, 189}. Los esteroides adrenales pueden inhibir la producción de testosterona por los testículos²²⁷.

PAPEL DE LA PROLACTINA SOBRE EL RECEPTOR TESTICULAR PARA LH

Se ha demostrado que la administración de prolactina a ratones enanos, aumenta el número de los receptores testiculares para LH¹⁷⁴, así como lo hace en testículo de rata¹⁶⁸.

Los receptores para LH en el testículo de la rata en crecimiento están modulados por cambios en la prolactina plasmática. La administración de 2- α -Bromo-ergocriptina (CB-154) no altera los niveles séricos de LH²²⁸ pero disminuye la unión de la hormona luteinizante¹⁶⁸. Este efecto no se debe a una acción directa de la CB-154 sobre el testículo.

En hamsters privados de luz, la prolactina incrementa los receptores para LH. La administración de prolactina a ratas hipofisectomizadas, permitió observar que dosis pequeñas de LH tenían un efecto positivo sobre su receptor⁶⁰. Además, la prolacti-

na previene la pérdida de receptores para LH, inducida por la administración de hormona homóloga, ya sea en ratas hipofisectomizadas o intactas.

La prolactina podría afectar la concentración de receptores testiculares para LH en las ratas hipofisectomizadas, por mantenimiento de la célula de Leydig o por un efecto específico sobre los receptores para LH. Apoyando la idea sobre el mantenimiento de las células de Leydig, se encuentra un trabajo²²⁹, en el que se menciona que la prolactina causa el crecimiento de tumores de células de Leydig en el ratón. Se ha descrito que el número de células de Leydig no disminuye sino después de 2 semanas de la hipofisectomía²³⁰. Dado que los receptores para LH comienzan a desaparecer dentro de las 48 horas posteriores a la hipofisectomía⁷¹ y, habiéndose estudiado el efecto de la prolactina dentro de los 7 días posteriores a la operación, se sugiere que esta hormona regula el número de receptores para LH por célula de Leydig.

OTROS ASPECTOS EN LA REGULACION DE LA FUNCION TESTICULAR

ANDROGENIZACION NEONATAL

La actividad reproductiva del macho intacto, es marcadamente diferente de la hembra.

El macho adulto secreta andrógenos y forma espermatozoides maduros en forma, esencialmente, continua. Además, la rata macho despliega una conducta sexual siempre que encuentra una hembra receptora. A pesar de que la conducta sexual de la rata macho es inhibida por un medio ambiente nuevo, una vez que el macho se adapta al nuevo ambiente, podrá aparearse con la hembra receptora.

Contrariamente, la actividad reproductiva de la rata hembra es cíclica. Los óvulos maduros son liberados solamente cuando ocurre la ovulación, hecho que sucede espontáneamente cada cuatro o cinco días. La ovulación es producida por una descarga cíclica de gonadotrofinas liberadas por la pituitaria. En contraste con la producción androgénica, relativamente estable, por los testículos, los ovarios de la rata hembra secretan diferentes cantidades de estrógenos y progesterona a través del ciclo reproductivo. La actividad cíclica del ovario es responsable del característico ciclo vaginal de cuatro o cinco días.

La ovulación, que es la llave del ciclo estral de la hembra, es llevada a cabo por la activación neural de la glándula pituitaria, en respuesta a los niveles circulantes del estrógeno ovárico. Debido a la dependencia de esta función cerebral sobre los estrógenos, se podría suponer que la diferencia sexual en la actividad reproductiva se debe a la presencia de un ovario funcionando en la hembra y a su ausencia en el macho. Sin embargo, cuando se transplanta un injerto ovárico a un macho castrado, no ocurre ovulación. Aún en presencia de esteroides ováricos, el cerebro de la rata macho no induce ovulación. La glándula pituitaria, por sí misma, no es el factor que determina la característica reproductiva, dado que transplantes de hipófisis de ratas machos permiten el reinicio del ciclo ovulatorio estral, en hembras hipofisectomizadas. Con respecto a la actividad pituitaria, la capacidad del cerebro de la rata hembra de regular la secreción cíclica de gonadotropinas responsables de la ovulación, es la diferencia sexual fundamental. El concepto de diferenciación sexual establece que esta diferencia sexual, fundamental en la función cerebral, no está directamente establecida por expresión genética neuronal.

Por el contrario, la producción de una sustancia por los testículos neonatales, presumiblemente andrógenos, es el factor que determina el curso del desarrollo del cerebro.

Desde las propuestas teóricas de Lillie^{231, 232} y Keller y Tandler²³³ sobre la posible causa de la condición conocida como "free-martin" en el ganado, se han realizado innumerables estudios acerca del papel de las hormonas en la diferenciación sexual. Como consecuencia de estos estudios, se ha establecido que el sexo genético de los mamíferos no puede ser alterado por las hormonas, a pesar de que se pueden producir aberraciones permanentes por tratamiento hormonal prenatal.

EFECTO DEL TRATAMIENTO HORMONAL PRE- Y POSTNATAL SOBRE LA REPRODUCCION

Las respuestas de las gónadas, los órganos reproductivos accesorios y el cerebro a hormonas exógenas, depende no sólo de las hormonas administradas, sino de la duración del tratamiento, de la dosis empleada y de la edad de los animales tratados. Para establecer cuidadosamente la respuesta del tracto reproductivo a una hormona, primero es necesario establecer si el órgano en estudio responde a una determinada edad. Mi-

rando la literatura, se puede establecer que la hipófisis, las gónadas y las glándulas sexuales accesorias prepuberales, no reaccionarán de igual manera que el animal maduro.

Las relaciones entre edad prepuberal y respuesta gonadal, han sido estudiadas mediante transplantes de tejido gonadal y por la administración exógena de esteroides y gonadotrofinas. De tales estudios se ha determinado que existe una gran variación según las especies, siendo la duración de la etapa refractaria corta, en la rata, y más larga en el mono²³⁴.

En el macho prepuberal, la administración de gonadotrofina aumenta el peso testicular y el diámetro de los túbulos seminíferos, estimulando el tejido intersticial, sin acelerar la espermatogénesis. Incluso el tratamiento continuado con gonadotrofinas desde el nacimiento hasta la pubertad, no es capaz de acelerar la aparición de espermatozoides. Más importante es la respuesta del tejido intersticial antes de la pubertad. La gonadotrofina estimulará las células intersticiales para secretar andrógenos, en cantidad suficiente como para aumentar el tamaño de las vesículas seminales^{235, 236}, por ejemplo.

La contribución de las secreciones de los ovarios y testícu

los prepuberales (o su desaparición) a la subsecuente fertilidad del animal, fue estudiada originalmente por Pfeiffer²³⁷. El observó que, ovarios transplantados a machos adultos que habían sido castrados al nacimiento, mostraban un desarrollo normal de folículos y cuerpo lúteo. Similarmente, ratas hembras adultas, ovariectomizadas al nacimiento, exhibían un ciclo vaginal normal, cuando se les transplantaba un ovario en el ojo. Contrariamente, cuando se transplantaban testículos a hembras recién nacidas, los ovarios de estos animales cuando adultos, contenían solamente folículos (no cuerpo lúteo) y presentaban cornificación vaginal persistente, siguiendo a la pubertad. Pfeiffer propuso que el mecanismo por el cual el andrógeno (secretado por el testículo), producía esta condición estral anovulatoria persistente, era por "masculinización" de la adenohipófisis, tal que resultaba en una secreción de gonadotrofinas permanentemente desbalanceada. Este autor sugería que la hipófisis de la rata recién nacida estaba indiferenciada. Si se diferenciaba en presencia de andrógenos, sólo se elaboraría FSH, mientras que si se diferenciaba normalmente, se secretarían tanto LH como FSH. Con la identificación y cristalización

de testosterona, diferentes autores estudiaron el efecto de inyecciones postnatales de este andrógeno sobre la fertilidad posterior. Estos estudios llevan involucrados diferentes regímenes de tratamiento y varias dosis hormonales.

INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACION PREPUBERAL DE ESTEROIDES SEXUALES SOBRE LA FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DEL MACHO
ANDROGENOS

Los efectos de las hormonas androgénicas en el sistema reproductivo del macho han sido extensamente investigados.

Los diversos efectos producidos por los andrógenos dependen de la edad, duración del tratamiento y la dosis empleada. Por ejemplo, en la rata inmadura, pequeñas dosis de andrógenos disminuyen el peso testicular²³⁸, mientras que dosis mayores estimulan el testículo. En ambos casos, sin embargo, hay atrofia de las células de Leydig. La respuesta diferencial del testículo, depende del efecto estimulatorio directo de altas dosis de andrógeno exógeno sobre la gónada²³⁹. Pequeñas dosis de andrógeno no estimulan los testículos directamente, pero inhiben la producción y/o liberación de gonadotrofinas y, así, disminuyen el peso testicular.

El efecto de una única inyección de andrógeno, a un tiempo de de terminado del desarrollo, sobre la maduración del sistema re productivo, ha sido estudiado por Barraclough y Leathem²⁴⁰.

Ratones machos, de 5, 10 ó 20 días de edad, fueron inyectados con una dosis de 1 mg de propionato de testosterona, siendo sacrificados a intervalos de 10 días, hasta los 60 días de edad. Los ratones tratados a los 5 ó 10 días de edad mostraron menor velocidad de crecimiento testicular, a través de los 60 días de estudio. Incluso la diferenciación de las espermátidas a espermatozoides, se les retardó de 30 a 40 días de edad. El peso testicular de los ratones tratados a los 20 días de edad, fue inicialmente menor, pero a los 40 días de edad era comparable al de los controles. También se observó el estímulo inicial de las vesículas seminales, en los ratones tratados a los 5 ó 10 días de edad, pero al alcanzar los 60 días de edad se comprobó que este órgano era significativamente menor que el de los controles. Aparentemente, el tratamiento con andrógenos a machos prepuberales, retarda el establecimiento de la pubertad aproximadamente 10 días, pero eventualmente, a los 60 días de edad, se establece una reproducción normal. En la hembra,

contrariamente, un tratamiento idéntico altera permanentemente la función reproductiva.

ESTROGENOS

Está generalmente aceptado que, en la mayoría de los casos estudiados (rata, cobayo, cerdo, toro, hombre, etc.), los estrógenos inducen atrofia de la gónada masculina²⁴¹. Más aún, si el tratamiento con estrógenos comienza tempranamente, se daña el descenso testicular y se inhibe la espermatogénesis. Sin embargo, estos efectos de los estrógenos parecen ser temporales, cuando son administrados a animales adultos y la regeneración se completa en 6 semanas²⁴². El efecto de los estrógenos en la rata es inducir atrofia de las células de Leydig y del epitelio germinal, de tal forma que sólo permanecen espermatoцитos, células de Sertoli y espermatogonias. Existe poca información sobre los efectos permanentes producidos por dosis únicas de estrógenos a animales machos prepuberales. Harris y Levine²⁴³ inyectando ratas machos de 4 días de edad con 100 ug de benzoato de estradiol, observaron un retardo del crecimiento y una marcada desorganización de la espermatogénesis en la pubertad. Kincl y col.²⁴⁴ informa-

ron que ratas machos, inyectadas con 120 ug de dipropionato de estradiol, antes de los 10 días de edad, no copulaban cuando adultos y que existía una pérdida completa del epitelio germinal del túbulo seminífero y un descenso del peso prostático y de la vesícula seminal. Por el contrario, machos tratados a los 10 ó 20 días de edad fueron adultos normales. Reduciendo la dosis de estrógenos, se notó que 10 ug de estas hormonas eran insuficientes para producir atrofia testicular. Una única inyección de 30 ug de estradiol produce una disminución significativa del peso de las glándulas accesorias e infertilidad, sin detener la espermatogénesis. Dada la disminución del peso de próstata y vesículas seminales, parecería que la acción de los estrógenos se ubicaría a nivel de la secreción androgénica (como ya hemos comentado anteriormente). Así, estos machos, esterilizados con estrógenos, se asemejan, en cierto grado, a las ratas hembras con diestro permanente.

Si el tratamiento prepuberal con estrógenos alterase la función normal del área que controla el hipotálamo tónico, disminuiría la secreción de gonadotrofinas y se produciría el síndrome de machos o hembras anormales. Sin embargo, esta hi-

pótesis está en contradicción con los efectos producidos por una única inyección de estrógenos en la rata hembra, donde ocurre el síndrome de estro persistente.

Se ha postulado que el efecto de los andrógenos sobre la diferenciación cerebral es mediada a través de metabolitos estrogénicos, formados en el sitio de acción en el cerebro^{245, 246}. Se ha demostrado "in vivo", una captación específica de estradiol por el hipotálamo y la hipófisis²⁴⁷⁻²⁵⁶ e "in vitro"²⁵⁷⁻²⁶¹. Estudios posteriores han caracterizado a estos sitios de unión, así como los efectos de la administración de testosterona o la castración neonatal sobre los mismos²⁶².

EFECTO DE LA ANDROGENIZACION NEONATAL SOBRE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA, LH, FSH Y PROLACTINA EN RATA MACHO

Es aceptado, generalmente, que la administración de andrógenos a ratas hembras, en el período neonatal, suprime la liberación cíclica de gonadotrofinas, ocurriendo una liberación tónica de estas hormonas^{263, 264}. La liberación tónica, característica de los machos, muestra niveles supe-

riores en la FSH plasmática y pituitaria y en la prolactina sérica, cuando es comparada con ratas hembras ²⁶⁵⁻²⁶⁸.

Dado que la administración neonatal de andrógenos también induce cambios en la fisiología reproductiva de las ratas machos adultos ²⁶⁹⁻²⁷¹, el efecto de la androgenización sobre la secreción gonadotrófica en este sexo no es clara.

Trabajos recientes ²⁷² demostraron que, en ratas machos, la administración de testosterona durante los primeros días de edad, produce un incremento permanente en la secreción de FSH y prolactina, comparada con la rata macho no tratada. Presumiblemente, la administración de una dosis adicional de testosterona a ratas machos durante el período de diferenciación sexual del hipotálamo, produciría el desarrollo de un control hipotalámico hipertónico de la secreción gonadotrófica, con niveles elevados de FSH y prolactina, comparados con las ratas machos normales. Estos resultados proveen evidencia adicional de que los andrógenos, actuando en los primeros días de vida, son responsables de los niveles mayores de FSH y prolactina que caracterizan la forma masculina o tónica de la secreción de gonadotrofinas.

EFECTO DE LA EDAD SOBRE LA FUNCION TESTICULAR

Está bien establecido que la testosterona circulante disminuye en el hombre con la edad²⁷³⁻²⁷⁵. La respuesta secretoria testicular, a la estimulación con hCG^{274, 276-278}, en humanos en el período de envejecimiento, sugiere que algún defecto intrínseco de la función de la célula de Leydig ocurre en el hombre, con la edad. Se ha documentado una disminución en la concentración plasmática de testosterona, en la rata, alrededor de los 24-48 meses de edad²⁷⁹⁻²⁸¹ y tanto Miller y Riegle²⁸⁰, como Chan y col.²⁸¹, han descrito una secreción anormal de testosterona en respuesta a hCG, utilizando ratas Long-Evans envejecidas. Este descenso de testosterona se correlaciona con una pérdida de la actividad en la 3- β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa, observada entre los 12 y 18 meses de edad (Leathem y Albrecht²⁸²) y con una disminución aparente de la masa de células de Leydig, según lo describen Peng y col.²⁸³. De acuerdo con Miller y Riegle²⁸⁰ y Chan y col.²⁸¹, hasta una hora después de la estimulación con hCG, los animales viejos son, relativamente, hipoestimulables con la gonadotrofina y sugieren que, al menos hasta

los 24 meses de edad, este defecto es reversible, dando un período adecuado de estimulación gonadotrófica.

Una función reproductiva reducida, es característica del envejecimiento en varias especies de mamíferos. A pesar que el mecanismo neuroendocrino preciso, involucrado con las alteraciones de la reproducción, relacionadas con la edad, permanece sin resolver, la información corriente sugiere que la edad podría afectar varios componentes del sistema de control hipotálamo-hipofisario-gonadal.

Estudios recientes han mostrado niveles reducidos de testosterona sérica en ratas machos envejecidas y en humanos ^{280,284}. Los efectos de la edad sobre la función gonadal, están relacionados con los efectos del envejecimiento sobre la secreción gonadotrófica. Aunque la reducción en la producción de esteroides gonadales con la edad, en los humanos, está acompañada por concentraciones aumentadas de gonadotrofinas en sangre ^{285,286}, no hay evidencias de un aumento similar en la liberación de gonadotrofinas, acompañando la secreción reducida de esteroides gonadales, en las ratas envejecidas. Recientemente se ha descrito un descenso en los niveles séricos de LH en

ratas machos envejecidas²⁸⁷.

Estos estudios sugieren efectos significativos de la edad sobre la secreción pituitaria de gonadotrofinas. En la mayoría de los estados reproductivos, las ratas viejas poseen niveles séricos de LH reducidos. Estas concentraciones bajas de LH sugieren una secreción hipofisaria de gonadotrofina crónicamente reducida. Además, se ha descrito que las ratas envejecidas responden a la inyección endovenosa de LHRH con menores niveles de LH sérica, comparadas con ratas más jóvenes^{287,288}. El incremento en la LH sérica, siguiendo a una inyección aguda de LHRH en ratas envejecidas, indica que sus pituitarias son capaces de secretar cantidades mayores de LH que las que mantienen normalmente. Una actividad secretoria de LH reducida durante largo tiempo, característica de la rata envejecida, puede, al menos en parte, dar cuenta de la respuesta pituitaria disminuida a la inyección aguda de LHRH, en estos animales.

A pesar que los estudios corrientes indican que la rata envejecida puede sostener niveles séricos de LH sustanciales, bajo condiciones experimentales de alta estimulación con LHRH, por

un período limitado de tiempo, existe amplia evidencia que la respuesta de la unidad hipotálamo-hipofisaria, que controla la secreción de LH, está alterada en la rata envejecida. Han sido descritos niveles basales reducidos de LH en ratas machos envejecidas^{287, 289}, así como también en ratas hembras envejecidas, en diversos estados reproductivos^{288, 289}. Se ha probado que las concentraciones hipofisarias de LH son menores en ratas machos y hembras envejecidas que en sus controles adultos jóvenes^{291, 292}. Estas concentraciones séricas y pituitarias de gonadotrofinas estarían relacionadas con el descenso en la capacidad reproductiva de ratas envejecidas de ambos sexos^{280, 293, 294}.

Si el control del sistema reproductivo en estos machos envejecidos funcionase normalmente, la disminución de la testosterona, observada en estos animales²⁸⁰, debería ser detectada en el sistema de retroalimentación hipotálamo-hipofisario, resultando en una secreción de LH aumentada. Dado que las ratas machos envejecidas inyectadas con hCG, presentan niveles séricos de testosterona aumentados, indicando que son capaces de responder a la gonadotrofina, se concluye que la testostero-

na sérica reducida refleja una menor estimulación gonadotrófica de los testículos.

Existe una hipótesis que indica que las alteraciones relacionadas con la edad en el sistema de control reproductivo, ocurren en la regulación neural de la liberación de hormonas hipotalámicas^{286, 293, 295}. El hipotálamo de las ratas machos envejecidas posee suficiente actividad liberadora de gonadotrofina como para estimular la liberación de LH a partir de incubaciones de hipófisis de rata²⁹¹. La rata macho envejecida presenta un incremento menor en los niveles séricos de LH y FSH post-orquidectomía^{289, 296}. Estos resultados indican que, a pesar de que el sistema de control reproductivo responde a una retroalimentación negativa disminuida, posterior a la gonadectomía, la respuesta es menor que la que ocurre en la rata adulta joven.

A pesar que el mecanismo preciso involucrado en el deterioro de la función hipotalámica de la rata envejecida no está completamente entendido, una cantidad sustancial de datos experimentales sugieren que las catecolaminas hipotalámicas podrían estar mediando este proceso. Se conoce que las catecola

minas hipotalámicas influncian las secreciones de la hipófisis anterior, presumiblemente afectando la liberación de hormonas reguladoras hipotalámicas, o por una acción directa sobre la pituitaria. Se ha relacionado un aumento en las catecolaminas hipotalámicas con la liberación de LH hipofisaria y con la inhibición de la liberación de prolactina²⁹⁷. El descenso en los niveles séricos de LH y el aumento en los de prolactina están de acuerdo con la hipótesis de una disminución de la función de catecolaminas hipotalámicas. Esta hipótesis se apoya en las observaciones de un menor contenido en catecolaminas hipotalámicas^{298, 299} y una disminución en la velocidad de recambio de catecolaminas neuronales^{298, 300} en ratas y ratones envejecidos. Sin embargo, se necesita mayor experimentación para entender las bases moleculares de los cambios en la función de las catecolaminas hipotalámicas en las ratas envejecidas, para comprender cómo están relacionados los cambios en estas hormonas con las alteraciones de la respuesta hipotalámica a los múltiples estímulos positivos o negativos que recibe.

FOTOPERIODO, GLANDULA PINEAL Y REPRODUCCION

El fotoperíodo diario, hasta donde se conoce, es el factor más importante que determina el carácter endocrino y anti-reproductivo de la glándula pineal en la mayoría de las especies mamíferas que han sido investigadas. Fotoperíodos cortos, exposición a la oscuridad o ceguera son considerados, usualmente, como estimulantes de la producción y descarga de antigonadotrofinas pineales y, por lo tanto, inhibitorias para la reproducción. Contrariamente, fotoperíodos largos inhiben la actividad pineal antigonadotrófica y, por lo tanto, eliminan el efecto supresor de la glándula pineal. Esta regla general es aplicable a varias especies de roedores y a un número de ungulados y carnívoros que han sido investigados. Esta regla está ejemplificada por los hallazgos obtenidos utilizando al hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) como animal experimental. La restricción tanto en machos como en hembras de esta especie a menos de 12,5 horas de luz por un período de 24 horas, induce colapso sexual e incompetencia reproductiva. Asociado con el marcado descenso en el peso testicular, los animales se vuelven aspermatogénicos, la testosterona circulante decae, los ór-

ganos sexuales accesorios involucionan, los títulos plasmáticos de las gonadotrofinas están disminuidos y los niveles pituitarios de LH y prolactina están reducidos. Los efectos de iluminación ambiental constante sobre la fisiología reproductiva, especialmente en ratas, se han atribuido al hecho de que la iluminación continua suprime completamente la actividad pineal. Hasta donde esto es cierto, la luz constante también tiene efectos sobre la reproducción que son independientes de la glándula pineal. De hecho, si las consecuencias reproductivas de la iluminación constante fuesen debidas, exclusivamente, a su efecto supresor de la actividad antigonadotrófica pineal, la simple pinealectomía debería tener los mismos efectos sobre la reproducción que la iluminación constante; sin embargo, las consecuencias de estos dos tratamientos son bien diferentes.

FOTOPERIODOS CORTOS Y FUNCION PINEAL

Un fotoperíodo diario de menos de 12,5 horas de luz por día es, usualmente, considerado inhibitorio para la reproducción en los hamsters³⁰¹. A pesar de la relación obvia entre la duración del fotoperíodo y la función sexual del hamster, se co

noce poco acerca de cómo la duración del día actúa para cambiar la capacidad de cría. De acuerdo con Stetson, Elliott y Menaker³⁰², existen, por lo menos, cuatro caminos por los cuales un hamster podría discriminar los días largos de los cortos: 1) ellos podrían medir la duración absoluta del período luminoso, 2) podrían medir la duración absoluta del período de oscuridad, 3) podrían medir la relación luz:oscuridad o, 4) una oscilación circadiana de fotosensibilidad podría gobernar la respuesta del animal a la luz. Para estudiar cuáles de estos caminos serían utilizados por los hamsters, usaron un ejemplo experimental que denominaron fotoperíodos de resonancia. Expusieron hamsters machos adultos a ciclos de luz:oscuridad que incluían un período de luz de 6 horas, alternando con períodos de oscuridad de diversa duración, de forma de tener una longitud de ciclo de 24, 36, 48 ó 60 horas de duración. En este esquema experimental, los hamsters que estuvieron expuestos a 6 horas de luz cada 1,5 días (luz:oscuridad 6:30) o cada 2,5 días (luz:oscuridad 6:54) interpretaron éstos como días largos y, por lo tanto, las dimensiones testiculares y de las glándulas sexuales accesorias permanecieron en la

condición adulta. Los otros dos fotoperíodos, es decir luz:oscuridad 6:18 ó 6:42, fueron incapaces de mantener los órganos reproductivos en la condición sexualmente madura. Resulta aparente, de estos resultados, que el hamster no depende de la duración absoluta de la luz, de la oscuridad o de la relación luz:oscuridad para mantener los testículos y órganos accesorios. Estos hallazgos sugieren que un ritmo circadiano de fotosensibilidad determina cuándo la luz actuará con capacidad estimuladora en el eje pituitario-gonadal.

Una de las consecuencias más obvias asociadas con la involución gonadal mediada por la pineal, en machos expuestos a la oscuridad, es una dramática depresión en los niveles hipofisarios de prolactina. A pesar de que el papel preciso de la prolactina en la fisiología normal del macho requiere definición, ha sido demostrado que estimula la esteroidogénesis testicular en ratas y ratones. Estas observaciones combinadas, convencieron a Bartke, Croft y Dalterio¹⁹⁹ de la posibilidad de que una disminución en la prolactina podría dar cuenta, al menos en parte, de la inactividad de los órganos sexuales accesorios y del testículo que sucede a la restricción luminosa en los hams-

ters machos. A causa de esto, ellos expusieron hamsters machos a oscuridad hasta que la pineal produjo el colapso reproductivo (8 semanas). Luego, un grupo de animales recibió inyecciones diarias de solución salina, 300 ug de prolactina ovina, 20 ug de LH ovina o 150 ug de FSH ovina, durante 2,5 semanas. En estas condiciones ni la LH ni la FSH, por sí solas, tuvieron influencia detectable sobre los parámetros de la reproducción que midieron; sin embargo, la prolactina estimuló el crecimiento testicular y de los órganos accesorios, la espermiogénesis y los niveles plasmáticos de testosterona. Aunque el tratamiento con prolactina no restauró completamente la dimensión testicular, los niveles plasmáticos de testosterona en los animales que habían recibido prolactina fueron comparables a los hamsters controles sin tratamiento.

FOTOPERIODOS LARGOS Y FUNCION PINEAL

Antes de conocerse que la actividad bioquímica y endocrina de la glándula pineal dependía de la información luminosa que alcanzaba los ojos, era rutina pinealectomizar los animales y comparar la respuesta de los órganos endocrinos, un tiempo después, con aquellos de controles "falsamente operados". En estos

estudios, tanto los animales pinealectomizados como los "falsamente operados", fueron mantenidos en condiciones de fotoperíodos largos (más de 12 horas de luz por día). Desde que se conoce que el fotoperíodo juega un papel importante en la determinación de la actividad endocrina de la pineal, rápidamente aparece el error en la investigación de la función pineal de los animales expuestos a días largos. En el experimento descrito, todos los animales estuvieron esencialmente pinealectomizados, la mitad fue quirúrgicamente pinealectomizada y los "falsamente operados" fueron "fisiológicamente pinealectomizados" por los largos períodos de luz. Para examinar apropiadamente la actividad de la pineal, es necesario someter este órgano a fotoperíodos de longitudes reducidas; así aparece la actividad de la pineal.

OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

El objetivo del presente trabajo es aportar nuevas evidencias que demuestren la necesidad de un complejo hormonal para el mantenimiento de la función normal de las células de Leydig, representado principalmente por la hormona luteinizante, la prolactina y la insulina.

También se investigan condiciones fisiológicas, así como tratamientos hormonales, que pueden influir sobre la capacidad reproductiva de la rata macho.

En todos los casos se estudian los mecanismos moleculares que se ponen en funcionamiento, intentando explicar las causas responsables de los fenómenos enunciados en la Introducción a la presente labor de investigación.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, variedad Wistar), adultas (aproximadamente de 90 días de edad), salvo especificación en contra.

Condiciones del bioterio: temperatura constante (25°C), con períodos de luz de 12 horas y 12 horas de oscuridad. Los animales recibieron dieta balanceada y agua "ad libitum".

TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

-OBTENCION DE ANIMALES DIABETICOS

La diabetes se produjo mediante la inyección de estreptozotocina (Upjohn Co., lot. 60140) (droga que destruye selectivamente las células beta del páncreas), por vía endovenosa, en una dosis de 65 mg/kg de peso corporal. La droga se preparó 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 la glucosa en sangre utilizando tiras reactivas Destrotix.

El éxito del tratamiento se evaluó siguiendo la aparición

de hiperglucemia, glucosuria y poliuria.

Los animales se utilizaron 30 días después de la inyección de estreptozotocina.

ADMINISTRACION DE INSULINA A LOS ANIMALES DIABÉTICOS

Un grupo de animales diabéticos fue inyectado con 2 UI/rata/día, de una suspensión de protamina-Zn-insulina (Eli Lilly & Co.), subcutáneamente, comenzando 15 días después de la administración de estreptozotocina y prolongando este tratamiento durante 15 días. Con esta dosis se logró una relativa normalización de la glucemia.

-OBTENCION DE ANIMALES "DESENSIBILIZADOS" POR hCG

Los animales fueron inyectados con una dosis subcutánea de hCG (200 UI/rata) (Endocorion, Elea), que denominaremos "dosis desensibilizante" o con una segunda dosis de la misma hormona, a los dos o siete días posteriores a la primera inyección, que llamaremos "dosis re-sensibilizante".

Luego de este tratamiento, los animales fueron sacrificados, a diferentes tiempos, por decapitación. La sangre se utili-

zó para la determinación hormonal correspondiente.

El grupo de animales considerado como control, recibió una o dos inyecciones subcutáneas de vehículo (solución fosfato-salina, buffer Dulbecco, pH= 7,4).

-OBTENCION DE ANIMALES ANDROGENIZADOS

En este caso, los animales recibieron una única dosis de propionato de testosterona (5 mg/rata), en el primer día de vida post-parto.

Las ratas fueron utilizadas al alcanzar los 90 días de edad. Fueron sacrificadas por decapitación y su sangre se utilizó para estudios hormonales.

-ESTUDIOS SOBRE RATAS ENVEJECIDAS

Para estos estudios se utilizaron ratas de 23 meses de edad, comparando los resultados con los obtenidos con ratas de 6 meses de edad.

Para la investigación de la influencia de la administración de testosterona sobre el parámetro estudiado, las ratas fueron inyectadas durante 14 días con enantato de testosterona (100 ug/0,1 ml/100 g de peso corporal) o con vehículo so-

lamente.

- ESTUDIOS REALIZADOS EN VIZCACHAS

Para el estudio de la influencia del fotoperíodo sobre la función testicular, se utilizaron vizcachas (*Lagostomus Maximus Maximus*).

El grupo de animales considerado como control, consistía en vizcachas cazadas en su habitat (noche), mientras que el otro grupo estaba formado por animales sometidos a 8 días de iluminación constante (100 foot candle).

AISLAMIENTO DE CELULAS DE LEYDIG POR TRATAMIENTO CON COLAGENASA

Se utilizó la técnica descrita por Mendelson y col.³⁰³, utilizando colagenasa (Worthington) para la dispersión del tejido tubular.

Los testículos descapsulados, colocados en tubos en tubos de plástico (Falcon) (seis testículos por tubo), fueron suspendidos en Medio 199 (Diffco Co.), en la relación 1 testículo por ml de medio, conteniendo 0,3 mg de colagenasa/ml. La incubación se realizó a 37°C, durante 15-20 minutos, en un in_

cubador Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno (O_2 : 95%, CO_2 : 5%), con agitación constante.

Finalizada la incubación, la reacción se detuvo por dilución con Medio 199 (8 ml por cada ml de incubación).

Con el objeto de dispersar mejor el tejido, se agitó en forma rotatoria el tubo incubado, durante 3 minutos, dejándolo reposar otros 3 minutos. Cuando los túbulos hubieron decantado, el sobrenadante fue aspirado con una jeringa de plástico y filtrado a través de Nitex (malla de poro 50), recogiendo el líquido filtrado en otro tubo de plástico. La resuspensión se repitió una vez más y el líquido filtrado se juntó con el anterior.

Este filtrado, conteniendo las células intersticiales, se centrifugó a 700 x g, durante 10 minutos. El precipitado así obtenido, se resuspendió en Medio 199, en la relación de 1 testículo en 6 ml de medio.

La determinación del número de células se realizó sobre 50 ul de esta preparación, teñidas con 150 ul de una solución acuosa de azul de metileno al 0,2%. Luego de 10 minutos, se agregaron 300 ul de Medio 199 y las células se contaron en una cámara. En estas condiciones, se obtuvieron preparaciones de,

aproximadamente, 7×10^6 células/ml.

INCUBACIONES CON TESTICULOS INTACTOS Y CELULAS
DE LEYDIG AISLADAS

-TESTICULOS INTACTOS

Los testículos intactos fueron obtenidos inmediatamente después de sacrificar los animales por decapitación. Cada testículo se descapsuló y fue incubado en un volumen de 3 ml de Medio 199, conteniendo 1-metil-3-isobutil-xantina (MIX) 0,1 mM y las hormonas a estudiar.

La incubación se llevó a cabo durante 3 horas, a 34°C, en un incubador Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno y con agitación constante.

Finalizada la incubación, el medio fue aspirado y congelado a -20°C, hasta ser utilizado.

-CELULAS INTERSTICIALES

Las células obtenidas según la técnica ya mencionada, fueron incubadas en un volumen final de 2 ml de Medio 199 (aproximadamente 10×10^6 células), con MIX 0,1 mM y suplementado con las hormonas a estudiar.

La incubación se realizó durante 2 horas, a 34°C, en un incubador Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno y con agitación constante.

Finalizada la incubación, el medio de incubación fue centrifugado a 1.000 rpm, durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se destinó a la determinación de hormonas esteroideas y AMP cíclico. El precipitado celular se utilizó, en algunos casos, para la determinación de AMP cíclico intracelular o actividad de unión de las proteínas quinasas, siguiendo la técnica que más adelante se detallará.

DETERMINACION DE TESTOSTERONA

El dosaje de testosterona se realizó mediante la utilización de un suero anti-testosterona, obtenido por inmunización activa de conejos, a intervalos de dos semanas, con un conjugado de testosterona-albúmina sérica bovina (BSA), preparado por acoplamiento de la carboxi-metil-oxima de la testosterona a BSA. El suero anti-testosterona utilizado, posee una constante de afinidad de 10^{10} M^{-1} y se utiliza en una dilución apropiada (1:2.500) para ligar el 50% de la testosterona-³H de referencia (aproximadamente 10.000 cpm).

El rango de utilidad es de 25 a 800 pg de testosterona, en un volumen final de 0,5 ml. Previa incubación durante 16 horas, a 4°C, la hormona libre es separada por agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón (Norit A)-dextranso (dextranso 70) (0,5-0,05% P/V) en el buffer de ensayo ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,04 M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,03 M; Azida sódica, 0,015 M; NaCl, 0,15 M, EDTA, 10 mM y gelatina 0,1%, pH= 7).

La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Packard Tri Carb (Modelo 3.320).

-TESTOSTERONA SERICA

Una vez obtenida la sangre de los animales, se le permitió coagular y el suero se separó para la determinación hormonal.

Una alícuota de este suero fue extraída dos veces con 5 ml de éter etílico (Merck).

El residuo evaporado de los extractos etéreos, fue resuspendido en 0,5 ml de buffer de ensayo y una alícuota apropiada fue utilizada para la determinación del contenido de testosterona.

-TESTOSTERONA DEL MEDIO DE INCUBACION

De los sobrenadantes de las incubaciones, guardados a -20°C, se tomó una alícuota adecuada que, sin extracción previa, se utilizó para la determinación.

DETERMINACION DE AMP CICLICO

Para el dosaje de este nucleótido cíclico, se utilizó la técnica de Brown y col.³⁰⁴.

-AISLAMIENTO DE LA PROTEINA QUINASA DE ADRENAL BOVINA

Luego de la separación de la médula, las cortezas de glándulas adrenales bovinas, fueron homogeneizadas, utilizando un homogeneizador tipo Polytron (Brinkmann), a 0°C, con 1,5 volúmenes de buffer Tris-HCl, 50 mM, pH= 7,4, conteniendo Sacarosa, 0,25 M; KCl, 25 mM y MgCl₂, 5 mM. Este homogenato se centrifugó a 2.000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se recentrifugó a 5.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación se guardó, en alícuotas de 0,5 ml a -20°C. Esta preparación fue descongelada y diluida con el buffer de ensayo (Tris-HCl, 50 mM, pH= 7,4

conteniendo Teofilina, 8 mM y 2-mercaptoetanol, 6 mM). Este buffer se utilizó en todos los pasos posteriores.

- ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE AMP CICLICO

Cada tubo de ensayo contenía 50 ul de una dilución apropiada de enzima, 100 ul de una cantidad conocida de AMP cíclico (entre 0,039 y 20 pmoles) y 50 ul de AMP cíclico-³H (aproximadamente 3.000 cpm). La cantidad de enzima era tal que ligaba aproximadamente el 40% del AMP cíclico de referencia.

La incubación se realizó a 4°C, durante 90 minutos. Finalizada la incubación, el AMP cíclico libre se separó por el agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón-BSA (Sigma, Fracción V) (500 mg de carbón:100 mg de BSA, para 10 ml de buffer de ensayo).

La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Packard Tri Carb (Modelo 3.320), utilizando tolueno centelleante, conteniendo 30% V/V de Tritón X-114.

