

## Tesis de Posgrado

# Regulación de los receptores de hormona luteinizante y esteroidogénesis en células de Leydig

Cigorruga, Selva Beatriz

1982

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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

**Cita tipo APA:**

Cigorruga, Selva Beatriz. (1982). Regulación de los receptores de hormona luteinizante y esteroidogénesis en células de Leydig. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1749\\_Cigorruga.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1749_Cigorruga.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cigorruga, Selva Beatriz. "Regulación de los receptores de hormona luteinizante y esteroidogénesis en células de Leydig". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1749\\_Cigorruga.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1749_Cigorruga.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

U N I V E R S I D A D   D E   B U E N O S   A I R E S  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

REGULACION DE LOS RECEPTORES DE HORMONA LUTEINIZANTE Y  
ESTEROIDOGENESIS EN CELULAS DE LEYDIG

Autora: Selva Beatriz Cigorruga

Padrino de Tesis: Dra. María L. Dufau

Lugar de Trabajo: Instituto Nacional de la Salud, Bethesda,  
Md, U.S.A.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas,  
Hospital de Niños, Buenos Aires.

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias  
Químicas.

1982

1749

J.<sup>s</sup>

A MIS PADRES

A MI ESPOSO

A MIS HIJOS

## A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. María L. Dufau por haberme permitido trabajar a su lado.

Al Prof. Dr. Eduardo H. Charreau y al Dr. Marco A. Rivarola por su constante apoyo y estímulo para que este trabajo fuera finalizado.

A todos aquellos que contribuyeron para que esta investigación pudiera concretarse.

I N D I C E

	Página
<u>I N T R O D U C C I O N</u>	1
- RESEÑA HISTORICA DE LAS EVIDENCIAS SOBRE LA FUNCION DE LA CELULA DE LEYDIG	1
- MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA DE LA CELULA DE LEYDIG A LA LH	6
1. Receptores de LH	6
2. Adenilato ciclasa	11
3. Proteína quinasa	14
4. Fosfodiesterasa	17
5. Proteínas específicas	18
- BIOSINTESIS DE ANDROGENOS	21
1. El colesterol como precursor de esteroides	21
2. Conversión del Colesterol en Pregnenolona	26
3. Conversión de Pregnenolona a Testosterona	30
4. Otros metabolitos de la Pregnenolona y de la Testosterona	32
- REGULACION HORMONAL DE LA FUNCION TESTICULAR	39

	Página
- INHIBICION DE LA FUNCION DE LA CELULA DE LEYDIG POR DEFICIENCIA DE GONADOTROFINAS	39
- INHIBICION DE LA FUNCION DE LA CELULA DE LEYDIG POR ESTEROIDES	41
- REGULACION DE LA FUNCION TESTICULAR POR HORMONAS PROTEICAS	48
<u>M A T E R I A L E S Y M E T O D O S</u>	52
- ANIMALES	52
- TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES	52
- AISLAMIENTO DE CELULAS DE LEYDIG POR TRATAMIENTO CON COLAGENASA	54
- OBTENCION DE GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA RADIOACTIVA	56
- PREPARACION DE SEPHAROSA-CONCANAVALINA A	58
- PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA CONCANAVALINA A	59
- DETERMINACION DEL NUMERO DE SITIOS RECEPTORES PARA LH/hCG	61

	Página
- ESTUDIOS DE UNION DE hCG EN HOMOGENATOS TESTICULARES	62
- DETERMINACION DE hCG UNIDA A TEJIDO	63
- UNION DE <sup>125</sup> I hCG A CELULAS INTERSTICIALES TESTICULARES	64
- ESTUDIOS DE UNION DE <sup>125</sup> I-hCG A RECEPTORES SOLUBLES	65
- DETERMINACION DE LA UNION DE AMP CICLICO A SUS RECEPTORES INTRACELULARES	67
- INCUBACION DE LAS CELULAS DE LEYDIG PURI- FICADAS	68
- RADIOINMUNOENSAYO DE ESTEROIDES	71
- PREPARACION PREVIA DE LAS MUESTRAS PARA EL RADIOINMUNOENSAYO	73
- DETERMINACION DE hCG SERICA	77
- DETERMINACION DE LH SERICA	78
- DETERMINACION DE cAMP	78

R E S U L T A D O S

- EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE hCG SOBRE LOS RECEPTORES PARA HORMONA LUTEINIZANTE	80
- CONCENTRACION DE SITIOS RECEPTORES PARA LH/hCG Y DETERMINACION DE LA hCG UNIDA AL TEJIDO LUEGO DE UNA UNICA INYECCION DE 10 ug DE hCG.	83
- CURVAS DE SATURACION DE LOS SITIOS RECEPTORES PARA LH/hCG. ANALISIS DE SCATCHARD	85
- ESTUDIOS "IN VITRO" DE LA RESPUESTA GONADOTROFICA DE LAS CELULAS DESENSIBILIZADAS	90
- PRODUCCION DE TESTOSTERONA ESTIMULADA POR TOXINA COLERICA Y $Bt_2$ cAMP	98
- DETERMINACION DE LA UNION DE AMP CICLICO A SUS RECEPTORES INTRACELULARES	103
- DESENSIBILIZACION INDUCIDA POR TRATAMIENTO CON FACTOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS	106
- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LH-RH SOBRE LA RESPUESTA ESTEROIDOGENICA DE LA CELULA DE LEYDIG ESTIMULADA POR hCG "IN VITRO"	113



	Página
- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LH-RH SOBRE LA PRODUCCION DE cAMP "IN VITRO"	114
- PRODUCCION DE TESTOSTERONA ESTIMULADA POR TOXINA COLERICA Y $Bt_2$ cAMP EN CELULAS DE LEYDIG DE ANIMALES TRATADOS CON LH-RH	116
- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UNA UNICA DOSIS DE hCG (10 ug) EN FORMA SUBCUTANEA, SOBRE LAS PRODUCCIONES "IN VITRO" DE TESTOSTERONA Y DE cAMP ESTIMULADAS POR hCG	119
- PRODUCCION DE PREGNENOLONA EN PREPARACIONES DE CELULAS DE LEYDIG	125
- CURVAS DOSIS RESPUESTA Y ESTUDIOS CINETICOS DE LA PRODUCCION DE PREGNENOLONA DURANTE LA ESTIMULACION GONADOTROFICA	132
- PRODUCCION DE PREGNENOLONA EN RATAS DESENSIBILIZADAS POR ADMINISTRACION DE UNA UNICA INYECCION ENDOVENOSA DE hCG	141

	Página
- LOCALIZACION DE LA LESION PRODUCIDA POR TRATAMIENTO CON hCG "IN VIVO" EN EL CAMINO BIOSINTETICO QUE CONVIERTE PREGNENOLONA A TESTOSTERONA	148
- LOCALIZACION DE LA LESION ESTEROIDOGENICA PRODUCIDA POR TRATAMIENTO CON LH-RH "IN VIVO".	152
- BIOSINTESIS DE ANDROGENOS EN ANIMALES TRATADOS CON UNA UNICA DOSIS DE hCG EN FORMA SUBCUTANEA	161
- PAPEL DE LOS ESTROGENOS EN LA LESION ESTEROIDOGENICA INDUCIDA POR TRATAMIENTO CON GONADOTROFINAS	164
- CONTENIDO TESTICULAR DE $17\beta$ ESTRADIOL Y NIVELES SERICOS DE TESTOSTERONA Y hCG, LUEGO DEL TRATAMIENTO CON hCG EN FORMA SUBCUTANEA O ENDOVENOSA	166

Página

- EFECTOS DEL ANTIESTROGENO TAMOXIFENO  
SOBRE LA RESPUESTA DE LAS CELULAS DE  
LEYDIG, 3 DIAS LUEGO DEL TRATAMIENTO  
DESENSIBILIZANTE

169

D I S C U S I O N

174

B I B L I O G R A F I A

204

A B R E V I A T U R A S

hCG	Gonadotrofina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
DNA	Acido desoxi-ribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
cAMP	3',5'-Adenosina monofosfato cíclico
BSA	Albúmina sérica bovina
LH-RH	Factor liberador de gonadotrofinas
PBS	Buffer fosfo-salino (Dulbecco)
<sup>3</sup> H	Tritio
<sup>14</sup> C	Carbono 14
DE50	Dosis efectiva 50 %
M	Molar
pmol	Picomol
fmol	Femtomol
ug	Microgramo
ng	Nanogramo

pg	Picogrammo
ul	Microlitro
UI	Unidad Internacional
mU	Miliunidad
cpm	Cuentas por minuto
Ci	Curie
uCi	Micro-Curie
NADPH	Nicotinamida--adenina--dinucleótido fosfato. Forma reducida
dpm	Desintegraciones por minuto
Bt <sub>2</sub> cAMP	N <sup>6</sup> ,O <sup>2</sup> -dibutiril adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico
DS	Desviación standard
ES	Error standard
Pregnenolona	3 β-ol-5-Pregnen-20-ona
17 hidroxipregnenolona	3 β,17α -diol-5-Pregnen-20-ona
Dehidroepiandrosterona(DHA)	3 β-ol-5-Androsten-17-ona
Δ <sub>5</sub> -androstenodiol	5-Androsten-3 β,17β -diol
Testosterona	17 β-ol-4-Androsten-3-ona

Progesterona	4-Pregnen-3,20-diona
17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona	17 $\alpha$ -ol-4-Pregnen-3,20-diona
Androstenodiona	4-Androsten-3,17-diona
17 $\beta$ Estradiol	1,3,(5-10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol
11 Desoxicortisol	17 $\alpha$ ,21-diol-4-Pregnen-3,20-diona
$\Delta_4$ Androstenodiol	4-Androsten-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
Cortisol	11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-4-Pregnen-3, 20,diona
20-OH-Progesterona	20 $\alpha$ -ol-4-Pregnen-3-ona
6-OH-Progesterona	6 $\alpha$ -ol-4-Pregnen-3,20-diona
DHA-Sulfato	3 $\beta$ -ol-5Androsten-17-ona sulfato
Colesterol	5-Colesten-3 $\beta$ -ol
Estrona	3-ol-1,3,5(10)-Estratrien-17-ona
Estriol	1,3,5(10)-Estratrien-3,16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -triol
16-Cetoestradiol	3,17 $\beta$ -diol-1,3,5(10)Estratrien- 16-ona
16-Epiestriol	1,3,5(10)-Estratrien-3,16 $\beta$ , 17 $\beta$ -triol

Estradiol-3-glucurónido	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ - diol-3 glucuronato
Estradiol 17 glucurónido	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol- 17-glucuronato
Cortisona	17 $\alpha$ ,21-diol-4-Pregnen-3,11, 20-triona
Dihidrotosterona	17 $\beta$ -ol-5 $\alpha$ -Androstan-3-ona
Androstenediona	4-Androsten-3,17-diona
21-OH-Pregnenolona	3 $\beta$ ,21-diol-5-Pregnen-20-ona
11-OH-Progesterona	11 $\alpha$ -ol-4-Pregnen-3,20-diona

I N T R O D U C C I O N

RESEÑA HISTORICA DE LAS EVIDENCIAS SOBRE LA FUNCION  
DE LA CELULA DE LEYDIG

La castración de animales domésticos y del hombre puso en claro desde la antigüedad, el papel del testículo en la manifestación de las características sexuales secundarias del macho. Por mucho tiempo se supuso que la regulación de estas características sexuales, era mediada por nervios que se extendían desde el testículo a los órganos sexuales secundarios. Sin embargo, en 1849 Berthold (1), notó que testículos transplantados ectópicamente en gallos castrados, eran todavía capaces de prevenir la atrofia de la cresta de estas aves y concluyó que la regulación era realmente ejercida a través de la sangre.

Un año más tarde, en 1850, Franz Leydig describió la presencia de células intersticiales en el testículo de varios mamíferos (2). Más tarde otros autores especularon sobre las posibles funciones de estas células, sugiriendo que podrían aportar nutrientes para el tubo seminífero,



producir una hormona masculina, almacenar productos hormonales producidos por el túbulo, eliminar sustancias nocivas que pudieran dañar los túbulos o migrar al tubo seminífero para reemplazar a células de Sertoli envejecidas (3).

Las evidencias más sobresalientes que atribúan un papel endócrino a la célula de Leydig fueron presentados en una serie de trabajos que se inician en 1903 por Bowin y Ancel (4). Esta evidencia junto con la presentada por otros autores se produjo en las siguientes líneas:

1. Las células de Leydig tienen forma epitelioides y núcleo prominente y estas son características morfológicas de células involucradas en procesos secretorios.
2. Las células de Leydig están más orientadas hacia la vasculatura que hacia los túbulos.
3. En muchas condiciones patológicas o experimentales (calor, rayos x, algunos casos de vasectomía y otros tratamientos), el túbulo sufre un proceso regresivo, pero las células de Leydig permanecen intactas, y las características sexuales secundarias del macho también se mantienen.

Se veía así que estas características estaban más relacionadas con el estadio de las células de Leydig que con el del tubo seminífero.

4. Las células de Leydig son numerosas en el testículo embrionario de los mamíferos, en el momento en que el tracto reproductivo masculino se desarrolla y en este mismo momento el tubo seminífero es rudimentario.

Aunque todas estas evidencias sugerían un papel endócrino para las células de Leydig, eran en realidad evidencias circunstanciales que podían ser interpretadas por otros mecanismos. Prácticamente en todas las condiciones experimentales donde se producía una regresión del tubo seminífero, eran las células germinales las que se afectaban, mientras que las células de Sertoli (y también espermatogonias) permanecían en los túbulos y constituían una posible fuente de hormonas. Cuando se estudiaron además los ciclos reproductivos estacionales en ciertos vertebrados y mamíferos, aparecieron casos paradigmáticos en los cuales los caracteres sexuales secundarios parecían estar desfasados con respecto

al desarrollo de las células de Leydig. Como resultado de éstas y otras dificultades los principales investigadores en células de Leydig entre los años 1920 a 1935 eran escépticos acerca de su función. En una revisión muy extensa sobre las células de Leydig, Rasmussen discutió las evidencias en detalle y concluyó que era necesario ser precavido en las conclusiones que de ellas se extrajeran. Por otro lado Steive, un investigador que había realizado numerosos estudios sobre las células de Leydig de varias especies, concluyó que toda la evidencia era consistente con el punto de vista de que las células de Leydig simplemente nutrían a las células del túbulo, y que eran estas últimas las que realmente producían la hormona masculina circulante.

En los primeros años de la década del 30 se estableció que la hormona masculina era la testosterona (5), y que la función testicular estaba controlada por hormonas de la pituitaria (6).

La prueba definitiva de que las células de Leydig son la principal fuente de andrógenos se ha obtenido relativa-

mente hace pocos años a través de dos desarrollos técnicos. En 1958 apareció una técnica histoquímica para localizar la enzima esteroideogénica  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (7, 8), y se vió que tanto en mamíferos como en los otros vertebrados estudiados, la actividad de esta enzima se hallaba predominantemente sobre las células de Leydig.

La otra evidencia se hizo posible por el desarrollo de un método que permitió separar túbulos de células de Leydig en testículo de rata. Cuando los dos componentes fueron incubados separadamente con progesterona radioactiva se vió que el tejido intersticial tenía preponderantemente la capacidad de convertir este sustrato a andrógenos, aún cuando el tubo seminífero también mostró alguna actividad (9). Por otro lado Hall y col. demostraron que la conversión de colesterol a andrógenos ocurría sólo en el tejido intersticial (10).

Mucho se ha avanzado desde aquellos primeros intentos para definir el papel de las células de Leydig en la organización testicular. Se ha avanzado en el conocimiento del

mecanismo de acción de la hormona luteinizante que conduce finalmente a la secreción de testosterona, pero a pesar de que se conoce hoy una constelación de hormonas que pueden regular la función de la célula de Leydig, queda todavía muchísimo por investigar sobre los complejos mecanismos que se integran para obtener una célula de Leydig esteroideogénicamente activa.

#### MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA DE LA CELULA DE LEYDIG A LA LH

##### 1. Receptores de LH

La primera evidencia de que las células de Leydig poseían receptores para LH, que le permitían interaccionar selectivamente con la gonadotropina circulante fué aportada por: a- técnicas inmunohistoquímicas usando LH acoplada a ferritina (11) y b- técnicas autoradiográficas luego de exponer al animal in vivo a LH marcada con  $^{125}\text{I}$  (12, 13).

En estas condiciones, se demostró que la LH interaccionaba selectivamente con la célula de Leydig, mientras que no

se observaba unión a las células del tubo seminífero. Las siguientes observaciones sugirieron que estos sitios de reconocimiento hormonal, se encontraban en la membrana plasmática de las células de Leydig: a- La LH unida a Sepharosa, que no podía penetrar a las células, era capaz de estimular la esteroidogénesis (14) y b- la gonadotropina unida a la célula podía eluirse simplemente disminuyendo el pH del medio (15).

Un hallazgo mucho más reciente que claramente demuestra la localización en la superficie celular de estos receptores hormonales, se debe a la visualización del complejo fluorescente que se obtiene utilizando una técnica de inmunofluorescencia en la periferia celular (16).

Cada uno de estos métodos, independientemente, han demostrado que los receptores de LH se encuentran predominantemente sobre la superficie celular y coinciden con los estudios en fracciones subcelulares de células intersticiales que indicaron la misma localización.

Se demostró que, la asociación entre LH o hCG y los

sitios receptores es marcadamente dependiente de la temperatura de incubación y que a 37°C se produce rápidamente. Sin embargo, la mayoría de los estudios de unión de LH o hCG marcadas, han sido realizados a temperaturas entre 20 y 24°C, para disminuir al máximo los efectos de degradación de la hormona y/o de los sitios receptores durante la reacción de unión. Se vio que la velocidad de la interacción entre sitios receptores y hormona depende también de la concentración de hormona utilizada y que sigue una cinética de segundo orden, hasta que se utiliza un exceso de hormona en que la reacción adquiere una cinética de pseudo-primer orden (17). Se ha encontrado que las características de la unión de las gonadotrofinas a los receptores son idénticas en células de Leydig aisladas, en homogenatos testiculares y en membranas de células intersticiales y se ha calculado que existen aproximadamente 20.000 sitios receptores por célula de Leydig. La constante de unión en el equilibrio  $K_a$  es  $4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  y pertenece a una sola clase de sitios de unión no interactivos, que se demostraron en la obtención de

gráficos de Scatchard lineales y en gráficos de Hill con pendiente 1.0. La vida media del complejo receptor-hormona es de 24 horas a 24°C, y la disociación se produce aún más lentamente a 4°C. Esta propiedad de los sitios receptores para gonadotrofina ha sido de incalculable valor en la solubilización y caracterización físico-química de los mismos; permitiendo la utilización de métodos tales como filtración en geles o gradientes de densidad, que son relativamente largos.

Cuando se correlacionó la unión de hCG a sus sitios receptores con la esteroidogénesis se vió que la célula de Leydig contenía un gran exceso de receptores con respecto a los necesarios para producir una respuesta esteroidogénica máxima (18). Esta última puede ser inducida con una ocupación de sitios receptores menor del 1 % (es decir 200). La ocupación de sitios necesaria para producir pequeños incrementos en la esteroidogénesis debería involucrar sólo unos pocos sitios. No existen evidencias de que haya una subpoblación de sitios de alta afinidad que sea la responsable



de la respuesta esteroideogénica aguda. La función de este gran exceso de sitios muy por encima de los necesarios para producir una respuesta biológica máxima y que han dado en llamarse receptores redundantes no ha sido completamente aclarada. Dos explicaciones posibles para su presencia serían a) se favorecería la formación del complejo receptor-hormona y por lo tanto indirectamente la respuesta biológica en condiciones de baja concentración del ligando y b) proveerían un reservorio de sitios para reemplazar aquellos utilizados o procesados como consecuencia de la interacción de la hormona en condiciones fisiológicas que inducen la secreción hormonal. Las fluctuaciones en el número de sitios receptores tendrían efectos en la sensibilidad de las curvas de dosis respuesta de cada célula.

Un grupo de investigadores (19) ha propuesto recientemente la existencia de dos subpoblaciones de células de Leydig en testículo de ratas maduras. Los mismos autores postulan que la subpoblación de células de Leydig que tiene menor número de sitios receptores y que no responde al es-

tímulo gonadotrófico con producción de Testosterona, representa a células de Leydig inmaduras.

## 2. Adenilato ciclasa

El primer efecto de la LH sobre la célula de Leydig, es la activación mediada por el complejo receptor-hormona de la adenilato ciclasa que resulta en la formación del cAMP. En la célula de Leydig intacta los niveles de cAMP se elevan rápidamente, dentro de los primeros segundos luego de la interacción LH-receptor, mientras que la producción de Testosterona se pone en evidencia luego de por lo menos 10 minutos. La respuesta del nucleótido cíclico a la gonadotrofina en células de Leydig aisladas es grande y rápida. El hecho de que la respuesta esteroideogénica a la LH, pueda ser reproducida por análogos del cAMP, por toxina colérica y que además sea potenciada por inhibidores de la fosfodiesterasa es consistente con que el cAMP es el segundo mensajero de la acción gonadotrófica, así como de los efectos de ACTH en la corteza adrenal. Sin embargo, las marcadas discrepancias entre las curvas de dosis respuesta

para el cAMP y para la producción de esteroides en células de Leydig aisladas así como en células luteales y adrenales, oscureció por mucho tiempo el papel del cAMP en el mecanismo de acción hormonal, planteándose la posible existencia de otros mensajeros responsables de la respuesta esteroidogénica a bajos niveles hormonales. Sólo recientemente, un estudio detallado de los niveles intracelulares de cAMP, incluyendo aquel que involucra el nucleótido unido a la subunidad reguladora de la proteína quinasa, ha demostrado que existe una muy buena correlación entre producción de cAMP, activación de proteína quinasa y esteroidogénesis durante la estimulación hormonal en testículo, ovario y adrenal (20, 21, 22, 23). En estos experimentos se puso asimismo en evidencia que el proceso de activación regulado por cAMP estaba controlado por cambios muy pequeños en los niveles intracelulares de cAMP y que existirían respuestas mediadas por el cAMP en determinados compartimentos celulares (21). Estos hallazgos, junto con las observaciones recientes que demuestran la fosforilación de proteínas citosólicas en células de

Leydig y células adrenales estimuladas por las respectivas hormonas tróficas (24, 25), aportan evidencias firmes sobre el papel de la adenilato ciclasa-proteína quinasa en el mecanismo de acción hormonal.

Dufau y col. (26) demostraron asimismo que es el receptor el que determina la especificidad de la respuesta de la adenilato ciclasa, transfiriendo receptores solubilizados de ovario a células adrenales aisladas, hicieron que estas últimas células se hicieran sensibles a la hCG respondiendo a su estímulo con la producción simultánea de cAMP y de glucocorticoides.

Si bien el sistema de la adenilatociclasa ha sido poco estudiado en particular en la célula de Leydig, parece ser que también aquí al igual que en otros tejidos (27, 28) los nucleótidos guanílicos juegan un papel decisivo en el acoplamiento del receptor a la ciclasa y su activación subsiguiente. El grado de activación parece ser dependiente de las concentraciones en el medio de magnesio, calcio y ATP.

### 3. Proteína quinasa

Aunque se supo por mucho tiempo de la existencia de proteína quinasa en célula de Leydig, sólo recientemente y con el advenimiento de nuevas técnicas de separación celular estas quinasas han sido caracterizadas (29, 30, 31, 32). Estos estudios demostraron en células de Leydig la existencia de dos proteínas quinasas dependientes de cAMP y una independiente de cAMP. Se creía que ésta última era la subunidad catalítica común a las dos holoenzimas, ya que el tratamiento de las células de Leydig con bajas dosis de hCG producía activación progresiva de ambas proteínas quinasas y conversión a la subunidad independiente de cAMP (32). Cuando se estudiaron los pesos moleculares de estas quinasas (33) se vió que el 70 % de la proteína kinasa dependiente de cAMP de la célula de Leydig, tiene dos subunidades regulatorias (PM 116.400). La segunda holoenzima con un peso molecular menor (PM 59.600) derivaría de la mayor y estaría constituida por una subunidad reguladora unida a una subunidad catalítica. La unión del cAMP a las dos subunidades re-

gulatorias de la holoenzima de mayor peso molecular, o a la subunidad regulatoria única de la menor, causaría la liberación de las subunidades catalíticas respectivas (PM 33.000) que fosforilarían proteínas celulares. Podestá y col. (34) usando electroforesis en geles de poliacrilamida para separar las diferentes holoenzimas, pudieron demostrar que usando bajas dosis de hCG, el cAMP endógeno ocupa las subunidades regulatorias correspondientes a la enzima de PM 116.400, mientras que la segunda holoenzima sólo es activada cuando se utilizan dosis altas de gonadotropina para el estímulo. De estos experimentos se deduciría que la holoenzima de mayor peso molecular, es la involucrada en la respuesta esteroideogénica que se obtiene a bajos niveles de gonadotropina.

Los estudios en que se comparan las curvas de dosis respuesta del cAMP y de la Testosterona después de exponer a la célula de Leydig a la hCG o a la toxina colérica indicarían que la proteína quinasa que se activa por la acción gonadotrófica, estaría ubicada en un compartimento celular específico. Esta aseveración se basa en la siguiente evi-

dencia durante la estimulación con la toxina, la curva de dosis respuesta para la testosterona se obtiene con ocupación del 75 - 100 % de los receptores de cAMP, mientras que se necesita solamente una ocupación del 25 % de los sitios receptores para el nucleótido en la estimulación hormonal, para producir niveles máximos esteroidogénicos (20, 21). Estas observaciones sugieren que el cAMP producido en la estimulación hormonal, tiene un acceso más rápido o directo a receptores de cAMP que se encuentran en las proximidades de enzimas esteroidogénicas que son la clave de una producción de Testosterona aumentada, y que serían activadas por la proteína quinasa. Luego de la unión de la toxina y de la estimulación inespecífica de la ciclasa en múltiples puntos de la membrana celular, el cAMP producido ocuparía receptores que no se encuentran directamente relacionados con la proteína quinasa involucrada en la esteroidogénesis y se explicaría así el porqué se necesita un número mucho mayor de receptores ocupados para activarla.

#### 4. Fosfodiesterasa

El grado de activación de la proteína quinasa depende de los niveles intracelulares del cAMP, que están regulados por la actividad simultánea de dos enzimas: la adenilato ciclasa que lo forma bajo el estímulo hormonal y la fosfodiesterasa que lo degrada al compuesto inactivo 5'AMP. En varios tejidos se ha considerado que las fosfodiesterasas juegan un papel clave en la regulación de la respuesta celular a la hormona. Así, en la célula de Sertoli se ha supuesto que uno de los mecanismos para la falta de respuesta a la FSH en células de animales adultos, se debe a un incremento en la actividad de estas enzimas. Existen evidencias indirectas de que en las células de Leydig las fosfodiesterasas regulan la respuesta celular a la gonadotrofina, y son las que se derivan de estudios realizados en presencia de MIX o de teofilina. La incubación de células de Leydig aisladas en presencia de estos inhibidores, tienen un efecto potenciador sobre la respuesta esteroideogénica inducida por LH/hCG (35, 36, 37), sugiriendo asimismo estos resulta-



dos que en condiciones normales la señal hormonal es en cierta forma atenuada por la presencia de fosfodiesterasas. Sin embargo, la mayor parte de los estudios sobre fosfodiesterasa testicular han sido realizados en homogenatos testiculares totales y existen muy pocos intentos para caracterizar estas enzimas en las distintas poblaciones celulares. Los trabajos realizados con células de Sertoli indicarían que existen múltiples formas de estas enzimas, con diferentes especificidades de sustrato, comportamiento cinético y requerimiento por calcio (38).

##### 5. Proteínas específicas

Las proteínas intracelulares que son fosforiladas por la proteína quinasa, activan probablemente una secuencia de eventos involucrados en la biosíntesis esteroidea, pero los mecanismos precisos de su acción son aún desconocidos. Durante la activación hormonal, se produce síntesis proteica en la célula de Leydig y este es un prerrequisito para una respuesta esteroideogénica normal. Esto ha sido demostrado

por el efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de esteroides que ejercen los inhibidores de síntesis proteica (39, 40, 41, 42, 43). Janszen y col. han descrito varias proteínas que son inducidas por estimulación con LH en células de Leydig normales y tumorales, sin embargo, estas proteínas no parecen estar involucradas en la respuesta esteroidogénica aguda, ya que su presencia no ha podido ser detectada antes de un período de 2 horas luego de la estimulación con gonadotrofina. Recientemente se han encontrado más fosfoproteínas dependientes de LH en las células de Leydig (44). Las propiedades de estas proteínas deben ser investigadas en mayor detalle tratando de encontrar correlaciones entre fosforilaciones y activación proteica en fracciones subcelulares aisladas y purificadas.

De los experimentos con cicloheximida se ha concluido que ciertas proteínas con una vida media muy corta ( $t_{1/2}$  - 13 min), están involucradas en la regulación de la esteroidogénesis en la célula de Leydig (39).

Además de estos estudios sobre el papel del metabolismo

proteico en la respuesta esteroideogénica, se han investigado específicamente ciertas proteínas. Se ha detectado en tejido testicular (45), una proteína termoestable que une específicamente al colesterol, y se ha sugerido que esta proteína podría cumplir un papel en el transporte del colesterol desde el espacio extramitocondrial al intramitocondrial. Hall y col. (46) han demostrado recientemente que los microfilamentos conteniendo actina en las células de Leydig podrían estar involucrados en el transporte de colesterol, ya que la esteroideogénesis es inhibida luego del tratamiento de las células con liposomas conteniendo anticuerpo anti-actina. El requerimiento de los microfilamentos para el suministro de colesterol a la mitocondria parece ser condición necesaria pero no suficiente, ya que no existen evidencias de que el sistema de transporte del colesterol constituya la etapa de velocidad limitante en el control de la esteroideogénesis. Los experimentos con anticuerpos contra proteínas intracelulares específicas, introducidos en células intactas ya sea vía liposomas o fusión celular parecen

promisorios y podrían contribuir a un mejor entendimiento acerca del papel de ciertas proteínas en el mecanismo de acción de la LH.

## BIOSINTESIS DE ANDROGENOS

### 1. El colesterol como precursor de esteroides

No existen dudas de que los órganos esteroidogénicos pueden convertir el colesterol a las hormonas segregadas por estos órganos, es decir: corticoesteroides en la adrenal (47, 48, 49); Progesterona en el cuerpo lúteo (50, 51); y Testosterona en el testículo (52, 53). Además, la conversión de colesterol a estas hormonas es estimulada por las hormonas tróficas, ACTH (48, 49) y LH (51, 53). Ambas hormonas producen una disminución del contenido en colesterol en sus órganos blancos respectivos (47, 54) y en el caso de la corteza adrenal la disminución absoluta en colesterol es del mismo orden que la producción de esteroides. Sin embargo la mayor parte del colesterol en los órganos esteroidogénicos está presente en una forma en la que no es direc-

tamente precursor de hormonas esteroideas y además se encuentra en compartimentos celulares específicos complicándose así la experimentación en este campo. El colesterol exógeno marcado no es un buen precursor de andrógenos observándose un porcentaje de conversión muy bajo. Esto se debe en parte a que el colesterol es insoluble en agua siendo así difícil ofrecerlo a los tejidos y con el resultado de que es muy poco lo que entra y por otra parte lo poco que uno consigue incorporar es diluido por una gran cantidad de colesterol endógeno no marcado (51). Por otro lado, el acetato  $^{14}\text{C}$  sirve como un precursor medianamente efectivo para hormonas esteroideas (55, 49). Estos resultados fueron interpretados hace algunos años (56) como que el colesterol no era el precursor fisiológico de esteroides, y como que el acetato podría formar esteroides sin pasar por el colesterol, o sea que se planteó en aquel momento que el colesterol podía no ser un precursor obligatorio de las hormonas esteroideas. Actualmente se considera que no existe ninguna evidencia que no pueda ser reconciliada con que el coleste-

rol es precursor obligatorio de esteroides y con que el acetato es convertido a esteroides luego de pasar por colesterol. Cuando se estudia la contribución del colesterol plasmático al nivel de colesterol precursor de hormonas esteroideas la situación parece diferir en distintos órganos. En adrenal la fuente principal de esteroides parece ser el colesterol plasmático: en el hombre, 80 % (57); perro 90% (58); rata 90 % (59); y cobayo, 60 % (60). En estudios similares en que se estudió la contribución del colesterol plasmático a la producción de andrógenos testiculares, se vió que era del 13 % en cobayo (60), y aproximadamente 40 % en la rata (59).

En realidad las contribuciones relativas del colesterol testicular y del colesterol plasmático a la síntesis de esteroides pueden variar en distintas circunstancias (por ejemplo de acuerdo a la velocidad con que se sintetizan los andrógenos) y las evidencias presentadas respecto al origen del colesterol que está involucrado en la esteroidogénesis, no resultan concluyentes.

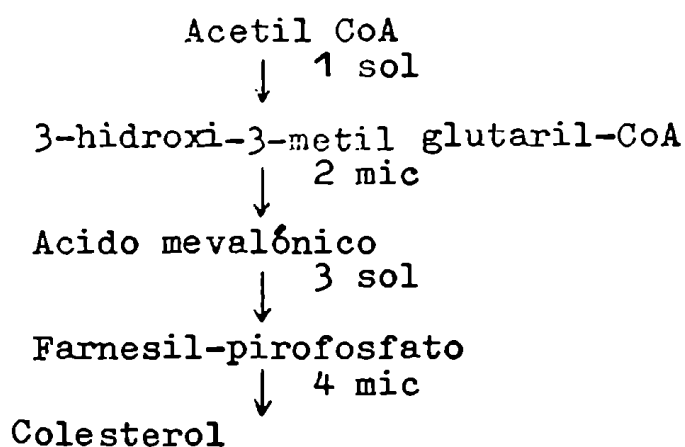
Los ácidos grasos constituyen probablemente los principales precursores iniciales de la biosíntesis de colesterol testicular (la glucosa puede ser también un buen sustrato). Una vez en el interior de la célula, tanto los ácidos grasos como la glucosa pueden transformarse en acetil-CoA, pilar fundamental de la biosíntesis de esteroides. El sistema enzimático para la degradación de los ácidos grasos ( $\beta$  oxidación) se localiza en las mitocondrias. Una vez formada la acetil-CoA destinada a la biosíntesis de esteroides, debe abandonar esta organela (posiblemente vía citrato), por ser la membrana mitocondrial impermeable a la acetil-CoA, llegando al citoplasma donde se encuentran las enzimas responsables de catalizar los dos pasos siguientes que lo transforman en 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA (HMGCoA) cuya posterior reducción a ácido mevalónico depende de enzimas fuertemente asociadas al retículo endoplásmico.

Los pasos sucesivos que dan lugar a la formación de farnesil-pirofosfatos (a partir de 3 de los 5 carbonos provenientes del mevalónico) son catalizados por enzimas cito-

plasmáticas solubles mientras que la transformación de este compuesto a colesterol depende de sistemas enzimáticos presentes en el retículo endoplásmico. Quizás, esto sea una ventaja ya que el farnesil-pirofosfato y los productos posteriores son comparativamente más insolubles en el citoplasma acuoso. En esta forma estos sustratos podrían asociarse con las porciones más hidrofóbicas del retículo endoplásmico, facilitando su presentación a las enzimas responsables de la síntesis de colesterol.

En la fig. a se muestra un esquema de la biosíntesis del colesterol y la localización intracelular de las principales enzimas involucradas.

Fig. a





Una vez sintetizado en la célula o tomado desde el plasma, el colesterol es rápidamente esterificado con ácidos grasos y acumulado en gránulos lipídicos, de los cuales puede ser hidrolizados por esterases citoplasmáticas, que proveen de esta forma más colesterol libre para ser utilizado en la biosíntesis de esteroides.

## 2. Conversión del Colesterol en Pregnenolona

Como ya se mencionó, el principal punto de acción tanto de ACTH como de LH sobre la esteroidogénesis parece ser la conversión de colesterol en Pregnenolona (49, 61), y por lo tanto es probable que las proteínas fosforiladas por la proteína quinasa, así como las proteínas lábiles que son sintetizadas en las células de Leydig (36), estén involucradas en esta etapa de la biosíntesis esteroidea. Tales proteínas podrían ser necesarias para el transporte del colesterol dentro de la mitocondria y/o para la activación del sistema enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol. Según Burnstein y col. (62) precisamente la eta-

pa que es estimulada por la LH en la secuencia biosintética entre colesterol y Pregnenolona, sería la conversión del colesterol a 20 y 22 $\alpha$ -hidroxicolesterol. Por otro lado, tanto en testículo como en ovario, LH y prolactina parecen tener influencia sobre la síntesis y el metabolismo de los ésteres del colesterol. Bajo tratamiento con LH se ha observado en las gonadas una actividad aumentada de la colesteroles-terasa y una actividad disminuída de la enzima que esterifica al colesterol (61, 63, 64), favoreciéndose de esta forma la presencia de colesterol libre que puede ser utilizado para la biosíntesis de andrógenos. El tratamiento con prolactina induce la acumulación de ésteres del colesterol en el testículo de ratón y conduciría a una producción incrementada de andrógenos testiculares en presencia de LH (65).

Una vez formado en el citoplasma, el colesterol libre debe movilizarse hacia la membrana mitocondrial externa, y probablemente lo realiza combinándose con una proteína transportadora (66). Ya que, el complejo enzimático que

rompe la cadena lateral del colesterol se halla situado en la membrana interna mitocondrial, el colesterol debe ahora incorporarse a esta zona de la organela celular. En la adrenal, se ha demostrado que la ACTH induce la unión del colesterol al citocromo P-450, siendo este último un componente del complejo enzimático. La reacción enzimática que ocurre en la membrana interna mitocondrial sería el paso limitante de la esteroidogénesis; este sistema enzimático es sumamente complejo e incluye a las 20 y 22 hidroxilasas que introducen grupos hidroxilos en las posiciones respectivas, previamente a la ruptura del enlace carbono entre los carbonos 20 y 22 por la 20, 22 liasa (cada una de las hidroxilasas posee un transportador de electrones diferente al conocido para la respiración, actuando el citocromo P450 como oxidasa terminal de las hidroxilaciones).

La hipofisectomía produce un decaimiento notable en el contenido testicular de citocromo P-450 y enzimas relacionadas, mientras que la administración prolongada y simultánea de LH evita esta disminución (67). Caron y col. (68) demos-

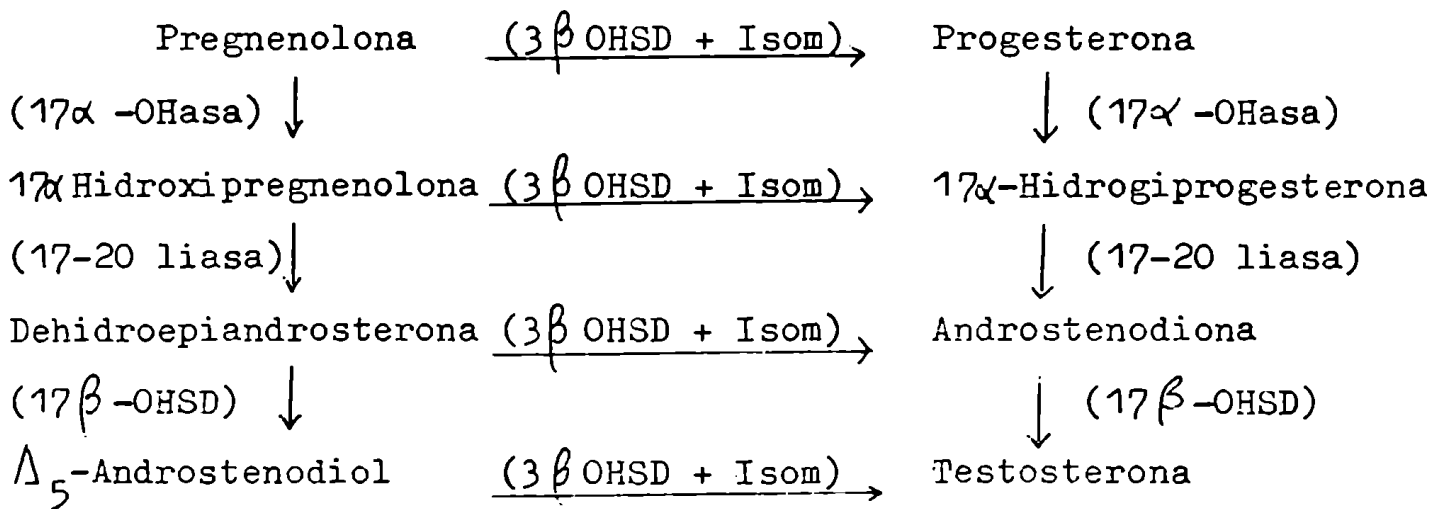
traron asimismo que la fosforilación con proteína quinasa cAMP dependiente proveniente de ovario, de un sistema enzimático reconstituido in vitro, aumenta la actividad de ruptura de la cadena lateral. La esterasa del colesterol proveniente de extractos crudos de corteza adrenal incrementa su actividad en una reacción que es dependiente de Mg ATPasa y que es estimulada por cAMP o sus derivados (69, 70, 71, 72). La reacción es incrementada por la adición de proteína quinasa cAMP dependiente exógena y es bloqueada por un inhibidor de esta proteína, no quedando así prácticamente dudas de que la fosforilación estaría involucrada.

La colesterol esterasa altamente purificada puede ser fosforilada y activada por cAMP, sin embargo el grado de activación alcanzado es pequeño cuando se lo compara con el grado de estimulación de la producción hormonal inducida por ACTH (72). De todas estas evidencias puede verse claramente, cuáles podrían ser los puntos de control, importantes en la regulación de la biosíntesis esteroidea que ejerce la LH.

### 3. Conversión de Pregnenolona a Testosterona.

Si se examina la fig. b, se ve claramente que la conversión de Pregnenolona a andrógenos requiere cinco reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas:  $17\alpha$  hidroxilasa, C17-20 liasa o desmolasa,  $3\beta$ , hidroxioesteroide deshidrogenasa,  $\Delta_5-3$  cetohidroxioesteroide isomerasa y  $17\beta$  hidroxioesteroide deshidrogenasa. En esta figura puede asimismo observarse que estas operaciones enzimáticas pueden ser realizadas con secuencias diferentes, dando lugar a varios caminos alternativos para la síntesis de Testosterona a partir de Pregnenolona. Ya que la etapa limitante de la velocidad en la síntesis de andrógenos ocurre antes de la producción de Pregnenolona, el determinar el camino que prevalece parecería tener un interés meramente académico. Sin embargo los hallazgos sobre la predominancia de un camino en las distintas especies, podrían sugerir un ordenamiento preciso de las enzimas involucradas en el retículo endoplásmico. Aún así, el camino predominante podría cambiar cuando cambia la velocidad de la biosíntesis esteroidea. Se ha es-

Fig. b



$3\beta$  OHSD:  $3\beta$  Hidroxiesteroide deshidrogenasa

Isom:  $\Delta_5$ -3cetohidroxiesteroide isomerasa

$17\alpha$ -OHasa:  $17\alpha$ -hidroxilasa

17-20 liasa: C 17-20 liasa o desmolasa

$17\beta$ -OHSD:  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

peculado con que la entrada de la Pregnenolona al retículo endoplásmico podría efectuarse a través de una "puerta específica", determinándose así la primer enzima con que entraría en contacto (73).

Parecería que el camino de la Progesterona, o bien "vía  $\Delta_4$ " es la que predomina en la rata (74), si bien otros caminos alternativos no pueden ser excluidos. En el testículo humano la "vía  $\Delta_5$ " parece ser la más significativa. En el testículo fetal humano se ha demostrado que están presentes Pregnenolona y Dehidroepiandrosterona pero no Progesterona (75) y se concluyó que la formación de Testosterona ocurre vía Pregnenolona, Dehidroepiandrosterona y Androstenodiona (76, 77, 78).