- AMP CICLICO DEL MEDIO DE INCUBACION

El sobrenadante de las incubaciones de testículos o célu-

las se hirvió a 100°C, durante 10 minutos y, luego de centrifugarlo a 3.000 rpm, durante 10 minutos, una alícuota apropiada del sobrenadante se utilizó para la determinación del nucleótido.

-AMP CICLICO INTRACELULAR

Las células sedimentadas luego de la incubación y lavadas con 2 ml de Medio 199, conteniendo MIX, 0,1 mM, se re-suspendieron en 1 ml del buffer de ensayo y, luego de sonicarlas en un sonicador Brinkmann, durante 15 segundos, se las hirvió a 100°C, durante 10 minutos. Luego de centrifugarlas, se procedió de la misma forma que con el medio de incubación.

OBTENCION DE HORMONAS RADIACTIVAS

-HORMONA LUTEINIZANTE

Para preparaciones óptimas de la hormona marcada, 6 ug de hCG (10.000-12.000 UI/mg) fueron marcados con 500 uCi de ^{125}I , por una modificación del método del NaClO^{305} que a continuación se detalla.

Todos los reactivos fueron agregados a tubos de vidrio de

4 x 40 mm (previamente siliconizados), de acuerdo con la siguiente proporción:

- 1- hCG (10.000-12.000 UI/mg), 6 ug (60 ul)
- 2- Buffer fosfatos, 0,5 M, pH= 7,4 (10 ul)
- 3- ^{125}I , libre de portador, en NaHO, 0,1 N, 500 uCi (10 ul)
- 4) NaClO, recién preparado, 15 nmoles (13 ul)

Después de agitar vigorosamente durante 45 segundos, la mezcla de iodinación fue diluida con buffer fosfatos 0,05 M y transferida a una columna de Sephadex G-75. Separado el pico hormonal del de iodo libre, la fracción correspondiente a la hormona, se dividió en alícuotas que se guardaron congeladas a -70°C para su posterior repurificación, antes de su utilización.

Cada alícuota, aproximadamente de 0,2 ml, fue purificada por Sepharosa-Concanavalina A o ACA 44 (Ultrogel, LKB, Suecia).

PREPARACION DE SEPHAROSA-CONCANAVALINA A

La Concanavalina A fue unida a Sepharosa^{306,307} de la siguiente manera: 50 g de Sepharosa 6B, lavada y suspendida en 40 ml de agua destilada, fue activada con el agregado de 50

ml de una solución al 16% P/V de bromuro de cianógeno acuoso, recién preparado, mezclando continuamente con ayuda de un agitador magnético y manteniendo el pH= 11 mediante la adición de una solución de NaHO 4 M. La reacción, llevada a cabo a 20°C, durante 10-20 minutos, se consideró terminada cuando no se requirió adición ulterior de álcali para mantener el pH. En estas circunstancias fue necesaria la adición de 6 a 8 ml de NaHO. Inmediatamente, la suspensión conteniendo la Sepharosa activada, se filtró por un filtro Buchner y se la lavó con 100 ml de agua destilada y 100 ml de una solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Luego de esto, el sólido fue agregado a una solución de 500 mg de Concanavalina A, disuelta en 40 ml de NaCl 1 M, completándose la mezcla con 40 ml de NaHCO₃ 1 M. Dicha mezcla se dejó agitando durante la noche, a 4°C y luego se lavó la preparación, filtrando a través de un embudo de vidrio poroso con dos litros de NaHCO₃ 0,1 M.

La eficiencia del acoplamiento se determinó 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 producir el acoplamiento.

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

PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA- CONCAVALINA A

La afinidad de los restos de hidratos de carbono de las hormonas glicoproteicas por la Concanavalina A, fue utilizada para la purificación de la gonadotropina marcada.

Mediante este método, dichas hormonas son específicamente adsorbidas a Sepharosa-Concanavalina A y luego eluidas con soluciones de α -metilglucósido o α -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 ^{125}I -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 esto, la hormona marcada fue eluida con la misma solución, conteniendo α -metilglucósido 0,2 M.

Las propiedades físicas de la ^{125}I -hCG, obtenida por este método, no difieren de la hormona no marcada según los criterios utilizados (filtración por gel, electroforesis en gel de poliacrilamida, electroenfocado).

La concentración de hormona en las preparaciones radiactivas se determinó mediante radioinmunoensayo³⁰⁸. Es de hacer notar que, marcaciones de hCG con el método de la lactoperoxidasa³⁰⁹, produjeron preparaciones similares a los obtenidos con NaClO , aunque no mostraron ventajas en su realización.

Se ha demostrado que estas hormonas mantienen su completa actividad biológica, a juzgar por los ensayos de aumento en el peso de la próstata ventral y la disminución del contenido de ácido ascórbico ovárico^{310, 311} y la producción de testosterona por testículos aislados³¹².

La actividad específica usual de la ^{125}I -hCG empleada fue de 50 uCi/ug.

-PROLACTINA

Para la obtención de prolactina marcada con ^{125}I , se utilizó una modificación del método de Thorell y Johansson³⁰⁹.

Para preparaciones óptimas de hormona marcada, 5 ug de prolactina (en Na_2HPO_4 0,05 M, pH= 7,4) fueron marcados con 500 uCi de ^{125}I , según se indica a continuación:

- 1) Prolactina, 5 ug (10 ul)
- 2) Buffer Acetato de Sodio 0,4 M, pH= 5,6 (10 ul)
- 3) ^{125}I , libre de portador, en NaHO 0,1 N, 500 uCi (6 ul)
- 4) Lactoperoxidasa bovina (Calbiochem, grado B, cat. N°427466)
2,7 mg/ml en buffer Acetato de Sodio 0,1 N (4 ul)
- 5) H_2O_2 (300 volúmenes, diluida 1:20.000) (4 ul)

Después de agitar vigorosamente durante 2 minutos, la mezcla de iodinación fue diluida con 300 ul de buffer fosfatos 0,05 M y transferida a una columna de Sephadex G-75. Separado el pico hormonal del de iodo libre, la fracción correspondiente a la hormona se dividió en alícuotas, que se guardaron congeladas a -70°C para su posterior repurificación, antes de su utilización.

Cada alícuota, aproximadamente de 0,2 ml, fue purificada

por columna de poliacrilamida-agarosa (ACA 54, Ultrogel, LKB, Suecia), separándose la hormona agregada de la utilizable para los estudios de unión a receptor.

Usualmente, la actividad específica obtenida fue de 50 uCi/ug.

-INSULINA

Para la marcación de insulina con iodo radiactivo, se siguió el siguiente esquema:

- 1) Insulina porcina-Zn, 5 ug (5 ul)
- 2) ¹²⁵I, libre de portador, en NaHO 0,1 N, 500 uCi (6 ul)
- 3) Buffer fosfatos, 0,5 M, pH= 7,5 (10 ul)
- 4) NaClO, recién preparado, 10 nmoles (10 ul)

Luego de agitar vigorosamente la mezcla, durante 30 segundos, se la diluyó con 200 ul de una solución de BSA (20 mg/ml), conteniendo 20 ul de una solución de bisulfito de sodio (1 mg/ml). Posteriormente se la transfirió a una columna de Sephadex G-25 (10 x 0,6 cm). Colectando el pico hormonal, se lo dividió en alícuotas que se congelaron a -70°C para su posterior repurificación, antes de su utilización.

Cada alícuota (100 ul) fue purificada utilizando pastillas

de talco (25 mg), según el siguiente esquema:

- 1- Hormona marcada (100 ul)
- 2- Buffer fosfatos 0,1 M, conteniendo BSA 0,1% (500 ul)
- 3- Una pastilla de talco (25 mg)

Agitar hasta resuspensión total. Dejar descansar 15 minutos, en frío, y centrifugar a 3.000 rpm, durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 2 ml de buffer fosfatos. Volver a centrifugar y descartar el sobrenadante. Al precipitado, agregar 3 ml de la siguiente solución:

- 1- HCl 1 N (3 ml)
- 2- H₂O (2,5 ml)
- 3) BSA (20%) (0,5 ml)

Dejar 5 minutos en frío y centrifugar a 3.000 rpm, durante 10 minutos. Guardar el sobrenadante. Agregar 5 gotas de buffer fosfatos 0,5 M y llevar a pH= 7 con NaHO.

Usualmente, se obtiene una actividad específica de 97 uCi/ug.

UNION DE HORMONAS MARCADAS A LA FRACCION PARTICU- LADA

La interacción entre las hormonas y sus receptores se es-

tudió sobre la base de la unión de las hormonas radiactivas, agregadas en cantidades variables, a componentes particulados de testículos de ratas adultas, o a células intersticiales aisladas. La unión inespecífica fue evaluada agregando una cantidad 1.000 veces superior de hormona no radiactiva.

-TESTICULOS ENTEROS

Testículos descapsulados fueron homogeneizados en 4 volúmenes de buffer Dulbecco (PBS), pH= 7,4, utilizando un homogeneizador del tipo Polytron.

El homogenato se filtró por Nitex (malla de poro 50) y se lo centrifugó a 14.000 rpm, durante 15 minutos, en una centrífuga International, modelo B-20, refrigerada. El precipitado se resuspendió en igual volumen de buffer PBS y se utilizó como fuente de receptor.

La mezcla de incubación contenía 100 ul de la fracción receptora, 50 ul de hormona marcada (20.000-200.000 cpm) y 50 ul de hormona no marcada o buffer. La incubación se efectuó a 24°C, durante toda la noche (aproximadamente 20 horas) y se detuvo por dilución con 2 ml de PBS frío. Luego de la centrifugación de los tubos, se determinó la radiactividad

del precipitado, utilizando un contador gamma automático, Beckman.

-CELULAS INTERSTICIALES

Las células obtenidas por tratamiento con colagenasa, fueron incubadas en 0,5 ml de PBS, con cantidades variables de hormona radiactiva y hormona fría constante (para calcular la unión inespecífica) o buffer. La incubación se realizó de la misma forma que para testículos enteros.

-DETERMINACION DE SITIOS TOTALES DE UNION DE hCG

Para determinar la cantidad total de sitios de unión para hCG en testículo entero, se utilizó la técnica descrita por Chen y col.¹²³.

El testículo fue homogeneizado en 1 ml de $MgCl_2$ 4 M, a 0°C, usando un homogeneizador tipo Polytron. Luego de la homogeneización, se diluyó el homogenato con PBS y se lo centrifugó a 14.000 rpm, durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en PBS y se lo volvió a centrifugar a la misma velocidad. El precipitado así obtenido, se resuspendió en 4 volúmenes de PBS y se lo utilizó como fracción receptora.

Este tratamiento con $MgCl_2$ es suficiente para despegar toda la hormona luteinizante que se encuentra pegada a sus sitios receptores.

Luego de este tratamiento, la incubación procede como se describió anteriormente.

SOLUBILIZACION DE LAS PARTICULAS TESTICULARES

Los testículos de ratas fueron descapsulados y desgarrados cuidadosamente (cardados) en buffer Dulbecco (PBS), pH= 7,4, en la relación 3 ml/testículo. Mediante este procedimiento se ha demostrado que se liberan fragmentos de células intersticiales con alta afinidad de unión para las hormonas LH y hCG 313.

Después de la filtración a través de Nitex, la suspensión fue centrifugada a 120 x g, durante 20 minutos, para eliminar células intactas y restos de tejido. La fracción sobrenadante fue centrifugada a 27.000 x g, durante 20 minutos.

El precipitado así obtenido, se suspendió en solución al 1% de Tritón X-100, en PBS, durante 30 minutos, a 4°C. Después de diluir la muestra 10 veces, con PBS, la solución se centrifugó a 27.000 x g, durante 10 minutos, 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 sitios de unión para LH, 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 x g, durante 3 horas.

CENTRIFUGACION 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 Beckman modelo L2-65 B, empleando un rotor SW 56. Dichos gradientes fueron preparados con una bomba peristáltica Desaga. Estos gradientes se realizaron en tubos de polialómero de 7/16" de diámetro x 2-3/8".

Los gradientes se estacionaron a 4°C por 3-4 horas, antes de ser utilizados. Este procedimiento suministra gradientes extremadamente lineales y reproducibles, verificados por el método de Martin y Ames³¹⁴.

Las muestras (0,4 ml) fueron aplicadas después de agregarles las proteínas marcadoras: inmunoglobulina G y albúmina de

suero bovina (BSA).

Las centrifugaciones se llevaron a cabo a 45.000 rpm, durante 14 horas, a 4°C.

Finalizada la centrifugación, las fracciones fueron colectadas cada 15 segundos 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 Beckman DB-G. Los picos radiactivos fueron localizados contando la radiactividad presente en cada fracción en un contador gamma automático Beckman.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col.³¹⁵, usando BSA como referencia.

DETERMINACION DE LA UNION DE AMP CICLICO A SUS RECEPTORES INTRACELULARES

La determinación de la unión del nucleótido cíclico a las proteínas quinasas, se realizó según la técnica descrita por Dufau y col.⁴⁵.

El precipitado celular, obtenido luego de la incubación de células intersticiales, se lavó con 1 ml de Medio 199, conteniendo MIX 0,1 mM. El precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer Tris-HCl, 20 mM, pH= 7,4, conteniendo MIX 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM. Esta suspensión celular fue sonificada durante 15 segundos, en la posición 4 de un sonicador Brinkmann. Luego de la sonicación se la centrifugó a 2.000 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante se mantuvo a 0°C y se utilizó como fuente de proteína quinasa.

La mezcla de incubación contenía 50 ug de proteína, 2×10^6 cpm de AMP cíclico- ^3H (40 Ci/mmol) en 200 ul de buffer fosfato de potasio 80 mM, pH= 6,5, conteniendo acetato de magnesio 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM y MIX 0,1 mM y, para calcular la unión inespecífica, AMP cíclico 10^{-6} M en el mismo buffer.

La incubación se efectuó a 6°C, durante 2 horas para determinar los sitios disponibles, o durante 16 horas para el dosaje de sitios totales. Finalizada la incubación, se agregaron 2 ml del buffer Tris-HCl y se filtró a través de Millipore (0,45 u). El tubo se lavó con 2 ml de buffer, dos veces y, luego, se lavó el filtro con 2 ml del mismo buffer Tris-HCl. El filtro se dejó secar y se

contó la radiactividad usando tolueno centelleante, en un contador de centelleo líquido Packard, modelo 3.320.

Para la determinación de los sitios de unión, utilizando el método gráfico de Scatchard³¹⁶, se utilizaron cantidades variables de AMP cíclico-³H.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS GENERADORAS DE NADPH

Las células intersticiales, obtenidas por tratamiento con colagenasa, fueron resuspendidas en 2 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, pH= 7,5, conteniendo KCl 25 mM, Sacarosa 0,25 M y MgCl₂ 17 mM. Esta suspensión fue homogeneizada en un homogeneizador Polytron, a 0°C y, luego, centrifugada a 15.000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga International, refrigerada, modelo B-20. El sobrenadante se utilizó como fuente enzimática.

Las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P DH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PG DH) e isocitrato deshidrogenasa (ISO DH), se ensayaron midiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm, usando un espectrofotómetro Beckman DB-G, con un registrador automático. La mezcla de reacción consistía

de: Tris-HCl 50 mM, pH= 7,5; MgCl₂ 17 mM; KCl 25 mM; sacarosa 0,25 M; NADP 3,3 x 10⁻⁴ M y D-glucosa-6-fosfato 6,6 x 10⁻⁴ M, 6-fosfo-D-gluconato 6,6 x 10⁻⁴ M o DL-isocitrato 1,66 x 10⁻⁴ M, en un volumen total de 1 ml, usando una dilución adecuada de la preparación enzimática.

Todas las enzimas se ensayaron dentro de las 4 horas posteriores a la extracción de los testículos.

PRODUCCION DE TESTOSTERONA UTILIZANDO UN SISTEMA GENERADOR DE NADPH

La producción de testosterona utilizando un sistema generador de NADPH³¹⁷, se determinó incubando células intersticiales en un incubador Dubnoff, a 37°C, durante una hora, bajo atmósfera de carbógeno. La mezcla de incubación consistía de: NADP 1 mM; D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 UI; D-glucosa-6-fosfato 5 mM y MIX 0,1 mM, en un volumen final de 2,8 ml.

Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas y el líquido sobrenadante se utilizó para la determinación de testosterona.

INCUBACION DE CELULAS DE LEYDIG EN PRESENCIA DE
DIBUTIRIL-AMP CICLICO, COLERATOXINA Y/O INHIBIDO-
RES DE LA SINTESIS DE TESTOSTERONA

La incubación de alícuotas de 2 ml de la suspensión de células de Leydig, obtenidas por tratamiento con colagenasa, se realizó en viales de polietileno, de 20 ml de capacidad, en presencia de MIX 0,1 mM. El agregado de hCG (300 ng), cóle ratoxina (50 ug), dibutiril-AMP cíclico (1 mM), se efectuó en alícuotas de 100 ul. Para permitir la determinación de pregnenolona y otros esteroides intermediarios de la síntesis de testosterona, producidos por las células de Leydig de ratas normales y diabéticas, se utilizaron dos inhibidores de la síntesis de testosterona⁵²: cianocetona (10^{-6} M) (Winthrop) y spironolactona (10^{-5} M) (Sigma). Estos inhibidores se disolvieron en etanol y los volúmenes deseados se pipetearon en los viales de incubación, evaporándolos bajo corriente de aire.

Luego de agregar las células a los viales, se incubaron en presencia de los agregados descritos, durante 3 horas, a 34°C, bajo atmósfera de carbógeno, con agitación constante.

Finalizada la incubación, se centrifugaron los incubados

y el sobrenadante se guardó a -20°C , para la determinación de testosterona y esteroides intermediarios, utilizando anticuerpos específicos.

Las células se lavaron con 1 ml de Medio 199, conteniendo MIX 0, 1 mM, y el precipitado celular se resuspendió en 1 ml de buffer de ensayo para la determinación de AMP cíclico, tal como se describió.

ESTUDIO DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-GONADAL

Para este experimento se utilizaron ratas normales, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina, 48 horas después de su castración. Se recogió la sangre de los animales, en condiciones basales y 48 horas después de su castración. Se permitió la separación del suero y se determinó la concentración de LH por radioinmunoanálisis.

-DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA LH SERICA

Se incubaron células de Leydig, obtenidas a partir de testículos de ratas normales, con distintas cantidades de suero de ratas normales, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina

(25, 50 y 100 ul). Paralelamente, se realizó una curva de estimulación de la síntesis de testosterona, con cantidades crecientes de hLH. Finalizada la incubación (2 horas a 34°C), se determinó la testosterona liberada al medio de incubación. Los valores obtenidos en las incubaciones con los sueros se compararon con los de la curva patrón³¹⁸.

-EVALUACION DE LA RESPUESTA HIPOFISARIA

Luego de administrar 5 y 25 ug de LHRH a ratas normales y diabéticas, enteras, se determinó la concentración sérica de hormona luteinizante, a los 10 minutos de la inyección, utilizando un radioinmunoanálisis específico.

RESULTADOS

INSULINA

Los datos encontrados acerca del efecto de la deficiencia en esta hormona sobre la función testicular, llevaron al estudio de la existencia de sitios receptores para insulina en la fracción intersticial del testículo de rata.

La figura 1 nos muestra el diagrama de saturación y su correspondiente gráfico de Scatchard, indicando la presencia de un único tipo de sitios de unión para insulina, con una constante de afinidad del orden de $1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

-ESTADO DIABETICO Y ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS GENERADORAS DE NADPH

La disminución observada en la respuesta testicular a la gonadotrofina exógena, en las ratas diabéticas, podría deberse también a la existencia de un daño en otras etapas intermedias entre el sitio de reconocimiento de la hormona y la respuesta fisiológica final del tejido (biosíntesis de testosterona).

Con el objeto de encontrar la causa de esta biosíntesis dañada, se investigó la fuente de energía de reducción (NADPH), como una de las etapas importantes en la producción de testos-

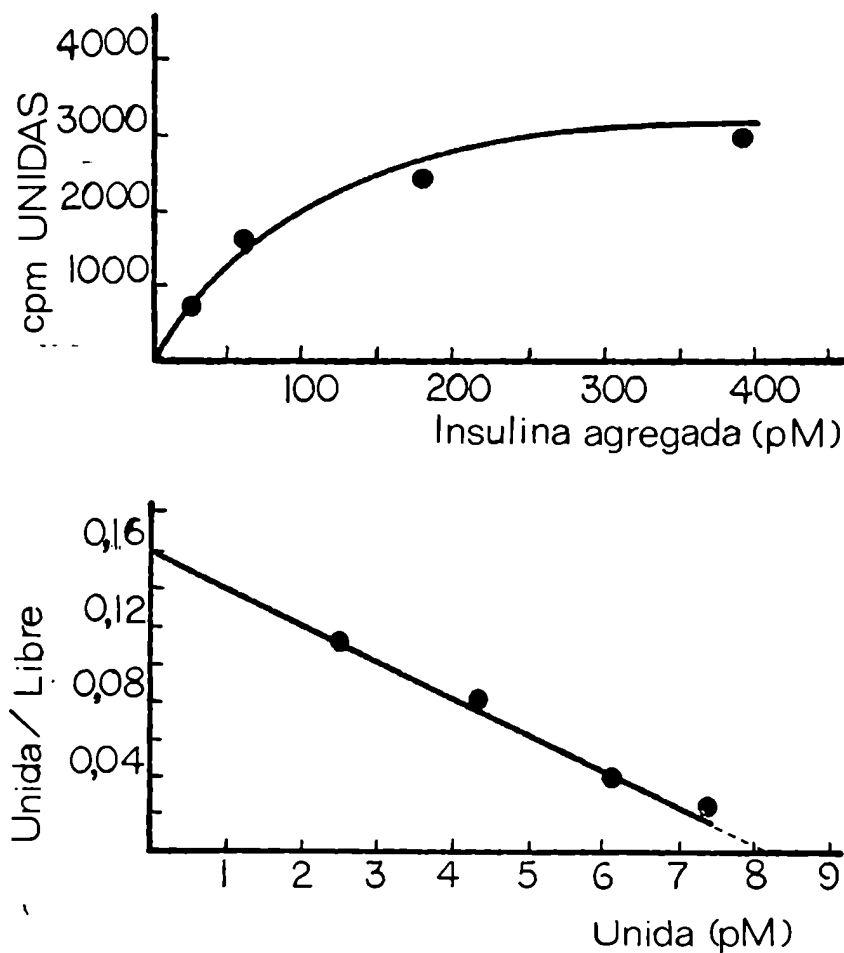


Figura 1. - Curva de saturación y gráfico de Scatchard para la unión de insulina a células intersticiales de testículo de rata. Las células obtenidas por tratamiento de testículos descapsulados con colagenasa, se incubaron con cantidades variables de insulina radiactiva, a 24°C, durante 20 horas. Finalizada la incubación por dilución con PBS frío, se determinó la radiactividad asociada al precipitado, en un contador gamma. Las incubaciones se realizaron por duplicado.

terona que podría estar afectada.

Una de las formas en que la hormona luteinizante podría acelerar la esteroidogénesis, sería aumentando la concentración de cofactores necesarios en el camino biosintético.

La síntesis de andrógenos requiere energía de reducción, bajo la forma de NADPH, estimulando la producción esteroidea mediante su papel como cofactor requerido en muchos de los pa sos esteroidogénicos, incluyendo la reacción de ruptura de la cadena lateral del colesterol. Así, una menor concentración de NADPH resultaría en una disminución de los niveles de su producto final (por ejemplo, testosterona).

Concomitantemente con la síntesis reducida de testostero na, se observó una disminución (casi a un 55% de la actividad normal) en la actividad de las enzimas productoras de NADPH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidroge nasa e isocitrato deshidrogenasa, en las células de Leydig de las ratas diabéticas por estreptozotocina (figura 2). Esta disminución de las actividades, podría ser consecuencia del aumento de la degradación proteica que se observa en la diabetes.

El tratamiento con insulina restablece sus actividades a

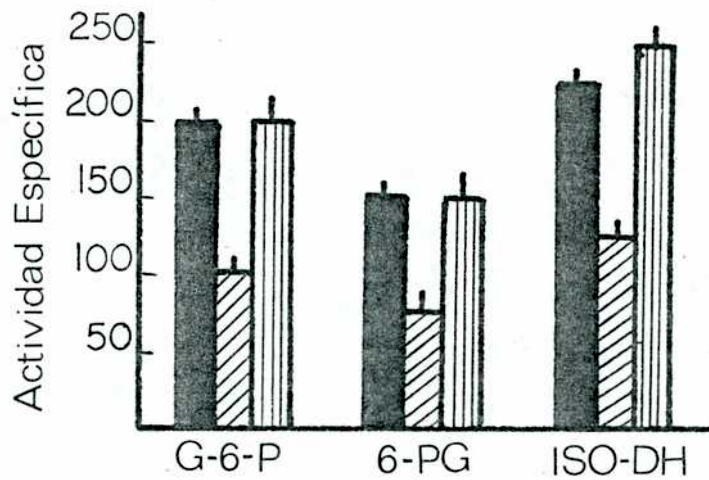


Figura 2. - Actividad específica de las enzimas generadoras de NADPH. Células intersticiales, obtenidas por tratamiento con colagenasa, fueron resuspendidas en buffer Tris-HCl 50 mM, pH= 7,5, conteniendo KCl 25 mM, sacarosa 0,25 M y MgCl₂ 17 mM. Esta suspensión se homogeneizó con un homogeneizador Polytron, a 0°C y centrifugada a 15.000 rpm, durante 30 minutos.

El sobrenadante se utilizó como fuente enzimática.

Las enzimas: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PG) e isocitrato deshidrogenasa (ISO DH) se ensayaron midiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm.

Animales: NORMALES ■
DIABETICAS ▨
DIABETICAS + INSULINA ▤

Cada barra representa el promedio de tres determinaciones.

los valores normales.

Si consideramos que el aporte disminuido de NADPH en el tejido intersticial de las ratas diabéticas, es el único factor de control de la esteroidogénesis, la disponibilidad de grandes cantidades de NADPH exógeno reduciría las diferencias en la síntesis de testosterona, observada cuando se la compara con células de ratas normales.

Sin embargo, los resultados obtenidos por incubación de homogenatos de células de Leydig con cantidades óptimas de NADPH, fueron cuantitativamente muy diferentes.

Aún con la adición de NADPH exógeno siguen existiendo las diferencias en la producción de testosterona (figura 3). Esto no ocurriría si el efecto de la diabetes estuviese mediado exclusivamente por la disponibilidad de NADPH.

Este experimento, a pesar de los problemas que se derivan de la interpretación de estos resultados, muestra que la biosíntesis dañada de testosterona, en la rata diabética, podría estar relacionada, sólo en parte, con las actividades reducidas de las enzimas generadoras de NADPH, antes mencionadas.

Por otra parte, el proceso por el cual la insulina ejerce-

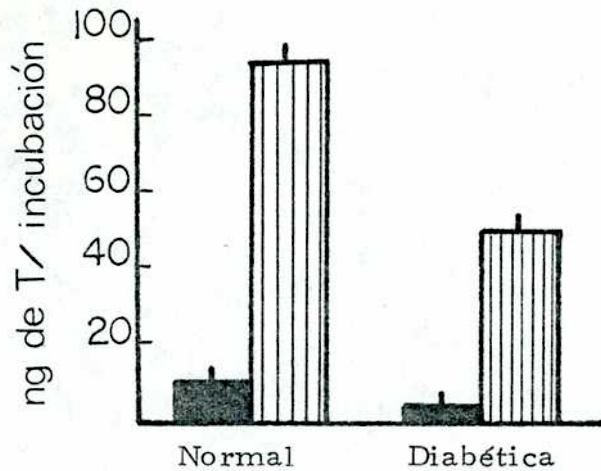


Figura 3. - Producción de testosterona por células intersticiales, utilizando un sistema generador de NADPH.

Se incubaron células intersticiales, homogeneizadas con un homogeneizador Polytron, a 37°C, durante una hora, bajo atmósfera de carbógeno. La mezcla de incubación consistía de: NADP 1 mM, D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 UI, D-glucosa-6-fosfato 5 mM y MIX 0, 1 mM, en un volumen final de 2, 8 ml.

Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas y el líquido sobrenadante se utilizó para la determinación de testosterona.

Incubaciones: SIN NADPH ■

CON NADPH ▨

Cada barra representa el promedio de tres incubaciones.

ría su efecto en la restauración de sus actividades podría ser por síntesis "de novo" de estas enzimas, como se ha probado en otros tejidos, pero su mecanismo de acción permanece oscuro.

Estos resultados nos llevaron a realizar otro experimento con el objeto de ubicar el posible bloqueo en la síntesis de testosterona.

-ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE TESTOSTERONA EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE SU SINTESIS

Para permitir una mejor determinación de pregnenolona, producida por las células de Leydig de ratas normales y diabéticas ante el estímulo de 300 ng de hCG, 50 ug de cóleratoxina o 1 mM de dibutiril-AMP cíclico, se utilizaron dos inhibidores de la síntesis de testosterona: cianocetona (10^{-6} M) y spironolactona (10^{-5} M). La cianocetona es un potente inhibidor de la actividad 3- β -hidroxi-esteroide óxido-reductasa- Δ^5 -isomerasa, "in vitro" e "in vivo"; la spironolactona es un inhibidor de la 17- α -hidroxilasa.

Los resultados pueden observarse en la tabla I. Se puede ver la falla en la producción de testosterona que ya se ha des-

TABLA I. - Estimulación de la síntesis de Testosterona por hCG, coleratoxina y dibutiril-AMP cíclico, en presencia de inhibidores de su síntesis (cianocetona (W) y/o spironolactona (S)).

AGREGADOS	TESTOSTERONA		PREGNENOLONA	
	NORMALES	DIABETICAS	NORMALES	DIABETICAS
Basal	62, 83	53, 12	4, 15	1, 05
hCG	379, 31	337, 50	3, 85	3, 39
Coleratoxina	298, 71	193, 75	3, 55	3, 64
Dibutiril-AMPc	464, 66	345, 83	2, 97	3, 91
W + S	33, 19	31, 25	23, 71	23, 96
hCG + W + S	50, 40	33, 33	90, 09	94, 80
db-AMPc + W + S	54, 52	35, 42	101, 94	96, 88
W	37, 31	16, 67	8, 30	11, 46
hCG + W	66, 38	47, 38	4, 74	16, 67
db-AMPc + W	97, 20	45, 83	10, 67	33, 33

Los valores están expresados en nanogramos/mg de ADN, en ambos casos.

Las incubaciones fueron realizadas en las condiciones mencionadas en el texto, por duplicado.

cripto en las ratas diabéticas.

Puede verse la inhibición de la síntesis producida por la presencia de los inhibidores, más acentuada en las ratas diabéticas que en las normales.

Observando la producción de pregnenolona, se puede ver que cuando se incuba con la mezcla de los dos inhibidores, la acumulación es igual para las normales y las diabéticas, indicando que no existiría falla en el nivel anterior a la producción de pregnenolona.

Sin embargo, cuando se incuba en presencia de cianocetona solamente (inhibidor de la Δ^5 -isomerasa), se puede observar una mayor acumulación de pregnenolona en las células provenientes de las ratas diabéticas, lo que podría indicar un bloqueo a nivel de la 17- α -hidroxilasa.

En otro experimento, estudiando la producción de testosterona y 17-HO-progesterona por células de Leydig de animales normales, diabéticos y diabéticos tratados con insulina, ante el estímulo con hCG, puede observarse (Tabla II) que, si bien la insulina restablece la producción normal de testosterona, no disminuye la relación 17-HO-progesterona/testosterona a va

TABLA II. - Estimulación de la síntesis de Testosterona (T) y 17-HO-progesterona (17-HO-P) por hCG (60 pg)

ANIMALES	T	17-HO-P	17-HO-P/T
Normales			
Basal	74,25	1,14	0,02
hCG	231,00	5,52	0,02
Diabéticas			
Basal	13,75	2,16	0,20
hCG	169,12	6,26	0,04
Diabéticas+Ins.			
Basal	16,50	0,05	0,003
hCG	191,12	11,16	0,06

Los valores están expresados en nanogramos/incubación, en ambos casos.

Las incubaciones se realizaron colocando igual cantidad de células nucleadas intersticiales (7×10^6 células).

Los valores están expresados como Promedio de dos incubaciones.

lores normales, indicando que no sería capaz de levantar el bloqueo existente, sino que su efecto estaría a nivel de una estimulación esteroideogénica general e inespecífica, posiblemente por síntesis "de novo" de las enzimas responsables de la biosíntesis esteroidea.

Por otra parte, la acumulación de 17-HO-progesterona, nos está hablando de la existencia de más de un punto de bloqueo en el camino esteroideogénico.

- ACCION DE LA INSULINA SOBRE LA PRODUCCION DE AMP CICLICO

Como ya se expuso en la introducción, las múltiples observaciones encontradas en la literatura están de acuerdo con el papel del AMP cíclico como intermediario de la esteroideogénesis inducida por la acción gonadotrófica en el testículo, aunque aún no se ha establecido la prueba final de este mecanismo.

Los intentos para correlacionar la disminución en la respuesta testicular a la LH exógena en las ratas diabéticas, con una falla en la producción de AMP cíclico fueron infructuosos dado que, en nuestras condiciones experimentales, el contenido endógeno de AMP cíclico, luego de la estimulación de las célu-

las de Leydig con LH (150 pM) fue mayor en la preparación celular proveniente de ratas diabéticas que en la proveniente de ratas normales (Tabla III).

Asimismo, la figura 4 muestra una curva de tiempo de producción de testosterona y el AMP cíclico liberado al medio de incubación por testículos descapsulados, estimulados con 6 ng de hCG. Puede observarse que, junto con una menor producción de testosterona en el caso de las ratas diabéticas, se observa una mayor liberación de AMP cíclico al medio de incubación.

Puede observarse que la insulina tiende a restablecer la producción de testosterona, mientras que se recupera totalmente la liberación del nucleótido al medio de incubación.

La acción de la insulina sobre los niveles de AMP cíclico es diversa. En algunos casos puede elevar sus niveles, inhibir la adenilato ciclasa o activar las fosfodiesterasas en otros.

El hecho de que la insulina restablezca la producción de AMP cíclico a su nivel normal, mientras la producción de testosterona sigue siendo menor que la de los controles, indica una

TABLA III. - Estimulación gonadotrófica del AMP cíclico intracelular en células de Leydig de ratas normales y diabéticas por estreptozotocina.

CONCENTRACION DE hCG	NORMAL	DIABETICA
—	52,72 ± 3,04 ^a	56,07 ± 3,90 ^c
150 pM	88,99 ± 6,89 ^b	129,44 ± 4,60 ^d

Todos los valores (Promedio ± E.S., n = 3) están expresados como pmoles/4 x 10⁶ células.

Las incubaciones con hCG fueron llevadas a cabo, durante 2 horas, como se describió oportunamente.

a vs b: p < 0,01 - c vs d: p < 0,02 - b vs d: p < 0,05

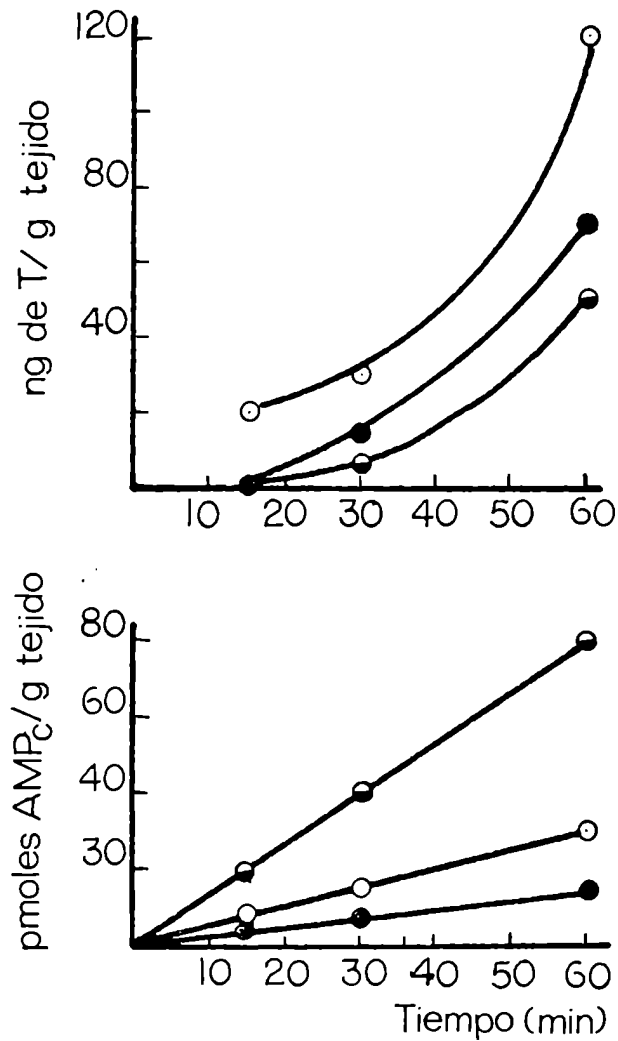


Figura 4. - Producción de testosterona y AMP cíclico, liberado al medio de incubación por testículos descapsulados, estimulados con 6 ng de hCG. La incubación se realizó a diferentes tiempos, a 34°C, en presencia de MIX 0,1 mM. Animales: NORMALES ○
DIABETICOS ●
DIABETICOS + INSULINA ●
Cada punto representa el Promedio de tres incubaciones.

disociación aparente entre estos dos eventos, aumentando la posibilidad de la existencia de un bloqueo a otro nivel de las etapas esteroideogénicas.

-OCUPACION DE LOS RECEPTORES PARA AMP CICLICO
DURANTE LA ESTIMULACION DE CELULAS DE LEYDIG
CON hCG

El candidato más lógico para ocupar el vacío entre los niveles aumentados de AMP cíclico y la función celular alterada, en respuesta a las hormonas peptídicas, parece ser la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

El grado de fosforilación de varias proteínas intracelulares parece estar regulado a través de la acción del AMP cíclico sobre proteína quinasas y su mecanismo podría dar cuenta, al menos en parte, de los diversos efectos biológicos del nucleótido cíclico.

Para resolver la importante cuestión acerca del papel intermediario del AMP cíclico en la respuesta esteroideogénica aguda a la hormona trófica, Dufau y col.⁴⁵, estudiando la ocupación de los sitios de unión para AMP cíclico en el componente regulatorio de la proteína quinasa de células de Leydig puri-

ficadas, demostraron que ocurren cambios progresivos en la producción de AMP cíclico y su unión a esta proteína, durante la estimulación gonadotrófica de la esteroidogénesis.

Por este motivo, se realizaron estudios para determinar los cambios en la ocupación de los receptores para AMP cíclico, durante la estimulación con hCG de ratas normales y diabéticas.

El estudio de este aspecto de la síntesis de testosterona, reveló que tanto en las ratas normales, como en las diabéticas, el número de sitios de unión para AMP cíclico permanece invariable (Tabla IV), así como también la constante de afinidad de la enzima por el nucleótido cíclico.

Estos estudios indican que la falla en la biosíntesis del andrógeno debe ser buscada más allá del sitio de producción del AMP cíclico y de su unión a su receptor citoplasmático, la proteína quinasa.

-ESTUDIO DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISARIO

Es sugestivo que en la rata diabética macho, aparezcan en el hipotálamo anterior, modificaciones en el consumo de oxí

TABLA IV. - Determinación de los sitios de unión para AMP cíclico en la fracción soluble de células de Leydig.

ANIMALES	$\frac{\text{pmoles AMPc}}{\text{mg proteína}}$	$K_a (M^{-1})$
NORMALES	$4,76 \pm 0,09$	$1,2 \times 10^9$
DIABETICAS	$5,64 \pm 0,08$	$1,0 \times 10^9$
INSULINA	$5,17 \pm 0,05$	$0,9 \times 10^9$

Los valores están expresados como Promedio \pm E. S.

En cada caso se realizaron tres determinaciones.

geno y también en la producción de ácido láctico, análogas, aunque menos marcadas, a las observadas después de la castración en las ratas normales.

Si bien los conocimientos actuales conducen a pensar que la relación entre la hiperglucemia y los niveles bajos de testosterona sería la causa de la infertilidad en la rata macho, no existen pruebas directas que expliquen cómo se efectuaría.

Una posibilidad sería que la hiperglucemia afectase directamente el testículo, disminuyendo la producción de testosterona. Otra sería que bloquease la acción de las hormonas sobre los efectores, modificando ya fuera los sitios de reconocimiento o discriminadores, 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 serían, en parte, debidos a las alteraciones en la secreción o producción de gonadotrofinas hipofisarias.

Se ha demostrado la existencia de niveles bajos de gonadotrofinas, ocho días después de la inducción de la diabetes por aloxano. En la rata pancreatopriva, los valores basales de ambas

hormonas no parecen diferir de los correspondientes controles normales.

Sin embargo, observaciones de que la administración de propionato de testosterona, en dosis de hasta 0,5 mg/día, no produce una disminución significativa en las concentraciones séricas de gonadotrofinas, nos llevó a investigar una posible alteración en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

Este mecanismo de retroalimentación alterado, como se ve en la tabla V, se demuestra por la capacidad limitada de los animales diabéticos de responder a la gonadectomía. En esta tabla tenemos los valores séricos de LH, determinados por radioinmunoensayo, en condiciones basales y medidos 48 horas después de la castración.

Se puede observar que las ratas diabéticas presentan iguales valores basales, pero que son incapaces de responder con un aumento, frente a la castración, mientras que la administración de insulina revierte totalmente este efecto.

Sin embargo, cuando se determina la actividad biológica de la LH sérica (figura 5), se observa que la insulina no es capaz de restablecer el valor hallado para las ratas diabéticas, a la nor-

TABLA V. - Determinación de LH sérica por radioinmunoensayo, en condiciones basales y 48 horas después de la castración.

ANIMALES	BASAL	CASTRADOS
NORMALES	2,87 ± 0,28 ⁶	10,2 ± 1,8 ⁴
DIABETICOS	2,56 ± 0,27 ⁵	2,8 ± 0,8 ³
INSULINA	2,83 ± 0,28 ⁴	11,2 ± 1,1 ⁴

Todos los valores están expresados como microgramos de LH de rata/ml de suero.

El supraíndice indica el número de animales por grupo.

Todos los valores están expresados como Promedio ± E. S.

Las diferencias entre los valores basales de los diferentes grupos no son significativas.

Diferencias entre los valores, 48 horas después de la castración: N vs D: $p < 0,02$ - D vs D+I: $p < 0,01$

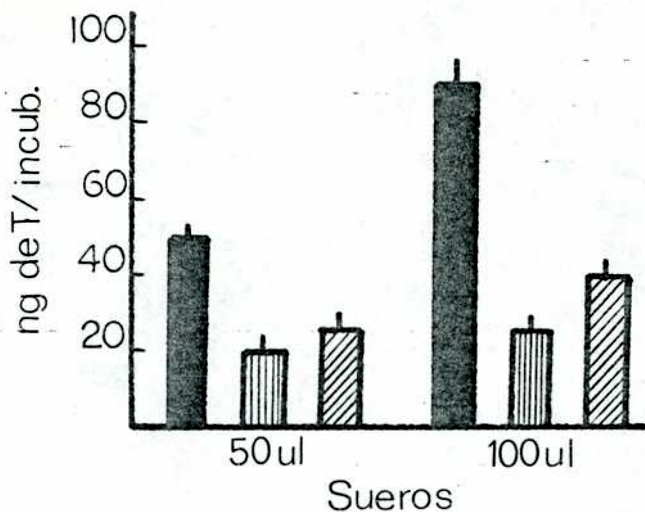


Figura 5. - Determinación de la actividad biológica de la LH de sueros de ratas normales y diabéticas. Se incubaron células intersticiales con distintas cantidades (50 y 100 ul) de suero. Finalizada la incubación (2 horas a 34°C), se determinó la testosterona liberada al medio de incubación. Las ratas fueron castradas y, 48 horas después, fueron sacrificadas por decapitación, colectándose la sangre que se utilizó para el experimento. Sueros: NORMALES ■
DIABETICOS ▨
DIABETICOS + INSULINA ▩
Cada barra representa el promedio de tres incubaciones.

malidad. Esto indicaría que, si bien la LH producida luego de la administración de insulina es radioinmunológicamente idéntica a la encontrada en las ratas normales, tendría alteraciones en su porción biológicamente activa que, la insulina, por lo menos en el tiempo que duró este experimento, no fue capaz de revertir.

La tabla VI muestra la respuesta de la hipófisis de la rata normal y diabética ante el estímulo con el LHRH. Se puede observar la respuesta disminuida que presentan las ratas diabéticas.

PROLACTINA

-RECEPTORES ESPECIFICOS PARA PROLACTINA EN CELULAS DE LEYDIG. CARACTERIZACION PARCIAL

Se ha demostrado la existencia de receptores específicos para prolactina en el tejido intersticial de testículo de rata. En la figura 6 se puede observar el diagrama de saturación y de desplazamiento de la hormona radiactiva con hormona no marcada. El diagrama de Scatchard indica que posee una constante de afinidad del orden de $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

TABLA VI. - Determinación de la liberación de LH, luego de la inyección de LHRH.

TRATAMIENTO	CONTROL	DIABETICA
Salina	$0,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$
LHRH (5 ug)	$2,5 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$
LHRH (25 ug)	$5,4 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,2$

Los valores están expresados en nanogramos de LH de rata/ml de suero.

Las determinaciones se efectuaron 10 minutos después de la inyección del LHRH.

Los valores son Promedio de (8) animales.

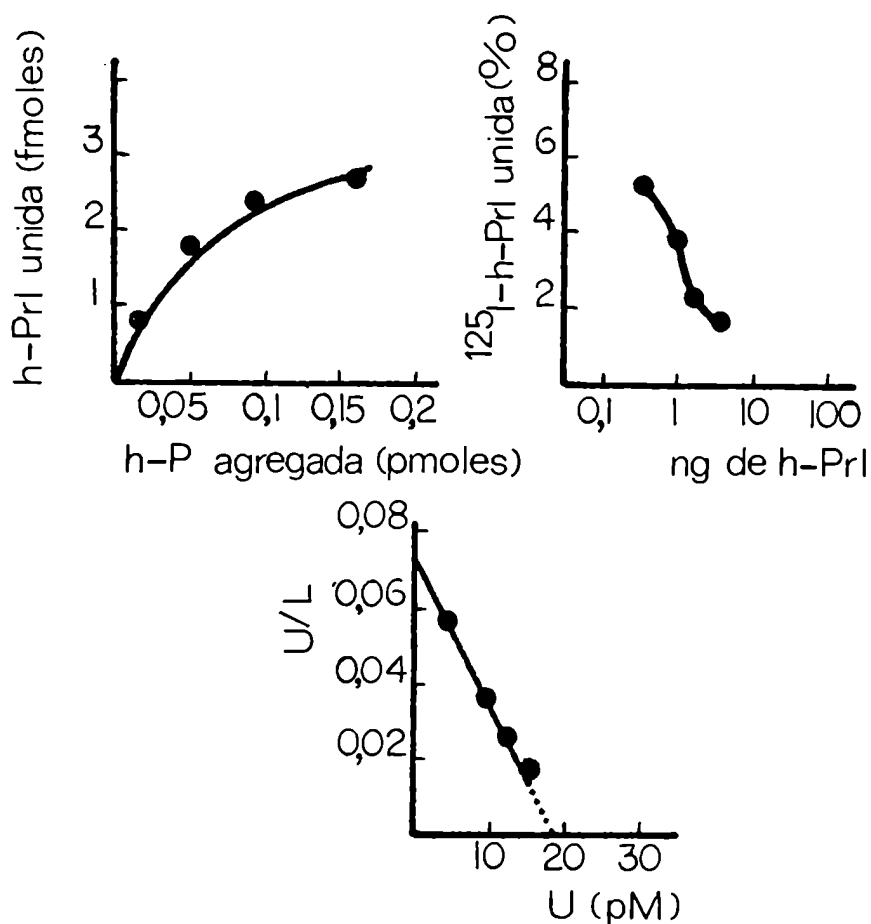


Figura 6. - Unión de prolactina humana a células intersticiales de testículo de rata.
(A) Unión específica de prolactina humana a 25 mg de homogenato de testículo. La saturación de los sitios de unión ocurre a una concentración hormonal de 0,3 pmoles por 0,2 ml. (B) Ensayo de radioligando-receptor de prolactina humana, en presencia de la fracción de 27.000 x g equivalente a 1/100 de un testículo de rata adulta. (C) Gráfico de Scatchard, a 22°C. $K_a = 3 \times 10^9 M^{-1}$
Las incubaciones fueron realizadas por duplicado.

La solubilización de los receptores para prolactina de las células intersticiales testiculares, fue realizada en la forma más efectiva mediante la extracción de la fracción 120 - 27.000 x g de células de Leydig, con detergentes no iónicos como Tritón X-100 al 1%. Este detergente extrae el 20-40% de los complejos premarcados prolactina-receptor, mientras que otros detergentes no iónicos como el Lubrol PX o PW y los detergentes iónicos como el deoxicolato de sodio, son menos efectivos en solubilizar al receptor de prolactina.

El complejo prolactina-receptor solubilizado, permanece en solución luego de ser centrifugado a 360.000 x g, durante 1 hora y pudo ser analizado por gradientes de centrifugación en sacarosa 5-20% (figura 7). Este complejo presenta una constante de sedimentación de, aproximadamente, 6S, claramente distinta al complejo LH-receptor, cuya constante de sedimentación, en las mismas condiciones experimentales, es de 8,8S.

El papel de los grupos sulfhidrilos y disulfuros proteicos en la unión de la hormona, se investigó determinando la capacidad de unión luego de la reducción y/o alquilación de receptores libres o del complejo ya preformado hormona-receptor.

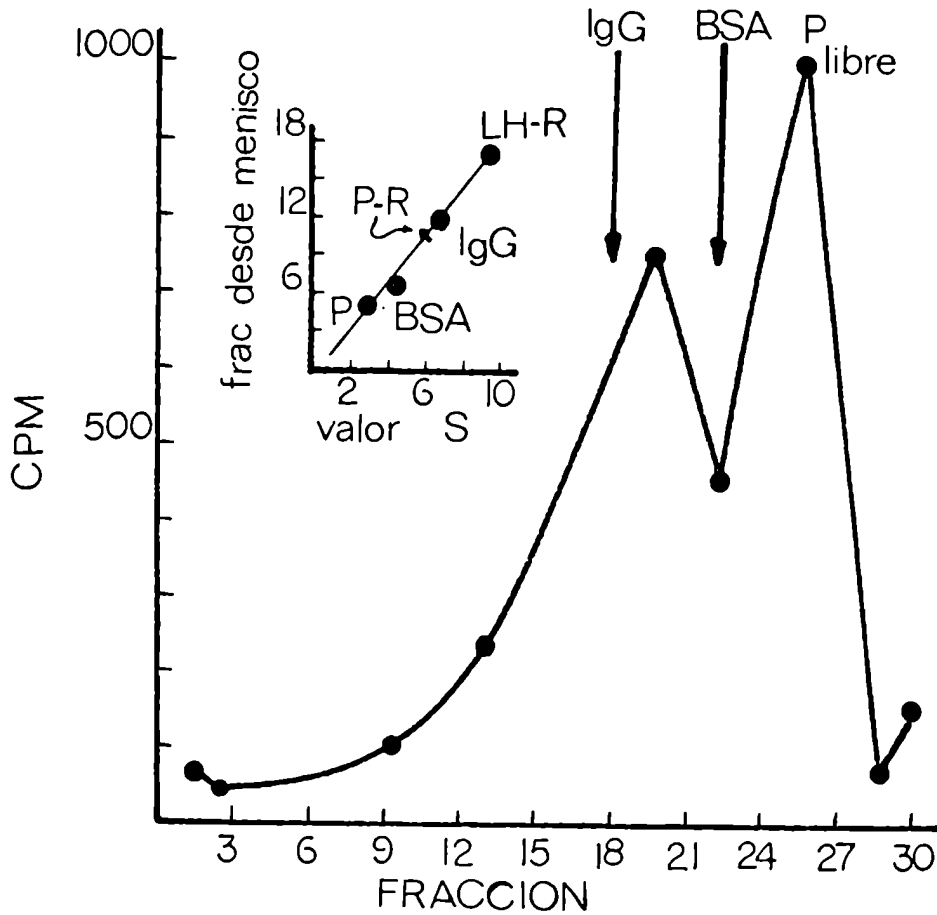


Figura 7. - Gradiente de ultracentrifugación en sacarosa 5-20% de las partículas receptoras, marcadas con prolactina radiactiva, solubilizadas con detergente Tritón X-100 al 1%. Como proteínas marcadoras se utilizaron IgG, BSA. Incluida en la figura se encuentra el valor de la constante de sedimentación, extrapolada del gráfico: fracción a partir del menisco vs. constante de sedimentación calculada para las proteínas marcadoras.

En la figura 8 puede observarse que el tratamiento del receptor libre con ditioneitol (DTT) (10 mM) o 2-mercaptoetanol (10 mM), durante 60 minutos, a 22°C, no produce disminución en la capacidad de unión de 125 I-Prl, indicando que la presencia de grupos disulfuros no jugaría un papel esencial en el mecanismo de unión. Sin embargo, el tratamiento con N-etilmaleimida (NEM) (10 mM), redujo aproximadamente en un 50% la capacidad de unión del receptor, indicando que grupos SH accesibles, estarían involucrados en la unión de la hormona.

Cuando el tratamiento con los agentes reductores y/o alquilantes se realizó luego de producida la unión hormona-receptor, no se observó disminución en la capacidad de unión, indicando que estas sustancias no causan la disociación del complejo preexistente. Esta falta de efecto sobre el complejo hormona-receptor sugiere que los grupos S-S no juegan un papel importante en la unión y que los grupos SH estarían en una zona adyacente al sitio receptor, jugando un papel esencial en el mecanismo de unión, quedando protegidos luego de la unión con la hormona.

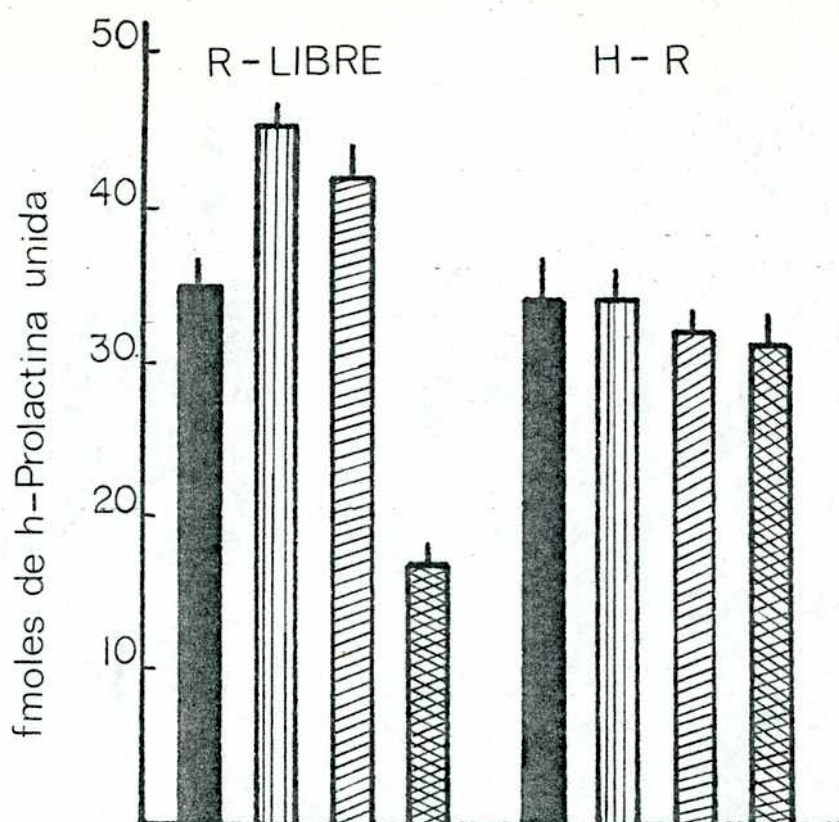






Figura 8. - Efecto de agentes reductores y alquilantes sobre la capacidad de unión del receptor para prolactina, libre y sobre el complejo hormona-receptor preformado.

Izquierda: reducción y alquilación de receptores libres: unión de prolactina radiactiva por receptores particulados previamente tratados con DTT (10 mM), 2-mercaptoetanol (10 mM) o NEM (10 mM), durante 60 minutos a 22°C. Derecha: Reducción y alquilación del complejo receptor-hormona: retención de la hormona unida por el receptor, luego del tratamiento con los mismos agentes.

Tratamientos: DTT 
 2-mercaptoetanol 
 NEM 
 CONTROL 

-ACCION DE LA PROLACTINA SOBRE LOS RECEPTORES
PARA LH Y FSH

La administración de 50 y 500 ug de prolactina a ratas de 30 días de edad, durante 9 días, en dos dosis diarias subcutáneas de 25 y 250 ug cada una, produjo un incremento en la capacidad de las células de Leydig para unir LH. Este resultado puede verse en la figura 9, donde se muestra el gráfico de Scatchard para los tres grupos de animales. Puede observarse un incremento en el total de sitios de unión, dependiente de la dosis, mientras que la constante de afinidad se mantiene inalterada ($K_a = 6,6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$). La cantidad de sitios de unión, expresada en fmoles/mg de DNA fue de:
CONTROLES: $32,35 \pm 2,85$; INYECTADOS CON 50 ug de o-PRL: $83,37 \pm 1,96$; INYECTADOS CON 500 ug de o-PRL: $140,74 \pm 4,34$.

En otro experimento se investigó la acción de la prolactina sobre los sitios receptores para LH y FSH. Los animales fueron tratados con: prolactina (500 ug), mesilato de bromocriptina (3 mg por Kg de peso, en 2 dosis diarias) o sulfato de sulpiride (Vipral) (7 mg/día/rata, en dos dosis).

En la figura 10 puede verse el efecto sobre los receptores

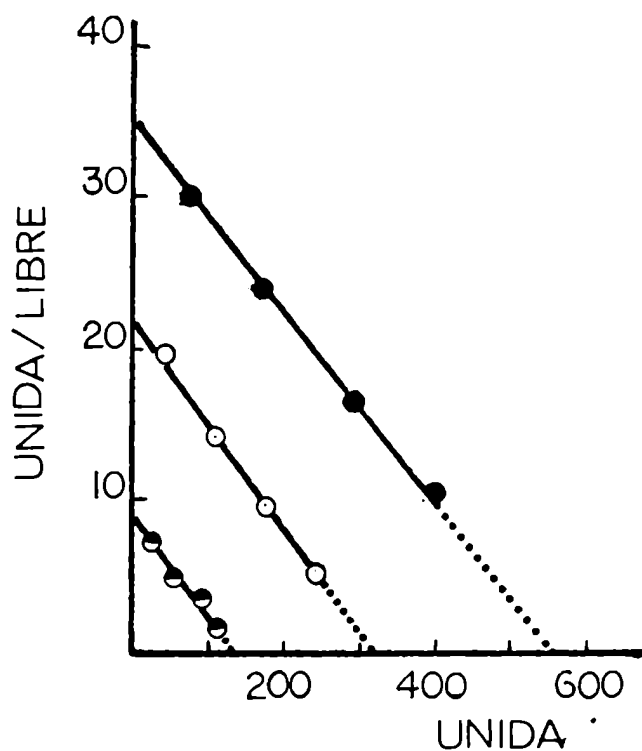


Figura 9. - Acción de la prolactina sobre los receptores para LH.

Gráfico de Scatchard obtenido luego de incubar células intersticiales, obtenidas de testículos de ratas tratadas con 50 ó 500 ug de prolactina ovina, con cantidades variables de LH radiactiva. La incubación se realizó a 24°C, durante 20 horas.

Finalizada la incubación por dilución con PBS, se determinó la radiactividad del precipitado, midiendo en un contador gamma.

GRUPOS: CONTROLES ●

PROLACTINA 50 ug ○

PROLACTINA 500 ug ●

Cada punto es promedio de dos incubaciones.

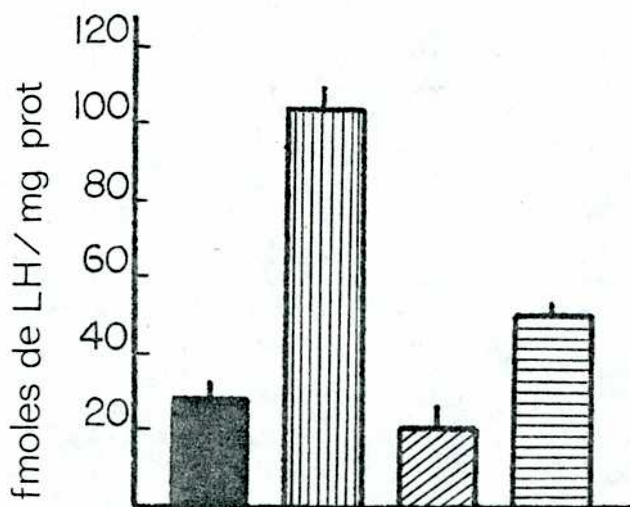


Figura 10. -Acción de la prolactina, bromocriptina y sulpiride sobre los receptores para LH.

Los animales fueron tratados con 500 ug de prolactina ovina (▨), mesilato de bromocriptina (3 mg/kg) (▧) o sulfato de sulpiride (7 mg/rata) (▩).

Las células intersticiales, aisladas de los testículos de estas ratas, fueron incubadas en presencia de cantidades variables de hormona luteinizante radiactiva, a 24°C, durante 20 horas.

La cantidad de sitios receptores/mg de proteína se determinó a partir de gráficos de Scatchard. CONTROLES (■), inyectados con vehículo.

Cada gráfico de Scatchard se realizó a partir de 4 incubaciones realizadas por duplicado.

para LH, observándose que la prolactina y el sulpiride (liberador de prolactina) aumentan la cantidad de sitios receptores, mientras que la bromocriptina (inhibidor de la liberación de prolactina), los disminuye ligeramente.

Por otra parte, como puede verse en la figura 11, no se observan modificaciones en el contenido de receptores para FSH, indicando que la prolactina no regula el número de estos sitios receptores.

Este estudio pone en evidencia la acción regulatoria de la prolactina sobre los sitios receptores para LH, utilizando diversos tratamientos para provocar el aumento o la disminución de los niveles séricos de esta hormona.

-EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA RESPUESTA TESTICULAR A LA GONADOTROFINA EXOGENA

-EFECTO "IN VIVO"

Luego de administrar, durante 9 días, 50 ó 500 ug de o-Prl a ratas de 30 días de edad, se las sacrificó por decapitación, colectándose su sangre para la determinación de testosterona. Los testículos fueron descapsulados y se los sometió a tratamiento con colagenasa, para obtener un preparado de células intersticiales.

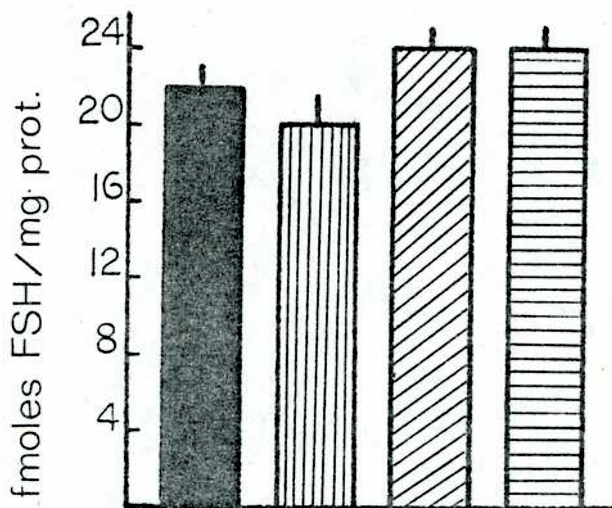


Figura 11. -Efecto de la prolactina, bromocriptina y sulpiride sobre los receptores para FSH. Los animales fueron tratados con 500 ug de prolactina ovina (▨), mesilato de bromocriptina (3 mg/Kg) (▧) o sulfato de sulpiride (7 mg/rata) (▩). Los túbulos seminíferos de estas ratas fueron incubados en presencia de cantidades variables de FSH radiactiva, a 24°C, durante 20 horas. La cantidad de sitios receptores/mg de proteína se determinó a partir de gráficos de Scatchard (n= 8) CONTROLES (■), inyectados con vehículo.

En la figura 12 se observan los valores de testosterona sérica de estos animales, indicando la acción de prolactina a dosis bajas sobre la secreción testicular de este andrógeno. Es interesante destacar que la mayor dosis de prolactina no tuvo efecto sobre la testosterona plasmática.

Las células obtenidas, se incubaron en presencia de 1 ng de hCG y la producción de testosterona se muestra en la figura 13. Puede verse que las células provenientes de ratas tratadas con la menor dosis de prolactina, responden a la estimulación con gonadotrofina exógena produciendo mayor cantidad de testosterona, mientras que no se observa respuesta en el caso de células provenientes de ratas tratadas con la dosis mayor de prolactina. Este resultado está de acuerdo con el dato presentado antes, de testosterona sérica.

En la figura 14, se muestran los valores de AMP cíclico formado y liberado al medio de incubación por la estimulación gonadotrófica. Puede verse, sin embargo, que tanto el AMP cíclico intracelular como el liberado al medio de incubación, muestran un incremento dependiente de la dosis de prolactina administrada al animal. Esto está de acuerdo con el aumento en los si-

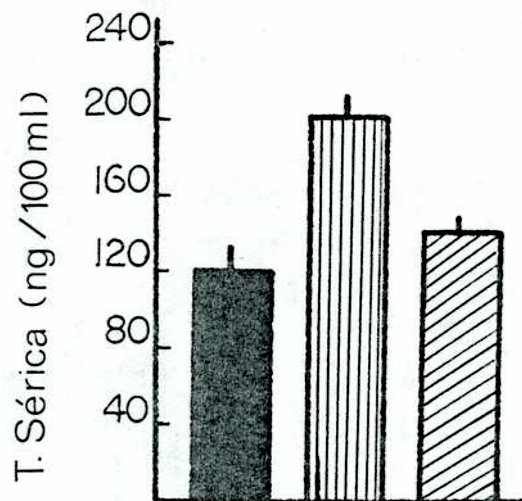


Figura 12. - Testosterona sérica de ratas inyectadas con distintas cantidades de prolactina ovina. Los animales inyectados con vehículo (■), con 50 ug de prolactina ovina (▨) o con 500 ug de prolactina ovina (▩), fueron sacrificados por decapitación y su sangre fue colectada. Luego de la separación del suero, se tomó una alícuota que se extrajo con éter para la posterior determinación de testosterona por radioinmunoensayo. (n= 6).

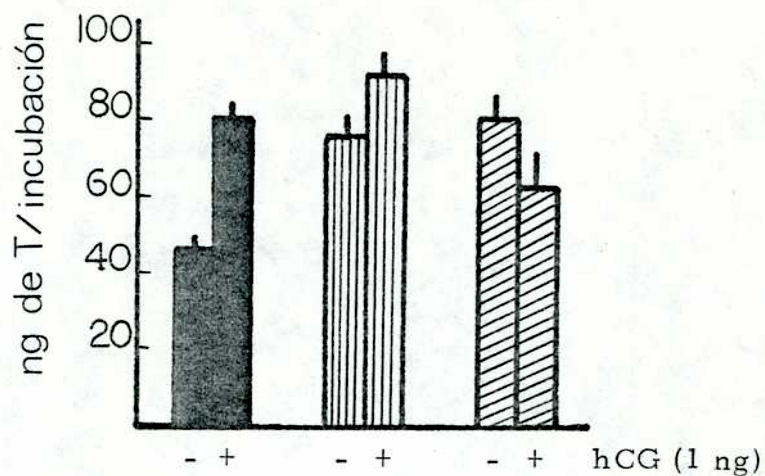


Figura 13. -Estimulación de células intersticiales de animales tratados con distintas dosis de prolactina ovina, con gonadotrofina exógena. Las células intersticiales, obtenidas a partir de testículos de ratas controles (■), inyectadas con 50 ug de prolactina ovina, durante 9 días (▨) o con 500 ug de prolactina ovina, durante el mismo tiempo (▧), fueron incubadas con 1 ng de hCG, durante 2 horas, a 34° bajo atmósfera de carbógeno, por triplicado. Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas y el líquido sobrenadante se utilizó para la determinación de testosterona.

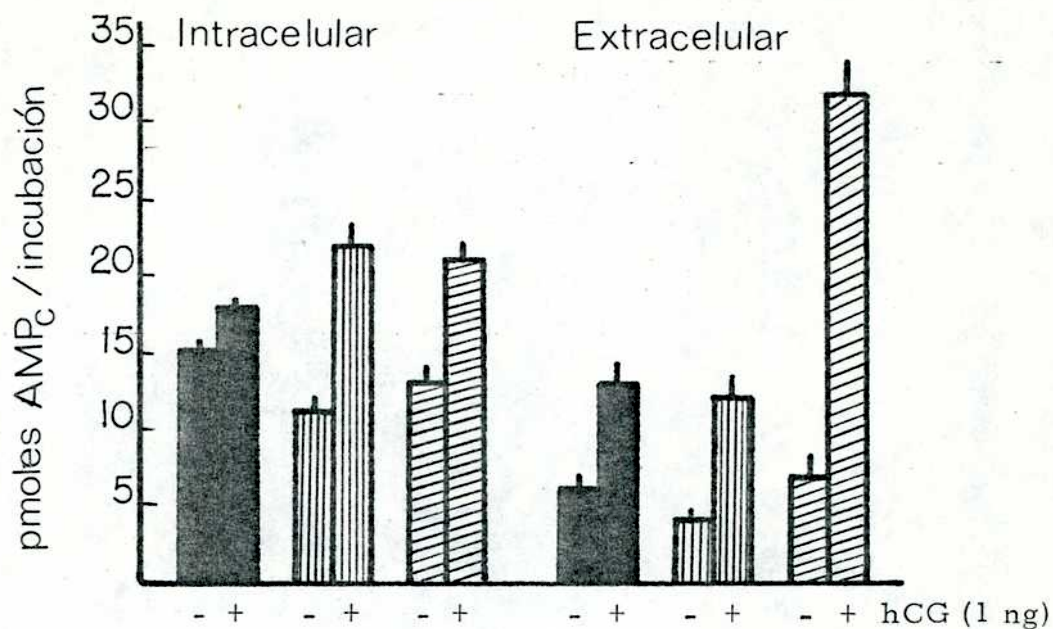


Figura 14. -Estimulación de la producción de AMP cíclico por células intersticiales de animales tratados con distintas dosis de prolactina ovina. Las células intersticiales, obtenidas a partir de testículos de ratas controles (■), inyectadas con 50 ug de prolactina ovina, durante 9 días (▤) o con 500 ug de prolactina ovina, durante el mismo tiempo (▨), fueron incubadas con 1 ng de hCG, durante 2 horas, a 34°C, por triplicado. Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas y el líquido sobrenadante se utilizó para la determinación de AMP cíclico. El precipitado celular fue lavado una vez con Medio 199, conteniendo MIX 0, 1 mM y resuspendidas en buffer de ensayo para AMP cíclico. Se las sonicó durante 15 segundos y se las hirvió a 100°C, durante 10 minutos. Luego de centrifugarlas, el sobrenadante se utilizó para la determinación de AMPc intracelular.

tios receptores para LH, antes mostrado, y evidencia la estrecha relación existente entre sitios receptores y actividad de adenilato ciclasa, así como también la aparente disociación entre los niveles del nucleótido cíclico y la esteroidogénesis. Es evidente que la producción de testosterona depende de otros factores que se encuentran más allá del sitio de producción del pretendido "segundo mensajero".

-EFECTO "IN VITRO"

En la tabla VII se muestran los efectos de la prolactina sobre la producción de testosterona, cuando se incubaron células intersticiales con cantidades variables de hCG, en presencia o ausencia de 50 ng de r-Prl. Puede observarse el efecto sinérgico de la prolactina sobre la producción de testosterona, para cada una de las dosis de hCG agregada al medio de incubación.

Es bien sabido que en el proceso de aislamiento de la prolactina, a partir de la glándula hipófisis, resulta difícilso eliminar las demás hormonas hipofisarias. Esto puede hacer sospechar la presencia de cantidad suficiente de hormona luteinizante como para producir el efecto antes mencionado.

TABLA VII. - Producción de testosterona por células de Leydig, estimuladas con hCG, en presencia de prolactina de rata.

CONCENTRACION DE hCG (pg)	SIN r-Prl	CON r-Prl (50 ng)	p <
0	11,37	22,64	0,05
7,8	13,70	27,34	0,05
15,6	16,27	28,20	0,20
31,2	15,34	34,49	0,02
250,0	107,27	168,28	0,02
500,0	158,67	178,07	0,05

Los valores están expresados como nanogramos de testosterona/10⁶ células.

Las incubaciones se realizaron por triplicado, a 34°C, durante 2 horas.

Para evitar este problema, se sometió a la prolactina, previamente a su utilización, a una purificación a través de una columna de Concanavalina A-Sepharosa, con el objeto de que toda la hormona luteinizante que pudiese estar presente, quedase adherida a la columna, aprovechando el carácter glicoproteico de esta hormona. La prolactina así purificada, se utilizó en un experimento de estimulación de células de Leydig, cuyo resultado puede verse en la figura 15. Se observa que la prolactina purificada es capaz de estimular sinérgicamente con la LH la producción de testosterona.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de la acción complementaria de la prolactina en la producción de testosterona ante el estímulo gonadotrófico.

-ACCION DE LA PROLACTINA SOBRE LA PROTEINA QUINASA DE LA CELULA DE LEYDIG

Se ha postulado que la acción de la prolactina en tejido mamario estaría mediada por el aumento en el número de sitios intracelulares de unión para AMP cíclico, es decir, en el incremento de la cantidad de proteína quinasa dependiente de este nucleótido cíclico.