#### 4. Otros metabolitos de la Pregnenolona y de la Testosterona

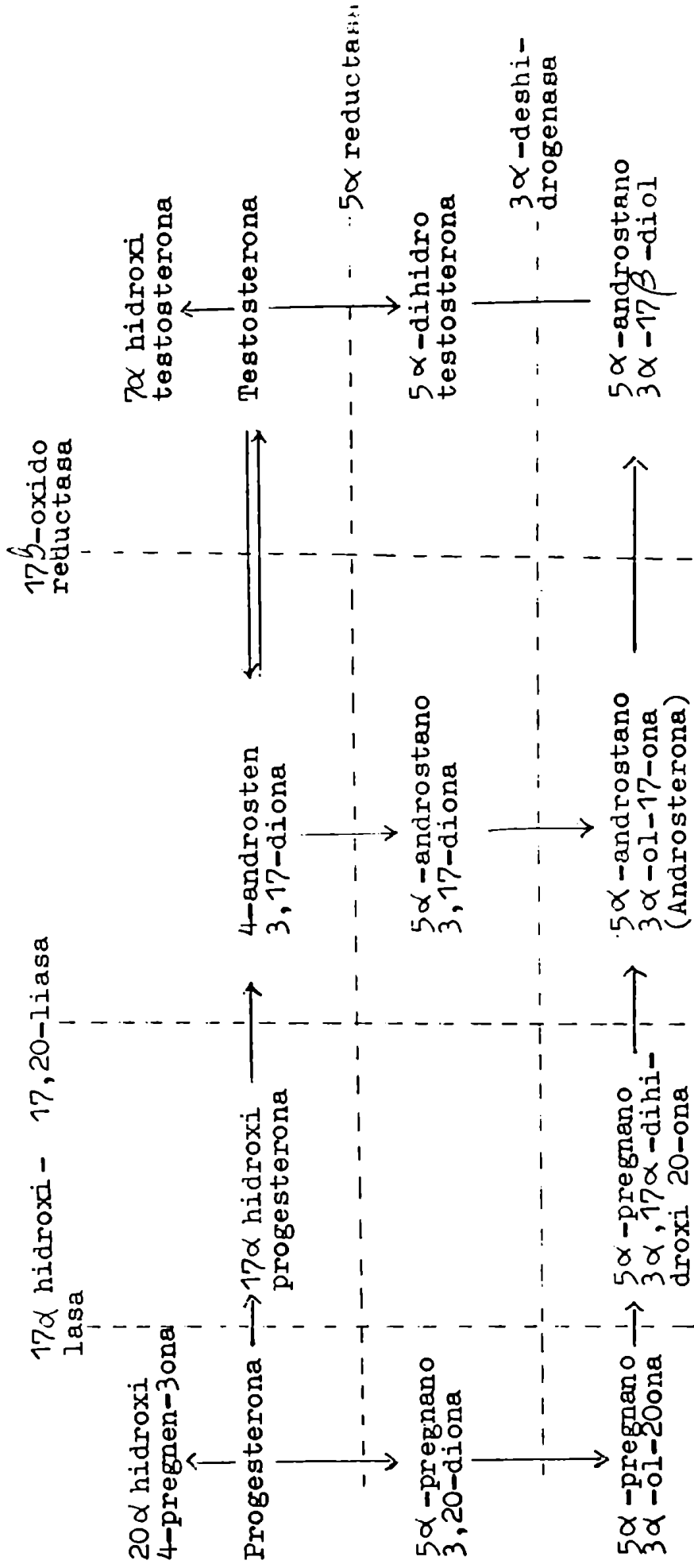
Cuando se miden los esteroides endógenos, se demuestra que existe en los mismos, de acuerdo a las especies y al grado de desarrollo una gran variabilidad (79). Por ejemplo en el testículo de rata inmadura el  $5\alpha$ -androstano- $3\alpha$ ,

$17\beta$  diol y el  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -androstan-17ona (Androsterona) están presentes en cantidades muy superiores a la Testosterona, mientras que esta última se halla incrementada en el testículo maduro (80). Se han hecho observaciones semejantes para las cantidades relativas de Testosterona y Androstenodiona en el testículo del toro, siendo éste último esteroide cuantitativamente más importante en animales inmaduros, mientras que la Testosterona lo es en animales adultos (81).

En la fig. c se muestran algunos de los metabolitos que han sido encontrados en tejido testicular.

Las enzimas requeridas para la formación de Pregnenolona, así como para su posterior conversión a Androstenodiona y Testosterona están localizadas fundamentalmente en la célula de Leydig. Algunas de estas enzimas sin embargo, han sido localizadas en más de un tipo celular testicular (Tabla A).





**Fig. c:** Algunos de los caminos conocidos para la degradación reductiva de esteroides en el testículo.

TABLA A. LOCALIZACION DE LAS ENZIMAS QUE METABOLIZAN ESTEROIDES EN EL TEJIDO INTERSTICIAL Y EN EL TUBULO SEMINIFERO DE TESTICULO DE RATA

Actividad enzimática	% de actividad presente en			Referencias
	Tej.intersticial	Túbulo seminífero		
- Complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol.	98	2		82
- $\Delta$ 5-3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta$ <sub>4-5</sub> isomerasa	95-98	2-5		83
- 17 $\alpha$ -hidroxilasa	93-94	6-7		67, 84
- 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa	3	97		85, 84
- C <sub>17-20</sub> liasa	93-94	6-7		67, 84
- 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa	presente	presente		86, 82
- 5 $\alpha$ -reductasa	> 90 % (inmadura)	< 10 % (inmadura)		87, 86, 88, 89.
- 3 $\alpha$ (3 $\beta$ ) hidroxiesteroide deshidrogenasa	> 90 % (inmadura) presente (adulto)	< 10 % (inmadura) presente (adulto)		86, 87, 88, 89
- Aromatasa	ausente	presente		90, 91

Otros tipos celulares, distintos de la célula de Leydig, en el testículo podrían estar involucrados en la biosíntesis de otros esteroides biológicamente activos de la Testosterona, tales como la Dihidrotestosterona y el Estradiol, o podrían asimismo ser responsables de la inactivación de esteroides biológicamente activos. Cabe mencionar que los esteroides teóricamente difunden fácilmente a través de las membranas, pudiendo así permitirse una cooperación metabólica entre los distintos tipos celulares (92, 93). Se deduce entonces, que la producción de esteroides testiculares esté fundamentalmente determinada por las actividades enzimáticas totales, más que por la distribución celular específica de estas enzimas. Por otro lado la regulación de las actividades enzimáticas en los distintos tipos celulares podría ser distinta, y esto podría contribuir a un aporte cuantitativamente diferente de los distintos tipos celulares. En los últimos años ha recibido particular interés la distribución celular de la aromatasa testicular. El esclarecimiento de la localización celular de esta enzi-

ma responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos, podría contribuir a un mejor entendimiento del papel que ejercen distintas hormonas que están involucradas en el control de la producción de Estradiol testicular. El Estradiol puede inhibir la esteroidogénesis testicular y sería importante por lo tanto, saber si el Estradiol actúa como una señal intercelular para la interacción entre las células de Leydig y otras células tales como las de Sertoli, llevando consigo el mensaje para detener la producción de andrógenos.

Los experimentos realizados con células de Sertoli en cultivo (94, 95, 96), además de los realizados con fracción tubular testicular (90), parecerían indicar que las células de Sertoli constituyen la principal fuente testicular de estrógenos. Otros autores, sin embargo discrepan con estos resultados (97, 98). Recientemente se ha demostrado, que ésta actividad, es mucho menor en células de Sertoli de ratas mayores de 20 días (94), y que en animales adultos puede detectarse actividad aromatizante estimulable por trata-

miento con hCG "in vivo" (97, 99). Se concluye que la distribución subcelular de la aromatasa podría cambiar con la maduración testicular. Los efectos de la LH sobre la actividad de aromatasa testicular en fracciones subcelulares se ponen en evidencia luego de 2 ó 3 días de tratamiento con la gonadotrofina (97, 99), mientras que puede observarse un incremento en el contenido testicular de estrógenos luego de 30 minutos de la administración de LH (100). Luego de una hora de la administración in vivo de LH se observa un incremento en el nivel de estrógenos en el plasma venoso testicular (101) y en células de Leydig aisladas incubadas en presencia de  $^3\text{H}$ -Testosterona se observa producción de  $^3\text{H}$  Estradiol dentro de los primeros 30 minutos de incubación (99). La célula de Leydig parecería así ejercer un papel dominante en la biosíntesis de esteroides biológicamente importantes. Sin embargo no debe olvidarse que el testículo ejerce otra función importante que es la de producir espermatozoides y que estaría directamente relacionada con una esteroidogénesis normal.

## REGULACION HORMONAL DE LA FUNCION TESTICULAR

La regulación de la función endócrina testicular por mecanismos hormonales, depende de las acciones integradas de las hormonas hipofisarias (LH, FSH, prolactina, GH e insulina) y de los esteroides (estrógenos y andrógenos) sobre la célula de Leydig. En las siguientes líneas intentaré resumir las evidencias acumuladas en tal sentido.

## INHIBICION DE LA FUNCION DE LA CELULA DE LEYDIG POR DEFICIENCIA DE GONADOTROFINAS

La hipofisectomía de la rata adulta es seguida por una disminución en la población de receptores testiculares para LH (102, 103, 104, 16, 105, 106), lo que indica que la población de receptores testiculares debe ser restituida continuamente por factores que son dependientes de la glándula pituitaria. El efecto sobre los niveles de receptores parece depender de la edad del animal al que se le realiza la ablación, y esto podría explicar las diferencias obser-

vadas por varios laboratorios. En la rata adulta, esta pérdida de sitios receptores para LH se aproxima al 50 % (16, 102, 106), y Hsueh y col. (16) en experimentos de marcación de los receptores por inmunofluorescencia han sugerido que esta pérdida no es generalizada, sino debida a la desaparición de sitios receptores en una subpoblación de células de Leydig. Otro grupo de investigadores han por su parte sugerido que se debe a la primera posibilidad (103, 108). En cualquiera de los casos, parecería existir una población de receptores que escapa al control hipofisario, o que sería relativamente independiente de éste.

La producción de cAMP en células de Leydig, luego de la hipofisectomía, se encuentra aumentada con respecto a los controles (109). En todos los casos se ha observado que la producción de cAMP es mantenida mientras que la esteroidogénesis máxima así como los niveles de receptores para LH se encuentran disminuídos. Se ha sugerido que este fenómeno podría resultar de una eficiencia mayor de acoplamiento del receptor a la unidad catalítica de la adenilato

ciclase, o de una actividad de fosfodiesterasa disminuída. Esta última posibilidad parece tener confirmación experimental (105), y podría explicar la sensibilidad aumentada de la curva de dosis respuesta para cAMP observada en células de Leydig de animales hipofisectomizados. Los efectos principales de la hipofisectomía sobre la esteroidogénesis parecen encontrarse más allá de la producción del cAMP (109).

#### INHIBICION DE LA FUNCION DE LA CELULA DE LEYDIG POR ESTEROIDES.

Cuando se administran esteroides a animales intactos, la producción de andrógenos se ve disminuída. Este efecto ha sido atribuído a la acción de los esteroides sobre la hipófisis que causa inhibición en la secreción de gonadotrofinas y altera secundariamente el estado endocrino de las gonadas (110, 111, 112, 113). Este mecanismo es claramente un factor muy importante en la acción de los andrógenos y de los estrógenos sobre la secreción de Testosterona, pero la presencia de un receptor de Estradiol en la célula



de Leydig (114, 115) y las observaciones que demuestran disminución de la producción de Testosterona sin cambios asociados en los niveles plasmáticos de LH (116, 117, 118, 119) son compatibles con la idea de que los estrógenos pueden ejercer una acción inhibitoria directa sobre la función de la célula de Leydig (120, 121, 122); ya que el testículo puede producir a la vez que unir mediante receptores específicos tanto a andrógenos como estrógenos, es posible que ambos esteroides esten involucrados en algún tipo de regulación mutua.

Para estudiar la influencia de los estrógenos sobre la función testicular se ha utilizado un modelo que evita la complicación de tener un efecto inhibitorio de la secreción de gonadotrofinas por el estrógeno administrado. Este modelo experimental en el que se tiene un aporte estable y definido de gonadotrofinas, es la rata hipofisectomizada mantenida con FSH, en la que se ha demostrado que se mantiene la función testicular (123, 124, 125, 126). En este modelo se han estudiado los efectos locales de los estróge-

nos sobre la unión de gonadotrofinas a los receptores testiculares, la producción de cAMP y la formación de Testosterona (109) y se ha demostrado un efecto inhibitorio directo de los estrógenos en la función de la célula de Leydig. De acuerdo con estos estudios parecería haber un efecto bifásico de los estrógenos sobre la función testicular. A bajos niveles de esteroide existiría una disminución de la producción de Testosterona como consecuencia de una lesión en una etapa lejana a la activación del receptor, mientras que con altas dosis de estrógenos administrado habría un efecto inhibitorio adicional sobre la concentración de receptores de LH. La acción de los estrógenos sería de acuerdo a estos estudios ejercida sobre enzimas específicas de la biosíntesis de andrógenos. Por otro lado otros autores han demostrado que las actividades de la  $17\alpha$ -hidroxilasa y de la 17-20 desmolasa se encuentran disminuídas luego del tratamiento con estrógenos en: testículos de ratones normales y criptórquidos (127, 128, 129, 130).

Se han demostrado receptores citoplasmáticos de estró-

genos en células de Leydig y se ha probado que estos pueden translocarse a la fracción nuclear luego de formar un complejo con la molécula de Estradiol (115, 131). La existencia de tales receptores proveen un mecanismo posible a través del cual podría operar la acción directa del Estradiol en la regulación de la célula de Leydig. Como ya se ha mencionado, varios estudios han indicado que los estrógenos pueden ser sintetizados por células testiculares, De Jong y col. (90) sugirieron que el Estradiol era sintetizado en el tubo seminífero y que era principalmente acumulado en el tejido intersticial. Las células de Sertoli en cultivo sintetizan Estradiol en un proceso dependiente de FSH (132). Otro grupo de autores ha sugerido que es la célula de Leydig la responsable de la síntesis de estrógenos (133, 97, 90, 99). A pesar de que existe incertidumbre sobre el origen del estrógeno testicular, es claro que este esteroide puede jugar un papel importante en una regulación intratesticular de la función de la célula de Leydig.

En incubaciones in vitro con preparaciones de tejido

testicular se demuestra que varios esteroides pueden inhibir enzimas involucradas en la esteroidogénesis. Entre estos esteroides varios son producidos endógenamente en el testículo.

En la tabla B se muestran varios ejemplos de tales inhibiciones. La importancia fisiológica de tales observaciones in vitro no es clara aún (134), pero algunas correlaciones observadas entre los cambios en las actividades enzimáticas y los niveles de esteroides endógenos (135) podrían estar reflejando una relación causal.

La presencia de receptores de andrógenos en la célula de Leydig fue demostrada autoradiográficamente (147) y bioquímicamente (148) y sobre esta base se ha especulado que los andrógenos pueden ejercer un efecto sobre la función de la célula de Leydig. Recientemente Chen y col. (149) en un estudio preliminar muestran que bajo ciertas condiciones este influjo puede ser negativo. De los estudios de Purvis y col. (150) parecerían extraerse las mismas conclusiones. Existen dos explicaciones posibles para tal efecto inhibi-

TABLA B

ACTIVIDAD ENZIMATICA	ESTEROIDE	
Ruptura cadena lateral del colesterol	Pregnenolona	(136)
	Testosterona	(137)
$\Delta_5, 3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa	$7\alpha$ -hidroxiandrosteno- diona	(138, 139)
	$7\alpha$ -hidroxitestosterona	(138, 139)
	$17\beta$ estradiol	(140)
$17\alpha$ -hidroxilasa	$17\alpha$ -hidroxiprogesterona	(141)
	$17\beta$ estradiol	(142, 143)
$C_{17-20}$ -liasa	Progesterona	(145, 146)
	$17\alpha, 20\alpha$ -dihidroxi-4- pregnen-3-ona	(85)
	$17\beta$ estradiol	(129)
$17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa	Testosterona	(138)
	$7\alpha$ -hidroxiandrosteno- diona	(138, 139)
	$17\beta$ estradiol	(140)

torio de los andrógenos sobre la esteroidogénesis. Primeramente podría estar involucrada una retroalimentación directa sobre alguna de las enzimas claves de la esteroidogénesis, y en segundo lugar podría simplemente ser el reflejo de la conversión de Testosterona a estrógenos en la célula de Leydig, los cuales, entonces ejercerían el efecto inhibitorio. Contra esta última hipótesis estaría el hecho de que un andrógeno no aromatizable como la Dihidrotestosterona pueda ejercer un efecto inhibitorio (150). Por otro lado, altas concentraciones de andrógenos podrían causar la translocación nuclear de los receptores de estrógenos. La posibilidad de que los efectos androgénicos pueda también ser explicada por activación del receptor de estrógenos aún no puede ser descartada.

Si un bloqueo esteroidogénico puede ser mediado por andrógenos, es difícil creer que este involucre al receptor de andrógenos, ya que bajo condiciones normales los altos niveles intratesticulares de andrógenos saturarían todos los sitios para andrógenos disponibles a menos que exista com-

partamentalización de las acciones androgénicas. En el caso del receptor de estrógenos, sin embargo, implican que sólo una proporción relativamente pequeña de la población de receptores estaría ocupada. Este hecho combinado con la teoría de la compartamentalización en la célula de Leydig, implica que cambios extremadamente pequeños en la cantidad de estrógenos, pueden ejercer marcados efectos sobre la esteroidogénesis local.

#### REGULACION DE LA FUNCION TESTICULAR POR HORMONAS PROTEICAS

La función endócrina de la célula de Leydig es regulada por las acciones agudas y tróficas de la hormona luteinizante, y es modulada por los efectos sinérgicos de FSH, prolactina y hormona de crecimiento (GH). La forma en la cual la LH actúa sobre la célula de Leydig para estimular la biosíntesis de andrógenos ha sido ya analizada en la presente introducción, donde también se han comentado los conocimientos actuales sobre este proceso. Ya que la LH ejerce efectos regulatorios sobre la esteroidogénesis a la

vez que produce una acción trófica para mantener la función de la célula de Leydig, es importante distinguir estos dos procesos cuando se analizan los mecanismos por los cuales las gonadotrofinas controlan la producción de esteroides. De esta forma, algunos de los efectos de las gonadotrofinas sobre la producción de andrógenos, son para mantener los caminos enzimáticos de la esteroidogénesis en una célula de Leydig diferenciada; mientras que otros efectos se ejercen sobre procesos regulatorios agudos que estimulan la biosíntesis esteroidea y concluyen con una producción aumentada de Testosterona.

Se ha demostrado que la LH mantiene la función de la célula de Leydig en ratas hipofisectomizadas (102, 151), mientras que el tratamiento con LH o hCG es seguido por una disminución de los receptores de LH testiculares, reflejando la regulación negativa de estos sitios receptores que sigue a la elevación de los niveles de LH circulante. La habilidad de las hormonas peptídicas de regular la concentración de sus sitios receptores específicos, es un fenómeno que ha



sido reconocido y estudiado recientemente (152, 153, 154, 155, 156). Este fenómeno fue inicialmente interpretado como modulación antigénica de las inmunoglobulinas de superficie y más tarde como regulación homóloga de los receptores de hormonas peptídicas (157, 158). Tal regulación puede ser positiva o negativa, pero es mucho más frecuente observar la pérdida de sitios receptores, sin cambio en las propiedades de unión de los sitios receptores residuales.

Como se mencionó anteriormente, la administración de LH y hCG, produce una marcada disminución en el número de sitios receptores específicos en el testículo y en el ovario (159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168). En la mayoría de los tejidos, no han sido examinados en detalle las consecuencias sobre la función de la célula blanco que siguen a la pérdida de receptores inducida por la hormona, aunque en algunos trabajos ha podido ser establecida una correlación entre desensibilización de adenilato ciclasa y pérdida de sitios receptores (169, 170, 171, 172, 173, 162, 163).

El presente trabajo describe una serie de estudios realizados en tejido testicular y en células de Leydig purificadas donde se demuestra que existen consecuencias funcionales muy importantes como resultado de la regulación de receptores inducida por LH y hCG (165, 174, 109, 175, 100).

M A T E R I A L E S    Y    M E T O D O S

ANIMALES

Se utilizaron ratas macho adultas de 50 días de edad (200-250 g) que fueron obtenidas de Charles River Laboratories, Wilmington Mass. Estos animales corresponden a la cepa Sprague Dawley.

TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

Los animales fueron inyectados con hCG en forma endovenosa, vía la vena yugular externa. La hCG utilizada para la desensibilización fue Pregnyl de laboratorios Organon (3000 UI/mg) y se administró en dosis de 2, 10 y 100 UI en 100 ul de buffer PBS Dulbecco pH 7.4. Los animales controles recibieron vehículo solamente. Estas dosis fueron equivalentes a 0.2, 1 y 10 ug de hCG purificada con una actividad biológica de 10.000 UI/mg.

En algunos casos el tratamiento consistió en una única inyección subcutánea de 10 ug de hCG, en el mismo vehículo.

Para el tratamiento con LH-RH se utilizó LH-RH porcino que se adquirió de Beckman Instruments, Bioproducts Division. El tratamiento consistió en una única inyección subcutánea en dosis de 0.1, 1 y 10 ug del factor, disueltos en buffer PBS Dulbecco. Los animales controles recibieron vehículo. El antiestrógeno Tamoxifeno, fue administrado sólo o junto con la inyección endovenosa de hCG en una dosis de 1.5 ug. Cuando el tratamiento fue en conjunto con LH-RH, se realizó primero una inyección endovenosa de 1.5 ug de Tamoxifeno e inmediatamente la dosis correspondiente de LH-RH vía subcutánea. En todos los casos inmediatamente después de los tratamientos mencionados, se aplicó una inyección intramuscular de 1.5 ug de Tamoxifeno disuelto en 100 ul de buffer PBS Dulbecco.

Los animales fueron sacrificados por decapitación a diferentes tiempos. Los sueros se utilizaron para las determinaciones hormonales correspondientes. Se retiraron los testículos y se colocaron en hielo para su procesamiento inmediato.

## AISLAMIENTO DE CELULAS DE LEYDIG POR TRATAMIENTO CON COLAGENASA

Se utilizó la técnica descrita por Mendelson y col. (36), utilizando colagenasa para la dispersión del tejido testicular.

Los testículos decapsulados, colocados en tubos plásticos (seis testículos por tubo) fueron suspendidos en Medio 199 (Difco Co.) conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1 %, en la relación 1 testículo por ml de medio, conteniendo 0.3 mg de colagenasa/ml.

La incubación se realizó a 34°C, durante 15-20 minutos en un incubador Dubnoff, bajo atmósfera de carbógeno (O<sub>2</sub>: 95 %, CO<sub>2</sub>: 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 suspendió en Medio 199- 0.1 % BSA, en la relación de 6 testículos por 2 ml. Las células de Leydig así obtenidas, fueron purificadas por centrifugación en un gradiente de densidad de Metrizamida (Accurate Chemical), según la técnica descripta por Conn y col. (176).

Los gradientes lineales de 40 ml. se prepararon a partir de una solución al 80 % de Metrizamida en Medio 199- 0.1 % BSA con una bomba peristáltica.

Sobre estos gradientes se sembraron 2 ml de la preparación celular obtenida con colagenasa, que contenía aproximadamente  $10^8$  células. Se centrifugó el gradiente durante 5 minutos a 3300 x g. Se tomó la banda celular correspondiente a las células de Leydig (la tercera desde arriba localizada inmediatamente encima de la banda correspondien-

te a los glóbulos rojos).

Se mezcló esta suspensión celular con 30 ml de medio 199- 0.1 % BSA fresco y se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en una proporción equivalente a 3 ml por testículo, que correspondía a  $2 \times 10^6$  células de Leydig purificadas (90-95 % de pureza).

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.

#### OBTENCION DE GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA RADIOACTIVA

Para preparaciones óptimas de la hormona marcada, 6 ug de hCG (10.000 UI/mg, CR117, proporcionada por el Dr. Canfield, Columbia University, New York) fueron marcadas con 500 uCi de  $^{125}\text{I}$ , por una modificación de la técnica de Thorell y Johansson (177) según se detalla a continuación:

- 1) hCG; 6 ug en 10 ul  $\text{Na}_2\text{HPO}_2$  0.05 M, pH 7.4.
- 2) Buffer Acetato de Sodio 0.4 M, pH 5.6 (10 ul).
- 3)  $^{125}\text{I}$ , libre de portador, en NaOH 0.1N, 500 uCi (6 ul).
- 4) Lactoperoxidasa bovina (Calbiochem, grado B, Cat No 427466) 2.7 mg/ml en buffer Acetato de Sodio 0.1 N (4 ul).
- 5)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (300 volúmenes, diluída 1:20.000)(4 ul).

Después de agitar vigorosamente durante 2 minutos, la mezcla de iodinación fue diluída 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  $-70^\circ\text{C}$  para su posterior repurificación, antes de su utilización.

Cada alícuota, aproximadamente de 0,2 ml, fue purificada por columna de Sepharosa-Concanavalina A o 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.



#### PREPARACION DE SEPHAROSA-CONCAVALINA A

La concanavalina A fue unida a Sepharosa (178-179) 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 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 NaHCO<sub>3</sub> 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  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M.

La eficiencia del acoplamiento se determinó por comparación de la adsorción 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 CONCANAVALINA 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 gonadotrofina marcada.

Mediante este método, dichas hormonas son específicamente adsorbidas a Sepharosa-Concanavalina A y luego eluf-

das con soluciones de  $\alpha$ -metilglucósido o  $\alpha$ -metilmanósido. La selectividad de este procedimiento por la porción de hidratos de carbono de la molécula marcada, contrasta enormemente con el método de adsorción en celulosa, donde el componente proteico es el que desempeña el papel principal.

Para la purificación de  $^{125}\text{I}$ -hCG, la mezcla de iodación fue transferida a una columna de Sepharosa-Concanavulina 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  $\alpha$ -metilglucósido 0,2 M.

Las propiedades físicas de la  $^{125}\text{I}$ -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 radioinmunoensayo (180). Es de hacer notar que, marcaciones de hCG con el método de la lactoperoxidasa (177), 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 (181-182) y la producción de Testosterona por testículos aislados (15).

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

#### DETERMINACION DEL NUMERO DE SITIOS RECEPTORES PARA LH/hCG

La interacción entre la hCG y su receptor, se estudió sobre la base de la unión de la hormona radioactiva agregada en cantidad variable, a componentes particulados de testículos de ratas adultas, o a células intersticiales aisladas. La unión inespecífica fue evaluada agregando una cantidad 1000 veces superior de hormona no radioactiva.

## ESTUDIOS DE UNION DE hCG EN HOMOGENATOS TESTICULARES

Los testículos decapsulados fueron homogeneizados en buffer PBS Dulbecco pH 7.4 (1 ml/testículo) en un homogeneizador del tipo Polytron. Al homogenato se lo filtró por Nitex (malla de poro 50) y se lo centrifugó a 20.000 x g por 15 minutos. El precipitado resultante fue resuspendido en 40 ml de buffer y centrifugado nuevamente. El precipitado así obtenido se pesó y se dispersó a una concentración final de 100 a 200 mg/ml en buffer PBS Dulbecco, siendo esta preparación la fuente de receptor para LH/hCG.

Los receptores fueron determinados incubando diluciones seriadas del homogenato con una concentración saturante de la hormona marcada empleando el método de radioiodinación enzimática descripto previamente.

Los siguientes reactivos se agregaron a tubos de ensayo de vidrio (12 x 75 mm): 100 ul de buffer fosfato salino conteniendo albúmina sérica bovina al 0.1 % con o sin el agregado de 100 UI de hCG; 50 ul de  $^{125}\text{I}$  hCG (200.000 cpm, 5-10 ng) en buffer fosfato salino con BSA al 0.1 % y 100 ul

del homogenato testicular. Se incubaron tres diluciones seriadas 1:1 del homogenato por triplicado a temperatura ambiente durante 16 a 18 h. Una vez finalizada la incubación se diluyó con 3 ml de buffer frío y se centrifugó a 1500 x g por 15 minutos. El material que sedimentó se lavó una vez, y la radioactividad unida al tejido se determinó en un contador gamma automático.

La radioactividad específicamente unida, fue convertida a nanogramos de hormona unida por testículo, utilizando para el cálculo la actividad específica y la actividad de unión máxima de cada preparación de hormona (183).

#### DETERMINACION DE hCG UNIDA A TEJIDO

La permanencia de hCG unida al receptor como consecuencia del tratamiento, fue determinada luego de calentar alícuotas del homogenato testicular a 65°C durante 15 minutos. Entre el 80 % y el 85 % de la hormona unida al tejido puede ser recuperada por este método. La hormona liberada al sobrenadante luego del calentamiento fue medida por radioinmunoensayo específico.

## UNION DE $^{125}\text{I}$ hCG A CELULAS INTERSTICIALES TESTICULARES

Para estudiar la unión de la hormona marcada a su receptor en preparaciones de células de Leydig purificadas, se procedió según el siguiente esquema: alícuotas de 1 ml ( $10^6$  células) de la suspensión de células de Leydig fueron incubadas con 0.1 ml de hCG marcada (100,000 dpm, equivalente a 4 - 5 ng) en presencia de concentraciones crecientes de hCG no marcada (hasta 100 ng) por 3 horas a  $34^\circ\text{C}$ , o a temperatura ambiente por 16 horas. Estas condiciones son adecuadas para alcanzar el equilibrio de la reacción de unión. La unión no específica de la  $^{125}\text{I}$ -hCG, fue determinada incubando en tubos controles con un exceso de hormona no marcada (100 UI). Finalizado el período de incubación, se agregaron a todos los tubos 2ml de buffer PBS-Dulbecco frío y se centrifugaron a  $1500 \times g$  por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Los sobrenadantes se descartaron por aspiración. El precipitado celular remanente fue resuspendido en 3 ml del mismo buffer frío, y los tubos fueron centrifugados nuevamente en las mismas condiciones. Luego de aspirar y descartar este segundo sobrenadante, la radioactividad unida a las células

fue evaluada en un contador automático gamma.

#### ESTUDIOS DE UNION DE $^{125}\text{I}$ -hCG A RECEPTORES SOLUBLES

Los receptores de gonadotrofinas de testículos de animales controles o tratados con hCG fueron solubilizados por tratamiento con Triton X-100 del precipitado que resulta de la centrifugación diferencial de células de Leydig fragmentadas, entre 120 y 27000 x g según la técnica descrita previamente (184-185).

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 (186).

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.

Se tomaron alícuotas de la preparación del receptor soluble que fueron equilibradas con  $^{125}\text{I}$ -hCG por 16 hs a 4°C. El complejo de unión fue precipitado con polietilenglicol según una técnica ya descripta(186-187) y la radioactividad en el precipitado fue analizada en un contador gamma automático.

## 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. (20).

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 sonicada 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,  $2 \times 10^6$  cpm de AMP cíclico- $^3\text{H}$  (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, MIX 0.1 mM y, para calcular la unión inespecífica, AMP cíclico  $10^{-6}$  M en el mismo buffer.

La incubación se efectuó a 0°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 Scatchard (188), se utilizaron cantidades variables de AMP cíclico-<sup>3</sup>H.

#### INCUBACION DE LAS CELULAS DE LEYDIG PURIFICADAS

Se incubaron alícuotas de 1 ml de células de Leydig purificadas ( $1 \times 10^6$  células/ml) en viales para contador de centelleo líquido (20 ml), plásticos (Packard) en presencia de 1-metil-3-isobutil-xantina (MIX) 0.125 mM.

El agregado de hCG, toxina colérica (CT) o dibutiril

adenosina 3'-5' monofosfato cíclico ( $Bt_2cAMP$ ) se hizo en alícuotas de 100 ul en Medio 199-BSA 0.1 %, a tres de los 6 viales de muestra. Todas las incubaciones se hicieron a 34°C durante 3 horas en un incubador Dubnoff bajo una atmósfera de carbógeno.

Para poder medir la producción de 3-ol-5-Pregnen-20-ona (Pregnenolona) de células de Leydig normales y de animales desensibilizados se estudió el efecto de dos inhibidores, cianocetona (Winthrop Laboratories, N° 19.578) y espironolactona (Sigma). En los experimentos subsiguientes, los dos inhibidores se usaron juntos a la concentración óptima ( $10^{-6}$  M para la cianocetona y  $10^{-5}$  M para la espironolactona) en aquellos casos en que se quiso estudiar la producción de Pregnenolona. 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, se incubó por un período de 15' con los inhibidores antes de agregar hCG,  $Bt_2cAMP$  o toxina colérica. Las células, fueron al igual que antes incubadas por 3 hs a 34°C bajo carbógeno y con agitación a

100 ciclos/min. Luego de 180 minutos de incubación o a intervalos seleccionados, se detuvo la incubación transfiriendo los viales a un baño con hielo.

Las células más el medio de incubación, se transfirieron a tubos de polietileno (12 x 75 mm) y se centrifugaron a 260 x g por 15' a 4°C. El sobrenadante se guardó a -20°C para la determinación de Testosterona, Progesterona, Pregnenolona, 17 $\alpha$ hidroxiprogesterona, 17 $\alpha$ hidroxipregnenolona, Dehidroepiandrosterona; Androstenodiona y  $\Delta_5$  Androstenodiol.

Los inhibidores de síntesis proteica cicloheximida y actinomicina D, ambos suministrados por Sigma, se incluyeron en la incubación en alícuotas de 100 ul en Medio 199, 0.1 % BSA. El resto del procedimiento fue como se indicó anteriormente.

Para determinar el cAMP total una alícuota de 450 ul de células más medio de incubación, fueron agregadas a tubos de vidrio que contenían 50 ul de teofilina 10 mM. Inmediatamente estos tubos fueron colocados en un baño a ebullición por 10' y se guardaron luego congelados hasta su análisis. Los restantes 550 ul de células y medio fueron

centrifugados y el sobrenadante guardado congelado para la determinación de Testosterona u otros esteroides.

#### RADIOINMUNOENSAYO DE ESTEROIDES

El radioinmunoensayo de Testosterona fue realizado según la técnica descrita por Dufau y col (189). El antisue- ro fue producido en conejos inmunizando con un conjugado Testosterona-albúmina sérica bovina, preparado por acopla- miento de la carboxi-metil-oxima de la Testosterona en po- sición 3, a la albúmina. El ensayo se realizó en tubos de vidrio de 12 x 75 mm a 4°C durante 16 hs.

Las alícuotas deseadas de muestras se llevaron a 250 ul con buffer PBS-Dulbecco. Los standards de Testosterona se agregaron en cantidades de 10 a 20.000 pg, en alícuotas de 250 ul en el mismo buffer. Se agregó luego 0.5 ml del trazador (30.000 - 40.000 dpm) en el mismo diluyente a to- dos los tubos. Luego de incubar por 16 hs. a 4°C, se agre- garon 0.2 ml de una suspensión de carbón 0.25 %, dextran 0.025 % y se mezcló cada tubo con un vortex por 2 seg. Los tubos se mantuvieron a 4°C por 30 min y entonces se centrifu-

garon a 1200 g por 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron en viales de vidrio, se agregó 1 ml de dioxano y 10 ml de solución de centelleo. La radioactividad presente en cada tubo se determinó en un contador de centelleo líquido.

El radioinmunoensayo de Pregnenolona fue realizado según la técnica descrita por Di Pietro y col. (190) con un antisuero producido en conejos contra el conjugado al 3-hemi-succinato de la Pregnenolona. El radioinmunoensayo de la Progesterona se realizó según el procedimiento descrito por Abraham y col. (191).

Los radioinmunoensayos de Dehidroepiandrosterona, 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteroa y Androstenediona, se realizaron con anticuerpos altamente específicos como describieron Nieschlag, D.L. y col. (192). Para los radioinmunoensayos de Dehidroepiandrosterona y 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, los antisueros fueron producidos contra conjugados de BSA a 3-hemisuccinatos de ambos esteroides. Para Androstenediona y 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteroa, los antisueros fueron producidos por inmunización con los derivados 6 $\beta$ -OL-hemisuccinato y 3-carboxi-metil-oxima, respectivamente.

El radioinmunoensayo para  $17\beta$ -Estradiol se realizó según una técnica descrita por Wu y Lundy (193) usando un antisuero altamente específico producido en conejos contra un derivado conjugado a la albúmina del 6-cetoestradiol.

Las reacciones cruzadas de todos estos anticuerpos se muestran en tabla C.

El porcentaje de reacción cruzada para cada uno de los esteroides probados fue calculado como: la relación entre la masa de esteroide necesaria para producir un desplazamiento del 50 % en la curva, con respecto a la masa de esteroide en estudio, necesario para producir el mismo desplazamiento.

#### PREPARACION PREVIA DE LAS MUESTRAS PARA EL RADIOINMUNOENSAYO

Para las determinaciones de esteroides en medios de incubación, este último fue directamente diluído 1:10 o 1:25 en buffer fosfato salino, pH 7.4 e introducido directamente en el ensayo cuando la especificidad del anticuerpo lo permitía (194).



TABLA C . REACCIONES CRUZADAS DE UNA VARIEDAD DE ESTEROIDES CON LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS

Anticuerpo anti- $\Delta_4$ Androstenodiona	Anticuerpo anti- 17 $\alpha$ OH-Pregnenolona	Anticuerpo anti- 17 $\alpha$ OH-Progesterona
$\Delta_4$ Androstenodiona 100.00 %	17 $\alpha$ OH-Pregnenolona 100.00 %	17 $\alpha$ OH-Progesterona 100.00 %
DHA 3.50 %	17 $\alpha$ OH-Progesterona 27.50 %	Progesterona 14.30 %
Testosterona 1.00 %	Pregnenolona 1.00 %	5 $\beta$ Androstan3,20diol 2.20 %
Progesterona 0.08 %	Testosterona < 1.00 %	5 $\alpha$ Androstan3,20diol 1.70 %
11 Desoxicortisol 0.07 %	$\Delta_4$ Androstenodiona < 1.00 %	17 $\beta$ -Estradiol < 0.10 %
Pregnenolona 0.06 %	$\Delta_5$ Androstenodiol < 1.00 %	Cortisol < 0.10 %
17 $\alpha$ OH-Progesterona 0.02 %	Progesterona < 1.00 %	Testosterona < 0.10 %
Estrona < 0.01 %		20 $\alpha$ -OHProgesterona < 0.10 %
$\Delta_4$ Androstenodiol < 0.01 %		6 $\beta$ -OHProgesterona < 0.10 %
Cortisol < 0.01 %		
Estradiol < 0.01 %		
17 $\alpha$ -OHPregnenolona < 0.01 %		

Anticuerpo anti- Dehidroepiandrosterona (DHA)	Anticuerpo anti- Progesterona	Anticuerpo anti- Testosterona
DHA 100.00 %	Progesterona 100.00 %	Testosterona 100.00 %
DHA-sulfato 71.40 %	6 $\beta$ OH-Progesterona 0.62 %	Androstenodiona 47.50 %
$\Delta_4$ -Androstenodiona 1.70 %	Testosterona 0.40 %	$\Delta_5$ -Androstenodiol 34.50 %
$\Delta_5$ -Androstenodiol < 0.50 %	17 $\alpha$ -OHProgesterona 0.18 %	Androstanodiona 6.50 %
Progesterona < 0.50 %	20 $\alpha$ -OHProgesterona 0.61 %	DHA < 3.00 %
Pregnenolona < 0.50 %	Cortisona 0.03 %	Anticuerpo anti- Pregnenolona
17 $\alpha$ -OHProgesterona < 0.50 %	Cortisol < 0.02 %	Pregnenolona 100.00 %
Testosterona < 0.50 %	Aldosterona < 0.02 %	Progesterona 3.00 %
Colesterol < 0.50 %	Dihidrottestosterona < 0.02 %	17OH-Pregnenolona 3.00 %
Estradiol < 0.50 %	$\Delta_5$ -Androsteno3 $\beta$ 17diol < 0.02 %	21-OH-Pregnenolona 2.00 %
Cortisol < 0.50 %	5 $\alpha$ -Androstano3 $\alpha$ ol-17one < 0.02 %	11- $\beta$ OHProgesterona 0.50 %
Anticuerpo anti- 17 $\beta$ Estradiol		Dehidroepiandros- terona 0.3 %
17 $\beta$ Estradiol 100.00 %		17 $\alpha$ OHProgesterona < 0.3 %
Estrona 0.83 %		Testosterona < 0.3 %
Estriol 0.67 %		Dihidrottestosterona < 0.3 %
16-Cetoestradiol 1.80 %		Estradiol < 0.3 %
16-Epiestriol 3.80 %		
Estradiol 3-glucurónido 0.69 %		
Estradiol 17-glucurónido 0.09 %		

Para determinar la cantidad de esteroide presente en el suero de animales tratados o controles, se realizó una extracción con eter etílico de este material biológico, agregando previamente una pequeña cantidad de esteroide tritiado, que permitió luego corregir por las pérdidas ocurridas durante el procedimiento de extracción.

Para determinar el contenido tisular de esteroides, se realizó un homogenato de los testículos decapsulados (2 ml PBS/testículo). Luego de agregar esteroide tritiado para poder descontar pérdidas ocurridas durante el fraccionamiento, se extrajo dos veces con eter etílico. Una alícuota adecuada de este extracto fue introducido en el radioinmunoensayo.

En los casos en que se realizó un procedimiento de extracción se introdujeron en el ensayo los blancos correspondientes. También se realizaron pruebas de paralelismo para asegurarse que estaban ausentes interferencias inespecíficas.

En el ensayo de  $17\alpha$ hidroxipregnenolona, la  $17$ hidroxiprogesterona mostró una reacción cruzada importante (27.5 %), to-

dos los otros esteroides probados fueron débilmente inactivo-activos. La separación de los esteroides  $17\alpha$ -hidroxilados se realizó mediante cromatografía en placa delgada de alúmina utilizando como solvente de desarrollo acetato de etilo, en dos corridas sucesivas. Los RF encontrados para la  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona y  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona, fueron respectivamente 0.5 y 0.25.

El anticuerpo contra la  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona tenía reactividad cruzada importante con la Progesterona (14 %), por lo tanto se procedió a separar estos dos esteroides. Los extractos de las muestras fueron sembrados en placa delgada de alúmina y desarrollados dos veces consecutivas en el sistema de solventes cloroformo:eter, 80:20. (RF para  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona igual a 0.25 y para Progesterona 0.72).

Cuando los esteroides debieron ser purificados antes del ensayo, una alícuota apropiada del medio de incubación fue extraída con acetato de etilo luego que se hubo agregado un indicador interno tritiado para corregir por pérdidas ocurridas durante la purificación.

Para medir el  $\Delta_5$ -Androstenodiol se empleó el mismo

anticuerpo que para la Testosterona que tiene una reacción cruzada del 35 % con este esteroide y que presenta curvas de desplazamiento paralelas cuando se usa Testosterona como trazador en el ensayo. El medio de incubación fue extraído como se describió anteriormente, el extracto fue sembrado en placas de alúmina y estas fueron corridas dos veces con acetato de etilo. Se realizó radioinmunoensayo sobre los eluidos de cada centímetro de la placa, que mostró que la inmunoreactividad era coincidente con el standard de Testosterona (Rf 0.37) o  $\Delta_5$ -Androstenediol (Rf 0.16), o ambos de acuerdo a las condiciones de incubación empleadas.

Los extractos testiculares donde se midió  $17\beta$  estradiol fueron purificados a través de una columna cromatográfica de Sephadex- LH 20.

#### DETERMINACION DE hCG SERICA

La concentración de hCG presente en suero de animales tratados, fue medida por un procedimiento específico empleando anti-hCG como primer anticuerpo.

Este anticuerpo permite medir específicamente hCG en

presencia de LH. La técnica utilizada fue la descrita por Vaitukaitis, J.L. y col. (195).

#### DETERMINACION DE LH SERICA

La LH sérica fue determinada por una técnica de doble anticuerpo, empleando como trazador  $^{125}\text{I}$ -rLH y antisuero contra rLH (s - 4), el standard usado fue rLH (RP - 1), estos materiales fueron provistos por el Centro de distribución de hormonas pituitarias del NIAMDD. Todos los valores de LH sérico fueron medidos en duplicado, a dos concentraciones de suero, para asegurar el paralelismo con la curva de ensayo.

#### DETERMINACION DE cAMP

El cAMP fue medido por radioinmunoensayo en alícuotas de la suspensión celular después de la inmersión en un baño a ebullición durante 10 minutos y luego de centrifugar a 1400 x g por 10 min. Este nucleótido cíclico fue ensayado según una modificación del método de Steiner y col. (196)

con la incorporación de la etapa de acetilación descrita por Harper y Brookr (197). Este procedimiento aumentó la sensibilidad del ensayo en aproximadamente 50 veces, reduciendo los niveles de detección a unos pocos femtomoles de cAMP. La etapa de acetilación también aumentó la especificidad del ensayo a bajas concentraciones de cAMP.