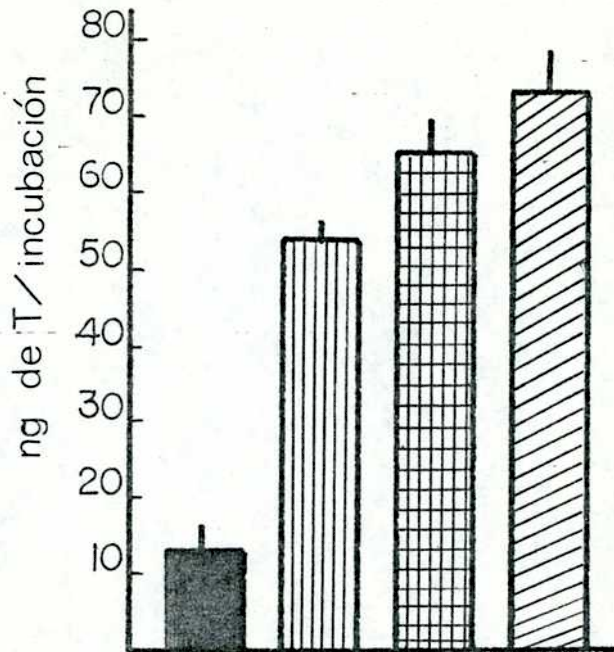


Figura 15. -Estimulación "in vitro" de células intersticiales con hCG y prolactina, purificada por columna de Concanavalina A. Células intersticiales, obtenidas por tratamiento con colagenasa, fueron incubadas en presencia de 200 pg de hCG (▤), 200 pg de hCG + 50 ng de prolactina (▣) y 200 pg de hCG + 50 ng de prolactina previamente purificada por Concanavalina A (▨). Luego de incubar las células durante 2 horas a 34°C, el líquido sobrenadante de la centrifugación se utilizó para la determinación de testosterona. Niveles basales (■). Las incubaciones se realizaron por triplicado.

En un intento de estudiar el efecto de la prolactina sobre estas enzimas en las células de Leydig, se determinó la cantidad de sitios totales de unión para AMP cíclico en el citoplasma de células intersticiales obtenidas de testículos de ratas de 30 días de edad, tratadas con 50 ó 500 ug de prolactina ovina, durante 9 días. El resultado, según el gráfico de Scatchard, se muestra en la figura 16. Se puede ver el aumento en el número de sitios de unión, según la dosis de prolactina, observándose que la estimulación es mayor en el caso en que la dosis administrada fue de 50 ug, mientras que para la dosis mayor el incremento es inferior. Esto representaría un efecto dual de la prolactina, siendo menor la estimulación pasado un cierto umbral o límite.

Puede verse que la constante de afinidad permanece inalterada ($K_a = 1,06 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$).

En la figura 17 se puede observar la ocupación de estos sitios de unión por el AMP cíclico producido ante el estímulo de 1 ng de hCG, conjuntamente con los niveles intracelulares del nucleótido cíclico.

Estos experimentos indican que, al menos una de las fun

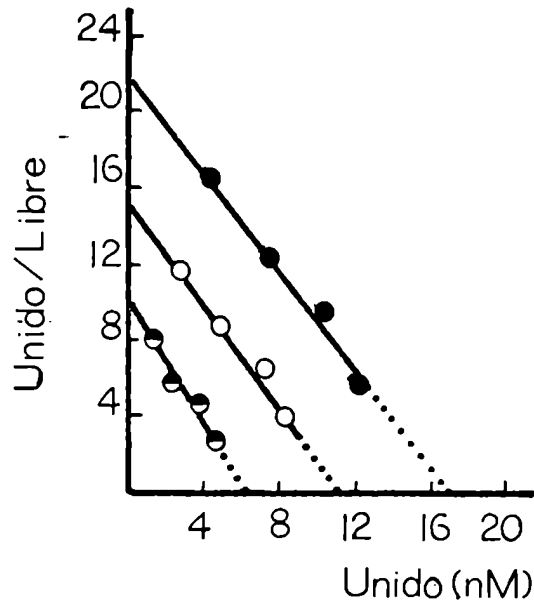


Figura 16. -Sitios totales de unión de AMP cíclico en células intersticiales de ratas tratadas con distintas dosis de prolactina ovina. Células intersticiales, obtenidas a partir de animales controles (●), inyectados con 50 ug de prolactina ovina, durante 9 días (●) o inyectadas con 500 ug de prolactina ovina, durante el mismo tiempo (○), fueron sonicadas durante 15 segundos y, luego de ultracentrifugarlas a 105.000 x g, durante 60 minutos, el sobrenadante se utilizó para la determinación de sitios de unión de AMPc. La incubación se llevó a cabo en presencia de cantidades variables del nucleótido tritiado, durante 16 horas, a 6°C. La cantidad de sitios receptores de AMPc, se determinó mediante el gráfico de Scatchard. Las incubaciones se realizaron por duplicado.

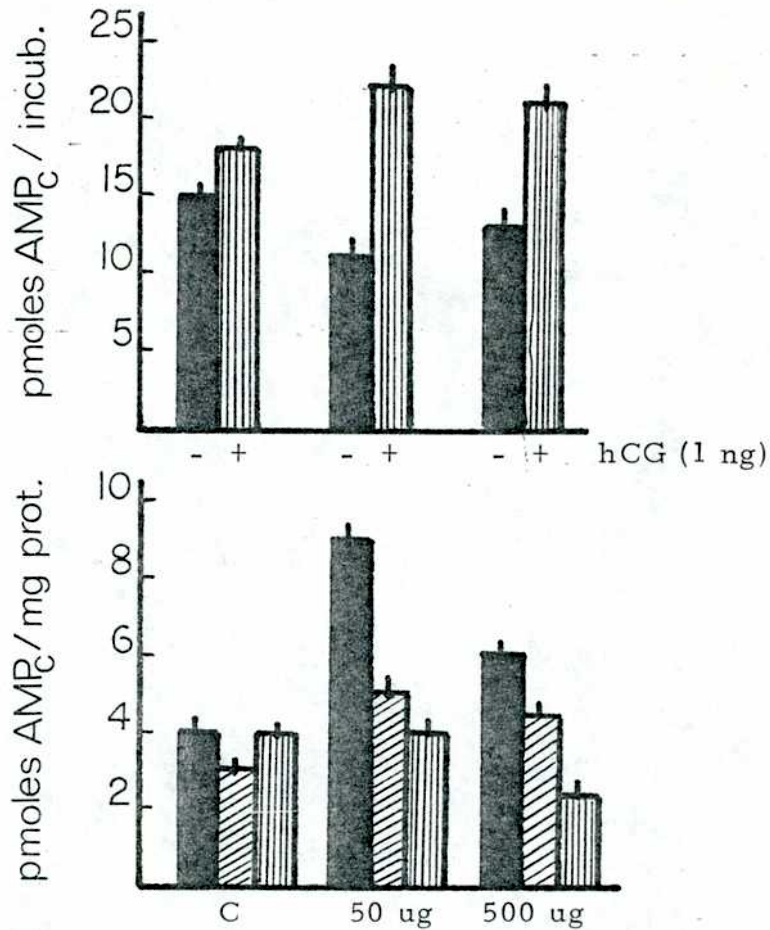


Figura 17. -Arriba: Niveles intracelulares de AMP cíclico, producidos en respuesta a 1 ng de hCG, por células intersticiales de animales controles (C), inyectados con 50 ug de prolactina ovina, durante 9 días (50 ug) o inyectados con 500 ug de prolactina ovina (500 ug). (n= 3)
Abajo: Sitios receptores para AMP cíclico, en células intersticiales.
Las barras (■) indican la concentración total de sitios receptores. Las barras (▨) indican la cantidad de sitios disponibles, basales. Las barras (▤) indican la cantidad de sitios libres, luego de estimulación con 1 ng de hCG. (n= 3)

ciones de la prolactina en la regulación de la función testicular sería la de aumentar el número de sitios de reconocimiento intracelulares del AMP cíclico formado ante el estímulo gonadotrófico.

HORMONA LUTEINIZANTE

-MECANISMO DE DESENSIBILIZACION: EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE DOS DOSIS DE hCG

Ratas machos de 90 días de edad fueron inyectadas, subcutáneamente, con 200 UI de hCG y sacrificadas por decapitación a los 5 días de la inyección. Otro lote de animales recibió una segunda dosis de hCG, 48 horas después de la primera y fueron sacrificados tres días después de esta segunda administración de gonadotrofina. Un tercer grupo de animales recibió la segunda dosis a los siete días de recibida la primera inyección y fueron sacrificados tres días después de la segunda inyección. Un cuarto lote de animales se reservó como control y recibieron una inyección de vehículo (buffer fosfato salino, Dulbecco pH= 7,4).

Inmediatamente después de sacrificar los animales, los testículos fueron utilizados para la determinación de sitios re-

ceptores de LH y para su estimulación, "in vitro", con gonadotropina exógena. En la sangre colectada se determinó la concentración de testosterona.

La figura 18 muestra los niveles séricos de testosterona. Puede observarse que la dosis única de testosterona disminuye significativamente los niveles de testosterona medida cinco días después de su administración. Cuando la determinación del andrógeno circulante se realiza tres días después de la segunda inyección de hCG se observa la existencia de respuesta testicular a la gonadotropina, al detectarse niveles aumentados de testosterona.

Cuando se determinó la cantidad de sitios receptores para LH o hCG en los testículos de estos animales, se obtuvieron los resultados presentados en la figura 19. A los cinco días de la primera dosis de hormona, los sitios receptores se encuentran significativamente disminuidos, recuperándose parcialmente a los 10 días. Cuando se administra una segunda dosis, 48 horas después de la primera, los receptores permanecen disminuidos, tres días después de la segunda administración de gonadotropina y se observa una recuperación menor 10 días después de la primera

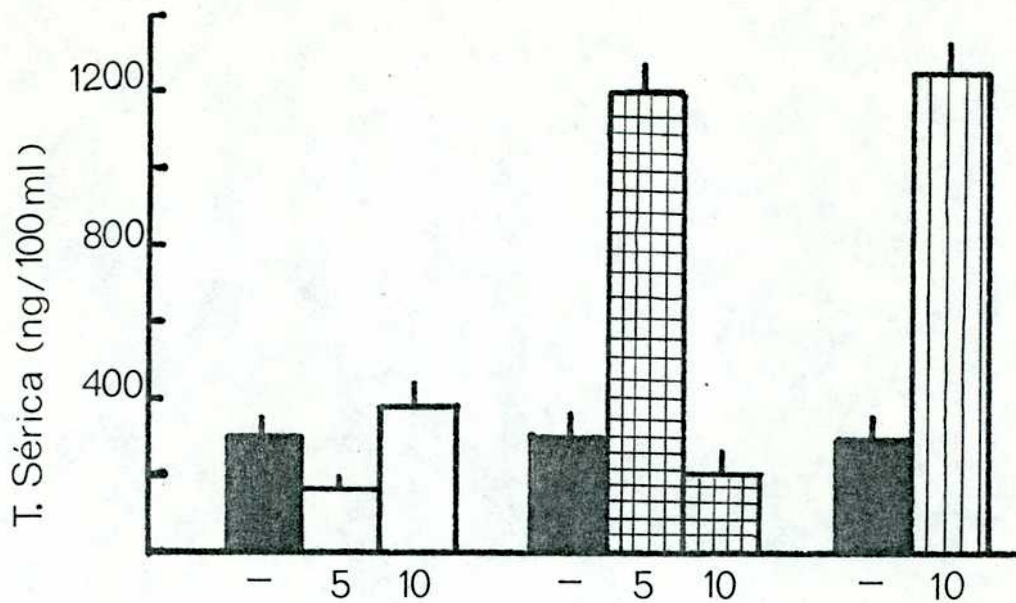


Figura 18. - Testosterona sérica de animales inyectados con una o dos dosis de hCG (200 UI). Ratas machos de 90 días de edad fueron inyectadas con 200 UI de hCG y sacrificadas por decapitación, a los 5 ó 10 días de la inyección (□). Otro lote de animales recibió una segunda dosis de hCG (200 UI), 48 horas después de la primera (▣) y fueron sacrificados a los 5 ó 10 días de esta primera dosis. Un tercer grupo de animales recibió la segunda dosis a los siete días de la primera (▨) y fueron sacrificados a los 10 días de la primera inyección. Un cuarto lote se reservó como control (■). Se colectó la sangre y se determinó la testosterona circulante. (n= 3)

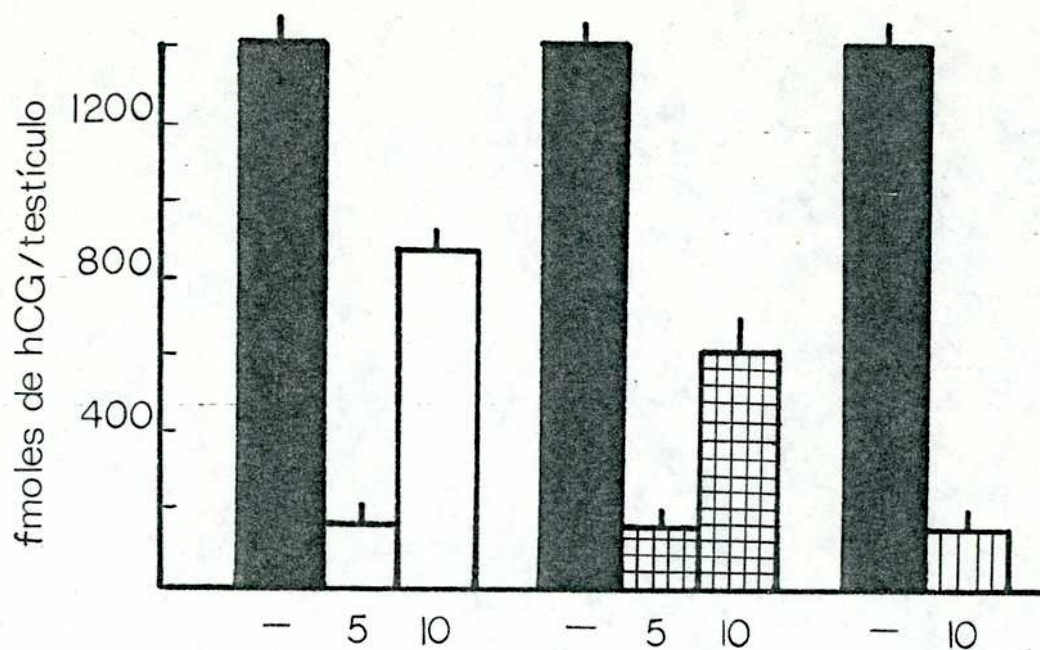


Figura 19. -Determinación de sitios receptores para LH, en testículos de ratas inyectadas con una o dos dosis de hCG (200 UI).
Ratas machos de 90 días de edad fueron inyectadas con 200 UI de hCG y sacrificadas por decapitación, a los 5 ó 10 días de la inyección (□). Otro lote de animales recibió una segunda dosis de hCG, 48 horas después de la primera (▣) y fueron sacrificadas a los 5 ó 10 días de la primera dosis. Un tercer grupo de animales recibió la segunda dosis a los siete días de la primera y fueron sacrificados a los 10 días de la primera inyección (▨). Un cuarto lote se reservó como control (■). Los testículos fueron utilizados para la determinación de sitios receptores para LH, incubando un homogenato testicular, con cantidades crecientes de LH radiactiva. La concentración de sitios receptores se determinó usando el método gráfico de Scatchard. (n= 8)

inyección. Esto indicaría un corrimiento hacia la derecha en la curva de recuperación de los sitios receptores con el tiempo transcurrido desde la primera inyección. Administrando una segunda dosis a los siete días de la primera inyección, se observa que se vuelve a producir la desaparición parcial de los sitios receptores, determinada tres días después de la segunda administración, indicación que sugiere que el efecto de la hormona luteinizante (en nuestro caso gonadotrofina coriónica humana) sobre la desaparición de sus sitios receptores, se ejerce en cualquier momento de su administración.

Cuando se incubaron los testículos de estos animales con una dosis saturante de hCG, se obtuvieron los resultados indicados en las figuras 20 y 21. En la figura 20 puede verse que la producción de testosterona por los testículos de las ratas inyectadas con una única dosis de gonadotrofina es significativamente menor que la de los controles, indicando que esa dosis fue capaz de producir desensibilización testicular, aunque el efecto no fue demasiado notorio debido a que la determinación se realizó cinco días después de la inyección, tiempo en que el proceso de desensibilización, referido a la producción de testos

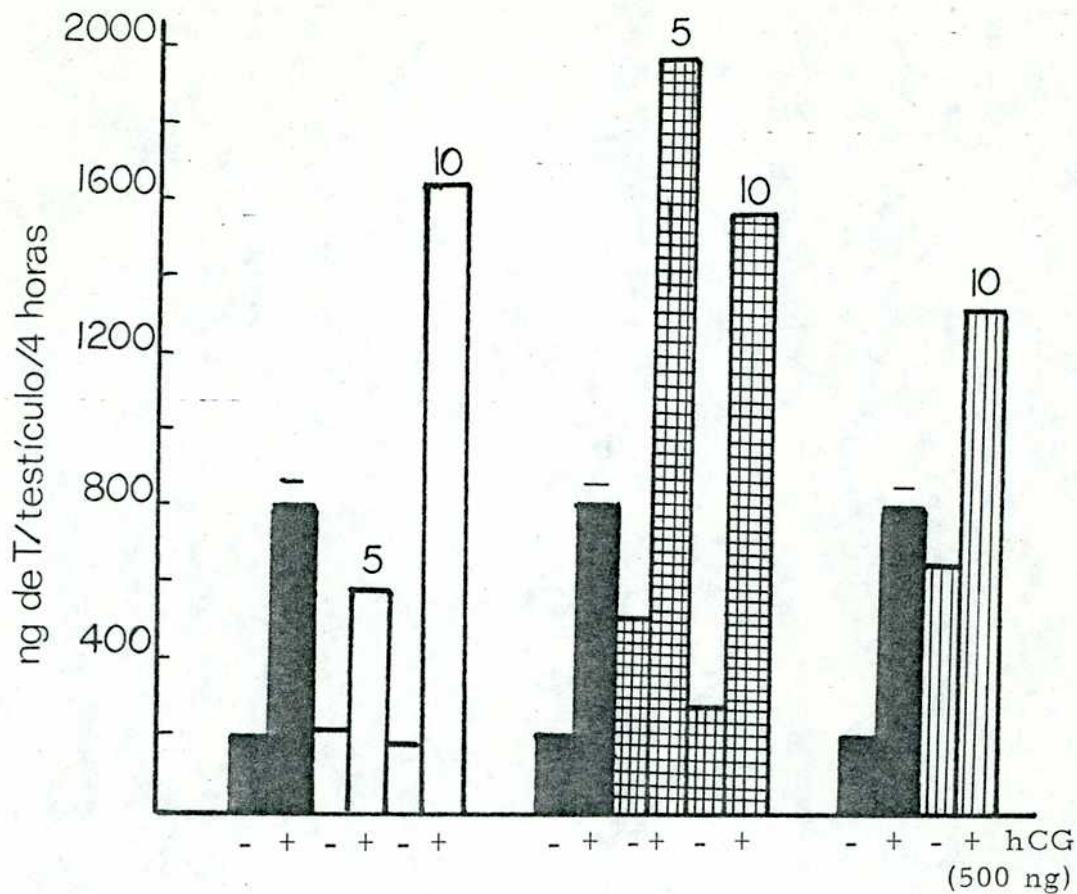


Figura 20. -Estimulación de la producción de testosterona por testículos enteros de animales inyectados con una o dos dosis de hCG (200 UI). Los animales fueron inyectados con una dosis de hCG (□) y sacrificados a los 5 ó 10 días. Otro lote recibió una segunda dosis, 48 horas después de la primera (▣) y fueron sacrificados a los 5 ó 10 días de la primera inyección. Un tercer grupo de animales recibió la segunda inyección a los siete días de la primera (▨) y fue sacrificado a los 10 días de la primera dosis. El cuarto grupo se reservó como control (■). Los testículos fueron descapsulados e incubados, durante 4 horas, con 500 ng de hCG. Las incubaciones se realizaron por duplicado.

terona, comienza a recuperarse. Si se determina la producción de testosterona por los testículos de las ratas inyectadas con dos dosis de hormona, se puede observar que, a las 48 horas y a los siete días de la primera inyección, la testosterona producida es significativamente superior a la de los animales controles, indicando una reversión del proceso de desensibilización. Poniendo nuestra atención en la producción de testosterona por los testículos de los animales sacrificados a los 10 días de la primera inyección, se puede observar que en todos los grupos, la producción de este andrógeno es supranormal, indicando un proceso de "supersensibilización" del testículo al estímulo gonadotrófico que ocurre luego de la etapa de desensibilización.

Cuando se determinan los niveles de AMP cíclico, producido durante la estimulación gonadotrófica, se observa, en el caso de los testículos de animales tratados con una única dosis de hCG (figura 21), que la liberación de este nucleótido al medio de incubación es menor que la de los controles y mucho menor a los tres días de recibida una segunda dosis de hormona, indicando en esta forma la desensibilización de la adenila-

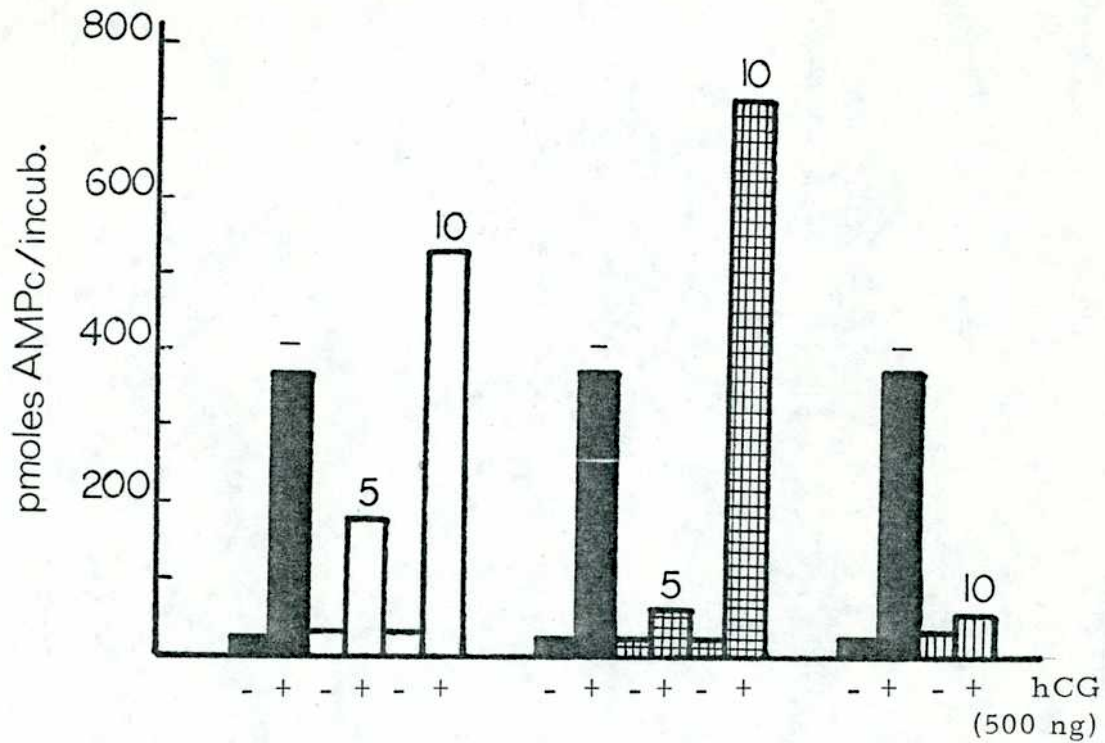


Figura 21. -Estimulación de la producción de AMP cíclico por testículos enteros de animales inyectados con una o dos dosis de hCG (200 UI). Los animales fueron inyectados con una dosis de hCG (□) y sacrificados a los 5 ó 10 días. Otro lote recibió una segunda dosis, 48 horas después de la primera (▣) y fueron sacrificados a los 5 ó 10 días de la primera inyección. Un tercer grupo de animales recibió la segunda inyección a los siete días de la primera (▨) y fue sacrificado a los 10 días de la primera dosis. El cuarto grupo se reservó como control (■). Luego de la incubación de los testículos con hCG, se determinó el AMPc liberado al medio. Las incubaciones se realizaron por duplicado.

to ciclasa a la modulación gonadotrófica. Se puede ver que es este proceso, como la desaparición de los sitios receptores para LH o hCG, se producen independientemente del tiempo de administración de la gonadotrofina. Esto indicaría la íntima relación existente entre receptores y actividad enzimática productora de AMP cíclico. En la figura 21 también se observa el fenómeno de supersensibilidad que ocurre a los diez días de la primera inyección (desensibilizante) o a los cinco días de la segunda (resensibilizante).

Vistos en conjunto los resultados de la estimulación, "in vitro", de la producción de testosterona y de AMP cíclico por gonadotrofina exógena, se nos presenta como un proceso de resensibilización esteroideogénica, aparentemente independiente de AMP cíclico, o posiblemente dependiente de cantidades mínimas de este nucleótido, pero, en todo sentido, nos enfrentamos a una resensibilización del sistema que, además, encuentra aumentado su nivel de respuesta máxima (ver figura 20).

-ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICION DE LA SINTE-
SIS PROTEICA SOBRE EL FENOMENO DE RESENSIBILIZA-
CION

Los animales fueron tratados de la siguiente forma: un grupo de animales fue inyectado con una única dosis de hCG y se los sacrificó cinco días después de la inyección. Otro grupo recibió una segunda dosis de gonadotrofina, 48 horas después de la primera dosis y fueron sacrificados a los tres días de la segunda inyección. Un tercer grupo se reservó como control, recibiendo una inyección de vehículo.

La concentración de testosterona sérica se puede observar en la figura 22, encontrándose una marcada disminución en el andrógeno circulante a los cinco días posteriores a la primera inyección y un aumento apreciable ante la segunda administración de gonadotrofina.

La figura 23 nos demuestra que la inhibición de la síntesis proteica, por agregado de cicloheximida al medio de incubación (10 ug/ml) produce la inhibición de la producción de testosterona en todos los casos. Esto indica que la producción de testosterona por los testículos de animales "resensibilizados" con la segunda dosis de hCG, continúa siendo dependiente de una síntesis proteica continua.

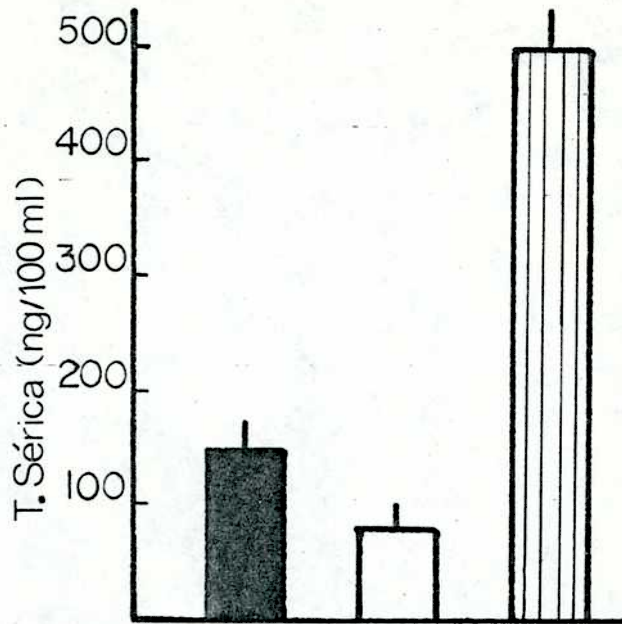


Figura 22. - Testosterona sérica de animales inyectados con una o dos dosis de hCG (200 UI).

Un grupo de animales fue inyectado con una única dosis de hCG (□) y se los sacrificó cinco días después de la inyección. Otro grupo recibió una segunda dosis de gonadotrofina, 48 horas después de la primera dosis y fueron sacrificados a los tres días de la segunda inyección (▨). Un tercer grupo se reservó como control (■).

Los animales fueron sacrificados por decapitación y se colectó la sangre. Después de separarse el suero, se lo utilizó para la medición de testosterona. (n= 8)

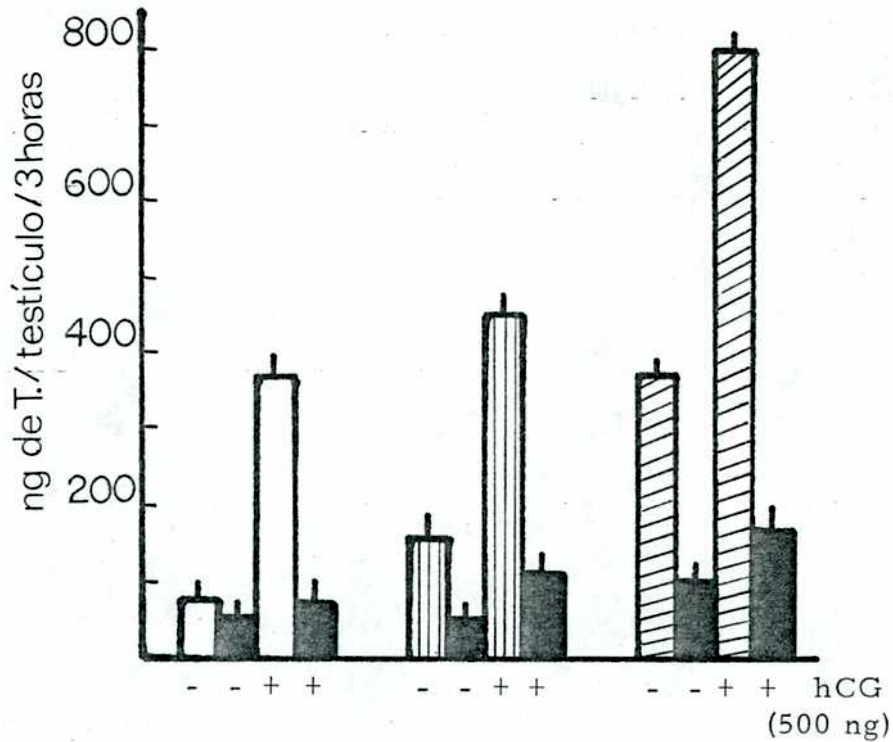


Figura 23. -Estimulación de la producción de testosterona, en presencia de cicloheximida. Un grupo de animales fue inyectado con una única dosis de hCG (▨) y se los sacrificó cinco días después de la inyección. Otro grupo recibió una segunda dosis de gonadotropina, 48 horas después de la primera dosis y fueron sacrificados a los tres días de la segunda inyección (▩). Un tercer grupo se reservó como control (□). Los testículos fueron descapsulados e incubados con 500 ng de hCG, en presencia de cicloheximida (10 ug/ml) (■), durante 3 horas, a 34°C, por triplicado. Finalizada la incubación, se determinó la testosterona liberada al medio de incubación.

La determinación de los niveles de AMP cíclico, liberado al medio de incubación, vuelve a reflejar la disminución observada en el caso de los animales tratados con gonadotrofina, siendo este descenso máximo en los animales que recibieron una segunda dosis de hormona (figura 24).

En la figura 25 se observan los niveles de progesterona y 17-HO-progesterona producidos durante la estimulación, "in vitro", de los testículos. Puede verse la gran acumulación de estos esteroides que ocurre en el caso de los animales tratados con una única dosis de gonadotrofina, acumulación que disminuye en los animales inyectados con dos dosis de hormona.

En la tabla VIII se indica la relación progesterona:testosterona y 17-HO-progesterona:testosterona, pudiendo observarse que este índice retorna a valores normales cuando los animales son tratados con una segunda dosis de hCG. Dado que la lesión encontrada en el proceso de desensibilización está ubicada a nivel de la 17,20-desmolasa (razón que llevó a la determinación de estos dos intermediarios de la síntesis de testosterona), podría suponerse que esta segunda dosis de hormona sería capaz de revertir este bloqueo enzimático.

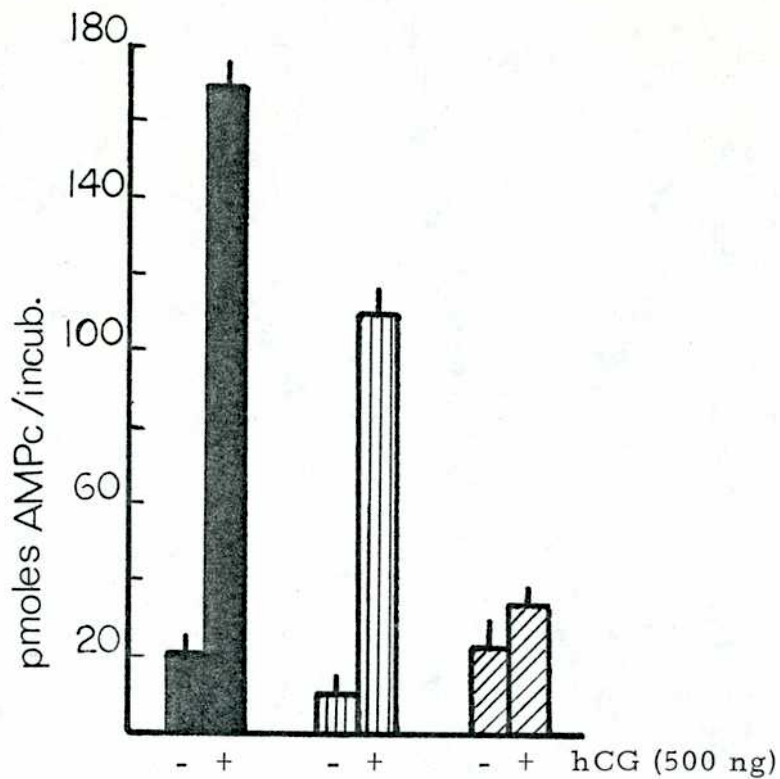


Figura 24. -Estimulación de la producción de AMP cíclico por testículos descapsulados.

Un grupo de animales fue inyectado con una única dosis de hCG (▤) y se los sacrificó cinco días después de la inyección. Otro grupo de animales recibió una segunda dosis de gonadotropina, 48 horas después de la primera dosis y fueron sacrificados a los tres días de la segunda inyección (▨). Un tercer grupo se reservó como control (■). Los testículos fueron descapsulados e incubados con 500 ng de hCG, durante 3 horas, a 34°C. Finalizada la incubación, se determinó el AMP cíclico liberado al medio de incubación.

Las incubaciones se realizaron por triplicado.

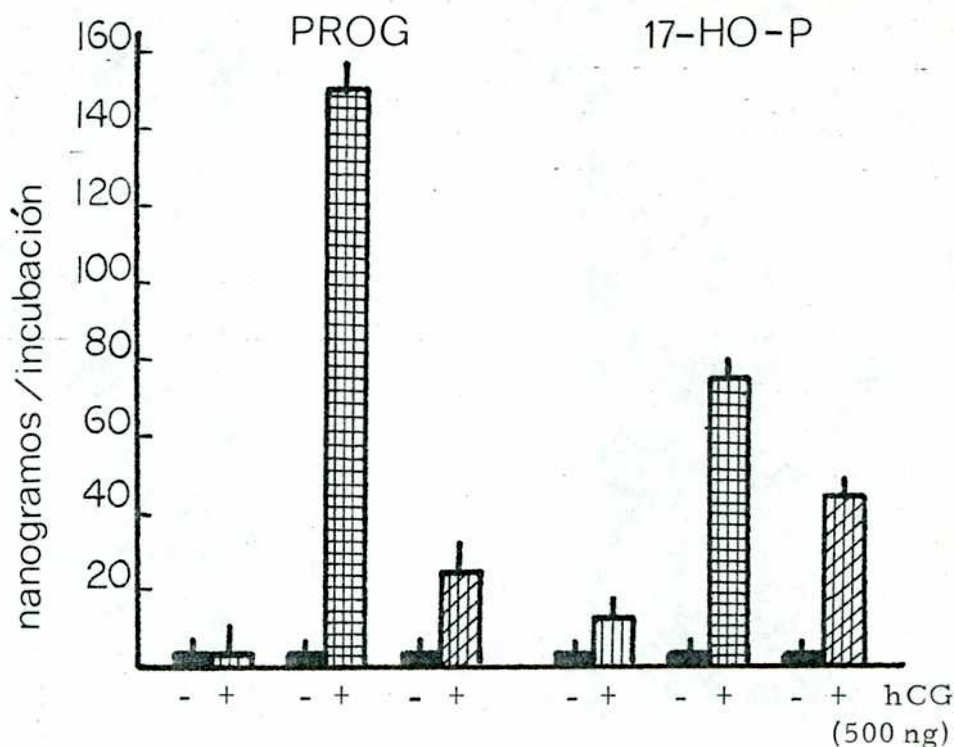


Figura 25. -Estimulación de la producción de progesterona y 17-HO-progesterona por testículos descapsulados.

Un grupo de animales fue inyectado con una única dosis de hCG (▨) y se los sacrificó cinco días después de la inyección. Otro grupo recibió una segunda dosis de gonadotropina, 48 horas después de la primera dosis y fueron sacrificados a los tres días de la segunda inyección (▧). Un tercer grupo se reservó como control (▩). Los testículos fueron descapsulados e incubados con 500 ng de hCG, durante 3 horas, a 34°C, por triplicado. Finalizada la incubación, se determinó la producción de progesterona (Prog.) y 17-HO-progesterona (17-HO-P) en el medio de incubación.

TABLA VIII. - Relación entre Progesterona/Testosterona y 17-HO-Progesterona/Testosterona, producidas en diferentes condiciones de estimulación testicular.

RELACION	CONTROL		1 DOSIS		2 DOSIS	
	Basal	hCG	Basal	hCG	Basal	hCG
P/T	0,02	0,03	0,12	0,14	0,03	0,04
17-HO-P/T	0,03	0,03	0,12	0,16	0,02	0,06

RELACION	Basal hCG AMPc (CONTROL)		Basal hCG AMPc (1 DOSIS)		Basal hCG AMPc (2 DOSIS)	
	Basal	hCG	Basal	hCG	Basal	hCG
P/T	0,02	0,02	0,12	0,14	0,03	0,04
17-HO-P/T	0,02	0,04	0,18	0,08	0,05	0,07

Un grupo de animales recibió una dosis de hCG (200 UI) y otro lote recibió una segunda dosis, 48 horas después de la primera. En el panel superior, los animales inyectados con una única dosis, fueron sacrificados 5 días después. En el panel inferior, el mismo grupo de animales fue sacrificado 3 días después de la primera inyección, el mismo hCG (500 ng/incubación) - dibutilil-AMPc (10-3 M/incubación).

-ESTUDIO DEL EFECTO DEL AGREGADO DE NADPH EXO-
GENO Y DE AMP CICLICO SOBRE LA SINTESIS DE TESTOS-
TERONA, EN EL PROCESO DE RESENSIBILIZACION

En este estudio los animales inyectados con una única dosis de hCG (200 UI), fueron sacrificados tres días después de la inyección, para asegurar una completa desensibilización. Los animales inyectados con una segunda dosis de hormona, 48 horas después de la primera, fueron sacrificados tres días después de la segunda dosis.

La concentración de la testosterona circulante puede observarse en la figura 26, siendo reflejo de la estimulación de la producción de este andrógeno, en respuesta a las dosis de hormona inyectada.

En la figura 27, podemos ver la producción de testosterona por los testículos de estos animales, en respuesta a la gonadotropina exógena o a concentración saturante de dibutiril-AMP cíclico. En el caso de los animales inyectados con una única dosis de gonadotropina, la respuesta es mínima. Cuando observamos lo que ocurre en los animales inyectados con una segunda dosis de hormona, nos encontramos con el proceso de resensibilización, siendo estimulable también por dibutiril-AMP cíclico.

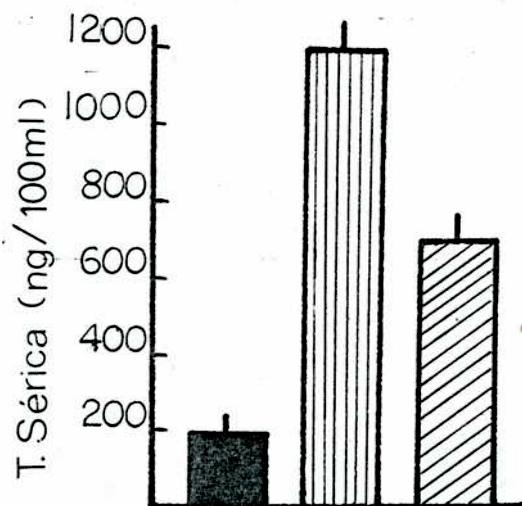


Figura 26. - Testosterona sérica de animales tratados con una o dos dosis de hCG (200 UI).

Un grupo de animales recibió una única dosis de hCG (200 UI) (▨) y fueron sacrificados a los tres días de la inyección. Otro grupo recibió una segunda dosis de hormona, 48 horas después de la primera inyección (▧) y fueron sacrificados tres días después de la segunda dosis. Un tercer grupo se reservó como control (■).

Luego de la decapitación, se colectó la sangre y se determinó el contenido en testosterona del suero. (n= 7)

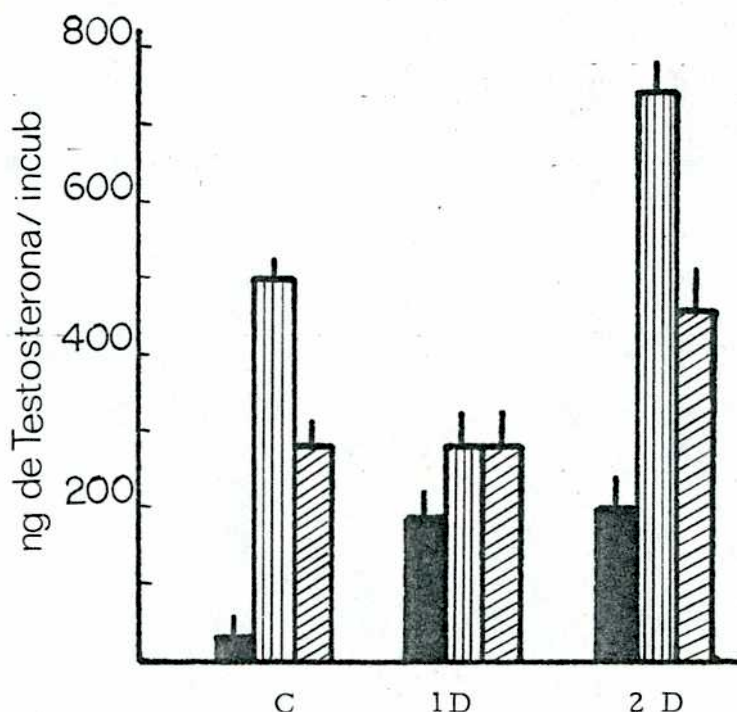


Figura 27. -Estimulación de la producción de testosterona por testículos descapsulados, en respuesta a gonadotrofina (hCG) o dibutiril-AMP cíclico. Un grupo de animales recibió una única dosis de hCG (200 UI) (1 D) y fueron sacrificados a los tres días de la inyección. Otro grupo recibió una segunda dosis de hormona, 48 horas después de la primera inyección (2 D) y fueron sacrificados tres días después de la segunda dosis. Un tercer grupo se reservó como control (C).

Luego de la decapitación, se utilizaron los testículos, incubándolos con 500 ng de hCG (▨) o con dibutiril-AMPc (10⁻³ M) (▧). Las barras oscuras indican los valores basales, luego de 3 horas de incubación.

Las incubaciones se realizaron por triplicado.

co, indicando que este mecanismo seguiría dependiendo de este nucleótido cíclico.

La figura 28, muestra la producción de progesterona y 17-HO-progesterona, observándose acumulación de estos intermediarios, tanto en los animales tratados con una sola dosis, como con dos inyecciones de gonadotrofina. Sin embargo, observando la relación progesterona:testosterona y 17-HO-progesterona:testosterona (ver Tabla VIII, pág. 183), se ve que retorna a niveles casi normales cuando el animal recibe dos dosis de hCG.

En un experimento paralelo, se obtuvieron células intersticiales, a partir de testículos de estos animales, por tratamiento con colagenasa. Estas células fueron congeladas a -70°C y luego dejadas a temperatura ambiente hasta su descongelamiento, procedimiento que produce la ruptura celular. Estas células así tratadas, fueron incubadas con un sistema generador de NADPH y se determinó la producción de testosterona. En la figura 29 puede observarse que, mientras el agregado de NADPH estimula la producción de testosterona en las células provenientes de testículos controles, este estímulo es menor en el caso de las células de testículos de animales

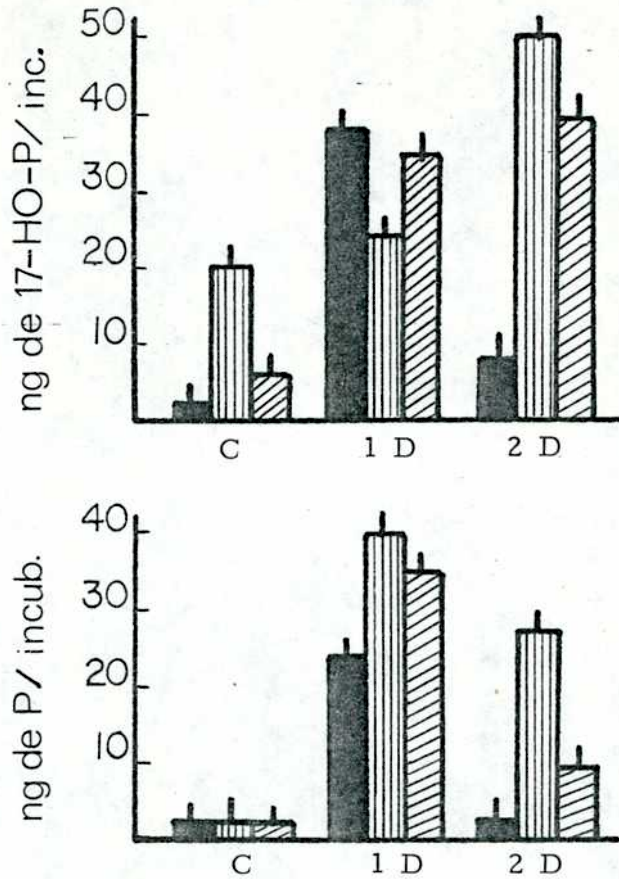


Figura 28. -Estimulación de la producción de progesterona y 17-HO-progesterona por testículos descapsulados, en respuesta a hCG o dibutiril-AMPc. Un grupo de animales recibió una única dosis de hCG (200 UI) (1 D) y fueron decapitados a los tres días de la inyección. Otro grupo recibió una segunda dosis de hormona, 48 horas después de la primera inyección (2 D) y fueron sacrificados tres días después de la segunda dosis. Un tercer grupo se reservó como control (C). Los testículos de estos animales fueron descapsulados e incubados en presencia de 500 ng de hCG (■) o dibutiril-AMP cíclico ($10^{-3}M$) (▨), por 3h. Las barras representan el promedio de tres incubaciones.

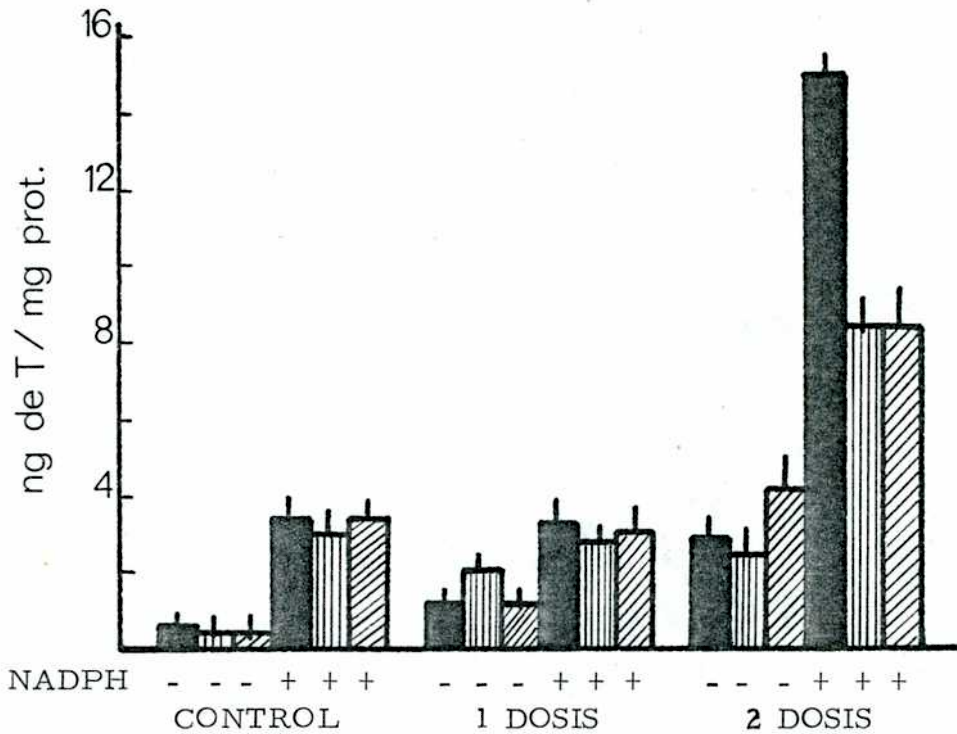


Figura 29. -Estimulación de la producción de testosterona por homogenatos de células intersticiales, en presencia de un sistema generador de NADPH, LH o dibutiril-AMP cíclico. Un grupo de animales recibió una única dosis de hCG y fueron sacrificados a los tres días de la inyección. Otro grupo recibió una segunda dosis, 48 horas después de la primera y fue sacrificado a los tres días de la segunda inyección. Otro lote se reservó como control. Células intersticiales obtenidas de estos animales fueron homogeneizadas por congelamiento y descongelamiento e incubadas en presencia de hCG (500 ng) (▨) o dibutiril-AMPc (10^{-3} M) (▧) para comprobar su ruptura. Además se agregó, en algunos casos, un sistema generador de NADPH. Las barras representan el promedio de tres incubaciones.

tratados con una única dosis de gonadotrofina, siendo mucho mayor cuando las células provenían de animales "resensibilizados" con una segunda dosis de hormona. Esto indicaría un proceso de reactivación a nivel de las enzimas dependientes de este cofactor, responsables de las hidroxilaciones que finalizan en la síntesis de testosterona, a partir de colesterol.

-ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS DOSIS CONSECUTIVAS DE hCG SOBRE EL PROCESO DE RESENSIBILIZACION

Con el objeto de investigar los efectos de la administración de una segunda dosis de hCG sobre el proceso de desensibilización, un grupo de animales recibió una dosis de hCG (200 UI) y fue sacrificado a los tres días de la inyección. Un segundo lote de animales recibió una segunda dosis de hormona, 24 horas después de la primera, siendo sacrificados a los dos días de recibida esta segunda inyección. El tercer grupo se reservó como control y recibió una dosis de vehículo.

La figura 30 muestra la producción de testosterona por las células de Leydig, aisladas de los testículos de estos animales e incubadas en presencia de 30 ng de hCG o dibutiril-AMP cíclico (10^{-3} M). Puede observarse que ni en las células

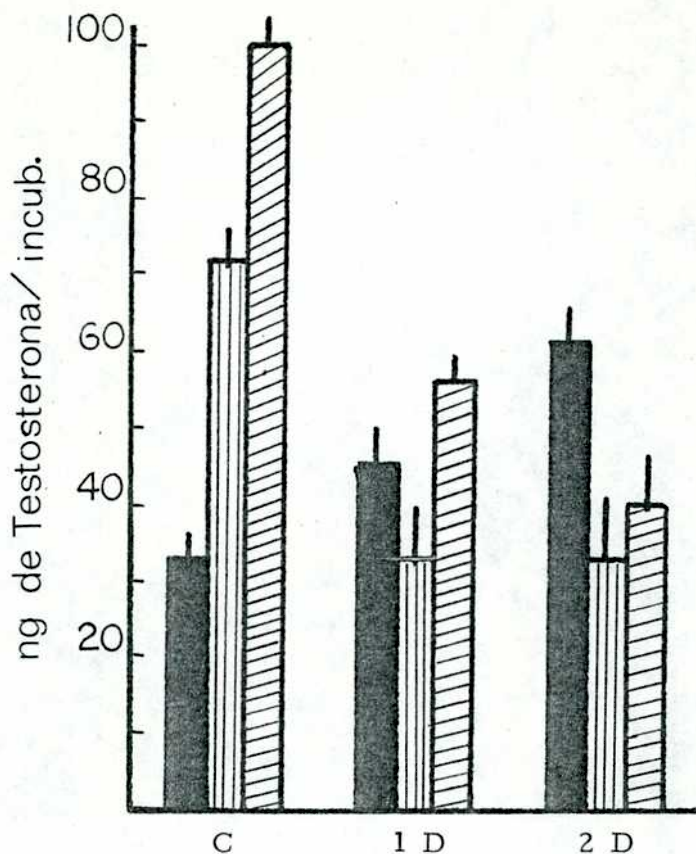


Figura 30. -Producción de testosterona por células intersticiales, en respuesta a hCG o dibutiril-AMPc. Un grupo de animales recibió una dosis de hCG (200 UI) y fue sacrificado a los tres días de la inyección (1 D). Un segundo lote de animales, recibió una segunda dosis de hormona, 24 horas después de la primera, siendo sacrificados a los dos días de recibida esta segunda inyección (2 D). Un tercer grupo se reservó como control (C). Células intersticiales, aisladas de los testículos de estos animales, fueron incubadas en presencia de hCG (30 ng) (■) o dibutiril-AMPc (10⁻³M) (▨). Se determinó la testosterona liberada al medio de incubación. Las incubaciones se realizaron por triplicado.

intersticiales de las ratas inyectadas con una única dosis de hCG, así como tampoco en las obtenidas de animales que recibieron dos dosis de esta hormona se produce respuesta de testosterona a la estimulación con gonadotrofina o AMP cíclico exógeno. Esto indica que una segunda dosis de hCG, administrada 24 horas después de la primera, no es capaz de desencadenar o, al menos, evidenciar el proceso de "resensibilización" testicular al estímulo gonadotrófico.

En la figura 31 puede observarse que, en ambos casos, tampoco se observa estimulación de la liberación de AMP cíclico al medio de incubación, indicando la desensibilización de la adenilato ciclasa.

Estos resultados, en conjunto, demuestran que una segunda dosis de hCG, administrada, por lo menos, 48 horas después de la inyección "desensibilizante", es capaz de revertir este proceso en lo que a esteroidogénesis se refiere, llevando al testículo a responder en forma supranormal al estímulo exógeno con gonadotrofina. Esta respuesta continúa siendo dependiente de una síntesis proteica continua y, aparentemente, es estimulable por AMP cíclico, a pesar que se man-

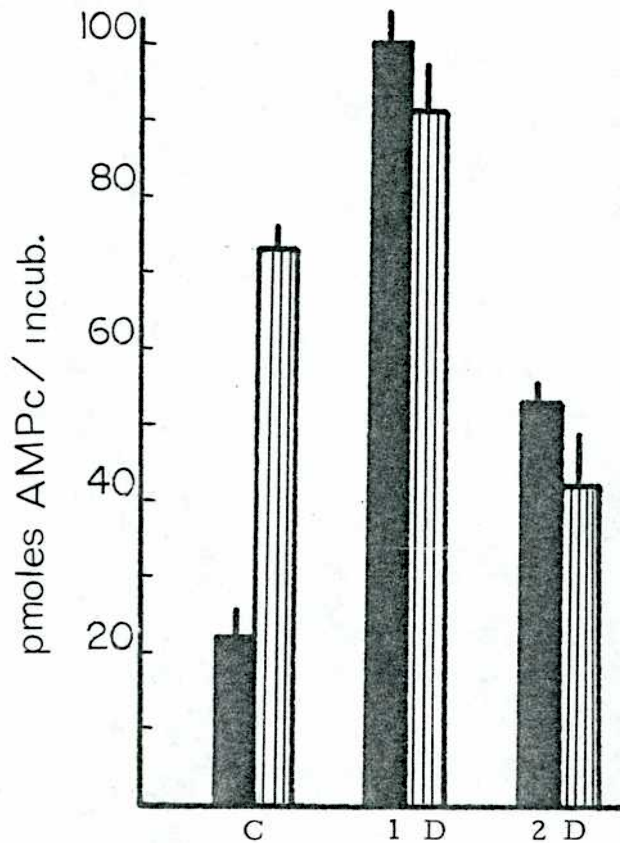


Figura 31. -Producción de AMP cíclico por células intersticiales, en respuesta a hCG.

Un grupo de animales recibió una dosis de hCG (200 UI) y fue sacrificado a los tres días de la inyección (1 D). Un segundo lote de animales, recibió una segunda dosis de hormona, 24 horas después de la primera, siendo sacrificados a los dos días de recibida esta segunda inyección (2 D). Un tercer grupo se reservó como control (C). Células intersticiales, aisladas de los testículos de estos animales, fueron incubadas en presencia de 30 ng de hCG (▨). Las barras negras indican la producción basal. Se determinó el AMPc liberado al medio de incubación. Las barras representan el Promedio de tres incubaciones.

tiene la desensibilización a nivel de la adenilato ciclasa. Por otra parte, parecería levantar el bloqueo existente a nivel enzimático, llevando a una producción normal de testosterona.

REGULACION DE LOS SITIOS DE UNION DE LH POR TESTOSTERONA

Se ha postulado que existiría una correlación entre los niveles aumentados de testosterona y la disminución en el número de sitios receptores para LH cuando se administra una dosis desensibilizante de gonadotrofina.

Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que la administración de andrógenos regule en forma alguna los sitios de reconocimiento para esta gonadotrofina.

En la figura 32 se muestra el resultado de analizar la unión de LH marcada con iodo radiactivo a células intersticiales obtenidas de testículos de ratas luego de 9 días de hipofisectomizadas y de ratas hipofisectomizadas tratadas con 500 ug de propionato de testosterona durante el mismo tiempo. El grupo de animales control e hipofisectomizados recibieron 9 dosis de aceite vegetal, en forma subcutánea.

Puede observarse la disminución en el número de sitios

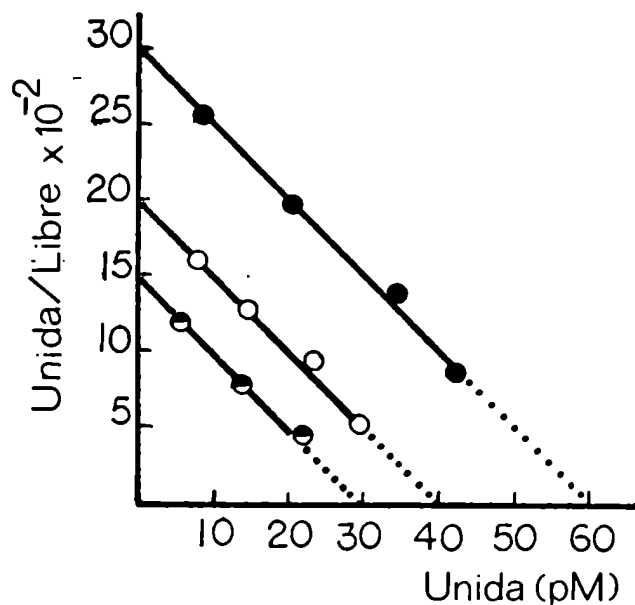


Figura 32. -Efecto de la testosterona sobre el contenido en receptores de gonadotropina, en testículos de ratas hipofisectomizadas.

Ratas adultas, con 9 días de hipofisectomía, fueron inyectadas durante el período post-operatorio con 9 inyecciones de propionato de testosterona (500 ug c/u).

Se obtuvieron células intersticiales de los testículos de estos animales y fueron incubadas en presencia de cantidades variables de hCG marcada con ¹²⁵I.

Finalizada la incubación (20 horas a 24°C), se determinó la radiactividad asociada al precipitado. Los datos se analizaron según el método de Scatchard.

Grupos: CONTROLES ●
HIPOFISECTOMIZADOS ○
HIPOFISECTOMIZADOS + TEST. ●

Cada punto representa el promedio de dos incubaciones.

receptores que ocurre después de la hipofisectomía, llevando el número de sitios receptores de 3.413 sitios/célula a 2.234 sitios/célula. Cuando las ratas se tratan con 500 ug de testosterona, se produce una disminución ulterior en el número de sitios, llegando a 1.739 sitios/célula, es decir un 22% menos que los animales hipofisectomizados y un 49% menos que los controles.

La constante de afinidad se mantiene en los tres casos, siendo igual a $0,49 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

Esta es una evidencia directa de la acción de la testosterona sobre la regulación de los sitios receptores para LH. Estos resultados darían idea de la existencia de un mecanismo de regulación ultra corta, mediado por el andrógeno producido por acción de la hormona luteinizante sobre la célula de Leydig.

Este mecanismo podría servir de mecanismo de control para prevenir un incremento exagerado de testosterona en aquellos casos en que los niveles de gonadotropina circulante están aumentados.

ESTUDIO SOBRE LA VIDA MEDIA DEL RECEPTOR PARA LH

Para este estudio, testículos de ratas de 45 días fueron incubados en 2 ml de medio Eagle, durante 1, 2, 4, 8 y 12 horas. Cada 4 horas el medio fue cambiado por nuevo, conteniendo: Penicilina 5.000 U, Estreptomicina 1,67 mg.

Para estudiar la inhibición de la síntesis proteica, se agregó al medio cicloheximida (3,3 mg en 25 ml) y, una hora antes de terminar se agregaron 0,5 uCi de aminoácidos-¹⁴C.

La figura 33 nos muestra la incorporación de radiactividad con el período de incubación. Puede observarse la inhibición, en aproximadamente un 90%, de la síntesis proteica en los testículos incubados con cicloheximida.

Para la determinación de los sitios receptores, los testículos incubados durante 4, 8 y 12 horas, fueron homogeneizados en 10 ml de PBS, centrifugados a 3.000 rpm, durante 20 minutos y resuspendidos en 10 ml de PBS. De esta suspensión se tomaron 0,5 ml para el ensayo de receptores y el resto para la determinación de proteínas.

La incubación para la determinación de los sitios de unión se realizó tal como se describió en la sección de Métodos.

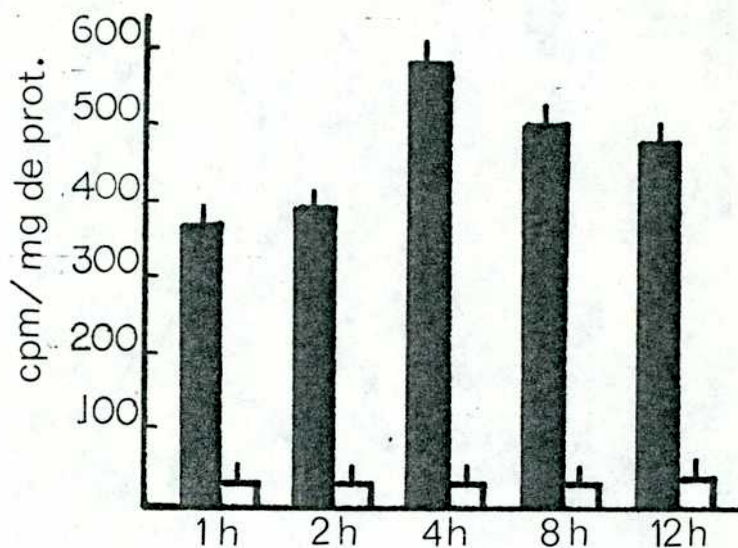


Figura 33. -Efecto de la cicloheximida, "in vitro", sobre la síntesis proteica en testículo de rata.

Testículos de ratas de 45 días fueron incubados en 2 ml de medio Eagle, durante 1, 2, 4, 8 y 12 horas. Cada 4 horas el medio fue cambiado por nuevo, conteniendo: Penicilina 5.000 U, Estreptomina 1,67 mg.

Se agregó al medio cicloheximida (3,3 mg en 25 ml) y, una hora antes de terminar se agregaron 0,5 uCi de aminoácidos-¹⁴C.

Se detuvo la reacción por agregado de TCA y, luego de filtrar a través de filtros de fibra de vidrio, se midió la radiactividad asociada a proteínas.

En la figura se ve la incorporación de radiactividad en ausencia (■) y en presencia de cicloheximida (□).

Las incubaciones se realizaron por triplicado.

En la figura 34 tenemos la cantidad de sitios receptores en las distintas incubaciones. Podemos ver que la presencia de cicloheximida en el medio de incubación no disminuye la capacidad de unión de los testículos. La disminución observada entre las 4 y 8 horas de incubación, probablemente, se deba a la separación de sitios receptores de la membrana celular apareciendo en el medio de incubación.

Esto significa que la vida media del receptor para LH debe ser superior a las 12 horas.

ESTUDIO SOBRE LA DESAPARICION DE LOS SITIOS RECEPTORES PARA LH, "IN VITRO"

Testículos descapsulados fueron incubados en presencia de 38 ug/ml (hCG), a 34°C, durante 15 y 30 minutos y 1, 2 y 4 horas.

Terminada la incubación, los testículos fueron homogeneizados en $MgCl_2$ 4 M, para la separación de la hormona unida a su receptor.

El procedimiento se efectuó de acuerdo con lo descrito en la sección de Métodos.

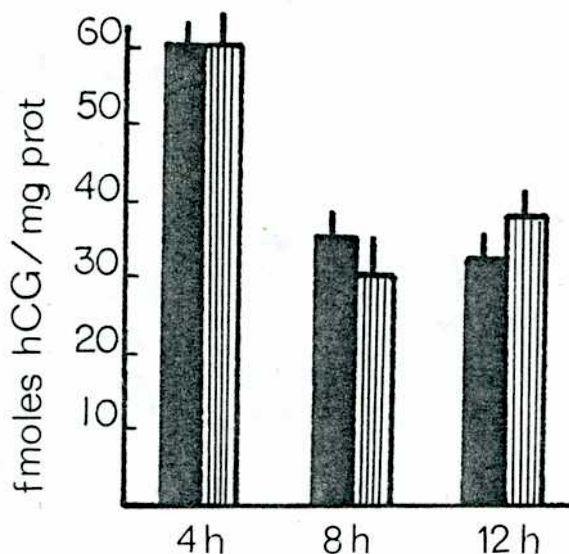


Figura 34. -Determinación de la cantidad de sitios receptores para LH, en testículos de rata, en presencia de cicloheximida.

Testículos de ratas de 45 días fueron incubados en 2 ml de medio Eagle, durante 4, 8 y 12 horas. Cada 4 horas el medio fue cambiado por nuevo, conteniendo: Penicilina 5.000 U, Estreptomina 1,67 mg.

El medio contenía cicloheximida (3,3 mg en 25 ml) (▨). Las barras negras indican las incubaciones realizadas en ausencia del inhibidor de síntesis proteica.

Los testículos fueron homogeneizados en PBS y se los incubó en presencia de cantidades crecientes de LH marcada con iodo radiactivo.

Los datos fueron analizados según el método de Scatchard. (n= 8)

En la figura 35 se muestra la disminución en el contenido de sitios receptores para LH durante la incubación con hormona.

Determinando la constante de afinidad de los sitios receptores remanentes, luego de las 4 horas de incubación en presencia de hormona, comparando con los que quedaban luego de la incubación en ausencia de hCG, se obtuvo el resultado que se muestra en la figura 36.

Puede observarse que para la incubación control, la constante de afinidad es del orden de $4,92 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, mientras que para los sitios remanentes de la incubación con hormona, la constante resultó de $7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, es decir de un orden menor.

Esto podría indicar un segundo tipo de sitios receptores, o bien una diferente conformación de los mismo sitios, previo a su desaparición o producida por la membrana plasmática con gran depleción de sitios de unión.

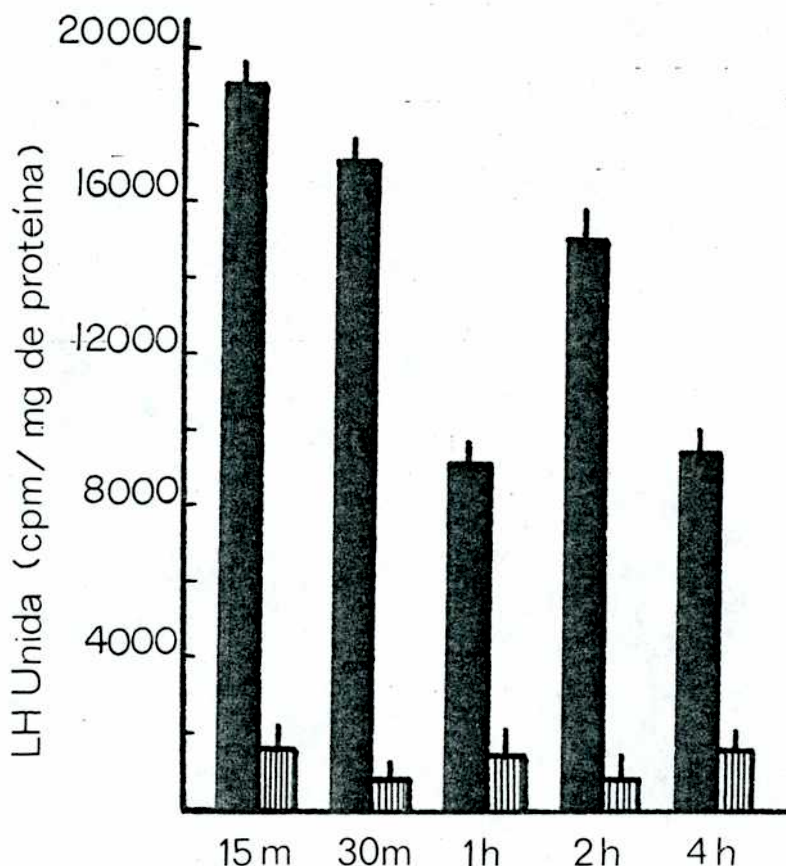


Figura 35. -Desaparición de los sitios receptores para LH durante la incubación con hCG.

Testículos descapsulados fueron incubados en presencia de 38 ug/ml de hCG (▨), a 34°C, durante 15 y 30 minutos y 1, 2 y 4 horas.

Terminada la incubación, los testículos fueron homogeneizados en MgCl₂ 4 M, para la separación de la hormona unida a su receptor.

Los testículos así homogeneizados fueron incubados en presencia de cantidades crecientes de hormona luteinizante marcada. Las barras negras indican testículos provenientes de incubaciones realizadas sin hCG.

Las incubaciones con hCG se realizaron por triplicado. Luego de la incubación con hormona radiactiva, se tomó el punto de saturación y se efectuó el promedio (n= 3), valor representado en las barras.

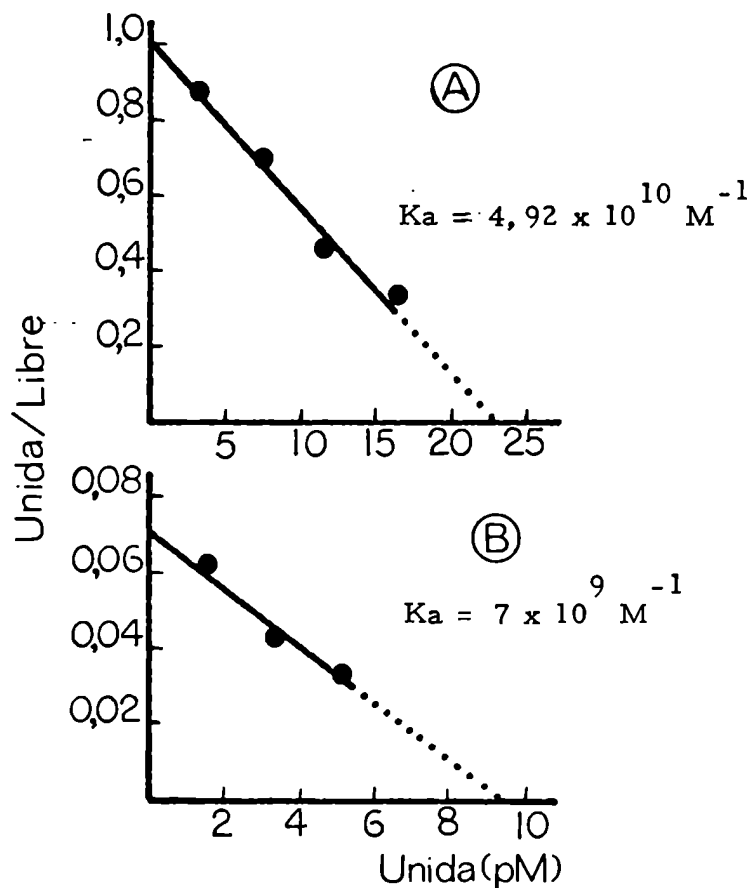


Figura 36. -Análisis de la constante de afinidad, según el método de Scatchard, de los receptores para LH en testículos incubados en presencia de hCG. Testículos descapsulados fueron incubados en presencia de 38 ug/ml de hCG, a 34°C, durante 4 horas. Terminada la incubación, los testículos fueron homogeneizados en MgCl_2 4 M, para separar la hormona unida a su receptor. Luego se incubó una alícuota de este homogenato, previamente lavado con PBS, con cantidades crecientes de ^{125}I -LH. El gráfico (A) muestra el diagrama obtenido para testículos sin incubación con hCG y el gráfico (B) es el resultado de la incubación con la hormona. Cada punto representa el promedio de dos determinaciones.

ANDROGENIZACION NEONATAL Y FUNCION TESTICULAR

En la figura 37 se puede ver que la administración neonatal de testosterona no tiene efecto sobre los receptores para LH. En el caso de los receptores para FSH, cuando se estudiaron en testículos de ratas de 90 días de edad, no se encontraron diferencias respecto de las ratas controles, mientras que en ratas de 40 días se pudo observar un ligero incremento (figura 38). Siendo el peso testicular un poco menor en el caso de las ratas adultas androgenizadas neonatalmente (CONTROLES: $1,48 \pm 0,03$ g, ANDROGENIZADAS: $1,14 \pm 0,04$ g), esta diferencia no se puede explicar por un menor número de sitios de reconocimiento para la gonadotropina.

El estudio de la producción de testosterona, ante la estimulación de los testículos de ratas adultas y adultas androgenizadas, permitió observar (figura 39) que, ante diferentes dosis de hCG, los testículos de las ratas androgenizadas muestran una mayor sensibilidad y una mayor producción de testosterona, comparada con los controles.

Estos datos demuestran que la androgenización neonatal no produce diferencias en los sitios de unión para las gonadotropinas, mientras que sensibiliza al testículo ante el estímulo

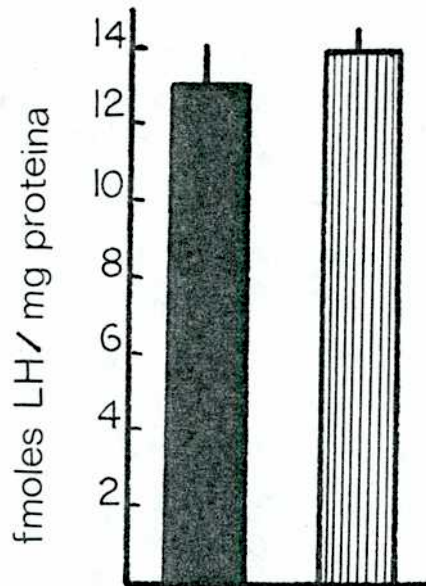


Figura 37. -Efecto de la androgenización neonatal sobre los receptores para LH en testículo de rata.