## R E S U L T A D O S

### EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE hCG SOBRE LOS RECEPTORES PARA HORMONA LUTEINIZANTE

En los estudios de unión de  $^{125}\text{I}$ -hCG a las células de Leydig preparadas a partir de animales controles y desensibilizados, se demostró que el fenómeno de pérdida de los sitios receptores era un proceso que dependía: del tiempo transcurrido luego de la administración de la gonadotrofina y de la dosis inyectada de esta última. Los resultados se muestran en la figura 1.

La dosis más baja de hCG empleada (100 ng) no tuvo un efecto significativo sobre la concentración de receptores. Observando solamente una ligera caída al quinto día, luego del tratamiento y una ligera elevación, por encima de los niveles del control al sexto día.

Cuando se administraron 200 ng de hCG, se produjo una disminución en el número de sitios receptores del 30 % al segundo día del tratamiento. Dos días más tarde, o sea

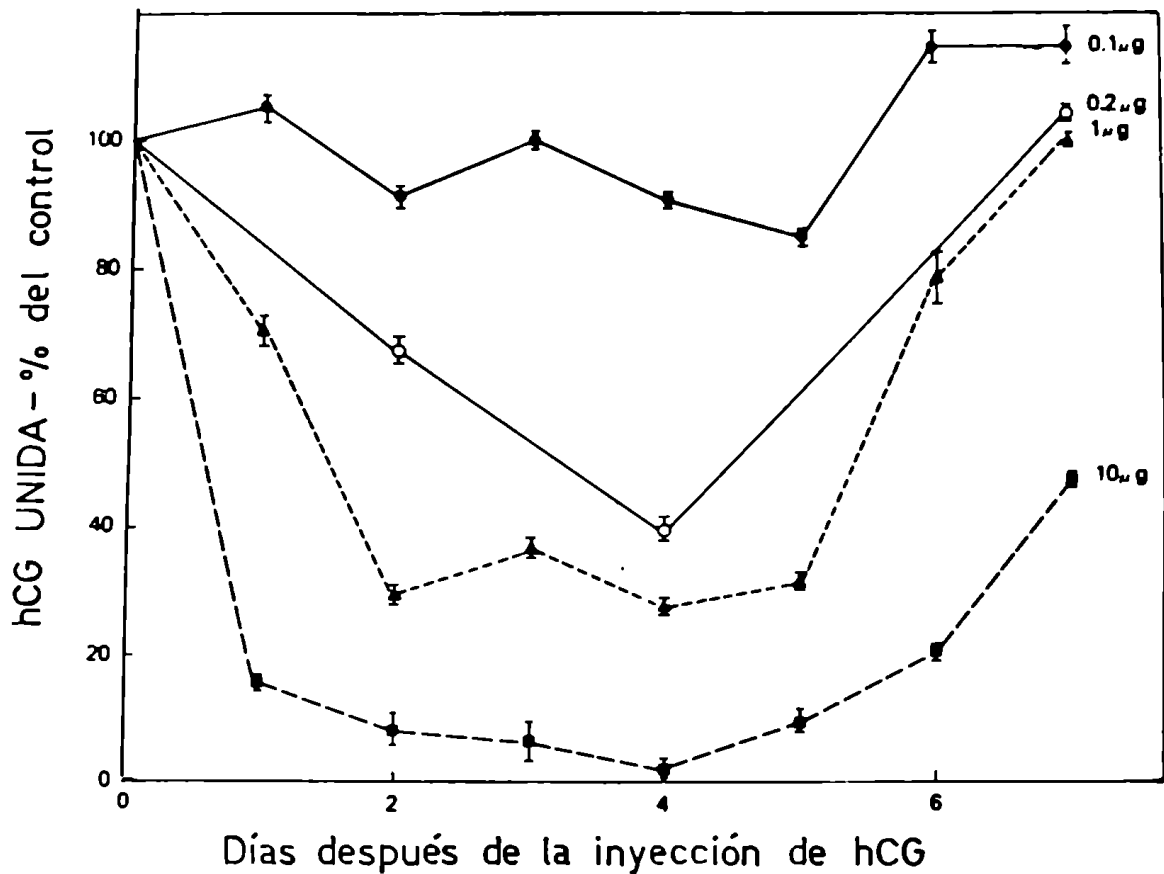


Fig. 1: Curvas de tiempo para la pérdida de sitios receptores de LH, en células de Leydig de animales tratados con distintas dosis de hCG (0.1 ug  $\bullet$ — $\bullet$ , 0.2 ug  $\square$ — $\square$ , 1 ug  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$  y 10 ug  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ). Cada punto representa el valor medio  $\pm$  DS de 4 determinaciones.



cuatro días luego de la administración de una dosis única de hCG en forma endovenosa (200 ng), se observó una reducción aún mayor (60 %). Este efecto fue seguido por una recuperación total a valores controles, al séptimo día.

Después del tratamiento con 1 ug de hCG, los sitios receptores disminuyeron un 30 % a las 24 horas, un 70 % a las 48 horas y permanecieron bajos durante 4 días. El número de sitios receptores se recuperó significativamente en el sexto día alcanzando un valor del 80 % del control y se restableció totalmente al séptimo día.

Con un tratamiento de 10 ug de hCG, los sitios receptores disponibles, cayeron rápidamente a niveles muy bajos, siendo casi indetectables por varios días y empezando a recuperarse en el quinto día. Sin embargo, el restablecimiento a valores controles de los sitios receptores, sólo se produjo 14 días luego del tratamiento, como se ve en la fig. 2.

Un experimento en paralelo para determinar la capacidad de unión de LH/hCG en células de Leydig homogeneizadas de animales controles y tratados dió un perfil similar al

observado con las células intactas.

CONCENTRACION DE SITIOS RECEPTORES PARA LH/hCG Y DETERMINACION DE LA hCG UNIDA AL TEJIDO LUEGO DE UNA UNICA INYECCION DE 10 ug DE hCG.

Luego de la administración de 0.1 a 1 ug de hCG, no se detectó hCG unida al tejido al segundo día de tratamiento, cuando el número de sitios receptores había caído a valores del 30 % del valor control. En contraposición a estos resultados, se observó una considerable ocupación de los sitios receptores, con saturación casi completa a las 24 hs del tratamiento con 10 ug de hCG. Luego de esta alta dosis la ocupación de sitios receptores era todavía significativa a los dos días (cerca del 25 % del número total de sitios receptores para LH).

La hCG unida al tejido disminuyó en los días subsiguientes, pero fue todavía detectable 10 días después del tratamiento (Fig. 2). La desaparición temprana de sitios receptores disponibles para LH/hCG puede ser atribuída a

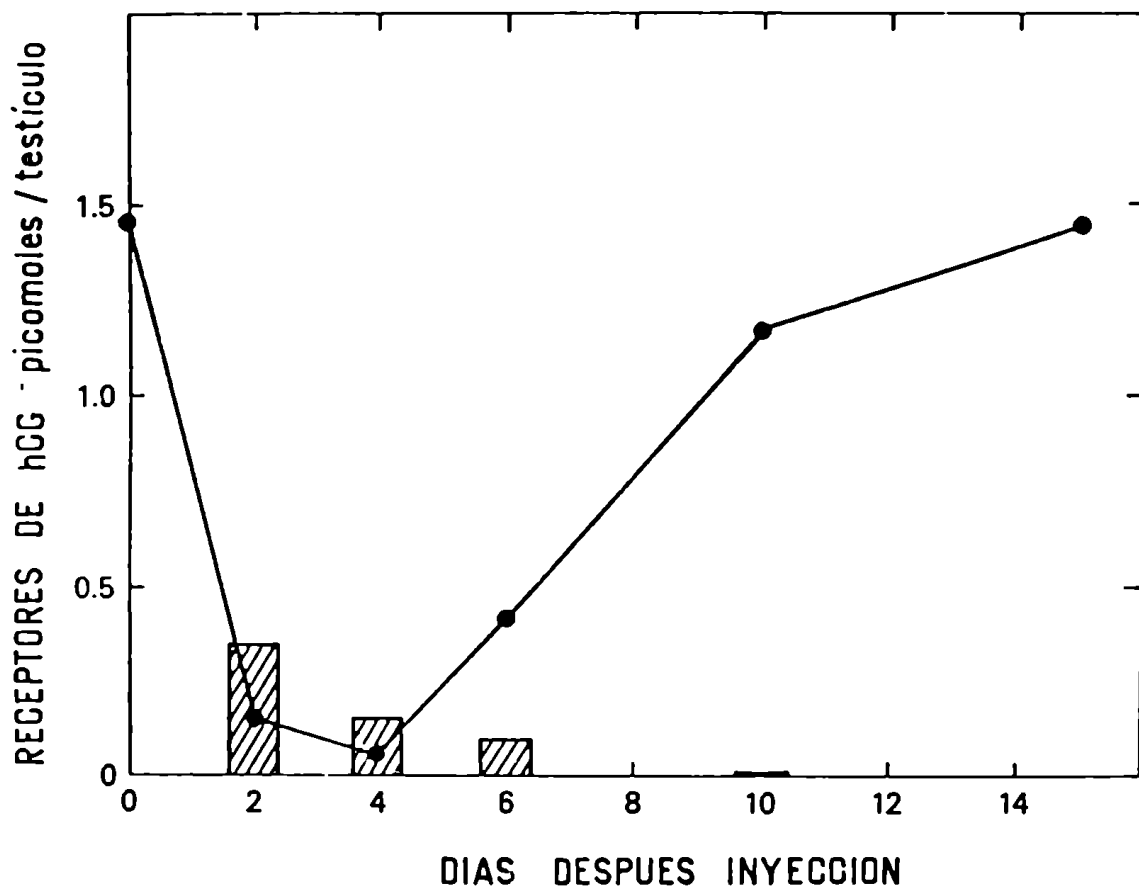


Fig. 2: Cambios en la concentración testicular de receptores libres (•—•) y de receptores unidos a hCG (barras), luego del tratamiento con 10 ug de hCG. Cada punto representa el valor medio de 3 determinaciones.

ocupación de los sitios receptores por la hCG administrada, cuando se utiliza esta dosis de gonadotrofina (10 ug). Cuando se estudió la subsiguiente pérdida de sitios receptores, se vió que la recuperación era muy lenta, no alcanzándose los valores controles hasta el decimocuarto día luego del tratamiento desensibilizante.

#### CURVAS DE SATURACION DE LOS SITIOS RECEPTORES PARA LH/hCG. ANALISIS DE SCATCHARD

Se realizaron estudios comparativos, para evaluar la pérdida de sitios receptores para LH/hCG en células de Leydig intactas (Fig. 3) y solubilizadas (Fig. 4), provenientes de animales controles y tratados con distintas dosis de hCG, sacrificadas tres días luego de recibir la dosis desensibilizante.

El análisis de Scatchard de estudios de unión en el equilibrio dió en todos los casos gráficos lineales, indicando la presencia de una sola clase de sitios de unión.

Se observaron cambios en el número de sitios receptores

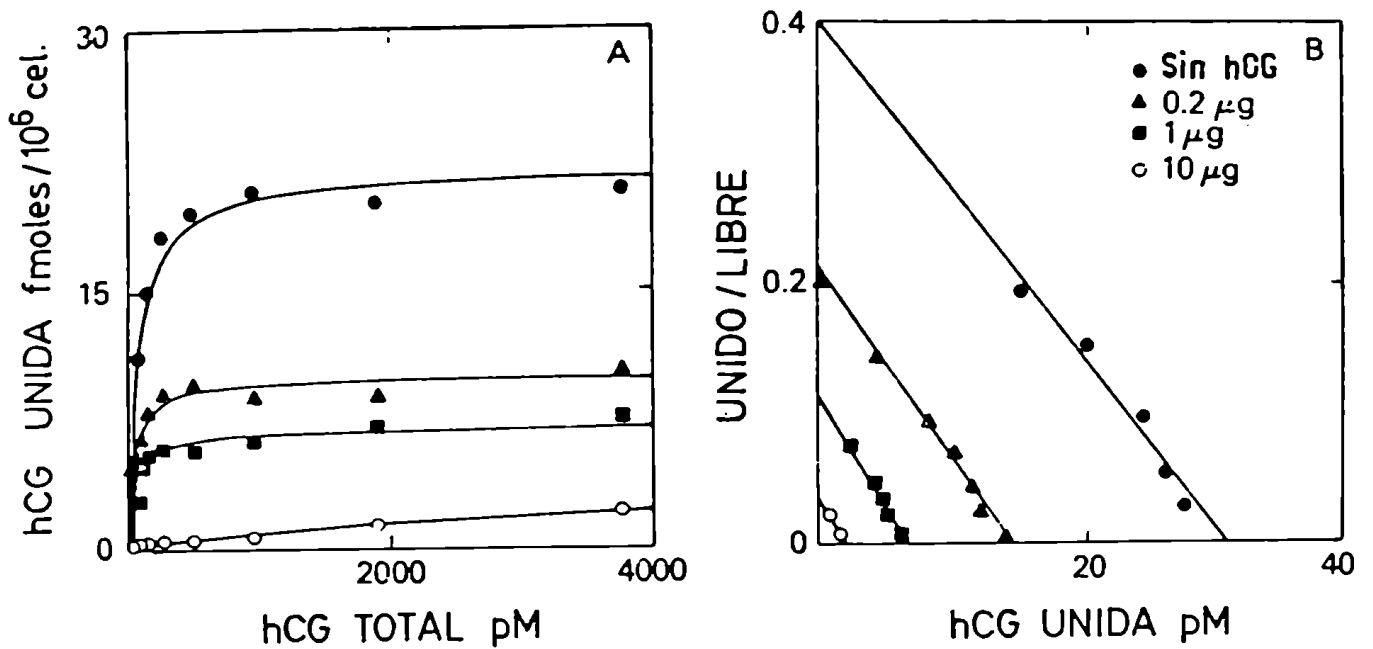


Fig. 3: Análisis de saturación (A) y gráfico de Scatchard (B), para el número de sitios receptores de LH en células de Leydig obtenidas a partir de: animales controles (●), e inyectados con 0.2 (▲), 1 (■) y 10 (○) ug de hCG, 3 días antes del sacrificio.

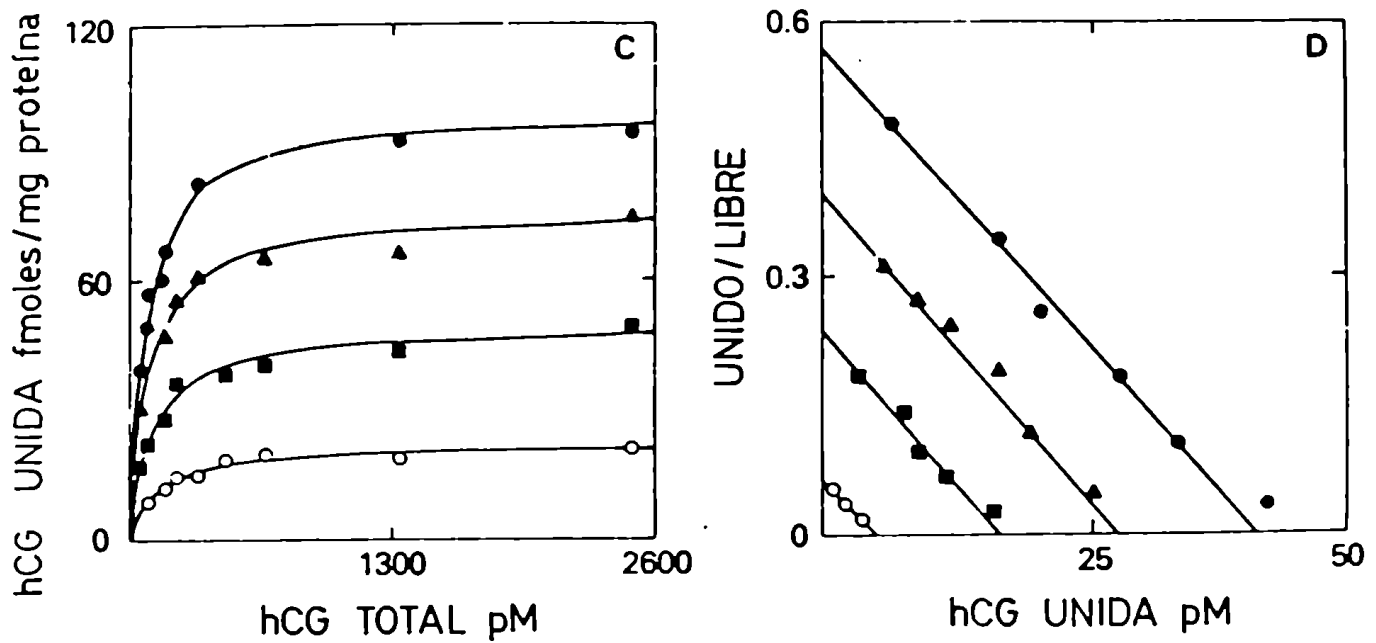


Fig. 4: Análisis de saturación (c) y gráfico de Scatchard (D), para el número de sitios receptores de LH, en células de Leydig solubilizadas por tratamiento con Triton x 100, obtenidas a partir de: animales controles (●), e inyectados con 0.2 (▲), 1 (■) y 10 (○) ug, 3 días antes del sacrificio.

durante la desensibilización. La disminución en el número de sitios receptores para LH/hCG en células y extractos celulares no estuvo acompañado de un cambio en la afinidad de unión de LH/hCG con respecto al valor control de  $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ .

Tanto en las células intactas como en las solubilizadas, se observó una disminución de los sitios receptores que fue dependiente de la dosis administrada tres días antes, pero la reducción fue significativamente menos marcada en los receptores solubilizados, sugiriendo que los sitios receptores fueron ocluidos o internalizados en la membrana plasmática durante el proceso de desensibilización.

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos para la concentración de sitios receptores hallados por análisis de Scatchard en ambas situaciones experimentales.

TABLA I

CONCENTRACION DE RECEPTORES DE LH EN CELULAS DE LEYDIG INTACTAS Y EN EXTRACTOS CELULARES SOLUBILIZADOS

Preparación	Células de Leydig sitios de unión/célula	Receptores solubles fmol/mg proteína
Control	13.000 $\pm$ 312 (100) <sup>a</sup>	98 $\pm$ 4.9 (100)
hCG		
0.2 ug	6.500 $\pm$ 200 (48)	83 $\pm$ 6.8 (85)
1 ug	4.200 $\pm$ 163 (31)	51 $\pm$ 9.0 (52)
10 ug	930 $\pm$ 133 (6.8)	24 $\pm$ 7.0 (24)

a. Por ciento del control

Valor medio (n = 3)  $\pm$  DS



ESTUDIOS "IN VITRO" DE LA RESPUESTA GONADOTROFICA DE LAS CELULAS DESENSIBILIZADAS.

En las figuras 5 y 6 se muestran respectivamente las curvas de dosis respuesta para Testosterona y cAMP que se obtienen cuando se estimula "in vitro" a una célula de Leydig con dosis crecientes de hCG. Observando ambas figuras puede verse la discrepancia entre las dosis de hCG necesarias para producir una respuesta máxima de Testosterona y cAMP y que como se mencionó en la introducción hizo dudar por mucho tiempo del papel del cAMP como segundo mensajero de la acción hormonal.

El fenómeno de desensibilización inducido por tratamiento con gonadotrofinas "in vivo", se ha limitado en su descripción a lo que ocurre a nivel del receptor de LH/hCG. Nuestro interés se centró entonces en las alteraciones bioquímicas que ocurren probablemente como consecuencia de esta primera interacción de la hormona con su receptor.

En la fig. 7 se muestra el contenido de sitios receptores en células de Leydig provenientes de animales contro-

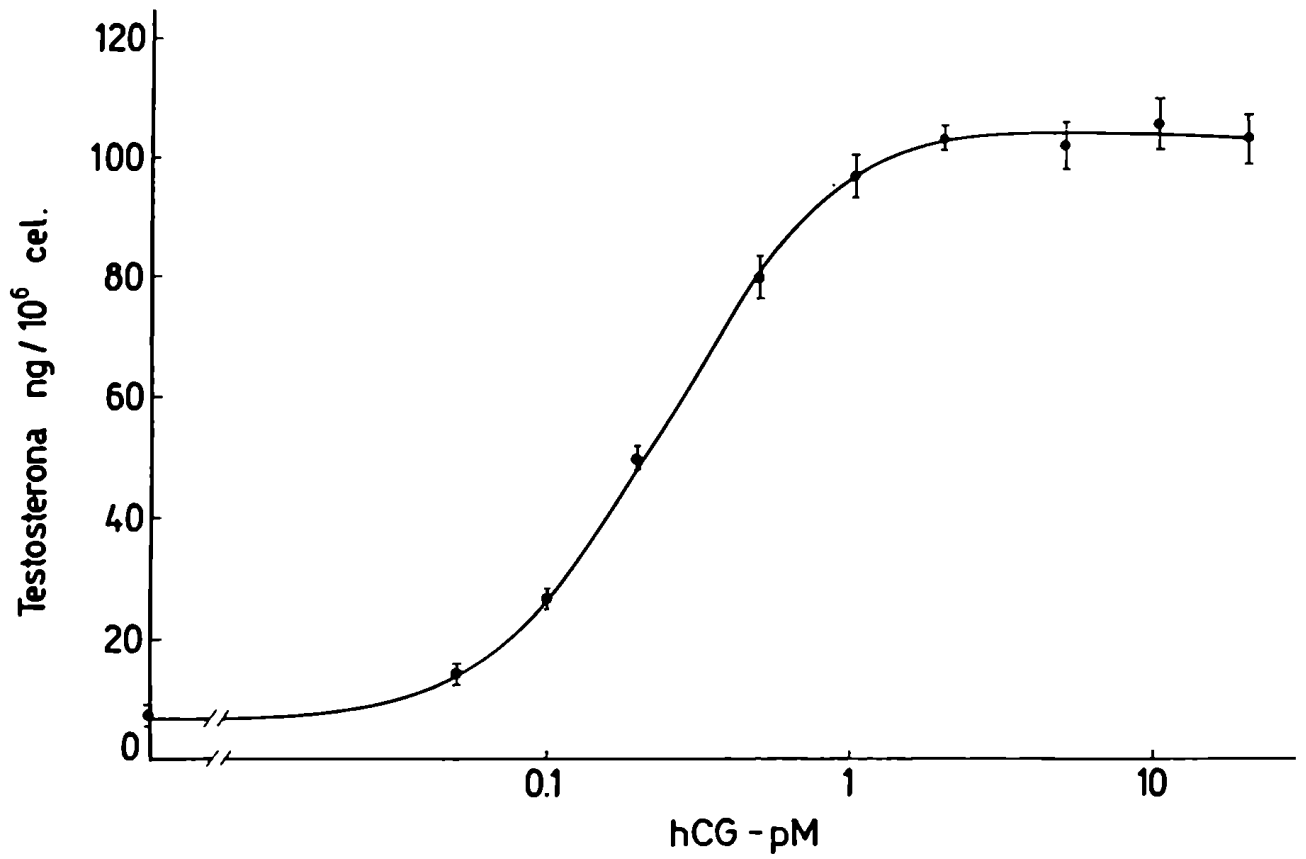


Fig. 5: Curva de dosis respuesta para la producción de Testosterona por células de Leydig, estimuladas con hCG "in vitro". Cada punto representa el valor medio de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

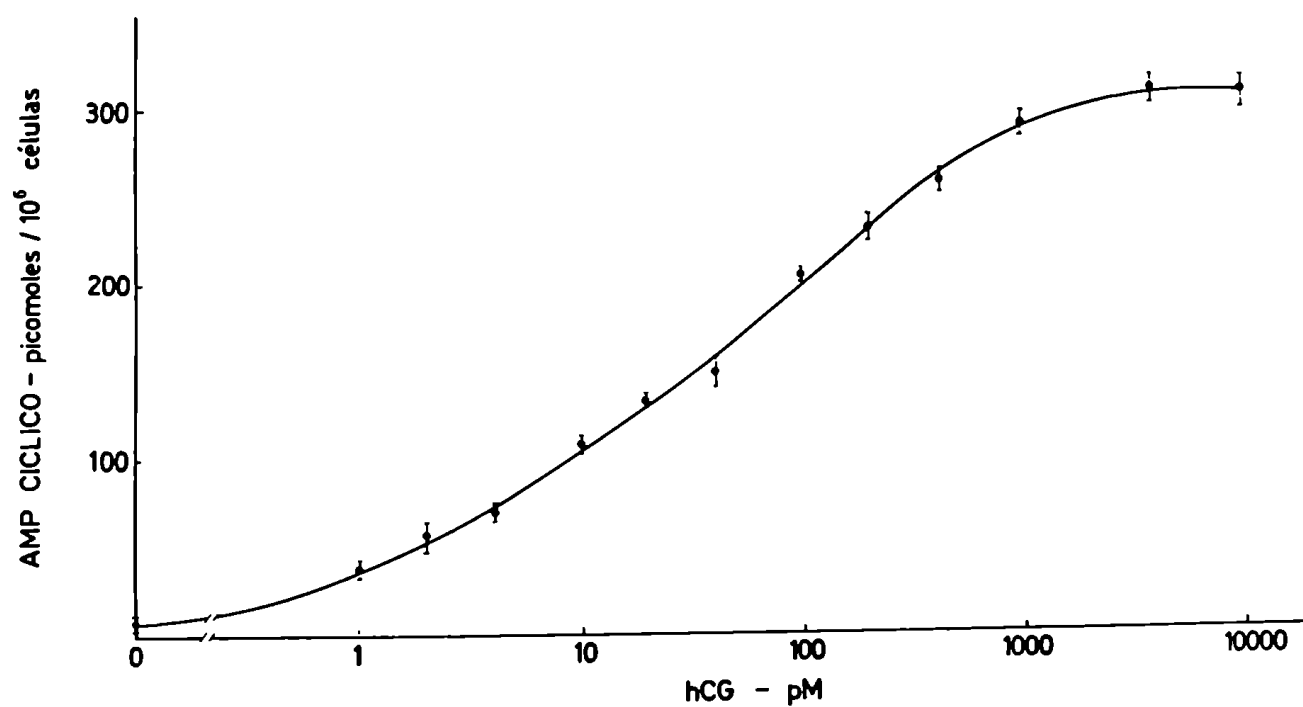


Fig. 6: Curva de dosis respuesta para la producción de cAMP por células de Leydig, estimuladas con hCG "in vitro". Cada punto representa el valor medio de 3 determinaciones  $\pm$  DS.

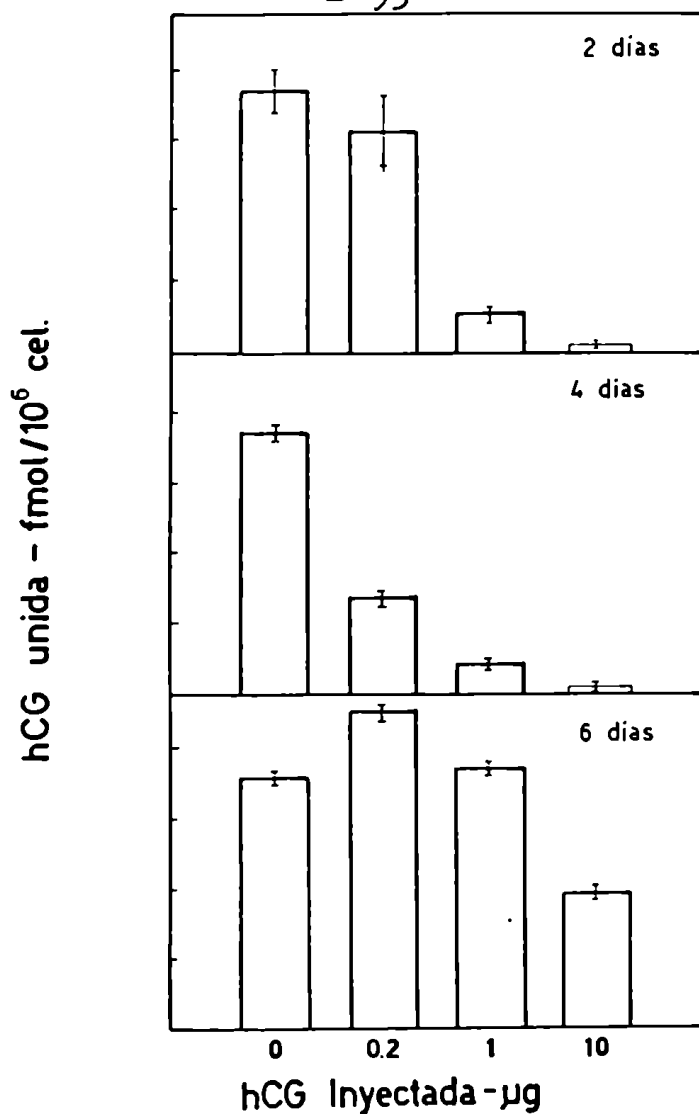


Fig. 7: Número de sitios receptores remanentes para LH después de 2, 4 y 6 días del tratamiento con una única dosis de hCG (0.2, 1 y 10 ug). Cada barra representa el valor medio  $\pm$  DS de 3 determinaciones.

les y tratados con 0.2, 1 y 10 ug de hCG luego de dos días (panel superior), 4 días (panel medio) y 6 días (panel inferior) del tratamiento. Los resultados están expresados como fmol/10<sup>6</sup> células y representan valores obtenidos en condiciones de saturación de los sitios receptores. Como se ve, el contenido en sitios receptores es semejante al ya descrito en la fig. 1, para distintas dosis de hormona administrada y a distintos días del tratamiento.

En el mismo experimento, se estudiaron otros dos parámetros: producción de cAMP y de Testosterona bajo estímulo "in vitro" con dosis crecientes de gonadotrofina.

La figura 8 presenta la respuesta del cAMP a concentraciones de hCG desde 0.01 a 10 ng/ml in vitro. Estas respuestas estuvieron disminuidas en proporción a la pérdida de sitios receptores, mas no se observaron cambios en la sensibilidad a la gonadotrofina.

Cuando se observaron los resultados obtenidos luego de dos días del tratamiento se vió que: no había disminución en la respuesta máxima del cAMP en células de animales tratados con 0.2 ug de hCG, a pesar que se observó una dismi-

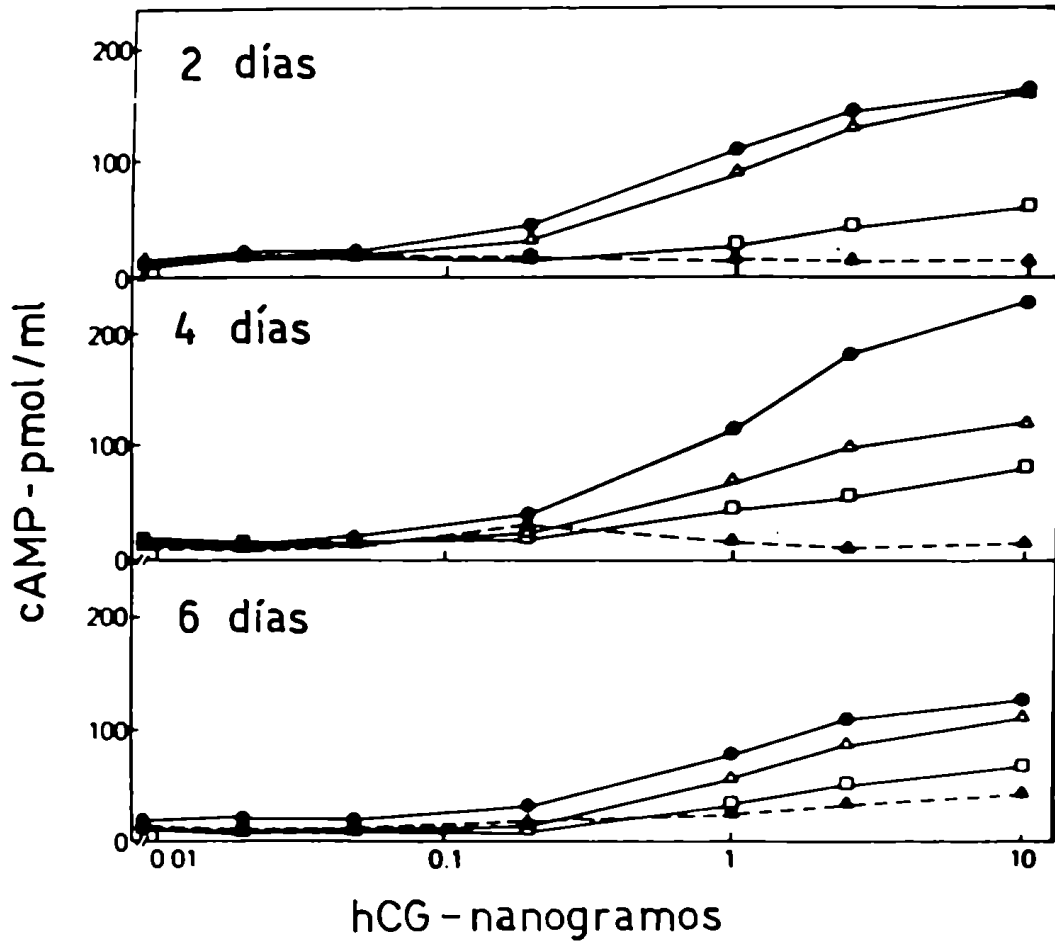


Fig. 8: Producción de cAMP bajo estímulo "in vitro" con dosis crecientes de hCG, por células de Leydig de animales controles (●—●) y tratados con hCG (△—△: 0,2ug, □—□ 1 ug, ▲—▲ 10 ug) a distintos tiempos (2, 4 y 6 días) luego del tratamiento.

nución del 25 % en el número de sitios receptores para LH/hCG. Se observó una disminución marcada en la respuesta máxima del cAMP en los animales tratados con una dosis de 1 ug de hCG y no se observó estimulación de la producción de cAMP después del tratamiento con 10 ug de hCG (Fig. 8).

Luego de cuatro días del tratamiento y siguiendo la disminución del número de sitios receptores para LH/hCG (Fig. 7), se observó una marcada disminución en la respuesta máxima del cAMP en las células provenientes de animales tratados con la dosis de 0.2 ug. Después de seis días del tratamiento y a pesar que se observó casi completa recuperación de los sitios receptores para las dosis de 0.2 y 1ug, la respuesta máxima del cAMP estuvo francamente disminuída en ambos grupos experimentales (Fig. 8). Se observaron respectivamente reducciones del 10 % y del 50 % para los animales tratados con 0.2 ug y 1 ug. La respuesta máxima del cAMP se había recuperado parcialmente (25 % del valor control) seis días luego del tratamiento con 10 ug de hCG.

La respuesta de la Testosterona a la hCG "in vitro"

mostró cambios no sólo en la respuesta máxima, sino también en la sensibilidad al estímulo (Fig. 9). La respuesta máxima estuvo aumentada en el grupo tratado con 0.2 ug de hCG al segundo y cuarto día del tratamiento y francamente disminuída en los animales tratados con 1 y 10 ug de hCG.

Debe notarse, que la respuesta máxima de la Testosterona no pudo alcanzar los valores controles, aún cuando se utilizaron dosis supramáximas de hCG para el estímulo. Al sexto día las curvas dosis-respuesta habían alcanzado los valores normales en células de animales tratados con 0.2 y 1 ug de hCG, y en los animales tratados con 10 ug, si bien pudo alcanzarse la respuesta máxima, se observó una dosis efectiva 50 %, dos veces más alta.

#### PRODUCCION DE TESTOSTERONA ESTIMULADA POR TOXINA COLERICA Y $Bt_2$ cAMP.

Ya que la producción de Testosterona en células intersticiales desensibilizadas (1 a 10 ug) no pudo ser estimulada a los valores máximos controles, se planteó la posibilidad de que el cAMP producido durante la estimulación hormonal en el



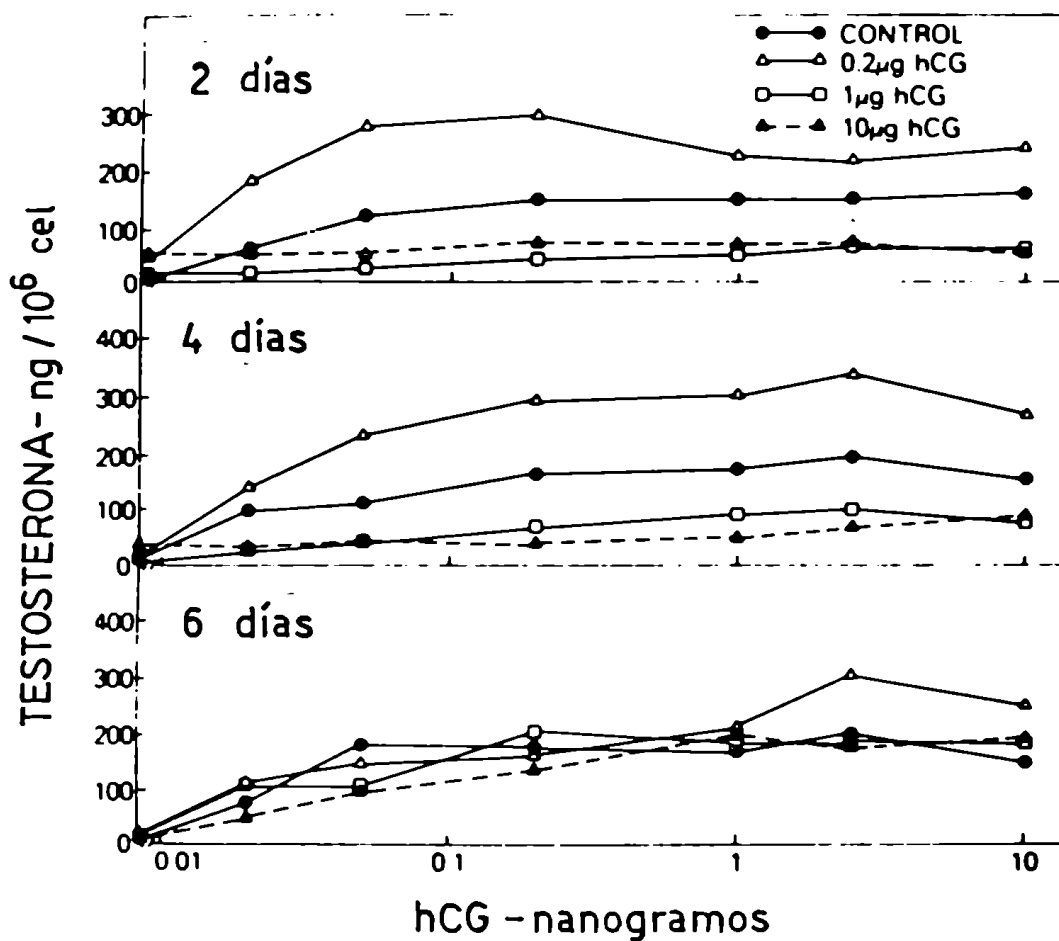


Fig. 9: Producción de Testosterona bajo estímulo con dosis crecientes de hCG "in vitro", por células de Leydig de animales controles y tratadas con hCG (0.2, 1 y 10 ug) a distintos tiempos (2, 4 y 6 días) luego del tratamiento.

estado desensibilizado, estuviera en alguna forma no disponible o fuera insuficiente para la estimulación de la esteroidogénesis.

Se realizaron experimentos para examinar este problema estimulando la producción de Testosterona con toxina colérica y  $Bt_2cAMP$  en dosis supramáximas. Cuando se estimuló con toxina colérica (10 ug/ml) (Fig. 10), la producción de Testosterona en células de Leydig provenientes del grupo tratado con 0.2 ug estuvo por encima de los valores controles al segundo día luego del tratamiento y estuvieron cercanos al valor control al cuarto y sexto día luego del tratamiento. En los grupos en que se había administrado 1 y 10 ug de hCG, la respuesta máxima de la Testosterona al segundo día estuvo reducida a 45 % del valor control, y se elevó a 60 y 75 % de este último valor luego de 4 y 6 días. Al mismo tiempo, la respuesta del cAMP a la toxina colérica, no se distinguió de los controles en ninguno de los grupos tratados con hCG (Tabla II).

La respuesta esteroidogénica a una concentración de  $Bt_2cAMP$  1mM, fue en general similar a aquella producida por la toxina (Fig. 11). Las respuestas en células de ratas

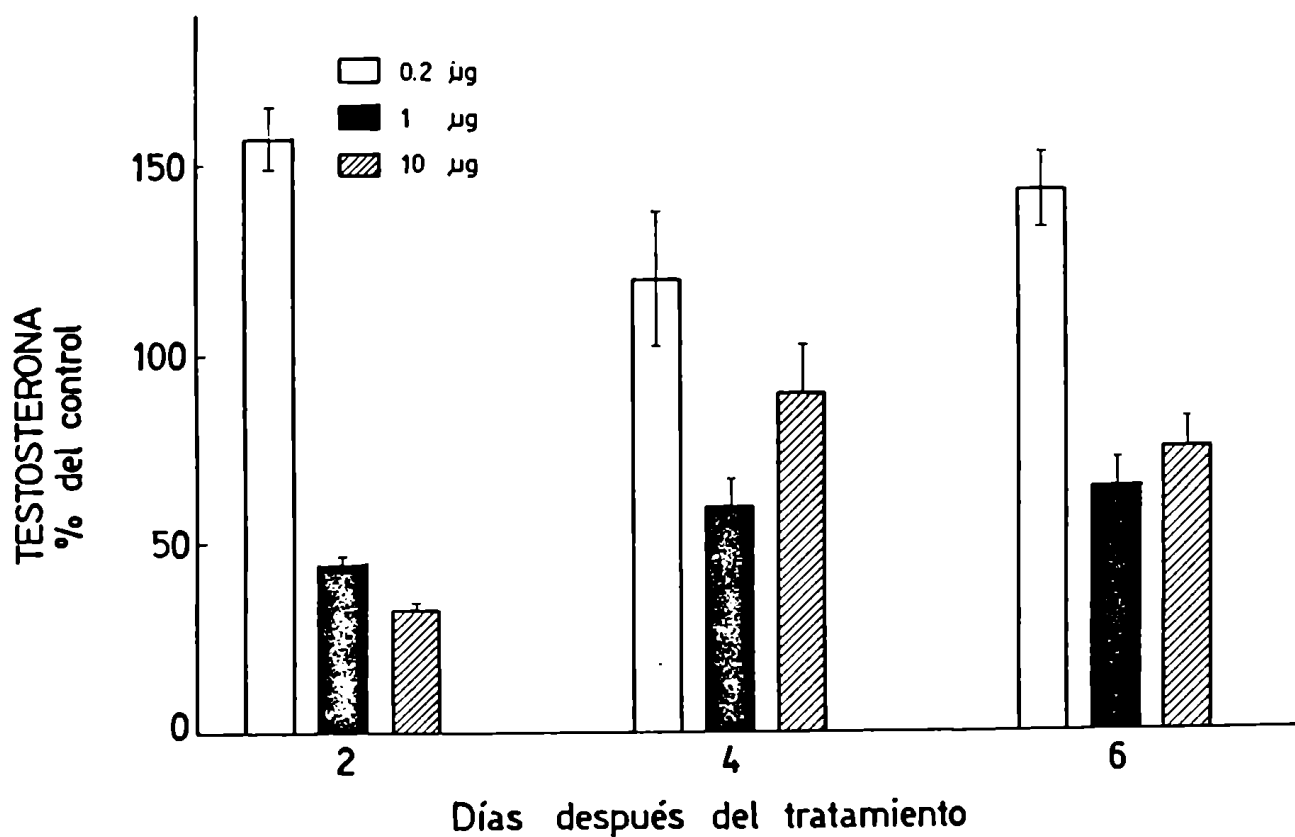


Fig. 10: Producción de Testosterona estimulada con una dosis supramáxima de toxina colérica (10 ug/ml) por células de Leydig obtenidas a partir de animales desensibilizados con distintas dosis hCG (0.2, 1 y 10 ug) y sacrificados a distintos tiempos (2, 4 y 6 días) luego del tratamiento único. Los resultados se expresan como % del control y representan el valor medio  $\pm$  DS de 3 determinaciones.

TABLA II

EFEECTO DE LA TOXINA COLERICA SOBRE LA PRODUCCION DE cAMP EN CELULAS DE LEYDIG AISLADAS DE RATAS CONTROLES Y TRATADAS CON hCG.

Toxina	Control	hCG		
		0.2 ug	1.0 ug	10 ug
0	12 $\pm$ 1.5	14 $\pm$ 2.3	14 $\pm$ 1.5	30 $\pm$ 3.4
10 ug	174 $\pm$ 2.5	178 $\pm$ 1.3	195 $\pm$ 6.2	216 $\pm$ 16

Cada valor es la media  $\pm$  DS de la respuesta del cAMP (pmol/10<sup>6</sup> células) a la toxina colérica (10 ug/ml) en células derivadas de grupos de cuatro animales en cada nivel de dosis, dos días después de la administración de hCG.

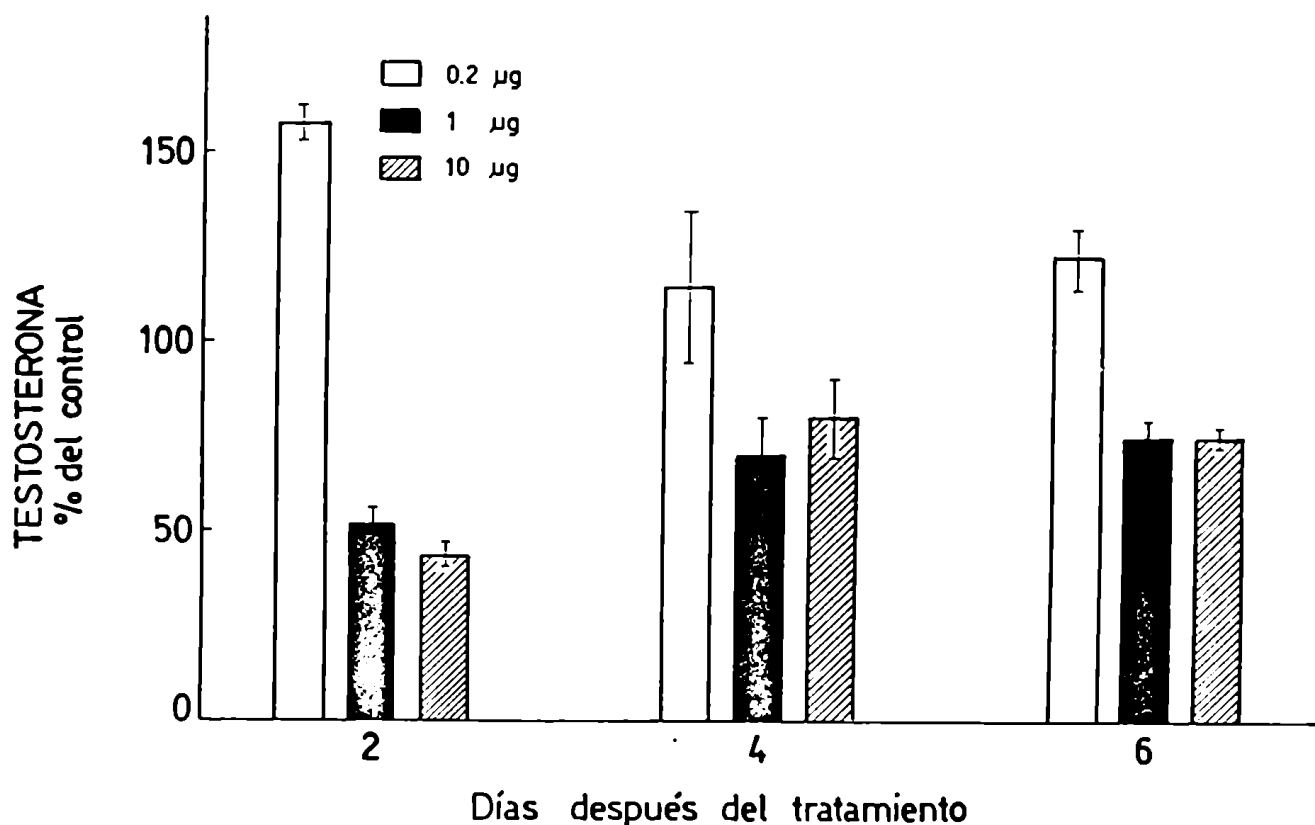


Fig. 11: Producción de Testosterona estimulada por una dosis supramáxima de  $Bt_2cAMP$  (1mM) por células de Leydig obtenidas a partir de animales desensibilizados con distintas dosis de hCG (0.2, 1 y 10 ug) y sacrificados a distintos tiempos (2, 4 y 6 días) luego del tratamiento único. Los resultados se expresan como % del control y representan el valor medio  $\pm$  DS de 3 determinaciones.

tratadas con 0.2 ug de hCG estuvieron nuevamente aumentadas por encima del valor control, mientras que las respuestas de los grupos tratados con 1 y 10 ug de hCG fueron marcadamente menores al segundo día (25 % del valor control en células normales) y volvieron a valores cercanos al 100 % luego de 4 y 6 días.

La imposibilidad de obtener una esteroidogénesis normal por un período de 48 a 72 horas con un exceso de cAMP, ya sea el estimulado por la toxina colérica o el exógeno en origen, indicó que el defecto en la respuesta esteroidogénica a la hCG, no era simplemente una consecuencia inmediata de la pérdida de receptores y que debía estar localizado más allá de la formación del nucleótido cíclico.

#### DETERMINACION DE LA UNION DE AMP CICLICO A SUS RECEPTORES INTRACELULARES

Para determinar si el defecto en la respuesta esteroidogénica estaba relacionado a cambios en el contenido de proteína quinasa, se realizaron experimentos donde se evaluó la disponibilidad y la ocupación de sitios en la pro-

teína receptora para el cAMP en células de Leydig desensibilizadas.

Se estudió la cantidad de sitios receptores disponibles para cAMP, en incubaciones durante dos horas de extractos de células de Leydig con cAMP tritiado (Fig. 12). No se observaron diferencias significativas entre la capacidad de unión del grupo control y del tratado con 1 ug de hCG.

El número de receptores disponibles para el cAMP fue ligeramente más alto en el grupo tratado con 0.2 ug de hCG, y estuvo ligeramente reducido en el grupo tratado con 10 ug de hCG (Fig. 12). Los ensayos de unión de cAMP tritiado, fueron también realizados en una incubación por 16 horas para permitir el intercambio del nucleótido endógeno que ocupa sitios receptores con el cAMP tritiado agregado, y así determinar el número total de sitios receptores para cAMP (199).

Por este método no se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo tratado con 10 ug de hCG y se observaron aumentos significativos en el número de sitios re-

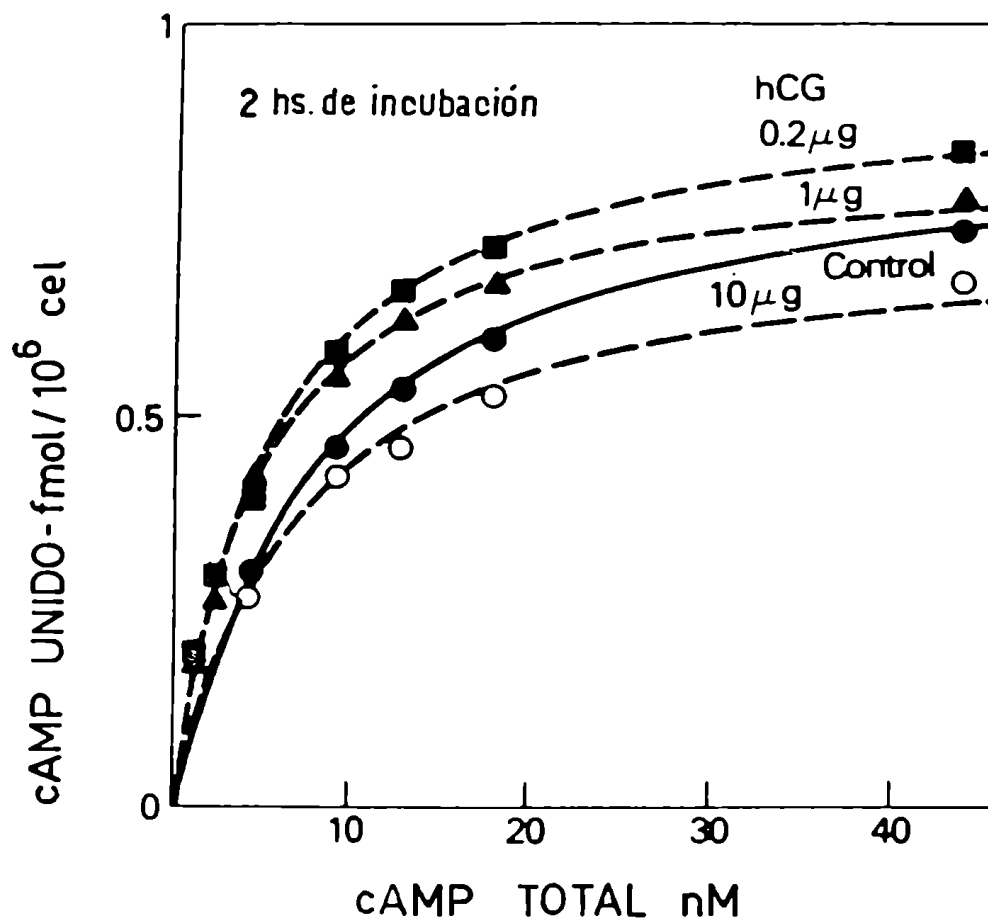


Fig. 12: Unión de cAMP a su proteína receptora en células de Leydig obtenidas de animales tratados con distintas dosis de hCG (0.2, 1 y 10  $\mu$ g) dos días luego del tratamiento. La incubación se realizó por 2 horas. Los resultados se expresan como femtomoles de cAMP unido por  $10^6$  células en función de concentraciones crecientes de cAMP agregadas.



ceptores totales para cAMP en los grupos tratados con 0.2 y 1 ug de hCG (Fig. 13). No se observó diferencia en la afinidad de unión del cAMP a su receptor, siendo la constante de afinidad media entre los distintos grupos de  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

El mantenimiento del número de sitios receptores para cAMP en el estado desensibilizado, sugirió que la lesión en la respuesta esteroidogénica, estaba probablemente localizada más allá del nivel de la proteína quinasa.

#### DESENSIBILIZACION INDUCIDA POR TRATAMIENTO CON FACTOR LIBERADOS DE GONADOTROFINAS

Se ha demostrado también, que existe disminución de los receptores testiculares para LH/hCG en animales tratados con una única dosis de LH-RH, y que este es un proceso que alcanza su máximo alrededor de dos días después del pico de LH endógeno inducido por la administración del factor liberador (198).

En el siguiente grupo de experimentos se intentó evaluar la respuesta hormonal en animales tratados con el factor liberador.

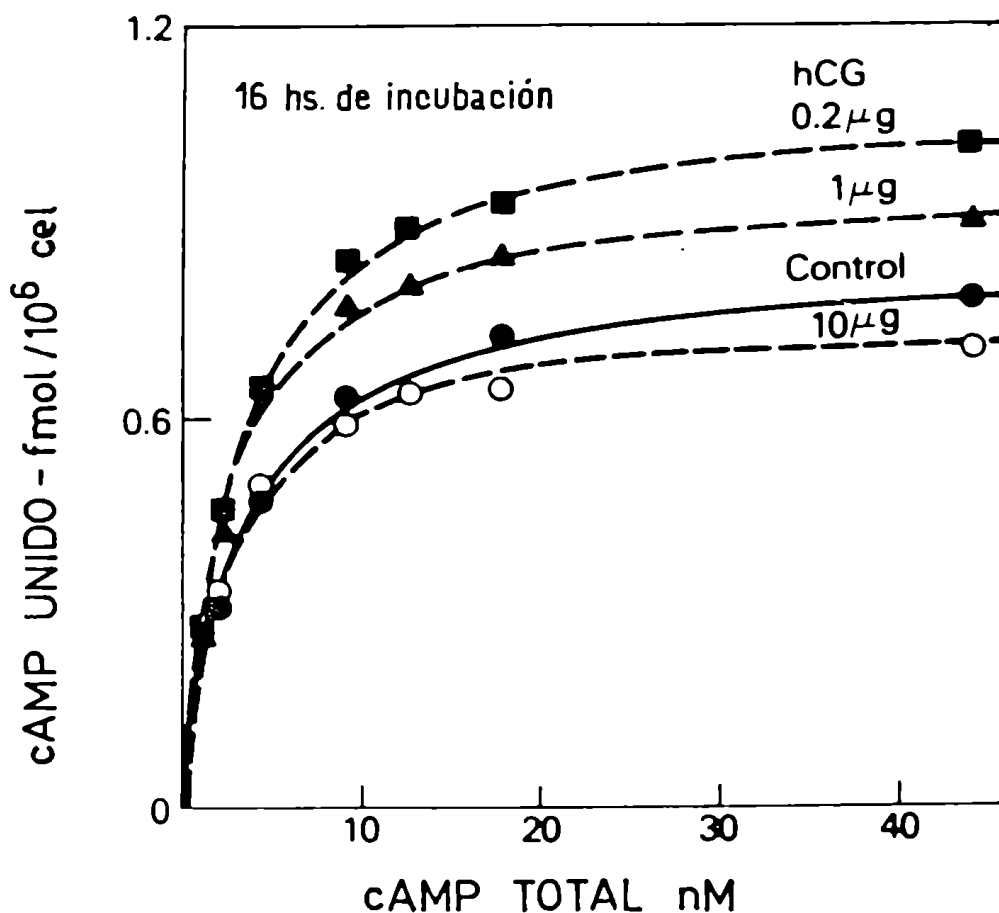


Fig. 13: Unión de cAMP a su proteína receptora en células de Leydig obtenidas de animales tratados con distintas dosis de hCG (0.2, 1 y 10  $\mu$ g) dos días luego del tratamiento. Se realizó una incubación de 16 horas para permitir el intercambio del cAMP marcado agregado, con el unido endógeno. Los resultados se expresan como femtomoles de cAMP en función de concentraciones de cAMP agregado.

La fig. 14 muestra los efectos del tratamiento con una s3la dosis LH-RH (0.1 ug, 1 ug y 10 ug ) sobre los niveles plasmáticos de LH expresados como ng del standard RP<sub>1</sub> por ml, en funci3n del tiempo transcurrido luego de la administraci3n del factor liberador. Los cambios en los niveles plasmáticos de LH fueron r3pidos y transitorios, y el pico y la duraci3n de cada respuesta estuvo relacionada con la magnitud de la dosis precedente de LH-RH administrada. A3n despu3s de la dosis m3s alta de LH-RH administrada (10 ug), la concentraci3n plasmática de LH se elev3 una hora luego del tratamiento, y volvi3 a sus niveles normales a las 4 horas (Fig. 14).

En la fig. 15 se muestran los cambios en la Testosterona plasmática que acompa3aron este tratamiento. Estos cambios fueron muy semejantes a los observados en la LH, aunque estuvieron ligeramente retardados con respecto a estos 3ltimos. Es de notar que los niveles de Testosterona plasmática hab3an vuelto a valores normales ocho horas luego del tratamiento.

En los test3culos de estos mismos animales se midieron

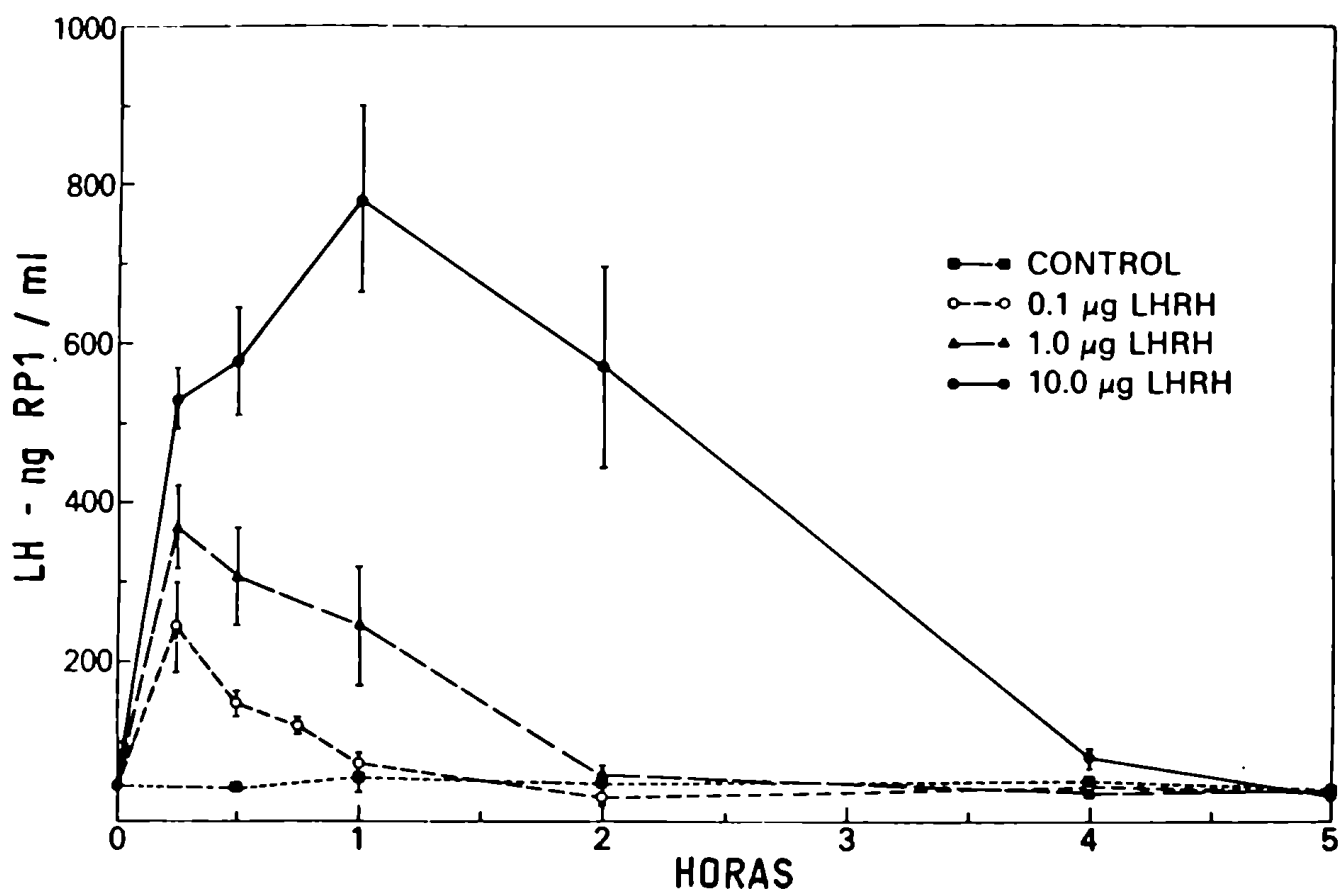


Fig. 14: Niveles plasmáticos de LH en función del tiempo transcurrido luego de la administración de distintas dosis de factor liberador de gonadotrofinas (0.1, 1.0 y 10 ug de LH-RH). Cada punto representa el valor medio  $\pm$  DS de los valores obtenidos en 6 animales.

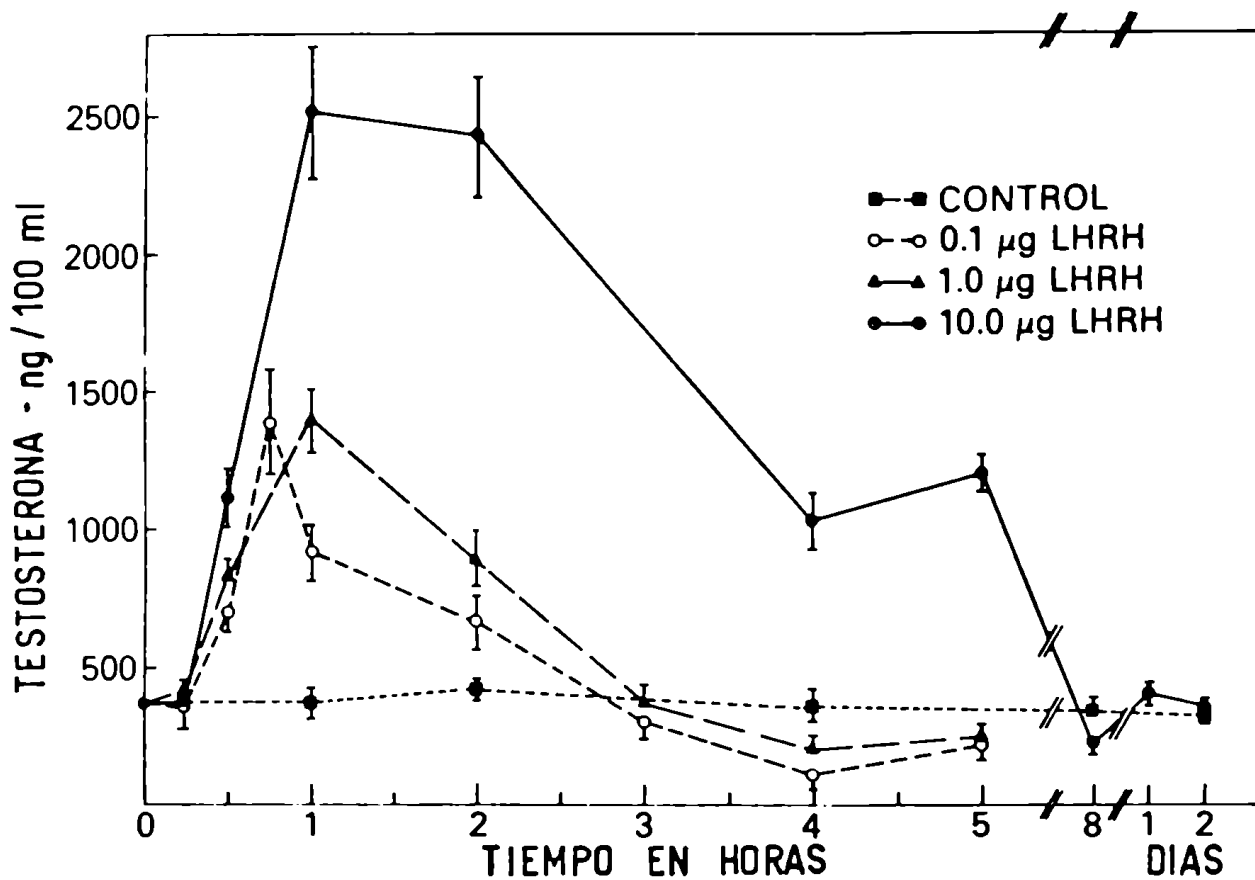


Fig. 15: Niveles plasmáticos de Testosterona en función del tiempo transcurrido luego de administrar distintas dosis de factor liberador de gonadotrofinas (0.1, 1.0 y 10 ug de LH-RH). Cada punto representa el valor medio  $\pm$  DS de los valores obtenidos en 6 animales.

los cambios en el número de sitios receptores para LH/hCG. Los cambios se produjeron considerablemente más tarde que la variación en los niveles plasmáticos de LH, alcanzando sus niveles mínimos dos días después del tratamiento y recuperándose a niveles normales en el sexto día. La pérdida de receptores de LH/hCG estuvo obviamente relacionada a la magnitud del pulso precedente de LH endógena que a su vez estuvo relacionado con la dosis de LH-RH utilizada para inducir la desensibilización (Fig. 16).

El retardo temporal en la pérdida de sitios receptores para LH/hCG, dos días después del tratamiento con LH-RH y del pico transitorio de LH acompañante, no fué atribuible a ocupación de los sitios receptores por hormona endógena. También aquí, la medida directa de la ocupación del receptor por elusión y ensayo de la LH unida, reveló que el grado total de ocupación del receptor era muy bajo con las dosis de LH-RH empleadas. Por lo tanto el proceso de regulación de los receptores de LH por la hormona homóloga fue iniciado por una muy baja ocupación de sitios receptores durante la fase estimuladora de la célula de Leydig. Este

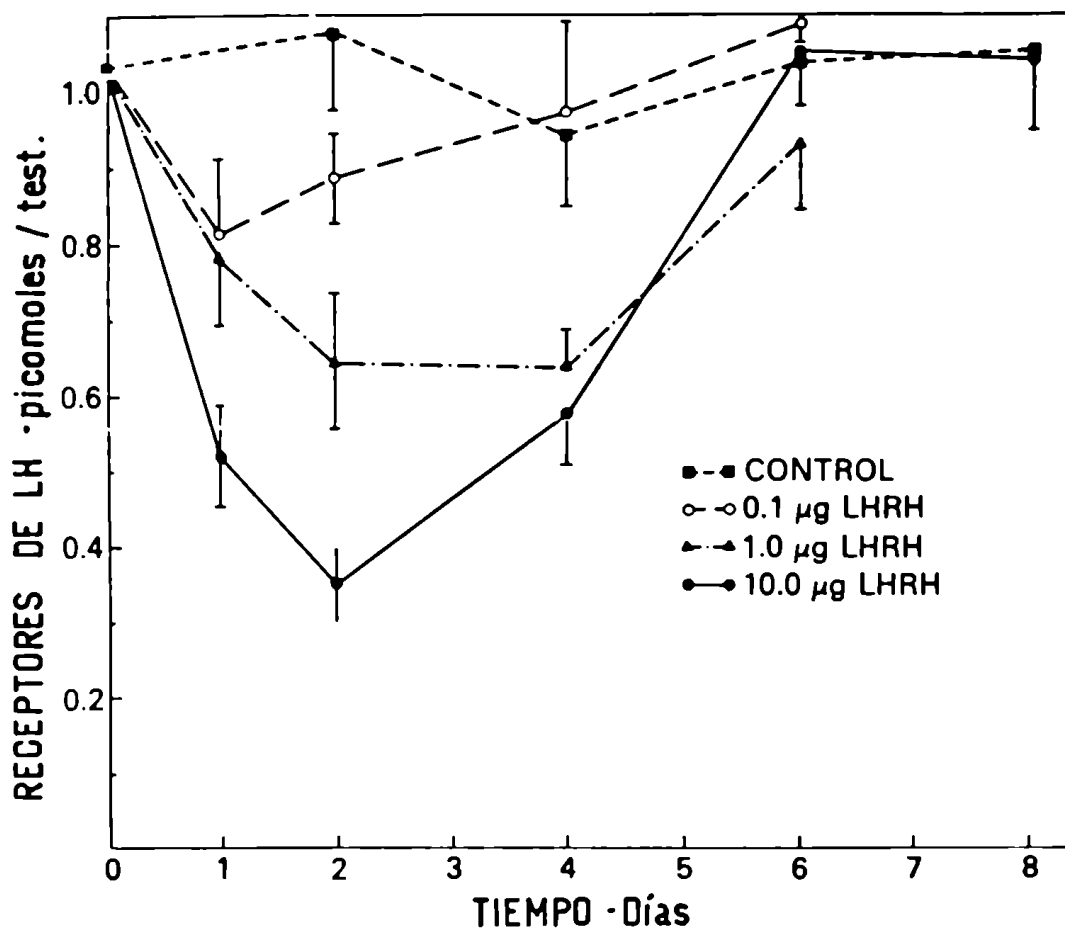


Fig. 16: Curvas de tiempo para la pérdida de sitios receptores de LH, en testículos de animales tratados con distintas dosis de LH-RH (0.1, 1.0 y 10.0 ug). Cada punto representa el valor medio  $\pm$  DS de 4 determinaciones.

Proceso entonces prosiguió durante las siguientes 24 a 48 hs para causar una pérdida de sitios receptores mucho mayor, presumiblemente involucrando a una mayoría de sitios libres junto con el pequeño número de sitios ocupados que están comprometidos en la interacción original hormona-receptor. La secuencia de pérdida y recuperación de receptores fue similar a la observada luego del tratamiento con gonadotropina exógena. Se demostró así que las elevaciones de LH endógena inician el mismo proceso de regulación de receptores.

#### EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LH-RH SOBRE LA RESPUESTA ESTEROIDOGENICA DE LA CELULA DE LEYDIG ESTIMULADA POR hCG "IN VITRO"

La pérdida de receptores de LH inducida por tratamiento con LH-RH que causara una elevación de la LH endógena, estuvo acompañada por cambios significativos en la respuesta "in vitro" de la célula de Leydig a la estimulación hormonal. Este fenómeno se puso en evidencia cuando se estudiaron las respuestas metabólicas de células de Leydig de ani-



males controles y desensibilizados, dos días luego del tratamiento con una única inyección s.c. de LH-RH.

La respuesta "in vitro" de la Testosterona bajo estímulo con dosis crecientes de hCG, varió en proporción a la pérdida de sitios receptores. Cuando la pérdida de sitios receptores fue importante (Fig. 17), ésta estuvo siempre acompañada por una reducción en la respuesta máxima de la Testosterona a concentraciones supramáximas de hCG ( $10^{-9}$  M). Sin embargo, cuando la pérdida de sitios receptores fue baja, la producción de esteroides estuvo usualmente aumentada por encima de los valores controles, como se había visto anteriormente para la desensibilización con la dosis más baja de hCG (0.2 ug).

#### EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LH-RH SOBRE LA PRODUCCION DE cAMP " IN VITRO "

La reducción en el número de sitios receptores para LH/hCG dos días luego del tratamiento con 1, 10 y 100 ug de LH-RH fué a valores de 33, 26 y 11 % del control en los grupos respectivos. Esta disminución en el número de sitios

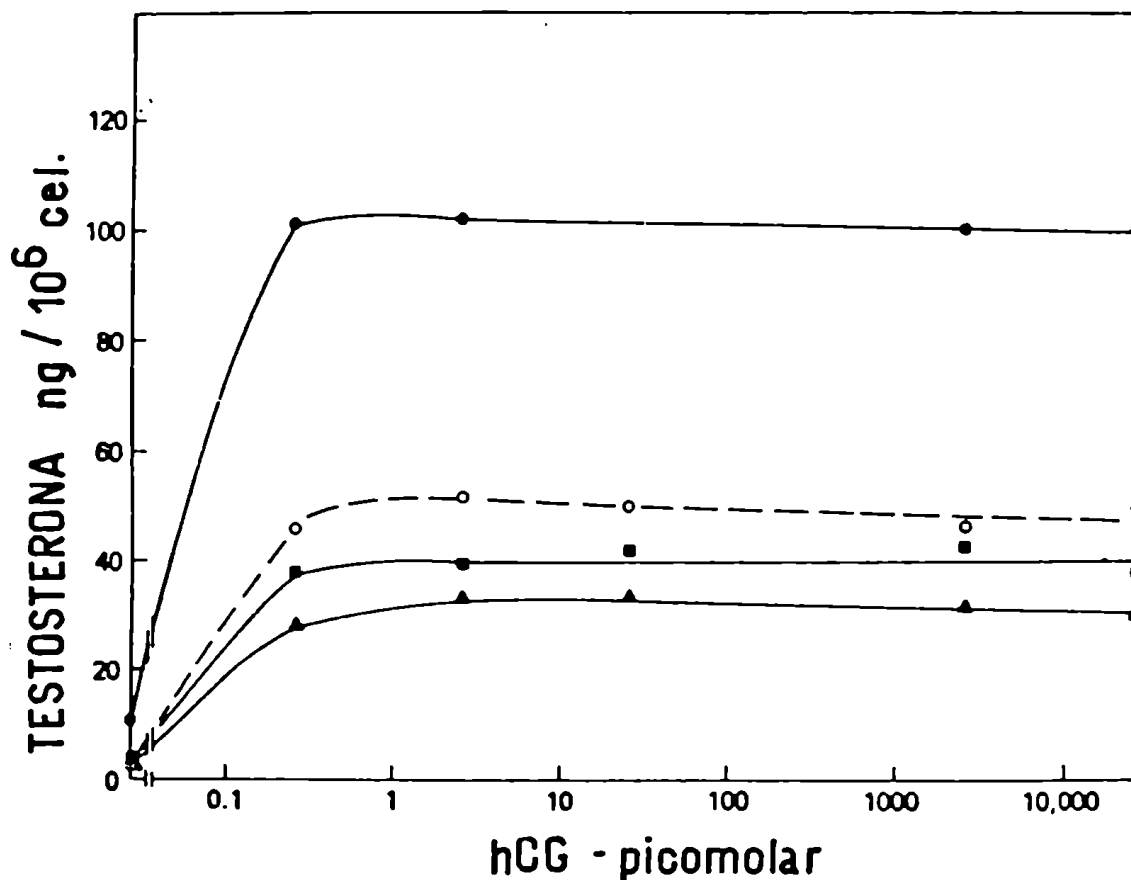


Fig. 17: Producción de Testosterona "in vitro" por células de Leydig provenientes de animales tratados con LH-RH (●-● Control, ■-■ 1 ug, ○-○ 10 ug y ▲-▲ 100 ug), estimulada con dosis crecientes de hCG en el medio de la incubación. El número de sitios receptores para LH dos días luego del tratamiento expresados como % del control fue: ■-■ 33 %, ○-○ 26 % y ▲-▲ 11 %.

receptores estuvo acompañada por una declinación en la producción del cAMP estimulado por dosis crecientes de gonadotrofina a valores de 37 %, 32 % y 25 % del valor control máximo en los grupos antes mencionados (Fig. 18).

#### PRODUCCION DE TESTOSTERONA ESTIMULADA POR TOXINA COLERICA Y $Bt_2cAMP$ EN CELULAS DE LEYDIG DE ANIMALES TRATADOS CON LH-RH

Al igual que en el caso de la desensibilización con hCG, la respuesta máxima para la producción de Testosterona no pudo ser inducida por concentraciones supramáximas de hCG.

En la fig. 19 se muestra que la respuesta máxima de la Testosterona tampoco pudo ser alcanzada cuando se utilizó para estimular las células de Leydig  $Bt_2cAMP$  ( $10^{-3}$  M) o toxina colérica ( $10^{-7}$  M). El número de sitios receptores de LH/hCG dos días luego del tratamiento con 1, 10 y 100 ug de LH-RH fue como ya se mencionó, 33, 26 y 11 % del control en los grupos respectivos.

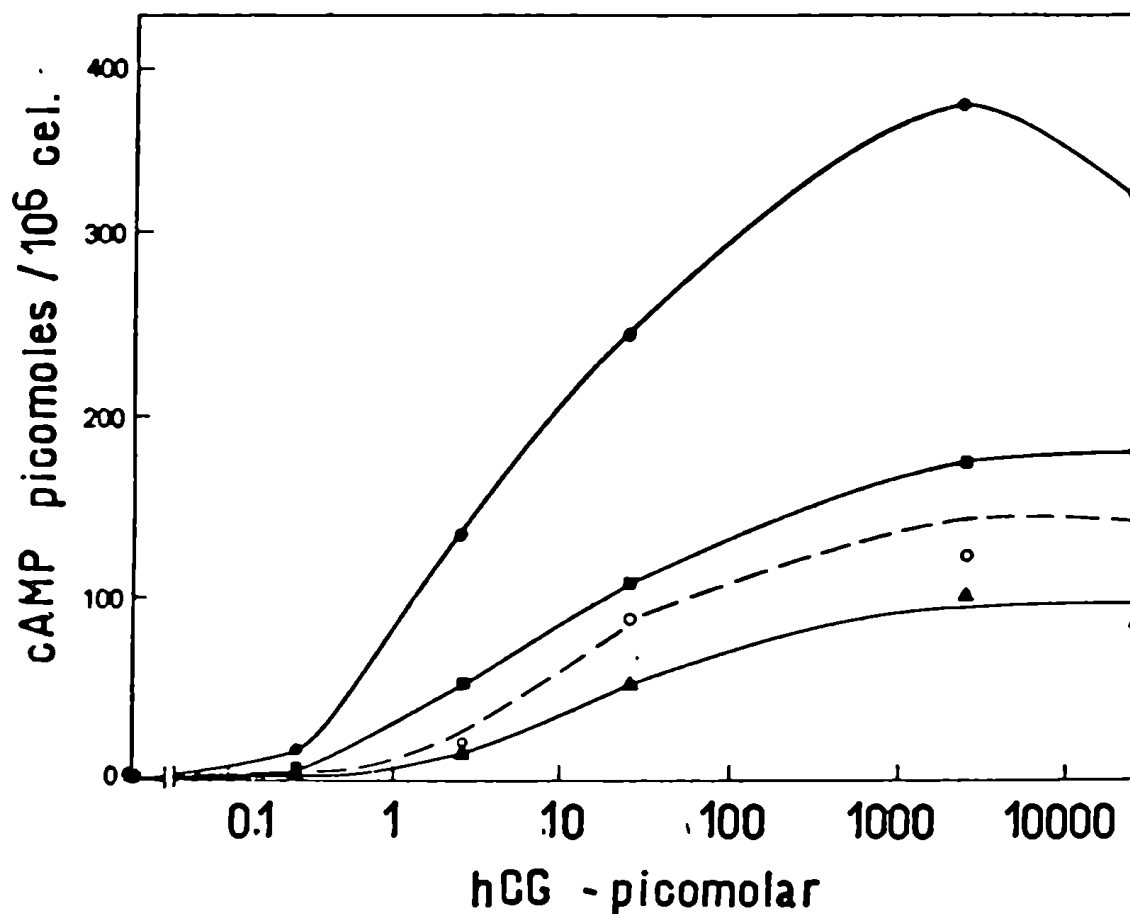


Fig. 18: Producción de cAMP "in vitro" por células de Leydig provenientes de animales tratados con LH-RH (○-○ Control, ■-■ 1 ug, ○-○ 10 ug y ▲-▲ 100 ug) estimuladas con dosis crecientes de hCG en el medio de la incubación.

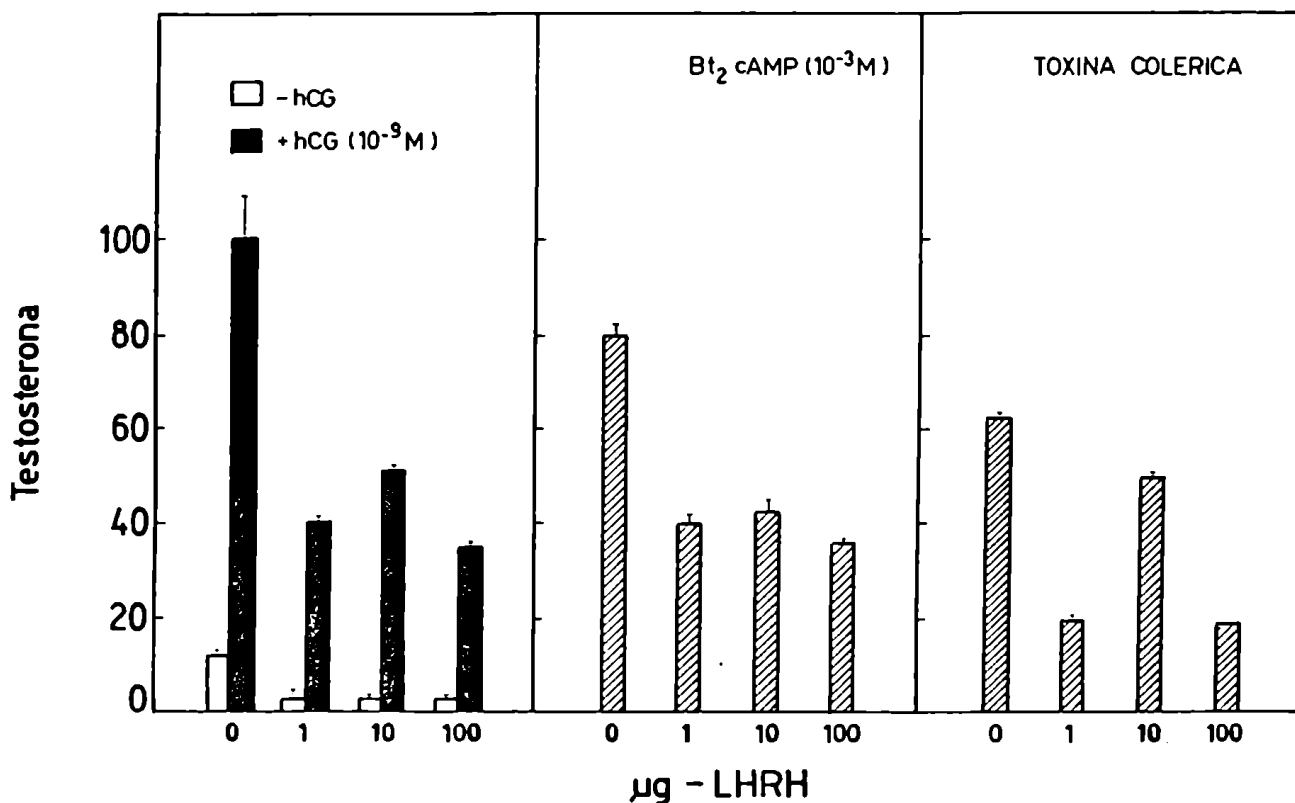


Fig. 19: Producción de Testosterona "in vitro" bajo estímulo con hCG  $10^{-9}$ M (panel izquierdo),  $Bt_2cAMP$   $10^{-3}$ M (panel medio) y toxina colérica  $10^{-7}$ M (panel derecho). Las barras blancas en el panel izquierdo representan la producción basal. Las células de Leydig provenían de animales controles y tratados con 1, 10 o 100 ug de LH-RH dos días antes del sacrificio. Cada valor representa el valor medio  $\pm$  DS de 3 determinaciones, expresadas como nanogramos/ $10^6$  células.

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UNA UNICA DOSIS DE hCG (10 ug) EN FORMA SUBCUTANEA, SOBRE LAS PRODUCCIONES "IN VITRO" DE TESTOSTERONA Y DE cAMP ESTIMULADAS POR hCG.

En contraposición a los efectos sobre la respuesta esteroidogénica, inducidos por una única inyección endovenosa de hCG, la administración en forma subcutánea de 10 ug de hCG que produjera una disminución del 65 % en el número de sitios receptores para LH, no provocó una pérdida en la respuesta máxima de la Testosterona bajo estímulo gonadotrófico. En este grupo experimental se observó una marcada disminución en la sensibilidad a la hCG de la respuesta esteroidogénica, pudiendo determinarse aumentos en la DE 50 % de 20 y 40 veces durante incubaciones en presencia o en ausencia de MIX (Figs. 20, 21). La incubación con el inhibidor de la fosfodiesterasa produjo una disminución de la DE 50 % para hCG de 4.5 y 2.1 veces, en los grupos controles y desensibilizados, respectivamente.