Se administraron 5 mg de propionato de testosterona a ratas recién nacidas (entre las 24 y 48 horas posteriores a su nacimiento) y se las sacrificó cuando alcanzaron los 90 días de edad. Los testículos fueron homogeneizados en PBS e incubados en presencia de cantidades variables de LH radiactiva, para determinar el contenido en receptores para esta hormona.

ANIMALES: NORMALES ■
 ANDROGENIZADOS ▨

La cantidad de sitios receptores se determinó mediante el gráfico de Scatchard, realizado para tres testículos (n= 8, para cada Scatchard)

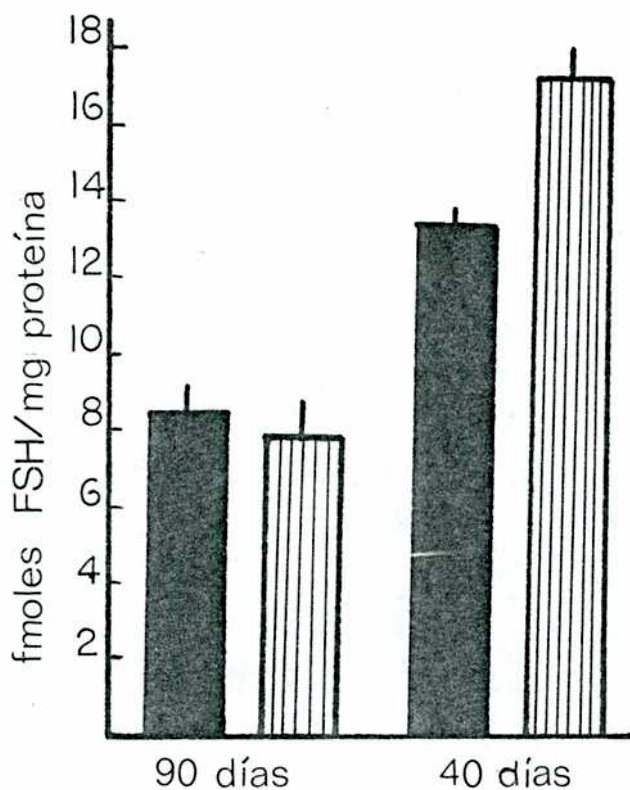


Figura 38. -Efecto de la androgenización neonatal sobre los receptores para FSH en testículo de rata.

Se administraron 5 mg de propionato de testosterona a ratas recién nacidas (entre las 24 y 48 horas posteriores a su nacimiento) y se las sacrificó a los 90 ó 40 días de edad.

Los testículos fueron homogeneizados en PBS e incubados en presencia de cantidades variables de FSH radiactiva, para determinar el contenido en receptores para esta hormona.

Animales: NORMALES ■

ANDROGENIZADOS ▨

Se realizó un gráfico de Scatchard, para tres testículos por lote (n= 8, para cada determinación).

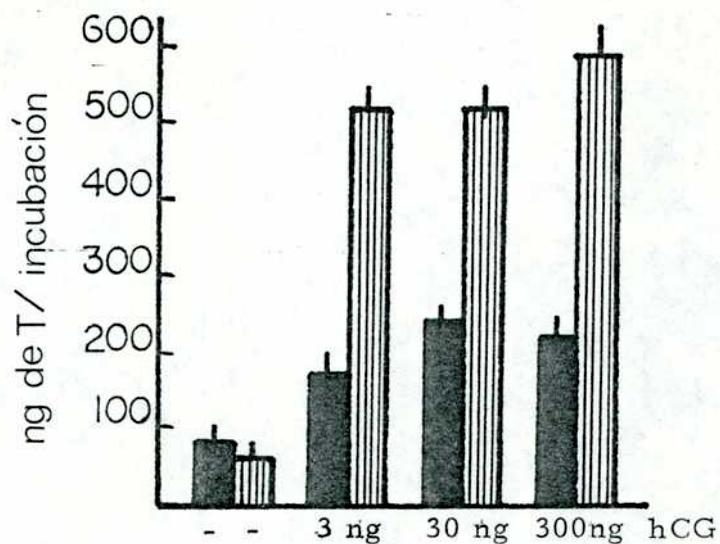


Figura 39. -Producción de testosterona ante el estímulo gonadotrófico, con cantidades variables de hCG. Ratas machos de 24-48 horas de vida, fueron inyectadas con 5 mg de propionato de testosterona y sacrificadas a los 90 días de edad. Los testículos fueron descapsulados e incubados en presencia de cantidades variables de hCG, durante 3 horas, a 34°C. Finalizada la incubación, se determinó la testosterona liberada al medio de incubación.
Animales: NORMALES ■
ANDROGENIZADOS ▨
Las incubaciones se realizaron por triplicado.

gonadotrófico.

Buscando la explicación a esta mayor respuesta testicular ante el estímulo por hCG, en los niveles aumentados de la prolactina sérica, se repitió el experimento de estimulación utilizando un lote de animales androgenizados, tratados con bromocriptina, para descenderles los niveles de prolactina circulante.

En la figura 40 se muestran los resultados obtenidos. Puede observarse que el tratamiento con bromocriptina no fue capaz de disminuir la respuesta testicular aumentada en los animales androgenizados, de forma tal que la explicación deberá buscarse a otro nivel.

EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS SITIOS RECEPTORES

PARA LH

Estudiando el contenido en receptores para hormona luteinizante de los testículos de ratas adultas y ratas envejecidas, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla IX. Puede verse que, en el caso de las ratas de 23 meses de edad, se produce una reducción en un 37% en el número de sitios receptores, comparado con las ratas adultas jóvenes (de

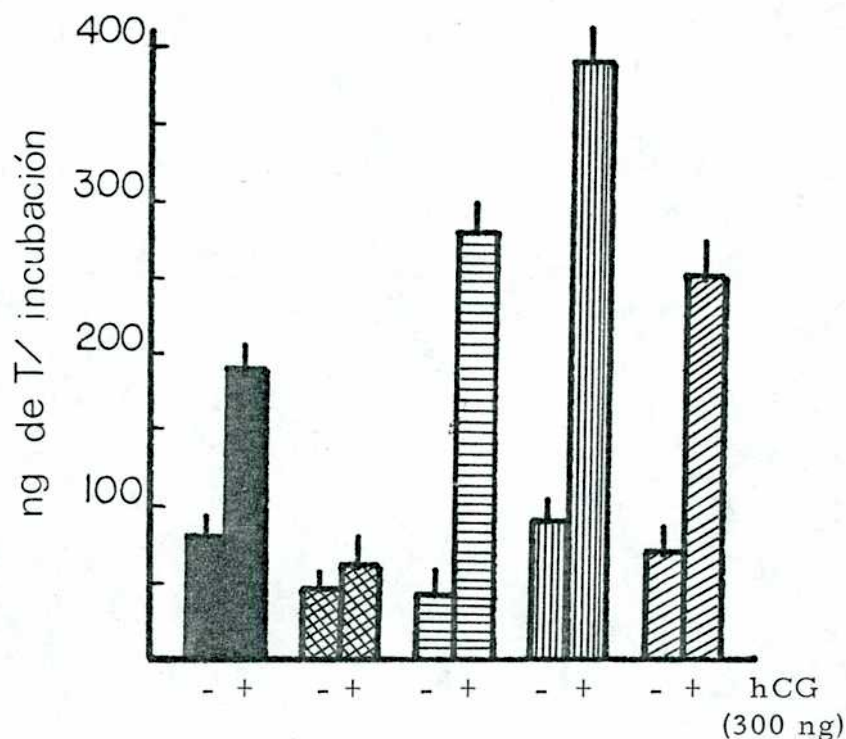


Figura 40. -Producción de testosterona ante el estímulo gonadotrófico, por testículos de animales androgenizados neonatalmente, tratados con bromocriptina.

Ratas machos de 24-48 horas de vida, fueron inyectadas con 5 mg de propionato de testosterona y sacrificadas a los 90 días de edad. Seis días antes de ser sacrificadas, se les administró bromocriptina (0, 3 y 3 mg/kg de peso) hasta el día del experimento.

Los testículos descapsulados fueron incubados en presencia de 300 ng de hCG, por triplicado. Animales: Normales (■); Normales + Bromoc. (▣); Androg. (▨); Androg. + Br. dil. (▧) y Androg. + Br. conc. (▩).

TABLA IX. - Efecto de la edad sobre el contenido testicular de receptores para LH y la respuesta a la administración de testosterona.

TRATAMIENTO	ADULTAS	ENVEJECIDAS
NINGUNO	18,77 ± 1,71	11,87 ± 1,47
TESTOSTERONA	12,50 ± 0,58	10,08 ± 0,57

Estos valores están expresados como femtomoles de LH/mg de proteína.

El tratamiento con testosterona consistió en la administración de 14 dosis de enantato de testosterona (100 ug/100g de peso corporal).

Las ratas adultas jóvenes tenían 6 meses de edad y las ratas envejecidas tenían 23 meses de edad.

Cada grupo constaba de tres animales.

Adultas vs Adultas + T. : $p < 0,01$

Adultas vs Envejecidas : $p < 0,01$

6 meses de edad).

La constante de afinidad permanece invariable e igual a $0,71 \times 10^{10} M^{-1}$.

En la misma tabla puede observarse que el tratamiento de estos dos grupos de animales con testosterona (100 ug/100 g de peso corporal), durante 14 días, produce una disminución en el número de receptores del 33%, en el caso de las ratas adultas jóvenes, mientras que no se observan cambios cuando los animales tratados con adultos envejecidos. Esto podría indicar que la edad tendría, también, un efecto sobre ese mecanismo de retroalimentación negativo ultracorto, antes mencionado, o bien, si es que esta reducción se debe a una acción a nivel hipotálamo-hipofisario, una respuesta disminuida del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal al estímulo con concentraciones exógenas de andrógenos. Este último hecho se ha discutido en la introducción, donde se aportaron datos que confirman la alteración de este sistema regulatorio.

EFFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE EL TESTICULO

Para la investigación de la influencia de la duración del período luminoso sobre el testículo, se utilizaron animales cuya

mayor actividad se realiza de noche. El animal estudiado fue la vizcacha (*Lagostomus Maximus Maximus*). Este animal, de hábitos nocturnos, fue mantenido en cautiverio y sometido a períodos de iluminación permanente (8 días a 100 foot candle) con el objeto de investigar su función pineal. Al momento del experimento se lo sacrificó por dislocación cervical y se colectó sangre; los testículos fueron colocados inmediatamente sobre hielo seco, para su posterior utilización. El grupo control lo constituyeron animales cazados en su habitat (noche).

La tabla X muestra el peso testicular, la testosterona sérica y la concentración de sitios receptores para FSH.

Puede observarse el descenso en los tres parámetros considerados, en el caso de los animales sometidos a iluminación constante.

Esto presenta un panorama interesante de la función pineal de estos animales pues, lo hasta ahora conocido, era que esta glándula ejercía su actividad antigonadotrófica en presencia de un fotoperíodo corto, es decir menor tiempo de iluminación, mientras que una iluminación constante equivalía a una pinealectomía funcional. Aparentemente, en estos animales, la

TABLA X. - Influencia del fotoperíodo sobre algunos parámetros testiculares, en la vizcacha.

PARAMETROS OBSERVADOS	CONTROLES	ILUMINADAS
Peso testicular (g)	4,98 ± 0,63	2,77 ± 0,31
Testosterona sérica (ng/100 ml)	419,20 ± 12,50	84,50 ± 5,13
Receptores para FSH (fmoles/mg proteína)	14,4 ± 0,12	3,42 ± 0,25

Todos los valores están expresados como Promedio ± E. S.

Las vizcachas controles fueron cazadas en su habitat (oscuridad) y las iluminadas, mantenidas en cautiverio y con iluminación constante, durante 8 días (100 foot candle).

Cada grupo constaba de cinco animales.

Peso testicular: $p < 0,05$

Testosterona sérica: $p < 0,001$

Receptores para FSH: $p < 0,001$

función pineal sería contraria a lo conocido, ya que un período de iluminación de mayor duración posee efecto antigonadotrófico

DISCUSION

Es incuestionable que la biosíntesis de los esteroides androgénicos por el testículo de los mamíferos, depende de las secreciones de la pituitaria anterior y que la LH es absolutamente requerida para la función normal de la célula de Leydig. Sin embargo, es evidente que la esteroidogénesis testicular está regulada, normalmente, por un complejo de hormonas adenohipofisarias además de la insulina, siendo la FSH y la prolactina, componentes de este complejo. Debe indicarse que este concepto no es nuevo, tal como lo demuestran los estudios de Woods y Simpson³¹⁹ sobre el control hormonal de la espermatogénesis en la rata.

Existen similitudes importantes entre los efectos de las hormonas de la pituitaria anterior sobre el testículo y el ovario. El concepto de un complejo luteotrópico, esto es un complejo de hormonas de la pituitaria anterior involucrado en la regulación de la síntesis de progesterona por el cuerpo lúteo de mamíferos, surgido del trabajo de Rothchild, Greep, Greenwald y sus colaboradores (recopilados por Hilliard³²⁰), provee un modelo para comprender los caminos por los cuales la pitui

taria anterior controla la función esteroidogénica del testículo. Similarmente, estudios más recientes de Midgley, Ryan, Channing, Armstrong, Richards, Behrman y otros (recopilados por Richards y Midgley³²¹) sobre los intrincados caminos por los cuales las hormonas de la pituitaria anterior y los esteroides ováricos interactúan regulando los niveles de receptores hormonales en los diferentes compartimientos del ovario, proveen una herramienta conceptual para la investigación de efectos análogos de hormonas peptídicas y esteroideas sobre el testículo.

En este trabajo se ha intentado demostrar la necesidad de este conjunto hormonal en el normal desarrollo de la función testicular, prestando especial atención a los mecanismos moleculares que se ponen en funcionamiento desde que la hormona es reconocida por el sitio discriminador, hasta que se produce la respuesta fisiológica en respuesta al estímulo hormonal.

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

Recientemente se han realizado estudios tendientes a dilu-

cidar las causas de las alteraciones de las funciones reproductivas masculinas en condiciones de diabetes experimental.

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

La segunda hipótesis, es decir una acción directa de los disturbios diabéticos sobre el testículo está 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.

Podría existir una tercera posibilidad, que resultaría de combinar las dos anteriores: es decir que las alteraciones debidas al estado diabético se producirían tanto en el eje hipotálamo-hipofisario como también en el testículo.

En la última década se ha postulado que el binomio hiperglucemia-hipotestosteronemia sería una de las causas responsables de la infertilidad. Sin embargo, el estado diabético no com

prende solamente el aumento de glucosa en sangre, sino un disturbio en el metabolismo corporal.

Los resultados obtenidos recientemente¹⁶⁶ muestran claramente una disminución de la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig en animales diabéticos por estreptozotocina, como se evidencia por los bajos niveles plasmáticos y testiculares de testosterona. El tratamiento sustitutivo con insulina, produjo una recuperación parcial de los niveles plasmáticos de testosterona.

Esta disminución en los niveles séricos del andrógeno podría deberse a una disminución en la síntesis de testosterona por las células de Leydig o a un elevado ritmo de metabolización de la hormona.

Se ha demostrado que la producción de testosterona, en respuesta a la acción de gonadotrofina exógena, es diferente en testículo de animales normales y diabéticos. Así, en los animales diabéticos la producción androgénica es inferior a la de los animales controles. Cuando los animales inyectados con estreptozotocina son tratados con insulina, se observa una recuperación de la respuesta testicular, aunque, en ciertos casos,

no alcanza los valores normales.

Las investigaciones realizadas hasta el momento indican que, concomitantemente con esta reducción en la capacidad biosintética testicular, se produce en las ratas diabéticas una disminución en el número de receptores para LH. La administración de insulina restaura completamente el número de sitios de unión para la gonadotrofina.

El hecho comprobado de que la administración de insulina restablece, en muchos casos a normalidad, los parámetros alterados en el estado diabético, podría indicar una acción directa de la hormona sobre el testículo. Sin embargo, no se puede descartar que la acción primaria se ejerza a nivel del estado diabético en general y que sea este restablecimiento en el estado general lo que provoque la mejoría a nivel testicular.

De ser cierta la hipótesis de la acción directa de la hormona sobre la célula de Leydig, consecuentemente con el postulado de que toda hormona peptídica, para ejercer su acción debe, primeramente, unirse a un receptor específico ubicado en la membrana celular externa, debería encontrarse

un sitio de unión para esta hormona.

En el presente trabajo hemos demostrado que la insulina posee receptores de alta afinidad a nivel de la membrana plasmática de las células intersticiales. Este hallazgo es el primer paso en la elucidación del mecanismo de acción de esta hormona a nivel de las células de Leydig.

El mecanismo de acción de la insulina es un tema ampliamente discutido. Esta hormona tiene variadas acciones sobre el metabolismo general, observándose efectos rápidos sobre el transporte a través de membrana y efectos a largo plazo sobre la síntesis de ARN y ADN. Sin embargo, a pesar de 50 años de investigación, la acción primaria de la insulina aún es 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 efectoras. Luego de esta unión, es presumible que este complejo hormona-receptor 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 la síntesis de ADN y 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 para el glucagón y otras hormonas peptídicas, esté mediada por la formación de un segundo mensajero intracelular. Otra hipótesis indica que la insulina podría entrar en la célula, mediando los eventos intracelulares por su propia acción³²².

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.

Es 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.

Correlacionando la disminución en el número de sitios re

ceptores para la LH y la respuesta testicular disminuida ante el estímulo gonadotrófico y, recordando que estos sitios receptores aparecen funcionalmente acoplados a la adenilato ciclasa, se estimó que una consecuencia lógica de esta disminución en los sitios de unión y, a la vez, posible factor desencadenante de la respuesta dañada, sería el descenso en los niveles intracelulares del "segundo mensajero", es decir, el AMP cíclico.

Así como en otras células esteroideogénicas, se ha demostrado que la estimulación de la producción de esteroides testiculares es mediada por AMP cíclico^{323, 324} y su dibutiril derivado¹⁰⁴, también se ha demostrado que la estimulación por la hormona trófica aumenta la actividad de la adenilato ciclasa¹⁰⁰ y la formación de este nucleótido cíclico³²⁵ en tejido intersticial aislado.

Tomadas en conjunto, estas observaciones están de acuerdo con el papel del AMP cíclico como intermediario de la esteroideogénesis inducida por gonadotrofina en el testículo, aunque aún no se ha establecido la prueba final de este mecanismo.

Con respecto a este punto, los estudios revelaron que, lejos de encontrarse disminuidos en el estado diabético, ante el

estímulo por gonadotrofina exógena, los niveles producidos de AMP cíclico, eran superiores a los valores de estimulación en controles.

Esto indicaría, en principio, que no existiría falla en lo que respecta a la adenilato ciclasa y su acoplamiento funcional al receptor para LH.

Si bien no se presenta alguna falla en este mecanismo, queda aún por explicar el hecho comprobado de que las células provenientes de ratas diabéticas respondan produciendo más AMP cíclico que las células obtenidas de ratas normales.

Tomando en cuenta la existencia de receptores para insulina en la membrana de las células de Leydig y el hecho de que una de las consecuencias del estado diabético, si no la causa, es la menor cantidad de insulina circulante, puede suponerse que, a este nivel, estaría influyendo directamente el menor aporte de esta hormona a la célula de Leydig.

Sin embargo, la acción de la insulina mediada por el AMP cíclico aparece multiforme. En ciertos casos, esta hormona puede elevar los niveles de este nucleótido^{326, 327}, inhibir la adenilato ciclasa³²⁸ o activar la fosfodiesterasa de AMP cíclico^{329, 330}.

En nuestro caso se observó que la administración de insulina a las ratas diabéticas, tenía como consecuencia una dis-minución en los niveles de AMP cíclico, producido ante el estímulo con gonadotrofina exógena.

Esta última evidencia permite suponer, en principio, que la acción de la insulina a nivel testicular sería la de regular, mediante una acción inhibitoria, la actividad de la adenilato ciclase. El descenso en los niveles de esta hormona produciría el desenfreno de esta enzima, resultando en niveles más altos del nucleótido cíclico.

Para demostrar fehacientemente esta hipótesis, el experimento correspondiente sería la medición directa de la activi-dad de la adenilato ciclase. Sin embargo, todos nuestros inten-tos en este sentido fueron infructuosos ya que fue imposible de-tectar aumento por encima de la actividad basal, ante el estímulo con diferentes hormonas (incluidas LH, FSH e insulina).

Otro nivel de posible acción insulínica es la fosfodiesterasa de AMP cíclico. Su activación por insulina también podría dar cuenta del efecto observado.

Frente a estos resultados era necesario interpretar la re-

alidad de una respuesta testicular disminuida, en cuanto a la producción androgénica, correlacionándola con niveles aumentados de "segundo mensajero".

El candidato más lógico para ocupar el vacío entre los niveles aumentados de AMP cíclico y la función celular alterada, en respuesta a las hormonas peptídicas, parecía ser la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

Por este motivo se realizaron estudios para determinar los cambios en la ocupación de los receptores para este nucleótido durante la estimulación con hCG de células de Leydig de ratas diabéticas normales y diabéticas.

El estudio de este aspecto de la síntesis de testosterona reveló que, tanto en las ratas normales, como en las diabéticas, el número de sitios de unión para AMP cíclico permanece invariable, así como también la constante de afinidad de la proteína quinasa por el nucleótido.

Este nuevo indicio nos llevó a buscar la falla en la biosíntesis androgénica más allá del sitio de producción de AMP cíclico y de su unión al receptor citoplasmático, la proteína quinasa.

Es bien conocido que la síntesis de andrógenos requiere energía de reducción, bajo la forma de NADPH³³¹ estimulando la producción esteroidea mediante su papel como cofactor requerido en muchos de los pasos esteroidogénicos, incluyendo la reacción de ruptura de la cadena lateral del colesterol. Así, una menor concentración de NADPH resultaría en una disminución de los niveles de su producto final (por ejemplo, testosterona).

El estudio del sistema productor de NADPH, representado por las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa, reveló una falla en esta etapa del camino biosintético. Se demostró que la actividad de estas tres enzimas se encontraba francamente disminuida, siendo totalmente restablecida por la administración de insulina.

Si consideramos que el aporte disminuido de NADPH en el tejido intersticial de las ratas diabéticas es el único factor de control de la esteroidogénesis, la disponibilidad de grandes cantidades de NADPH exógeno, debe reducir las diferencias en la síntesis de testosterona.

Sin embargo, nuestros resultados obtenidos por incubación de homogenatos de células de Leydig con cantidades óptimas de NADPH, fueron cuantitativamente muy diferentes. Aún con la adición de este cofactor en forma exógena, siguen existiendo las diferencias en la producción de testosterona.

Este experimento, a pesar de los problemas que se derivan de la interpretación de estos resultados, muestra la existencia de alguna otra falla en el camino metabólico, ya que el suministro de cantidades masivas del cofactor no revierte la disminución en la biosíntesis del andrógeno.

Como consecuencia de estos datos, en un intento de encontrar un punto de acumulación de intermediarios, lo que revelaría una etapa enzimática bloqueada, se realizó la incubación de células aisladas con inhibidores de síntesis de esteroides, con el fin de magnificar la acumulación de algún metabolito intermediario en forma preferencial.

En este experimento se evidenció que la inhibición de la síntesis, en presencia de cianocetona y spironolactona, era más acentuada en las diabéticas que en las ratas normales.

Observando la producción de pregnenolona, se puede ver

que, cuando se incubaba con la mezcla de los dos inhibidores, la acumulación es igual para las normales y para las diabéticas, indicando que no existiría falla en el nivel anterior a la producción de pregnenolona.

Sin embargo, incubando en presencia de cianocetona solamente (inhibidor de la Δ^5 -isomerasa), se puede observar una mayor acumulación de pregnenolona en las células provenientes de las ratas diabéticas, lo que podría indicar un bloqueo a nivel de la 17-hidroxilasa.

En otro experimento se determinó la producción de testosterona, progesterona y 17-HO-progesterona, comparando ratas normales, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina.

Los resultados obtenidos, ante el estímulo con hCG, de mostraron que, en el caso de los animales diabéticos, se producía una acumulación de 17-HO-progesterona. El estudio de la relación 17-HO-progesterona:testosterona, indicó que el tratamiento con insulina no era capaz de revertir el bloqueo existente más allá de la 17-hidroxilasa (además del antes mencionado a nivel de esta enzima), sino que el aumento en la capacidad biosintética testicular sería más bien un incremento

inespecífico de la actividad esteroidogénica, probablemente por síntesis "de novo" de las enzimas involucradas.

Por otra parte, el metabolismo alterado de los hidratos de carbono en los animales diabéticos, podría alterar la composición de ciertas glicoproteínas, como son las gonadotrofinas.

En la rata diabética se ha postulado que los disturbios en la función reproductora serían, en parte, debidos a las alteraciones en la secreción o producción de gonadotrofinas hipofisarias³³².

Se han demostrado niveles bajos de gonadotrofinas, ocho días después de la inducción de la diabetes por aloxano³³³. En ratas diabéticas de 21 días (por estreptozotocina y aloxano), los valores séricos de LH tienden a estar disminuidos, en tanto que los valores hipofisarios aumentados. En estos mismos experimentos, los niveles séricos de FSH están inalterados, mientras que los hipofisarios aumentados³³⁴. Estos resultados indicarían que existiría una falla en los mecanismos de secreción de LH, que no estarían alterados respecto de FSH, cuyos valores séricos se mantienen normales.

En la rata pancreatopriva los valores de ambas hormonas no parecen diferir de los correspondientes controles normales.

En nuestro estudio, si bien los valores radioinmunológicos basales, así como también la actividad biológica de la LH, se encuentran inalterados, esta alteración puede observarse cuando se somete a la hipófisis a la situación de "stress" que representa la castración. En esta oportunidad se pudo observar que la diabetes altera la respuesta, no detectándose la elevación de los valores séricos de gonadotropina que es posible encontrar en los animales normales. Cuando al animal diabético se lo somete al tratamiento con insulina, se recupera la respuesta hipofisaria (determinando la concentración de LH por radioinmunoensayo), aunque esta gonadotropina posee actividad biológica disminuida.

Este hecho indica no solamente la alteración en la gonadotropina hipofisaria observada en la situación de diabetes experimental, sino que además presenta la discrepancia entre la medición radioinmunológica y la determinación de la actividad biológica de la hormona ensayada. Esto significa que el si-

tio de reconocimiento inmunológico no tiene por qué ser el mismo que es reconocido por el receptor para que la hormona ejerza su actividad informática.

Los estudios presentados en este trabajo sobre la acción de la insulina, unidos al conocimiento presente sobre el mecanismo de acción de las gonadotrofinas sobre el testículo, pueden ser relacionados con los conocidos cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren durante el establecimiento de la diabetes experimental y aportan evidencias sobre la necesidad de recurrir a un conjunto hormonal, antes que a un único estímulo, para explicar el funcionamiento normal de la célula de Leydig.

En nuestro diseño experimental, la deficiencia en insulina o su reemplazo no son las únicas variables en las ratas diabéticas.

Es posible que la acción de la insulina sobre los parámetros endocrinos estudiados, sea un efecto indirecto concomitante con otras anormalidades metabólicas, características del estado diabético.

Con respecto a este punto estudiado, queremos enfatizar

que, en nuestras condiciones experimentales, las células de Leydig de las ratas diabéticas presentan diversas alteraciones bioquímicas cuando se las compara con los controles alimentados "ad libitum" y que la administración de insulina a estas ratas corrige estos defectos.

Prosiguiendo el estudio de los estímulos involucrados en la regulación de la función de las células de Leydig, pasamos a investigar la acción de otra hormona, en este caso proveniente de la adenohipófisis, aceptada como factor importante en la actividad testicular.

Está bien establecido que la prolactina, además de su efecto sobre la glándula mamaria, influencia la esteroidogénesis ovárica y regula el metabolismo lipídico en el ovario³³⁵⁻
340.

En los mamíferos machos, la prolactina también está presente en la pituitaria^{341, 342} y en la sangre periférica^{343,}
344. Sin embargo, el papel fisiológico de la prolactina en el macho no está completamente establecido. Existen evidencias que indican que la producción androgénica por el testículo, depende de un complejo de hormonas hipofisarias y que

la prolactina sería parte de este complejo^{186, 187, 208}.

Se ha demostrado el efecto de la prolactina sobre la 3- β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa, en testículos de ratones enanos²¹¹. También se demostró la acción sinérgica de la prolactina con la hormona luteinizante en la restauración de la espermatogénesis en ratones hipofisectomizados²⁰⁸.

El estudio, "in vitro", del efecto de la prolactina y la LH sobre la incorporación de (1-¹⁴C)-acetato a testosterona y colesterol, utilizando testículos de ratas hipofisectomizadas, demostró que la síntesis de testosterona aumentaba significativamente más con el tratamiento con prolactina y LH juntas que con LH sola, pero que ambos tratamientos causaban el mismo grado de depleción del colesterol esterificado¹⁸⁸. Esto indicaría que la acción de la prolactina estaría en el aumento del colesterol esterificado disponible para la conversión a hormonas esteroideas, paso que depende principalmente de LH. Este mecanismo también puede ser inferido de los trabajos sobre el control hormonal de las reservas de colesterol en el testículo de ratón²⁰⁸.

En otros experimentos en los que se midió el efecto de

prolactina y LH sobre los niveles plasmáticos de testosterona y androstenediona, en ratas hipofisectomizadas, se encontró que la concentración plasmática de testosterona en los animales tratados con ambas hormonas era significativamente mayor que en el grupo tratado exclusivamente con LH¹⁸⁴. La relación testosterona/androstenediona disminuye en los animales hipofisectomizados y vuelve a la normalidad con el tratamiento combinado de ambas hormonas, no sucediendo lo mismo cuando se trata a los animales tratados exclusivamente con LH.

Las múltiples evidencias experimentales de la acción de la prolactina sobre la función testicular, unidas a la existencia demostrada de receptores específicos para esta hormona en la membrana plasmática de las células intersticiales del testículo, hablan bien a las claras de una acción directa de esta hormona sobre la gónada masculina.

Como primer paso en el estudio de la acción de esta hormona se caracterizó parcialmente su receptor. Para esto se lo solubilizó utilizando un detergente no iónico como el Tritón X-100 y se analizó su coeficiente de sedimentación ultracentri

fugando el receptor solubilizado de las partículas marcadas con hormona radiactiva, en gradientes de sacarosa.

Se puede demostrar que el sitio receptor para prolactina constituye una entidad macromolecular diferente de la correspondiente al receptor para gonadotrofina, dado que su constante de sedimentación observada fue de 6S, comparada con la correspondiente de 8,8S para el sitio de unión de LH.

Habiéndose demostrado que las acciones biológicas de varias hormonas son modificadas por reactivos de grupos sulfhidrilos, sugiriendo que grupos SH libres serían esenciales para la interacción hormona-receptor y/o la respuesta biológica específica. Así, parece que los grupos sulfhidrilos juegan un importante papel en la actividad de receptores para transmisores alfa adrenérgicos^{345, 346}, hormona estimulante de los melanóforos³⁴⁶, secretina, glucagón³⁴⁸ y estrógenos³⁴⁹. La importancia de las uniones disulfuros para la actividad del receptor, ha sido menos estudiada.

En este estudio sobre el receptor para prolactina, se ha investigado la importancia de los grupos disulfuros proteicos para la unión de la hormona, determinando la actividad de

unión de prolactina marcada con ^{125}I , luego de la reducción y alquilación de receptores o del complejo receptor-hormona.

Los resultados obtenidos luego de tratar el receptor particulado con agentes reductores, como ditioneitol o 2-mercaptoetanol y realizando posteriormente el ensayo de unión de hormona marcada, demostraron que no ocurría pérdida de capacidad receptora evidenciando que no sería necesaria la presencia de puentes disulfuros intactos para la formación del complejo hormona-receptor. Resultado similar se obtuvo cuando el tratamiento reductor se realizó posteriormente a la unión de la hormona a su sitio receptor, indicando que estos agentes no son capaces de separar la hormona unida.

Cuando se alquilaron los grupos SH libres del receptor, utilizando el agente N-etil-maleimida, se encontró una disminución notable de la capacidad de unión cuando, posteriormente al tratamiento, se efectuó la marcación de la partícula receptora con la hormona radiactiva. Si el tratamiento alquilante se realizaba con posterioridad a la unión de la prolactina al sitio receptor, no se observaba disminución en la unión. Estos resultados indican que la presencia de grupos SH libres, adya-

centes al sitio activo del receptor, son indispensables para lograr la máxima unión de la hormona pero que, una vez formado el complejo hormona-receptor, estos grupos se encuentran protegidos de la acción del agente alquilante, no siendo capaz de separar la unión formada.

Como se puede observar, estas pruebas concluyen que la macromolécula ligadora de prolactina es una entidad completamente diferente de la correspondiente a la LH pues, como se demuestra en estudios realizados³⁵⁰, los resultados obtenidos para este último receptor son completamente opuestos a los aquí presentados para el sitio de unión de prolactina.

Una de las acciones de prolactina sobre el testículo consiste en la regulación del número de sitios de unión para LH. En el presente estudio se investigó la acción de dos concentraciones diferentes de prolactina, administradas por vía subcutánea, sobre este parámetro. El resultado observado fue un incremento dependiente de la dosis, con mantenimiento de la constante de afinidad. Como comprobación de este mecanismo se realizó la medición de los sitios de unión para LH en testículos de ratas tratadas con bromocriptina (inhibidor de la liberación

de prolactina) o sulpiride (liberador de prolactina). Los resultados obtenidos concuerdan con un efecto directo de la prolactina en la regulación de los sitios receptores para gonadotropinas pues la inhibición de la liberación de prolactina, por el derivado de la ergotamina, conduce a una disminución en el número de sitios de unión, mientras que el aumento de esta hormona por sulpiride provoca un incremento acentuado en el número de los receptores para LH.

Este efecto parece ser específico para los receptores para LH ya que la determinación de la capacidad de unión para FSH en túbulos de testículos de ratas tratadas con prolactina, bromocriptina o sulpiride no arrojó valores diferentes de los observados en controles, inyectados con vehículo.

Esta última observación está de acuerdo con el hecho de que no se han observado receptores para prolactina en la fracción tubular del testículo de rata.

En el estudio de la función testicular frente a la inyección de diferentes dosis de prolactina, se encontró un aumento en la testosterona circulante para el caso de la menor dosis inyectada (50 ug) mientras que cuando la dosis se aumentó a 500 ug no

hubo diferencia respecto del control. Este resultado se confirmó con la investigación de la respuesta celular a la estimulación, "in vitro", con gonadotropina. Se observó una mayor res puesta cuando las células estimuladas provenían de testículos de ratas tratadas con la menor dosis, no encontrándose diferen cias en el otro caso, comparando con las células controles.

Demostrando un paralelismo entre la presencia de sitios receptores para LH y la actividad de adenilato ciclasa se pudo observar que la estimulación con gonadotropina exógena resultaba en una mayor producción de AMP cíclico, dependiendo de la dosis de prolactina administrada a las ratas. Esto está de acuerdo con el hecho demostrado del aumento en el número de sitios receptores para LH, dependiente de la dosis de hormona inyectada, estando éstos funcionalmente acoplados a la enzima adenilato ciclasa.

Es conocido que el estado hiperprolactinéxico va acompañado, generalmente, de hipogonadismo. Podría suponerse que, en el caso de la administración de 500 ug de prolactina estaríamos en una situación semejante, resultando en una res puesta dis minuida, respecto de lo observado para una dosis menor.

Por otra parte, al observar que los niveles del nucleótido cíclico se encuentran aumentados ante el estímulo exógeno con LH, sin un aumento concomitante en la síntesis de testosterona, se podría suponer la presencia de una inhibición en alguna etapa del camino biosintético o alguna bifurcación hacia otros metabolitos, resultando en una disminución en la síntesis de testosterona.

Nuevamente, buscando el nexo entre los niveles de AMP cíclico aumentados y la respuesta de testosterona, se investigó la proteína quinasa dependiente de este nucleótido cíclico.

Ciertos estudios indicaron que, en glándula mamaria, la acción de la prolactina estaría mediada por el aumento en el número de sitios intracelulares de reconocimiento para este nucleótido, es decir las proteínas quinasas. Sin embargo, no existen evidencias en este sentido en tejido testicular.

El análisis de los sitios de unión para AMP cíclico indicó un incremento en el número de receptores para este nucleótido en forma inversa a la dosis, es decir que el mayor aumento se obtuvo con la menor dosis, mientras que la administración de 500 ug de prolactina provocó un menor incremento, respecto de

los controles. Esto implicaría un comportamiento bimodal de la prolactina respecto de la regulación de las proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico, aunque no explicando la ausencia de estimulación observada en las células provenientes de ratas tratadas con la mayor dosis de prolactina, respecto de la producción de testosterona. Evidentemente el bloqueo o la bifurcación deberá buscarse más allá del sitio de producción y reconocimiento del nucleótido cíclico.

Un mejor acercamiento de la prolactina respecto de la producción de testosterona, en el sentido de evidenciar una acción directa de la hormona sobre la célula de Leydig, se obtendría mediante la incubación "in vitro" del tejido intersticial con las hormonas.