Esta pequeña diferencia podría indicar que las células desensibilizadas tienen de alguna forma niveles de fosfodiesterasa más bajos que los animales controles. Sin embargo,

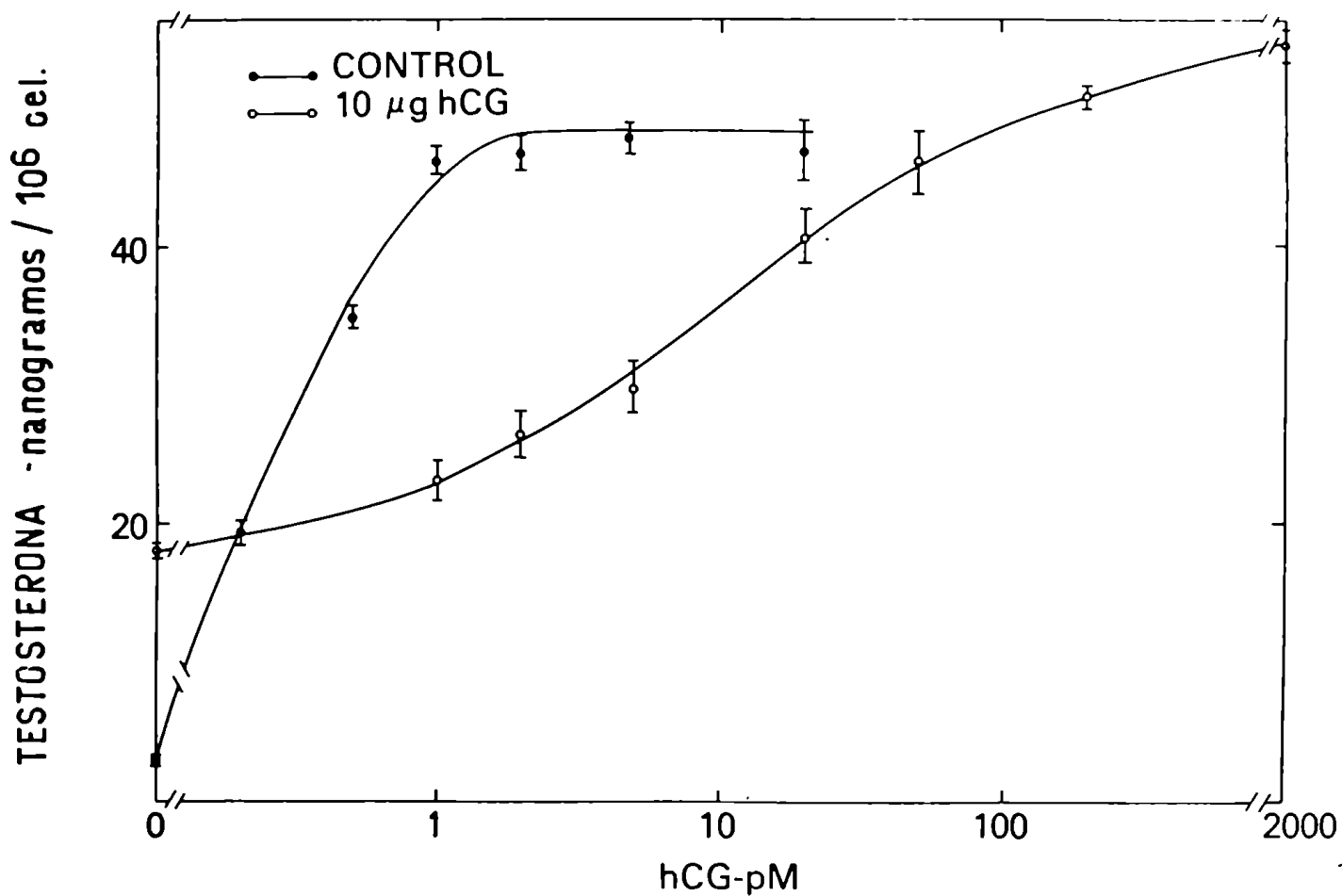


Fig. 20: Producción de Testosterona "in vitro" en presencia de MIX y con estímulo de dosis crecientes de hCG en el medio de la incubación. Las células de Leydig provienen de animales controles y desensibilizados con una dosis única de hCG (10 ug) en forma subcutánea, tres días luego del tratamiento. Cada punto representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

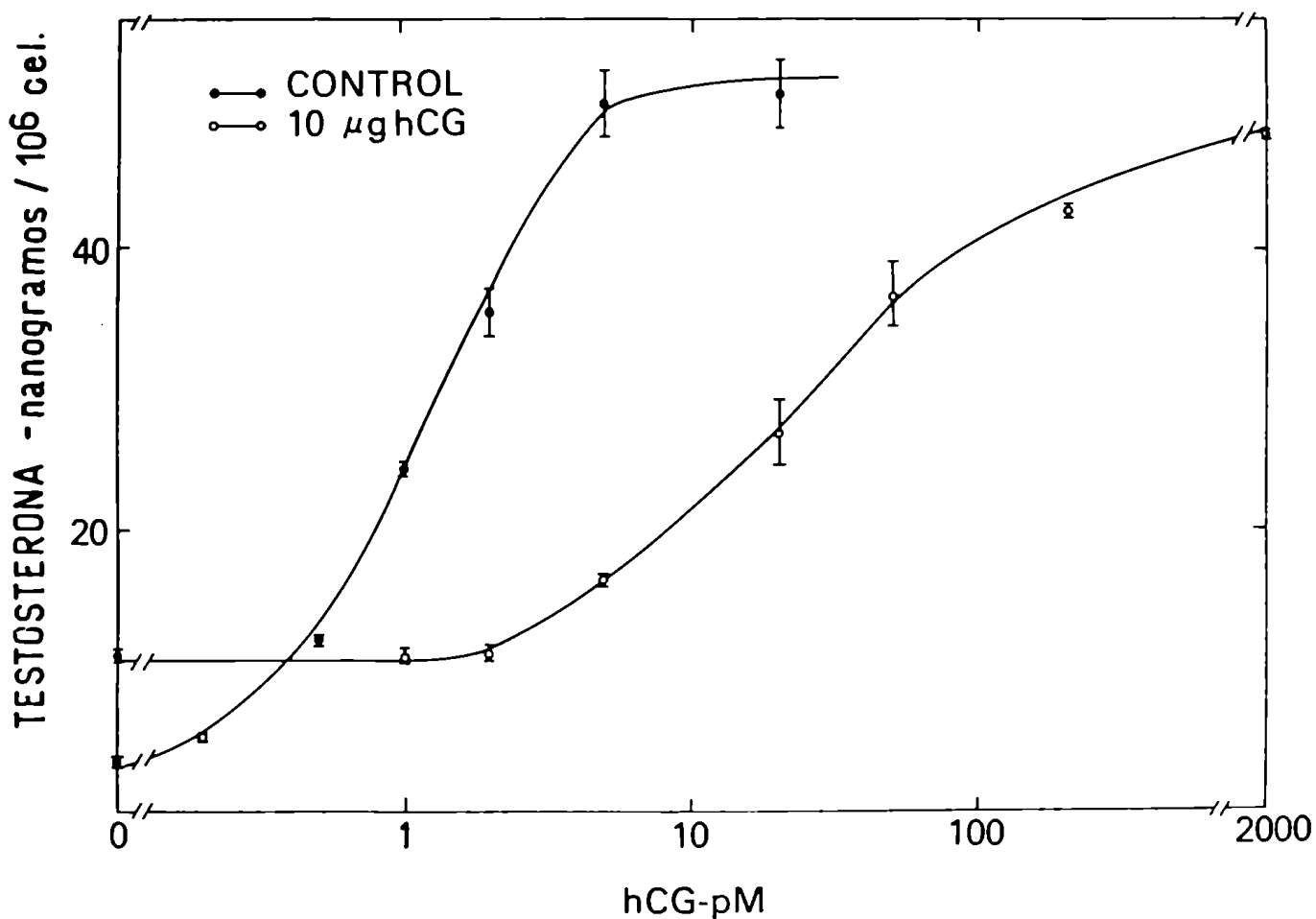


Fig. 21: Producción de Testosterona "in vitro", en ausencia de MIX y con estímulo de dosis crecientes de hCG en el medio de incubación. Las células de Leydig provienen de animales controles y desensibilizados con una única dosis de hCG (10 ug) en forma subcutánea, tres días luego del tratamiento. Cada punto representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.



las diferencias observadas durante la incubación con MIX probablemente esten relacionados con los altos niveles basales encontrados en el grupo desensibilizado.

La disminución del número de sitios receptores para LH, estuvo acompañada de una marcada disminución en la producción de cAMP estimulada por dosis crecientes de hCG in vitro, mientras que no se observaron cambios significativos en la dosis efectiva 50 %, cuando se realizaron incubaciones en presencia o ausencia del inhibidor de fosfodiesterasa MIX (Figs. 22 y 23).

La pérdida de sitios receptores inducida por una única inyección subcutánea de hCG, no estuvo acompañada por una disminución en la respuesta máxima de Testosterona como la que se había observado luego del tratamiento con hCG en forma endovenosa o con LH-RH, que produjeran una pérdida semejante de receptores a la observada en este último tratamiento. En cambio, tales células claramente mostraron un cambio en la sensibilidad al estímulo gonadotrófico, y esto es lo que se habría esperado en un tejido blanco en el que no existiese un daño posterior a la pérdida de sitios receptores.

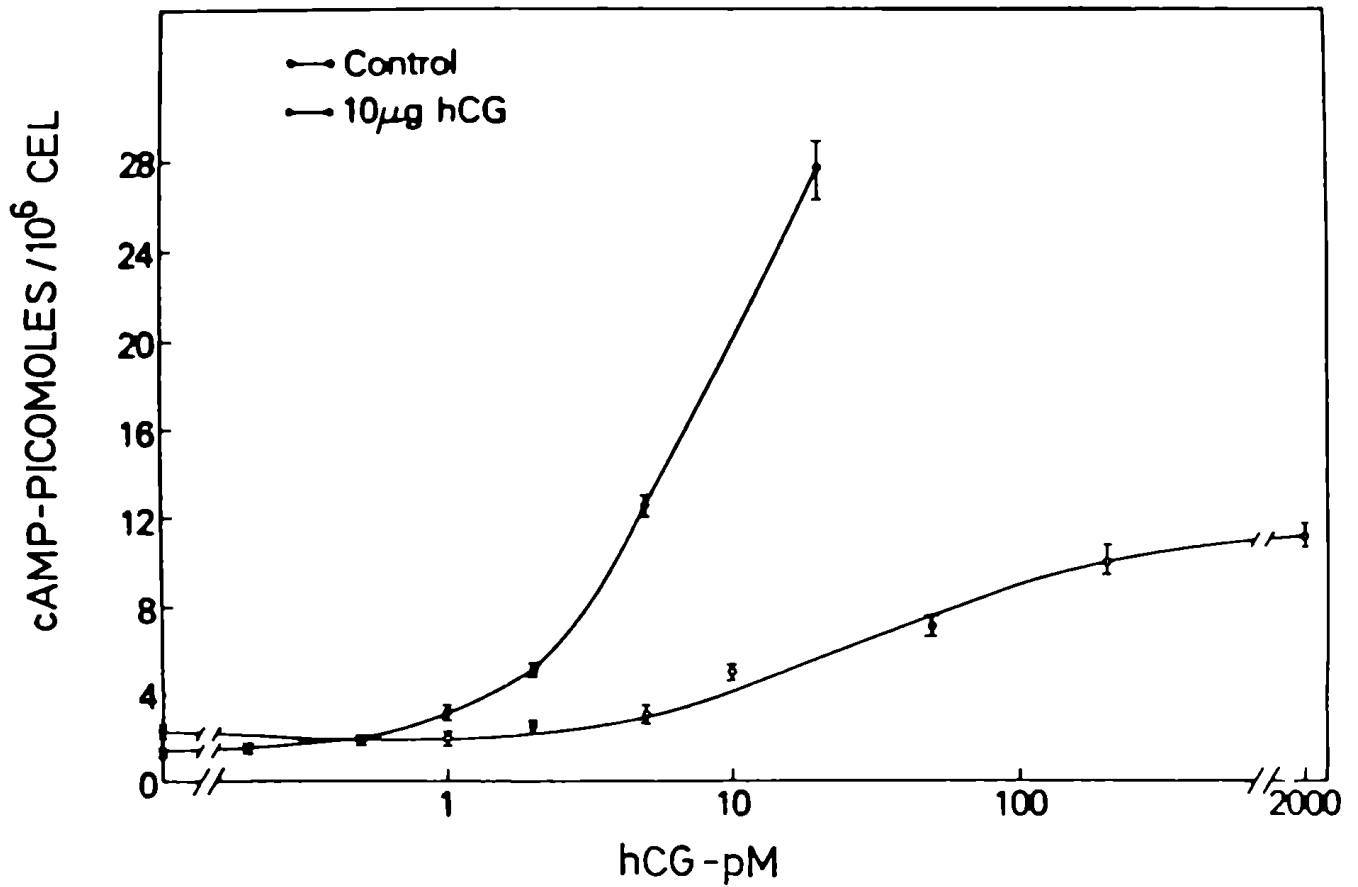


Fig. 22: Producción de cAMP "in vitro" en presencia de MIX y con estímulo de dosis crecientes de hCG en el medio de incubación. Las células de Leydig provienen de animales controles y desensibilizados con una única dosis de hCG en forma subcutánea tres días luego del tratamiento. Cada punto representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

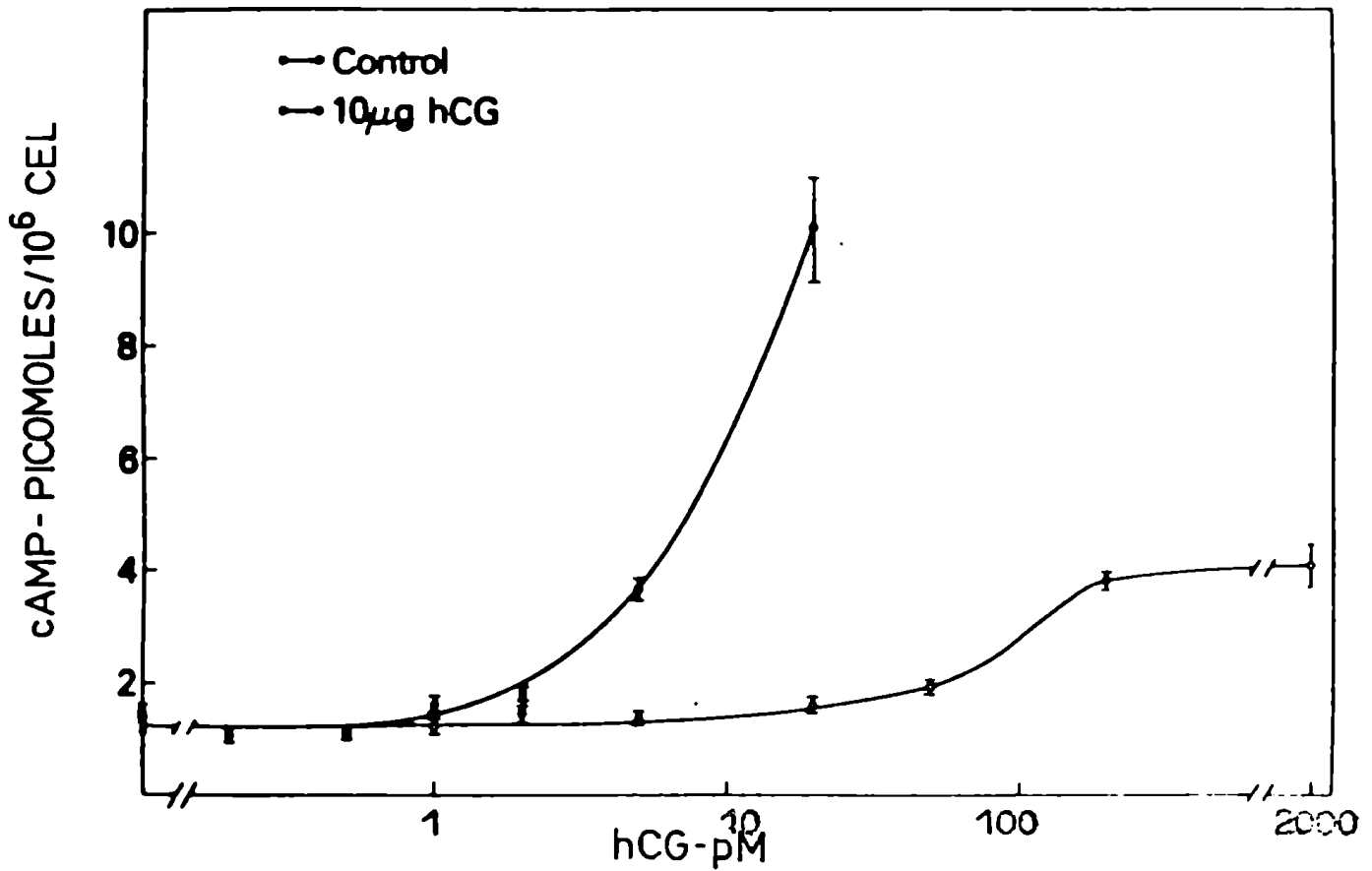


Fig. 23: Producción de cAMP en ausencia de MIX y con estímulo de dosis crecientes de hCG en el medio de incubación. Las células de Leydig provienen de animales controles y desensibilizados con una única dosis de hCG en forma subcutánea tres días luego del tratamiento. Cada punto representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

## PRODUCCION DE PREGNENOLONA EN PREPARACIONES DE CELULAS DE LEYDIG

Se han descrito una serie de experimentos, en los que se demuestra que la célula de Leydig desensibilizada por una única inyección endovenosa de hCG, o subcutánea de LH-RH es incapaz de producir Testosterona en su máximo nivel ya sea por: dosis supramáximas de hCG, cAMP exógeno, o cAMP formado endógenamente bajo la acción de la toxina cólera. Estos experimentos indicaron que con tales tratamientos ocurría una lesión más allá del nivel del receptor y probablemente a nivel del camino biosintético que conduce a la producción de Testosterona.

El mecanismo preciso por el cual la LH regula la esteroideogénesis no ha sido completamente elucidado, pero se acepta en general que uno de los sitios principales de regulación podría ser a nivel de la conversión de colesterol a Pregnenolona (49 , 199).

Para permitir el análisis de la producción de Pregnenolona por las células de Leydig (como un índice de la actividad de la enzima que rompe la cadena lateral del coles-

terol durante la activación gonadotrofica), se evaluaron los efectos de dos inhibidores de la biosíntesis esteroidea. El primer compuesto fue el Win 19,578, un esteroide sintético del tipo de la cianocetona, que es un potente inhibidor de la actividad de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide oxidoreductasa  $\Delta_5$  isomerasa "in vitro" e "in vivo" (200-203). El segundo inhibidor fue la Spironolactona, un antagonista de la Aldosterona, e inhibidor de la biosíntesis esteroidea, que se sabe actúa sobre la  $17\alpha$  hidroxilasa y sobre otras enzimas dependientes del citocromo  $P_{450}$  en fracciones mitocondriales y microsomales de tejido adrenal (204) y en fracciones microsomales testiculares (205).

La formación de Testosterona a partir de Pregnenolona puede ocurrir en la célula de Leydig a través de dos rutas biosintéticas, que son conocidas como las vías  $\Delta_4$  y  $\Delta_5$ . Las actividades relativas de ambas vías parecen variar con las distintas especies (206).

En la rata, según Sikita y col. (207), la vía  $\Delta_4$  parece ser la predominante y se esperaría que en presencia de un inhibidor de la  $3\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa  $\Delta_5$

isomerasa, se produjera una acumulación de Pregnenolona en condiciones basales o bajo estímulo gonadotrófico.

Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M de Win-19578 en la incubación, la Pregnenolona formada en condiciones basales no pudo ser detectada por radioinmunoensayo directo con un antisuero de Pregnenolona ( $< 0.6 \text{ ng}/10^6 \text{ cel}$ ), como se muestra en la figura 24. Bajo estímulo con hCG (10 ng) se observó un incremento en los valores de este esteroide, de aproximadamente 200-300 % de los valores encontrados en el grupo de células controles incubadas en ausencia de inhibidor. Cuando se incubó en presencia de Win  $10^{-4}$  M se obtuvo la producción máxima de  $3.7 \text{ ng}/10^6$  células que representa sólo 10 % del valor encontrado para la producción de andrógenos en ausencia de inhibidor ( $41.1 \text{ ng}/10^6$  células). Simultáneamente se observó una producción significativa de un andrógeno inmunorreactivo, con las tres concentraciones de inhibidor utilizadas (Fig. 24). El fraccionamiento de las muestras por cromatografía en capa delgada como se describió en materiales y métodos, mostró que la Testosterona era el único esteroide

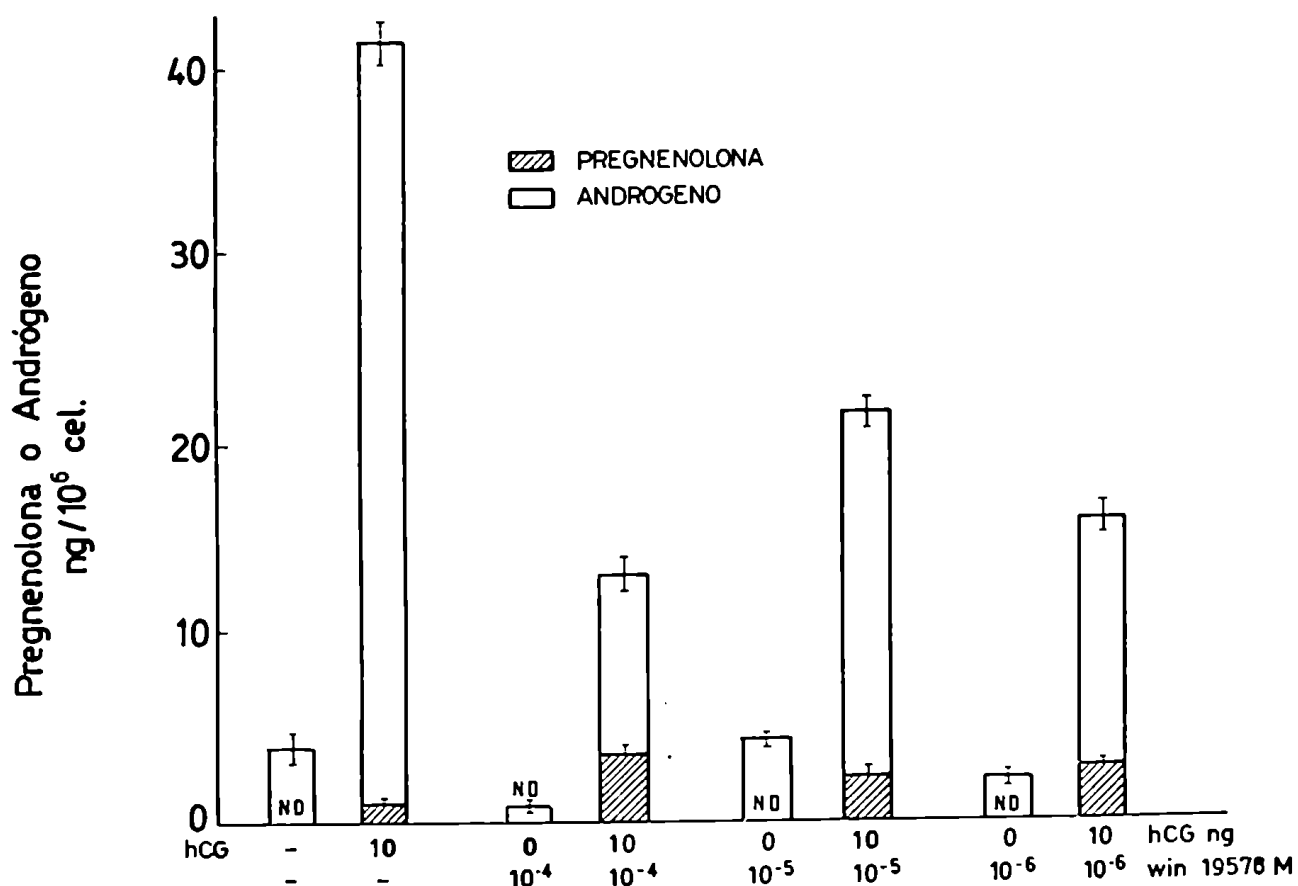


Fig. 24: Producción de Pregnenolona y de andrógeno inmunorreactivo "in vitro", por células de Leydig incubadas en presencia de distintas dosis de cianocetona. (Win 19578;  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M), con o sin estímulo con 10 ng de hCG. Cada barra representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

producido en incubaciones sin inhibidor, mientras que en las incubaciones en presencia de Win 19578, más del 90 % del andrógeno inmunorreactivo detectado, se comportaba cromatográficamente como  $\Delta_5$ -Androstenodiol, correspondiendo al 10 % restante a Testosterona.

Ya que la reacción cruzada del  $\Delta_5$ -Androstenodiol con el anticuerpo de Testosterona era del 35 %, un cálculo grosero de la cantidad de  $\Delta_5$ -Androstenodiol producida en estas incubaciones fue de 43 ng. Cuando se determinaron las cantidades de Testosterona y  $\Delta_5$ -Androstenodiol formados en presencia de cianocetona, luego de realizar su separación cromatográfica, la suma de Testosterona,  $\Delta_5$ -Androstenodiol y Pregnenolona dió un total de 47 ng, que es equivalente en magnitud a la producción de Testosterona (41 ng) que se obtiene en incubaciones controles en ausencia de inhibidor. Con este experimento se puso en evidencia la necesidad de inhibir completamente la esteroidogénesis y para ello se utilizó la Spironolactona como inhibidor de la  $17\alpha$ -hidroxilasa con el objeto de cuantificar la producción de Pregnenolona. El agregado de un segundo inhibidor



(Spironolactona  $10^{-5}$  M) que bloqueó la actividad de la  $17\alpha$ -hidroxilasa, produjo una acumulación de Pregnenolona en las incubaciones controles y durante la estimulación gonadotrófica, que fue equivalente a la producción de Testosterona durante incubaciones sin inhibidores ( $94.3 \pm 10.8$  ng para Pregnenolona versus  $100.5 \pm 2.9$  ng para Testosterona valor medio  $\pm$  DS,  $n=3$  (Fig.25). Sólo una pequeña cantidad de Testosterona fue detectada cuando ambos inhibidores estaban presentes.

En algunos experimentos, la incubación con Spironolactona en las concentraciones necesarias para producir inhibición de la  $17\alpha$ -hidroxilasa ( $10^{-5}$  M), causó una inhibición parcial de la esteroidogénesis del 20 al 50 % cuando se comparó con la producción de Testosterona en ausencia de inhibidores. Este efecto podría deberse a una inhibición parcial de la enzima que rompe la cadena lateral del colesterol, ya que se ha demostrado que la Spironolactona afecta al citocromo P-450 y a la actividad de las enzimas dependientes de este citocromo en testículo (204-205). Cuando se usó Spironolactona sola, el principal esteroide formado fue

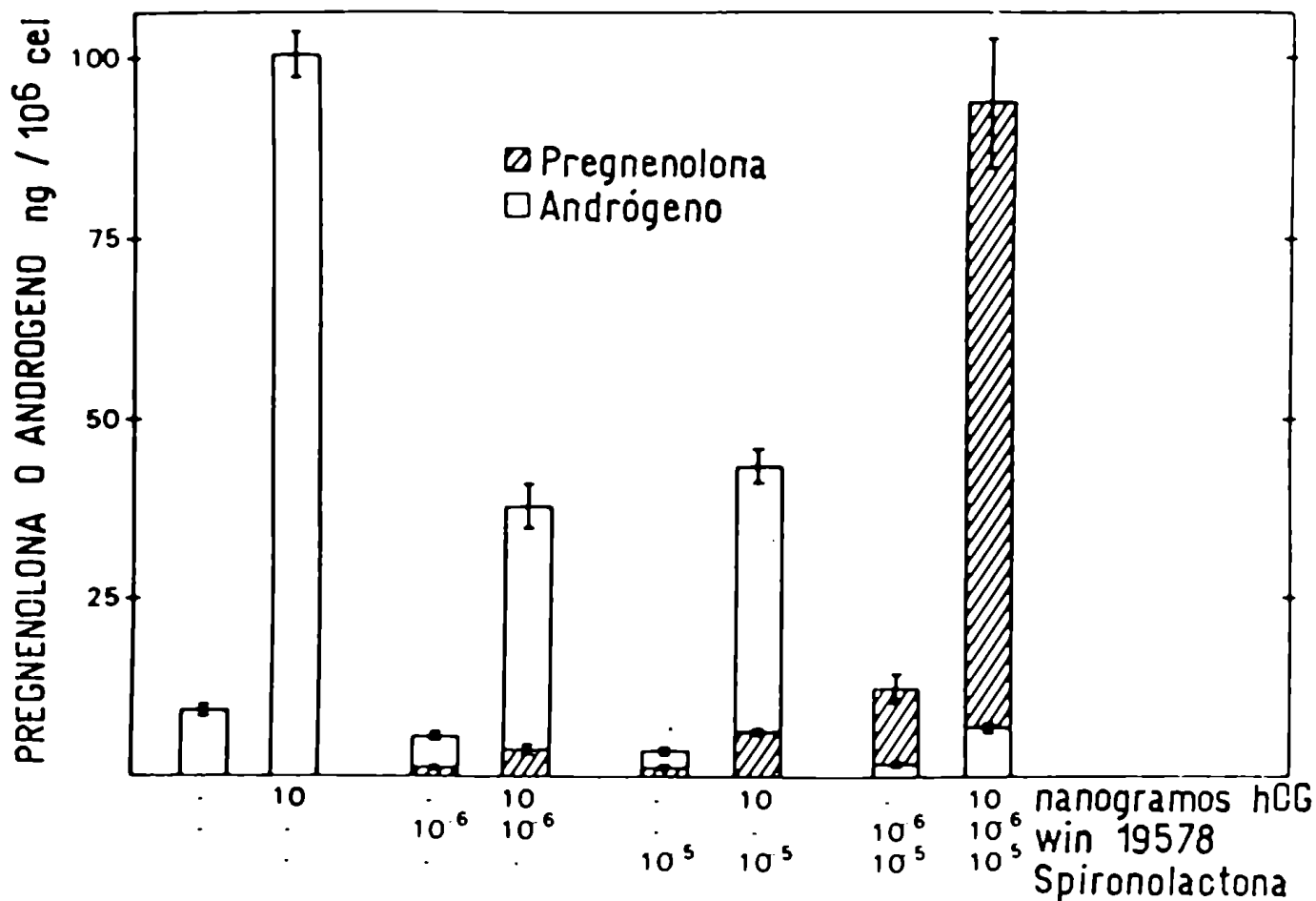


Fig. 25: Producción de Pregnenolona y de andrógeno inmunorreactivo "in vitro" por células de Leydig incubadas en presencia de cianocetona (Win 19578,  $10^{-6}$  M), y/o Spironolactona ( $10^{-5}$  M), con o sin el estímulo de 10 ng de hCG en el medio de incubación. Cada barra representa el valor medio ( $n=3$ )  $\pm$  DS.

la Testosterona, junto con pequeñas cantidades de Pregnenolona. Durante los experimentos subsiguientes para estudiar la producción de Pregnenolona en preparaciones de células de Leydig purificadas, se realizaron incubaciones en presencia de ambos inhibidores a las concentraciones indicadas.

CURVAS DOSIS RESPUESTA Y ESTUDIOS CINETICOS DE LA PRODUCCION DE PREGNENOLONA DURANTE LA ESTIMULACION GONADOTROPICA.

La producción de Pregnenolona fue dependiente de la dosis utilizada para el estímulo, en una incubación de 3 horas con concentraciones de hCG entre 0.1 y 2 pM. (Fig. 26).

La DE50 obtenida fue 0.2 - 0.6 pM, valor similar al observado para la producción de Testosterona en ausencia de inhibidores (Fig. 5).

La producción de Pregnenolona aumentó significativamente luego de 5 minutos de incubación con una dosis submáxima de hCG (0.8 pM) (Tabla III). A pesar de este pequeño aumento de la Pregnenolona durante los primeros 10 minutos de incubación, los incrementos mayores en la producción

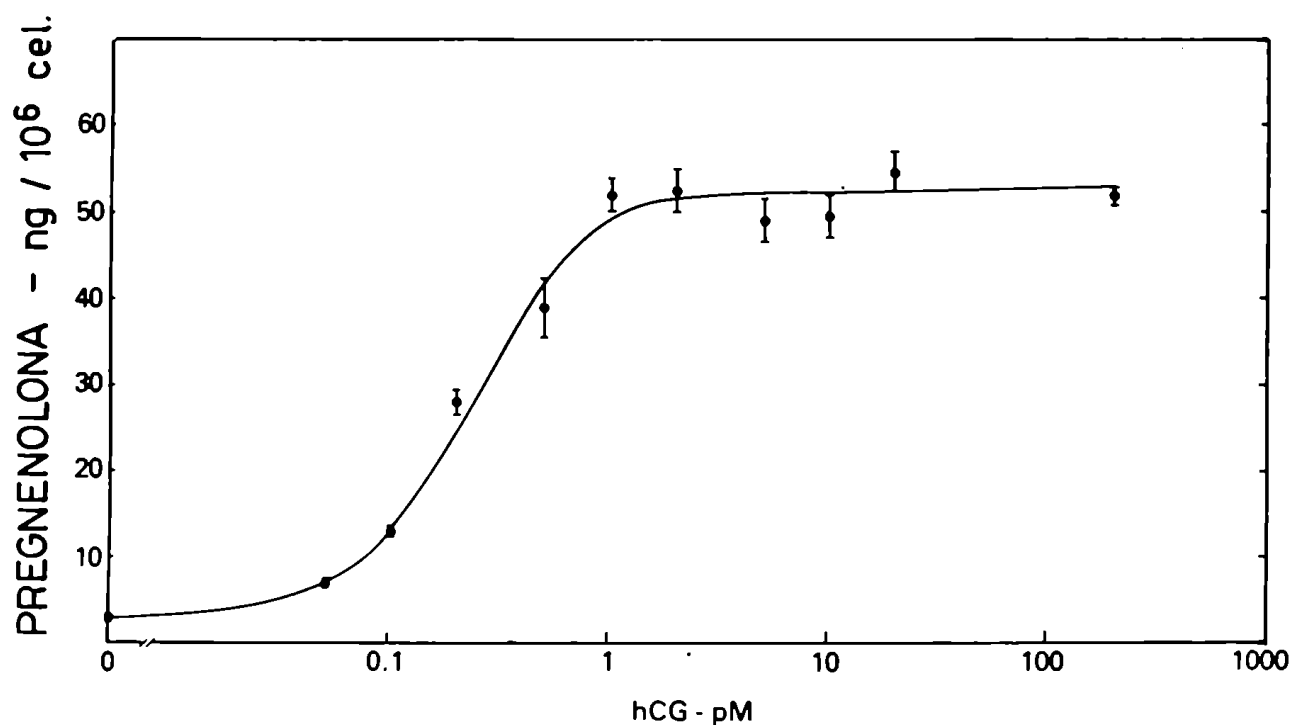


Fig. 26: Producción de Pregnenolona por células de Leydig purificadas, en presencia de cianocetona ( $10^{-6}$  M) y Spironolactona ( $10^{-5}$  M) bajo estímulo con dosis crecientes de hCG en el medio de incubación. Cada punto representa el valor medio ( $n=3$ )  $\pm$  DS.

TABLA III

Tiempo min.	Pregnenolona ng/10 <sup>6</sup> células		Valor medio $\pm$ ES (n = 4)
	Control	hCG (0.8 pM)	hCG (40 pM)
0	1.10 $\pm$ 0.22	1.05 $\pm$ 0.07	1.29 $\pm$ 0.06
2	1.17 $\pm$ 0.20	1.33 $\pm$ 0.12	1.33 $\pm$ 0.13
5	1.09 $\pm$ 0.14	2.33 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	2.79 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
10	1.16 $\pm$ 0.23	2.44 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>	2.62 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>
20	1.23 $\pm$ 0.25	2.31 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>	4.68 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>

Test de Student

<sup>a</sup> p < 0.05

<sup>b</sup> p < 0.01

<sup>c</sup> p < 0.001

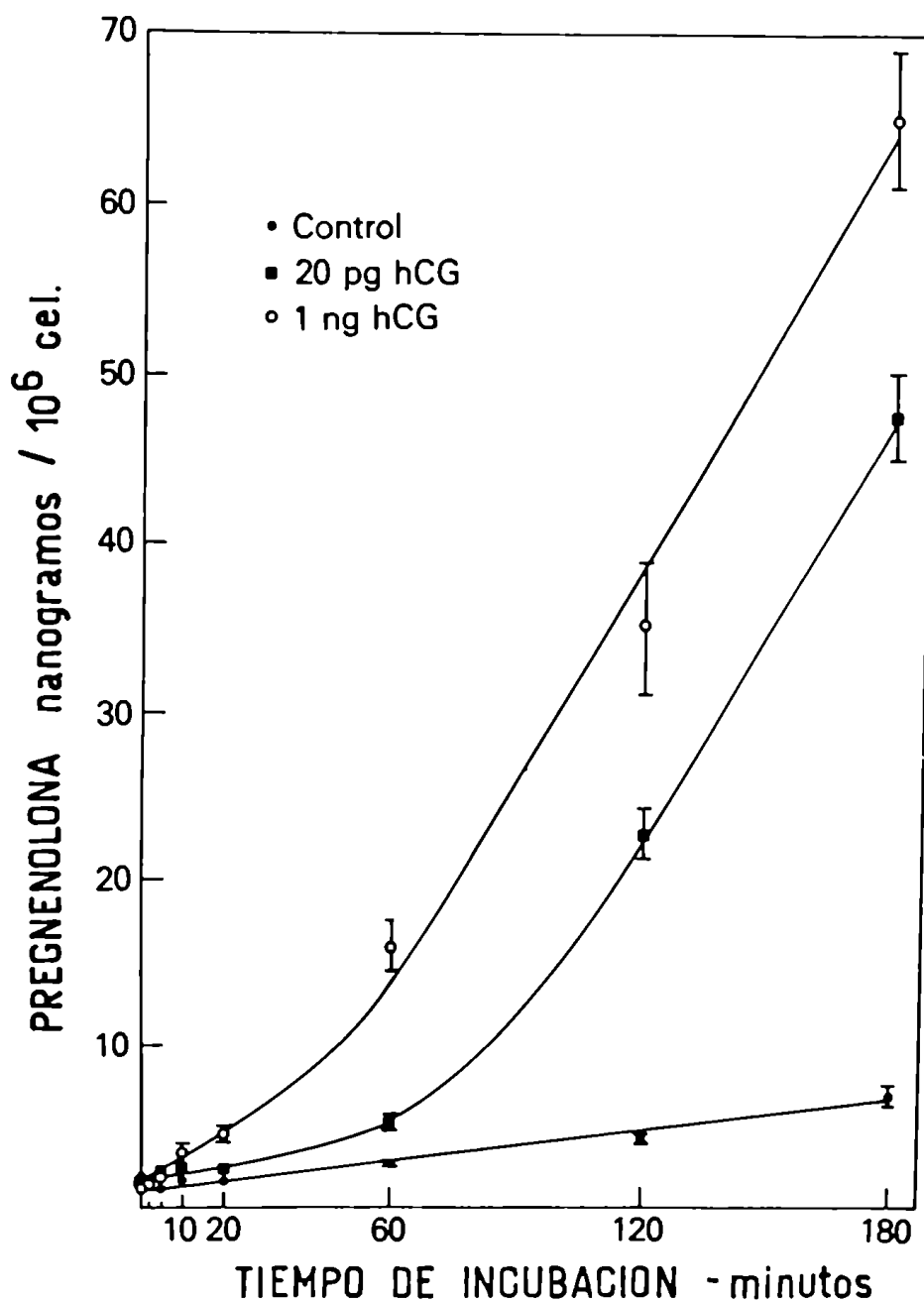


Fig. 27: Curva de tiempo para la producción de Pregnenolona basal y estimulada por hCG (20 pg, 1 ng) "in vitro" en células de Leydig purificadas. Cada punto representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

de este esteroide, no comenzaron hasta después de este intervalo (Fig. 27). Cuando las células fueron estimuladas con una dosis supramáxima de hCG (40 pM), nuevamente se observaron aumentos significativos a los 5 minutos, y a partir de allí incrementos casi lineales. La forma en que la Pregnenolona fue estimulada por hCG durante los primeros 15 minutos, se diferenció de la Testosterona que mostró un período de retardo de 20 - 30 minutos independientemente de la dosis empleada para la estimulación (36,208 ). Estos hallazgos previos fueron confirmados en el presente estudio, utilizando células intersticiales purificadas (Fig. 28) donde el período de retardo estuvo entre los 10 y 20 minutos para la dosis 0.8 pM y fue de 10 minutos para la dosis mayor (40 pM). Se podría pensar que las cuatro etapas biosintéticas necesarias para convertir Pregnenolona a Testosterona son las responsables de las pequeñas diferencias observadas en las curvas de tiempo de ambos esteroides.

Se ha demostrado ( 36,39 ) que la síntesis de RNA y de proteínas es necesaria para que se produzca la estimulación

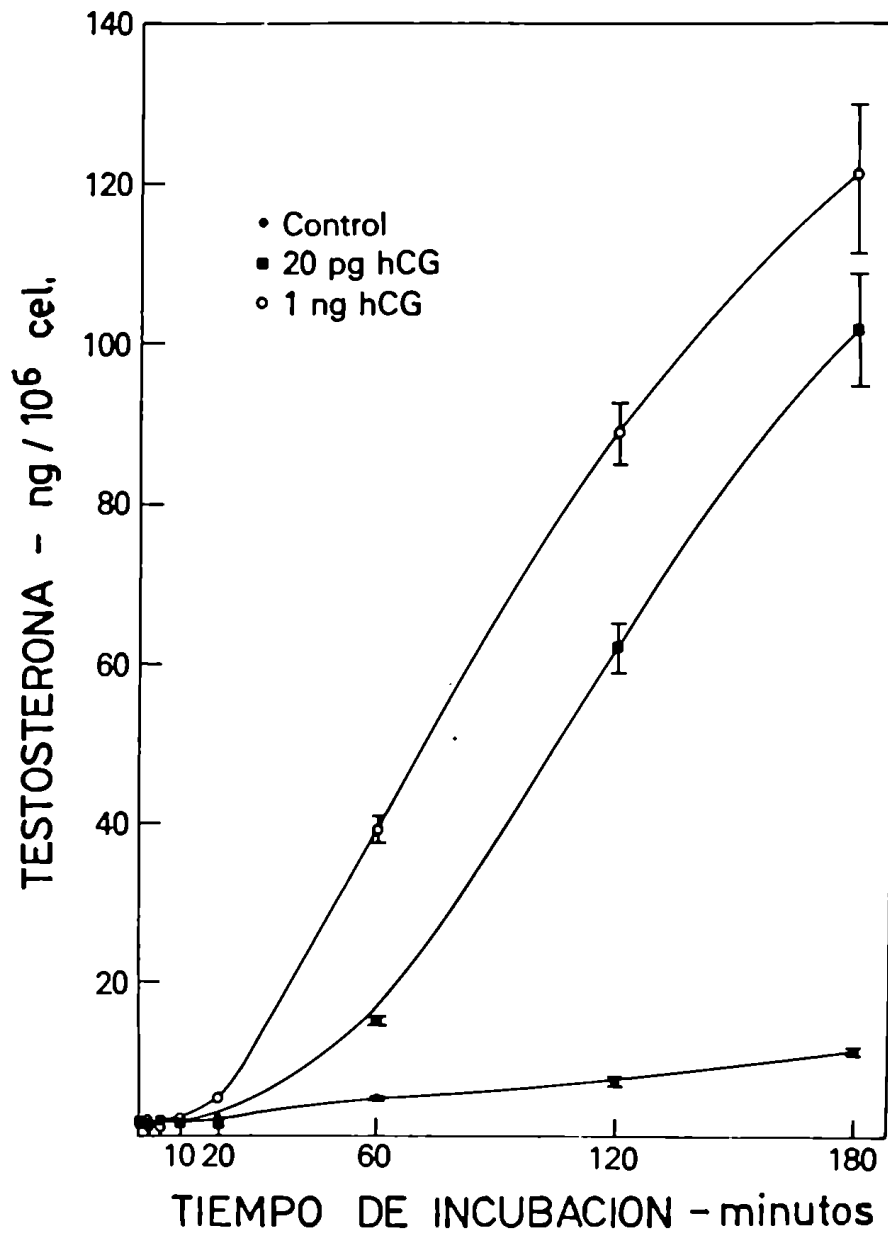


Fig. 28: Curva de tiempo para la producción de Testosterona basal y estimulada por hCG (20 pg, 1 ng) "in vitro" en células de Leydig purificadas. Cada punto representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.



gonadotrófica de la esteroidogénesis en células de Leydig, y estos resultados sugirieron la dependencia de dicha estimulación de una proteína lábil. Si la formación de tal proteína fuera necesaria para mediar la iniciación de la esteroidogénesis (este requerimiento no ha sido aún demostrado), esto podría explicar la respuesta retardada de la Testosterona a la estimulación hormonal.

Ya que para la producción de Pregnenolona estimulada por hCG se demostró un período más corto, fue de interés comparar los efectos de dos inhibidores de la síntesis proteica Actinomicina D y cicloheximida sobre la producción de este esteroide (Fig. 29) y de Testosterona (Fig. 30). El grado de inhibición producido por ambos inhibidores en cantidades crecientes fue casi idéntico para ambos, indicando ésto que la síntesis proteica es necesaria en eventos que preceden a las etapas biosintéticas que convierten pregnenolona a Testosterona.

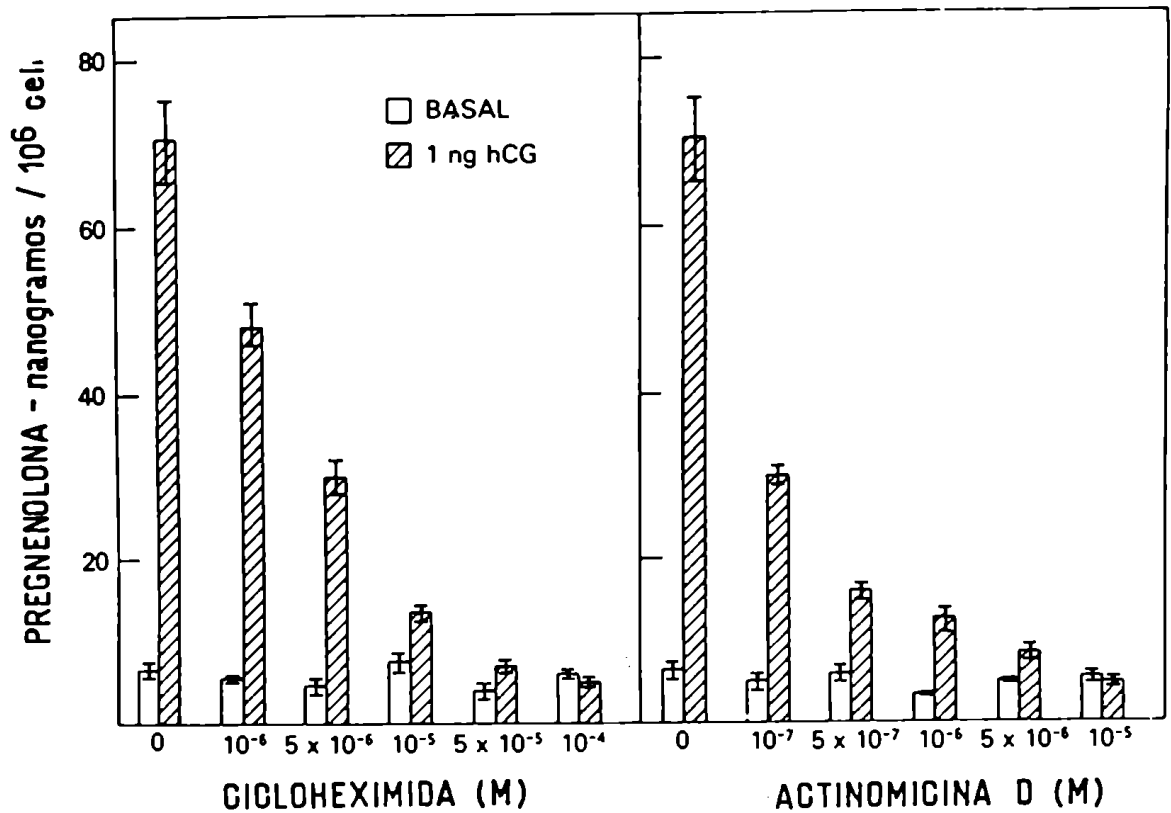


Fig. 29: Efecto de la presencia de distintas concentraciones de cicloheximida y actinomicina, en el medio de incubación de células de Leydig purificadas sobre la producción de Pregnenolona basal y estimulada por 1 ng hCG. Cada barra representa el valor medio (n=3) ± DS.

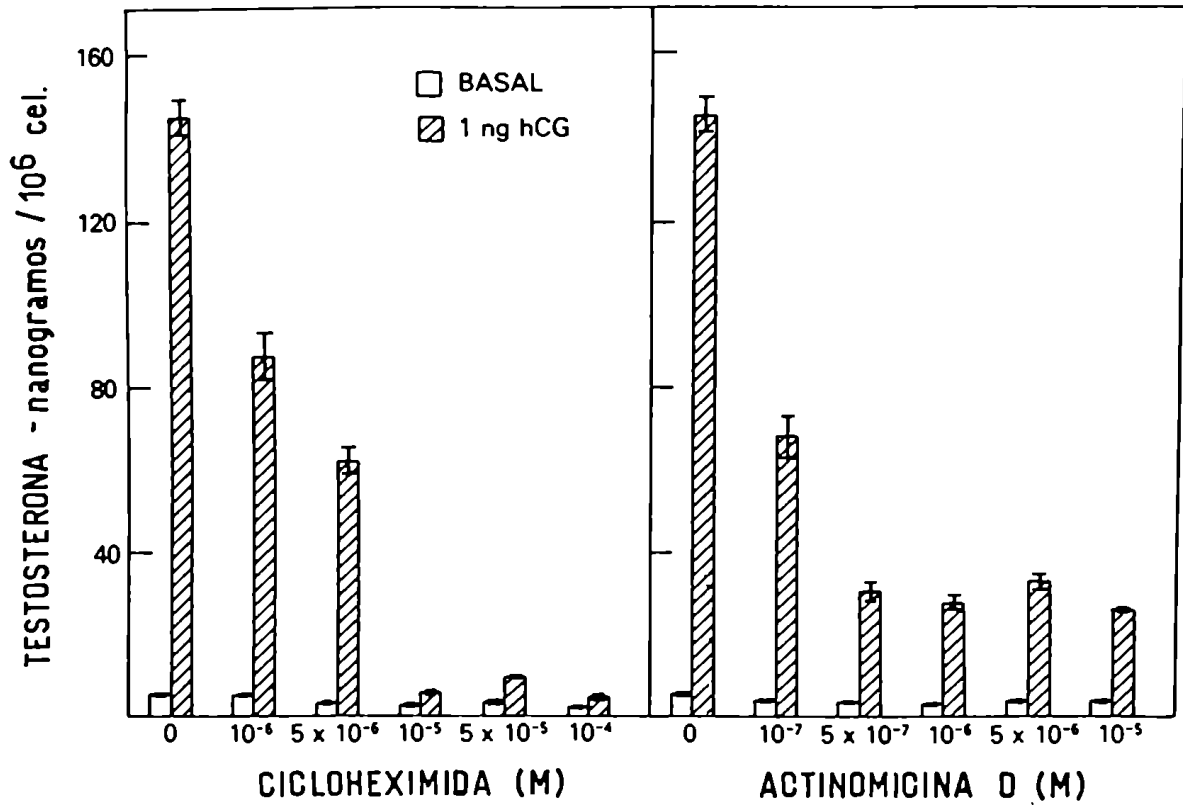


Fig. 30: Efecto de la presencia de distintas concentraciones de cicloheximida y actinomicina en el medio de incubación de células de Leydig purificadas, sobre la producción de Testosterona basal y estimulada por 1 ng hCG. Cada barra representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

PRODUCCION DE PREGNENOLONA EN RATAS DESENSIBILIZADAS POR ADMINISTRACION DE UNA UNICA INYECCION ENDOVENOSA DE hCG.

En los experimentos presentados previamente (Figuras 1 a 19) se demostró que, el tratamiento con una única inyección endovenosa de hCG o con LH-RH en forma subcutánea, producía una disminución del número de sitios receptores para LH/hCG que fue acompañada por una producción disminuída de cAMP y de Testosterona en incubaciones "in vitro" tres días luego del tratamiento.

La producción de Testosterona disminuída en células de Leydig desensibilizadas, no pudo ser restablecida por estímulo con altas concentraciones de hCG (hasta  $10^{-8}$  M) ni por adición de  $Bt_2cAMP$  ( $10^{-3}$  M) o de toxina colérica a concentraciones que produjeron niveles normales de cAMP. Se demostró también que la capacidad de unión del cAMP no estaba alterada en el estado desensibilizado, indicando que los niveles de proteína quinasa no estaban reducidos. Estos resultados sugirieron que la regulación negativa de los sitios receptores estaban acompañados por una segunda lesión más allá del nivel del cAMP y de la proteína quinasa y

probablemente en el camino biosintético responsable de la producción de andrógenos.

Los experimentos que se describirán a continuación se realizaron para elucidar la naturaleza y el sitio de esta segunda lesión en el camino biosintético. En la figura 31 se muestra la producción de Testosterona (panel superior) y de Pregnenolona (panel inferior) en células de Leydig de animales tratados con hCG en forma endovenosa, que produjeron distinto grado de pérdida de receptores (entre paréntesis en el gráfico). Una única inyección endovenosa de 1 ug de hCG, produjo una disminución del 70 % en el número de sitios receptores, que estuvo acompañada por una disminución del 50 % en la respuesta máxima de la Testosterona bajo estímulo con hCG (Fig. 31, arriba). Sin embargo, cuando se midió la producción de Pregnenolona (en el mismo grupo experimental), la respuesta fue normal con respecto al control (Fig. 31, abajo).

Estos resultados sugirieron la presencia de una lesión en aquel segmento del camino biosintético de esteroides que completa la formación de Testosterona a partir de Pregnenolona.

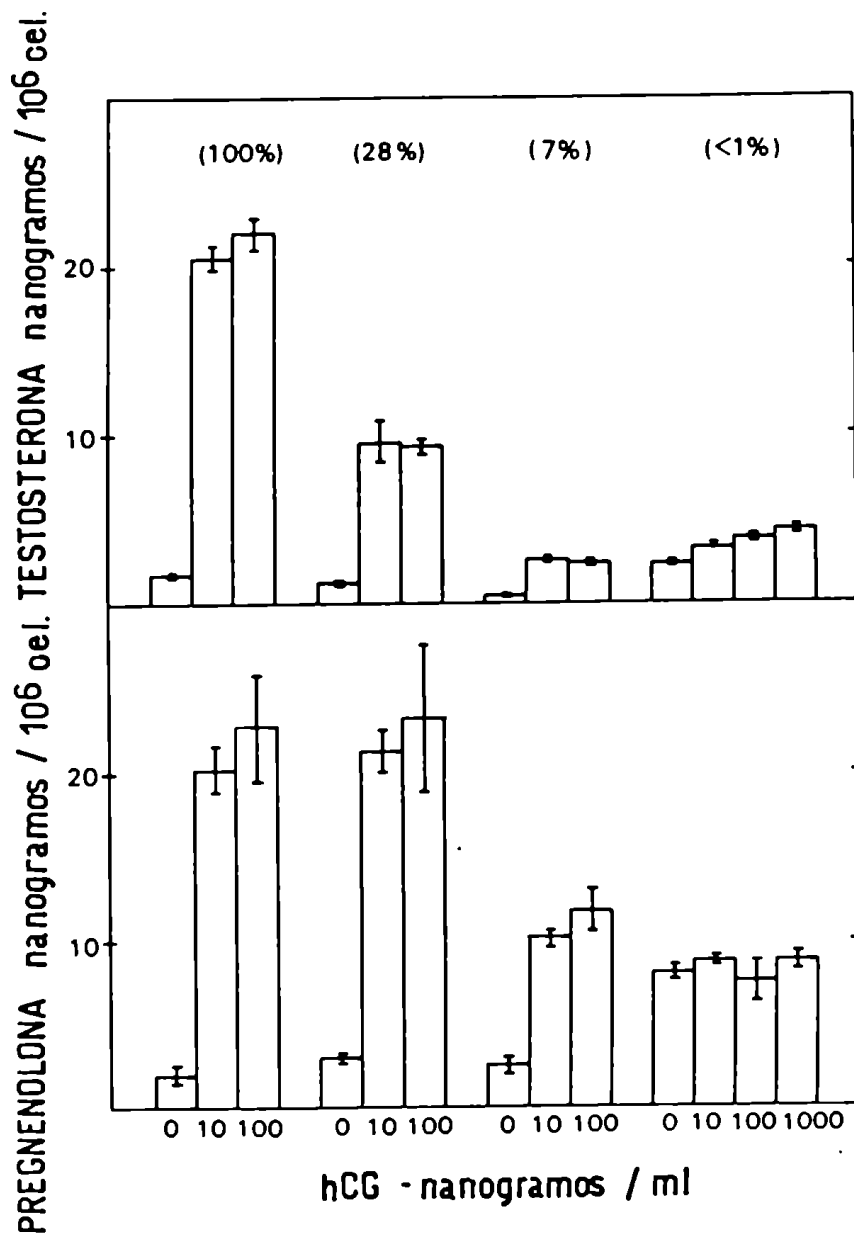


Fig. 31: Producción de Testosterona (panel superior) y de Pregnenolona (panel inferior) "in vitro" por células de Leydig aisladas, provenientes de animales desensibilizados con dosis crecientes de hCG. Se estudió la producción basal y estimulada por 10 y 100 ng de hCG en el medio de incubación. En la parte superior del gráfico figuran entre paréntesis el porcentaje de receptores remanentes luego de 3 días del tratamiento agudo. Cada barra representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS .

Cuando el número de sitios receptores disminuyó aún más, a valores del 7 % del control, la respuesta de la Testosterona a la hormona trófica se redujo un 90 %, mientras que la producción de Pregnenolona estuvo reducida a valores del 50 %. Cuando se indujo una disminución de los sitios receptores aún mayor (> 99 %) por tratamiento con dosis muy altas de hCG (> 10 ug), las células no pudieron ser estimuladas in vitro tanto en la producción de Testosterona como de Pregnenolona (Fig. 31). Luego de la administración de esta dosis alta de hCG, la producción basal de Pregnenolona estuvo aumentada y esto fue probablemente el reflejo de una estimulación provocada por la persistente ocupación de los sitios receptores.

En la figura 32 se muestra la respuesta de la Pregnenolona a un amplio rango de concentraciones de hCG (0.01 a 1000 pM) en células de Leydig controles y desensibilizadas. La estimulación máxima por hCG en células controles y células desensibilizadas con la dosis más baja de hCG (200 ng) y con 28 % de sitios receptores remanentes luego de 3 días, fue de 10 veces, con una respuesta máxima idéntica de 100 ng

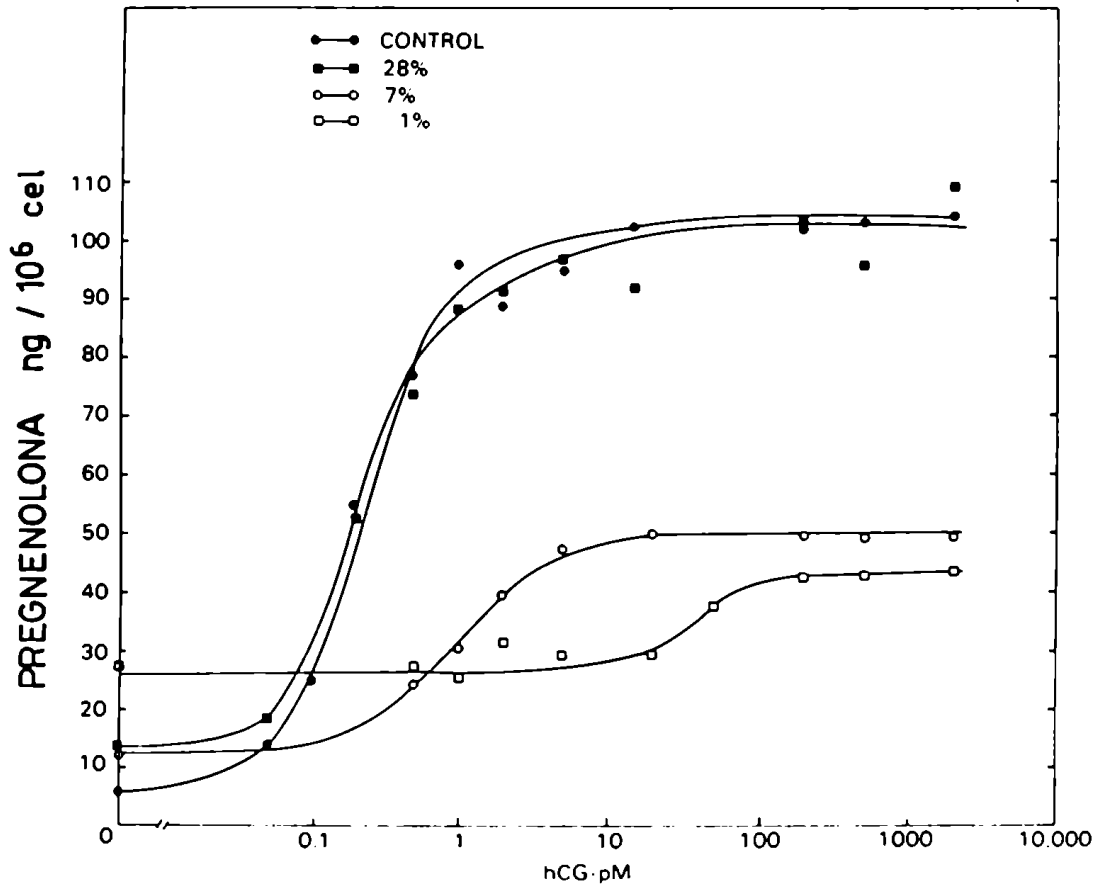


Fig. 32: Producción de Pregnenolona estimulada por dosis crecientes de hCG en el medio de incubación de células de Leydig obtenidas a partir de animales con distinto grado de desensibilización. Los valores 28 %, 7 % y < 1 % representan el porcentaje de receptores remanentes 3 días después del tratamiento.



de Pregnenolona/  $10^6$  células y también la misma DE50 de 0.2 pM de hCG. Sin embargo se encontraron marcados cambios en la respuesta máxima y en la sensibilidad, cuando los receptores disminuyeron en un 93 % y 99 %. La estimulación máxima con hCG fue a valores del 400 % y 50 % respectivamente, con un aumento de dos veces en los niveles basales de esteroide en este último grupo. En ambos casos se observó una marcada disminución en la sensibilidad al estímulo gonadotrófico, con DE50 de 1.0 y 70 pM.

La figura 33 resume los valores encontrados para la producción basal y estimulada por hCG "in vitro" de Pregnenolona, en varios grupos experimentales en que se han producido grados variables de disminución de sitios receptores.

Como puede verse la producción basal de Pregnenolona estuvo aumentada en todos los casos, mientras que la producción del mismo esteroide estimulada por hCG estuvo normal o aumentada cuando la disminución de sitios receptores fue moderada, mientras que estuvo disminuída en aquellos grupos en que los sitios receptores bajaron a niveles menores del 10 %. Estos resultados indicaron la presencia de dos tipos

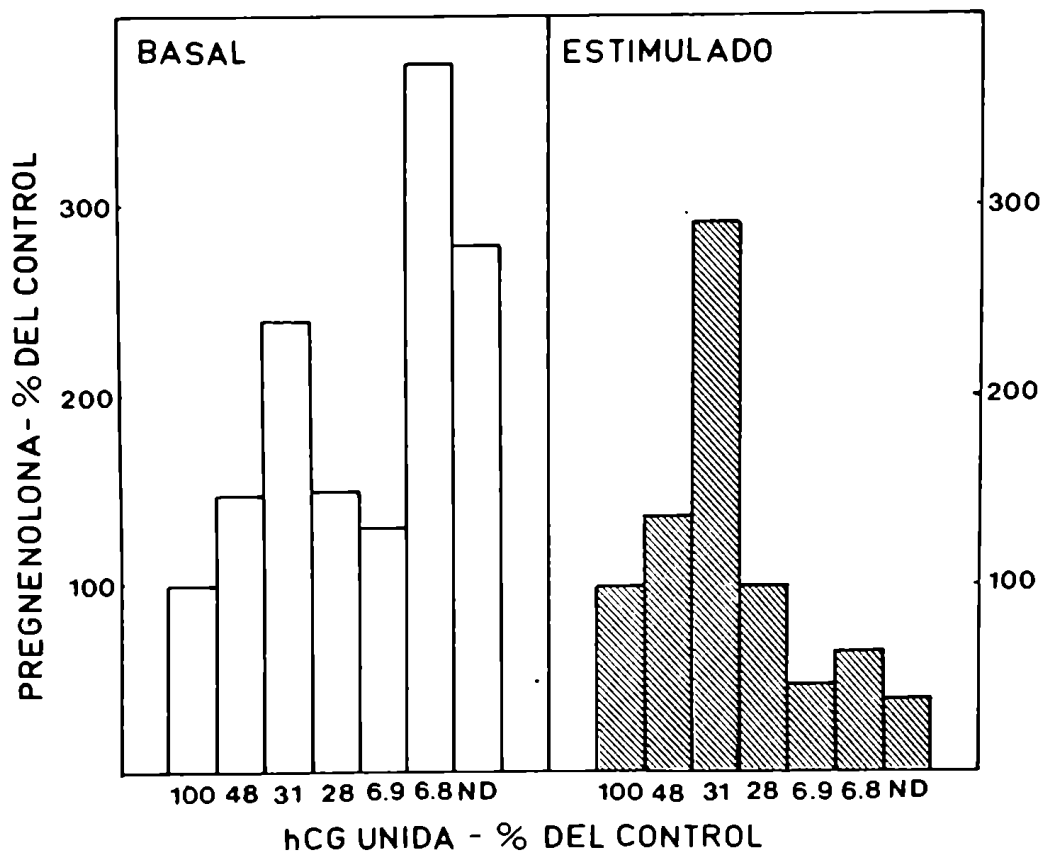


Fig. 33: Producción basal de Pregnenolona (panel derecho) y estimulada por una dosis supramáxima de hCG (panel izquierdo) expresada como porcentaje del grupo control. En abcisas figura el porcentaje de receptores para LH remanentes en distintos grupos experimentales, luego del tratamiento desensibilizante.

distintos de lesiones, una a nivel de alguna de las etapas que convierten Pregnenolona a Testosterona, y la otra anterior a la producción de la Pregnenolona.

LOCALIZACION DE LA LESION PRODUCIDA POR TRATAMIENTO CON hCG IN VIVO EN EL CAMINO BIOSINTETICO QUE CONVIERTE PREGNENOLO-NA A TESTOSTERONA.

En la figura 34 se muestran los resultados obtenidos en incubaciones realizadas con células controles y desensibilizadas en presencia de cianocetona durante la estimulación con hCG, toxina colérica, y dibutiril cAMP. Como se describió anteriormente el bloqueo de la  $\Delta_5-3\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa con cianocetona, inhibe completamente la conversión de Pregnenolona a Progesterona y desvía el metabolismo de la Pregnenolona por el camino  $\Delta_5$ , para formar principalmente  $\Delta_5$ -Androstendiol (80 %) y Dehidroepiandrosterona (20 %) (panel izquierdo de la figura).

En las células desensibilizadas, se observó acumulación de Pregnenolona y  $17\alpha$  hidroxipregnenolona, junto con una muy pequeña producción de Dehidroepiandrosterona y

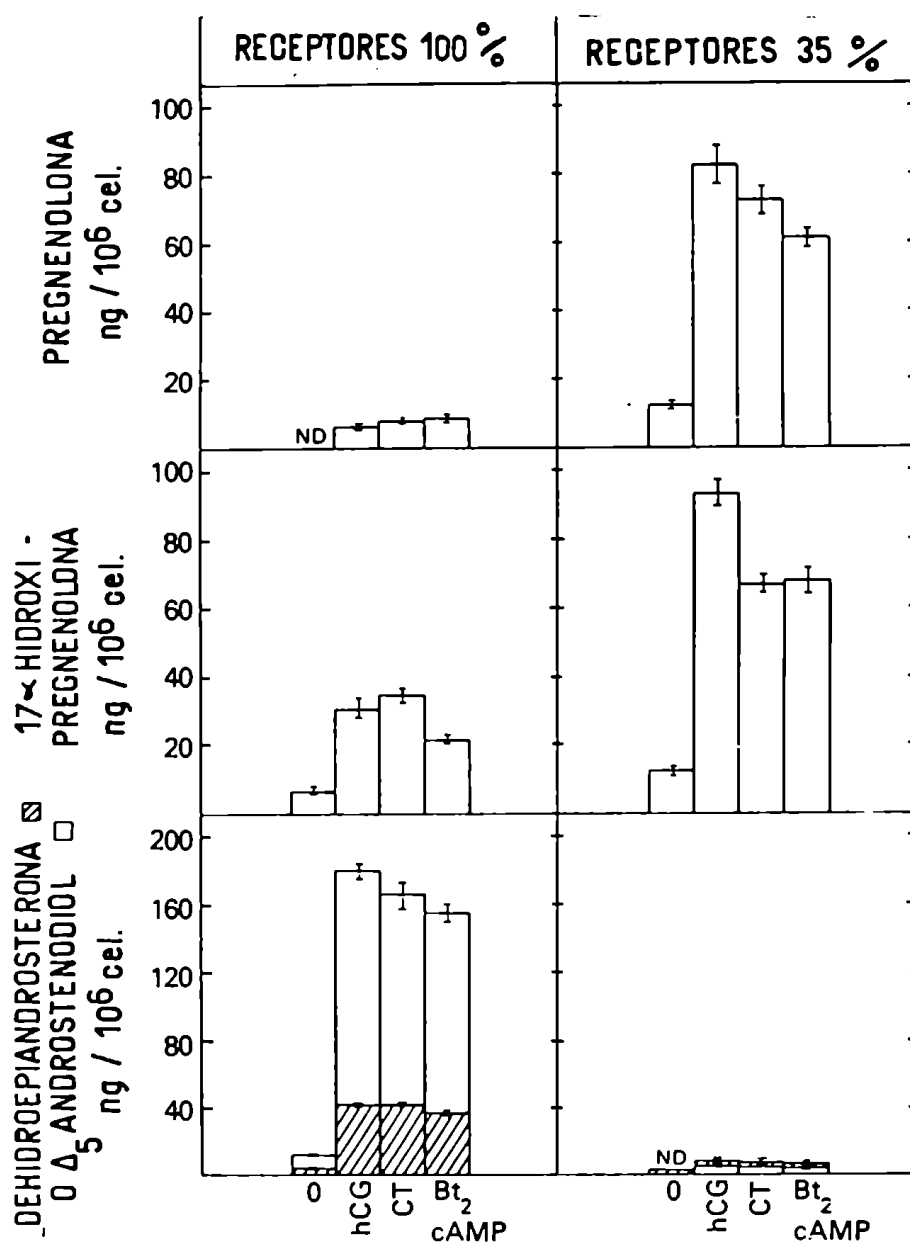


Fig. 34: Producción de Pregnenolona, 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, Dehidroepiandrosterona y  $\Delta_5$ -Androstenodiol, durante la estimulación de células de Leydig controles, con 100 % de los receptores (izquierda) y de las células desensibilizadas con 35 % de los receptores (derecha), con dosis estimulatorias máximas de hCG (2nM), toxina colérica (50 ug) y dibutiril cAMP (1mM). La producción de estos esteroides fue determinada en presencia de cianocetona en el medio de incubación. Cada barra representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

$\Delta_5$ -Androstenediol (panel derecho de la figura). Estos resultados son consistentes con una marcada disminución de la actividad de la 17,20-desmolasa, que conduce a la acumulación de esteroides precursores por encima de esta etapa biosintética.

Cuando las células controles (100 % de sitios receptores) se incubaron con hCG,  $Bt_2cAMP$ , o toxina colérica en ausencia de inhibidores (Fig. 35), se observó que el principal esteroide acumulado era la Testosterona y en cantidades menores la Androstenediona (1:4). Cuando se incubaron células desensibilizadas (35 % de sitios receptores) se observó una acumulación importante de Progesterona y  $17\alpha$  hidroxiprogesterona en el camino  $\Delta_4$ , que estuvo acompañada por una disminución marcada en la producción de Testosterona a 30 % de los valores controles. Asimismo en el metabolismo por la vía  $\Delta_5$ , se observó acumulación de Pregnenolona y  $17\alpha$  hidroxipregnenolona aunque no se evidenció aumento en Dehidroepiandrosterona o  $\Delta_5$ -Androstenediol. Nuevamente se puso en evidencia en este experimento realizado en ausencia de inhibidores, que la lesión esteroideogé-

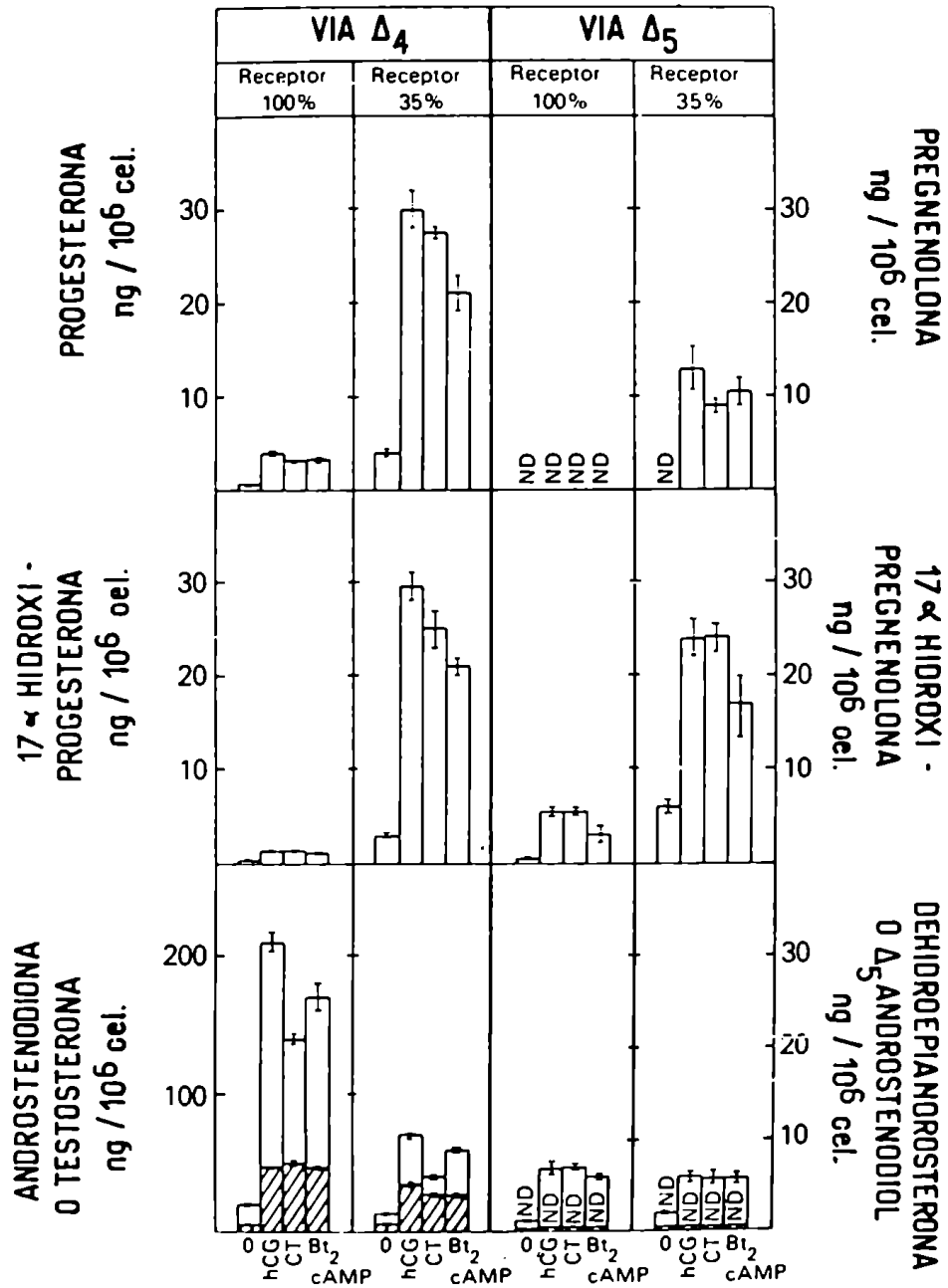


Fig. 35: Producción de Pregnenolona, 17 $\alpha$  hidroxipregnenolona, Dehidroepiandrosterona o  $\Delta_5$ -Androstenodiol (vía  $\Delta_5$ , derecha) y Progesterona, 17 $\alpha$  hidroxiprogesterona, Androstenediona y Testosterona (vía  $\Delta_4$ , izquierda), por células de Leydig con 100 % y 35 % de los sitios receptores. La estimulación fue realizada con hCG (2 nM) toxina colérica (50 ug) y dibutiril cAMP (1 mM), en ausencia de inhibidores de la esteroidogénesis. Cada barra representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

nica en células desensibilizadas está localizada en la etapa en que la desmolasa convierte los esteroides  $17\alpha$  hidroxilados a andrógenos, produciendo acumulación de los esteroides intermediarios sintetizados antes de este punto.

#### LOCALIZACION DE LA LESION ESTEROIDOGENICA PRODUCIDA POR TRATAMIENTO CON LH-RH IN VIVO.

En la figura 36 se muestra la producción de Pregnenolona (panel superior) en presencia de inhibidores de la esteroidogénesis y la de Testosterona (panel inferior) en ausencia de inhibidores, en células de Leydig de animales controles y tratados con LH-RH. Las células desensibilizadas (50 % y 40 % de sitios receptores) no mostraron pérdida de respuesta máxima con respecto a la Pregnenolona a pesar de que se observó una marcada disminución en el número de sitios receptores y en la capacidad de producir Testosterona bajo estímulo con hCG y  $Bt_2cAMP$ .

En las células de Leydig de animales tratados con 1, 10 y 100 ug de LH-RH en forma subcutánea, en los que se había demostrado una disminución en la producción máxima de

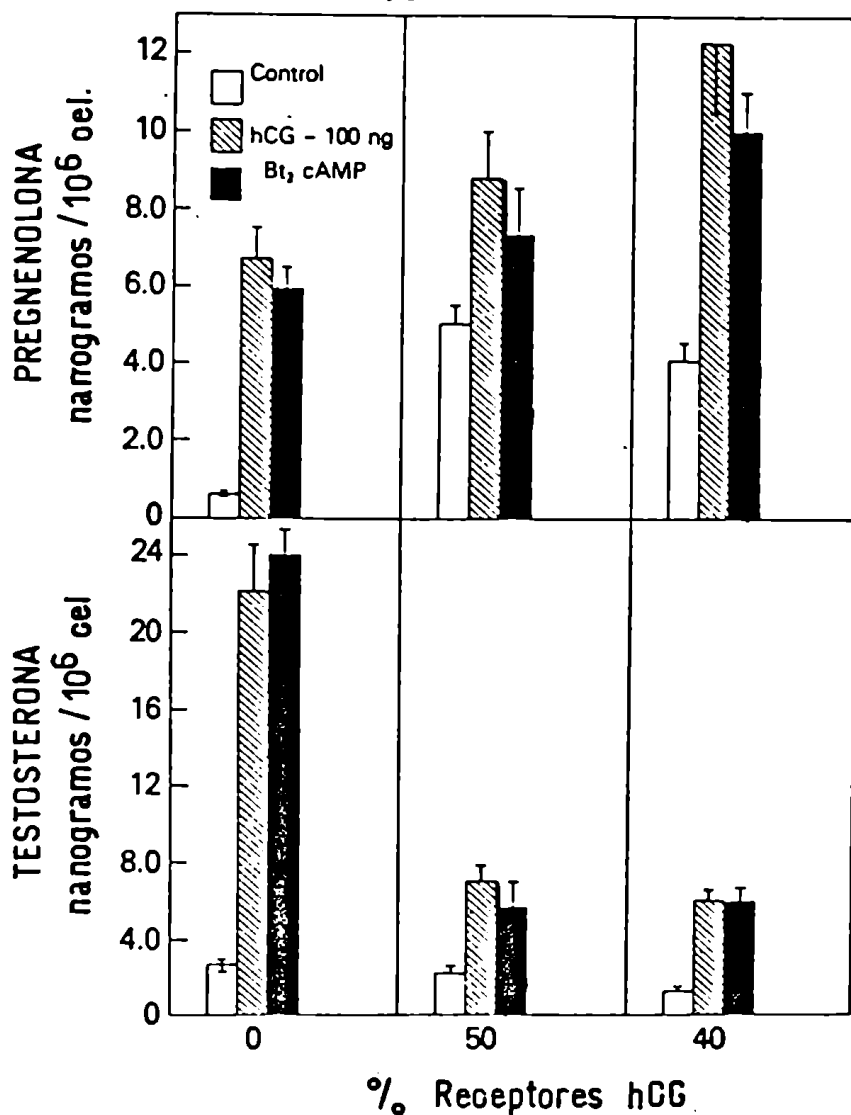


Fig. 36: Pregnenolona (panel superior) y Testosterona (panel inferior) producidas en una incubación de células de Leydig provenientes de animales normales y desensibilizados 2 días después de una única inyección de LH-RH de 1 o 10 ug. El porcentaje de receptores para LH remanentes luego del tratamiento fue 50 y 40 % respectivamente. La Pregnenolona fue medida en presencia de inhibidores de la esteroidogénesis. La estimulación se realizó con 100 ng de hCG o dibutiril-cAMP 1 mM. Cada barra representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.



Testosterona bajo estímulo con hCG,  $Bt_2cAMP$ , o toxina colé-rica (Fig. 19) se estudió la producción de Progesterona y de  $17\alpha$  hidroxiprogesterona en incubaciones in vitro con los 3 estímulos antes mencionados (Fig. 37).

Los tres estímulos indujeron aumentos significativos en la producción de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona y Progesterona en los grupos desensibilizados por 10 ug y 100 ug de LH-RH. Como se había observado previamente en células de Leydig de animales tratados con hCG en forma endovenosa, estos resultados indicaron que la disminución en la producción de andrógenos en los animales tratados con LH-RH, se debía a un defecto en la biosíntesis de andrógenos.

Los efectos del tratamiento con LH-RH sobre los receptores testiculares de LH y la respuesta de la Testosterona estuvieron relacionados con la dosis de LH-RH administrada, pero se observó una variabilidad moderada en los niveles de disminución de sitios receptores producidos por una dosis dada del factor liberador. En general, una pérdida de sitios receptores mayor del 50 % estuvo acompañada por una lesión en el camino esteroideogénico y se observó acumulación

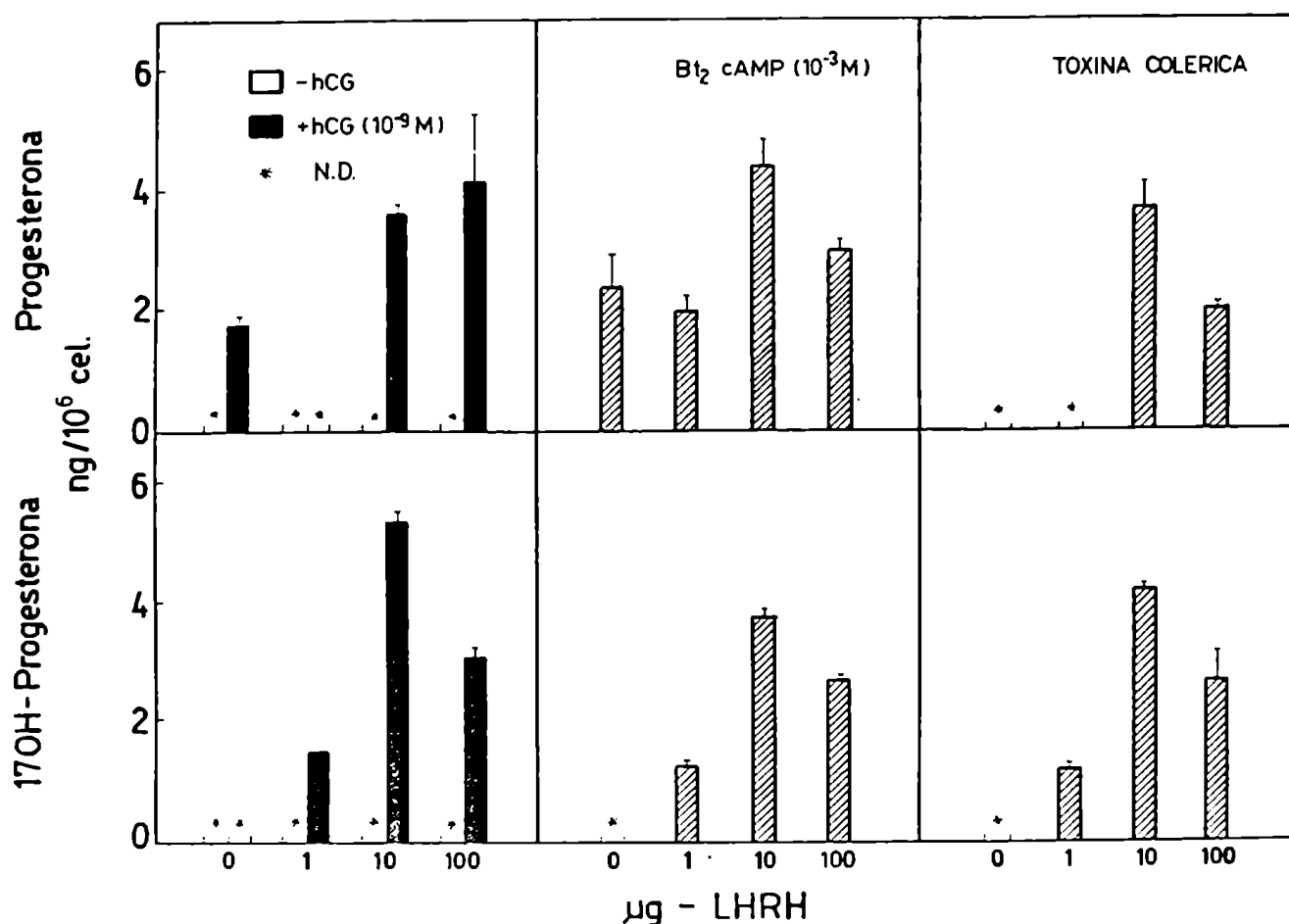
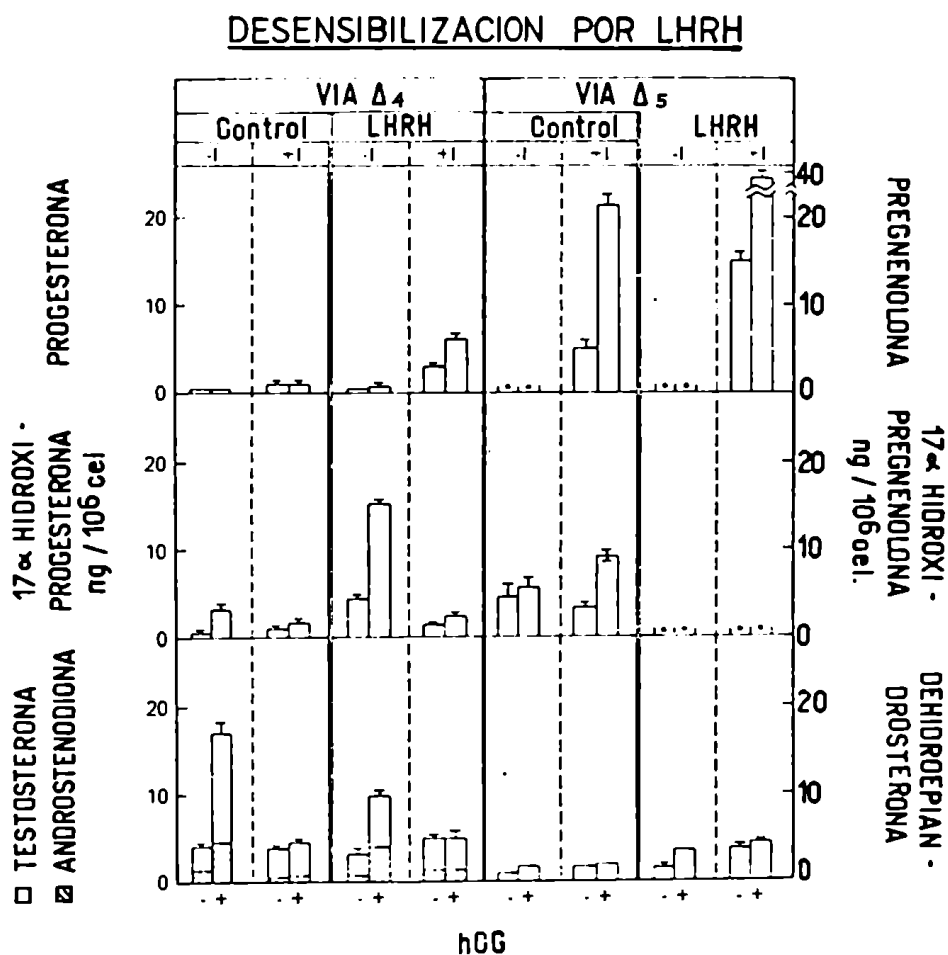


Fig. 37: Producción de Progesterona (arriba) y de 17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona (abajo) por células de Leydig preparadas a partir de animales tratados con distintas dosis de LH-RH. Las dosis utilizadas para el tratamiento se indican en la abcisa. Las células fueron incubadas en condiciones basales y con los siguientes estímulos: hCG 1 nM (izquierda), Bt<sub>2</sub>cAMP (medio) y toxina colérica 10<sup>-7</sup> M (derecha). El porcentaje de receptores para LH remanentes luego del tratamiento con 1, 10 y 100 ug de LH-RH fue respectivamente: 33 %, 26 % y 11 % del valor control. N.D.: no detectable. Cada barra representa el valor medio (n=3)  $\pm$  DS.

de esteroides precursores. Sin embargo, cuando la pérdida de receptores fue menor, no hubo lesión en la esteroidogénesis y la capacidad secretoria de Testosterona estuvo significativamente aumentada.