La realización de experimentos tendientes a comprobar esto dió como resultado una acción sinérgica de prolactina en LH en la producción de testosterona, no debida a una contaminación de la prolactina con esta gonadotrofina, como lo demuestra la estimulación de las células con hormonas previamente purificada por una columna de Concanavalina-A, para eliminar todo resto glicoproteico (por ejemplo, LH). Se pudo

observar un aumento en la biosíntesis de testosterona, así como también un aumento significativo en la producción de AMP cíclico, abriendo la posibilidad de un acoplamiento funcional entre los receptores para la prolactina y la adenilato ciclasa, hecho comprobado en próstata³⁵¹.

Todas estas observaciones, tomadas en conjunto, abren el panorama hacia la elucidación del mecanismo de acción de esta hormona, "permisiva" según ciertos autores, quedando a la espera de muchos más resultados que completen los huecos que todavía median entre la acción de la hormona a nivel de la membrana plasmática y el sinergismo, en ciertos casos, con LH, para la producción de testosterona.

En este punto llegamos a la tercera de las hormonas estudiadas y que abre la posibilidad más interesante por cuanto se trata de la gonadotropina considerada como indispensable y "sine qua non" para el funcionamiento normal de la célula de Leydig. Nos referimos a la hormona luteinizante o, también conocida como ICSH (hormona estimulante de las células intersticiales). Perdida, en cierta forma, su exclusividad en la regulación de la función testicular, sin embargo, no deja de

asombrarnos presentando un mecanismo tan fascinante como es el de la "desensibilización" testicular ante el estímulo de esta hormona.

Una acción de las hormonas peptídicas, recientemente reconocida, es su capacidad de regular la concentración de sitios receptores específicos en la superficie de sus células efectoras. Este fenómeno fue observado, inicialmente, como modulación antigénica de inmunoglobulinas de superficie y, más tarde, como regulación homóloga de receptores para hormonas peptídicas^{352, 353}. Tal regulación puede ser positiva o negativa, pero lo más común es la pérdida de receptores, con poco cambio de las propiedades de unión de los receptores residuales. Similarmente, se ha demostrado que la administración de gonadotrofinas tales como LH o hCG causa una pérdida marcada de sitios receptores en el testículo y ovario. En la mayoría de los tejidos, las consecuencias de la pérdida de receptores inducida por la propia hormona, sobre la función de la célula efectora, no han sido examinadas en detalle, a pesar que numerosos trabajos han establecido que la desensibilización de la adenilato ciclasa al estímulo hormonal está correlacionada

con la reducción de los receptores específicos³⁵⁴. Los efectos desensibilizantes de la gonadotrofina sobre la adenilato ciclasa ovárica son bien conocidos¹³⁷⁻¹⁴⁰ y se ha demostrado que poseen, al menos, dos componentes, una pérdida inicial y transitoria de la actividad enzimática y una posterior y más prolongada pérdida de receptores para LH. También, la regulación negativa de los receptores testiculares y ováricos para LH por gonadotrofina, se acompaña con respuestas reducidas de AMP cíclico y testosterona, durante la estimulación hormonal, "in vitro"^{120, 122}.

Los estudios realizados en tejido testicular y células de Leydig purificadas de animales tratados con gonadotrofinas, han demostrado que ocurren importantes consecuencias funcionales como resultado de la regulación de receptores por LH y hCG^{52, 120}. La administración de una única dosis de hCG o LH ovina, como análogos de la hormona luteinizante endógena, causan una pérdida marcada de receptores para LH y de la respuesta de los testículos, "in vitro".

Se encontró que la pérdida de receptores para LH después del tratamiento con hCG era menos marcada en preparaciones

solubilizadas con Tritón X-100¹²⁴ que en la correspondiente fracción particulada, enriquecida en membranas. Esta diferencia en sitios disponibles sugiere que una proporción de la población de receptores en disminución, es enmascarada u ocluida dentro de la membrana y puede ser liberada para la interacción con la hormona cuando se la solubiliza con detergentes no iónicos, Pareciera que la oclusión inicial de sitios receptores a nivel de la membrana es sucedida por la internalización de los complejos por endocitosis y la subsecuente degradación luego de su asociación a lisosomas, similar en consecuencia y, probablemente también en mecanismo, al proceso de pinocitosis adsortiva, por la cual solutos unidos a sitios de reconocimiento específicos son internalizados, unidos a la membrana de la vesícula pinocítica¹²⁵. Así, estudios recientes han sugerido que algo de la LH unida a las células de Leydig, sería internalizada y, eventualmente, degradada por los lisosomas¹²⁷.

Otras observaciones en células ováricas luteinizadas revelaron que los complejos hormona-receptor inicialmente formados en la membrana celular son, luego, internalizados y se.

los encuentra asociados con una fracción particulada del citoplasma³⁵⁵. También se han presentado evidencias sobre la internalización del factor de crecimiento epidermal, unido a célula y sobre la pérdida de los receptores específicos luego de la endocitosis del complejo receptor-factor de crecimiento³⁵⁶.

Estos varios ejemplos de endocitosis de complejos hormona-receptor, forman parte de la actividad más general del sistema vacuolar responsable de la pinocitosis seguida del procesamiento, digestión y reciclado de los componentes ingeridos. En cuánto este proceso es activado por ligandos hormonales y si éste representa algo más que la expresión de una respuesta celular general a la unión a membrana de ligandos extracelulares, es algo que aún debe ser aclarado. Sin embargo, la función de tal proceso para efectuar una regulación de la población de receptores ha sido claramente demostrada en estudios sobre el receptor lipoproteico de baja densidad en cultivos de fibroblastos³⁵⁷ y podría dar cuenta del descenso crónico de la concentración de receptores en células expuestas a niveles hormonales elevados durante períodos prolongados.

La producción de AMP cíclico es proporcional al conteni

do en receptores y sigue muy de cerca la pérdida de receptores. La desensibilización aguda de la respuesta de AMP cíclico ocurre pocas horas después del tratamiento con hCG y corresponde a la fase inicial de la ocupación de los receptores, previa a la pérdida de sitios de unión y de respuesta que ocurre dentro de los 2 a 6 días posteriores a la administración de hCG.

Los cambios correspondientes en la producción de testosterona por células de Leydig, luego del tratamiento con hCG son más complejos y presentan una relación muy interesante entre la acción fisiológica conocida de la hormona trófica en el mantenimiento de la función celular y la secreción androgénica. Los resultados revelan que el proceso de regulación de los sitios receptores que ocurre a todo nivel de ocupación, es seguido por un incremento del camino esteroidogénico cuando se administran dosis pequeñas de hormona, "in vivo", para estimular los niveles gonadotróficos fisiológicos. Contrariamente, las células de Leydig de animales tratados con altas dosis de hCG, muestran una marcada reducción de la respuesta esteroidea máxima entre los 2 y 4 días.

Dado que la célula de Leydig posee una abundante reserva de receptores de "repuesto", en relación con la esteroidogénesis ¹⁰⁴, cualquier reducción en el contenido de sitios de unión, debería causar un corrimiento hacia la derecha en la curva de dosis-respuesta, con una disminución en la sensibilidad a la hormona gonadotrófica. Sin embargo, no se alcanza la respuesta máxima en la producción de testosterona, "in vitro", luego del tratamiento con hCG.

Esta imposibilidad de alcanzar la respuesta esteroidea máxima a la gonadotrofina, en células "desensibilizadas", podría surgir de un defecto a uno o varios niveles de la secuencia tendiente a la producción de testosterona. El hallazgo de que la estimulación hormonal, "in vitro", produce un aumento significativo en la síntesis de pregnenolona indica que la segunda lesión, inducida por la gonadotrofina, en el camino metabólico se encuentra más allá de la enzima responsable de la ruptura de la cadena lateral del colesterol. Sin embargo, cuando la población de sitios receptores disminuye hasta llegar a ser del 1%, la respuesta en la producción de pregnenolona ante el estímulo, "in vitro", con hCG es completamente abolida. Esto indi

ca que una disminución más extensa de sitios receptores, está asociada con la pérdida de los procesos necesarios para mantener las enzimas esteroidogénicas incluyendo el sistema de ruptura de la cadena lateral del colesterol.

Estudios recientes han ubicado la lesión esteroidogénica como un bloqueo parcial de la 17,20-liasa. Este defecto enzimático lleva a la acumulación de progesterona, 17- α -HO-progesterona, pregnenolona y 17- α -HO-pregnenolona.

La causa de esta disminución marcada en la actividad de la 17,20-liasa debe aún ser dilucidada.

Basándonos en estos resultados, enfocamos el estudio de la acción de la hormona luteinizante sobre la célula de Leydig investigando el efecto que tendrían varias dosis de gonadotropina sobre este proceso de desensibilización. Motivó este estudio el hecho de que una de las pruebas de funcionalidad testicular, realizada en pacientes con síndrome de testículo criptorquídico o no descendido, consiste en la inyección de múltiples dosis de gonadotropina coriónica humana, a diferentes intervalos, midiendo posteriormente la concentración plasmática de testosterona. Si este proceso de desensibilización ocurre en el

ser humano, se presentó la pregunta acerca de qué sucedería en estos casos donde dosis masivas de gonadotrofina son suministradas repetidas veces.

Nuestro modelo experimental fue la rata tratada con dos dosis de hCG (200 UI cada dosis), administrada subcutáneamente.

Los resultados obtenidos demuestran que la administración de hCG disminuye el número de sitios receptores y que una segunda dosis administrada en el momento de restauración de la población de receptores vuelve a ocasionar una disminución en la capacidad de unión de gonadotrofina. Vale decir que el tratamiento con dosis elevadas de hCG siempre produciría una disminución en el número de sitios receptores, quizás como parte del mecanismo de acción de esta hormona. En un estudio realizado, "in vitro", hemos observado que incubando testículos descapsulados en presencia de grandes cantidades de hCG, se producía una desaparición de receptores a los 15 minutos de incubación, permaneciendo en este nivel durante las 4 horas que duró el experimento. Esto podría indicar que, dentro del mecanismo de acción de la hormona luteinizante, es

ta desaparición de sitios receptores, posiblemente unidos a la hormona, sería fundamental para el desarrollo de la respuesta fisiológica.

Sin embargo, una segunda dosis de hCG, a pesar de ir acompañada por pérdida de receptores y "desensibilización" de la adenilato ciclasa, no impide alcanzar la respuesta máxima en la producción de testosterona sino que, por el contrario, produce un fenómeno de lo que podría llamarse como "supersensibilidad" ya que la producción de testosterona por los testículos estimulados, "in vitro", con hCG en cantidad saturante, sobrepasa en mucho la producción control.

Este estímulo, aparentemente, seguiría participando de las características comunes a una estimulación "normal" ya que continúa dependiendo de la síntesis continua de proteínas y también es posible desencadenarlo por incubación con dibutiril-AMP cíclico. Es de notar que al incubar el testículo de la rata tratada con dos dosis de hCG, la producción de testosterona no va acompañada con un aumento notable en la producción de AMP cíclico. Esto supondría el desarrollo de un mecanismo esteroideogénico alternativo, independiente del nucleótido cíclico o bien

que el mecanismo común se "sensibilizaría" de tal forma que pequeñas cantidades de AMP cíclico, no detectables por nuestro método de medición, serían capaces de estimular la biosíntesis esteroidea a niveles supranormales.

El estudio de la ubicación de la lesión en el camino metabólico, mediante la determinación de la producción de progesterona y su derivado 17-hidroxilado, indicó que la segunda inyección de hCG, aparentemente, revertiría este bloqueo, llevando la relación intermediario:testosterona a valores normales.

El agregado de NADPH exógeno a preparaciones celulares, rotas por congelamiento rápido y descongelamiento lento, reveló la menor producción esteroidea por las células de ratas inyectadas con una única dosis de hormona y la estimulación por encima de los valores normales para el otro grupo de animales.

Todos estos datos, tomados en conjunto, permiten suponer que la primera dosis de hCG actuaría como "dosis desensibilizante", mientras que la segunda administración de gonadotrofina de desencadenaría una respuesta supramáxima en lo que a producción de testosterona se refiere, revirtiendo el bloqueo enzimático pro-

vocado por la primera inyección. El mecanismo por el cual es ta segunda dosis de hormona sería capaz de revertir el proceso de desensibilización esteroideogénica, manteniendo la inhibición a nivel de la adenilato ciclasa, está aún por ser dilucidado.

Este efecto podría desarrollarse a nivel genómico, induciendo una síntesis "de novo" de las enzimas involucradas en el proceso biosintético.

Es de notar que este proceso parecería requerir de un cierto tiempo de desarrollo o maduración ya que, como presen tamos en los resultados, si la segunda dosis de hCG se adminis tra 24 horas después de la primera, se mantiene el proceso desensibilizante y no se observa esta respuesta supranormal. Podría pensarse en un "agotamiento celular" de forma tal que esta segunda inyección no fuera capaz de desencadenar el proceso de "resensibilización" por encontrar a la célula en un estado de "saturación" con mínimo aporte de sustratos para la producción de testosterona.

Teniendo en cuenta que el proceso desensibilizante parecería comenzar con una pérdida de sitios receptores, un paso ten-

diente a aclarar un poco más este punto fue la determinación de la vida media del receptor para LH.

El estudio de la capacidad de unión del receptor para la hormona luteinizante en presencia de cicloheximida, es decir con síntesis proteica inhibida (en un 90%), dio como resultado que la vida media del receptor debe ser muy superior a las 12 horas. Se pudo observar, incluso en el control, una disminución en la capacidad de unión entre las 4 y 8 horas de incubación, permaneciendo constante durante el resto del tiempo que duró la experiencia.

Esta pérdida de receptores con el tiempo de incubación está de acuerdo con el modelo propuesto por Bhalla³⁵⁸, en el cual se menciona que, luego de la unión de la hormona con su receptor, se produce una separación de este complejo de la membrana, apareciendo en el medio de incubación. Incluso la incubación de testículos en ausencia de hormona produce la aparición en el líquido de incubación de partículas receptoras, aumentando su concentración cuanto mayor es el tiempo de incubación o mayor es el volumen de suspensión del tejido.

Esto abre la posibilidad de que la desaparición de los si-

tios receptores se produzca por dos mecanismos diferentes como son la endocitosis y la liberación de la membrana celular.

Esta vida media del receptor prolongada, refuerza el hecho de que la desaparición de los sitios receptores de la membrana celular, es una consecuencia de la formación del complejo hormona-receptor.

Recientemente se ha realizado un estudio relacionando la concentración de testosterona en el fluido testicular y los receptores para hormona luteinizante en testículo de rata³⁵⁹.

En este trabajo se postula que la testosterona podría ser el agente mediante el cual la hCG induciría la reducción en los receptores para LH/hCG, en testículo de rata.

Sin embargo, hasta el presente, ningún trabajo ha demostrado la acción directa de la testosterona en la regulación del contenido en receptores para LH.

Intentando resolver esta cuestión, medimos la concentración de sitios receptores para esta gonadotropina en testículos de ratas normales, hipofisectomizadas e hipofisectomizadas tratadas con 500 ug de testosterona, durante 9 días. Se pudo observar una disminución en el número de sitios receptores en el gru-

po de animales tratados con el andrógeno, respecto de los hipofisectomizados sin tratamiento. Por otra parte se confirmó el hecho bien demostrado de que la hipofisectomía reduce la cantidad de receptores para LH.

Si este mecanismo operase en condiciones fisiológicas, sería una forma de regulación ultra corta de la función testicular, mediante la modulación del número de los sitios de reconocimiento hormonal por el producto biosintético, originado en respuesta a la información portada por la molécula gonadotrófica.

Los datos presentados hasta el momento en este trabajo, apoyan la hipótesis de la necesidad de un conjunto hormonal, actuando sobre las células intersticiales del testículo para lograr un funcionamiento testicular normal. Por lo menos cuatro hormonas diferentes son necesarias: LH, prolactina, FSH e insulina.

Pero el panorama no es tan simple ya que otras hormonas pituitarias han sido propuestas como reguladoras de la función testicular.

Los efectos de la hormona de crecimiento sobre la esteroidogénesis testicular no han sido examinados sistemáticamente. De las similitudes estructurales entre la hormona de crecimen-

to y la prolactina y de la considerable superposición en sus actividades biológicas, puede sospecharse que ambas hormonas posean efectos comparables sobre la función testicular. En ratones hereditariamente enanos, que poseen una deficiencia congénita de hormona de crecimiento y prolactina, la administración de una de estas hormonas es capaz de estimular la espermatogénesis³⁶⁰ e inducir la fertilidad³⁶¹. Woods y Simpson³¹⁹ observaron que la hormona de crecimiento puede potenciar la acción de las gonadotrofinas sobre la espermatogénesis en ratas hipofisectomizadas. En el hamster, la regresión testicular inducida por exposición a un fotoperíodo corto, es revertida por tratamiento con hormona de crecimiento, que aumenta el peso testicular y de las vesículas seminales, la unión de LH por homogenatos testiculares y los niveles plasmáticos de testosterona⁵⁵. También se describió aumento en la cantidad de receptores para LH luego de la administración de hormona de crecimiento, en ratas hipofisectomizadas⁶⁰.

Estos efectos de la hormona de crecimiento puede ser de importancia fisiológica durante la pubertad, dado que en ratas inmaduras hipofisectomizadas, el tratamiento con hormona de

crecimiento aumenta significativamente la respuesta testicular a la gonadotropina exógena.

La administración de ACTH causa un incremento agudo en los niveles plasmáticos de testosterona en pecarí³⁶², pero también se ha descrito inhibición de la esteroidogénesis testicular^{363, 364}. Contrariamente a las indicaciones de que el "stress" y los corticoides suprimen la función testicular³⁶⁵⁻³⁶⁸, la inyección de cortisol a ratas inmaduras, aumentó la respuesta del testículo a la LH³⁶⁹.

Hasta ahora no se ha detectado una acción directa de TSH sobre la producción androgénica. Sin embargo, ambos el hipo y el hipertiroidismo pueden interferir con la función testicular normal³⁷⁰. La posibilidad de un efecto importante, aunque indirecto, del eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo sobre el testículo, está dada por la capacidad del TRH de estimular la liberación de prolactina.

Respecto de la acción hormonal sobre la función testicular, puede verse que el panorama es muy amplio y las funciones diversas. Pero esta situación no es la única involucrada en el desarrollo de la función esteroidogénica normal sino que, además,

se presentan otras circunstancias que pueden modificar estos efectos hormonales.

Una circunstancia capaz de influir en el funcionamiento normal de la célula de Leydig, es la administración de andrógenos en la etapa prepuberal.

La diferenciación del hipotálamo, que determinará el ritmo de la secreción hipofisaria en el animal adulto, se produce en los primeros días de vida.

Se propuso la existencia de dos centros, uno responsable de la secreción cíclica propia de la hembra y otro, determinante de una secreción tónica. En el caso del macho, el primero de los centros se atrofiaría por efecto de los andrógenos testiculares y esto provocaría la diferenciación del hipotálamo hacia una producción constante de gonadotrofinas.

Cuando este tratamiento se realiza en machos, inyectando una dosis de 5 mg de testosterona a las 48 horas de vida, se producen modificaciones en los niveles hormonales de FSH y prolactina que se encuentran anormalmente altos, mientras que los valores de LH y testosterona permanecen normales. Paralelamente a esto, se observa una disminución significativa del peso testi

cular y de los órganos sexuales accesorios tales como próstata, epidídimo y vesículas seminales.

Entre los estudios que realizamos, determinamos la capacidad de unión de gonadotrofinas por los testículos de estos animales androgenizados neonatalmente.

El estudio de los receptores testiculares para LH y FSH, en ratas adultas normales y androgenizadas, demostró que ambas poseen igual número de sitios de unión, con idéntica constante de afinidad. Cuando determinamos los receptores para FSH en ratas inmaduras, normales y androgenizadas, el resultado demostró un pequeño incremento en la capacidad de unión luego del tratamiento con testosterona.

Esto indicaría que, a nivel de la discriminación hormonal, la androgenización prepuberal no produciría ningún efecto.

El hecho de que la concentración sérica de testosterona sea normal en las ratas androgenizadas, demostraría una actividad biosintética y secretoria normal del testículo. Sin embargo, al realizar estudios de estimulación testicular por agregado exógeno de gonadotrofina (hCG), determinando la testosterona liberada al medio de incubación, encontramos un efecto muy intere-

sante.

Los resultados obtenidos demostraron que el testículo de la rata androgenizada es capaz de responder en una forma más sensible, desarrollando una respuesta máxima superior, que el testículo de una rata normal.

Buscando una explicación a este hecho, pensamos que la encontraríamos en los niveles moderadamente elevados de prolactina circulante. En este punto debemos recordar todo lo dicho acerca de la acción sinérgica entre la prolactina y la hormona luteinizante, en lo que a producción de testosterona se refiere.

A los efectos de dilucidar el fenómeno descubierto, se preparó un lote de ratas androgenizadas, inyectadas además con bromocriptina (inhibidor de la liberación de prolactina). Repitiendo el experimento antes descrito, encontramos que los resultados obtenidos eran similares a los ya mencionados, es decir que los testículos de las ratas androgenizadas respondían produciendo más testosterona que las ratas normales.

Como podemos observar, no se puede buscar la respuesta a la disminución en el peso de los órganos sexuales en una pro-

ducción menguada de testosterona. Es posible que se deba a una falla en el sistema de discriminación hormonal de estos órganos, impidiendo la acción normal de la hormona androgénica en sus tejidos efectores, ya sea por un menor número de sitios receptores o, quizás, por un impedimento de traslocación al interior del núcleo y posterior acoplamiento a la cromatina para regular la actividad transcripcional.

De todas formas aún no se han podido establecer las causas que determinan la mayor sensibilidad testicular a la estimulación con gonadotrofinas, en el caso de las ratas androgenizadas.

Otro factor importante para tener en cuenta en el estudio de la función reproductiva en la rata macho es la edad.

Una función reproductiva reducida es característica del envejecimiento en varias especies de mamíferos. A pesar que el mecanismo neuroendocrino preciso, involucrado en las alteraciones de la reproducción relacionadas con la edad, permanece sin resolver, la información corriente sugiere que la edad podría afectar varios componentes del sistema de control hipotálamo-hipofisario-gonadal.

Recientemente se ha demostrado que el envejecimiento reduce los niveles séricos de testosterona, tanto en ratas machos como en humanos^{280, 284}. Los efectos de la edad sobre la función gonadal están relacionados con los efectos del envejecimiento sobre la secreción de gonadotrofinas. No existen evidencias de que la reducción de la producción de esteroides gonadales, en animales envejecidos, esté acompañada por un aumento concomitante en la liberación de gonadotrofinas pituitarias. En la mayoría de los estados reproductivos, las ratas envejecidas poseen niveles séricos de LH reducidos. Estas concentraciones bajas de LH sugieren una secreción pituitaria de LH crónicamente reducida.

En ratas machos envejecidas se han encontrado niveles séricos de testosterona reducidos²⁸⁰. Si el control del sistema reproductivo de estos machos envejecidos funcionase normalmente, esta disminución de la testosterona debería reflejarse en un aumento de la secreción de LH. Se han descrito niveles basales reducidos de LH^{287, 289} en diversos estados reproductivos y, dado que las ratas machos envejecidas son capaces de responder a una inyección de hCG con niveles séricos de testos-

terona aumentados, se concluye que la testosterona sérica reducida refleja una menor estimulación gonadotrófica de los testículos.

En nuestro experimento investigamos la cantidad de sitios receptores para LH en testículo de ratas envejecidas. Los resultados obtenidos demuestran que estos animales poseen una menor capacidad de unión para esta gonadotropina, comparada con los valores normales de las ratas adultas jóvenes. La constante de afinidad no sufre alteraciones.

Por otra parte, si a estas ratas envejecidas se las somete a un tratamiento con testosterona (100 ug durante 14 días) y después se determina el número de sitios receptores para LH, se puede observar que la población receptora permanece sin modificaciones cuantitativas, opuestamente a lo que ocurre con las ratas adultas jóvenes, en las que se verifica una disminución en este parámetro.

Esta disminución observada en las ratas jóvenes podría deberse a un efecto a nivel hipofisario con inhibición de la liberación de LH, influyendo indirectamente sobre el testículo. En este caso, el no observar un cambio similar en la rata envejecida sería un ín-

dice de una actividad pituitaria dañada, no siendo capaz de responder ante el estímulo androgénico con una menor liberación de gonadotrofina.

Por otra parte, podríamos estar en presencia del mecanismo de retroalimentación ultra corto que postulamos como posible entre testosterona y receptores para LH en testículo. Esto indicaría que ese mecanismo de regulación de los receptores para la gonadotrofina por el producto metabólico testicular, sería también afectado por el envejecimiento, tornándose el testículo más refractario a una regulación hormonal.

Estos resultados, tomados en conjunto con los otros datos presentados en la literatura, dan cuenta del efecto de la edad sobre la función pituitaria y su relación con la actividad gonadal, tal vez como expresión del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal defectuoso.

El último factor estudiado, en relación con la actividad gonadal, fue el efecto del fotoperíodo y, en consecuencia, de la función pineal sobre el testículo de vizcacha.

Dada la relación obvia entre el fotoperíodo y el estado de los órganos reproductivos, los investigadores relacionaron inme-

diatamente las alteraciones estacionales en la competencia sexual con los cambios anuales de la longitud del día. Ciertamente se ha comprobado que, en los hamsters, la involución reproductiva está asociada con los cortos días de invierno y que esta involución se prevenía con la pinealectomía, anterior a la exposición de los animales a fotoperíodos naturales. Adicionalmente, mientras los hamsters intactos eran incapaces de reproducirse durante los meses de invierno, los animales pinealectomizados experimentaban una conducta reproductiva normal. Es natural que el ciclo reproductivo circanual de los mamíferos esté sincronizado con el cambiante fotoperíodo, ya que éste es el factor más reproducible del medio ambiente. Ciertamente sería menos propicio para los animales depender de otros factores tales como la temperatura ambiente, lluvias, disponibilidad de alimento, que cambian marcadamente de año a año.

Muchos mamíferos en su habitat natural son criadores es tacionales. El fotoperíodo cambiante se considera un parámetro de importancia en la sincronización del período de cría con la estación apropiada del año. Considerando la importancia de la

luz en los ajustes reproductivos estacionales se ha involucrado a la glándula pineal como el intermediario entre el fotoperíodo cambiante y el eje hipotálamo-pituitario-gonadal^{371, 372}. Algunas especies son criadoras de día largo, mientras que otras son criadoras de día corto.

En general, puede decirse que fotoperíodos cortos, exposición a la oscuridad o ceguera son considerados, usualmente, como estimulantes de la producción y descarga de antigonadotrofinas pineales y, por lo tanto, inhibitorias para la reproducción. Contrariamente, fotoperíodos largos inhiben la actividad pineal antigonadotrófica y, por lo tanto, eliminan el efecto supresor de la glándula pineal.

En el estudio presentado en este trabajo, se utilizó la vizcacha como animal de experimentación por ser de hábitos nocturnos, es decir que su mayor actividad la desarrolla en la oscuridad. Así, presentaba una propuesta interesante para la investigación del efecto de la exposición a prolongados períodos de luz sobre la actividad testicular.

Los parámetros estudiados fueron: peso testicular, niveles séricos de testosterona y receptores para gonadotrofinas.

Los resultados obtenidos muestran una disminución en el peso testicular, así como en la testosterona plasmática, cuando los animales son sometidos a situaciones de luz prolongada.

Paralelamente se investigó la cantidad de sitios receptores para LH y FSH en el testículo de animales sometidos a oscuridad (habitat natural) o a períodos de luminosidad controlada (cautiverio). Los resultados demostraron que, cuando los animales eran sometidos a períodos de luminosidad controlada, se producía una disminución en el número de sitios receptores para FSH, manteniéndose invariable la constante de afinidad. A diferencia de lo que ocurre para la hormona folículo estimulante, la capacidad de unión para la hormona luteinizante, es muy pequeña en el testículo de vizcacha, lo que presentó serios inconvenientes para su medición, razón por la cual no presentamos resultados en ese aspecto.

Es de notar, en relación con lo expuesto finalmente, que el testículo de vizcacha se presenta como un tejido de alta capacidad de unión para FSH, indicando la posibilidad de que esta hormona sea la principal involucrada en la manutención de la

función testicular y no así la LH.

Estudios realizados por Bartke y colaboradores⁵⁵ sobre el receptor para LH en hamster ciego, revelaron una marcada disminución en estos sitios de unión, comparados con los valores obtenidos con animales normales. Paralelamente se demostró un menor nivel de prolactina circulante, lo que se supuso era responsable de esta disminución en el número de receptores para la gonadotrofina, dada la reconocida intervención de esta hormona en la regulación de la cantidad de sitios discriminadores¹⁶⁸. Junto con la administración de prolactina se observaba una normalización en los niveles de los receptores.

Dada la imposibilidad, no contando con un anticuerpo específico, de medir la concentración hormonal circulante en viz cachea, no se puede correlacionar este descenso en el número de sitios receptores con niveles disminuidos de prolactina u otras hormonas.

Relacionando la actividad pineal con un efecto antigonadotrófico, estos resultados serían una prueba de que, en ciertos animales, la luz sería el factor estimulador de la actividad de esta glándula, contrariamente a lo encontrado hasta el momento.

COMENTARIOS FINALES

El presente trabajo ha demostrado que la función testicular normal no depende de un único estímulo hormonal, sino que es la resultante de la acción de un complejo conjunto de moléculas informáticas, cada una actuando a diferentes niveles, en ciertos casos en forma sinérgica y, en otros en forma antagónica, dependiendo de las concentraciones circulantes. De este conjunto hormonal hemos focalizado nuestra atención en la hormona luteinizante, la prolactina y la insulina.

Por otra parte, estos estímulos tomados en forma aislada, no representan sino una parte de los factores que deben ser tenidos en cuenta para tener una visión lo más exacta posible de lo que acontece a nivel de la célula de Leydig.

Como hemos observado, además del estímulo hormonal es importante la edad del animal, el fotoperíodo que regula su actividad y el ambiente hormonal a que se vio expuesto en la etapa de maduración prepuberal.

Cada paso que se avanza en el estudio de la regulación hormonal de la función testicular, es una pieza más que se agre

ga al gran rompecabezas que nos hace comprender que el organismo no es una máquina funcionando en una relación biunívoca estímulo-respuesta, sino que presenta múltiples bifurcaciones que, en conjunto, no hacen sino mejorar el funcionamiento y la regulación de las distintas funciones fisiológicas.

REFERENCIAS

1. - Greep, R. O.; Fevold; H.L. y Hisaw, F.L. (1936) Anat. Record. 65: 261.
2. - Greep, R.O. y Fevold, H L. (1937) Endocrinology 21: 611
3. - Greep, R. O. (1961) En: Sex and Internal Secretions (W. C. Young, Ed.), Vol. 1, p. 240. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
4. - Albert, A. (1961) En: Sex and Internal Secretions (W. C. Young, Ed.), Vol. 1, p. 305. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
5. - Clermont, Y. y Harvey, S. C. (1967) CIBA Found. Colloq. Endocrinol. 16: 173.
6. - Lostroh, A.J. (1963) Acta Endocrinol. 43: 592.
7. - Lostroh, A.J., Johnson, R. y Jordan, C.W., Jr. (1963) Acta Endocrinol. 44: 536.
8. - Fawcett, D. W. (1973) Adv. Biosci. 10, 83.
9. - Ross, M.H. (1967) Am. J. Anat. 121, 523.
10. - Bressler, R.S. y Ross, M.H. (1972) Biol. Reprod. 6: 148
11. - Fawcett, D. W. (1965) En: "Handbook of Physiology" (D. W. Hamilton y R. O. Greep, Eds.) Vol. 5, Sec. 7, pp. 21-55, Amer. Physiol. Sec.
12. - Dym, M. y Fawcett, D. W. (1970) Biol. Reprod. 3: 308.
13. - Berthold, A. A. (1849) Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med. 16; 42.
14. - Leydig, F. (1850) Z. Wiss. Zool. 2: 1.
15. - Rasmussen, A. T. (1917) Am. J. Anat. 22: 475.
16. - Stieve, H. (1930) En: "Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des menschen" (W. von Mollendorff, Ed.) Vol. 7, Part 2, pp 1-399, Springer, Berlin.
17. - Hooker, C. W. (1944) Am. J. Anat. 74: 1.
18. - Wislocki, G. B. (1949) Endocrinology 44: 167.
19. - Perlman, P. L. (1950) Endocrinology 46, 347.
20. - McEnery, W.B. y Nelson, W.O. (1950) Anat. Record. 106: 221.
21. - Melampy, R.M. y Cavazos, L.F. (1954) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 87: 297.
22. - Arzac, J.P. (1950) J. Clin. Endocrinol. 10: 1465.
23. - Montagna, W. y Hamilton, J. B. (1952) Anat. Record. 112; 237

24. - Cavazos, L. F. y Melampy, R. M. (1954) *Am. J. Anat.* 95: 467.
25. - McEnery, W. B. y Nelson, W. O. (1953) *Endocrinology* 52: 93.
26. - Jarlstedt, J. y Steward, V. W. (1968) *Endocrinology* 82: 1063.
27. - Huggins, C. y Moulton, S. H. (1948) *J. Exptl. Med.* 88: 169
28. - Dempsey, E. W., Greep, R. O. y Deane, H. W. (1949) *Endocrinology* 44: 88.
29. - Mancini, R. E.; Nolzco, J. y de la Balze, F. A. (1952) *Anat. Record.* 114: 127.
30. - Mancini, R. E.; Vilar, O.; Lavieri, J. C.; Andrada, J. A.; Heinrich, J. J. (1963) *Am. J. Anat.* 112: 203.
31. - Frank, A. L. y Christensen, A. K. (1968) *J. Cell. Biol.* 36: 1
32. - Niemi, M. e Ikonen, M. (1962) *Endocrinology* 70, 167
33. - Bouin, P. y Ancel, P. (1903) *Arch. Zool. Exptl. Gen.* 1: 437.
34. - Stewart, C. A.; Bell, E. T. y Roehlke, A. B. (1936) *Am. J. Cancer* 26: 144
35. - Rowlands, R. P. y Nicholson, G. W. (1929) *Guy's Hosp. Rept.* 79: 401.
36. - Masson, P. (1942) *Rev. Can. Biol.* 1: 570
37. - Venning, E. H. (1942) *Rev. Can. Biol.* 1: 571
38. - Smith, P. E. y Engle, E. T. (1927) *Am. J. Anat.* 40: 159
39. - Simpson, M. E.; Li, C. H. y Evans, H. M. (1944) *Endocrinology* 35: 96
40. - Steinberger, E. y Wagner, C. (1961) *Endocrinology* 69: 305
41. - Fevold, H. L.; Hisaw, F. L. y Leonard, S. L. (1931) *Am. J. Physiol.* 97: 291
42. - Evans, H. M.; Simpson, M. E. y Pencharz, R. I. (1937) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 5: 229.
43. - Catt, K. J.; Tsuruhara, T. y Dufau, M. L. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 279: 194.
44. - Dufau, M. L.; Watanabe, K. y Catt, K. J. (1973) *Endocrinology* 92: 6.
45. - Dufau, M. L.; Tsuruhara, T.; Horner, K. A.; Pódestá, E. J. y Catt, K. J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.* 74: 3419
46. - Pódestá, E. J.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1976) *Mol. Cell. Endocrinol.* 5: 109.

47. - Karaboyas, G. C. y Koritz, S. B. (1965) *Biochemistry* 4: 462.
48. - Hall, P. F. y Koritz, S. B. (1964) *Biochemistry* 3: 129.
49. - Hafiez, A. A.; Bartke, A. y Lloyd, C. W. (1972) *J. Endocr.* 63: 223.
50. - Mendelson, C.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1975) *Biochem. Biophys. Acta* 411: 222.
51. - Cooke, B. A.; Janszen, F. H. A.; Clopscher, W. F. y van der Molen, H. J. (1975) *Biochem. J.* 150: 413.
52. - Cigorruga, S.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 4297.
53. - Desjardins, C.; Zeleznik, A. J. y Midgley, A. R. (1974) *En: Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis* (M. L. Dufau y A. R. Means, Eds.), p 221, Plenum Press, New York.
54. - Thanki, K. H. y Steinberger, A. (1976) *Endocr. Res. Comm.* 3: 49.
55. - Bex, F. J. y Bartke, A. (1977) *Endocrinology* 100: 1223.
56. - Catt, K. J.; Dufau, M. L.; Neaves, W. B.; Walsh, P. C. y Wilson, J. D. (1975) *Endocrinology* 97: 1157.
57. - Gulyas, B. J.; Tullner, W. S. y Hodgen, G. D. (1977) *Biology of Reproduction* 17: 650.
58. - Odell, W. D. y Swerdloff, R. S. (1976) *Recent. Progr. Hormone Res.* 32: 245
59. - Ketelslegers, J. M.; Hsueh, A. J. W.; Hetzel, W. D. y Catt, K. J. (1976) *5th International Congress of Endocrinology, Hamburg, Abstract* 519.
60. - Zipf, W. B.; Payne, A. H. y Kelch, R. P. (1978) *Endocrinology* 103: 595.
61. - 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.), 177, Plenum Press, New York.
62. - Friesen, H. G. y Shiu, R. P. C. (1977) *En: Endocrinology: Proceedings of the V International Congress of Endocrinology, Vol II, 1* (V. H. T. James, Ed.). Excerpta Medica, Amsterdam.
63. - Posner, B. J. (1977) *En: Endocrinology: Proceedings of the V International Congress of Endocrinology, Vol II, 178* (V. H. T. James, Ed.). Excerpta Medica, Amsterdam.

64. - Aragona, C. y Friesen, H. G. (1975) *Endocrinology* 97: 677
65. - Woods, M. C. y Simpson, M. E. (1961) *Endocrinology* 69: 91.
66. - Lostroh, A. J. (1969) *Endocrinology* 85: 438.
67. - 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.) 65. Plenum Press, New York.
68. - 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.), 237. Plenum Press. New York.
69. - Frowein, J, y Engel, W. J. (1975) *J. Endoc.* 64: 59
70. - Hsueh, A. J. W.; Dufau, M. L.; Katz, S. J. y Catt, K. J. (1976) *Nature (Lond.)* 261: 710.
71. - Hauger, R. L.; Chen, Y-D. I.; Kelch, R. P. y Payne, A. H. (1977) *J. Endocr.* 74: 57.
72. - van Beurden, W.M.O.; Roodnat, B.; de Jong, F.H.; Mulder, E. y van der Molen, H. J. (1976) *Steroids* 28: 847.
73. - Hauger, R. L.; Kelch, R. P.; Chen, Y-D. I. y Payne, A. (1977) *J. Endocr.* 75: 23.
74. - Alder, A.; Burger, H.; Davis, J.; Dulmanis, A.; Hudson, B.; Sarfaty, G. y Stratton, W. (1968) *Brit. Med. J.* 1: 28.
75. - Verjans, H. L.; de Jong, F.H.; Cooke, B. A.; van der Molen, H. J. y Eik-Nes, K. B. (1974) *Acta Endocr. (Kbh.)* 77: 636.
76. - de Jong, F.H.; Vilenbrock, J. T. J. y van der Molen, H. J. (1975) *J. Endocr.* 65: 281.
77. - van Beurden, W.M.O.; Mulder, E.; de Jong, F.H. y van der Molen, H. J. (1977) *Endocrinology* 101: 342.
78. - Brinkmann, A. O.; Mulder, E.; Lamers-Stahlhofen, G. J. M. y van der Molen, H. J. (1972) *FEBS Letters* 26: 301.
79. - Mulder, E.; Brinkmann, A. O.; Lamers-Stahlhofen, G. J. M. y van der Molen, H. J. (1973) *FEBS Letters* 31: 131.
80. - Danutra, V.; Harper, M. E.; Boyns, A. R.; Cole, E. N.; Brownsey, B. G. y Griffiths, K. (1973) *J. Endocr.* 57: 207.
81. - Mallampati, R. S. y Johnson, D. C. (1973) *Neuroendocrinology* 11; 46.
82. - Chowdhury, M.; Tcholakian, R. y Steinberger, E. (1974) *J. Endocr.* 60: 375.

83. - Dorner, G.; Stahl, F.; Rohde, W. y Schnorr (1975) *Endokrinologie* 66: 221.
84. - Oshima, M.; Wakabayashi, K. y Tamaoki, B. (1967) *Biochem. Biophys. Acta* 137: 356.
85. - Harper, M. E.; Pierrepont, C. G.; Fahmy, A. R. y Griffiths, K. (1971) *J. Endocr.* 49: 213.
86. - Yanaihara, T. y Troen, P. (1972) *J. Clin. Endocr.* 34: 968.
87. - Kelch, R. P.; Jenner, M. R.; Weinstein, R.; Kaplan, S. L. y Grumbach, M. M. (1972) *J. Clin. Invest.* 51: 824
88. - de Jong, F. H.; Hey, A. H. y van der Molen, H. J. (1974) *J. Endocr.* 60: 409.
89. - Mulder, E.; Peters, M. J.; van Beurden, W. M. O.; Galdier, M.; Rommerts, F. F. G.; Janszen, F. F. G. y van der Molen, H. J. (1976) *J. Endocr.* 70: 331.
90. - Odell, W. D.; Swerdloff, R. S.; Jacobs, H. S. y Hescox, M. A. (1973) *Endocrinology* 92: 160.
91. - Chen, Y. J.; Payne, A. H. y Kelch, R. P. (1976) *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* 153: 473.
92. - Desjardins, C.; Ewing, L. L. e Irby, D. C. (1973) *Endocrinology* 93: 450.
93. - Dorrington, J. H. y Armstrong, D. T. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 72: 2677.
94. - Leach, R. B.; Maddock, W. D.; Tokuyama, J.; Paulsen, C. A. y Nelson, W. O. (1956) *Recent Progr. Hormone Res.* 12: 377.
95. - Steinberger, E. y Steinberger, A. (1974) *En: Handbook of Physiology (E. Knobil y W. H. Sawyer, Eds.), Vol 4, Sec. 7, 325. American Physiological Society, Washington D. C.*
96. - 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.), 293. Plenum Press, New York.*
97. - Wilson, E. M. y Smith, A. A. (1975) *En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis (F. S. French, V. Hansson, E. M. Ritzen y S. W. Nayfeh, Eds.), 281. Plenum Press. New York.*

98. - 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.), 1-30. Plenum Press. New York.
99. - 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.), 125-144. Plenum Press. New York.
100. - Moyle, W. R. y Ramachandran, J. (1973) *Endocrinology* 93:27.
101. - 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.), 24. Plenum Press. New York.
102. - Catt, K. J. y Dufau, M. L. (1973) *Adv. Expt. Med. Biol.* 36: 379.
103. - Catt, K. J. y Dufau, M. L. (1972) *Nature New Biol.* 242: 246
104. - Catt, K. J. y Dufau, M. L. (1973) *Nature New Biol.* 244: 219
105. - Beall, R. y Sayers, G. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 148: 70.
106. - Williams, J. A. (1972) *Endocrinology* 91: 144.
107. - Azhur, S.; Clark, M. R. y Menon, K.M. J. (1976) *Endocrine Res. Commun.* 13: 93.
108. - Mendelson, C.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 8818.
109. - Dufau, M. L.; Mendelson, C. y Catt, K. J. (1974) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 610.
110. - Cooke, B. A.; Janszen, F.H. A; Clotscher, W.F. y van der Molen, H. J. (1975) *Biochem. J.* 150: 413.
111. - Karaboyas, G. C. y Kortz, S. B. (1965) *Biochemistry* 4; 462
112. - Burstein, S. y Gut, M. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 212: 262.
113. - Gavin, J. R.; Roth, J.; Neville, D. M.; DeMeyts, P. y Buell, D. N. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71: 84.
114. - Kebabian, J.M.; Zatz, M.; Romero, J. A. y Axelrod, J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 3735.
115. - Mukherjee, C. y Caron, M. J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 1945.
116. - Hinkle, P.M. y Tashjian, A.H. (1975) *Biochemistry* 14: 3845

117. -Lesniak, M. A. y Roth, J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 3720
118. -Conti, M.; Harwood, J. P.; Hsueh, A. J. W.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 7729.
119. -Hsueh, A. J. W.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 1145.
120. -Hsueh, A. J. W.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 592.
121. -Sharpe, R. M. (1976) *Nature* 264: 644.
122. -Haour, F. y Saez, J. M. (1977) *Mol. Cell. Endocrinol.* 7: 17
123. -Chen, D. I. y Payne, A. H. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 1589.
124. -Tsuruhara, T.; Dufau, M. L.; Cigorruga, S. y Catt, K. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 9002.
125. -Steinman, R. M. y Cohen, Z. A. (1976) En: *Biogenesis and Turnover of Membrane Macromolecules* (J. S. Cook, Ed.). pp. 1-14. Raven Press. New York.
126. -Ascoli, M. y Puett, D. (1977) *FEBS Lett.* 75: 77.
127. -Chen, T. T.; Abel, J. H.; McClellan, M. C.; Sawyer, H. R.; Diekman, M. A. y Niswender, G. D. (1977) *Cytobiologie* 14: 412.
128. -Tcholakian, R. K.; Chowdhury, M. y Steinberger, E. (1974) *J. Endocrinol.* 63: 411.
129. -de Jong, F. H.; Hey, A. H. y van der Molen, H. J. (1973) *J. Endocrinol.* 57: 277.
130. -Samuels, L. T.; Short, J. G. y Huseby, R. A. (1964) *Acta Endocrinol.* 45: 487.
131. -Dorner, G.; Stahl, F.; Rohde, W. y Schnorr, D. (1975) *Endokrinologie* 66: 221.
132. -Rodriguez-Rigan, L. J.; Tcholakian, R. K.; Smith, K. D. y Steinberger, E. (1977) En: *The testis in normal and infertile men* (P. Troen y H. Nankin, Eds.), 457-468. Raven Press. New York.
133. -Inano, H.; Nakano, H.; Shikita, M. y Tamaoki, B. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 137: 540.
134. -Molitch, M.; Edmonds, M.; Jones, E. E. y Odell, W. D. (1976) *Am. J. Physiol.* 230: 907.
135. -Bockaert, J.; Hunzicker-Dunn, M. y Birnbaumer, L. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 2653.
136. -Kirschner, M. A.; Wıder, J. A. y Ross, G. T. (1970) *J. Clin. Endocr.* 30: 504.

137. -Marsh, J. M. ; Mills, T. M. y Lemaire, W. J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 304: 197.
138. -Hunzicker-Dunn, M. y Birnbaumer, L. (1976) *Endocrinology* 99: 185.
139. -Hunzicker-Dunn, M. y Birnbaumer, L. (1976) *Endocrinology* 99: 198.
140. -Hunzicker-Dunn, M. y Birnbaumer, L. (1976) *Endocrinology* 99: 221.
141. -Johnson, E. S. ; Gendrich, R. L. y White, W. F. (1976) *Fertil. Steril.* 27: 853.
142. -Bowers, C. Y. y Folkers, K. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 1003.
143. -Johnson, E. S. ; Seeley, J. H. ; White, W. F. y De Sombre, E. R. (1976) *Science* 194: 329.
144. -Auclair, C. ; Kelly, P. A. ; Labrie, F. ; Coy, D. H. y Schally, A. V. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 855.
145. -Auclair, C. ; Kelly, P. A. ; Coy, D. H. ; Schally, A. V. y Labrie, F. (1977) *Endocrinology* 101: 189.
146. -Foglia, V. G. (1958) *Brit. Med. J.* 844: II
147. -Bergvist, N. (1954) *Acta Endocr. (Suppl.)* 18: 1
148. -Schoffling, K. ; Federlin, K. ; Ditschuneit, H. y Pfeiffer, E. F. (1963) *Diabetes* 12: 519.
149. -Schoffling, K. ; Federlin, K. ; Schmitt, W. y Pfeiffer, E. F. (1967) *Acta Endocrinol.* 54: 335.
150. -Irisawa, S. H. ; Shirai, M. ; Matsushita, S. H. ; Kagayama, M. e Ichijo, S. (1966) *Tohoku J. Exp. Med.* 88: 311.
151. -Villanueva, A. ; García, G. ; Hernández, P. y Cesarman, E. (1964) *Rev. Invest. Clin. (México)* 16: 31.
152. -Warren, S. J. y Le Compte, P. M. (1952) *Lea & Febiger, Phila.* Vol. I
153. -Miller, S. y Masson, M. L. (1945) *J. Clin. Invest.* 5: 220.
154. -Hortsmann, L. (1958) *Acta Endocr.* 5: 261.
155. -Soulaireac, A. ; Desclaux, P. y Katz, R. P. (1948) *C. R. Soc. Biol.* 142: 311 (París).
156. -Soulaireac, A. y Desclaux, P. (1948) *Ann. d' Endocr.* 9: 333.
157. -Kent, J. R. (1966) *Diabetes* 15: 537.
158. -Faerman, J. ; Vilar, O. ; Rivarola, M. ; Rosner, J. M. ; Jadzinsky, M. ; Fox, D. ; Pérez-Lloret, A. ; Saraceni, D. y Bernstein Mahn, L. (1972) *Diabetes* 21: 123.

159. -Antonini, F.M. y Petruzzi, E. (1970) Acta VII Intern. Diabetes Fed. Congress, Buenos Aires.
160. -Stutinsky, F. y Mialhe, P. (1962) Bull. Assoc. Anat. 48 Reunión (Toulouse 15-19 Abril), 1249.
161. -Belkin, R.; Rapoport, J. y Striganoff, A. (1933) C. R. Soc. Biol. 114: 892.
162. -Hunt, E. L. y Bailey, D. W. (1961) Acta Endocrinol. 38: 432.
163. -Chesler, A. y Tislowitz, R. (1945) Science 101: 468.
164. -Lema, B. E.; Foglia, V. G. y Fernández-Collazo, E. L. (1965) Rev. Soc. Argentina Biol. 41: 197.
165. -Schoffling, K.; Federlin, K.; Schmitt, W. y Pfeiffer, E. F. (1967) Acta Endocrinol. 54: 335.
166. -Tesone, M. (1978) Tesis Doctoral. Fac. Ciencias Exactas y Naturales. U. B. A.
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. -Bartke, A. (1976) En: Progress in Reproductive Biology. Sperm Action (P. O. Hubinot y M. L'Hermite, Eds.), Vol. I, 136. Karger. Basel.
172. -Aragona, C. y Friesen, H. G. (1975) Endocrinology 97: 677
173. -Charreau, E. H., Attramadal, A.; Torjesen, P. A.; Purvis, K.; Calandra, R. y Hansson, V. (1977) Mol. Cell. Endocrinol. 6: 303.
174. -Bohnet, H. C. y Friesen, H. G. (1976) J. Reprod. Fertil. 48: 307.
175. -Rubin, R. T.; Poland, R. E. y Tower, B. B. (1976) J. Clin. Endocrinol. 42: 112.
176. -Besser, G. M. y Thorner, M. O. (1975) Pathol. Biol. (París) 23: 779.
177. -Fossati, P.; Strauch, G. y Tournaire J. (1976) Nouv. Presse Med. 5: 1687.
178. -Franks, S.; Jacobs, H. S. y Nabarro, J. D. N. (1976) Clin. Endocrinol. (Oxf.) 5: 63.

179. -Malarkey, W. B. y Johnson, J. C. (1976) Arch. Intern. Med. 136: 40.
180. -Besser, G.M. y Thorner, M. O. (1976) Post. grad. Med. J. 52: 64.
181. -Magrini, G.; Ebner, J. R.; Burckhardt, P. y Felber, J. P. (1976) J. Clin. Endocr. 43: 944.
182. -Fang, V. S.; Refetoff, S. y Rosenfield, R. L. (1974) Endocrinology 95: 991.
183. -Negro-Vilar, A. y Saad, W. A. (1972) IV International Congress of Endocrinology, Washington, D. C. Junio, p. 73 (Abstract).
184. -Hafiez, A. A.; Lloyd, C. W. y Bartke, A. (1972) J. Endocr. 52: 327.
185. -Cavallero, C.; Martinazzi, M.; Baroni, C. y Magrini, U. (1963) Gen. Comp. Endocrinol. 3: 636.
186. -Bartke, A. y Lloyd, C. W. (1970) J. Endocr. 46: 321.
187. -Bartke, A. (1971) J. Endocr. 49: 311.
188. -Hafiez, A. A.; Bartke, A. y Lloyd, C. W. (1972) J. Endocr. 53: 223.
189. -Bartke, A.; Goldman, B. D.; Bex, F. J. y Dalterio, S. (1977) Endocrinology 101: 1760.
190. -Bartke, A. (1965) J. Reprod. Fert. 10: 93.
191. -Cheever, E. V.; Seavey, B. K. y Lewis, U. J. (1969) Endocrinology 85: 698.
192. -Bartke, A. (1966) J. Endocr. 35: 419.
193. -Bartke, A. (1976) En: Sperm Action (P. O. Hubinont, M. L'Hermite y J. Schwerts, Eds.) pp 136-152. Karger, Basel.
194. -Harper, M. E.; Danutra, V.; Chandler, J. A. y Griffiths, K. (1976) Acta Endocr. 83: 211.
195. -Rubin, R. T.; Gouin, P. R.; Lubin, A.; Poland, R. E. y Pirke, K. M. (1975) J. Clin. Endocr. Metab. 40: 1027.
196. -Ambrosi, B.; Travaglini, P.; Bech-Peccoz, P.; Bara, R.; Elli, R.; Paracchi, A. y Faglia, G. (1976) J. Clin. Endocr. Metab. 43: 700.
197. -Hoffman, R. A. y Reiter, R. J. (1965) Science 148: 1609.
198. -Gaston, S. y Menaker, M. (1967) Science 158: 925.
199. -Bartke, A.; Croft, B. T. y Dalterio, S. (1975) Endocrinology 97: 1601.

200. -Berndtson, W.E. y Desjardins, C. (1974) *Endocrinology* 95: 195.
201. -Turek, F. W. ; Elliott, J. A. ; Alvis, J. D. y Menaker, M. (1975) *Endocrinology* 96: 854.
202. -Reiter, R. J. (1975) *J. Exp. Zool.* 191: 111.
203. -Reiter, R. J. y Johnson, L. Y. (1974) *Hormone Res.* 5: 311.
204. -Racey, P. A. ; Rowe, P. H. y Chesworth, J. M. (1975) *J. Endocr.* 65: 89.
205. -Ravault, J. P. (1976) *Acta Endocr.* 83: 720.
206. -Rajaniemi, H. ; Oksanen, A. y Vanha-Perttula, T. (1974) *Hormone Res.* 5: 6.
207. -Bartke, A. (1969) *Nature* 224: 700.
208. -Bartke, A. (1971) *J. Endocr.* 49: 317.
209. - Bartke, A. ; Musto, N. ; Caldwell, B. V. y Behrman, H. R. (1973) *Prostaglandins* 3: 97.
210. -Hilliard, J. ; Spies, H. G. ; Lucas, L. y Sawyer, C. H. (1968) *Endocrinology* 82: 122.
211. -Hafiez, A. A. ; Philpott, J. E. y Bartke, A. (1971) *J. Endocr.* 50: 619.
212. -Musto, N. ; Hafiez, A. A. y Bartke, A. (1972) *Endocrinology* 91: 1106.
213. -Clemens, J. A. ; Minaguchi, H. ; Storey, R. ; Voogt, J. L. y Meites, J. (1969) *Neuroendocrinology* 4: 150.
214. -Knorr, D. W. ; Vanha-Perttula, T. y Lipsett, M. B. (1970) *Endocrinology* 86: 1298.
215. -Pahnke, V. G. ; Leidenberger, F. A. y Kunzig, H. J. (1975) *Acta Endocr.* 79: 610.
216. -Kolena, J. (1976) *Endocr. Exper. (Bratisl.)* 10: 113.
217. -Moger, W. H. y Armstrong, D. T. (1974) *Biol. Reprod.* 11: 1
218. -Odell, W. D. ; Swerdloff, R. S. ; Bain, J. ; Wollesen, F. y Grover, P. K. (1974) *Endocrinology* 95: 1380.
219. -Bartke, A. y Dalterio, S. (1976) *Biol. Reprod.* 15: 90.
220. -Boyar, R. M. ; Kapen, S. ; Finkelstein, J. W. ; Perlow, M. ; Sassin, J. F. ; Fukushima, D. K. ; Weitzman, E. D. y Hellman, L. (1974) *J. Clin. Invest.* 53: 1588.
221. -Tolis, G. y Van Vliet, S. (1976) *Clin. Res.* 24: 279A (Abst.)
222. -Fossati, P. ; L'Hermite, M. ; Asfour, M. y Boutemy, J. J. (1976) *En: Sperm Action* (P. O. Hubinont, M. L'Hermite y J. Schwers, Eds.) pp. 153-156. Karger. Basel.

223. -Thorner, M. O. ; Edwards, C. R. W. ; Hanker, J. P. ;
Abraham, G. y Besser, G.M. (1977) En: The Testis in
Normal and Infertile Men (P. Troen y H. R. Nankin, Eds.)
pp. 351-366, Raven Press, New York.
224. -Dent, R. y Tolis, G. (1976) Program 58th Meeting Endocr.
Soc., p. 165 (Abstr.) #217.
225. -Posner, B.I. ; Kelly, P. A. ; Shiu, R. P. C. y Friesen, H. G.
(1974) Endocrinology 95: 521.
226. -Marshall, S. ; Gelato, M. y Meites, J. (1975) Proc. Soc.
Exp. Biol. Med. 149: 185.
227. -Doerr, P. y Pirke, K.M. (1976) J. Clin. Endocr. Metab.
43: 622.
228. -Seki, M. ; Seki, K. ; Yoshihara, T. ; Watanabe, N. ; Okumura
T. ; Huang, S. -Y. y Kuo, C. -C (1974) Endocrinology 94: 911
229. -Yang, W.H. ; Jones, A. L. y Li, C.H. (1974) Cancer Res.
37: 2440.
230. -Desjardins, C. ; Zeleznik, A. J. y Midgley, A.R., Jr. (1975)
Endocrinology 86A, 145 (Abstr.)
231. -Lillie, F. R. (1916) Science 43: 611.
232. -Lillie, F. R. (1917) J. Exptl. Zool. 23: 371.
233. -Keller, K. y Tandler, J. (1916) Wien. Tierarztl. Wochschr.
3: 513.
234. -Krohn, P. L. (1955) CIBA Found. Colloq. Aging 1: 141.
235. -Price, D. y Ortiz, E. (1944) Endocrinology 34: 815.
236. -Hooker, C. W. (1948) Recent. Progr. Hormone Res. 3: 173.
237. -Pfeiffer, C. A. (1936) Am. J. Anat. 58: 195.
238. - Green, R.R. y Burrill, M. W. (1940) Endocrinology 26: 516.
239. -Nelson, W.O. y Merckel, C. (1937) Proc. Soc. Exptl. Biol.
Med. 36: 825.
240. -Barraclough, C.A. y Leathem, J.H. (1959) Anat. Record.
134: 239.
241. -Albert, A. (1961) En: Sex and Internal Secretions (W. C. Young,
Ed.) Vol I, pp 305-365. Williams & Wilkins, Baltimore, Mary-
land.
242. - Lynch, K.M. (1952) Ann. N. Y. Acad. Sci. 55: 734.
243. -Harris, G. W. y Levine, S. (1962) J. Physiol. (London) 163:
42P (Abstract).
244. -Kincl, F. A. ; Folch, Pi A. y Lasso, L. H. (1963) Endocrino-
logy 72: 966.

245. -Naftolin, F.; Ryan, K. J. y Petro, Z. (1971) *J. Clin. Endocr. Metab.* 33: 368.
246. -Naftolin, F.; Ryan, K. J. y Petro, Z. (1972) *Endocrinology* 90: 295.
247. -Eisenfeld, A. J. (1970) *Endocrinology* 86: 1313.
248. -Eisenfeld, A. J. y Axelrod, J. (1966) *Endocrinology* 79: 38
249. -Kato, J. y Villet, C. A. (1974) *Endocrinology* 80: 567.
250. -King, R. J. B.; Gordon, J. e Inman, D. R. (1965) *J. Endocr.* 32: 9.
251. -McGuire, J. L.; Lish, R. D. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61: 497.
252. -Mowles, T. F.; Ashkanazy, B.; Mix, E., Jr. y Sheppard, H. (1971) *Endocrinology* 89: 484.
253. -Notides, A. C. (1970) *Endocrinology* 87: 987.
254. -Tuohimaa, P. y Johansson, R. (1971) *Endocrinology* 88: 1159
255. -Whalen, R. E. y Luttge, W. G. (1970) *Neuroendocrinology* 6: 255.
256. -Zigmond, R. E. y McEwen, B. S. (1970) *J. Neurochem.* 17: 889.
257. -Clark, J. H.; Campbell, P. S. y Peck, E. J., Jr. (1972) *Neuroendocrinology* 77: 218.
258. -Kato, J. (1970) *Acta Endocr. (Copenh.)* 64: 687.
259. -Kato, J. (1973) *Acta Endocr. (Copenh.)* 72: 663.
260. -Korach, K. S. y Muldoon, T. G. (1973) *Endocrinology* 92: 322
261. -Korach, K. S. y Muldoon, T. G. (1974) *Endocrinology* 94: 785
262. -Charreau, E. H. y Denti, A. (1975) *Acta Physiol. Latinoam.* 25: 279.
263. -Barraclough, C. A. (1966) *Recent Progr. Hormone Res.* 22: 503
264. -Gorski, R. A. (1971) *En: Frontiers in Neuroendocrinology* (L. Martini y W. F. Ganong, Eds.) pp. 237-290. Oxford University Press, Oxford.
265. -Johnson, D. C. (1967) *Acta Endocr.* 56: 165.
266. -Johnson, D. C. (1971) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 138: 140
267. -Kragt, C. L. y Ganong, W. F. (1968) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 128: 965.
268. -Neill, J. D. (1972) *Endocrinology* 90: 1154.
269. -Johnson, D. C. y Witschi, E. (1963) *Acta Endocr.* 44: 119.
270. -Johnson, D. C.; Yasuda, M. y Sridharan, B. N. (1964) *J. Endocr.* 29: 95.
271. -Morrison, R. L. y Johnson, D. C. (1966) *J. Endocr.* 34: 117.

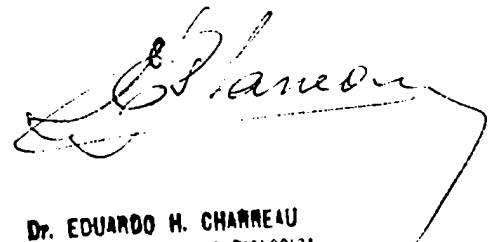
272. -Moguilevsky, J. A. ; Scacchi, P. y Rubinstein, L. (1977) J. Endocr. 74: 143.
273. -Frick, J. (1969) Urol. Int. 24: 481.
274. -Nieschlag, E. ; Kley, K. H. y Wiegelmann, W. (1973) Acta Endocrinol. (Kbh) (Suppl.) 177: 122.
275. -Vermuelen, A. ; Rubens, R. y Verdonck, L. (1972) J. Clin. Endocrinol. Metab. 34: 730.
276. -Longscope, C. (1973) Steroids 21: 583.
277. -Mazzi, C. ; Riva, L. R. y Bernasconi, D. (1974) En: The Endocrine Function of the Human Testis (V. H. T. James, M. Serio y L. Martini, Eds.), Vol. 2, p 51. Academic Press, New York.
278. -Rubens, R. ; Dhont, M. y Vermeulen, A. (1974) J. Clin. Endocr. Metab. 39: 40.
279. -Ghanadian, R. ; Lewis, J. G. y Chisolm, G. D. (1975) Steroids 25: 753.
280. -Miller, A. E. y Riegler, G. D. (1975) Fed. Proc. 34: 303.
281. -Chan, S. W. C. ; Leatham, J. H. y Esashi, T. (1977) Endocrinology 101: 128.
282. -Leatham, J. H. y Albrecht, E. D. (1974) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 1212.
283. -Peng, M. T. ; Pi, W. P. y Peng, Y. M. (1973) J. Formosan Med. Assoc. 72: 495.
284. -Vermeulen, A. (1976) En: Hypothalamus, Pituitary and Aging (A. V. Everett y J. A. Burgess, Eds,) p. 458. C. C. Thomas, Springfield, Ill.
285. -Lazarus, L. y Eastman, C. (1976) En: Hypothalamus, Pituitary and Aging (A. V. Everett y J. A. Burgess, Eds.) p. 97. C. C. Thomas, Springfield, Ill.
286. -Adamopoulos, D. A. ; Loraine, J. A. y Dove, G. A. (1971) J. Obstet. Gynecol. Br. Common. W. 78: 62.
287. -Riegler, G. D. y Meites, J. (1976) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151: 50.
288. -Watkins, B. E. ; Meites, J. y Riegler, G. D. (1975) Endocrinology 97: 543.
289. -Shaar, C. J. ; Euker, J. S. ; Riegler, G. D. y Meites, J. J. (1975) Endocrinology 66: 45.
290. -Watkins, B. E. ; McKay, D. W. ; Meites, J. y Riegler, G. D. (1975) Neuroendocrinology 19: 33.

291. -Riegler, G. D.; Meites, J.; Miller, A. E. y Wood, S. M. (1977) *J. Gerontol.* 32: 13.
292. -Clemens, J. A. y Meites, J. (1971) *Neuroendocrinology* 7: 249.
293. -Aschheim, P. (1976) En: *Hypothalamus, Pituitary and Aging* (A. V. Everett y J. A. Burgess, Eds.) p. 376. C. C. Thomas. Springfield Ill.
294. -Huang, H. H. y Meites, J. (1975) *Neuroendocrinology* 17: 289
295. -Riegler, G. D. (1973) *Neuroendocrinology* 17: 289.
296. -Huang, H. H.; Marshall, S. y Meites, J. (1976) *Biol. Reprod.* 14: 538.
297. -Swayner, C. H. (1975) *Neuroendocrinology* 17: 97.
298. -Simpkins, J. W.; Mueller, G. P.; Huang, H. H. y Meites, J. (1976) *Physiologist* 19: 368.
299. -Miller, A. E.; Shaar, C. J. y Riegler, G. D. (1976) *Exptl. Aging Res.* 2: 475.
300. -Finch, L. E. (1973) *Brain Res.* 52: 261.
301. -Elliott, J. A. (1976) *Fed. Proc.* 35: 2339.
302. -Stetson, M. H.; Elliott, J. A. y Menaker, M. (1975) *Biol. Reprod.* 13: 329.
303. -Mendelson, C.; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 8818.
304. -Brown, B. L.; Albano, J. D. M.; Ekins, R. P. y Sgherzi, A. M. (1971) *Biochem. J.* 121: 561.
305. -Redshaw, M. R. y Linch, S. S. (1974) *J. Endocr.* 60: 527.
306. -Axen, R.; Porath, J. y Ernback, S. (1967) *Nature* 214: 1302
307. -Cuatrecasas, P.; Wilchek, M. y Anfinsen, C. B. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61: 636.
308. -Catt, K. J. (1969) *Acta Endocrinol. (Kbh.)* 63 (Suppl.) 142: 222.
309. -Thorell, J. J. y Johansson, B. G. (1971) En: *Structure Activity Relationships of Proteins and Polypeptide Hormones* (M. Margoulies y F. C. Greenwood, Eds.) *Excerpta Medica.* Amsterdam.
310. -McArthur, J. W. (1952) *Endocrinology* 50: 304.
311. -Parlow, A. F. (1961) En: *Human Pituitary Gonadotropins* (A. Albert, Ed.) p. 300. C. C. Thomas Publishers, Springfield Ill.
312. -Dufau, M. L.; Tsuruhara, T. y Catt, K. J. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2414.

313. -Catt, K. J.; Dufau, M. L. y Tsuruhara, T. (1972) *J. Clin. Endocr.* 34: 123.
314. -Martin, R. G. y Ames, B. N. (1961) *J. Biol. Chem.* 236: 1372
315. -Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265.
316. -Scatchard, G. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 660.
317. -Blankenstein, M. A.; Van Woerkorn Blik, A.; Janszen, F. H. A. y van der Molen, H. J. (1976) *J. Steroid Biochem.* 7: 445
318. -Dufau, M. L.; Pock, R.; Neubauer, A. y Catt, K. J. (1976) *J. Clin. Endocr. Metab.* 42: 958.
319. -Woods, M. C. y Simpson, M. E. (1961) *Endocrinology* 69: 91.
320. -Hilliard, J. (1973) *Biol. Reprod.* 8: 203.
321. -Richards, J. S. y Midgley, A. R., Jr. (1976) *Biol. Reprod.* 14: 82.
322. -Goldfine, J. D. y Smith, G. J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 1427.
323. -Sandler, R. y Hall, P. F. (1968) *Biochem. Biophys. Acta* 164: 445.
324. -Connell, J. M. y Eik-Nes, K. B. (1968) *Steroids* 12: 507.
325. -Catt, K. J.; Watanabe, K. y Dufau, M. L. (1972) *Nature* 239: 280.
326. -Blecher, M.; Merlino, N. S. y Ro'Ane, J. T. (1968) *J. Biol. Chem.* 243: 3973.
327. -Kono, T. y Barham, F. W. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 7417
328. -Hepp, K. D. (1971) *FEBS Lett.* 12: 263.
329. -Senft, G.; Schultz, G.; Munske, K. y Hoffman, M. (1968) *Diabetologia* 4: 322.
330. -Loten, E. G. y Sneyd, J. G. T. (1970) *Biochem. J.* 120: 187
331. -Halkerston, J. D. K.; Eichhorn, J. y Hechter, O. (1961) *J. Biol. Chem.* 236: 374.
332. -Foglia, V. G.; Rosner, J. M.; Cattáneo de Peralta Ramos, M. y Lema, B. (1969) *Horm. and Metab. Res.* 1: 72
333. -Howland, B. E. y Zebrowsky, E. J. (1974) *Horm. Metab. Res.* 6: 121.
334. -Howland, B. E. y Zebrowsky, E. J. (1976) *Horm. Metab. Res.* 8: 465.
335. -Bartosik, D.; Romanoff, E. B.; Watson, D. J. y Sericco, E. (1967) *Endocrinology* 81: 186.
336. -Armstrong, D. T. (1968) *Recent Prog. Horm. Res.* 24: 255.

337. -Armstrong, D. T. ; Miller, L. S. y Knudsen, K. A. (1969) *Endocrinology* 85: 393.
338. -Bartosik, D. B. y Romanoff, E. B. (1969) En: *The Gonads* (K. W. McKerns, Ed.) pp. 212-243. Appleton-Century-Crofts. New York.
339. -Behrman, H. R. y Armstrong, D. T. (1969) *Endocrinology* 85: 474.
340. -Behrman, H. R. ; Orczyk, G. P. ; Mac Donald, G. J. y Greep, R. O. (1970) *Endocrinology* 87: 1251.
341. -Catt, K. J. y Moffat, B. (1965) *Endocrinology* 76: 678.
342. -Jones, A. E. ; Fisher, J. N. ; Lewis, U. J. y VanderLaan, W. P. (1965) *Endocrinology* 76: 578.
343. -Niswender, G. D. ; Chen, C. L. ; Midgley, A. R., Jr. ; Meites J. y Ellis, S. (1969) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 793.
344. -Amenomori, Y. ; Chen, C. L. y Meites, J. (1970) *Endocrinology* 86: 506.
345. -Goldman, J. M. y Hadley, M. E. (1972) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 112: 274.
346. -Goldman, J. M. y Hadley, M. E. (1969) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166: 1.
348. -Wizemann, V. ; Schultz, I. y Simon, B. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 307: 366.
349. -Clark, J. H. ; Anderson, J. N. y Peck, E. S. (1973) En: *Receptors for Reproductive Hormones* (O'Malley, B. W. y Means, A. R., Eds.), p. 15. Plenum Press. New York.
350. -Dufau, M. L. ; Ryan, D. y Catt, K. J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 343: 417.
351. -Lasnitzki, I. (1972) En: *Prolactin and Carcinogenesis. Proc. Fourth Tenovus Workshop. Cardiff, Wales, U. K.* (A. R. Boyns y K. Griffiths, Eds.) pp. 200-206.
352. -Raff, M. (1976) *Nature (Lond)* 259: 265.
353. -Hinkle, P. M. y Tashjian, A. H., Jr. (1975) *Biochemistry* 14: 3845.
354. -Mukherjee, C. ; Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1976) *Endocrinology* 99: 347.
355. -Conn, P. M. ; Tsuruhara, T. ; Dufau, M. L. y Catt, K. J. (1977) *Endocrinology* 101: 639.
356. -Carpenter, G. y Cohen, S. (1976) *J. Cell. Biol.* 71: 159.
357. -Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (1976) *Science* 191: 150.

358. -Bhalla, V.K. (1978) International Journal of Andrology. Supplement 2, Part 1 (Junio), 354.
359. -Sharpe, R.M. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 75: 711.
360. -Bartke, A. (1970) Genetics 64: s5-s6 (Abstract)
361. -Bartke, A. (1965) Gen. Comp. Endocr. 5: 418.
362. -Liptrap, R.M. y Raeside, J.J. (1975) J. Endocr. 66: 123.
363. -Beitins, J.Z.; Bayard, F.; Kowarski, A. y Migeon, C.J. (1973) Steroids 21: 553.
364. -Irvine, W.J.; Toft, A.D.; Wilson, K.S.; Fraser, R.; Wilson, A.; Young, J.; Hunter, W.M.; Ismail, A.A.A. y Burger, P.E. (1974) J. Clin. Endocr. Metab. 39: 522.
365. -Gomes, W.R. (1970) En: The Testis, Vol III (A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. VanDemark, Eds.) pp. 67-138. Academic Press. New York.
366. -Matsumoto, K.; Takeyasu, K.; Mizutani, S.; Hamanaka, Y. y Uozumi, T. (1970) Acta Endocr. 65: 11.
367. -Carstensen, H.; Amer, B.; Amer, J. y Wide, L. (1973) J. Steroid Biochem. 4: 45.
368. -Doerr, P. y Pirke, K.M. (1976) J. Clin. Endocr. Metab. 43: 622.
369. -Engel, W. y Frowein, J. (1974) Nature 251: 146.
370. -Leathem, J.H. (1972) En: Reproductive Biology (H. Bahn y S. Glasser, Eds.) Excerpta Medica. Amsterdam. pp 857.
371. -Reiter, R.J. (1975) Chronobiologia 1: 365.
372. -Reiter, R.J. (1975) Int. J. Biometeor. 19: 282.



Dr. EDUARDO H. CHARREAU
PROF. TITULAR QUIMICA BIOLOGICA
F. C. E. N. - U. B. A.