En la fig. 38 se muestra la producción de distintos esteroides en presencia o en ausencia de inhibidores en células de Leydig controles y desensibilizadas con 10 ug de LHRH que produjo una disminución importante del número de receptores (77 %). Las células de animales controles produjeron principalmente Testosterona y Androstenodiona (en una relación molar 3:1) en condiciones basales o durante la estimulación con hCG, con una pequeña acumulación de  $17\alpha$  hidroxiprogesterona y  $17\alpha$  hidroxipregnenolona. Los valores para Progesterona y Dehidroepiandrosterona fueron muy bajos y la Pregnenolona indetectable. Por otro lado, las células controles incubadas en presencia de cianocetona y spironolactona produjeron principalmente Pregnenolona bajo condiciones basales y durante el estímulo con hCG. En ausencia de inhibidores en las células desensibilizadas, la producción basal de Testosterona fué esencialmente la misma que



\* No detectable  
media  $\pm$  SE (n=4)

Fig. 38: Producción de distintos esteroides en ausencia (-I) o en presencia (+I) de inhibidores de la esteroidogénesis en la vía  $\Delta_4$  (izquierda) y  $\Delta_5$  (derecha) de la esteroidogénesis. Las células de Leydig provienen de animales controles o tratados con una única dosis de LH-RH en forma subcutánea. Cada barra representa el valor medio (n = 3)  $\pm$  DS.

en los controles, mientras que la estimulada por hCG, estuvo disminuída en un 50 %. En estas células se observó nuevamente un aumento en la producción de  $17\alpha$  hidroxiprogesterona basal y estimulable por hCG. Se observaron también incrementos menores en la producción de Progesterona y Dehidroepiandrosterona. Los aumentos en la producción basal de  $17\alpha$  hidroxiprogesterona observados durante la incubación in vitro; estuvieron también reflejados en los incrementos en los valores séricos para este esteroide ( $18 \pm 3$  a  $52 \pm 8$  ng/100 ml). La Testosterona sérica no estaba disminuída y esto está de acuerdo con el mismo comportamiento observado en la producción basal de este esteroide "in vitro".

La elevación en la producción de  $17\alpha$  hidroxiprogesterona (Fig. 38) solamente o en conjunto con Progesterona (Fig. 37) es consistente con una deficiencia en la actividad de la 17-20 desmolasa y probablemente de la  $17\alpha$  hidroxilasa.

Cuando el tratamiento realizado con LH-RH produjo una disminución menor del 50 % en el número de sitios receptores

no se observó disminución en la respuesta máxima de la Testosterona (Tabla IV), sino que por el contrario la capacidad esteroidogénica estuvo aumentada. De esta forma células con 40 % de disminución en el número de sitios receptores mostraron un 25 % de aumento en los niveles basales de esteroide y un 200 % de aumento en los niveles estimulables por hCG. Durante la estimulación con hCG, todos los metabolitos esteroideos se incrementaron de 2 a 10 veces, observándose los aumentos relativos mayores, para la  $17\alpha$  hidroxiprogesterona y la Androstenodiona (10 y 5 veces, respectivamente). Sin embargo, los dos esteroides que contribuyeron fundamentalmente al incremento total fueron: Testosterona (de 134 a 270 ng/ $10^6$  células) y Androstenodiona (de 7.9 a 35.2 ng/ $10^6$  células). En esta situación en que la producción de Testosterona estaba francamente aumentada, los incrementos en los esteroides precursores, podrían deberse a que se ha superado la capacidad máxima de estas enzimas (17,20-desmolasa y  $17\alpha$  hidroxilasa).

TABLA IV

Grupo	hCG	Total	Testosterona	17 $\alpha$ -hidroxi- progesterona	17 $\alpha$ -hidroxi- pregnenolona	Androsteno- diona	DHA	Pregnenolona
ng					ng/10 <sup>6</sup> células			
	0	30	28 $\pm$ 0.8	0.17 $\pm$ 0.02	0	1.42 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.05	0
Control	100	144	134 $\pm$ 6.0	0.50 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.07	7.95 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.15
	0	39	33 $\pm$ 1.50	0.64 $\pm$ 0.03	3.34 $\pm$ 0.69	1.86 $\pm$ 0.09	0.45 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.24
LH-RH	100	317	270 $\pm$ 10	6.02 $\pm$ 0.13	2.05 $\pm$ 0.42	35.20 $\pm$ 0.85	3.13 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.11

Producción de esteroides por células de Leydig controles (100 % sitios receptores) y desensibilizados (60 % sitios receptores) por tratamiento de los animales dos días antes, con una única dosis de LH-RH (1 ug). La producción basal y estimulada por hCG "in vitro" de distintos esteroides, se expresa como el valor medio  $\pm$  ES de incubaciones por cuadruplicado.

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS EN ANIMALES TRATADOS CON UNA UNICA DOSIS DE hCG EN FORMA SUBCUTANEA

En contraste a los efectos del tratamiento con hCG en forma endovenosa o con LH-RH, la producción máxima de Testosterona bajo estímulo con hCG estuvo mantenida a niveles controles en los animales tratados con 10 ug de hCG en forma subcutánea, en los que la población de sitios receptores había disminuído a valores de 35 % del control. Los resultados para la producción de Testosterona en este grupo experimental se han ya mostrado en las figuras 20 y 21. En el mismo medio de incubación de estas células se observó una pequeña acumulación de Progesterona y 17 $\alpha$ hidroxiprogesterona con respecto a los controles tanto en incubaciones en presencia como en ausencia de MIX (figuras 39, 40). Estos resultados podrían estar mostrando una pequeña disminución en las actividades de la 17,20 desmolasa y de la 17 $\alpha$ hidroxilasa.



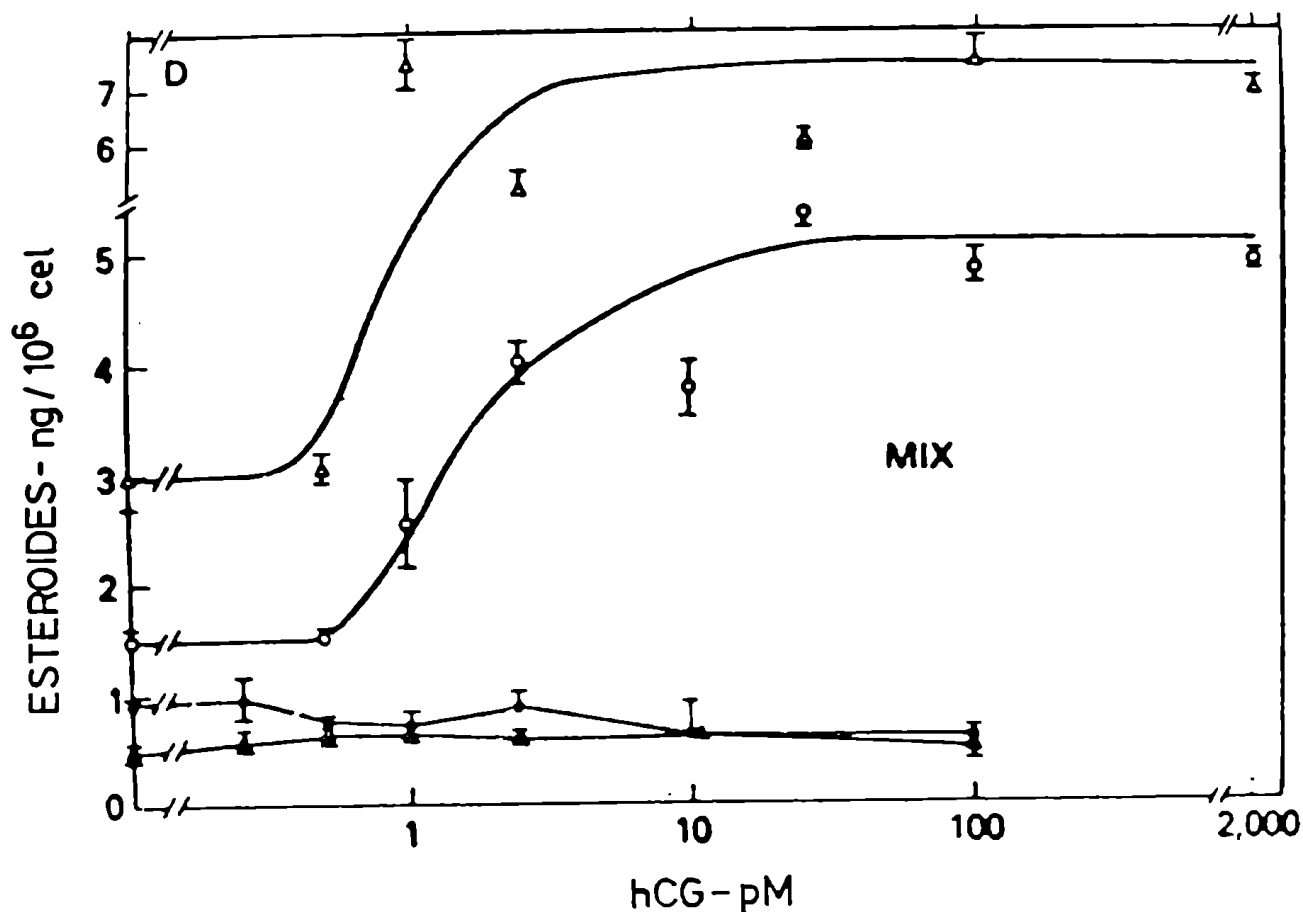


Fig. 39: Producción de Progesterona y  $17\alpha$ -Hidroxiprogesterona en función de concentraciones crecientes de hCG en el medio de incubación. La incubación se realizó en presencia de MIX. Las células de Leydig provienen de animales no tratados o tratados con una dosis única de hCG en forma subcutánea. Cada punto representa el valor medio ( $n=3$ )  $\pm$  DS.

- No tratados > Progesterona
- Tratados > Progesterona
- ▲-▲ No tratados >  $17\alpha$ -Hidroxiprogesterona
- △-△ Tratados >  $17\alpha$ -Hidroxiprogesterona

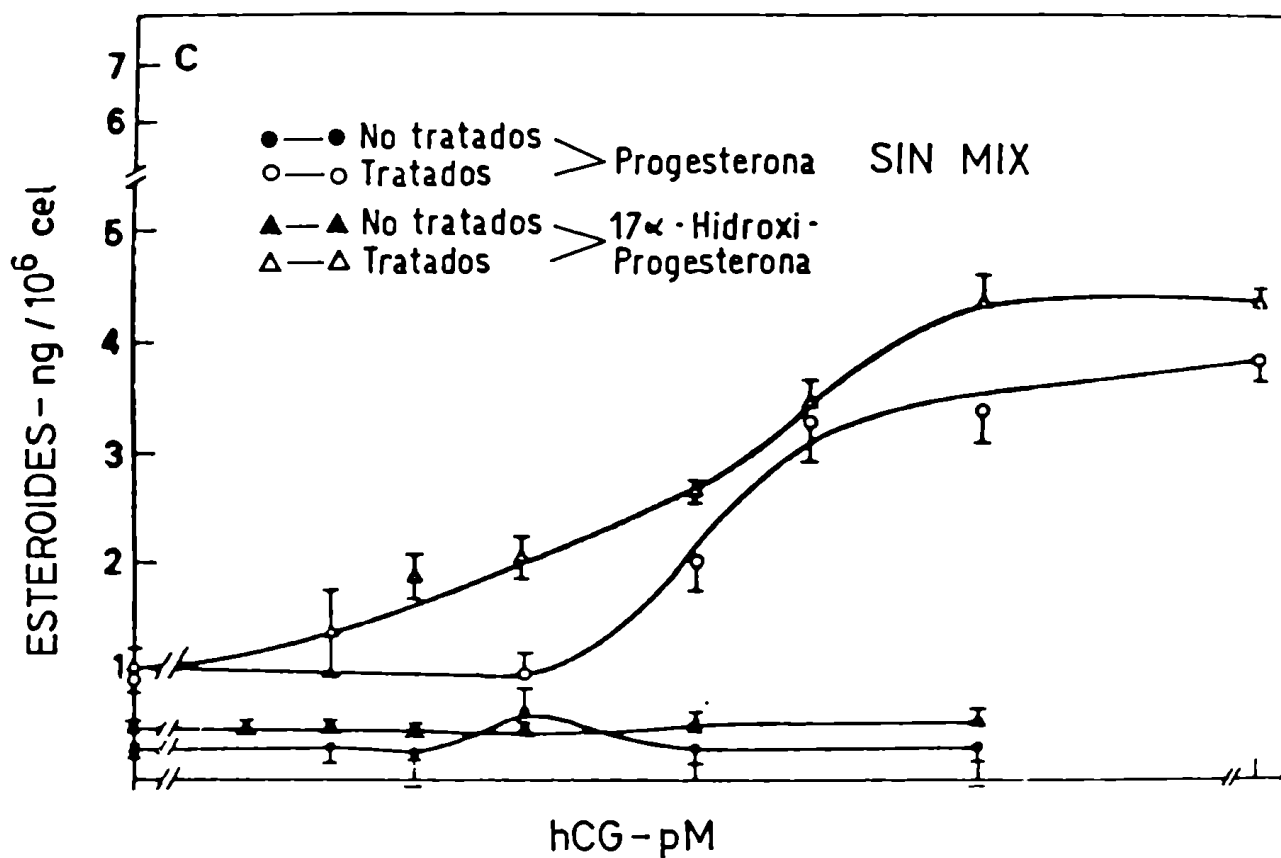


Fig. 40: Producción de Progesterona y  $17\alpha$ -Hidroxiprogesterona en función de concentraciones crecientes de hCG en el medio de incubación. La incubación se realizó en ausencia de MIX. Las células de Leydig provienen de animales no tratados o tratados con una dosis única de hCG en forma subcutánea. Cada punto representa el valor medio ( $n=3$ )  $\pm$  DS.

PAPEL DE LOS ESTROGENOS EN LA LESION ESTEROIDOGENICA INDUCIDA POR TRATAMIENTO CON GONADOTROFINAS

Los estudios anteriores mostraron que en el testículo desensibilizado por gonadotrofina, se produce una disminución en la actividad de las enzimas 17-20 desmolasa y 17 $\alpha$ -hidroxilasa. Como consecuencia de este fenómeno se encontró disminuída la producción máxima de Testosterona. Este esquema de metabolismo esteroideo fue encontrado en los testículos de animales inyectados con una única dosis de hCG en forma endovenosa, así como en aquellos animales donde se habían inducido elevaciones agudas de gonadotrofina endógena (LH), por administración en forma subcutánea de factor liberador (LH-RH). Por otro lado, el tratamiento con hCG en forma subcutánea que causara una pérdida de receptores significativa, no produjo una disminución en la respuesta máxima de la Testosterona durante la estimulación hormonal de las células de Leydig. Estas células mostraron la característica disminución en la sensibilidad a la hCG, que cabría esperar en el caso que el único fenómeno que

estuviera ocurriendo fuera la pérdida de sitios receptores.

Sin embargo, el hecho que la Progesterona y  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona se encontraran relativamente elevadas también en este grupo, sugería que también podía establecerse la lesión luego de la administración de una dosis suficiente en forma subcutánea. La recuperación de la lesión en la esteroidogénesis antes de que los receptores volvieran a valores normales, indicó que esta lesión transitoria no estaba directamente relacionada con los niveles de receptores para LH presentes en un dado momento. Se pensó entonces, que el tratamiento con gonadotrofinas desencadenaba como fenómeno paralelo a la pérdida de sitios receptores, un mecanismo responsable de las alteraciones observadas.

Los cambios en la biosíntesis esteroidea en ratas tratadas con hCG o LH-RH se parecían a la inhibición enzimática observada en roedores luego de la administración de estrógenos (127-128) que produce disminución en las actividades de las enzimas  $17\alpha$ -hidroxilasa y 17,20 desmolasa. Por esta razón, se investigó el papel de los estrógenos en la

lesión biosintética observada en células de Leydig desensibilizadas con gonadotrofinas.

CONTENIDO TESTICULAR DE  $17\beta$  ESTRADIOL Y NIVELES SERICOS DE TESTOSTERONA Y hCG, LUEGO DEL TRATAMIENTO CON hCG EN FORMA SUBCUTANEA O ENDOVENOSA

En los experimentos iniciales se midió el contenido testicular de  $17\beta$  Estradiol y los niveles séricos de hCG y Testosterona luego del tratamiento con hCG en forma subcutánea o endovenosa (Fig. 41). Cuando la hCG se administró en forma endovenosa el contenido testicular de Estradiol se elevó ya en los primeros 30 minutos, alcanzó su máximo a las 2 horas y se mantuvo elevado hasta el final del período en estudio, 8 horas. En contraposición a estos resultados la administración de hCG en forma subcutánea produjo un aumento más gradual en los niveles de estrógenos, con incrementos significativos entre las 4 y 8 hs.

Los niveles séricos de Testosterona luego del tratamiento en forma endovenosa alcanzaron su máximo a los

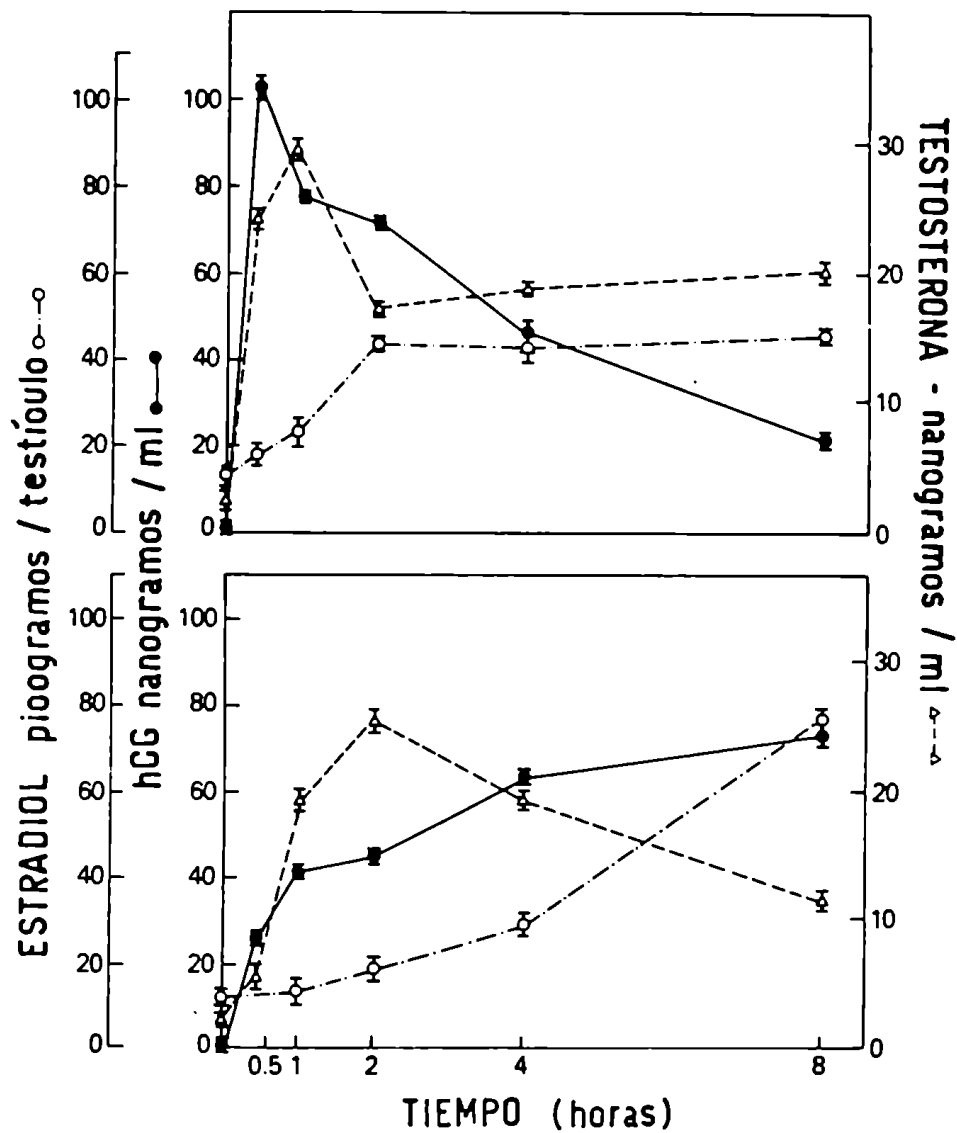


Fig. 41: Contenido testicular de Estradiol y niveles séricos de hCG y Testosterona a distintos tiempos ( 0 a 8 horas) luego del tratamiento con hCG (1 ug) en forma endovenosa (panel superior) o hCG (10ug) en forma subcutánea (panel inferior). Los datos representan el valor medio  $\pm$  ES de los valores obtenidos a partir de 6 animales.

60 minutos, y disminuyeron entonces a 50 % del valor máximo a las 2 horas cuando los niveles testiculares de Estradiol alcanzaban su máximo. De allí en más, tanto los niveles de Estradiol como de Testosterona, permanecieron elevados hasta 8 horas luego del tratamiento.

En los animales en que se administró hCG en forma subcutánea, los niveles séricos de Testosterona aumentaron más lentamente, alcanzando su máximo valor a las 2 horas y disminuyendo desde entonces gradualmente hasta las 8 horas.

Los aumentos en los niveles séricos de Testosterona fueron paralelos al perfil observado para la hCG durante las primeras 2 horas luego de la administración endovenosa o subcutánea, pero se diferenciaron en tiempos posteriores.

Después de la hCG en forma endovenosa, los valores para la Testosterona permanecieron constantes aún cuando la hCG disminuía gradualmente a aproximadamente 20 % de los valores máximos observados a los 30 minutos. Luego de la inyección subcutánea tanto los niveles séricos de hCG como de Testosterona se elevaron juntos durante las primeras 2 horas, luego la Testosterona disminuyó a valores cercanos

al 50 % a las 8 horas, mientras la hCG se elevaba significativamente durante este período.

EFFECTOS DEL ANTIESTROGENO TAMOXIFENO SOBRE LA RESPUESTA DE LAS CELULAS DE LEYDIG, 3 DIAS LUEGO DEL TRATAMIENTO DESENSIBILIZANTE.

En la figura 42 se muestra la producción de Testosterona en condiciones basales o bajo estímulo con hCG (1 nM) y  $Bt_2cAMP$  (1 mM) en los cuatro grupos experimentales que se señalan en la misma figura. La concentración de sitios receptores en los grupos control, hCG y hCG + Tamoxifeno, fueron respectivamente 17.830, 1120 y 2520 sitios/célula en el experimento 1 y para los mismos grupos en el experimento 2: 15.340, 1.490 y 3.530 sitios/célula. En estos experimentos, las células de animales tratadas con Tamoxifeno solo, mostraron aumentos significativos en el número de sitios receptores con respecto al control: 20 a 30 %.

El tratamiento previo con 1 ug de hCG produjo en ambos experimentos una disminución del 90 % en el contenido de



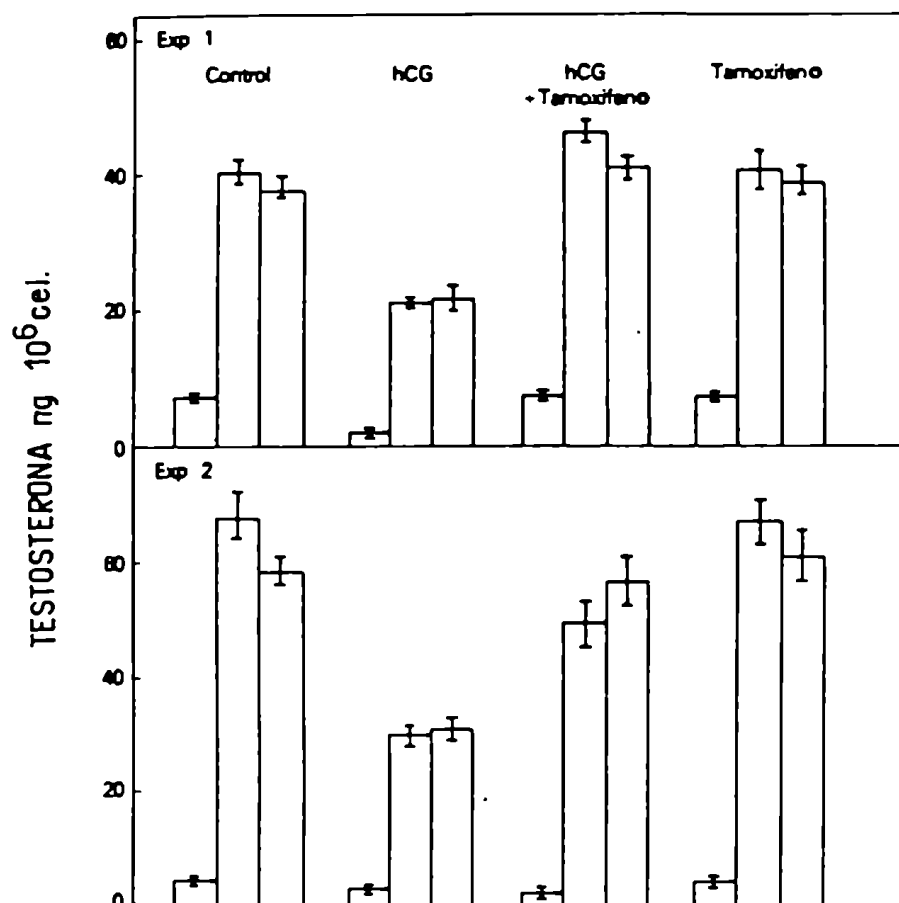


Fig. 42: Producción de Testosterona "in vitro" por las células de Leydig obtenidas a partir de animales controles y de animales tratados con una inyección endovenosa de 1 ug de hCG, 1 ug hCG + Tamoxifeno (1.5 ug endovenoso seguido de 1.5 ug intramuscular) o con Tamoxifeno solo. Las células fueron incubadas en condiciones basales (primer columna de cada grupo), en presencia de 1 nM de hCG (segunda columna de cada grupo) o 1 mM de dibutiril cAMP (tercer columna de cada grupo). Cada barra representa el valor medio (n=3)  $\pm$  ES.

receptores, y un 50 % de reducción en la respuesta de la Testosterona estimulada por hCG. Sin embargo, en estos y en otros experimentos la producción de Pregnenolona estudiada en presencia de inhibidores de la esteroidogénesis, estuvo normal o aumentada cuando se la comparó con la producción de Testosterona en ausencia de inhibidores. Los valores encontrados para la producción de Pregnenolona en presencia de hCG fue en el Exp 1:  $38 \pm 2.4$ ,  $46 \pm 3.0$ ,  $53 \pm 4.5$  y  $42 \pm 3.8$  ng/ $10^6$  células, en los grupos: control, tratados con hCG en forma endovenosa, hCG + Tamoxifeno y Tamoxifeno; Exp 2:  $73 \pm 8.2$ ,  $120 \pm 10$ ,  $128 \pm 11$  y  $71 \pm 6.5$  nanogramos/ $10^6$  células, en los mismos grupos.

La administración de Tamoxifeno con la dosis desensibilizante de hCG, tuvo dos efectos sobre las células de Leydig. Además de producir un ligero aumento en el número de sitios receptores para LH como se describió, indujo una recuperación significativa en la respuesta de la Testosterona. El Tamoxifeno solo, no aumentó la respuesta de la Testosterona bajo estímulo con hCG o  $Bt_2cAMP$  in vitro (Fig. 42).

Se encontró asimismo que el Tamoxifeno, era capaz de inhibir la lesión esteroideogénica en las células desensibilizadas por LH-RH (Fig. 43). En esta figura se muestra que la disminución en la respuesta máxima de la Testosterona, fue impedida cuando se realizó el tratamiento simultáneo con el antiestrógeno.

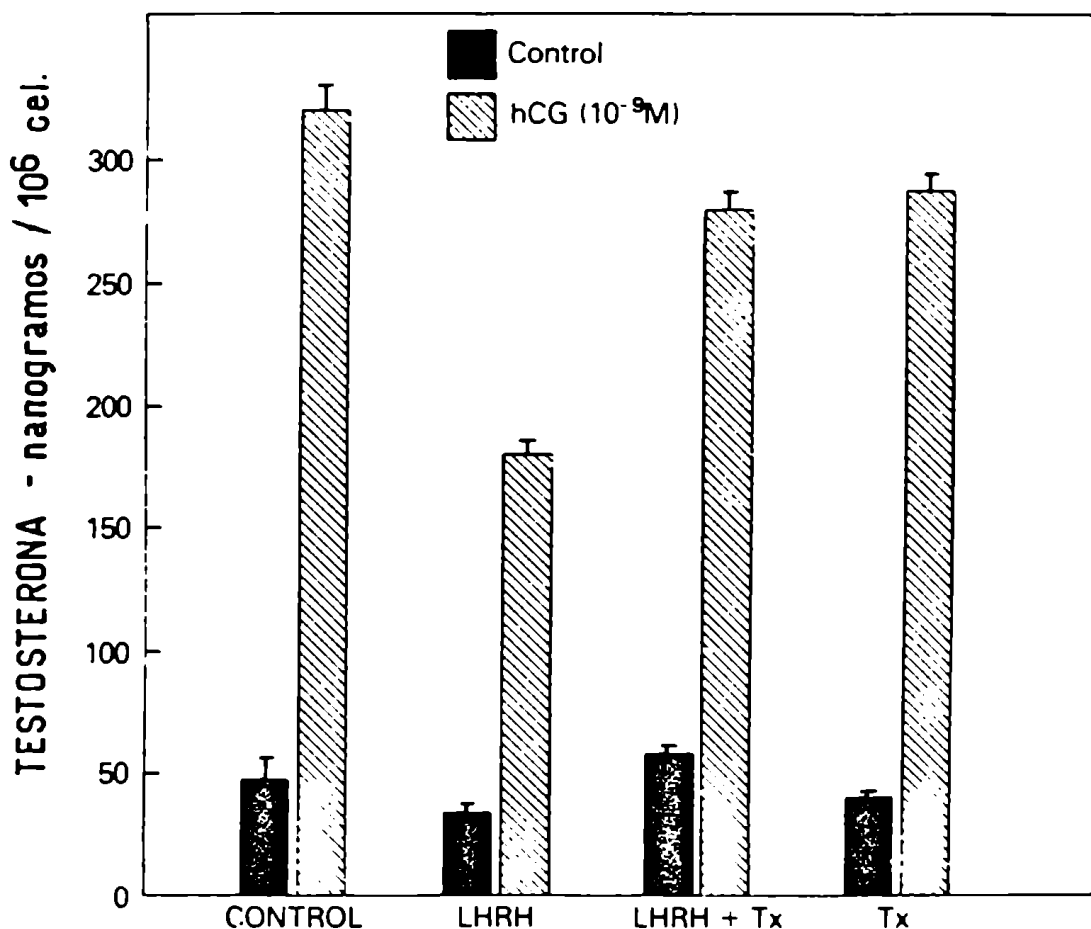


Fig. 43: Producción "in vitro" de Testosterona por células de Leydig aisladas obtenidas a partir de animales controles o tratados dos días antes con: LH-RH (10ug), LH-RH (10 ug) + Tamoxifeno (Tx: 1.5 ug endovenoso + 1.5 ug intramuscular) o Tamoxifeno (Tx: 1.5 ug endovenoso + 1.5 ug intramuscular). Los valores representan el valor medio  $\pm$  ES de incubaciones por cuadruplicado.

## D I S C U S I O N

Los resultados que se presentan en el presente trabajo de tesis, ampliaron los hallazgos previos sobre regulación de receptores y respuestas de tejido testicular y ovárico que sigue a la administración exógena de gonadotrofinas (159, 160, 161, 162). El fenómeno de regulación de los receptores gonadales, es semejante al observado en células con receptores para insulina (152), hormona de crecimiento (155), catecolaminas (153) y otros ligandos (156). En el sistema de la célula de Leydig, la obtención de células aisladas luego de la administración de gonadotrofinas "in vivo", ha permitido examinar con detalle las consecuencias funcionales de la regulación de receptores.

La hCG empleada como un análogo de la LH endógena, produjo una pérdida marcada de sitios receptores y concomitantemente cambios en la respuesta hormonal de estas células "in vitro". Con la dosis más baja usada (100 ng) no se observó modificación en el número de sitios receptores, mien-

tras sí se observaron con las dosis de 200 ng, 1 ug y 10 ug de hCG. La magnitud de dichos cambios, fue francamente dependiente de la dosis administrada. Luego de 48 hs de inyectar la mínima dosis efectiva (200 ng) no se observó ocupación de sitios receptores, como se demostró por elusión y ensayo de la hormona unida, mientras que se demostró una pérdida del 60 % de los mismos, luego de 4 días después de la inyección. Con la dosis de 1 ug de hCG, se observó una ocupación del 8 % de los sitios luego de 24 hs y se indujo una pérdida aún más importante. La dosis de 10 ug produjo una ocupación casi completa de sitios durante las primeras 24 hs, disminuyendo esta ocupación con el transcurso del tiempo. Pudo así demostrarse, que la pérdida de sitios receptores obtenidas con las dosis más bajas (0.2 y 1 ug hCG), era considerablemente mayor que el nivel de ocupación causado por la hormona administrada y se ponía de manifiesto en un momento en que la ocupación era no detectable o mínima. Esto indica que un proceso activo de regulación se inicia a nivel de la membrana celular, cuando sólo una pe-

queña proporción de sitios son ocupados por la hormona análoga.

El hecho que la pérdida de sitios receptores fuera menor en preparaciones extraídas con detergente que en la fracción particulada correspondiente, sugiere que al menos una parte de los sitios receptores que desaparecieron, se encuentran enmascarados u ocluidos en el interior de la membrana y son liberados por el tratamiento con el detergente no iónico. Es probable que la ocupación inicial de sitios receptores a nivel de la membrana, sea seguido por internalización de los complejos receptor hormona y de receptores libres adyacentes, por un proceso de endocitosis para su posterior degradación en asociación con los lisosomas. Este fenómeno podría ser similar en secuencia y probablemente en mecanismo, al proceso de pinocitosis por el cual solutos que se unen a sitios de reconocimiento en la superficie de la membrana celular, son internalizadas con la vesícula pinocítica (208). Estudios recientes han sugerido que parte de la LH unida a la célula de Leydig, es

internalizada y eventualmente degradada en los lisosomas (209). En el tejido ovárico se observaron cambios similares, la hormona trófica fue localizada por autorradiografía en la membrana plasmática y en cuerpos densos citoplasmáticos que son considerados como lisosomas (210). También se ha demostrado internalización del complejo receptor-hormona, para el factor de crecimiento epidérmico. Estos ejemplos de internalización del complejo receptor-hormona son probablemente parte de una actividad más general del sistema vacuolar, que es responsable del proceso de pinocitosis (208). Sin embargo, aún no se ha establecido con certeza si la internalización hormonal, es consecuencia de una respuesta celular universal que se produce como resultado de la unión de un ligando extracelular a la membrana plasmática, quedando abierta la posibilidad de que este sea un proceso activado específicamente por ligandos hormonales.

En estudios realizados con fibroblastos en cultivo y con el receptor para lipoproteínas de baja densidad (LDL), se ha encontrado que tal proceso de internalización opera



en la regulación por retroalimentación de los niveles de receptores para la hormona (211). Un mecanismo semejante podría postularse para explicar los bajos niveles de receptores para otras hormonas, que se observan cuando los tejidos blanco son expuestos a altos niveles del ligando por períodos prolongados.

Los cambios observados en la respuesta celular inducida por hCG "in vitro" luego del tratamiento con la gonadotropina "in vivo", fueron particulares para cada uno de los parámetros analizados. La producción de cAMP in vitro, fue proporcional al contenido de sitios receptores para LH/hCG, durante el segundo y cuarto día. Es importante notar que en estos experimentos, la desensibilización aguda de la respuesta del cAMP durante las primeras horas luego del tratamiento con hCG, habían ya ocurrido antes de que se produjera la pérdida real de sitios receptores entre el segundo y sexto día. La fase de recuperación de la respuesta del cAMP, fue relativamente más lenta que la recuperación de sitios receptores para LH. La respuesta máxima del cAMP en

los animales tratados con 0.2 y 1 ug de hCG, no volvieron a la normalidad a pesar de una completa recuperación en la población de receptores de LH. Ya que la estimulación en la producción de cAMP por la toxina colérica era normal o estaba incrementada durante el período de pérdida y recuperación de sitios receptores, es posible que exista un defecto en el acoplamiento entre las unidades receptoras y la adenilatociclasa durante el proceso inicial de recuperación, ya que estudios previos en células de Leydig normales, habían demostrado una estrecha correlación entre ocupación de receptor y formación de cAMP durante la estimulación por gonadotropina "in vitro" (36).

Los cambios que se observaron en la respuesta productora de Testosterona luego de la pérdida de sitios receptores inducida por hCG fueron más complejos. La producción de Testosterona aumentada observada luego de 2 y 4 días del tratamiento con la dosis más baja de hCG (200 ng), probablemente esté relacionada con la acción fisiológica reconocida de la hormona trófica en el mantenimiento de la cé-

lula de Leydig. Esta producción esteroideogénica aumentada, se observa aún en presencia de una caída significativa en los niveles de receptor de LH y de la respuesta del cAMP. Este efecto sugiere que el proceso de regulación de sitios receptores ocurre en todos los niveles de ocupación y es seguido por un aumento de la capacidad esteroideogénica, cuando se utilizan bajas dosis de hormona que se asemejan a los niveles fisiológicos de gonadotropina. En franco contraste con estos resultados, las células de Leydig de animales tratados con dosis más altas de hCG, mostraron disminuciones marcadas en la respuesta máxima de la Testosterona luego del 2do y 4to día posteriores al tratamiento.

Ya que la célula de Leydig tiene receptores cuyo número está en marcado exceso con respecto a los necesarios para producir una respuesta esteroideogénica máxima, se suponía que los cambios en los niveles de receptores, debían producir un cambio en la sensibilidad de las células a la estimulación gonadotrófica. Sin embargo, el efecto más notable fue la pérdida de la respuesta máxima de la Tes-

testosterona, que nunca fue alcanzada a pesar de las altas dosis estimuladoras de la hormona trófica utilizadas. Esta falla en alcanzar la respuesta máxima podía indicar que el cAMP producido no estaba disponible para inducir la estimulación subsiguiente, que los niveles de proteína quinasa habían disminuído, o que una lesión más distante había ocurrido en uno o más de las enzimas que regulan el camino esteroidogénico. La primera y la segunda de estas posibilidades, fueron descartadas respectivamente: con los estudios de estimulación con la toxina colérica, que indujeron una producción de cAMP normal o incrementada y con los estudios de unión del cAMP a proteína quinasa. De estos estudios se concluyó, que era poco probable que la lesión estuviera a nivel de la producción del nucleótido cíclico o activación de la proteína quinasa.

En otro grupo de experimentos, se demostró que el tratamiento con una única dosis de LH-RH, también producía una pérdida de sitios receptores que era máxima luego de 48 hs y que se normalizaba luego del 5to o 6to día. Estos hallaz-

gos, demostraron que las elevaciones de LH endógena inducidas por tratamiento con el factor liberador, inician el mismo proceso de desensibilización descrito para las gonadotrofinas exógenas tales como LH y hCG. Asimismo, la pérdida de sitios receptores inducida por tratamiento con LH-RH que produjera una elevación de LH endógena, estuvo acompañada por cambios en la respuesta celular "in vitro" a la estimulación hormonal, que fueron semejantes a los observados luego de la desensibilización por hCG. De esta forma la producción de cAMP estimulada por gonadotrofina, fue proporcional al contenido en receptores y siguió la disminución de los mismos luego del 2do y 4to día. La respuesta a la estimulación gonadotrófica "in vitro" de la Testosterona, fue variable y dependió del grado de disminución en el número de sitios receptores. A bajos niveles de pérdida de sitios receptores la respuesta esteroidogénica fue normal o estuvo incrementada, con pérdida severa de sitios receptores se observó el mismo fenómeno que en la administración endovenosa de hCG, o sea disminución en la

producción de Testosterona estimulada tanto por dosis supramáximas de hCG, como por  $Bt_2cAMP$  o toxina colérica.

Finalmente, el último esquema de tratamiento realizado con hCG en forma subcutánea, produjo un efecto ligeramente diferente en la célula de Leydig. A pesar de que la pérdida de receptores alcanzó valores del 65 % de los sitios totales se conservó la respuesta en la producción máxima de Testosterona, observándose el desplazamiento de la sensibilidad al estímulo gonadotrófico.

La lesión esteroideogénica se establecía antes que la caída máxima de los sitios receptores y asimismo se recuperaba más tempranamente que el número de sitios o la respuesta del cAMP, indicando que la lesión estaba relacionada a efectos de la LH sobre algún mecanismo intracelular de la célula de Leydig, más que a la regulación de sitios receptores per se.

La clave para establecer la naturaleza de la lesión en la célula de Leydig, que impedía a la misma responder en cuanto a la producción de Testosterona a valores del grupo

control, fue encontrada cuando se desarrolló un sistema de incubación "in vitro", que permitió la medición de un esteroide precursor de la Testosterona (Pregnenolona), como marcador de la estimulación gonadotrófica en la célula de Leydig. La incubación se realizó en presencia de dos inhibidores de la esteroidogénesis que impidieron la conversión posterior de Pregnenolona a otros esteroides tanto en la vía  $\Delta_4$  como en la vía  $\Delta_5$ . Este sistema de incubación se estudió exhaustivamente y se demostró que era perfectamente paralelo a la producción de Testosterona "in vitro". Por otra parte, tenía la ventaja que se estaba mirando al primer esteroide que se forma luego de la activación del sistema enzimático que rompe la cadena lateral del Colesterol, punto de acción de la gonadotrofina en la estimulación aguda.

Pensábamos en ese momento, que si la LH actuaba a nivel de este complejo enzimático, ya sea aumentando el aporte de sustrato por activación de una proteína transportadora de Colesterol y/o vía de la activación de la Colesterol esterasa, así como por activación directa de alguno de los com-

plejos o por intervención de la proteína lábil que ha sido descrita, era posible que por tratamiento con la gonadotrofina, alguno de estos mecanismos se hubiera agotado tempranamente, bajo la exigencia de una producción esteroidogénica importante que se produce luego de la administración de la hormona "in vivo".

La medición de Pregnenolona bajo el estímulo gonadotrófico "in vitro" nos permitió de esta forma, evaluar la integridad funcional de las primeras etapas en el camino biosintético de la Testosterona en los animales desensibilizados.

Pudo así demostrarse el establecimiento de dos lesiones adicionales a la pérdida de los sitios receptores y que comprometen a la maquinaria responsable de la respuesta esteroidogénica : 1) a bajos niveles de pérdida de sitios receptores, o lo que es lo mismo con los tratamientos con dosis más bajas, veíamos que el sistema responsable de la síntesis de Pregnenolona estaba normal o activado, debiendo lógicamente atribuirse la falla en producir Testosterona a



a niveles controles, a una lesión en alguno de los componentes enzimáticos que median la conversión de Pregnenolona a Testosterona y 2do) cuando la pérdida de sitios receptores era muy marcada (> 90 %), se perdía la integridad funcional del complejo mecanismo que conduce a la producción de Pregnenolona.

El paso siguiente fue estudiar la naturaleza de la lesión que se produce en los animales tratados, que conservan la respuesta de la Pregnenolona. Surgió en forma inmediata de estos resultados, la necesidad de estudiar cuidadosamente los niveles de esteroides intermediarios producidos bajo estimulación gonadotrófica. El primer intento se realizó en incubaciones en presencia de cianocetona, operando de esta forma, por estar inhibida la  $\Delta_5-3\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa, solamente la vía  $\Delta_5$  de la esteroidogénesis (Pregnenolona,  $17\alpha$  hidroxipregnenolona, Dehidroepiandrosterona,  $\Delta_5$ -Androstenodiol). Pudo así verse que durante la estimulación gonadotrófica de las células desensibilizadas, había acumulación de Pregnenolona y  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona, sugiriendo

que la 17-20 desmolasa responsable de la conversión de los esteroides con 21 carbonos a esteroides con 19 carbonos, estaba francamente disminuída.

La confirmación final, fue realizada estudiando la producción de esteroides en células incubadas en ausencia de inhibidores. Allí pudo observarse acumulación de Progesterona y  $17\alpha$  hidroxiprogesterona, ambos esteroides pertenecientes a la vía  $\Delta_4$ , y esta acumulación estuvo acompañada por una marcada disminución en la producción de Testosterona. Al mismo tiempo el metabolismo en la vía  $\Delta_5$  fue activo, demostrándose acumulación de Pregnenolona y  $17\alpha$  hidroxipregnenolona, mientras que no se observó producción de Dehidroepiandrosterona ni  $\Delta_5$ - Androstenodiol.

Nuevamente, en estos experimentos realizados en ausencia de inhibidores, se puso en evidencia la presencia de una lesión esteroideogénica en la etapa de la biosíntesis, donde la desmolasa convierte los esteroides  $17\alpha$  hidroxilados a andrógenos.

Los animales tratados con LH-RH mostraron alteraciones

de la respuesta esteroidogénica "in vitro", muy semejantes a las provocadas por el tratamiento con gonadotrofina en forma endovenosa, demostrándose así que las elevaciones de la LH endógena, inician el mismo proceso de desensibilización.

Al igual que antes la respuesta de la Testosterona "in vitro", varió con el grado de pérdida de sitios receptores en una forma bifásica. A bajos niveles de pérdida de sitios receptores la respuesta esteroidogénica estuvo aumentada por encima de los controles, indicando que los efectos negativos del tratamiento con gonadotrofinas sobre los niveles de sitios receptores y sobre la producción de cAMP, estarían acompañados por un incremento en la actividad de la maquinaria que biosintetiza Pregnenolona, y representaría la consecuencia de la acción trófica de las gonadotrofinas sobre las células de Leydig. Este efecto obviamente podría manifestarse por un aporte aumentado de sustrato, un aumento en el número de unidades de enzima o ambas posibilidades al mismo tiempo.

Esta etapa de la biosíntesis esteroidea se encuentra lesionada como se mencionó, en los casos en que la pérdida de sitios receptores es mayor del 90 % y esta situación no es alcanzada en ningún caso, por tratamiento con el factor liberador.

En la regulación de sitios receptores inducida por tratamiento con LH-RH, se observó siempre producción normal o aumentada de Pregnenolona. Cuando los niveles de sitios receptores estuvieron entre el 30 y 50 % del control, se observó acumulación de  $17\alpha$  hidroxiprogesterona y este resultado sugirió nuevamente una actividad de 17-20 desmolasa disminuída.

Un tratamiento prolongado con análogos de LH-RH probablemente acentuaría la lesión testicular, al producirse la desensibilización de la glándula hipofisaria. De esta forma la regresión funcional de la gonada podría ser exacerbada por los efectos posteriores de alteración en la liberación de gonadotrofinas. Una complicación adicional del tratamiento con LH-RH es la pérdida de receptores testicu-

lares para prolactina y FSH (212, 198).

Estos hallazgos tienen implicaciones en el uso terapéutico del LH-RH para estimular la función gonadal, así como en el análisis de los mecanismos fisiológicos responsables de la regulación e integración del eje hipotálamo, hipófiso gonadal. Se demuestra así la importancia de alcanzar niveles secretorios normales de gonadotrofinas, para el mantenimiento de una eficaz función gonadal.

La administración de hCG en forma subcutánea indujo una significativa pérdida de sitios receptores, no observándose en este caso disminución en la respuesta máxima de Testosterona, si bien se demostró cierta acumulación de esteroides con 21 carbonos. Estudios posteriores de Nozu y col (213) han demostrado que se puede alcanzar una situación semejante a la observada en el caso de administración endovenosa, utilizando dosis ligeramente superiores.

La acumulación de  $17\alpha$  hidroxiprogesterona y Progesterona que se observó al estimular "in vitro" células de Leydig obtenidas de animales con los distintos tratamientos,

pudo ser claramente atribuida a una disminucion en la actividad de ciertas enzimas, en aquellos casos en que la esteroidogénesis total o sea la suma de todos los esteroides producidos, estuvo disminuida. Cuando la capacidad esteroidogénica máxima estuvo aumentada como en el caso del tratamiento con LH-RH (1 ug), esta conclusión no se extrajo tan fácilmente, pues cabía la posibilidad de que estas dos enzimas (17-20 desmolasa y 17 $\alpha$  hidroxilasa) estuvieran trabajando con niveles de esteroides muy cercanos a los saturantes.

Los estudios con estas enzimas han sido particularmente difíciles, ya que estas se encuentran asociadas fuertemente al retículo endoplásmico, no pudiendo ser caracterizadas fisicoquímicamente en preparaciones puras. En estudios realizados con preparaciones impuras de estas enzimas (214, 145), se ha mencionado que se alcanza la saturación para la 17 $\alpha$  hidroxilasa aproximadamente para una concentración de sustrato (Progesterona) de 3 ug/ml, mientras que la 17-20 desmolasa podría no estar saturada a con-

centraciones de 6 ug/ml de 17 $\alpha$  hidroxiprogesterona. Estas concentraciones de esteroides que se mencionan, son muy superiores a las que se alcanzan en nuestras incubaciones "in vitro". Sin embargo, no puede descartarse que la cantidad de esteroide que llega a la enzima, sea distinta de la que se coloca en el medio de la incubación.

Aceptando que existe una disminución en la actividad de la 17-20 desmolasa luego de ciertos tratamientos en que se produce una disminución en la esteroidogénesis con acumulación de precursores de 21 carbonos, esta lesión enzimática podría ser explicada por lo menos por dos mecanismos: primero, estudios previos habían indicado que la administración de estrógenos producía una rápida disminución en los niveles de Testosterona plasmática y testicular, sin cambios aparentemente en los niveles de LH plasmáticos (215).

Asimismo, cabe mencionar que niveles de Estradiol o dietilestilbestrol de 50 ug/ml reducían en un 50 a 80 % la producción de Testosterona "in vitro" por testículos decapsulados de ratón y de rata, siendo dosis más bajas inefecti-

vas (216). Estos resultados estaban de acuerdo con los hallazgos de Samuels y col. (127), los cuales demostraron un efecto directo sobre la síntesis de andrógenos producida por implantes conteniendo estrógenos, concretamente observaron disminución de las actividades de las enzimas testiculares  $17\alpha$ -hidroxilasa y 17-20 desmolasa.

Estudios más recientes de Kalla y col. (129), quienes midieron andrógenos plasmáticos y de Hsueh y col. (217) que estudiaron la producción de andrógenos en testículos de ratas hipofisectomizadas tratadas con gonadotrofinas, han confirmado la acción directa de los estrógenos sobre la biosíntesis de andrógenos que habían descripto Samuels y col.

El hecho de que se hubieran encontrado receptores para estrógenos en células de Leydig (131, 115), hacía que fuera posible pensar en un efecto directo de los mismos en el control de la función endócrina testicular. La producción de Estradiol testicular había sido ya demostrada midiendo las elevaciones en el plasma venoso testicular que siguen



el tratamiento agudo con hCG (101, 90).

Pensamos entonces que era posible, que la estimulación de la producción local de estrógenos inducida por la dosis desensibilizante de hCG, fuera responsable del bloqueo en la esteroidogénesis como un fenómeno paralelo a la pérdida de sitios receptores.

Por otro lado, se ha descrito que la Progesterona es un inhibidor competitivo de la 17-20 desmolasa (214), no pudiendo descartarse que la acumulación de este esteroide tenga influencia en el metabolismo de la 17 $\alpha$ hidroxiprogesterona.

Una segunda posibilidad es que la disminución brusca en el efecto trófico ejercido por las hormonas hipofisarias, fundamentalmente causado por la pérdida de sitios receptores, signifique el alejamiento de una célula de Leydig diferenciada.

En contra de esta posibilidad, estaría el hecho de que en la rata hipofisectomizada, no se observa disminución en las actividades de la 17-20 desmolasa y de la 17 $\alpha$ hidroxilasa.

De los dos mecanismos postulados para la lesión esteroideogénica observada, nos pareció que el primero, o sea la acción directa de los estrógenos, podría ser el responsable. Para estudiar esta posibilidad se evaluó el efecto del tratamiento simultáneo con un antiestrógeno reconocido como el Tamoxifeno, sobre la desensibilización inducida por el tratamiento con hCG. Este antagonista estrogénico fue utilizado en las dosis mínimas efectivas para impedir cambios en la secreción de LH (218) o efectos directos sobre la actividad de aromatasa (219).

El hecho que se observara una recuperación en la esteroideogénesis, nos hizo concluir que la lesión observada en la 17-20 desmolasa y la 17 $\alpha$ -hidroxilasa, son consecuencia al menos en parte, de las elevaciones endógenas de estrógenos luego del tratamiento con hCG y que la acción de este esteroide se realiza a través del receptor que ha sido descrito en células de Leydig.

Se ha demostrado que dosis bajas de Tamoxifeno tienen un efecto antiuterotrófico significativo, y que una única

dosis subcutánea de 10 ug produce una disminución del 75 %, en el número de sitios receptores uterinos para estrógenos, manteniéndose el efecto por 24 hs y volviéndose a la normalidad a las 48 hs (220). Nosotros observamos aumento de estrógenos dentro de las ocho horas subsiguientes a las elevaciones plasmáticas de LH o hCG, o sea en un momento en el que presumiblemente el receptor citoplasmático había disminuído francamente como consecuencia del tratamiento con Tamoxifeno.

Se observó sistemáticamente, un aumento pequeño pero significativo en la cantidad de receptores para LH/hCG en los animales tratados con Tamoxifeno. Esto está de acuerdo con estudios de Hsueh y col. (217), donde se demostró que el tratamiento con estrógenos, disminuía la concentración de receptores de LH en animales hipofisectomizados e impedía la elevación de los mismos inducida por tratamiento con FSH.

Por lo tanto, es probable que la concentración intratesticular de estrógenos module el número de receptores de

LH en la célula de Leydig. Sin embargo, el mantenimiento de la respuesta esteroidogénica observada en estos estudios luego del tratamiento con Tamoxifeno, muy difícilmente se deba a este pequeño incremento en el número de sitios receptores, ya que se ha demostrado que células desensibilizadas con retención de hasta 31 % de sus sitios receptores tienen una producción de Testosterona disminuída en un 50 a 80 %. Concluimos que la prevención de la lesión esteroidogénica por el Tamoxifeno, es ejercida a través de su efecto antiestrogénico inhibiendo la lesión parcial de la 17,20 desmolasa que es causada por la elevación de estrógenos producida por el tratamiento con hCG o LH-RH.

El efecto inhibitorio directo de los estrógenos sobre la producción de Testosterona por la célula de Leydig, se ha demostrado en ratas hipofisectomizadas tratadas con FSH. En hombres con cáncer prostático se produce luego del tratamiento con dietilestilbestrol, una marcada disminución en los niveles circulantes de Testosterona con reducciones sólo moderadas en los niveles circulantes de LH (119). Es-

tos hallazgos han indicado que cantidades farmacológicas de estrógeno, ejercen un efecto inhibitorio directo sobre la producción de andrógenos testiculares, y esta inhibición ha sido localizada en roedores a nivel de la 17,20 desmolasa (221).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren, que cambios fisiológicos en la producción de estrógenos también influyen en la actividad de la 17,20 desmolasa y en la producción de andrógenos, y que los niveles de estrógenos endógenos pueden tener normalmente una acción tónica inhibitoria en el control de la esteroidogénesis testicular.

Esta hipótesis estaría de acuerdo con el fenómeno observado en hombres con síndrome de Klinefelter, donde se observa una reducción en la producción de Testosterona (222, 223). Tales pacientes tienen bajos niveles de Testosterona en plasma venoso testicular y periférico acompañado por niveles altos de  $17\alpha$  hidroxiprogesterona (224). Este modelo de esteroidogénesis sugiere la presencia de una lesión en

la 17,20 desmolasa, similar a la que se observa en el testículo de rata desensibilizada por gonadotrofinas. En los mismos pacientes se ha demostrado que existe una conversión incrementada de Testosterona a estrógenos en el testículo (225) y periféricamente (222). Asimismo se encontraron cambios similares en hombres de edad avanzada y en pacientes con cirrosis hepática (226, 227).

Los estrógenos parecerían así ejercer un efecto regulatorio sobre la esteroidogénesis, a través de la modulación de la actividad de la 17,20 desmolasa y probablemente también de la  $17\alpha$  hidroxilasa.

Normalmente entonces, la producción de Testosterona esté posiblemente influenciada por un efecto tónico inhibitorio de los estrógenos producidos en el testículo o en sitios periféricos de aromatización. Aunque este efecto en condiciones normales fuera poco significativo, se volvería importante cuando existe una producción de estrógenos aumentada tal como la que se observa en las condiciones clínicas mencionadas y en el modelo experimental de la desensibi-

lización (194, 175, 165).

Nuestra interpretación acerca del mecanismo de la desensibilización en relación a la esteroidogénesis puede resumirse de la siguiente forma. El tratamiento con hCG o LH-RH (vía LH endógena) produce un aumento en la producción de Testosterona, que se acompaña con un aumento de la producción de estrógenos a partir de este andrógeno, seguidamente los estrógenos causan una disminución en la actividad de la 17,20 desmolasa y probablemente de la  $17\alpha$ -hidroxilasa que resultan finalmente en producción de andrógenos disminuída, con aumento en los niveles de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona y Progesterona. Estas lesiones son impedidas, al menos parcialmente, cuando el antiestrógeno Tamoxifeno es inyectado junto con las dosis desensibilizante de gonadotrofina.

Recientemente se ha demostrado que el LH-RH puede tener acciones directas sobre el testículo (228), pero los cambios agudos observados en el presente trabajo son muy semejantes a los que ocurren luego del tratamiento con hCG y pueden ser atribuídos a las elevaciones de LH endógena.

Los efectos de las gonadotrofinas tanto exógenos como endógenas sobre el testículo son sumamente complejas, ya que el proceso de activación inicial es seguido por una desensibilización a nivel del receptor y de la respuesta esteroidogénica.

Además de la lesión esteroidogénica descrita, dependiente de estrógeno, se ha observado una lesión previa a la producción de Pregnenolona con dosis más altas de hCG. Charreau y col. (229), han demostrado recientemente que esta lesión es debida a una disminución en la actividad de la hidroximetil-glutaril-coenzima A reductasa, enzima que interviene en la biosíntesis de Colesterol.

Por otro lado, se ha sugerido que existe un factor proteico inhibitorio termolábil en las mitocondrias de células de Leydig normales, y que éste es marcadamente incrementado cuando se utilizan altas dosis de hCG para el tratamiento. Esta sustancia modula la actividad de la enzima que rompe la cadena lateral del Colesterol a través de una disminución en la afinidad de la misma por el NADPH.



Estos mecanismos podrían contribuir a la lesión esteroideogénica previa a Pregnenolona y también servir como moduladores normales de la biosíntesis de esteroides en sus primeras etapas (230).

Con respecto a la segunda lesión inducida por el tratamiento con hCG, se ha demostrado muy recientemente, que existe una activación de RNA polimerasa inducida por la elevación de estrógenos testiculares durante las primeras horas luego del tratamiento, que es inhibida si se administra Tamoxifeno simultáneamente con la dosis desensibilizante. Esta respuesta inmediata de la RNA polimerasa a la hCG, parece ser la responsable de la inhibición de las enzimas microsomales (231).

De todo lo expuesto, cabe concluir que si bien el modelo de la desensibilización puede considerarse farmacológico en el macho, la interpretación de las lesiones biosintéticas, producidas durante la estimulación hormonal, podría contribuir al esclarecimiento de los mecanismos de control intra-

celulares que regulan a las enzimas esteroideogénicas en la célula de Leydig.

H. C. 16

Marie de Luray

B I B L I O G R A F I A

- 1) Berthold A.A. (1849). Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.,  
p. 42.
- 2) Leydig F. (1850). Z. Wiss. Zool., 2:1.
- 3) Rasmussen A.T. (1933). Special Citology (2nd ed.), editado por E.V. Cowdry. New York Hoeber 3:1673.
- 4) Bouin P. y P. Ancel. (1903). Arch. Zool. Exptl. Gen. 1:437.
- 5) Gallagher T.F. y F.C. Koch (1929). J. Biol. Chem. 84:495.
- 6) Smith P.E. (1930). Am. J. Anat., 45:205.
- 7) Levy H., H.W. Deane y B.L. Rubin. (1959). Endocrinology,  
65:932.

- 8) Wattenberg L.W. (1958). J. Histochem.Cytochem. 6:225.
- 9) Christensen A.K. y N.R. Mason. (1965): Endocrinology 76:646.
- 10) Hall P.F., D.C. Irby y D.M. de Kretser. (1969). Endocrinology 84:488.
- 11) Mancini R.E., A. Castro y A.C. Seiguer. (1967). J. Histochem. Cytochem. 15:516.
- 12) De Kretser D.M., K.J. Catt, H.G. Burger y G.C. Smith. (1969). J. Endocr., 43:105.
- 13) De Kretser D.M., K.J. Catt y C.A. Paulsen. (1971). Endocrinology, 80:332.
- 14) Dufau M.L., K.J. Catt y T. Tsuruhara. (1971). Biochem. Biophys. Acta, 252:574.

- 15) Dufau M.L., K.J. Catt y T. Tsuruhara. (1972). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69:2414.
- 16) Hsueh A.J.W., M.L. Dufau, S.L. Katz y K.J. Catt. (1976). Nature Lond., 261:710.
- 17) Ketelslegers J.M., G.D. Knott y K.J. Catt. (1975). Biochemistry, 14:3075.
- 18) Catt K.J. y M.L. Dufau. (1973). Nature New Biol., 244:219.
- 19) Payne A.H., J.R. Downing y K.L. Wong. (1980). Endocrinology, 106:1424.
- 20) Dufau M.L., T.Tsuruhara, K.A. Horner, E. Podestá y K.J. Catt. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74:3419.
- 21) Dufau M.L., K.A. Horner, K. Hayashi, T. Tsuruhara, P.M. Conn y K.J. Catt. (1978). J. Biol. Chem., 253:3721.

- 22) Sala G.B., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1979). J. Biol. Chem., 254:2077.
- 23) Hayashi K., G.B. Sala, K.J. Catt y M.L. Dufau. (1979). J. Biol. Chem., 254:3861.
- 24) Hayashi K., S.H. Sorrell y L. Joshi. (1980). 62nd Annual Meeting of the Endocrine Society. Abst. 616.
- 25) Sorrell S.H., K.J. Catt y M.L. Dufau. (1980). 62nd Annual Meeting of the Endocrine Society. Abst. 753.
- 26) Dufau M.L., K.H. Hayashi, G. Sala, A. Baukal y K.J. Catt. (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75:4769.
- 27) Abou-Issa H. y L.E. Reichert, Jr. (1979). Endocrinology, 104:189.
- 28) Jahnsen T., K. Purvis, L. Birnbaumer y V. Hansson. (1981). Int. J. Androl. 3:396.

- 29) Cooke B.A., M.L. Lindh y F.H. Janszen. (1976). *Biochem. J.*, 160:439.
- 30) Cooke B.A., J.W.C.M. Van der Kemp y H.J. Van der Molen. (1975). *J. Endocr.*, 64:69.
- 31) Podestá E.J. y K.J. Catt. (1976). *Febs. Letts.* 70:212.
- 32) Podestá E.J., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1976). *Moll. Cell. Endocrinol.*, 5:109.
- 33) Podestá E.J., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1978). *Biochemistry*, 17:1556.
- 34) Podestá E.J., M.L. Dufau, A.R. Solano y K.J. Catt. (1978). *J. Biol. Chem.*, 253:8994.
- 35) Dufau M.L., C. Mendelson y K.J. Catt. (1974). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39:610.

- 36) Mendelson C., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1975). J. Biol. Chem., 250:8818.
- 37) Williams C.D., K.A. Horner y K.J. Catt. (1976). Endocr. Res. Comm., 3:343.
- 38) Means A.R., J.R. Dedman, D.J. Tindall y M.J. Welsh. (1978). En: Endocrine Approach to Male Contraception, Editores: V. Hansson, E.M. Ritzen, K. Purvis y F.S. French, Copenhagen. Scriptor p. 403.
- 39) Cooke B.A., F.H.A. Janszen, W.F. Clotscher y H.J. Van der Molen. (1975). Biochem. J., 150:413.
- 40) Cooke B.A., F.H. Janszen y H.J. Van der Molen. (1975). Acta Endocr. (Kbh), Suppl. 199. Abstr. 41.
- 41) Mendelson C., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1975). Biochim. Biophys. Acta, 411:222.



- 42) Janszen F.H.A., B.A. Cooke y H.J. Van der Molen. (1977).  
Biochem. J., 162:341.
- 43) Janszen F.H.A., B.A. Cooke, M.J.A. Van Driel y H.J. Van  
der Molen. (1978). Biochem. J., 170:9.
- 44) Dufau M.L., K. Hayashi, S.B. Cigorruga, A.J. Baukal,  
S. Sorrell, K. Nozu y K.J. Catt. (1980). 6th Interna-  
tional Congress of Endocrinology, Melbourne, Australia,  
Abst. 64.
- 45) Lefevre A., A.M. Morera y J.M. Saez. (1978). Febs. Letts.,  
89:287.
- 46) Hall P.F., C. Charponnier, M. Nakamura y G. Gabbiani.  
(1979). J. Steroid. Biochem., 11:1361.
- 47) Long C.H.N. (1947). Recent Progr. Horm. Res., 1:99.

- 48) Stone D., y O. Hechter. (1954). Arch. Biochem. Biophys., 51:457.
- 49) Karaboyas G.C. y S.B. Koritz. (1965). Biochemistry, 4:462.
- 50) Mason N.R. y K. Savard. (1964). Endocrinology, 75:215.
- 51) Hall P.F. y S.B. Koritz. (1965). Biochemistry 4:1037.
- 52) Hall P.F. y K.B. Eik-Nes. (1963). Biochim. Biophys. Acta, 86:604.
- 53) Hall P.F. y K. Okazaki. (1966). Biochemistry, 5:1202.
- 54) Bell E.T., S. Mukerji y J.A. Loraine. (1964). J. Endocrinol., 28:321.
- 55) Brady R.O. (1951). J. Biol. Chem., 193:145.

- 56) Hechter O., M.M. Solomon, A. Zaffaroni y G. Pincus.  
(1953). Arch. Biochem. Biophys, 46:201.
- 57) Borkowski A.J., S. Levin, C. Delcroix, A. Mahler y V.  
Verhas. (1967). J. Clin. Invest., 46:797.
- 58) Krum A.A., M.D. Morris y L.L. Bennett. (1964). Endocri-  
nology, 74:543.
- 59) Morris M.D. e I.L. Chaikoff. (1959). J. Biol. Chem.,  
234:1095.
- 60) Werbin H. e I.L. Chaikoff. (1961). Arch. Biochem. Bio-  
phys, 93:476.
- 61) Behrman H.R. y D.T. Armstrong. (1969). Endocrinology,  
85:474.
- 62) Burstein S., B.S. Middleditch y M. Gut. (1975). J. Biol.  
Chem., 250:9028.

- 63) Flint A.P.F., D.L. Grinwich y D.T. Armstrong. (1973).  
Biochem. J., 132:313.
- 64) Moyle W.R. y J. Ramachandran. (1973). Endocrinology,  
93:127.
- 65) Hafiez A.A., A. Bartke, y O.W. Lloyd. (1972). J. Endo-  
crinol., 52:223.
- 66) Kan K.W. y F. Ungar. (1973). J. Biol. Chem., 248:2868.
- 67) Purvis J.L. y R. Menard. (1975). En: "Hormonal Regulation  
of Spermatogenesis". Editores: F.S. French, V. Hansson,  
E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh. Plenum Press. New York.,  
pag. 65.
- 68) Caron M.G., S. Goldstein, K.Savard y J.M. Marsh. (1975).  
J. Biol. Chem., 250:5137.

- 69) Trzeciak W.H. y B.S. Boyd. (1974). Eur. J. Biochem.,  
46:201.
- 70) Trzeciak W.H. y G.S. Boyd. (1973). Eur. J. Biochem.,  
37:327.
- 71) Naghshineh S. (1974). Biochem. Biophys. Res. Commun,  
61:1076.
- 72) Beckett G.J. y G.S. Boyd. (1975). Biochem. Soc. Trans.,  
3:892.
- 73) Hall P.F. (1970). En: The Testis, Vol. II. Editores:  
D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. Van der Mark. pag. 1.  
Academic Press, New York.
- 74) Samuels L.T., L. Bussman, K. Matsumoto y R.A. Huseby.  
(1975). J. Steroid. Biochem. 6:291.

- 75) Huhtaniemi I. (1977) *J. Steroid Biochem.* 8:491.
- 76) Acevedo H.F., L.R. Axelrod, E. Ishikawa y Takari F. (1963). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 23:885.
- 77) Ikonen M. y J. Niemic. (1966). *Nature*, 212:716.
- 78) Mathur R.S., N. Wigvist y E. Diczfalusy. (1972). *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 71:792.
- 79) Mizutani S., T. Tsujimura, S. Akashi y K. Matsumoto. (1977). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44:1023.
- 80) Lacroix E., W. Eechaute e I. Lewsen. (1975). *Steroids*, 25:649.
- 81) Lindner H.R. (1961). *J. Endocrinol.* 23:139.
- 82) Van der Vusse G.J., M.L. Kalkman y H.J. Van der Molen. (1975). *Biochem. Biophys. Acta*, 380:473.

- 83) Van der Vusse G.J., M.L. Kalkman y H.J. Van der Molen.  
(1974). Biochem. Biophys. Acta, 348:404.
- 84) Inano H. (1974). J. Steroid. Biochem. 5:145.
- 85) De Bruijin H.W. y H.J. Van der Molen. (1974). J. Endocrinol. 61:401.
- 86) Dorrington J.H. e I.B. Fritz. (1975). Endocrinology, 96:879.
- 87) Van der Molen H.J., J.A. Grootegoed, M.G. de Greef-Bijleveld, F.F.G. Rommerts y G.J. Van der Vusse. (1975).  
En: Hormonal Regulation of Spermatogenesis, Editores:  
F.S. French, V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh,  
pag. 3. Plenum Press. New York.
- 88) Folman Y., N. Ahmad, J.G. Sowell y K.B. Eik-Nes. (1973).  
Endocrinology, 92:41.

- 89) Sowell J.G., Y. Folman y K.B. Eik-Nes. (1974). *Endocrinology*, 94:346.
- 90) Dejong F.H., A.H. Hey y H.J. Van der Molen. (1974). *J. Endocrinol.*, 60:409.
- 91) Dorrington J.H., I.B. Fritz y D.T. Armstrong. (1976). *Molec. Cell. Endocrinol.*, 16:117.
- 92) Parvinen M., P. Hurme y M. Niemi. (1970). *Endocrinology* 87:1082.
- 93) Müller R.E. y H.H. Wotiz. (1979). *Endocrinology*, 105:1107.
- 94) Dorrington J.H., I.B. Fritz y D.T. Armstrong. (1978). *Biol. Reprod.*, 18:55.
- 95) Rommerts F.F.G., B. Ch. Krüger-Sewnarain, A. Van Woerkom-Blik, J.A. Grootegoed y H.J. Van der Molen. (1978). *Mol. Cell. Endocrinol.* 10:39.



- 96) Verhoeven G., P. Dierickx y P. de Moor. (1979). Mol. Cell. Endocrinol., 13:241.
- 97) Canick J.A., A. Markis, G.L. Gunsalus y K.J. Ryan. (1979) Endocrinology, 104:285.
- 98) Steinberger E., R.K. Tcholakian y A. Steinberger. (1979). J. Steroid. Biochem. 11:185.
- 99) Valladares L.E., y A.H. Payne. (1979). Endocrinology, 105:431.
- 100) Cigorruga S.B., S. Sorrell, J. Bator, K.J. Catt y M.L. Dufau. (1980). J. Clin. Invest., 65:699.
- 101) De Jong, F.H., A.H. Hey y H.J. Van der Molen. (1973), J. Endocrinol., 57:277.

- 102) Catt K.J., T. Tsuruhara, C. Mendelson y M.L. Dufau.  
(1974). En: Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis. Editores: M.L. Dufau y A.R. Means.  
New York. Plenum Press, pag. 1.
- 103) Frowein J. y W. Engel. (1975). J. Endocr., 64:59.
- 104) Hauger R.L., Y-DI. Chen, R.P. Kelch y A.H. Payne. (1977).  
J. Endocr., 74:57.
- 105) Purvis K., O.P.F. Clausen, P.A. Torjesen y V. Hansson.  
(1979). Int. J. Androl., 2:74.
- 106) Thanki K.H. y A. Steinberger (1976). Endocr. Res. Comm.  
3:49.
- 107) Purvis K., O.P.F. Clausen, P. Brandtzaeg y V. Hansson.  
(1978). Archs. Andrology, 1:299.

- 108) Purvis K., O.P.F. Clausen, N.M. Ulvik y V. Hansson.  
(1980). En: Testicular Development, Structure and  
Function. Editores: E. Steinberger y A. Steinberger,  
New York. Raven Press, pag. 211.
- 109) Dufau M.L., A.J. Hsueh, S. Cigorruga, A.J. Baubal y K.  
J. Catt. (1978). En: Endocrine Approach to male contra-  
ception. Editores: V. Hansson, E.M. Ritzen, K. Purvis  
y F.S. French. Copenhagen. Scriptor p. 193.
- 110) Alder A., H. Burger, J. Davis, A. Dulmanis, B. Hudson,  
G. Sarfaty y W. Stratton. (1968). Brit. Med. J., 1:28.
- 111) Verjans H.L., F.H. de Jong, B.A. Cooke, H.J. Van der  
Molen y K.B. Eik-Nes. (1974). Acta Endocr. (Kbh), 77:636.
- 112) de Jong F.H., J.T.J. Vilenbroek y H.J. Van der Molen.  
(1975). J. Endocr., 65:281.

- 113) Van Beurden W.M.O., E. Mulder, F.H. de Jong y H.J. Van der Molen. (1977). *Endocrinology*, 101:342.
- 114) Brinkmann A.O., E. Mulder, G.J.M. Lamers-Stahlhofen y H.J. Van der Molen. (1972). *Febs. Letters*, 26:301.
- 115) Mulder E., A.O. Brinkmann, G.J.M. Lamers-Stahlhofen y H.J. Van der Molen. (1973). *Febs. Letters*, 31:131.
- 116) Danutra V., M.E. Harper, A.R. Boyns, E.N. Cole, B.G. Brownsey y K. Griffiths. (1973). *J. Endocr.*, 57:207.
- 117) Mallampati R.S. y D.C. Johnson. (1973). *Neuroendocrinology*, 11:46.
- 118) Chowdhury M., R. Tcholakian y E. Steinberger. (1974). *J. Endocr.*, 60:375.
- 119) Dorner G., F. Stahl, W. Rohde y D.Schnorr. (1975). An apparently direct inhibitory effect of oestrogen on the human testis. *Endocrinologie*, 66:221.

- 120) Oshima M., K. Wakabayashi y B. Tamaoki. (1967). *Biochim. Biophys. Acta*, 137:356.
- 121) Harper M.E., C.G. Pierrepont, A.R. Fahmy y K. Griffiths. (1971). *J. Endocr.*, 49:213.
- 122) Yanaihara T. y P. Troen. (1972). *J. Clin. Endocr.*, 34:968.
- 123) Odell W.D., R.S. Swerdloff, H.S. Jacobs y M.A. Hescox. (1973). *Endocrinology*, 92:160.
- 124) Ketelslegers J.M., A.J.W. Hsueh, W.D. Hetzel y K.J. Catt. (1976). 5th International Congress of Endocrinology. Hamburg. Abstract 519.
- 125) Chen Y.I., A.H. Payne y R.P. Kelch. (1976). *Proc. Soc. Exp. Biol. (NY)*, 153:473.

- 126) Van Beurden W.M.O., B. Roodnat, F.H. de Jong, E. Mulder y H.J. Van der Molen. (1976). *Steroids*, 28:847.
- 127) Samuels L.T., G.J. Short y R.A. Huseby. (1964). *Acta Endocr. (Kbh)* 45:487.
- 128) Samuels L.T., T. Uchikawa, M. Zain-ul-Abedin y R.A. Huseby. (1969). *Endocrinology*, 85:96.
- 129) Kalla N.R., B.C. Nisula, R.H. Menard y D.L. Loriaux. (1977). *Endocrinology* 100 (Suppl) 82 (Abstract).
- 130) Murota S., M. Shikita y B. Tamaoki. (1966). *Biochim. Biophys Acta*, 117:241.
- 131) Mulder E., M.J. Peters, W.M.O. van Beurden, M. Galdier, F.F.G. Rommerts, F.F.G. Janszen y H.J. Van der Molen. (1976). *J. Endocr.*, 70:331.

- 132) Dorrington J.H. y D.T. Armstrong. (1975). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash, 72:2677.
- 133) Leach R.B., W.O. Maddock, I. Tokuyama, C.A. Paulsen y W.O. Nelson. (1956). Recent Progr. Hormone Res., 12:377.
- 134) Oshima H., L. Paraska, K.I. Yoshida y P. Trošn. (1977). J. Clin. Endocrinol. Metab., 45:1097.
- 135) Rosness P.A., A. Sinde y K.B. Eik-Nes. (1977). Biochim. Biophys. Acta, 488:55.
- 136) Koritz S.B., y A.M. Kumar. (1970). J. Biol. Chem., 245:152.
- 137) Menon K.M.J., N. Drosdowsky, R.I. Dorfman y E. Forchielli. (1965). Steroids, Suppl, 1:95.

- 138) Inano H., K. Suzuki, K. Wakabayashi y B. . Tamaoki.  
(1973). *Endocrinology*, 92:22.
- 139) Inano H. y B.I. Tamaoki. (1971). *Biochim. Biophys. Acta*, 239:482.
- 140) Kaartinen E., M. Laukkanen, J.A. Saure. (1971). *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 66:50.
- 141) Nayfeh S.N. y B. Baggett. (1969). *Steroids*, 14:269.
- 142) Kremers P., C. Tixhon y J. Gielen. (1977). *J. Steroid Biochem.*, 8:873.
- 143) Rodriguez-Rigau L.J., R.K. Tcholakian, K.D. Smith y E. Steinberger. (1977). *Steroids*, 29:771.
- 144) Van Beurden W.M.O., B. Roodnat, y H.J. Van der Molen.  
(1978). *Int. J. Androl., Suppl.* 2:374.



- 145) Mahajan K., y L.T. Samuels. (1962): Fed. Proc, 21:209  
(Abstract).
- 146) Matsumoto K., D.K. Mahajan y L.T. Samuels. (1974). En-  
docrinology, 94:808.
- 147) Sar M., W.E. Stumpf, W.S. Mc Lean, A.A. Smith, V.  
Hansson, S.N. Nayfeh y F.S. French. (1975). En: Hormo-  
nal Regulation of Spermatogenesis, Editores: F.S. French,  
V. Hansson, E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh, New York: Plenum  
Press, p. 311.
- 148) Wilson E. y A.A. Smith. (1975). En; Hormonal Regulation  
of Spermatogenesis. Editores F.S. French, V. Hansson,  
E.M. Ritzen y S.N. Nayfeh. New York: Plenum Press, p.  
281.
- 149) Chen Y.D.I., M.J. Shaw y A.H. Payne. (1977). Moll.  
Cell. Endocrinol. 8:291.

- 150) Purvis K., O.P.F. Clausen y V. Hansson. (1979). Biol. Reprod., 20:304.
- 151) Zipf W.B., A.H. Payne y R.P. Kelch. (1978). Endocrinology, 103:595.
- 152) Gavin J.R., J. Roth, D.M. Neville, P. De Meyts y D.N. Buell. (1974). Proc. Nat. Acad. Sci. Wash, 71:84.
- 153) Mukherjee C. y R.J. Lefkowitz. (1976). Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 73:1494.
- 154) Hinkle P.M. y A.H. Tashjian Jr. (1975). Biochemistry, 14:3845.
- 155) Lesniak M.A. y J. Roth. (1976). J. Biol. Chem., 251:3720.
- 156) Raff M. (1976). Nature (Lond), 259:265.

- 157) Kahn C.R., D.M. Neville Jr. y J. Roth. (1973). J. Biol. Chem., 248:244.
- 158) Kahn C.R. y J. Roth. (1976). En: Isolation of Hormone Receptors. Editor: G.S. Levey, Marcel Dekker, New York, p. 129.
- 159) Hsueh A.J.W., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1976). Biochim. Biophys Res. Comm., 72:1145.
- 160) Hsueh A.J.W., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 74:592.
- 161) Sharpe M. (1976). Nature (Lond), 264:644.
- 162) Conti M., J.P. Harwood, A.J.W. Hsueh, M.L. Dufau y K. J. Catt. (1976). J. Biol. Chem., 251:7729.
- 163) Conti M., J.P. Harwood, M.L. Dufau y K.J. Catt. (1977). Mol. Oharmacol, 13:1024.

- 164) Conti M., J.P. Harwood, M.L. Dufau y K.J. Catt. (1977).  
J. Biol. Chem. 252:8869.
- 165) Tsuruhara T., M.L. Dufau, S. Cigorruga y K.J. Catt.  
(1977). J. Biol. Chem. 252:9002.
- 166) Haour F. y J.M. Saez. (1977). Mol. Cell. Endocrinol.,  
7:17.
- 167) Chen Y.D.I. y A.H. Payne. (1977). Biochem. Biophys.  
Res. Comm., 74:1589.
- 168) Purvis K., P.A. Torjesen, E. Haug y V. Hansson. (1977).  
Moll. Cell. Endocrinol., 8:73.
- 169) Marsh J.M., T.M. Mills y W.J. Lemaire. (1973). Biochim.  
Biophys. Acta, 304:197.
- 170) Hunzicker-Dunn M. y L. Birnbaumer. (1976). Endocrinology,  
99:185.

- 171) Hunzicker-Dunn M. y L. Birnbaumer. (1976). *Endocrinology*, 99:198.
- 172) Hunzicker-Dunn M. y L. Birnbaumer. (1976). *Endocrinology*, 99:221.
- 173) Bockaer J., M. Hunzicker-Dunn y L. Birnbaumer. (1976). *J. Biol. Chem.*, 251:2623.
- 174) Cigorruga S., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1978). *J. Biol. Chem.*, 253:4297.
- 175) Dufau M.L., S. Cigorruga, A.J. Baukal, S. Sorrell, J.M. Bator, J.F. Neubauer y K.J. Catt. (1979). *Endocrinology*, 105:1314.
- 176) Conn P.M., T. Tsuruhara, M.L. Dufau y K.J. Catt. (1977). *Endocrinology*, 101:639.

- 177) Thorell J.J., y B.G. Johansson. (1971). En: Structure Activity Relationships of Proteins and Polypeptides hormones. Editores: M. Margoulies y F.E. Greenwold. Excerpta Medica. Amsterdam.
- 178) Axen R., J. Porath y S. Ernback. (1967). Nature, 214: 1302.
- 179) Cuatrecasas P., M. Wilchek y C.B. Anfinsen. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61:636.
- 180) Catt K.J. (1969). Acta Endocrinol. (Kbh). 63.(Suppl) 142:222.
- 181) Mc Arthur J.W. (1952). Endocrinology, 50:304.
- 182) Parlow A.F. (1961). En: Human Pituitary Gonadotropins. Editor: A. Albert. C.C. Thomas. Publishers, Springfield, p. 300.

- 183) Catt K.J., J.M. Ketelslegers y M.L. Dufau. (1976). En: Methods in Receptor Research. Editor M. Bleckey, Marcel Dekker, New York. Vol. 1, p. 175.
- 184) Dufau M.L., y K.J. Catt. (1973). Nature. New Biol., 242:246.
- 185) Charreau E.H., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1974). J. Biol. Chem., 249:4189.
- 186) Catt K.J., M.L. Dufau y T. Tsuruhara. (1972). J. Clin. Endocr. 34:123.
- 187) Dufau M.L., E.H. Charreau y K.J. Catt. (1973). J. Biol. Chem., 248:6973.
- 188) Scatchard G. (1949). Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660.
- 189) Dufau M.L., K.J. Catt, T. Tsuruhara y D. Ryan. (1972). Clin. Chim. Acta, 37:109.

- 190) Di Pietro D.L., P.D. Brown y C.A. Strott. (1972). J. Clin. Endocr. Metab., 35:729.
- 191) Abraham G.E., R. Swerldoff, D. Tulchinsky y W.D. Odell. (1971). J. Clin. Endocrinol. Metab., 32:619.
- 192) Nieschlag D.L., D.L. Louriaux y M.B. Lipsett. (1972). Steroids, 19:669.
- 193) Wu Ch-H y L. Lundy. (1971). Steroids, 18:90.
- 194) Dufau M.L., K.J. Catt y T. Tsuruhara. (1972). Endocrinology, 90:1032.
- 195) Vaitukaitis J.L., G.D. Braunstein y G.T. Ross. (1972). Am. J. Obstet. Gynecol. 113:751.
- 196) Steiner F., L.C.W. Parker y D.M. Kipnis. (1972). J. Biol. Chem., 247:1106.



- 197) Harper J.F. y G. Brooker. (1975). J. Cyclic Nucleotide Res, 1:207.
- 198) Catt K.J., A. Baukal, T.F. Davies y M.L. Dufau. (1978). Endocrinology 104:17.
- 199) Burstein S. y M. Gut. (1973). Ann. NY. Acad. Sci, 212:262.
- 200) Goldman A.S., W.C. Yakovac y A.M. Bongiovanni. (1965). Endocrinology, 77:1105.
- 201) Goldman A.S. (1967). J. Clin. Endocrin. Metab., 27:325.
- 202) Neville A.M. y L.L. Engel. (1968). Endocrinology, 83: 873.
- 203) Goldman A.S. (1967). J. Clin. Endocrinol. Metab., 27: 320.

- 204) Menard H.R., F.C. Bartter y G.J.R. Gillette, (1976).  
Arch. Biochem. Biophys., 173:395.
- 205) Menard R.H., B. Stripp y J.R. Gillette. (1974). Endo-  
crinology, 94:1628.
- 206) Tamaoki B. y H. Inano. (1973). En: Proceedings of the  
4th International Congress of Endocrinology. Editores:  
R.O. Seori, F.J. Elking y I.W. Henderson. Excerpta Me-  
dica, Amsterdam, p. 832.
- 207) Sikita M., H. Kabizaki y B.I. Tamaoki. (1964). Steroids,  
4:521.
- 208) Steinman R.M. y Z.A. Cohen. (1976). En: Biogenesis and  
Turnover of Membrane Macromolecules. Editor. J.J. Cooke,  
Raven Press, New York, p. 1.
- 209) Ascoli M., y D. Puett. (1977). Febs. 75:77.

- 210) Chen T.T., J.H. Abel, M.C. Mc Clellan, H.R. Sawyer, M.A. Dickman y G.D. Niswender. (1977). *Cytobiologie*, 14:412.
- 211) Brown M.S. y J.L. Goldstein. (1976). *Science*, 191:150.
- 212) Auclair C., P.A. Kelly, D.H. Coy, A.V. Schally y F. Labrie. (1977). *Endocrinology*, 101:1890.
- 213) Nozu K., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1981). *J. Biol. Chem*, 256:1915.
- 214) Huseby R.A., O.V. Dominguez y L.T. Samuels. (1961). *Recent Progress Horm. Res.*, 17:21.
- 215) Tcholakian R.K., M. Chowdury y E. Steinberger. (1974). *J. Endocr.*, 63:441.
- 216) Bartke A., K.I.H. Williams y D. Dalterio. (1975). *Biology of Reproduction*, 17:645.

- 217) Hsueh A.J.W., M.L. Dufau y K.J. Catt. (1978). *Endocrinology*, 103:1096.
- 218) Bartke A., M. Mason, S. Dalterio y F. Bex. (1978). *J. Endocrinol.*, 79:239.
- 219) Watson J. y J.W.H. Howson (1977). *J. Reprod. Fertil.*, 49:375.
- 220) Jordan V.C., C.J. Dix, L. Rowsby y G. Prestwich. (1977). *Mol. Cell. Endocrin.*, 7:177.
- 221) Samuels L.T., G.J. Short y R.A. Hubesy (1964). *Acta Endocrinol.*, 45:487.
- 222) Dupre J., R.V. Brooks, y H. Hyde. (1964). *J. Endocrinol.*, 29 (Abstr) Proc. VII. viii.
- 223) Wang C., W.G. Baker y H.G. Burger (1975). *Clin. Endocrinol.*, 4:399.

- 224) Stewart-Bentley M. y R. Horton. (1973). *Metab. Clin. Exp.*, 22:875.
- 225) Sharma D.C. y J.L. Gabrielove. (1971). *Acta Endocrinol.*, 66:737.
- 226) Mc Donald P.C., J.M. Grodin, y P.K. Siiteri. (1971).  
En: *Dynamics of androgen and estrogen in control of gonadal steroid secretion*. Editores D.T. Baird y J. A. Strone. Edinburgh University Press. Edinburgh, Scotland, 158.
- 227) Vermeulen A., M. Musshi y L. Verdonck. (1972). *Proceedings of the 4th International Congress of Endocrinology*. Abstract 305. Washington D.C.
- 228) Hsueh A.J.W. y G.F. Erickson. (1979). *Nature (Lond.)* 281:66.

- 229) Charreau E.H., J. Calvo, K. Nozu, O. Pignataro y M.L. Dufau. (1981). 63rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Cincinnati, Ohio. Abst. 643.
- 230) Hattori M. (1982). 64th Annual Meeting of the Endocrine Society. San Francisco. Abst. 41.
- 231) Aquilano D.R. y M.L. Dufau. (1982). 64th Annual Meeting of the Endocrine Society. San Francisco. Abst. 951.